

妊娠子宮における子宮筋 Side Population 細胞の役割

小野 政徳¹⁾, 丸山 哲夫¹⁾, 梶谷 宇¹⁾, 内田 浩¹⁾, 荒瀬 透¹⁾, 各務 真紀¹⁾, 小田 英之¹⁾,
西川 明花¹⁾, 升田 博隆¹⁾, 長島 隆¹⁾, 太田 邦明¹⁾, 伊藤 守³⁾, 浅田 弘法¹⁾, 岡野 栄之²⁾,
松崎 有未²⁾, 吉村 泰典¹⁾

- 1) 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
2) 慶應義塾大学医学部生理学教室
3) 実験動物中央研究所

はじめに

子宮は妊娠・分娩時に著明な増大を示し、それが妊娠ごとに繰り返されるという非常にユニークな雌性生殖器官である。その主な構成組織である子宮筋では、妊娠時、細胞肥大と細胞増殖が著明である [1]。しかしこれまで増殖した子宮平滑筋細胞の由来に関しては明らかにされていない。また子宮平滑筋における組織幹細胞の同定と単離については、その試みすら、これまで一切なされていない。近年さまざまな器官・組織に存在する固有の組織幹細胞が、それぞれの器官・組織の維持と再生を担っていることが明らかとなってきた [2]。それゆえ組織の再生を繰り返す骨髄・腸管・骨格筋などと同様に、子宮平滑筋においても、組織幹細胞の存在が示唆される。子宮筋幹細胞の表面マーカーなどが明らかになっていないため、子宮筋幹細胞候補集団としてヘキスト 33342染色を用いた side population (SP) 法を選択した [3, 4]。ヘキスト 33342は DNA 結合色素であり、単一色素でありながら 450/675nm という 2つの波長の蛍光を発するという特長をもつ。その特徴ある染色パターンのなかで、両波長をほとんど発しない細胞集団 SP 細胞は、高い組織幹細胞活性を示すことが報告されており、骨髄を含め骨格筋、腸管、心臓、皮膚、精巣などさまざまな臓器において組織幹細胞として機能していることが明らかになりつつある [5-10]。本研究では、ヒト子宮平滑筋における SP の同定・単離と機能解析を通じて、子宮筋における幹細胞システムの存在を明らかにすることを目的とした [11]。

ヒト子宮筋 Side Population 細胞の分離

悪性腫瘍・子宮腺筋症を除く良性疾患で子宮を摘出する患者の同意を得て、手術摘出63検体(患者年齢35~54歳)より正常子宮筋を採取した。子宮筋組織を用手的に 1 mm³以下に細切後、酵素処理を行った。分散細胞を得た後に子宮筋組織幹細胞の候補集団を SP 法 [3, 4] にて抽出した。SP は様々な臓器・組織において幹細胞活性をもつことが、これまで報告されてきている [5-8]。われわれは63検体のヒト子宮筋検体から生細胞のうち平均 2.97 ± 1.13% の子宮筋 SP (myoSP) が存在することを解析した(図1)。myoSP に 50 μM のレセルピンを加えることにより、myoSP の細胞膜上の ABCG2 トランスポーターが阻害され、SP 分画が消失することを確認した。分離した子宮筋細胞における myoSP の出現割合は、検体供与患者の年齢・既往分娩歴・検体が回収された時期の生理周期に影響を受けなかった。

細胞表面抗原の比較解析

次に myoSP と子宮筋 main population (myoMP) の

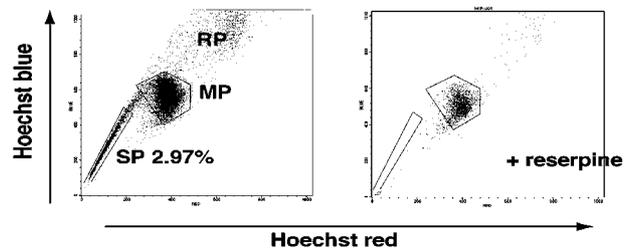


図1 ヒト子宮筋 SP 分画 (myometrial SP, myoSP) の分離
(左) 正常子宮筋組織を採取し、機械的細切および酵素処理により分散細胞を得て Hoechst 染色した後、フローサイトメトリで解析したところ、子宮筋 SP 分画 (myometrial SP, myoSP) が存在した (図中 SP 分画)。
(右) 50 μM のレセルピンを加えると、myoSP 分画は消失した。

連絡先: 小野政徳, 慶應義塾大学医学部産婦人科学
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35
TEL: 03-3353-1211 (代)
FAX: 03-5363-3578
E-mail: di045015@sc.itc.keio.ac.jp

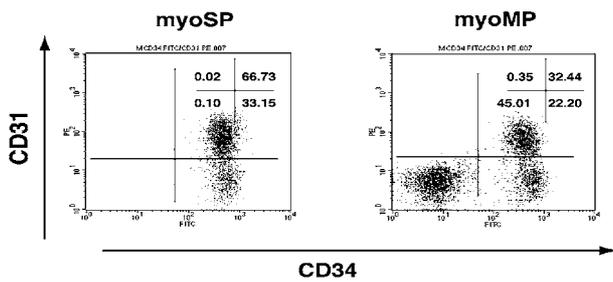


図2 myoSPとmyoMPにおける細胞表面抗原CD31とCD34の発現解析
myoSPとmyoMPにおいてCD31とCD34の発現に違いが認められた。とくにmyoSPにおいてはCD34抗原は陽性であった。

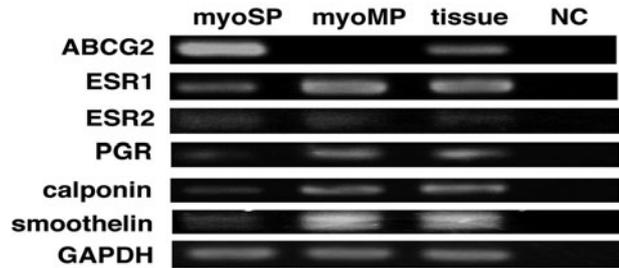


図4 myoSPにおける遺伝子発現解析
myoSPでは幹細胞マーカーであるABCG2の高発現を認めたが、性ステロイド受容体や平滑筋分化マーカーは発現が弱く、myoSPは未分化な状態であると考えられた。
NC：陰性コントロール

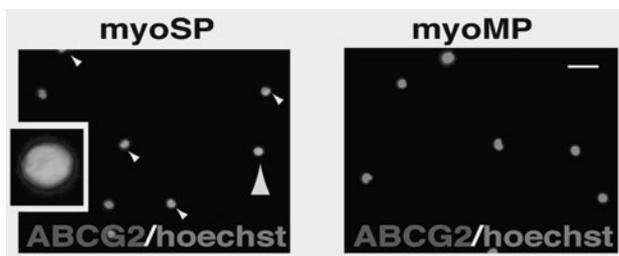


図3 免疫細胞染色によるmyoSPとmyoMPにおけるABCG2の発現解析
myoSPでは幹細胞マーカーであるABCG2が陽性である。
Bar: 10 μ m.

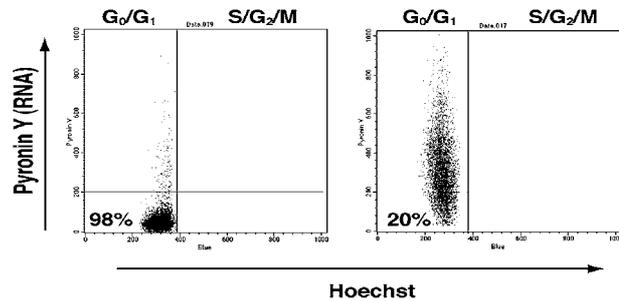


図5 myoSPとmyoMPにおける細胞周期の解析
myoSPの多くは細胞周期上G₀期すなわち静止期に存在した。

細胞表面抗原の比較解析を行った。myoSPはその99%がCD34陽性であるのに対し、myoMPは55%の陽性率であった。CD34陽性のmyoSPはさらにCD31陽性とCD31陰性の集団に分画され、陽性細胞の割合は67%であった。CD45は0.11 \pm 0.05%の陽性率であった(図2)。myoSPにおける血管内皮細胞の分化マーカー(CD106, VEGFR-1およびvon Willebrand factor (vWF))の発現は陰性であった。

myoSPおよびmyoMP細胞における発現遺伝子の比較解析

フローサイトメトリーのデータと一致して、myoSPは免疫細胞染色においてABCG2を発現していた(図3)。RT-PCRによる遺伝子発現解析においてもmyoSPではmyoMPと比較して有意にABCG2の発現が上昇していた。また、myoSPではmyoMPと比較してエストロゲン受容体 α 、プロゲステロン受容体、平滑筋細胞マーカーであるカルポニン、スムーセリンの発現が有意に低下しており、未分化細胞であることが示唆された(図4)。myoSPおよびmyoMPともにエストロゲン・レセプター β は低発現であり、ヒト非妊娠子宮におけるエ

ストロゲン・レセプター β の発現は低レベルであるという報告と一致していた[12]。

細胞周期の解析

組織幹細胞の1つの重要な特徴として、細胞周期上の静止期すなわちG₀にある細胞の割合が高いことが報告されている[13, 14]。ヘキスト・ピロニンY法を用いて解析した結果、myoSPはその98%がG₀に存在し、20%のmyoMPと比較して有意にG₀に存在する割合が高いことが判明した(図5)。

低酸素環境におけるmyoSPの増殖

次にmyoSPの培養を行ったが、myoSPは20%酸素濃度下培養にて増殖活性を示さなかった。そこで、さまざまな増殖因子を誘導することが知られている低酸素濃度下で培養を試みたところ、myoSPが効率良く増殖することを確認した(図6)。低酸素については最近、ES細胞、間葉系幹細胞の未分化性を保ち、なおかつ増殖効率を高めたという報告がされている[15-18]。細胞増殖の指標としてMTS法による検討を行ったところ、myoSP

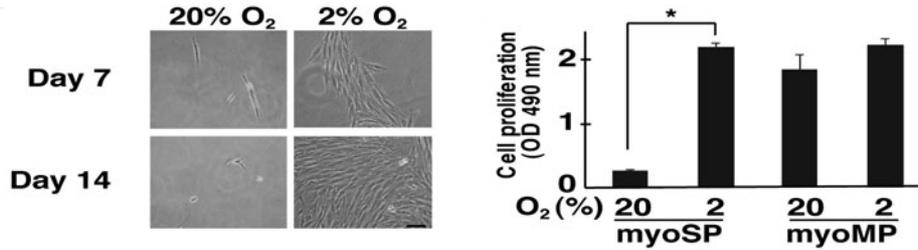


図6 低酸素環境における myoSP の増殖
 (左) 20%酸素濃度下にて効率的に増殖しなかった myoSP を 2%酸素濃度下にて培養したところ、myoSP の増殖が認められた。Bar: 500 μ m.
 (右) 細胞増殖活性を MTS 法にて解析したところ、低酸素培養条件下において myoSP は myoMP と同等の増殖活性を示した。*: P<0.05.

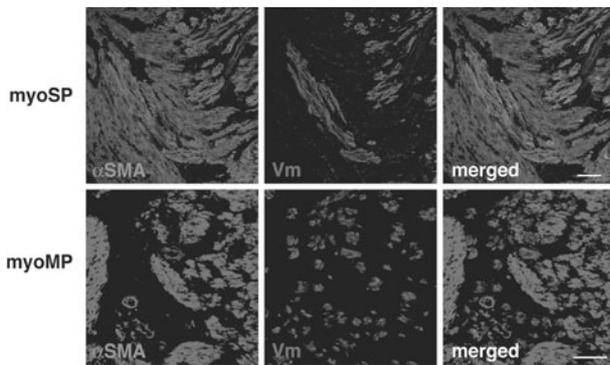


図7 in vivo における組織再構築能の解析
 (上) 5x10⁴個の myoSP を E2徐放錠を皮下に埋め込んだ NOG マウス子宮に移植したところ、子宮筋の再構築が認められた。
 (右) 同様の実験を myoMP について行ったところ、myoSP で認められた子宮筋の再構築は認められなかった。
 Bars: 50 μ m (upper) and 100 μ m (lower)

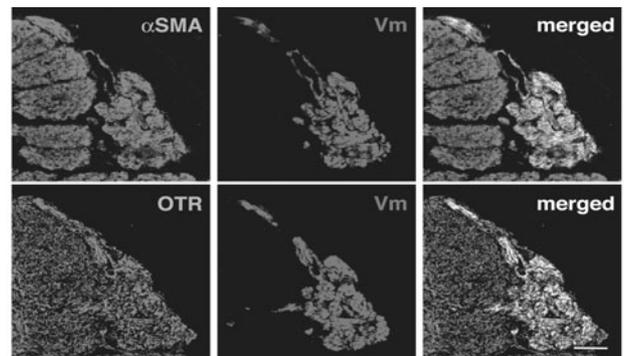


図8 妊娠 NOG マウスにおける再構築子宮筋のオキシトシン受容体発現解析 myoSP を移植した妊娠 NOG マウスにおける再構築子宮筋においてオキシトシン受容体の発現が認められた。Bar, 100 μ m.

は低酸素において20%酸素培養と比較して有意に増殖効率が改善し、myoMP とほぼ同等の増殖効率が得られた。myoSP の培養に低酸素条件を要したことは、子宮筋由来疾患のうち、とくに子宮筋腫の病因を示唆する可能性がある。子宮筋腫は婦人科疾患においてもっとも遭遇することの多い良性腫瘍性疾患であるが、不正出血・骨盤痛・頻尿・不妊・流産の原因疾患である。子宮筋腫の筋腫核を構成する細胞はその起源において単一細胞由来であることが報告されている [19]。さらに、子宮筋腫は低酸素環境によって増大することが知られている [20, 21]。低酸素環境は Wnt シグナルと関連した、分泌型フリズルド蛋白を上昇させ、子宮筋腫細胞の抗アポトーシス活性を上昇させる [21]。月経時では、子宮筋の収縮と血管収縮により、子宮筋は低酸素環境下にあると考えられている。繰り返す月経が myoSP を増殖させ、そのなかの一部の myoSP の異常が子宮筋腫の発生に寄与している可能性が示唆される。

免疫不全マウスへの移植および免疫蛍光染色による解析

続いて移植実験により、組織再構築能を検討した。移植マウスには NOG マウス (重症免疫不全マウス) を用いた [22]。移植時にマウスの両側卵巣を摘出し、マウス皮下にエストロゲン徐放錠を移植した [23]。16匹のマウスの左右子宮角に、それぞれ5x10⁴個の myoSP を移植した。同時に16匹のマウスに同様に myoMP を移植して対照実験とした。移植して10週間後に子宮を摘出して、免疫染色を行った。myoSP を移植したマウス子宮では、ヒト由来のビメンチンを発現する組織が構築されていた (図7)。ヒト由来ビメンチン細胞を発現する細胞は、抗ヒト核抗原および平滑筋マーカーである α 平滑筋アクチンを共発現していた。したがって、myoSP の移植により子宮平滑筋様の組織がレシピエント子宮内で再構築されたと考えられた。一方、myoMP では平滑筋様の組織再構築はみられなかった。したがって子宮平滑筋における組織幹細胞は myoSP に存在していることが示唆された。

妊娠子宮における myoSP の関与

妊娠子宮における子宮の再構築および子宮平滑筋細胞増殖に対する myoSP の関与を調べるため、myoSP 移植後に雌マウスを交配し妊娠させた。オキシトシン受容体は妊娠・分娩時に子宮筋において発現上昇することが報告されている [16, 17, 24-26]。われわれは妊娠子宮において myoSP がヒト子宮平滑筋組織を再構築し、同時にオキシトシン受容体を発現することを確認した (図 8)。このことは、myoSP が組織幹細胞特性である自己組織構築能を有するのみならず、妊娠子宮の機能発現に寄与する可能性を示唆する。

myoSP の多分化能に関する検討

増殖させた myoSP を 20% 酸素環境に移し、培地を骨分化誘導培地に変えて培養したところ、骨芽細胞の指標となるアルカリ・フォスファターゼ活性が陽性になった (図 9 A)。さらに RT-PCR による遺伝子発現解析において骨細胞分化マーカーを発現していた (図 9 B)。また、培地を脂肪分化誘導培地に変えて培養したところ、脂肪細胞の指標となるオイル・レッド O 陽性細胞が認められた (図 9 C)。さらに RT-PCR による遺伝子発現

解析において脂肪細胞分化マーカーを発現していた (図 9 D)。子宮筋腫は時に脂肪変性を起こし、ごくまれに骨変性を起こすことが知られているが [27, 28]、これらに myoSP の多分化能が関与している可能性が示唆される。われわれの考察と同様アラングらは β カテニンのミューラー管由来臓器特異的ノックアウトマウスの解析により、子宮が脂肪変性を起こすことを報告し、子宮筋幹細胞の存在および脂肪細胞への分化能について言及した [29]。これらの結果は、子宮体部に由来する特徴的な腫瘍である子宮筋腫・子宮肉腫・ミューラー管混合腫瘍などの発生に子宮筋幹細胞が関与している可能性を示唆する。

おわりに

myoSP は多分化能を有し、子宮筋に分化することができるのみならず、組織再構築能を有している。このように、myoSP は、子宮筋の発生機構、妊娠・分娩における子宮筋の増殖・退縮・機能発現を担う細胞メカニズム、さらに子宮筋腫などの子宮筋由来疾患の病因を解析するうえで有用な生物資源となる。また myoSP は他臓器治療における細胞マテリアルとしても臨床応用が期待される。

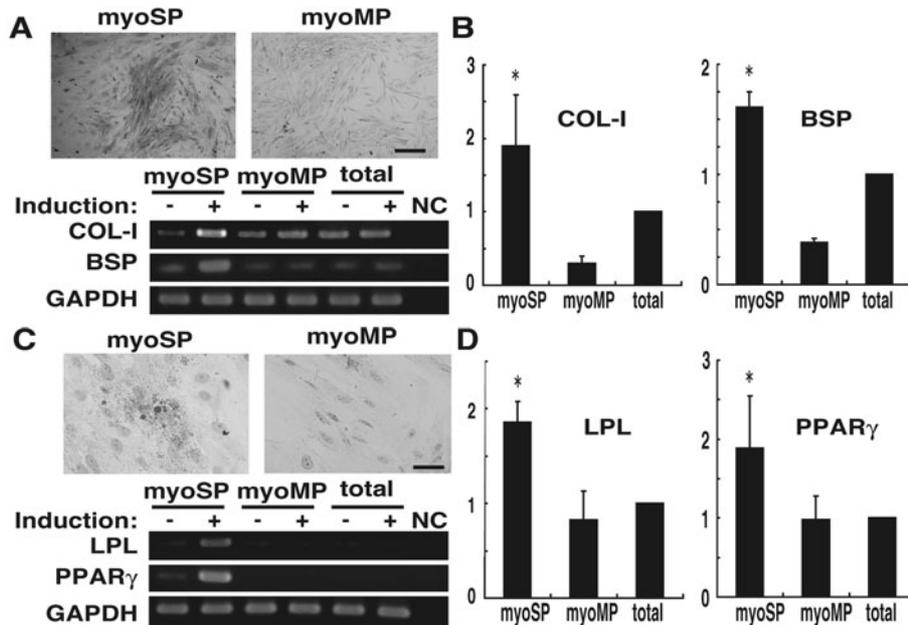


図 9 myoSP の多分化能に関する検討

(A) myoSP を骨細胞分化誘導培地にて培養したところ、アルカリフォスファターゼ陽性の細胞出現が認められた。Bar, 500 μ m。

(B) 骨細胞特異的な遺伝子の発現も認められた。*, P<0.05

(C) myoSP を脂肪細胞分化誘導培地にて培養したところ、オイル・レッド O 陽性の細胞出現が認められた。Bar, 250 μ m。

(D) 脂肪細胞特異的な遺伝子の発現も認められた。*, P<0.05

文献

1. Shynlova O, Oldenhof A, Dorogin A, Xu Q, Mu J, Nashman N, Lye SJ (2006) Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation. *Biol Reprod* 74, 839-849.
2. Korbling M, Estrov Z (2003) Adult stem cells for tissue repair- a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349, 570-582.
3. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183, 1797-1806.
4. Challen GA, Little MH (2006) A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 24, 3-12.
5. Redvers RP, Li A, Kaur P (2006) Side population in adult murine epidermis exhibits phenotypic and functional characteristics of keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 13168-13173.
6. Schienda J, Engleka KA, Jun S, Hansen MS, Epstein JA, Tabin CJ, Kunkel LM, Kardon G (2006) Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 945-950.
7. Montanaro F, Liadaki K, Volinski J, Flint A, Kunkel LM (2003) Skeletal muscle engraftment potential of adult mouse skin side population cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9336-9341.
8. Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC, Okano H (2004) Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity* 20, 7-93.
9. Pfister O, Mouquet F, Jain M, Summer R, Helmes M, Fine A, Colucci WS, Liao R (2005) CD31-but Not CD31 + cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res* 97, 52-61.
10. Lo KC, Lei Z, Rao Ch V, Beck J, Lamb DJ (2004) De novo testosterone production in luteinizing hormone receptor knockout mice after transplantation of leydig stem cells. *Endocrinology* 145, 4011-4015.
11. Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y (2007) Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 18700-18705.
12. Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I, Tamaya T (2003) Expression of estrogen receptor alpha and beta in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 68, 11-19.
13. Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF (2002) The chiascuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 100, 4266-4271.
14. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161.
15. Zhu LL, Wu LY, Yew DT, Fan M (2005) Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Mol Neurobiol* 31, 231-242.
16. Kimura T, Takemura M, Nomura S, Nobunaga T, Kubota Y, Inoue T, Hashimoto K, Kumazawa I, Ito Y, Ohashi K, Koyama M, Azuma C, Kitamura Y, Saji F (1996) Expression of oxytocin receptor in human pregnant myometrium. *Endocrinology* 137, 780-785.
17. Kubota Y, Kimura T, Hashimoto K, Tokugawa Y, Nobunaga K, Azuma C, Saji F, Murata Y (1996) Structure and expression of the mouse oxytocin receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 124, 25-32.
18. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T (2006) Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 207, 331-319.
19. Walker CL, Stewart EA (2005) Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* 308, 1589-1592.
20. Pavlovich CP, Schmidt LS (2004) Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 4, 381-393.
21. Fukuhara K, Kariya M, Kita M, Shime H, Kanamori T, Kosaka C, Orii A, Fujita J, Fujii S (2002) Secreted frizzled related protein 1 is overexpressed in uterine leiomyomas, associated with a high estrogenic environment and unrelated to proliferative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1729-1736.
22. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T (2002) NOD/SCID/gamma (c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100, 3175-3182.
23. Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, Ono M, Miyoshi H, Okano HJ, Ito M, Tamaoki N, Nomura T, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y (2007) Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c (null) immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 1925-1930.
24. Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81, 629-683.
25. Siebel AL, Gehring HM, Reytomas IG, Parry LJ (2003) Inhibition of oxytocin receptor and estrogen receptor-alpha expression, but not relaxin receptors (LGR7), in the myometrium of late pregnant relaxin gene knockout mice. *Endocrinology* 144, 4272-4275.
26. Takemura M, Nomura S, Kimura T, Inoue T, Onoue H, Azuma C, Saji F, Kitamura Y, Tanizawa O (1993) Expression and localization of oxytocin receptor gene in human uterine endometrium in relation to the menstrual cycle. *Endocrinology* 132, 1830-1835.
27. Wang X, Kumar D, Seidman JD (2006) Uterine lipoleiomyomas: a clinicopathologic study of 50 cases. *Int J Gynecol Pathol* 25, 239-242.
28. Bhattacharya N, Banerjee AK, Sengupta J (1998) Ossification of leiomyoma. *J Indian Med Assoc* 96, 99.
29. Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, Teixeira J (2005) Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol* 288, 276-283.