

ヒト子宮の平滑筋および平滑筋腫における幹細胞 —妊娠から子宮筋腫まで—

丸山 哲夫¹⁾, 小野 政徳²⁾

1) 慶應義塾大学医学部産婦人科

2) さいたま市立病院産婦人科

はじめに

組織幹細胞（成体幹細胞）は、成体のさまざまな組織や臓器に存在する未分化な細胞であり、通常は静止状態にあるが、さまざまな細胞を作る能力（多分化能）と本来の自己の組織を作る能力（自己組織構築能）を通じて、所属する（担当する）組織・臓器の新生・再生・維持や損傷に対する組織修復の役割を担う [1].

近年、多くの種類の組織・臓器において、成体幹細胞の存在が明らかになってきた。子宮も例外でなく、子宮を構成する子宮内膜や子宮平滑筋において、成体幹細胞の存在が報告されている [1, 2]。子宮内膜は、約40年に及ぶ生殖期間にわたって、周期的な増殖・分化・組織崩壊という構造および機能変化を月経毎に延々と繰り返す。このユニークな組織特性から、周期的・生理的な組織破壊（月経）に対応する能動的な幹細胞システムと強力な再生能・組織構築能の存在が強く示唆される [1, 2]。一方、妊娠に伴う子宮の劇的な増大に、子宮平滑筋の増殖と肥大が貢献していることが知られている [3]。生殖期間を通じて妊娠・分娩を何度も反復することが可能であることから、子宮平滑筋においても特有の幹細胞システムの存在が示唆される [4]。

子宮平滑筋を発生母地とする子宮平滑筋腫(子宮筋腫)は、子宮平滑筋細胞を主な構成成分とする良性平滑筋腫瘍であり、子宮平滑筋内あるいはその周辺に発生する [5]。卵巣ステロイド依存性の疾患であり、30代後半から40代の婦人の約30~40%に認められる。無症候性であることが多いが、過多月経や圧迫症状などに加えて、不妊症・不育症を惹起するなど性成熟期にある婦人の quality of life にさまざまな影響を及ぼす [5]。発生起源細胞に関しては、平滑筋細胞、胎生期遺残細胞、未熟な筋芽細胞などさまざまな説が提唱されている [4]。

その起源細胞の実体については不明であるが、それぞれの子宮筋腫結節を構成する細胞は、単一細胞由来（モノクローナル）であるとされている [4]。最近、子宮平滑筋腫における幹細胞が同定され、筋腫の起源細胞として注目されている [4]。

本稿では、最近のわれわれの研究成果も交えて、ヒト子宮の平滑筋および平滑筋腫における幹細胞について概説する。

子宮平滑筋の幹細胞

子宮は妊娠から分娩に至るまでに劇的な増大を示し、分娩後は劇的に退縮する。さらに、このダイナミックな変化が妊娠毎に繰り返される。子宮の主な構成組織である子宮平滑筋は、妊娠期間中、著明な細胞肥大と細胞増殖を呈する [4]。分娩後には、子宮の退縮に伴い子宮平滑筋細胞はアポトーシスに陥るが、引き続いて起こる子宮復古の過程では、新しい子宮平滑筋細胞が生み出される [4]。この一連の妊娠子宮のリモデリングを担う役者の1人として、子宮平滑筋における幹細胞が考えられるが、その実体については不明であった。そこで、子宮平滑筋における組織幹細胞の存在と役割を明らかにするために、われわれは、side population 法を用いて子宮筋幹細胞の同定と分離を試みた [6]。

Side population (SP) は、DNA 染色色素 (Hoechst33342) を細胞外に排泄する能力の高い細胞集団である [7]。さまざまな組織に少数存在し、その多くは所属する組織において高い幹細胞活性を有することが知られている。細胞膜トランスポーターである ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2) が DNA 染色色素排泄能を担う分子の1つであり、SP 細胞は ABCG2 を強く発現する [7]。この DNA 染色色素の排泄能を指標にして細胞を選別する SP 法を用いて、ヒト子宮筋幹細胞の同定と分離を試みた結果、子宮筋にも全体の約2%の割合で SP 分画 (myometrial SP, myoSP) が存在した [6]。myoSP 以外の子宮筋細胞の大部分を占める main

連絡先：丸山哲夫、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：tetsuo@keio.jp

population (myoMP) と myoSP の細胞周期を調べたところ、細胞周期上 G0期、すなわち静止期にある細胞が myoMP の20%に比べて myoSP では98%を占めていた。さらに、myoMP に比べて myoSP では、幹細胞マーカーである ABCG2や未分化マーカーである OCT-4/POU5F1の高発現を認めたが、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、および平滑筋分化マーカーの発現は低く、未分化な状態であった [6, 8]。このことは、myoSP が性ステロイドに直接反応するのではなく、周囲の平滑筋細胞などが反応することによって形成される微小環境(ニッチ)との相互作用で、myoSP の幹細胞特性が発揮される可能性が示唆される。

次に、卵巣摘出を施した重度免疫不全マウスの子宮に myoSP あるいは myoMP を移植した後、エストロゲンをマウスに投与したところ、10週間後の myoSP 移植部位に、高率にヒト平滑筋様組織が構築された [6]。また移植後マウスを妊娠させ、myoSP から再構築されたヒト子宮筋組織を解析した結果、オキシトシン受容体の発現が認められた。さらに、myoMP とは異なり、myoSP は脂肪や骨細胞への多分化能を有することが判明した。以上より、myoSP が、1) 未分化状態、2) 多分化能、3) 自己組織構築能、といった組織幹細胞特性を有することから、子宮筋において、myoSP を中心とする幹細胞システムが存在する可能性が示された [6]。

ただし、この SP 法にはいくつかの問題点がある [9]。1つは、Hoechst 染色の至適条件が細胞の種類によって異なる。さらに、実験条件や細胞の状態によって SP 分画の細胞組成も変動する。また、SP 分画をどのように設定するかなど結果の解釈に研究者間で相違が生じうる [9]。このように、色素排泄能を指標にする SP 法の限界を鑑みると、表面マーカーを用いる幹細胞の純化法が望まれる。われわれは最近、いくつかの表面マーカーを組み合わせることで myoSP を最も多く含む細胞集団を選別することに成功した [10]。

最初に一般的な組織幹細胞マーカーの中で myoSP に高発現している表面マーカーを検索・検討した結果、CD49f と CD34が選択的に高発現していることが判明した [10]。続いて、ヒト子宮手術検体から正常子宮筋組織を採取し、機械的・酵素的処理により細胞を分散し、予め Lin 陽性 (Lin⁺) 細胞 (非血管内皮・非血球・非リンパ球系) を除いて Lin 陰性 (Lin⁻) 細胞とした後、セルソーターにより Lin⁻かつ CD49f⁺CD34⁺細胞 (double positive cells; DP) とそれ以外の細胞 (non-DP) に分別した。この DP/Lin⁻および non-DP/Lin⁻のコロニー形成能ならびに骨・脂肪・軟骨細胞への分化能を *in vitro* で検討し

た。さらに重度免疫不全マウスの子宮への移植・妊娠実験により、移植ヒト細胞由来の構築組織の性状と組織量について、免疫染色およびヒト DNA を特異的に認識するプライマーを用いた real-time PCR を用いて調べた。その結果、DP/Lin⁻のみが SP 分画を含んでおり、DP/Lin⁻は他の分画に比べて有意にコロニー形成能および多分化能が高く、*in vivo* では子宮平滑筋様の組織を構築し得た。非妊娠やエストロゲン単独投与のマウス子宮に比べて、妊娠子宮において DP/Lin⁻に由来する構築組織の量が最も多かった。一方、non-DP/Lin⁻では多分化能と自己組織構築能は認められなかった [10]。

興味深い点として、myoSP も DP/Lin⁻も、低酸素下では効率よく増殖した [6, 10]。ラット子宮において、妊娠によって発生する子宮の物理的な伸張は、子宮筋を低酸素状態にする、という報告がある [11]。これらのデータを考え合わせると、妊娠子宮の増大に子宮平滑筋幹細胞の増殖が関与し、その増殖を促進する因子の1つは、低酸素である可能性が示唆される [4] (図1)。

子宮平滑筋腫の幹細胞

子宮筋腫は、雌性生殖器に発生する腫瘍のなかで最も頻度が高く、過多月経、月経痛、不妊などの多彩な症状を惹起する [5, 12]。頻度の高い疾患ではあるものの、その発生メカニズムはまだよく分かっていない。環境因子、遺伝的修飾、性ステロイドホルモンや tumor growth factor- β (TGFB) などのさまざまな生理活性物質の作用を受けることにより、子宮平滑筋細胞が平滑筋腫細胞に変化して、それを起源としてモノクローナルな腫瘍を形成するとされている [12] (図1)。遺伝的修飾としては、Mediator Complex Subunit 12 (MED12) 遺伝子の変異がきわめて高率に筋腫病変に認められると近年報告され、注目を集めている [13]。一方、低酸素も筋腫発生や増殖・進展に深く関与することが知られている [14]。子宮筋腫では組織中の酸素濃度が低く [15]、翻って低酸素は、Wnt シグナル経路の修飾分子 Frizzled-related protein 1を誘導し、アポトーシスの抑制を通じて筋腫の維持に働く [14]。月経時には虚血が起き低酸素環境になると考えられており [16]、これにより平滑筋幹細胞の増殖が惹起され、筋腫幹細胞への変化を促すのかもしれない (図1)。

近年、SP 分画は子宮筋腫細胞中にも存在し [17-19]、マウスへの移植実験において、エストロゲン、プロゲステロン、および正常平滑筋細胞の存在下で筋腫 SP (leiomyoma SP, LMSP) は平滑筋腫瘍を形成する高いポテ

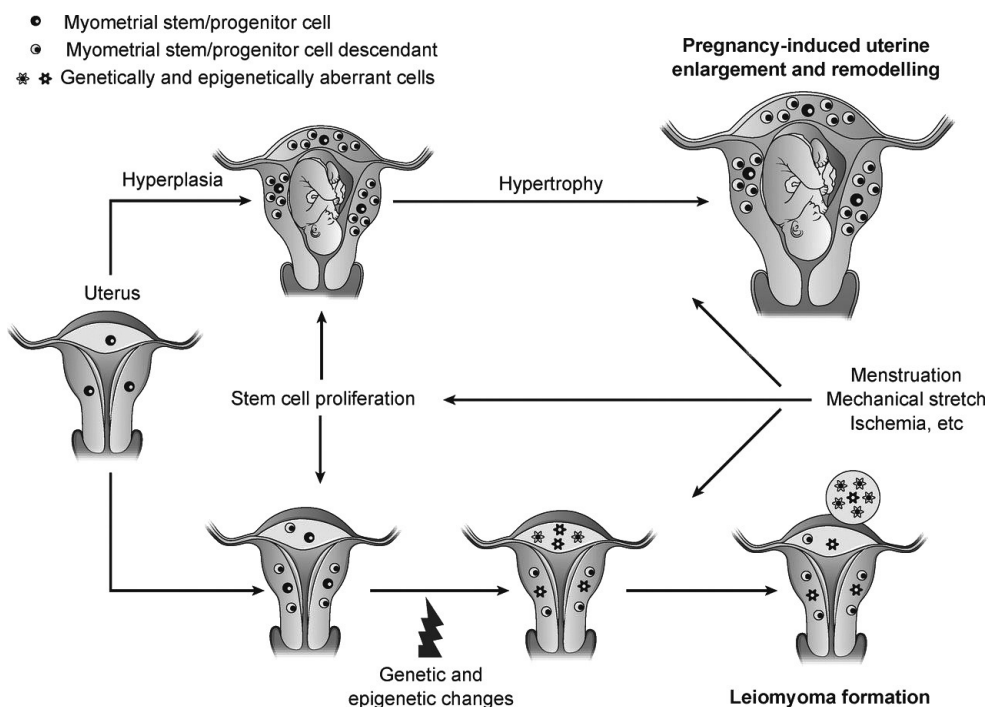


図1 妊娠子宮の増大および子宮筋腫の発生・進展における幹細胞の役割（仮説）（文献 [4] より引用）

ンシャルを有することが判明した[18]. ただし, myoSPと同様, LMSPは性ステロイドホルモン受容体の発現が低く未分化状態であった[18]. このことからLMSPは性ステロイド応答性が不良と考えられるが, なぜ, LMSPは性ステロイド依存性の平滑筋腫形成に貢献するのだろうか? そこでわれわれは, 性ステロイド依存性に産生されるパラクライン因子がLMSPに作用して増殖を促すと考えて, これまでの知見からその候補をWNTリガンドとして検討した[20]. 正常子宮筋細胞を性ステロイドで処理したところ, WNTリガンドが分泌され, パラクライン様式により子宮筋腫幹細胞の β -カテニン(CTNNB1)のシグナルが増強された. また, 性ステロイドがWNT/CTNNB1を介して子宮筋腫幹細胞を増殖させることが示された. 子宮筋腫細胞のWNT/CTNNB1シグナルを抑制した場合, 細胞増殖が抑制された[20].

以上から, 平滑筋腫の発生・進展の病態メカニズムを図2のように想定している[4]. エストロゲン受容体ESR1およびプロゲステロン受容体PGRは, 幹細胞の近傍・周囲にある分化した成熟平滑筋細胞や平滑筋腫幹細胞(いわゆるニッチ細胞)に強く発現している. 一方, これらの性ステロイド受容体の発現は幹細胞自身では低い. エストロゲンおよびプロゲステロンによりWNTリガンドがこれらのニッチ細胞から産生されて, パラクラインにFZD受容体を介して平滑筋腫幹細胞に作用する. これにより平滑筋腫幹細胞のCTNNB1-TCF経路が活性

化して, 自己複製・細胞増殖が惹起される. MED12はCTNNB1-TCF経路を負に制御するが, 変異MED12ではこの制御がはずれてCTNNB1-TCF経路の活性化が促進される可能性がある. 一方, ニッチ細胞から産生されるWNTリガンドは, オートクラインにニッチ細胞自身にも作用し, TGF β 3を産生することにより細胞外基質を産生し, 筋腫体積の増大に寄与する[4].

このメカニズムに基づけば, FZDやWNTを標的にした治療が想定される[4]. たとえば, FZD受容体の内包化を誘導するniclosamideやCTNNB1の安定化と核内移行を阻害するXAV939などが子宮筋腫に対する新しい有力候補薬剤として挙げられる[4].

おわりに

本稿では, われわれの研究成果も含めて, ヒト子宮平滑筋および平滑筋腫の幹細胞に関する現在の知見を紹介した. これらの幹細胞研究の目標の1つとして, 他のさまざまな臓器・組織と同様に, 幹細胞を用いた子宮関連組織・細胞の再生・再建医療の実現が挙げられる. 他方, 幹細胞の観点から, ヒト子宮平滑筋の発生・分化・修復の機構とその異常, また子宮筋腫を初めとする子宮平滑筋由来疾患の病態メカニズムが明らかにされていくであろう. その成果は, 幹細胞システムを標的とする子宮平滑筋関連疾患に対する新しい治療法や創薬の開発につな

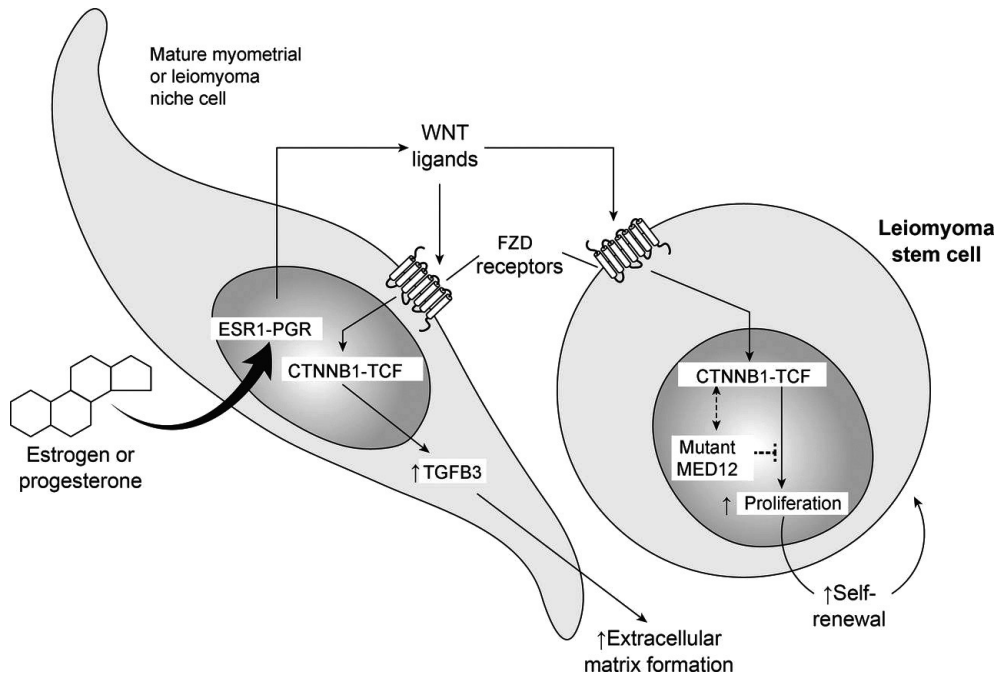


図2 子宮平滑筋腫における卵巣性ステロイドホルモン、CTNNB1、TGFβ3、およびMED12の相互作用（文献[4]より引用）

がると考えられる。

引用文献

1. 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.
2. Maruyama T, Miyazaki K, Masuda H, Ono M, Uchida H, Yoshimura Y (2013) Review: Human uterine stem/progenitor cells: Implications for uterine physiology and pathology. *Placenta* 34 Suppl, S68-72.
3. Maruyama T, Ono M, Yoshimura Y (2013) Somatic stem cells in the myometrium and in myomas. *Semin Reprod Med* 31, 77-81.
4. Ono M, Bulun SE, Maruyama T (2014) Tissue-specific stem cells in the myometrium and tumor-initiating cells in leiomyoma. *Biol Reprod* 91, 149, 1-7.
5. 丸山哲夫, 浅田弘法, 小野政徳, 荒瀬 透, 吉村泰典 (2006) 子宮筋腫, 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 2 内分泌症候群 (第2版) II, pp.477-484.
6. Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T et al. (2007) Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18700-18705.
7. Challen GA, Little MH (2006) A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 24, 3-12.
8. Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Nishikawa-Uchida S et al. (2010) OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. *Hum Reprod* 25, 2059-2067.
9. Golebiewska A, Brons NH, Bjerkvig R, Niclou SP (2011) Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell* 8, 136-147.
10. Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Uchida S et al. (2015) CD34 and CD49f double-positive and lineage marker-negative cells isolated from human myometrium exhibit stem cell-like properties involved in pregnancy-induced uterine remodeling. *Biol Reprod*, in press.
11. Shynlova O, Oldenhof A, Dorogin A, Xu Q, Mu J, Nashman N et al. (2006) Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation. *Biol Reprod* 74, 839-849.
12. Walker CL, Stewart EA (2005) Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* 308, 1589-1592.
13. Makinen N, Mehine M, Tolvanen J, Kaasinen E, Li Y, Lehtonen HJ et al. (2011) MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science* 334, 252-255.
14. Fukuhara K, Kariya M, Kita M, Shime H, Kanamori T, Kosaka C et al. (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.
15. Mayer A, Hoeckel M, von Wallbrunn A, Horn LC, Wree A, Vaupel P (2010) HIF-mediated hypoxic response is missing in severely hypoxic uterine leiomyomas. *Adv Exp Med Biol* 662, 399-405.
16. Critchley HO, Kelly RW, Brenner RM, Baird DT (2001) The endocrinology of menstruation - a role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55, 701-710.
17. Chang HL, Senaratne TN, Zhang L, Szotek PP, Stewart E,

- Dombkowski D et al. (2010) Uterine leiomyomas exhibit fewer stem/progenitor cell characteristics when compared with corresponding normal myometrium. *Reprod Sci* 17, 158-167.
18. Ono M, Qiang W, Serna VA, Yin P, Coon JSt, Navarro A et al. (2012) Role of stem cells in human uterine leiomyoma growth. *PLoS One* 7, e36935.
19. Mas A, Cervello I, Gil-Sanchis C, Faus A, Ferro J, Pellicer A et al. (2012) Identification and characterization of the human leiomyoma side population as putative tumor-initiating cells. *Fertil Steril* 98, 741-751 e746.
20. Ono M, Yin P, Navarro A, Moravek MB, Coon JSt, Druschitz SA et al. (2013) Paracrine activation of WNT/beta-catenin pathway in uterine leiomyoma stem cells promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17053-17058.