

ヒト子宮内膜再構成システムを用いた *in vivo* 幹細胞アッセイの開発と内膜幹細胞の同定

宮崎 薫¹⁾, 丸山 哲夫¹⁾, 升田 博隆¹⁾, 小田 英之²⁾, 内田 明花¹⁾, 内田 浩¹⁾, 吉村 泰典¹⁾

1) 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

2) 永寿総合病院産婦人科

はじめに

ヒト子宮内膜はホルモン制御下に各月経周期で再生・分化・剥離を遂げる非常に再生能力の高い組織であり [1], この周期的な再生には子宮内膜幹/前駆細胞が寄与すると考えられる. 近年, 子宮内膜幹/前駆細胞の存在とその役割を示唆する所見がわれわれを含めいくつかのグループにより報告されてきた [2-4]. 子宮内膜幹/前駆体細胞の候補となる細胞集団として, クローン原性子宮内膜細胞 [5], 子宮内膜 side population (SP) 細胞 [4, 6-9], CD140b+CD146+間質細胞 [10], CD29+CD73+CD90+間質細胞 [11], W5C5+間質細胞 [12] が挙げられる. しかしながら, *in vivo* での幹細胞活性を解析する有力なアッセイ系が今までに存在しなかったため, どの細胞集団が真の子宮内膜幹/前駆細胞分画であるのか, 一致した見解が得られていない. SP細胞は, ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) によってDNA結合色素である Hoechst 33342を排出するという特性をもつ [13]. 多くの組織にSP細胞が存在し, 組織特異的幹細胞候補として報告されている [13]. われわれは以前, ヒト子宮内膜 side population 細胞 (ESP) の免疫不全マウスへの異種移植により, *in vivo* での子宮内膜様組織の再構成に成功した [8]. 子宮内膜 main population 細胞 (EMP) にはこの組織再構築能がないことから, ESPは幹細胞様性質を示すといえる. しかし再構築率は8%と低く [8], その原因としてESP単独では幹細胞活性を支持するのに十分な微小環境(ニッチ)を確保することができないことが考えられた. 本研究は, 細胞追跡と組織再構成システムを応用した斬新な子宮内膜幹細胞 *in vivo* アッセイを確立すること, そしてこのアッセイの使用を通してESPの幹細胞特性を調べることを目的とした.

連絡先: 宮崎 薫, 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35
TEL: 03-3353-1211
FAX: 03-3352-1598
E-mail: inquirer83@yahoo.co.jp

ESP および EMP の表面マーカー発現

良性疾患による腹式単純子宮全摘術を施行する患者 (年齢38~49歳) から文書による同意を得たうえで, 摘出子宮から子宮内膜 (n=8; 移植用に2例, 系譜マーカー発現解析用に6例) を採取した. 機械的処理・酵素処理にて子宮内膜細胞を単離し [4, 14], Hoechst 33342にて染色して, フローサイトメトリーにてESPおよびEMPを同定・分離した [4, 15, 16] (図1A). ESPとEMPにおける系譜マーカーの発現をフローサイトメトリーで解析した. その結果, 上皮細胞マーカー CD326 および間質細胞マーカー CD10の発現は両者で有意差を認めなかった (CD326, $26.6 \pm 4.1\%$ vs. $38.4 \pm 8.3\%$; CD10, $13.9 \pm 4.5\%$ vs. $23.3 \pm 10.3\%$) (図1B). 一方, 血管内皮細胞および間葉系幹細胞マーカー (CD31, CD34, および CD146) は ESP で有意に高値を示した (CD31, $51.4 \pm 6.6\%$ vs. $14.3 \pm 3.9\%$, $P < 0.01$; CD34, $45.7 \pm 7.1\%$ vs. $12.4 \pm 3.5\%$, $P < 0.005$; CD146, $24.5\% \pm 3.5\%$ vs. $2.3 \pm 0.5\%$, $P < 0.005$) (図1B). また, 子宮内膜の間葉系幹細胞様細胞と報告されている CD140b+CD146+細胞 [10] の割合は, EMP よりも ESP で有意に高かった ($4.1 \pm 0.9\%$ vs. $1.5 \pm 0.5\%$, $P < 0.05$) (図1C).

ESP および EMP を用いた *in vivo* 幹細胞アッセイ

赤色蛍光タンパクの一種である tandem Tomato (TdTom) および発光タンパクの一種である red-emitting firefly luciferase の同時発現が可能な自己不活化 HIV-1 由来レンチウイルスベクターを ESP あるいは EMP (それぞれ 1×10^4 細胞) に感染させて標識した. これらを標識していない全内膜細胞 (4.9×10^5 細胞) と各々混合し (ESP-graft, EMP-graft), NOD/Shi-scid, IL-2R γ null (NOG) マウス [17] の右腎被膜下に移植した (図2). 内因性卵巣ホルモンの影響を除去するため, 移植時に両側卵巣摘出を行い, 17β -estradiol および progesterone

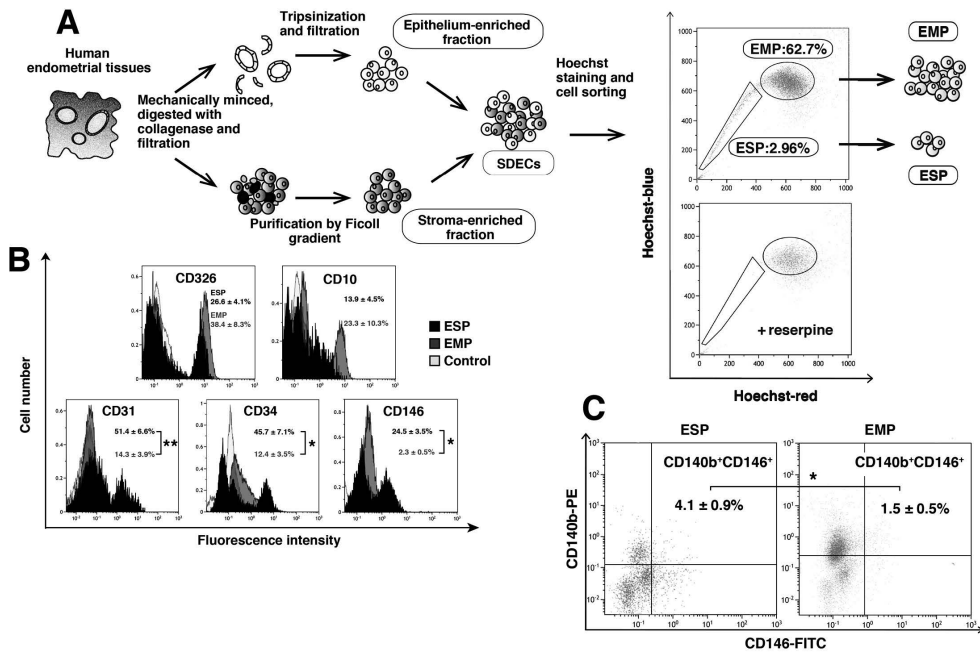


図1 ESP と EMP の分離および細胞表面マーカー発現
 (A) ヒト子宮内膜からの子宮内膜細胞の単離および Hoechst 33342 で染色した子宮内膜細胞からの ESP・EMP の分離。50 μ M reserpine 存在下にて ESP 分画の消失が確認できる。
 (B) ESP・EMP の細胞表面マーカー発現。* P <0.005. ** P <0.01.
 (C) ESP・EMP における CD140b+CD146+ 細胞の割合。* P <0.05。
 (Miyazaki K, et al, PLoS One 2012より引用)

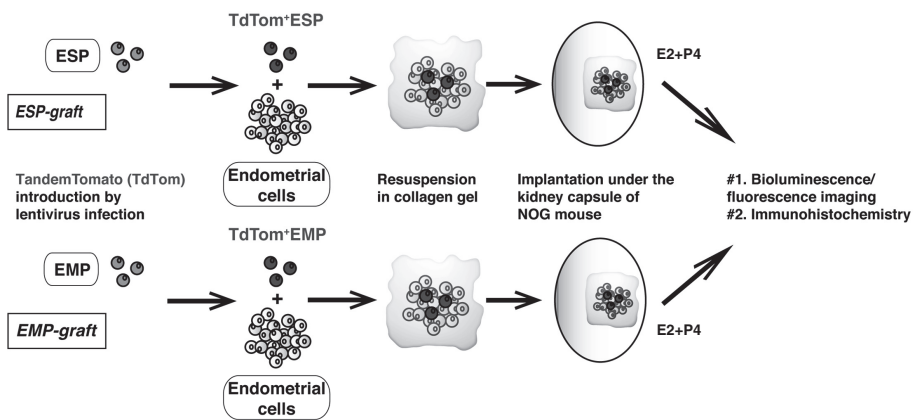


図2 ESP・EMP を用いた *in vivo* ヒト子宮内膜幹細胞アッセイ E2+P4 : 17 β -estradiol および progesterone の投与
 (Miyazaki K, et al, PLoS One 2012より引用)

を投与した。

再構築組織の組織学的解析

8週間後に右腎を摘出して組織切片を作製したところ、移植部位に一致して嚢胞状構造物を認めた(図3A)。H&E染色にて、同部位は腺腔構造をもった子宮内膜様構造物であることが示された(図3B)。すべての移植細胞から内膜様組織が再構築された。内膜構成成分の分

化マーカー(間質:ビメンチン[Vm], 腺上皮:サイトケラチン[Chk], 平滑筋:平滑筋アクチン[Sm], 血管内皮:CD31)のいずれかとTdTTomの2重免疫染色を行った。分化マーカー・TdTTom共陽性細胞/分化マーカー陽性細胞(%DPC/MPC)が各構成成分へのTdTTom陽性細胞の寄与を反映すると考え、これをESP-graftとEMP-graft各々36視野についてTissueQuest™を用いて定量的に解析・比較したところ、間質、腺上皮、血管内皮にて、ESP-graftの%DPC/MPCはEMP-graftよりも有

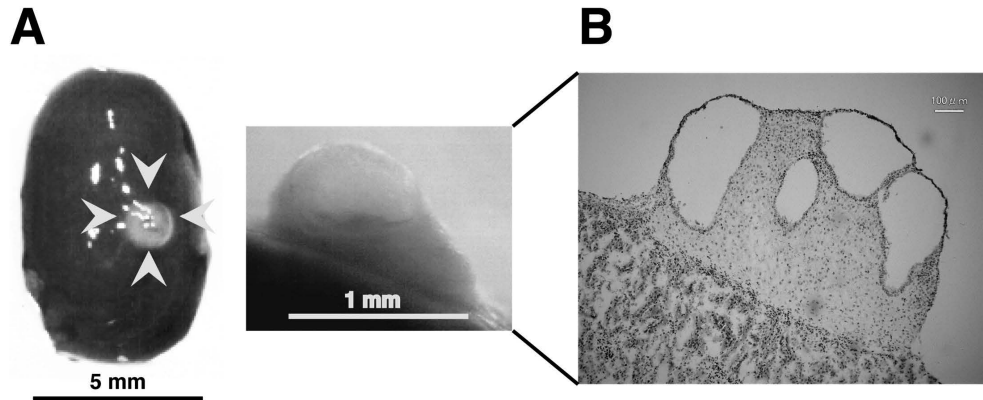


図3 *In vivo* 幹細胞アッセイにて再構築された組織の所見
 (A) 肉眼所見にて、移植部位に一致して嚢胞状構造物が認められる。
 (B) H&E 染色にて、同部位は腺腔構造をもった子宮内膜様構造物であることが分かる。
 (Miyazaki K, et al, PLoS One 2012より引用)

意に高値であった ($Vm: 26.2 \pm 3.4\%$ vs $11.0 \pm 2.6\%$, $P < 0.0005$; $Ck: 58.7 \pm 5.6\%$ vs $36.9 \pm 5.3\%$, $P < 0.01$; $CD31: 31.9 \pm 6.0\%$ vs $6.8 \pm 4.3\%$, $P < 0.0005$) (図4)。

おわりに

このアッセイでは、細胞追跡と組織再構成システムを応用することで、再生組織内における ESP の分化を観察することができた。ESP は EMP と比較して、上皮、間質、内皮細胞への分化の寄与が有意に高かった。この結果は、ESP 分画が子宮内膜構成要素に分化できる幹/前駆細胞を EMP 分画よりも高い割合で含むことを示唆している。実際、子宮内膜の間葉系幹細胞様細胞と報告されている $CD140b+CD146+$ 細胞 [10] の割合は、EMP よりも ESP で有意に高かった。以前の報告および今回の結果により、ESP は子宮内膜幹/前駆細胞候補である可能性が高いと考えられるが、ESP 分画の構成には 2 つの可能性がある。第 1 に、すべての子宮内膜構成要素を作り出すことのできる多能性幹細胞が含まれるかもしれない。第 2 に、各子宮内膜構成要素の前駆細胞が全て含まれているという可能性もある。ESP 分画が上皮、間質、内皮マーカー陽性細胞を含むという今回の結果のもとづく、後者の可能性のほうが高いと考えられる。

本研究にて、各子宮内膜構成成分への ESP 分画の分化を追跡できる、斬新な *in vivo* 子宮内膜幹細胞アッセイを確立した。このアッセイにおける子宮内膜組織再構成の効率は 100% であり、ESP 単独移植では 8% と低かったことを考慮すると再現性の面で大きなメリットがある。また、ニッチ存在下、すなわちより生理的な環境

での ESP の分化を観察できるのも利点である。本研究で新たに開発された *in vivo* 子宮内膜幹細胞アッセイは、今までに報告された、あるいはこれから発見されるであろうヒト子宮内膜幹/前駆細胞の同定及び評価に有用である。

謝 辞

本稿は 2012 年度に日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容をまとめたものである。本稿の執筆の機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会理事長 苛原 稔教授、第 17 回学術集会会長 吉村泰典教授に感謝いたします。

引用文献

1. Maruyama T, Yoshimura Y (2008) Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J* 55, 795-810.
2. Maruyama T, Masuda H, Ono M, Kajitani T, Yoshimura Y (2010) Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction* 140, 11-22.
3. Gargett CE, Masuda H (2010) Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod* 16, 818-834.
4. Miyazaki K, Maruyama T, Masuda H, Yamasaki A, Uchida S, et al (2012) Stem cell-like differentiation potentials of endometrial side population cells as revealed by a newly developed *in vivo* endometrial stem cell assay. *PLoS One* 7, e50749.
5. Chan RW, Schwab KE, Gargett CE (2004) Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 70, 1738-1750.
6. Kato K, Yoshimoto M, Adachi S, Yamayoshi A, Arima T, et al (2007) Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Hum Reprod* 22, 1214-1223.
7. Tsuji S, Yoshimoto M, Takahashi K, Noda Y, Nakahata T,

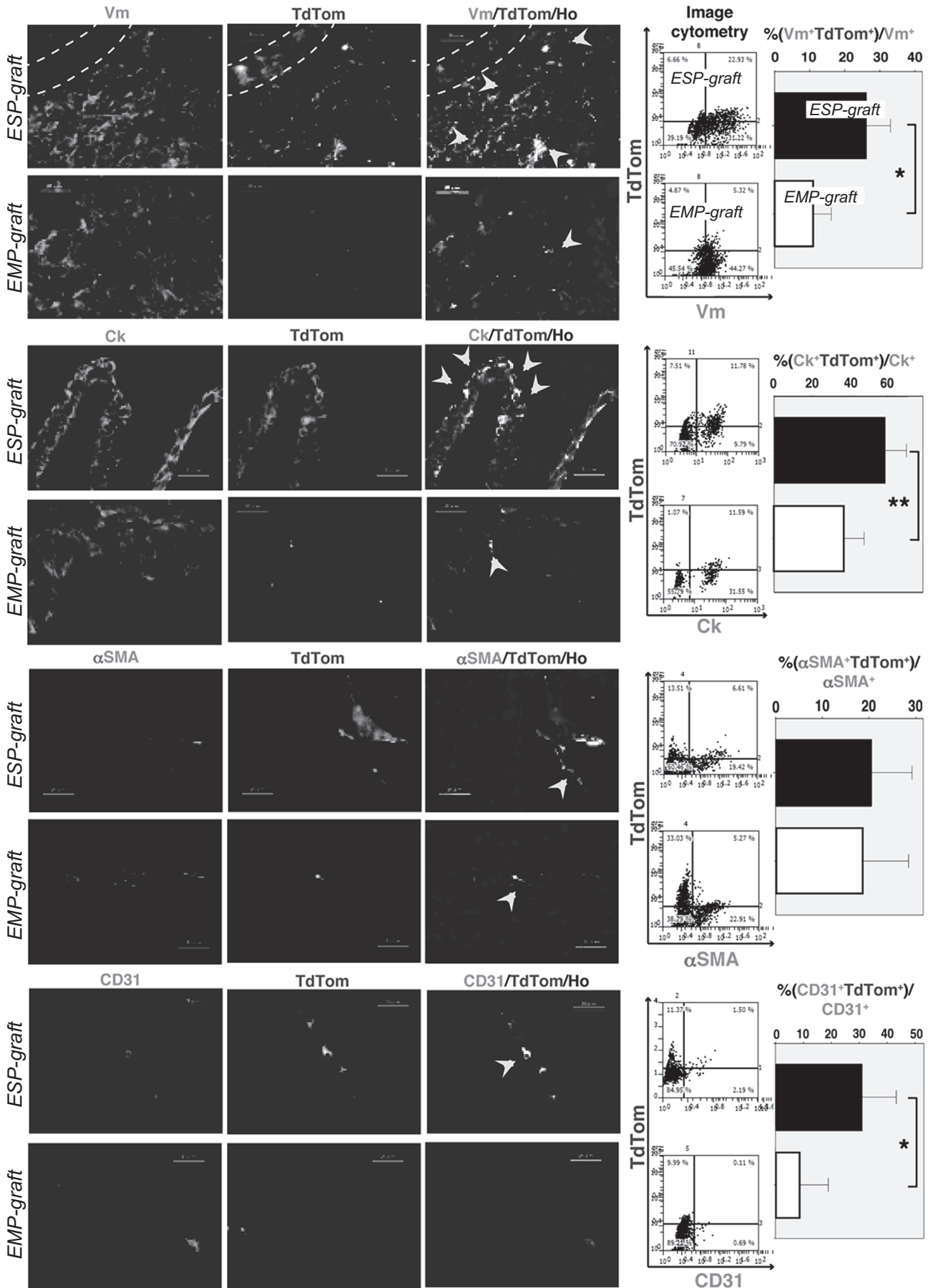


図4 ESP-graft 移植腎および EMP-graft 移植腎における各子宮内膜系譜マーカーと TdTom の共発現 (Miyazaki K, et al, PLoS One 2012より引用)

- et al (2008) Side population cells contribute to the genesis of human endometrium. *Fertil Steril* 90, 1528-1537.
8. Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, et al (2010) Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS One* 5, e10387.
 9. Cervello I, Gil-Sanchis C, Mas A, Delgado-Rosas F, Martinez-Conejero JA, et al (2010) Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PLoS One* 5, e10964.
 10. Schwab KE, Gargett CE (2007) Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod* 22, 2903-2911.
 11. Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, et al (2008) Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction* 135, 551-558.
 12. Masuda H, Anwar SS, Buhning HJ, Rao JR, Gargett CE (2012) A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplant* 21, 2201-2214.
 13. Challen GA, Little MH (2006) A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 24, 3-12.
 14. Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, et al (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.
 15. 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.
 16. Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC, Okano H (2004) Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity* 20, 87-93.
 17. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, et al (2002) NOD/SCID/gamma (c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100, 3175-3182.
 18. Maruyama T, Yoshimura Y (2012) Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)* 4, 2854-2863.