

脱細胞化組織移植によるマウス子宮再生モデルの構築と再生における転写因子 STAT3の役割

平岡 毅大, 廣田 泰, 大須賀 穰, 藤井 知行

東京大学医学部産婦人科学教室

緒 言

子宮内膜は、哺乳類の発生の初期に位置する着床という現象が起きる生命の継承に必須の組織であり、ヒトにおいては月経周期ごとに脱落・再生を繰り返す。マウスにおいても分娩ごとに修復が起きることから、高い再生能力を有していると考えられる。この子宮内膜の正常な再生は妊娠成功に向けての鍵を握ると考えられるが、再生を制御する詳細な機序についてはほとんど明らかにされていないのが現状である。子宮内膜に高い再生能力を付与する根本原理を解明する研究は、子宮再生医療の開発・発展に寄与する可能性があるため、基礎医学の観点だけでなく、臨床医学の観点からも非常に重要な意義があると考えられる。晩婚化の進む現代の日本社会において生殖医療技術は目覚ましい発展を遂げてきたが、流産手術などの子宮内手術や先天性子宮奇形による内膜欠損が原因となる不妊症に対しては、これまで有効な治療法は存在しなかった。子宮内膜再生機序の解明に向けての研究は、これらの難治性妊孕性障害症例に対する画期的な治療戦略を再生医療の観点から提供できる可能性があり、今後の発展が大いに期待される。そこでわれわれは今回、子宮内膜再生機序に関する基礎的知見を得るため、生体内で子宮再生を誘導するマウスモデルを作成し、再生過程を組織学的に検証した。

脱細胞化組織移植によるマウス子宮部分的再生

野生型のドナーマウス子宮を採取し、子宮内膜と筋層を含む 5×2 mm 大の直方体の形状に細切後、界面活性剤である 1 % ドデシル硫酸ナトリウムに一時間浸漬・振盪したのち洗浄バッファー内で 1 週間振盪することで脱細胞化子宮組織を作成した (図 1 A, B)。この脱細胞化組織は、ドデシル硫酸ナトリウム処理により細胞膜を破

綻させることでドナー由来の細胞が除去され、内膜上皮基底膜、内膜間質、筋層、血管の構造を保ちつつ細胞外基質タンパク質で構成される足場のみを保存していることを確認した (図 1 C)。一方で、野生型のレシピエントマウス子宮の対血管側に、麻酔下において内腔から筋層に至るまでの 5×2 mm の人工的欠損部位を作成し、前述のドナー由来の脱細胞化組織を 10-0 ナイロン糸を用いて顕微鏡下に結節縫合し移植した (図 1 A, D)。移植後 28 日目 (移植当日を移植後 0 日目と定義した) にレシピエントマウスを解剖し移植部位を採取したところ、脱細胞化組織内に脈管構造を伴った組織が構築されていることが肉眼的に確認された (図 2 A)。再生部位の中心付近を子宮角長軸と垂直な断面で薄切し、ヘマトキシリンエオジン染色や免疫染色により組織学的に検証したところ、再生部位の子宮は正常子宮と相同の組織学的構造を有しており、卵巣ホルモン受容体の発現は正常であった (図 2 B, C)。この再生部位の機能を評価するため、移植後 1 ヶ月のレシピエントマウスを野生型の雄マウスと交配し、妊娠初期の卵巣ホルモン応答性を評価したところ、着床マーカーと考えられている妊娠 4 日目における上皮の増殖停止と間質の増殖亢進 [1] は正常に認められた (図 3 A)。さらに、再生部位における正常産までの妊娠継続が可能であり、妊娠 19 日目の帝王切開により正常産仔の分娩が可能であったことから (図 3 B ~ E)、再生子宮が機能的に正常であることが示された。

脱細胞化組織移植モデルによる子宮再生過程の検証

次にわれわれは、この脱細胞化組織移植のマウスモデルを、子宮の再生制御機構を詳細に観察できる実験モデルであると考え、子宮再生過程を経時的に観察した。その結果、移植翌日には脱細胞化組織の表面に扁平な細胞が出現し、この細胞は移植後 3 日目には円柱状の形態に変化し、移植後 7 日目には成熟した形状の管腔上皮が形成され、その直下に腺管を含む間質が再構築されることがわかった (図 4 A)。この移植後早期に脱細胞化組織表面に出現する扁平な細胞は、免疫染色により正常な子

連絡先: 平岡毅大, 東京大学医学部産婦人科学教室
〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1
TEL: 03-3815-5411
FAX: 03-3816-2017
E-mail: t_hiraoka1985@yahoo.co.jp

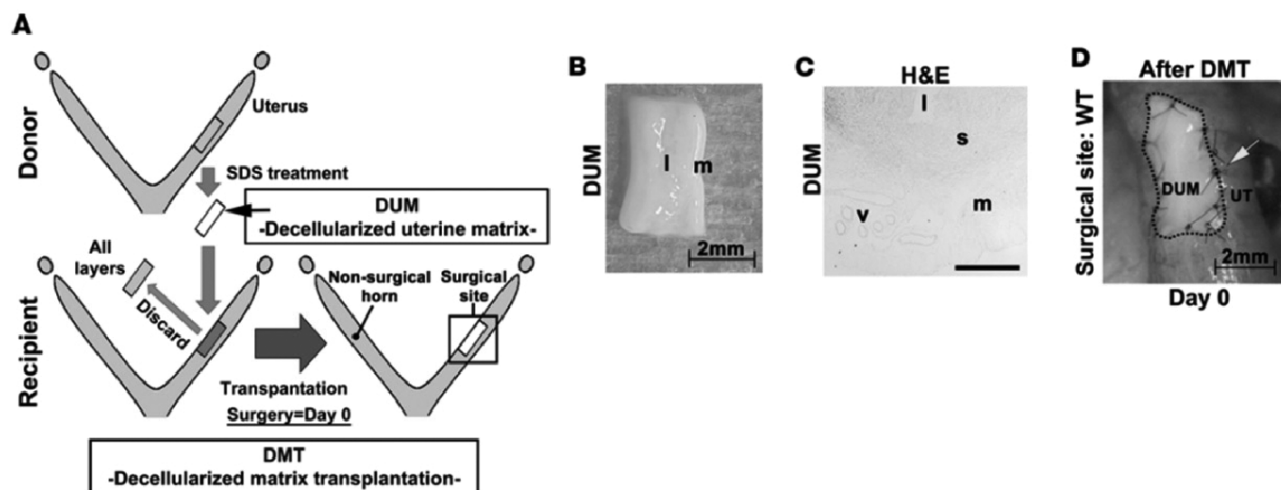


図1 マウス脱細胞化組織移植モデル (文献15 Hiraoka T. et al. JCI Insight 2016より引用)

- A. 研究手法の概略。DUM ; decellularized uterine matrix 脱細胞化子宮組織, DMT ; decellularized matrix transplantation 脱細胞化組織移植
 B. 脱細胞化子宮組織
 C. 脱細胞化子宮組織のヘマトキシリンエオジン染色。l : 管腔面, s : 間質の細胞外基質, m : 筋層の細胞外基質, v : 血管の細胞外基質
 D. 脱細胞化組織移植直後 (移植後0日目) の肉眼写真。UT, 移植片周囲の子宮

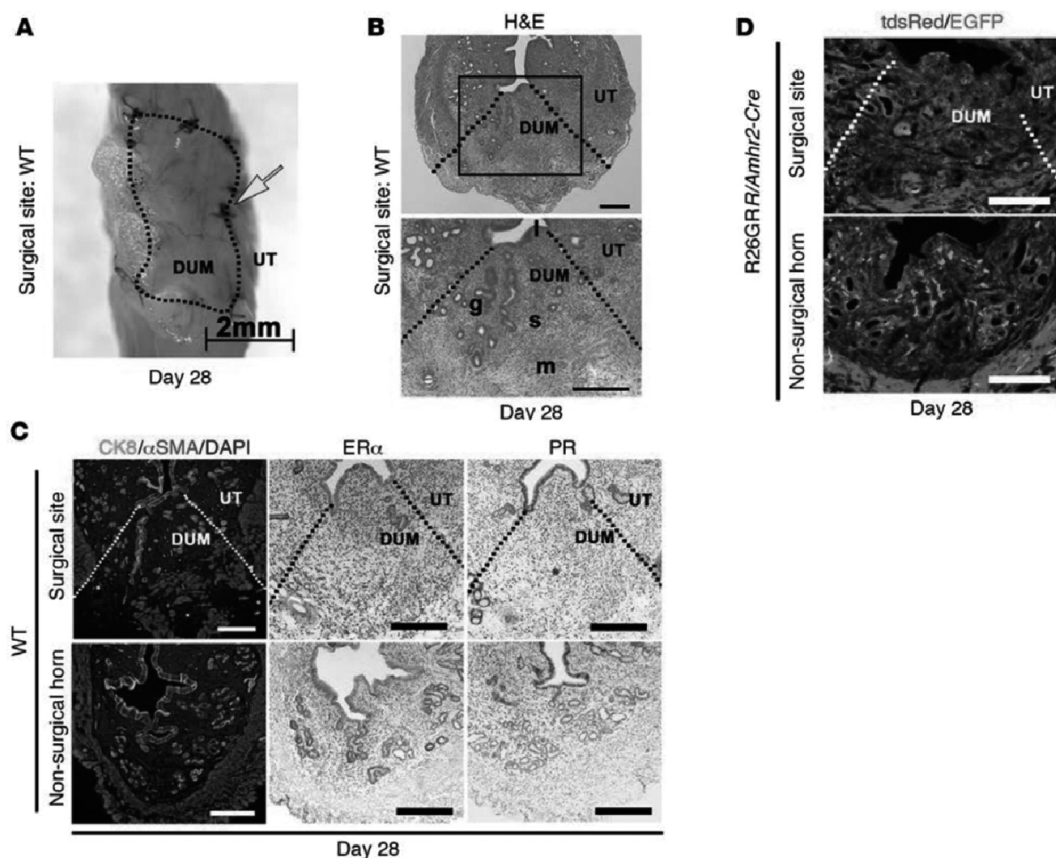


図2 脱細胞化組織移植によるマウス子宮再生 (文献15 Hiraoka T. et al. JCI Insight 2016より引用)

- A. 移植後28日目における移植部位の肉眼写真
 B. 子宮再生部位 (移植後28日目) のヘマトキシリンエオジン染色
 C. 子宮再生部位 (移植後28日目) の免疫染色。CK8 ; cytokeratin 8, α SMA ; alpha smooth muscle actin, ER α ; estrogen receptor alpha, PR ; progesterone receptor
 D. 間質・筋層特異的レポーターマウスにおける移植後28日目の蛍光顕微鏡写真

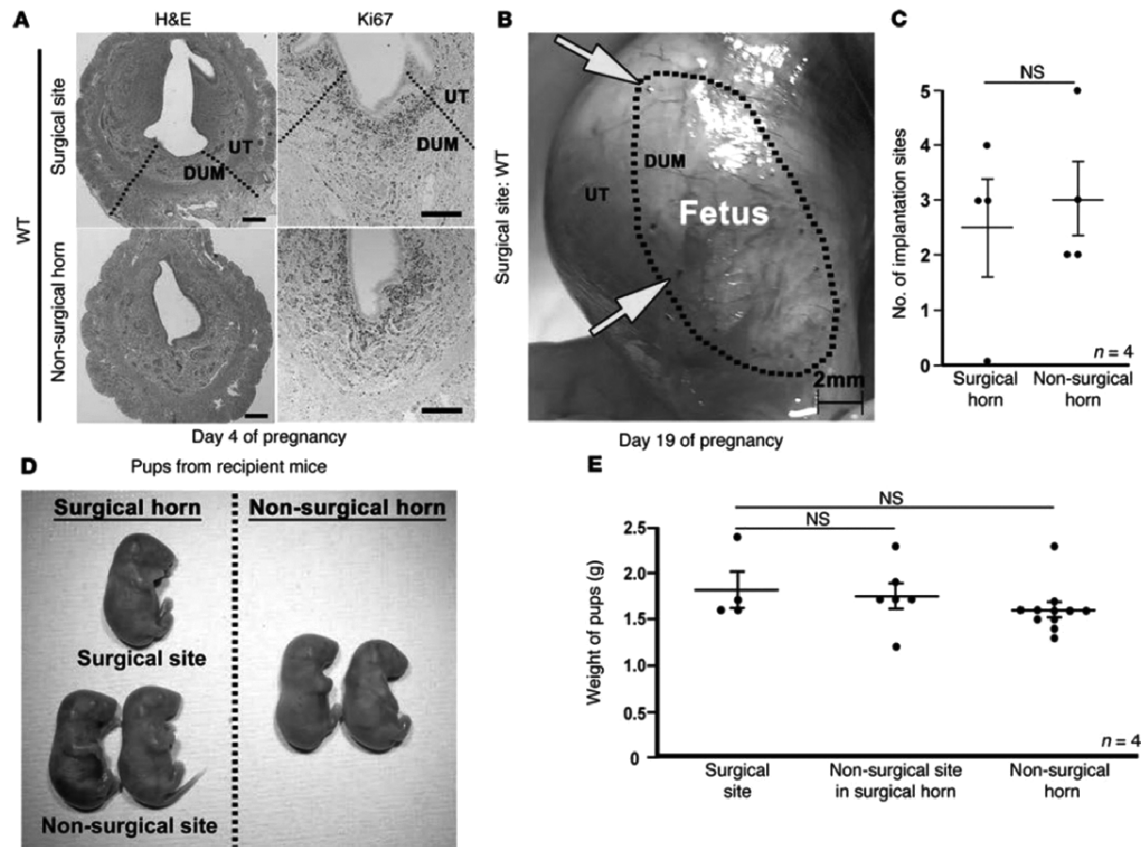


図3 子宮再生部位の機能的評価 (文献15 Hiraoka T. et al. JCI Insight 2016より引用)

- A. 妊娠4日目におけるKi67染色。着床直前の子宮内膜のホルモン応答能、すなわち上皮の増殖停止と間質の増殖亢進は正常である。
- B. 妊娠19日目での子宮再生部位における妊娠の維持
- C. 妊娠19日目で発育している胎児の数は手術側子宮角と非手術側子宮角の間で差がない。
- D. 妊娠19日目に帝王切開で分娩した産仔の肉眼写真
- E. 妊娠19日目に帝王切開で得られた産仔の体重。再生部位より得られた産仔の発育は正常であった。

宮上皮と同様の性質を備えていることが明らかになった (図4B)。さらに、子宮上皮の系譜を特異的に追跡可能な遺伝子改変マウスを作成し、野生型ドナーマウス由来の脱細胞化組織を移植したところ、この扁平な細胞は移植片周囲の管腔上皮から供給され移動してきた細胞であることが明らかとなった (図4C)。また、子宮間質・筋層の細胞系譜を追跡可能な遺伝子改変マウスも作成し、移植後28日目に観察したところ、再生された子宮上皮は、レシピエント上皮由来の細胞のみから構成されていることが明らかになった (図2D)。以上の検証により、脱細胞化組織移植モデルによる子宮再生過程において、子宮管腔上皮の再生能が卓越していることが明らかとなった。

卵巣ホルモンがマウス子宮再生に与える影響

次にわれわれは、卵巣ホルモンが子宮再生に与える影

響を評価するため、卵巣除去術後2週間の野生型ドナーマウスおよびレシピエントマウスを用いて脱細胞化組織移植を行った。その結果、子宮の再生過程は前述した通常のマウスにおける再生過程と類似しており (図5A)、移植後28日目の組織学的評価では、再構築された子宮は正常子宮と相同の構造を有していた (図5A, B)。この結果は、子宮再生過程に卵巣ホルモンが必須の要素ではないことを示唆しており、ヒト子宮内膜再生が血中卵巣ホルモン濃度低値である月経期に開始する事実や[2-4]、帝王切開後の無排卵期においても子宮の治癒が可能である事実を反映しているものと考えられた。

子宮上皮再生における転写因子 STAT3の役割

本モデルを用いてさらに詳細に子宮再生機構を検証するため、われわれは周期的に分泌される卵巣ホルモンの影響を除外できる卵巣除去術後の脱細胞化組織移植モデ

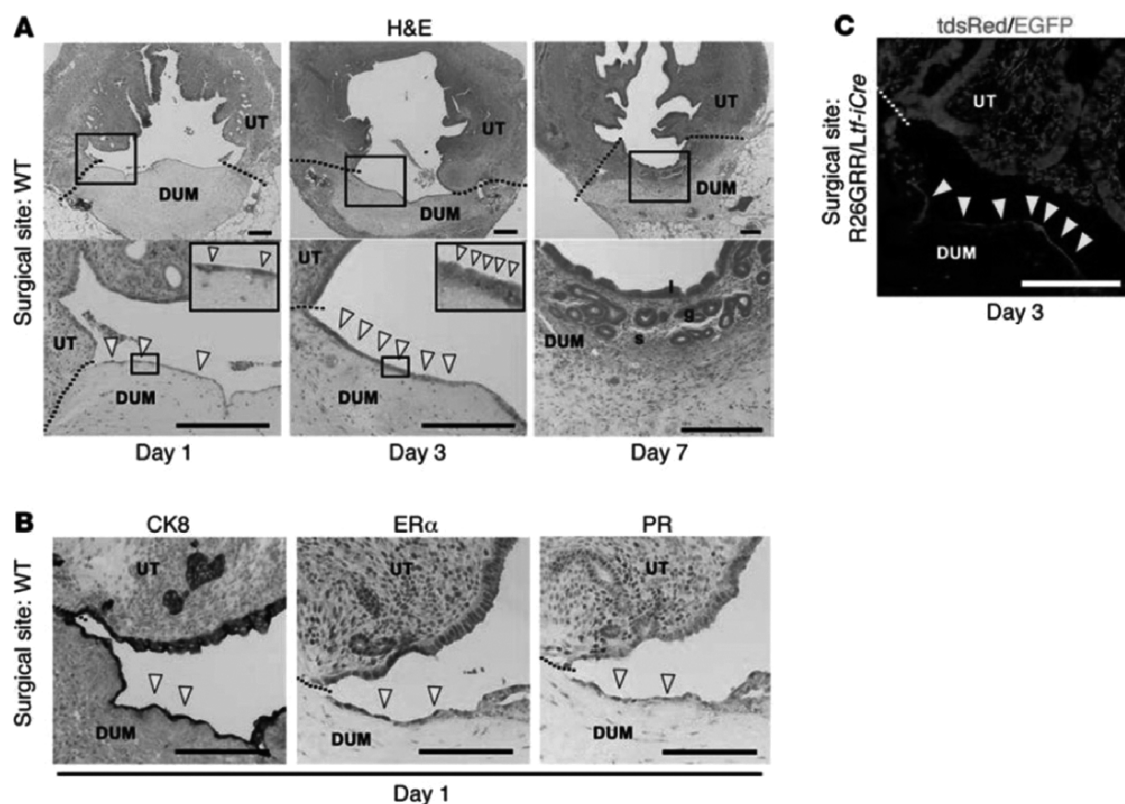


図4 子宮再生過程の経時的観察（文献15 Hiraoka T. et al. JCI Insight 2016より引用）

- A. 移植後1日目，3日目，7日目のヘマトキシリンエオジン染色．矢頭は脱細胞化組織表面の扁平な細胞を示す．
 l：管腔上皮，g：腺上皮，s：間質
- B. 移植後1日目の免疫染色
- C. 上皮特異的レポーターマウスにおける移植後3日目の蛍光顕微鏡写真

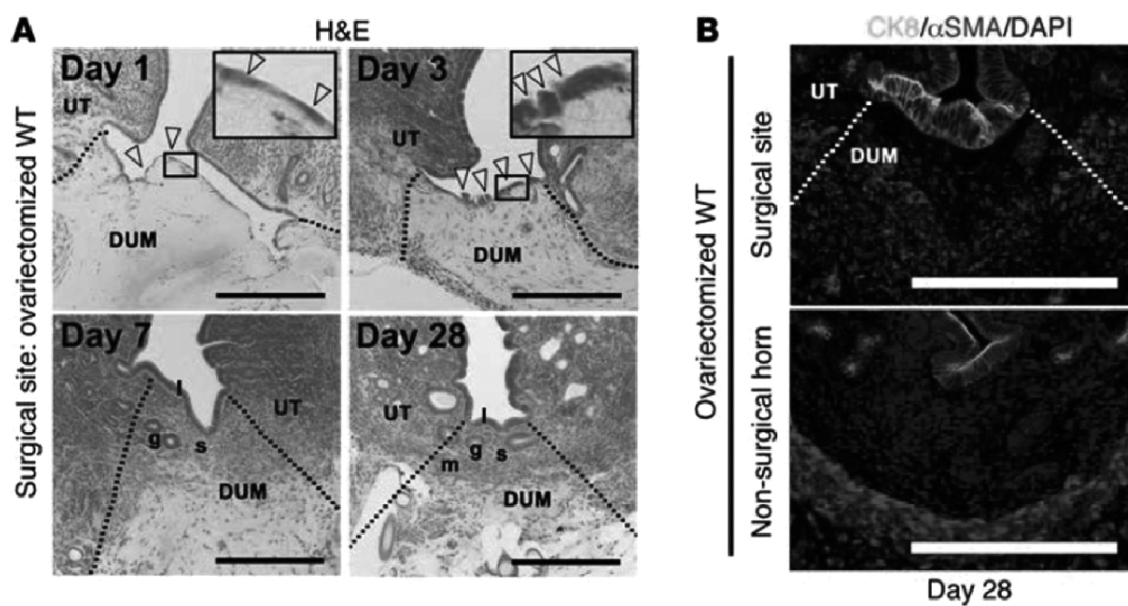


図5 卵巣除去術後マウスにおける子宮再生（文献15 Hiraoka T. et al. JCI Insight 2016より引用）

- A. 移植後1，3，7，28日における移植部位のヘマトキシリンエオジン染色
- B. 移植28日目における移植部位の免疫染色

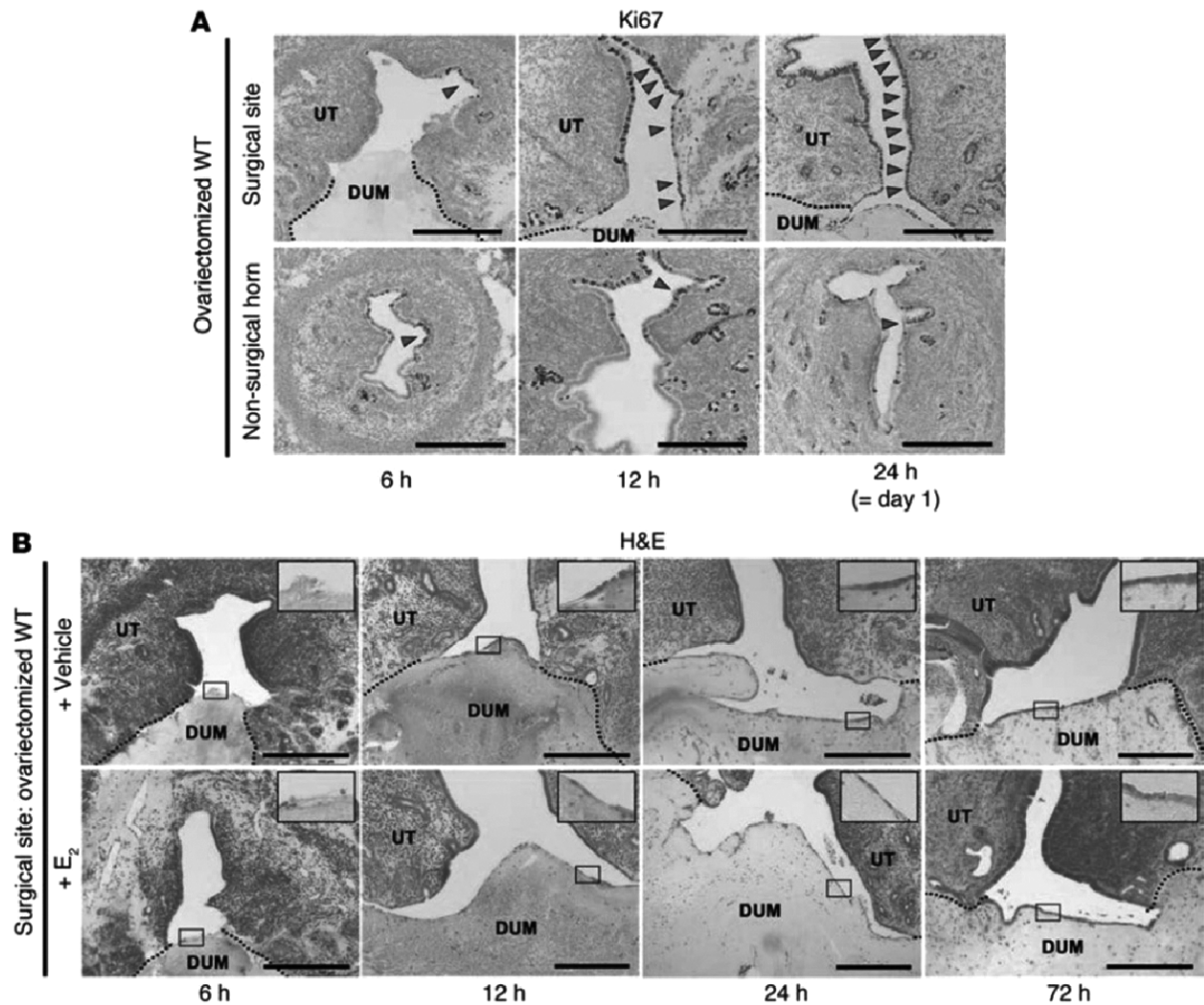


図6 卵巣ホルモン非存在下に管腔上皮は早期に再生を開始する（文献15 Hiraoka T. et al. JCI Insight 2016より引用）
A. 移植後6, 12, 24時間におけるKi67染色。上皮の増殖は移植後12時間より誘導される。
B. 移植後6, 12, 24, 72時間におけるエストロゲン投与群と対照群の管腔上皮再生能の比較。管腔上皮の再生に明らかな差を認めなかった。

ルを用いて、細胞の増殖能をKi67染色で評価した。その結果、卵巣ホルモン非存在下に、移植片周囲の子宮上皮が移植後12時間で増殖を開始することがわかった（図6A）。また、移植後72時間までの上皮再生過程の観察により、エストロゲン投与群と対照群において顕著な管腔上皮再生能の差を認めなかったことから（図6B）、子宮内膜損傷後の早期段階においては卵巣ホルモンを必要としない分子経路が再生を支配的に制御しているものと推測された。

この上皮の再生誘導経路を検証するため、われわれは転写因子STAT3に注目した。STAT3はIL-6, LIF, oncostatin MといったIL-6ファミリーサイトカインやEGF (epidermal growth factor) などの下流に位置し、標的遺伝子の転写調節に関与することが知られており[5]、種々の臓器における損傷からの修復過程において重要な役割を果たしていることがわかっている[6-8]。子宮に

おけるSTAT3の機能に関しては、子宮のSTAT3を欠損したマウスが着床障害による不妊となることは知られているものの[9-11]、子宮の再生という観点ではその機能は知られていなかった。そのためわれわれは脱細胞化組織移植後のSTAT3の活性化を免疫染色で検証したところ、移植後6時間に移植片周囲の上皮において顕著に、また間質や筋層においてもSTAT3の活性化が認められた（図7A）。そこでわれわれは子宮特異的STAT3ノックアウトマウス(ΔSTAT3)を作成し、卵巣除去術施行2週間後に野生型ドナーマウス由来の脱細胞化組織を移植し、移植後24時間における上皮の再生能を評価した。結果、ΔSTAT3マウスにおいては、野生型と比較し脱細胞化組織表面の扁平な再生上皮細胞の絶対数の有意な低下を認め、その原因として、移植片周囲の上皮の増殖率の有意な低下が考えられた（図7B~D）。これらの結果から、子宮内膜再生の初期段階に位置する上皮再生過程

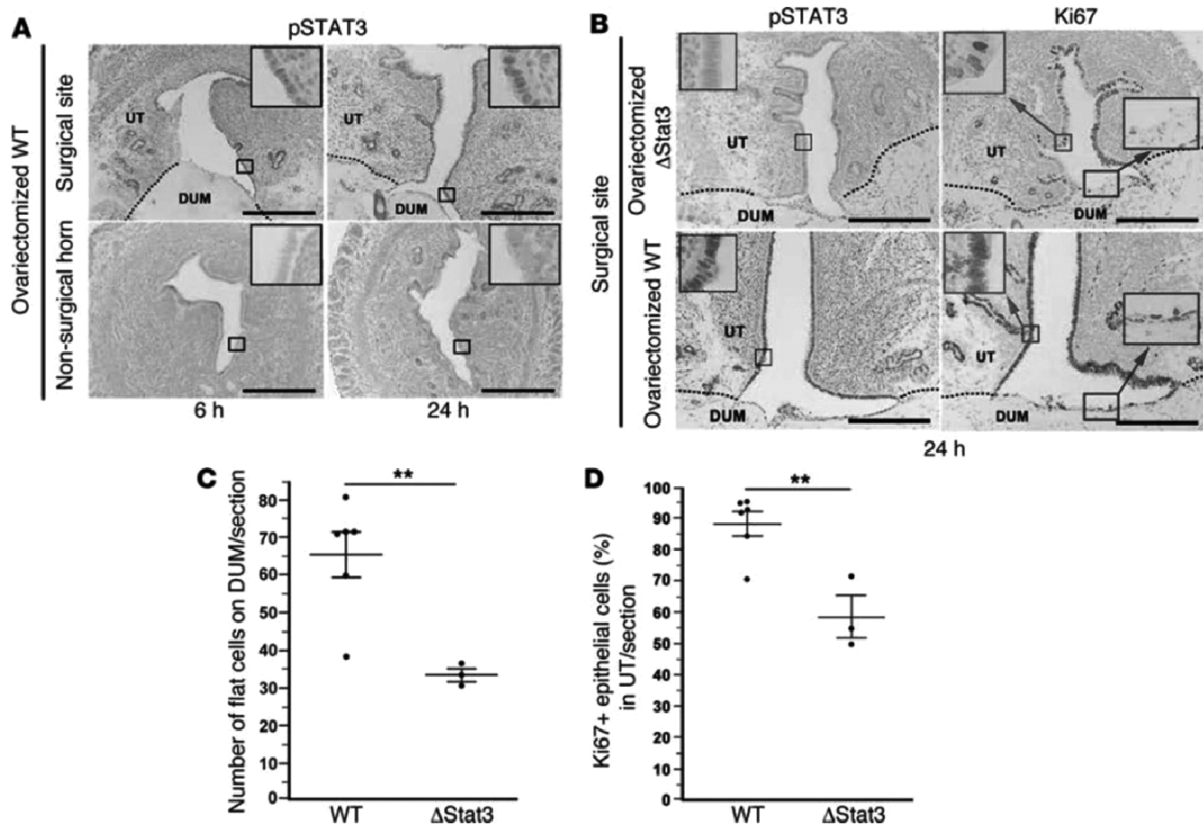


図7 STAT3は子宮上皮再生に重要である（文献15 Hiraoka T. et al. JCI Insight 2016より引用）

- A. 移植後6, 24時間における pSTAT3免疫染色。移植片周囲における STAT3の活性化は移植後6時間より上皮中心に起こり、間質、筋層でも活性化される。
- B. 移植後24時間における ΔSTAT3マウス（子宮特異的 STAT3ノックアウトマウス）の STAT3活性の低下と Ki67染色による上皮増殖能の低下
- C. 移植後24時間の ΔSTAT3マウスにおける脱細胞化組織上の再生上皮細胞数の有意な低下
- D. 移植後24時間の ΔSTAT3マウスにおける移植片周囲上皮増殖率の有意な低下

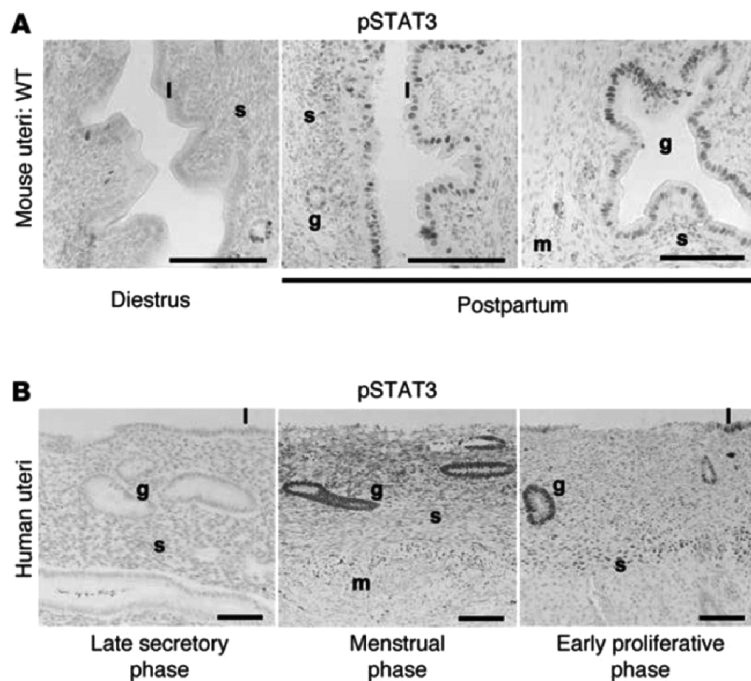


図8 生理的子宮内膜再生過程における STAT3の活性化（文献15 Hiraoka T. et al. JCI Insight 2016より引用）

- A. マウス分娩直後の子宮内膜における STAT3の活性化
- B. ヒト月経期, 増殖初期における STAT3の活性化

において、子宮の STAT3が重要な機能を果たしているものと考えられた。過去の報告により、子宮内膜の修復過程において好中球が重要な役割を果たしていることが知られており [12-14]、本モデルの子宮内膜再生過程においても好中球由来のサイトカインが STAT3の活性化に関わっている可能性が推測された。

生理的な子宮内膜再生過程における STAT3の活性化

これまでの結果から、人工的に子宮再生を誘導できる本モデルにおいて STAT3が重要な機能を有することが明らかとなったが、最後にわれわれは、マウスの分娩直後、ヒト月経後期・増殖初期といった生理的な子宮内膜の再生過程における STAT3の関与について検証した。免疫染色の結果、STAT3の活性化は、マウス・ヒトいずれにおいても上皮において顕著に、また間質においても認められ、脱細胞化組織移植モデルにおける STAT3活性化と類似した所見を示した（図 8 A, B）。この結果から、生理的な子宮内膜修復過程においても STAT3が関与していることが示唆された。

結 語

今回われわれは、脱細胞化組織移植技術を用い、マウス子宮の生体内での部分的再構築に成功した。さらに、本モデルを用いて子宮再生過程を解析し、転写因子 STAT3が子宮内膜再生の初期に位置する上皮再生に重要な役割を果たしていることを明らかにした [15]。本モデルは、種々の遺伝子改変マウスを用いることで子宮の再生を制御する分子学的機構をより詳細に解明し、子宮の再生を促進する化合物の同定につながる可能性も秘めていると考えられる。さらに、子宮内膜の異所性増殖を本態とする宮内膜症や子宮腺筋症の病態解明にも役立つ可能性もあり、本モデルを用いた今後のさらなる研究の発展が期待される。

引用文献

1. Haraguchi H, Saito-Fujita T, Hirota Y, et al (2014) MicroRNA

- 200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Mol Endocrinol* 28, 1108-1117.
2. McLennan CE, Rydell AH (1965) Extent of endometrial shedding during normal menstruation. *Obstet Gynecol* 26, 605-621.
3. Ferenczy A (1976) Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration. I. Scanning electron microscopy. *Am J Obstet Gynecol* 124, 64-74.
4. Ferenczy A (1976) Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration. II. Transmission electron microscopy and histochemistry. *Am J Obstet Gynecol* 124, 582-595.
5. Hirano T, Ishihara K, Hibi M (2000) Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19, 2548-2556.
6. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y et al (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.
7. Kida H, Mucenski ML, Thitoff AR et al (2008) GP130-STAT3 regulates epithelial cell migration and is required for repair of the bronchiolar epithelium. *Am J Pathol* 172, 1542-1554.
8. Pickert G, Neufert C, Leppkes M et al (2009) STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 206, 1465-1472.
9. Lee JH, Kim TH, Oh SJ et al (2013) Signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) plays a critical role in implantation via progesterone receptor in uterus. *FASEB J* 27, 2553-2563.
10. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ et al (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76-79.
11. Sun X, Bartos A, Whitsett JA et al (2013) Uterine deletion of Gp130 or Stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Mol Endocrinol* 27, 1492-1501.
12. Brasted M, White CA, Kennedy TG et al (2003) Mimicking the events of menstruation in the murine uterus. *Biol Reprod* 69, 1273-1280.
13. Kaitu'u-Lino TJ, Morison NB, Salamonsen LA (2007) Neutrophil depletion retards endometrial repair in a mouse model. *Cell Tissue Res* 328, 197-206.
14. Salamonsen LA, Woolley DE (1999) Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immunol* 44, 1-27.
15. Hiraoka T, Hirota Y, Saito-Fujita T et al (2016) STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. *JCI Insight* 1, pii: e87591.