

論文の内容の要旨

論文題目 初代子宮内膜症上皮細胞、不死化子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析による
子宮内膜症の病態解明

氏名： 中澤（鳥光）明里

1) 背景

子宮内膜症は子宮内膜に類似した組織が子宮以外の部位に発生する疾患であり、組織学的には子宮内膜様上皮、間質、そしてそれを取り巻く線維化組織からなる。子宮内膜症は、慢性痛や月経痛等の疼痛を引き起こし、不妊症の原因になる。近年、子宮内膜症は悪性転化することが明らかとなり、さらには内膜症を有する女性が妊娠した場合、妊娠予後に悪影響を及ぼすという報告もある。このように子宮内膜症は生殖年齢期から高齢期まで女性のライフスパン全期間において、QOL を大きく低下させる疾患といえる。子宮内膜症に罹患する女性は年々増加傾向にあり、生殖年齢層女性の 6-10%、不妊症患者の 50%に発症していると報告されている。このように罹患率の高い疾患であるにも関わらず、子宮内膜症の病態は未だ解明されていない。

内膜症に重要な炎症性サイトカインや血管新生因子などの増悪因子は子宮内膜症上皮細胞に高いことが報告されてきた。しかしながら子宮内膜症上皮細胞を用いた研究は殆どない。それは、子宮内膜症の上皮細胞は単離が困難であり、かつ培養が極めて難しいためである。実際、子宮内膜症上皮細胞を分離培養したという報告は皆無である。

また、子宮内膜症は良性疾患でありながら悪性転化する可能性を持つ疾患であり、特に子宮内膜症性卵巣嚢胞は 0.5-1.0%が卵巣癌へ移行すると報告されている。しかしながら癌化のプロセスについては未だ不明な点が多い。子宮内膜症の悪性転化に関する研究においても、子宮内膜症上皮細胞を用いた研究が有用であると考えられる。

加えて、これまで子宮内膜症上皮細胞を用いた網羅的遺伝子解析は行われていない。一方で、子宮内膜症組織もしくは間質細胞の網羅的遺伝子解析は行われているが、子宮内膜症間質細胞は発症母地となる卵巣等の間質細胞との鑑別が難しいため、解析に用いられる組織や細胞には子宮内膜症以外の間質細胞が混入している可能性が指摘されている。この点においても、子宮内膜症の本体である子宮内膜症上皮細胞がより高純度に分離され、解析の対象となることが重要であると考えられる。

しかしながら、子宮内膜症上皮細胞は培養に成功したとしても、長期培養に耐えられない。そ

のためこれら初代培養した子宮内膜症上皮細胞を不死化し、基礎的研究に用いる技術が必要であると考えた。以上の現状から、これまで研究に用いられてこなかった子宮内膜症上皮細胞にフォーカスした研究を行うため、子宮内膜症上皮細胞の分離培養方法を確立し、これらの初代分離培養上皮細胞の網羅的遺伝子解析を行うこと、及び不死化子宮内膜症上皮細胞の樹立をすることが有用であると考えた。

2) 目的

本研究において、これまで報告のない子宮内膜症上皮細胞の初代分離培養に取り組み、培養方法を樹立すること。分離培養された子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析を行うこと。子宮内膜症上皮細胞の不死化細胞を樹立すること。以上より、子宮内膜症上皮細胞にフォーカスした内膜症研究の基盤を構築することを目的とした。

3) 方法

東京大学医学部附属病院婦人科において、腹腔鏡下卵巣嚢胞摘出術または腹腔鏡下付属器切除術を施行した患者の卵巣検体を用いて、子宮内膜症上皮細胞(EmoEC)の分離培養を行った。子宮内膜症間質細胞(EmoSC)及び子宮内膜間質細胞(ESC)は以前に当研究室で報告している方法を用いた。また正所性子宮内膜上皮細胞(EEC)はこれまで同グループより報告されている分離培養細胞に MACS 磁気細胞分離を加えて行った。

RNA 抽出は Nucleospin RNA を用いて、プロトコールに従って行った。それぞれ初期培養した EmoEC, EmoSC, EEC, ESC、および作成した子宮内膜症性卵巣嚢胞上皮細胞の不死化細胞を、RNA シークエンスを用いて網羅的解析を行った。全ての RNA は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)で品質を確認した上で、Mondrian SP+ Complete Library Systems(NuGEN)を用いてライブラリーを作成し、HiSeq 2500 (illumina) を用いて RNA シークエンスを行った。結果の解析は ExAtlas (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/exatlas/>)を用いて行った。

Gateway system を用いて、CDK4R24C、CyclinD1、hTERT の 3 遺伝子を Eric Campeau らが作成したレンチウイルスベクター pLent-CMV-Blast DEST に導入し、レンチウイルスベクター (pLent-CMV-Blast CDK4 DEST、pLent-CMV-Blast CyclinD1 DEST、pLent-CMV-Blast hTERT DEST) を作成した。これらのウイルスベクターを 293 細胞に導入し、レンチウイルスを作成した後、初代分離培養子宮内膜症上皮細胞に遺伝子導入した。以上の方法により、不死化子宮内膜症上皮細胞の樹立を試みた。

4) 結果と考察

本研究において、初めて子宮内膜症上皮細胞の分離培養に成功した。初代培養子宮内膜症上皮細胞は上皮様の形態を維持し、上皮マーカーである Cytokeratin、PAX8 が陽性であった。得ら

れた初代培養子宮内膜症上皮細胞を用いて、その網羅的遺伝子解析を行った。PCA 解析では、子宮内膜症上皮細胞、子宮内膜間質細胞及び子宮内膜上皮細胞は其々がクラスターを形成し、これらの細胞が異なる遺伝子プロファイルを持つことが分かった。

RNA シークエンスを用いた網羅的遺伝子解析の結果に基づき、子宮内膜症間質細胞や正所性子宮内膜上皮細胞と比較することで、子宮内膜症上皮細胞の性質を検討した。子宮内膜症上皮細胞は間質細胞に比較し、42 遺伝子が有意に高発現であり、30 遺伝子が有意に低発現であった。Ontology 解析によると、integrin-mediated signaling pathway, cell migration などの遺伝子群が高発現であった。また、structural constituent of muscle, actin cytoskeleton, cell adhesion などが低発現遺伝子群であった。本研究で分離培養した子宮内膜症上皮細胞は、子宮内膜間質細胞とは異なることが示された。

次に、子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜上皮細胞の RNA シークエンスによる網羅的遺伝子解析結果の比較検討を行った。子宮内膜症上皮細胞は、正所性子宮内膜上皮細胞に比較し、100 遺伝子が高発現であり、48 遺伝子が低発現であった。差のある遺伝子群としては、FN1 などの EMT 関連遺伝子の高発現がみられた。これは、子宮内膜症上皮に EMT 関連分子の発現が高いという報告と整合性が見られた。

初代培養子宮内膜症上皮培養は寿命が短く、約 1 週間で細胞老化に至った。そこで、CDK4R24C、CyclinD1、hTERT の 3 遺伝子を初代培養子宮内膜症上皮細胞に遺伝子導入することで、不死化子宮内膜症上皮細胞を 4 株樹立した。4 株の細胞は 30 経代を越えて長期培養をした後も上皮細胞の性質を保っていた。

また、不死化子宮内膜症上皮細胞 4 ラインと初代子宮内膜症上皮細胞の遺伝子比較を行った。すると、有意に高発現であったのはわずか 18 遺伝子、低発現であったのはわずか 32 遺伝子であった。高発現であった遺伝子群は ontology 解析、KEGG pathway 解析により CDK4、CyclinD1(CCND1)などの導入不死化遺伝子とそれに関連する CDKN1A などの cell cycle 関連の遺伝子であり、導入遺伝子による影響と考えられた。違いのある遺伝子群が少ないことから、これらの不死化子宮内膜症上皮細胞が子宮内膜症上皮細胞の研究として十分用いることができることが分かった。

5) まとめ

本研究では、これまで報告のない初代子宮内膜症上皮細胞の分離培養方法を樹立した。これらの初代培養細胞より、子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析を行いそのデータセットを作成した。またこれらの初代分離培養子宮内膜症上皮細胞を用いて不死化細胞株を 4 株樹立することで、子宮内膜症上皮細胞にフォーカスした子宮内膜症研究の基盤を構築した。樹立した不死化子宮内膜症上皮細胞は RNA シークエンスによる発現遺伝子の比較検討にて、初代培養子宮内膜症上皮細胞と発現遺伝子の差が少なく、子宮内膜症研究の材料として十分耐え得ると考えられた。今後はこれらの子宮内膜症上皮細胞のトランスクリプトームのデータセットを用いてさらなる検討を行う予定である。また、DNA メチレーションについては既に、得られたデータを解析中で

ある。これらのデータとの比較検討を行うことで、さらなる子宮内膜症の病態生理の解明に取り組む予定である。