

博士論文

脱細胞化組織移植技術を用いたマウス子宮再生における

**STAT3** の機能解析

平 岡 毅 大

## 目次

目次	2
要旨	3
序文	4
目的	14
方法	15
結果	20
考察	49
まとめ	54
おわりに	55
謝辞	55
引用文献	56

## 要旨

子宮再生機序を検証する新しい実験モデルとして、マウス脱細胞化組織移植モデルを確立した。ドナーマウス由来の細胞成分を界面活性剤により除去した脱細胞化子宮組織をレシピエントマウス子宮の人工的欠損部位に移植したところ、移植後 28 日目には脱細胞化組織内に組織学的にも機能的にも正常な子宮組織が再生された。再生過程の組織像を時系列で検証したところ、管腔上皮の再生能が間質や筋層と比較し卓越していることが明らかになった。また、卵巣除去術後のレシピエントマウスを用いた検証により、子宮の再生に卵巣ホルモンは必須でないことが示された。さらに子宮特異的 STAT3 欠損マウスを用いた検証によって、子宮上皮・間質・筋層の再生に STAT3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。今回新たに確立した本モデルを用いて子宮再生機序のさらなる解明が期待され、子宮再生医療の発展と不妊治療への応用が期待される。

## 序文

### 不妊治療における子宮再生医療の意義について

晩婚化・少子化の進む現代の日本社会において、不妊治療の発達は重要性を増してきている。不妊症の原因として、排卵障害や卵巣予備能低下などの卵巣因子、卵管閉塞や卵管癒着などの卵管因子、子宮筋腫や子宮腔内癒着などの子宮因子、男性因子などが挙げられ、重度の不妊症に対しては体外受精による生殖補助医療技術を用いるが、着床障害などの依然として有効な治療手段が存在しない解決困難な難治性妊孕性障害症例は存在する。着床障害に対してはマウスモデルなどを用いた基礎研究の立場から解明の試みが進められている一方で[1, 2]、子宮の先天性子宮奇形や、流産手術などの子宮内手術による子宮内膜の器質的欠損・機能的低下が原因となる不妊症に対しては、これまでに有効な治療法が確立されていないだけでなく、基礎研究によるアプローチも十分に進んでいるとは言い難い。子宮摘出後の妊娠希望症例に対しては近年では同種他家子宮移植が試みられ生児獲得に至った例も報告されており[3]注目を集めているが、拒絶反応のリスクは今後も高いハードルの一つと考えられる。この点において、子宮再生医療はこれら子宮欠損や不可逆的子宮機能低下といった難治性妊孕性障害に対し光明をもたらす可能性を秘めていると考えられる。近年、iPS細胞などの幹細胞を用いた再生医療研究が急速に進んでおり、自身の細胞を用いて子宮を再生・作製する技術が確立されればまさに画期的であるが、現在の技術では立体構造を有する機能的な臓器の作製は依然困難であり、実用に向けた課題は多く残されている。そ

のため、幹細胞だけではなく様々なアイデアやアプローチが必要と考えられ、子宮再生研究は今後の発展が大きく期待される分野と言える。本研究では、子宮再生研究の新しい研究手法の確立に焦点を当てた。

## 子宮の構造について

ヒトの子宮は子宮体部、子宮頸部、そして、その両者の間にある子宮峡部に分けられるが（図 1） [4]、そのうち子宮体部は受精卵の着床から分娩までの妊娠の維持を担う場であり、子宮の最も重要な機能を担う部位と言える。子宮体部の組織構造は内側より子宮内膜、子宮筋層、子宮漿膜に分けられ（図 1）、子宮内膜は受精卵の着床の場となる。子宮内膜は単層の円柱上皮細胞より成る管腔上皮と腺上皮、そして間質により構成される（図 1）。また、月経により剥脱する内腔側を機能層、剥脱しない筋層側を基底層と呼ぶ（図 3）。

マウスの子宮は Y 字型になっており、2 つの子宮体部すなわち子宮角と、1 つの子宮頸部に分けられる[5]（図 2）。妊娠が起きるのは子宮体部である。子宮体部はヒトと同様、子宮内膜、子宮筋層、子宮漿膜に分けられ、子宮内膜もヒト同様に単層の円柱上皮細胞より成る管腔上皮と腺上皮、そして間質により構成される（図 2）。

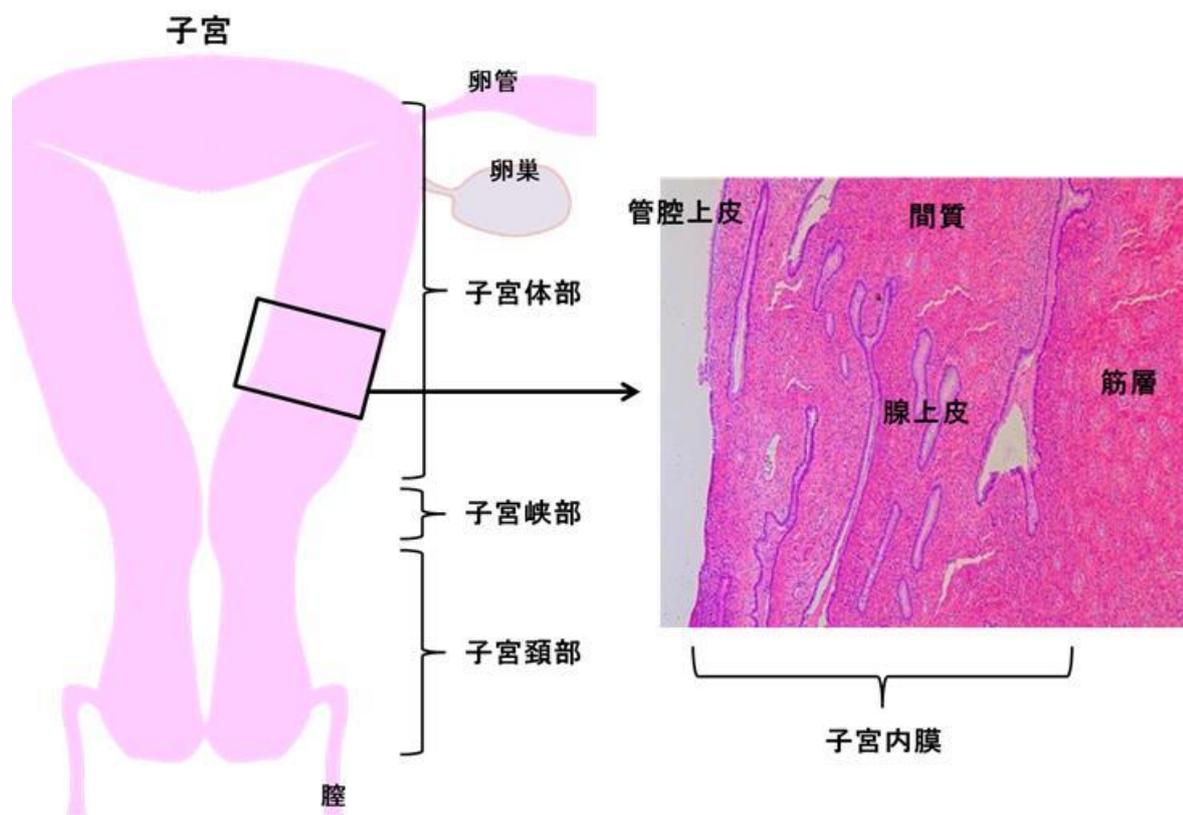


図 1. ヒトの子宮の構造

(Taketani, Y., et al. *Principles of Obstetrics and Gynecology*, 40-93 (2014) [4]より改変)

ヒトの子宮は子宮体部、子宮頸部、その両者の間にある子宮峡部よりなる。子宮体部の組織は、子宮内膜、子宮筋層に分けられる。断面図は子宮体部の HE 染色を示す。

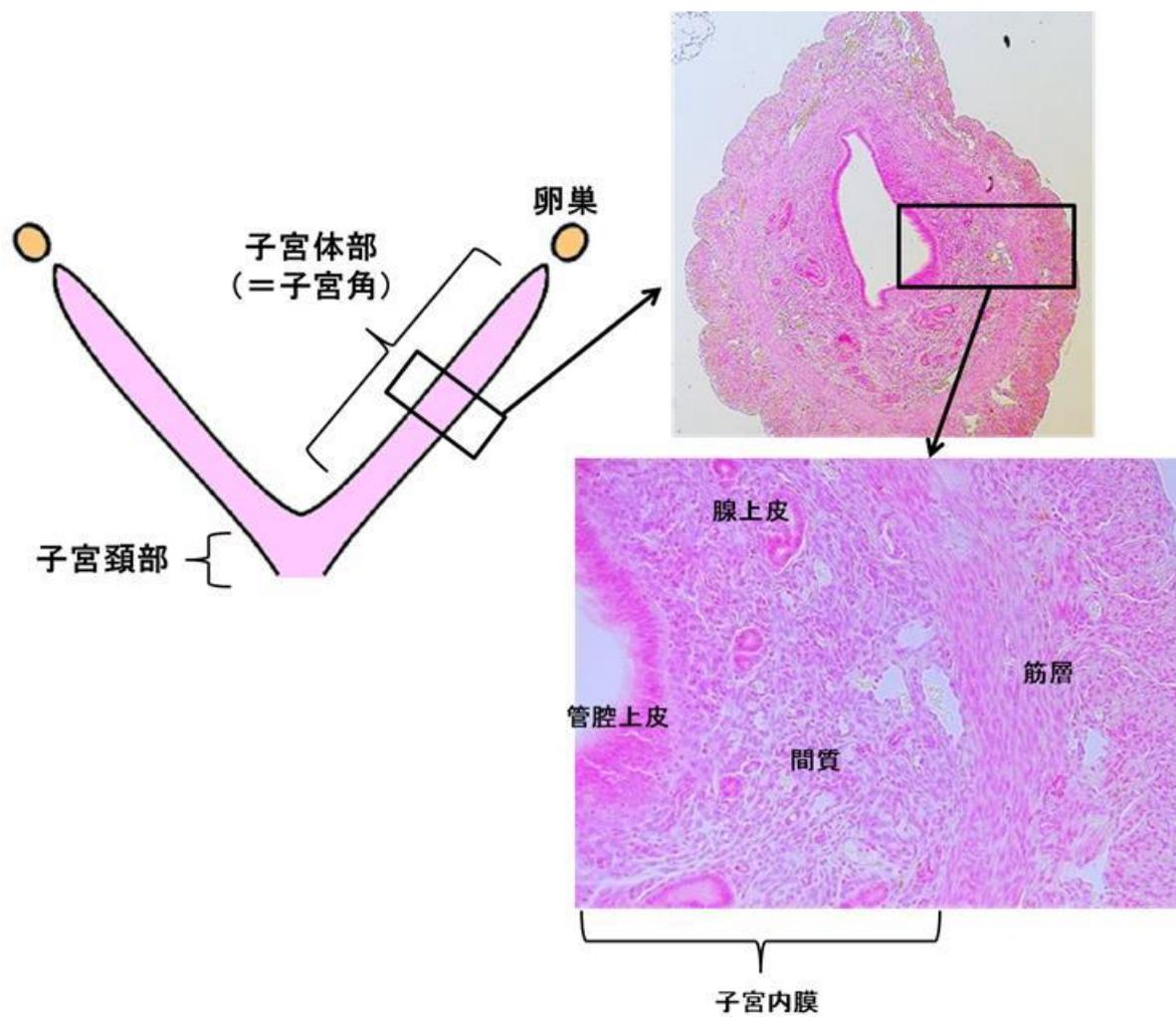


図 2.マウスの子宮の構造

マウス子宮は Y 字型（双角子宮）を示し、2つの子宮体部すなわち子宮角と1つの子宮頸部よりなる。子宮体部の組織は、子宮内膜、子宮筋層に分けられ、子宮内膜は管腔上皮、腺上皮、間質により成る。

## 子宮内膜の周期的再生について

非妊娠時、ヒトの子宮内膜は約 28 日前後の間隔で周期的に変化し、この周期を月経周期という[4] (図 3)。月経周期は月経期、増殖期、分泌期に分けられ、卵巣由来のエストロゲン ( $17\beta$ -estradiol,  $E_2$ )・プロゲステロン (progesterone,  $P_4$ ) の作用により、子宮内膜は変化する (図 3)。排卵までの増殖期には卵胞より分泌される  $E_2$  の作用により子宮内膜は肥厚し、排卵後の分泌期には黄体より分泌される  $P_4$  の作用が加わることにより子宮内膜は厚みを増し、着床に適した状態に変化する。妊娠不成立だった場合には黄体の退縮が起きることで  $E_2 \cdot P_4$  の分泌が消退し、子宮内膜は剥脱し、月経となる[4]。その後子宮内膜は再生し、 $E_2$  の上昇に伴い再び増殖期を迎える。月経により機能層が剥脱し、その後基底層から新たな機能層が生み出されることで子宮内膜が再生すると考えられており、約 1 ヶ月の周期で脱落と再生を繰り返すことから子宮内膜は高い再生能を有していると推測されているが、その詳細な機序は分かっていない。

一方、マウスには非妊娠時に 4-5 日間の性周期があり、発情前期、発情期、発情後期、発情休止期の 4 つに分類されるが[6]、月経はない。ただし、分娩時には脱落膜化した子宮内膜が剥脱することで出血をきたし、分娩後に子宮内膜の再生が起きる。マウスは繁殖力が高く、短ければ 20 日~30 日周期で妊娠分娩を繰り返すことが可能であり、その間も子宮内膜の脱落と再生が起きるため、マウスにおいても子宮内膜の再生能は高いと考えられる。しかしながら、ヒト同様、再生を制御する詳細な機構については明らかにされていない。

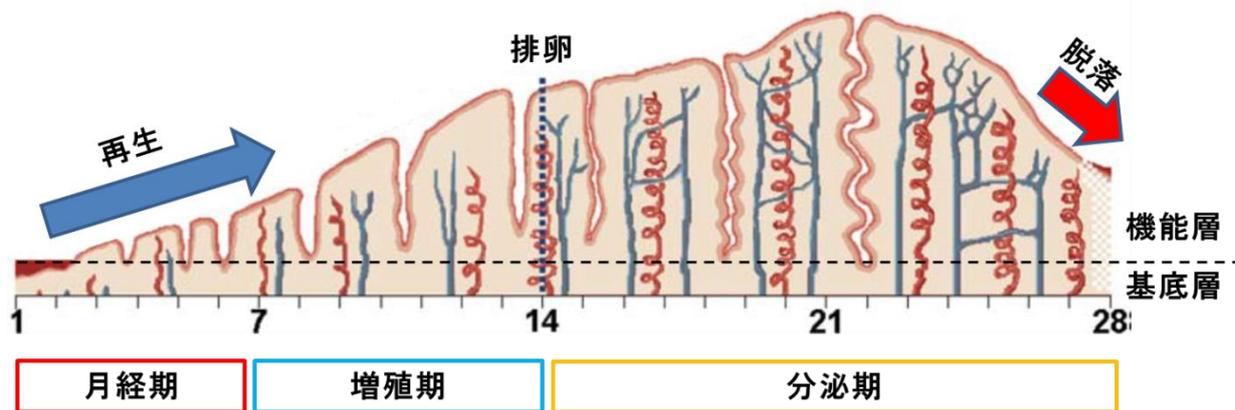


図 3. ヒト子宮内膜の周期的変化

(Munro, S.K., et al. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* **16**, 297-310 (2010) [7]より改変)

ヒトの月経周期における子宮内膜の変化を示す。月経周期は月経期、増殖期、分泌期に分けられ、卵巣より分泌される  $E_2 \cdot P_4$  の作用により子宮内膜の状態は変化する。増殖期に卵巣から分泌される  $E_2$  の作用により子宮内膜は肥厚し、排卵後の分泌期に黄体から分泌される  $P_4$  の作用により子宮内膜の厚みはさらに増し、着床に備える。妊娠が成立せず分泌後期に  $E_2 \cdot P_4$  が消退すると、子宮内膜は脱落し、月経期に入る。月経により機能層が剥脱し、基底層から新たな機能層が生み出されることで子宮内膜が再生すると考えられているが、詳細は不明である。

## 子宮再生研究の現況

上述のようにとりわけ高い再生能を有すると考えられる子宮内膜に関しては、再生を支える基盤として組織幹細胞の存在が疑われ、検証されてきた。Masudaらはヒト子宮内膜細胞を免疫不全マウスに移植することで子宮内膜症様の病変を作製するモデルを用いて、子宮内膜に存在するある一定の分画が幹細胞様の性質を持つ細胞を豊富に含んでおり、子宮内膜の再生や子宮内膜症の発生に寄与している可能性について報告した[8]。同様に、子宮筋層においてもある一定の分画が幹細胞様の性質を示すことも報告されている[9]。一方で、他臓器で一般的に知られている上皮系の幹細胞についての知見はほとんど得られていない。腸上皮を始めとして多くの臓器の上皮幹細胞マーカーとして知られている *Lgr5*+陽性細胞は、卵管上皮においては幹細胞であることを示唆する報告が見られるが[10]、子宮上皮に関しては決定的な報告はなされていない。もし子宮上皮幹細胞の単離マーカーが同定されれば、腸で特に研究が進んでいるようなオルガノイド培養技術が飛躍的に進展すると考えられる。オルガノイドとは、*in vitro* において人工的に作製される、構造的にも機能的にも実際の臓器を模倣した小型の器官のことを指す。腸管上皮の幹細胞である *Lgr5*+細胞を用いた腸管オルガノイドの研究が最も進んでおり代表的であるが[11]、子宮の細胞を用いたオルガノイド研究についてはつい最近報告がなされたばかりである[12, 13]。オルガノイドを用いた研究の利点としては、組織に類似した器官を試験管内で観察できるため、一般的な細胞株や初代培養細胞を用いた実験に比べてより生体内に近い情報を得られることが

挙げられる。ただし、現状の技術では間質細胞など他の構成細胞も含んだ大きな器官の作製は達成させておらず、組織全体の再生機序の研究や臨床応用に向けては課題が残されている。これまでに試みられてきた子宮再生研究の研究手法を表 1 に示す。

### 脱細胞化組織を用いた臓器再生研究について

上述以外の再生医療研究分野の一つとして、脱細胞化組織を用いた臓器再生の試みが挙げられる（表 1）。脱細胞組織とは、採取した組織に高静水圧負荷もしくは界面活性剤処理を施すことで細胞成分を破綻させ、細胞外基質のみを保持した担体のことを指し、*in vitro* で細胞を立体的に培養する“足場”として用いられることが多い。細胞外基質タンパク質はその構成成分・弾性・硬度といった条件が細胞の分化に影響を与えるという報告があり[14-20]、天然の組織に近い構造や性質を保っていると考えられる脱細胞化組織の長所を利用した研究成果が散見される[21-25]。ラットの心臓や肝臓、子宮の再生研究では、血管付きで採取した臓器を脱細胞化し、幹細胞あるいは分化した細胞の懸濁液を脱細胞化組織内に注入し、血管構造を利用して培養液を還流し、脱細胞化組織内で細胞の三次元培養を行っている[22, 26]。この手法の長所として、臓器本来の立体構造を有する組織を体外で作製できる可能性を秘めている点が挙げられるが、一方、現在の技術では培養期間が最長でも 21 日間しかなく、全ての終末分化細胞を十分な密度まで増殖させ機能的な臓器を作製するまでには技術的な障壁が高い。脱細胞化組織を用いた別の研究手法として、Miyazaki ら、Santoso らはそれぞれ

れ脱細胞化組織をラットの人工的子宮欠損部位に生体内移植し、移植部位における機能的な子宮組織の再構築に成功している[27, 28]。この手法の長所として、拒絶反応の原因となるドナー側の細胞成分を除去し、組織再構築に必要な細胞の足場を提供することで組織の治癒・再生を補助できる点が挙げられるが、一方、組織を構成するための細胞供給源はレシピエント由来であるため、先天的あるいは後天的に大規模な組織欠損を認める症例に対しての臨床応用は困難と考えられる。このような解決困難な課題を克服するためには子宮再生に関する分子生物学的な理解が必須と考えられ、有力な子宮再生実験モデルの確立が必要と考えられる。そこで本研究では、遺伝子改変技術が進んだマウスを用いて生体内への脱細胞化組織移植を行い、再生過程を解析することで子宮の再生制御機構を分子学的に明らかにするという、新しい研究手法を着想するに至った。

子宮再生研究の手法	報告者
子宮幹細胞	Masuda ら[8]、Ono ら[9]
オルガノイド培養	Boretto ら[12]、Turko ら[13]
脱細胞化組織	Miyazaki ら[27]、Santoso ら[28]

### 表 1. 子宮再生研究の現況

子宮再生研究の現況を実験手法ごとに示す。子宮内膜幹細胞、子宮筋幹細胞といった組織幹細胞同定に向けた試みや、組織を部分的に模倣したオルガノイド培養研究、そして立体的な細胞の「足場」を提供する脱細胞化組織を用いた研究などが試みられてきた。

## 目的

晩婚化・少子化が進む現代の日本社会において、体外受精などの不妊治療技術の進歩は重要性を増しているが、子宮の不可逆的な器質的・機能的欠損による難治性不妊症例に対する有効な治療法は確立されておらず、子宮再生医療はこの難題に画期的な解決策を与える可能性がある。子宮再生医療確立のためには子宮再生機序に関する基礎研究の蓄積が必要と考えられるが、現状では十分な知見は得られていない。そのため本研究の目的は、子宮再生機序を詳細に検証できる新しい実験モデルを確立し、子宮再生に関する知見を得ることである。

## 方法

### マウス

CD1 野生型マウス (WT) と R26GRR マウス[29]、Ltf-iCre マウス[30]、Pgr-Cre マウス[31]、Stat3-floxed マウス[32]を用いた。R26GRR マウスは EGFP による緑色蛍光を全身性に有しているが、Cre 酵素による DNA 組み換えが生じた細胞では tdsRed に発現が切り替わり、赤色蛍光を呈するようになるマウスである。Ltf-iCre マウスは子宮上皮特異的に、Pgr-Cre マウスは子宮全体に Cre を発現しているマウスである。子宮特異的 STAT3 欠損マウス ( $\Delta$ STAT3) は Stat3-floxed マウスと Pgr-Cre マウスを交配させて作製した。本研究で用いたすべてのマウスは、東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルに従って東京大学の動物飼育施設 (生命科学実験棟および南研究棟産婦人科動物飼育室) で飼育した。本実験は、東京大学医学系研究科動物実験委員会の承認を受けており、承認番号は、医-P12-113、医-P16-066 である。

### 脱細胞化子宮組織 (Decellularized uterine matrix, DUM) の作製

8~16 週齢の CD1 野生型メスマウスをドナーマウスとして用い、過量の麻酔投与により安楽死させ、子宮を摘出し、 $2 \times 5$ mm 大に細切した。PBS にて洗浄後、1% ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate, SDS) (WAKO) に浸漬し、常温で 1 時間振盪した。1% ドデシル硫酸ナトリウムを除去後、0.9% NaCl (WAKO), 0.05 M MgCl<sub>2</sub>/6 H<sub>2</sub>O (WAKO)、0.2 mg/ml DNase I (Roche Diagnostics)、1% Gibco penicillin-streptomycin

solution (Thermo Fisher Scientific)から成る洗浄バッファーにて4°Cで振盪し、連日液交換を行い、一週間かけて1%ドデシル硫酸ナトリウムを洗浄除去し、DUMを作製した。なお、卵巣除去術後の脱細胞化組織移植モデルに対しては、卵巣除去術後二週間のドナーマウスから子宮を採取し、1×3mm大のサイズに細切してから同様の手法でDUMを作製した。

### 脱細胞化組織移植 (Decellularized matrix transplantation, DMT)

8~16週齢のCD1野生型メスマウス、子宮特異的STAT3欠損マウス ( $\Delta$ STAT3)、R26GRR/Ltf-iCreマウスをレシピエントマウスとして用い、麻酔下に腹部正中切開にて開腹した。片側子宮角の対血管側の一部をマイクロ剪刀を用いて切除し、子宮内腔に達する2×5mm大の人工的欠損部位を作成した。この欠損部位に、同じサイズで作製したDUMを顕微鏡下に縫合し移植した。縫合糸は10-0ナイロン糸 (Matsuda) を使用し、レシピエント子宮の内腔側とDUMの内腔側が合致するように結節縫合で縫合した。移植部位表面には癒着防止剤としてセプラフィルム (KAKEN) を貼付した。卵巣除去術後の脱細胞化組織移植モデルに関しては卵巣除去術後二週間を経過したレシピエントマウスを用い、卵巣除去術により子宮が萎縮するため1×3mm大の人工的欠損を作成し、卵巣除去術後二週間を経過したドナーマウス由来の1×3mm大のDUMを移植した。

移植後の検体採取に際しては、移植部位の回収に加え、対照として同一マウスの対側子宮角の一部も採取した。また、移植部位の組織学的検証の際、レシピエントマウスの子宮（UT）と DUM の境界は縫合糸の存在により判定した。

### DMT 後の妊娠実験

DMT 後一ヶ月を経過した野生型レシピエントマウスと妊孕性のある野生型 CD1 オスマウスと交配させた。膣栓を認めた日を妊娠 1 日目と定義すると、着床直前である妊娠 4 日目に屠殺し、再生子宮のホルモン応答能を組織学的に評価した。さらに、移植部位での妊娠継続を評価するため、妊娠 19 日目に麻酔下に開腹し子宮の所見を肉眼で確認するとともに、帝王切開術により分娩を行い、産仔の重量を計測した。

### ヒト検体の採取

ヒト子宮組織は、腹腔鏡下あるいは開腹下に切除された子宮より採取した。事前にホルモン療法を受けていない、すなわち、術前の 3 カ月以内に性ステロイドホルモンや GnRH アゴニストを投与されていない患者より組織を得た。なお、月経周期については病理学的診断を受けたものを使用した[33]。検体採取に関して東京大学倫理委員会の承認を受けており、承認番号は 0324 である。手術前に患者より書面によるインフォームド・コンセントを得た。

## 免疫染色

摘出したマウス子宮組織を中性緩衝ホルマリンにて固定し、エタノールを用いて脱水したのちパラフィン包埋を行い、6 $\mu$ m の切片を作成した。切片はキシレンにて脱パラフィン後、10 mmol/L クエン酸バッファー (pH 6.0) で 1 時間加熱処理を施し、抗原賦活化を行った。PBS にて洗浄後、3%過酸化水素 / メタノールにて 10 分処理した。PBS 洗浄後、ブロッッキング液 (DAKO) にて 1 時間処理したのち、1 次抗体と 4°C で overnight 反応させた。抗 CK8 抗体 (1:100, Troma-I, Developmental Studies Hybridoma Bank)、抗  $\alpha$  SMA 抗体 (1:100, DAKO)、抗プロゲステロン受容体 (PR) 抗体 (1:100, abcam)、抗マウスエストロゲン  $\alpha$  受容体 (ER  $\alpha$ ) 抗体 (1:200, abcam)、抗マウス Ki67 抗体 (1:500, Thermo Scientific)、抗体ヒト・マウス pSTAT3 抗体 (Abcam、ab76315) を 1 次抗体として用いた。TBST で洗浄後、2 次抗体として Envision polymer for Rabbit IgG (DAKO) または Envision polymer for Rabbit IgG (DAKO)、ヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO (Rat) (ニチレイバイオサイエンス) と 1 時間反応させた。発色は DAB (ヒストファイン SAB-PO キット、ニチレイ) を用い、ヘマトキシリンによる核染色後、封入し顕微鏡で観察した。

WT と  $\Delta$  STAT3 における DUM 表面の扁平な細胞の数とレシピエント上皮細胞の Ki67 陽性率に関しては、三切片を手動で計数し、一切片あたりの平均値を算出した。

## 蛍光アッセイ

R26GRR/Ltf-iCre マウスを麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し、子宮組織を摘出した。さらに 4%パラホルムアルデヒドにて 4°C, overnight で浸漬固定を行ったのち、15%スクロース/PBS、30%スクロース/PBS による置換を行った。O.C.T. コンパウンド(サクラファインテックジャパン)に包埋し-80°Cで凍結させたのち 12 $\mu$ m の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡 (DM5000B, Leica Microsystems GmbH) を用いて蛍光を検出した。

## 統計学的解析

データはエクセル統計 2012 (Social Survey Research Information)を用いて解析した。

2 群間比較には Student's t test を行い、 $P < 0.05$  を統計学的有意とした。

## 結果

### 脱細胞化組織移植（DMT）による部分的子宮再生

まず、野生型ドナーマウスから採取した子宮に SDS 処理を施し、脱細胞化子宮組織（Decellularized uterine matrix, DUM）を作製した。DUM は肉眼的に白色であり、管腔面の襞が確認可能であり組織の構造は保たれていた（図 5A）。また、HE 染色により DUM 内に核や細胞質の染色を認めず、細胞成分が除去されていることを確認した（図 5B）。さらに、管腔面、間質、腺上皮、筋層、血管の細胞外基質構造は保たれていた（図 5B）。この DUM を野生型レシピエントマウス子宮の同じ大きさの人工的欠損部位に縫合、移植した（図 6）。移植当日を Day 0 と定義し、ある特定の時期にマウスを屠殺し、移植部位と対側子宮角の一部を採取し、組織学的な検証を行った。この実験モデル、脱細胞化組織移植（Decellularized matrix transplantation, DMT）の概要を図 4 に示す。

移植後 28 日すなわち Day 28 にレシピエントマウスを開腹し移植部位を観察したところ、縫合糸に囲まれた DUM 内に脈管構造を有する組織が構築されていることが肉眼的に確認された（図 6）。HE 染色にて、管腔上皮、腺上皮、間質、筋層から成る、構造的に正常な子宮組織が DUM 内に構築されていた（図 7A）。また、上皮マーカー CK8、筋層マーカー  $\alpha$  SMA の免疫組織染色により、再生子宮の管腔上皮と腺上皮は対側子宮角と同様に CK8 陽性を示し、再生子宮の筋層は対側子宮角と同様に  $\alpha$  SMA 陽性を示した（図 7B）。また、正常子宮上皮・間質・筋層で陽性を示すエストロゲン

受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ )、プロゲステロン受容体 (PR) に関しても、再生子宮において正常に発現していた (図 7B)。これらの結果より、子宮の部分的欠損に対し、細胞の足場となる DUM を移植することで、組織学的に正常な子宮組織が再建されることが明らかとなった。

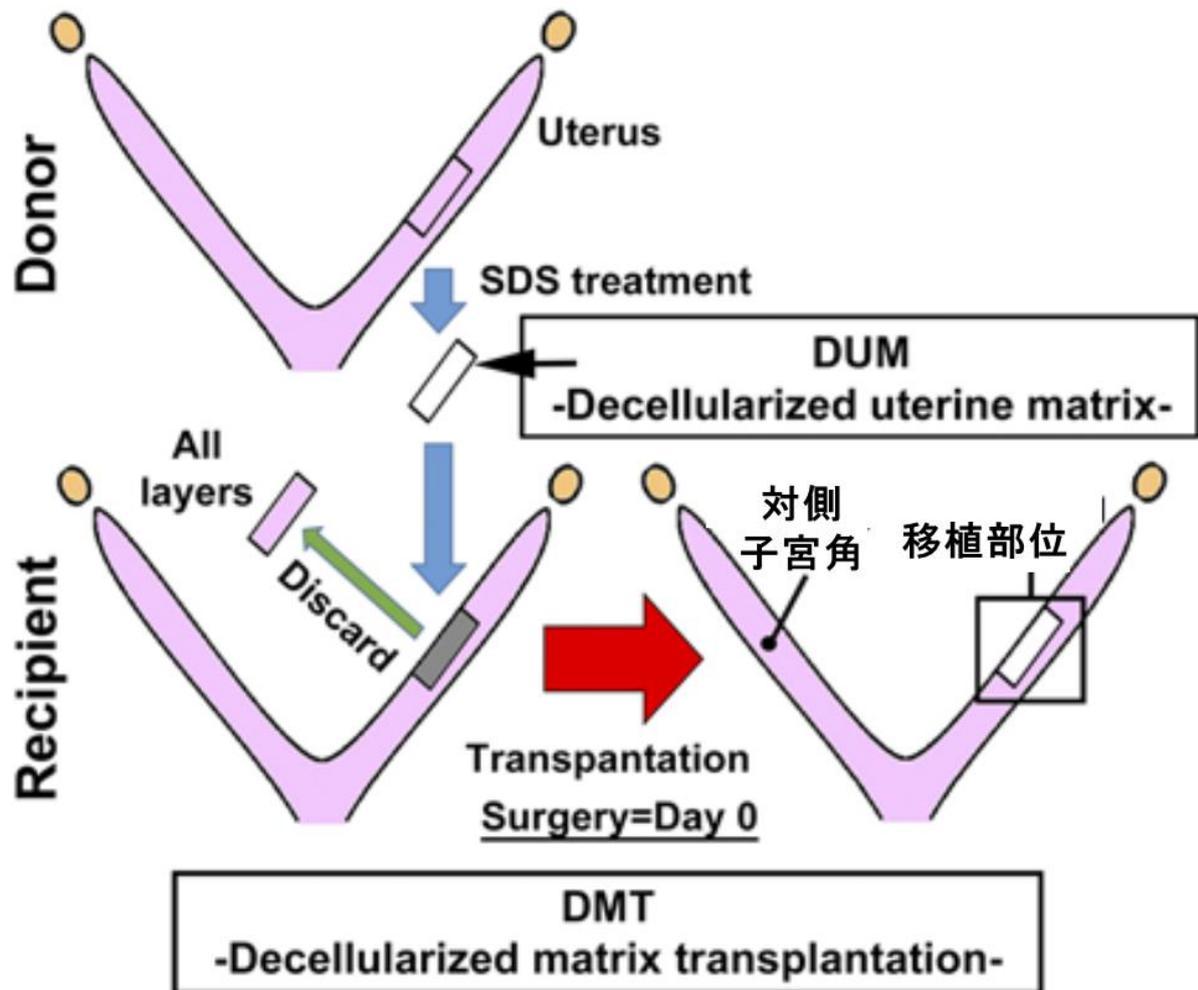


図 4. マウス脱細胞化組織移植モデルの概略

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

ドナーマウスより採取した子宮を 2×5mm 大に細切し、界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムで処理することで細胞成分を破綻させ、細胞外基質のみを保存した脱細胞化子宮組織すなわち DUM (decellularized uterine matrix) を作製した。この DUM を、レシピエントマウスの子宮に人工的に作成した 2×5mm 大の欠損部位に縫合、移植した。移植当日を Day 0 と定義し、Day 1、Day 3、Day 7、Day 28 に検体を採取し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色や免疫染色により組織学的検証を行った。

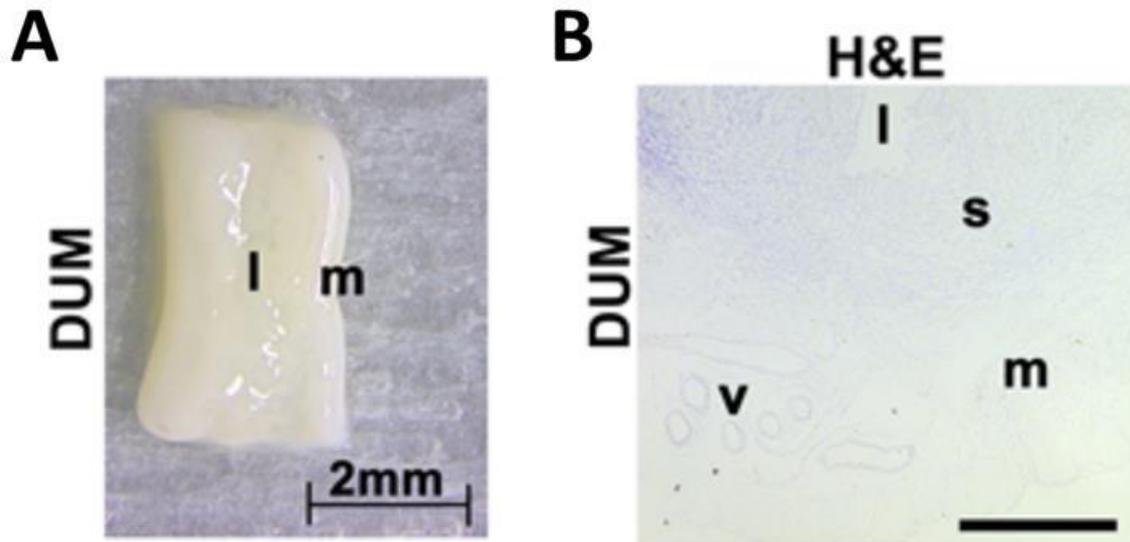


図 5. 脱細胞化子宮組織はドナーマウス由来の細胞成分を欠いており、子宮の細胞外基質構造を保っている

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

A. 脱細胞化子宮組織のマクロ像。子宮本来の淡紅色から白色に変化しているが、管腔面や筋層は肉眼的に識別可能であり、子宮の構造を保っている。B. HE 染色による脱細胞化子宮組織の組織像。核などの細胞成分を認めず、ドナーマウス由来の細胞が除去されていることが確認される。一方、管腔面、間質、筋層、血管の細胞外基質構造は保たれていることが分かる。3 検体検討した。図のスケールバーは 200µm、l は上皮、s は間質、m は筋層、v は血管を示す。

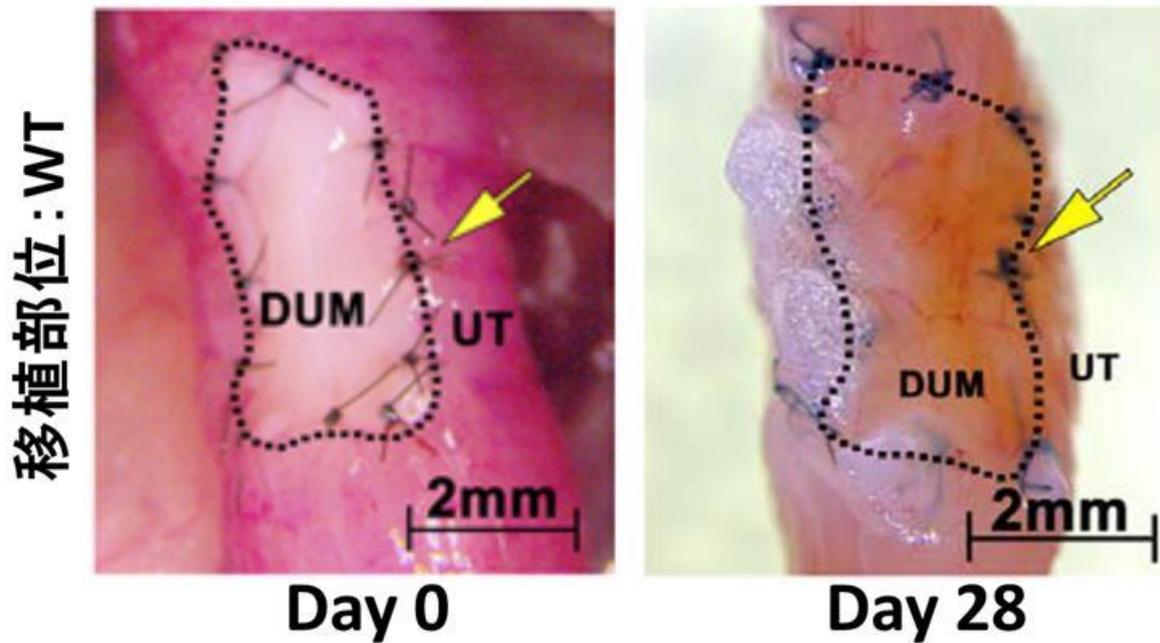
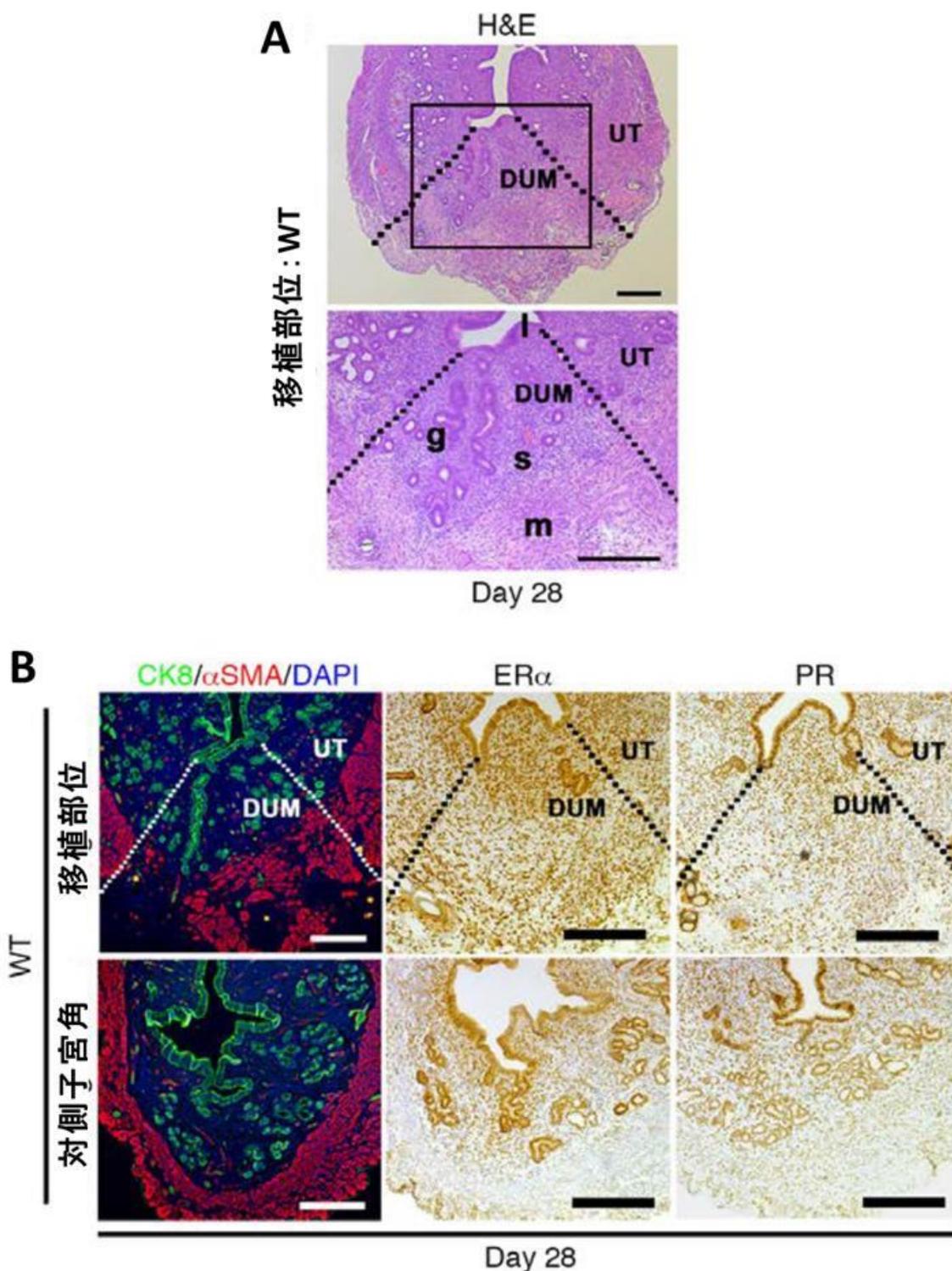


図 6. 移植後 28 日には脱細胞化組織内への組織の再構築を認めた

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

移植直後 (Day 0) と移植後 28 日目 (Day 28) における移植部位のマクロ像。Day 0 には白色で識別される DUM であるが、Day 28 には移植部周囲のレシピエント子宮 (UT) と同様に淡紅色を呈し、内部に脈管構造を有していることが分かり、細胞成分の充填による組織の再構築が示唆された。矢印は縫合糸を、点線は DUM と UT との境界を示す。



図

図 7. 脱細胞化組織内に再構築された子宮は組織学的に正常である

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

A. 子宮角長軸方向に垂直な断面で作成した移植部位の HE 染色。DUM 内に管腔上皮、腺上皮、間質、筋層を有する正常な構造の子宮組織が再構築されていた。B. 移植部

位の免疫染色。CK8、 $\alpha$ SMA、ER $\alpha$ 、PRは対側子宮角と同等の染色を示し、再生組織の性質も正常であることが示唆された。各3検体検討した。図のスケールバーは200 $\mu$ m、DUMは脱細胞化子宮組織、UTはレシピエントマウスの子宮、lは管腔上皮、gは腺上皮、sは間質、mは筋層を示す。

## 再生した子宮は機能的に正常である

次に、DUM 内に再生した子宮の機能が正常かどうか評価するため、移植後 1 か月を経過した野生型レシピエントマウスを、妊孕性のある野生型オスマウスと交配させ、妊娠の表現型を検証した。膣栓を認めた日を妊娠 1 日目と定義するとマウスの着床は妊娠 5 日目に起きるが、着床直前である妊娠 4 日目の子宮上皮の増殖停止、間質の増殖亢進 (Proliferation-Differentiation-Switching, PDS) が着床に必須の因子であることが我々の研究から明らかになっている[2]。この PDS は卵巣より分泌される  $E_2 \cdot P_4$  に対する子宮内膜の応答能によって制御されることが分かっており、子宮内膜の機能の指標と言える。DMT 後 1 か月のメスマウスの妊娠 4 日目の子宮を Ki67 免疫染色で評価したところ、再生子宮の PDS は対側子宮角と同様に正常であった (図 8)。さらに、再生子宮での妊娠継続の可否を検証するため、自然分娩が起きる妊娠 20 日目の前日である妊娠 19 日目に開腹したところ、移植部位での妊娠維持が確認された (図 9A)。5 匹のレシピエントマウスを交配させたうち 4 匹が妊娠しており、うち 3 匹に移植部位での妊娠を認めた。そのうち 1 匹では、移植部位に 2 個の妊娠部位が確認された。帝王切開による分娩を行ったところ、移植部位から娩出した仔に明らかな外見的異常を認めず、重量は移植部位以外の箇所から娩出した仔と同等であった (図 9B、9C)。これらの結果より、DMT により再生した子宮は正常な機能を有していることが示された。

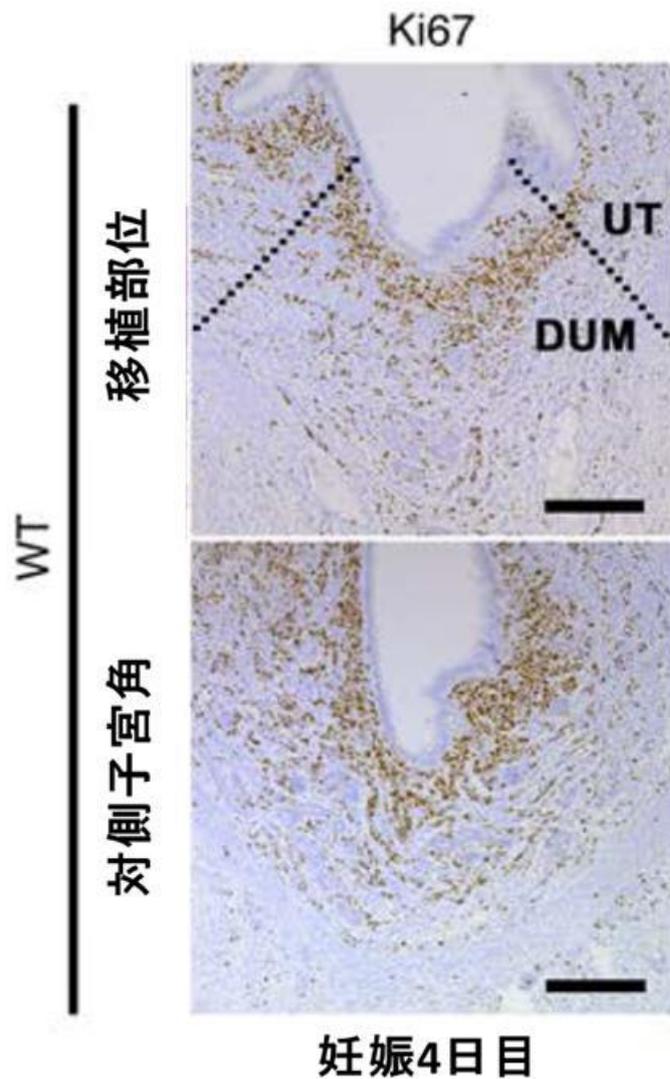


図 8. 再生子宮の妊娠初期における卵巢ホルモン応答能は正常である

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

妊娠 4 日目における Ki67 免疫染色。卵巢由来の  $E_2$ 、 $P_4$  により制御され、着床の成立に必須である上皮の増殖停止と間質の増殖亢進は、再生子宮において正常に認められた。3 検体検討した。図のスケールバーは 200 $\mu$ m、DUM は脱細胞化子宮組織、UT はレシピエントマウスの子宮を示す。

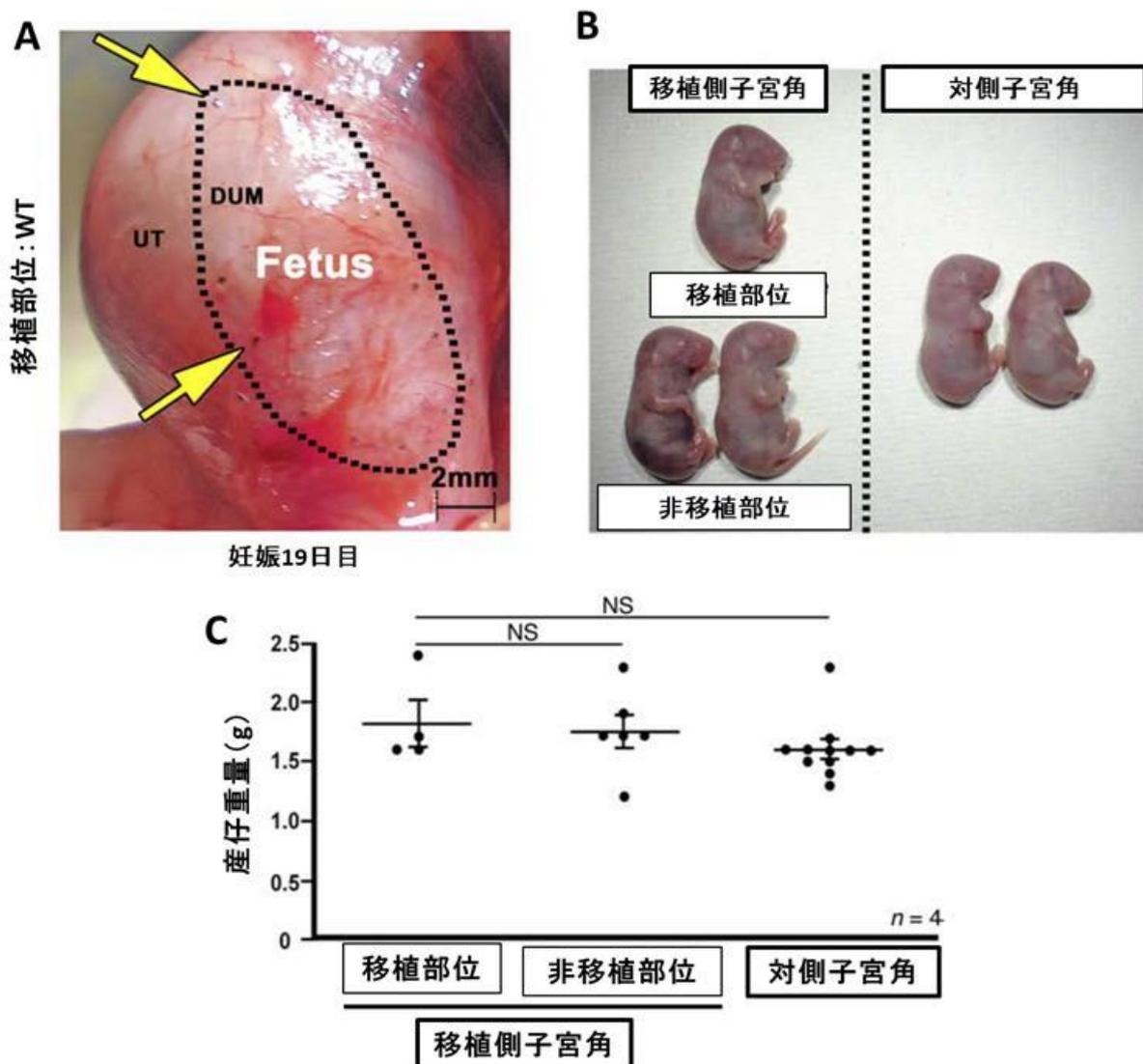


図 9. 再生子宮において正常産までの正常な妊娠継続が可能である

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

A. 再生子宮における妊娠 19 日目の肉眼所見。血種などの流産兆候や筋層菲薄化による子宮破裂の徴候を認めず正常な妊娠経過と考えられる。DUM は脱細胞化子宮組織、UT はレシピエントマウスの子宮を示す。矢印は縫合糸を、点線は DUM と UT の境界を示す。妊娠していた 4 匹のレシピエントマウスのうち、3 匹に移植部位での妊娠を確認した。B. 妊娠 19 日目に帝王切開により分娩した産仔の肉眼所見。再生子宮より娩出した仔の大きさは正常であり、外表的な異常を認めない。C. 帝王切開により分娩した産仔の重量の比較。再生子宮より分娩した仔の重量は、他の部位から分娩した児の重量と同等であった。

## マウス子宮上皮は卓越した再生能を有する

次に、DMT モデルを子宮再生機序解析の実験モデルとして用いるため、Day 1、Day 3、Day 7 にレシピエントマウスを解剖し、再生過程を時系列で検証した。その結果、Day 1 には DUM 表面に扁平な細胞が出現し、Day 3 にはこの細胞は徐々に円柱状の形態に変化し、Day 7 には単層円柱上皮から成る管腔上皮が形成された。また、腺上皮や間質の再生は、Day 7 に再生管腔上皮の直下に観察され、筋層の再生は Day 28 に確認された (図 10)。これらのことから、組織の損傷からの再生過程において、管腔上皮の再生能は間質や筋層と比較し卓越していることが明らかとなった。Day 7 に完成する再生管腔上皮の構成は Day 1 に DUM 上に出現する扁平な細胞が起源になっていると考えられるが、この Day 1 の扁平な細胞は免疫染色にて CK8、ER $\alpha$ 、PR いずれも陽性であり、再生初期から正常子宮上皮の性質を有していた (図 11A)。また、子宮上皮の細胞系譜を追跡可能な遺伝子改変マウスである R26GRR/Ltf-iCre マウスをレシピエントマウスとして用いて野生型ドナーマウス由来の脱細胞化組織を移植し Day 3 に観察したところ、移植後早期に DUM 上に観察される扁平な細胞は、DUM 周囲のレシピエントマウスの管腔上皮の移動により供給されている可能性が示唆された (図 11B)。以上のことから、本モデルを用いた子宮損傷後の再生過程の観察によって、子宮管腔上皮の再生能が卓越しており、間質や筋層の再生能はそれに続くことが示唆された。

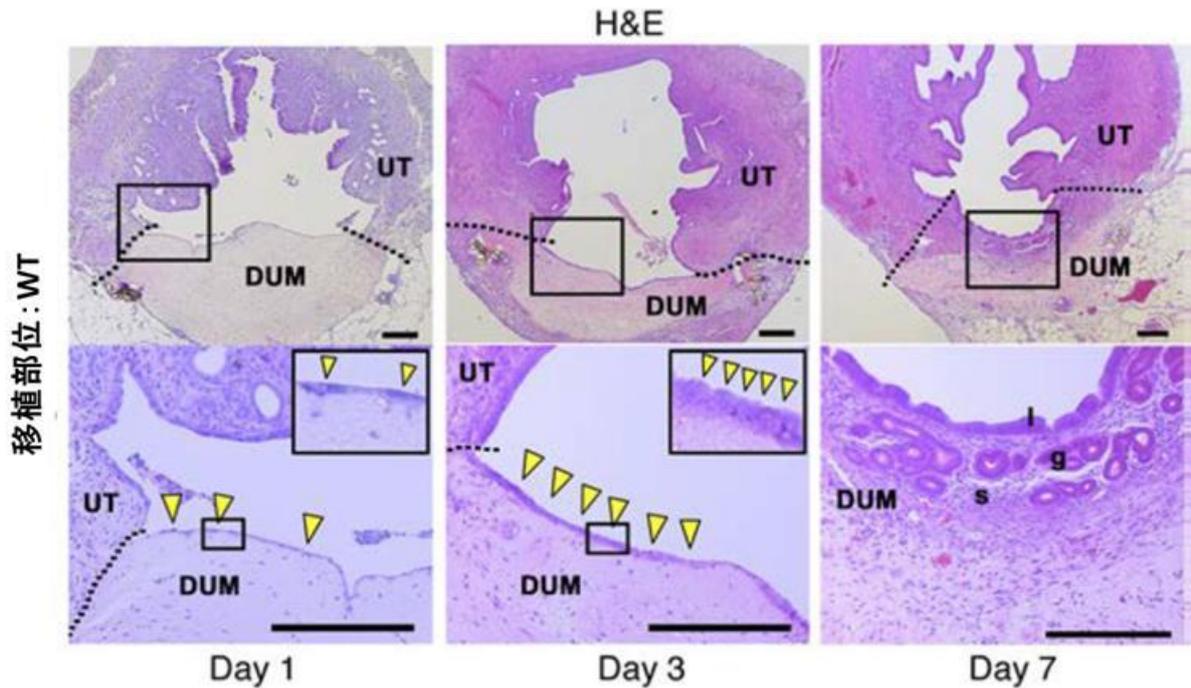


図 10. 管腔上皮の再生能が卓越しており、間質や筋層の再生能がそれに続く

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

子宮再生過程の時系列による組織所見。Day 1、Day 3、Day 7 にレシピエントマウスを解剖し、HE 染色を行った。Day 1 には DUM 表面に扁平な細胞が出現し、Day 3 にはこの細胞は徐々に円柱状の形態に変化し、Day 7 には単層円柱上皮から成る管腔上皮が形成された。また、腺上皮や間質の再生は、Day 7 に再生管腔上皮の直下に観察され、筋層の再生は移植後 7 日には認められなかった。これらのことから、管腔上皮の再生能は間質や筋層と比較し卓越していることが明らかとなった。各群 3 検体検討した。図のスケールバーは 200 $\mu$ m、DUM は脱細胞化子宮組織、UT はレシピエントマウスの子宮を示す。矢頭は DUM 表面の扁平な細胞を示す。

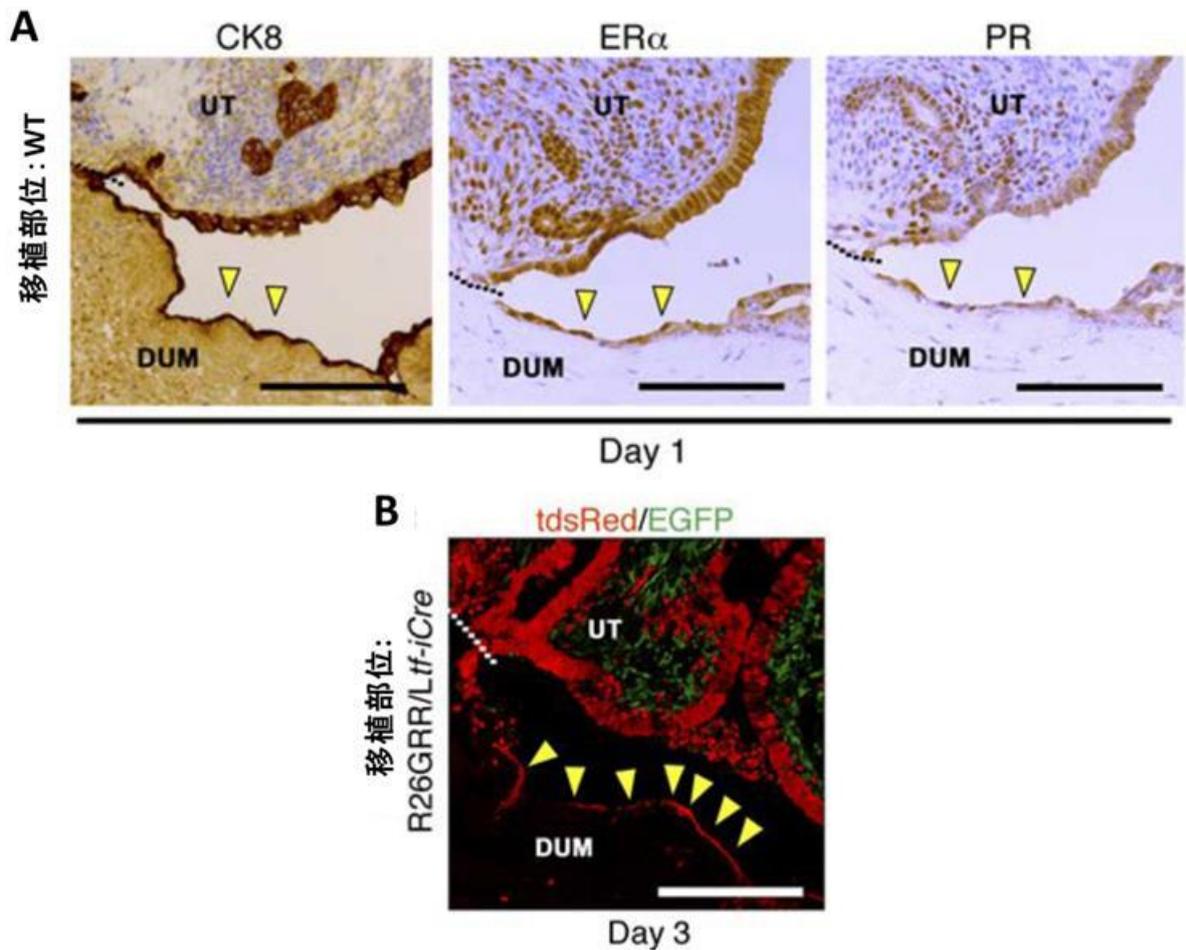


図 11. 管腔上皮の再生はレシピエントマウスの上皮細胞の移動によって開始する

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

A. Day 1 の CK8、ER $\alpha$ 、PR 免疫染色。DUM 表面の扁平な細胞は CK8、ER $\alpha$ 、PR 陽性を示し、上皮の性質を有していることが明らかとなった。B. 上皮レポーターマウスを用いた Day 3 の蛍光アッセイ。子宮上皮の細胞系譜を追跡可能な遺伝子改変マウスである R26GRR/Ltf-iCre マウスをレシピエントマウスとして用い、野生型ドナーマウス由来の脱細胞化組織を移植した。DUM 表面の扁平な細胞は赤色の蛍光を呈しており、レシピエントマウスの管腔上皮の移動により供給されていることが示唆された。各群 3 検体検討した。図のスケールバーは 200 $\mu$ m、DUM は脱細胞化子宮組織、UT はレシピエントマウスの子宮、l は管腔上皮、g は腺上皮、s は間質、m は筋層を示す。

## 卵巣ホルモンは子宮再生に必須の因子ではない

二種類の卵巣ホルモン  $E_2 \cdot P_4$  は周期的に卵巣より分泌され、ヒト子宮内膜の状態を制御しているが、マウス子宮内膜に対してもヒトと類似した作用を示すことが知られている[35]。そこで卵巣ホルモンが子宮再生に与える影響を検討するため、卵巣除去術後二週間を経過したドナーマウスとレシピエントマウスを用いて、DMT による子宮再生を評価した。その結果、子宮の再生過程や再生子宮の組織学的構造は卵巣を有する DMT と著変なく (図 7、図 10、図 12A)、CK8、 $\alpha$  SMA 免疫染色の結果も同様であった (図 12B)。この結果より、子宮組織の修復・再生に卵巣ホルモンは必須でないことが明らかとなった。

次に、卵巣ホルモンの非存在下においても誘導される子宮再生過程をより詳細に検証するため、卵巣除去術後マウスを用いた DMT モデルを用い、移植後早期に観察される上皮の再生に焦点を当てて組織学的検討を行った。

細胞増殖の指標である Ki67 免疫染色を行ったところ、DMT 後 12 時間にはレシピエントマウスの上皮における増殖が対側子宮角と比較し亢進しており (図 13)、DMT 後 24 時間 (すなわち Day 1) にはこの傾向がさらに顕著となり (図 13)、DUM 上への細胞の供給源になっていると考えられた。ここで、子宮上皮の増殖を誘導できることが知られている  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) が[36, 37]上皮再生に与える影響を評価するため、レシピエントマウスに DMT を行う 6 時間前に  $E_2$  を皮下投与し、Day 3 までの上皮の再生能を検証した。その結果、対照群と  $E_2$  投与群における明確な差は確認されな

った (図 14)。このことから、子宮の損傷からの再生機構にはエストロゲンの影響と重複するかそれを上回る分子経路が存在し、上皮の再生を制御している機序が推定された。

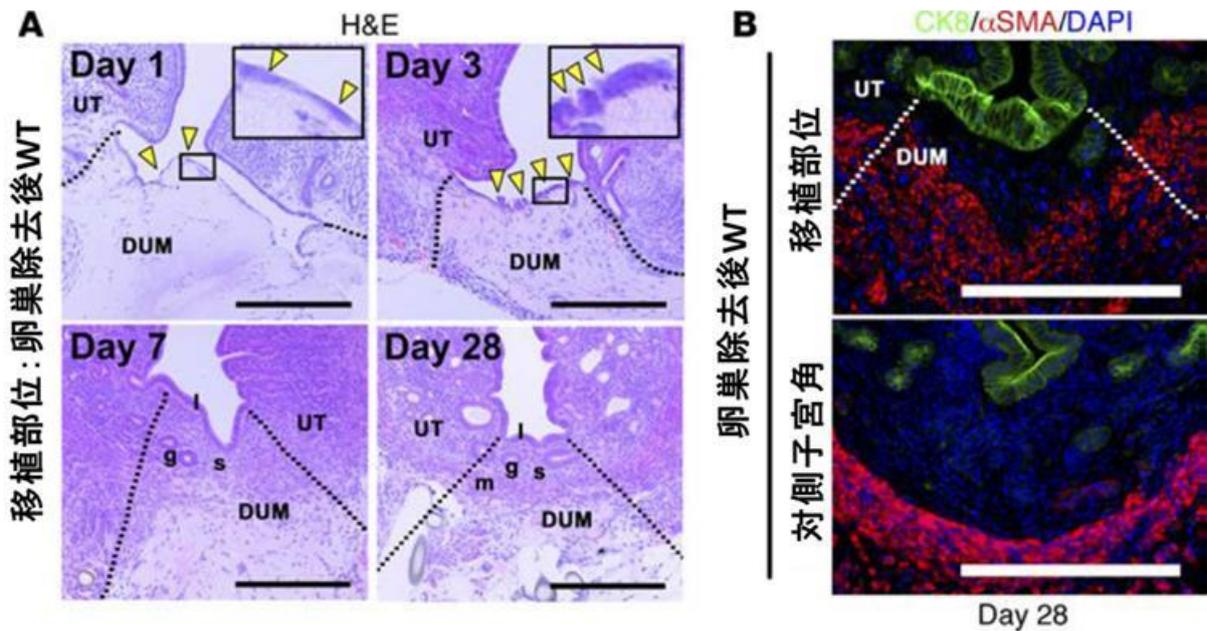


図 12. 卵巣ホルモンの欠如下においても子宮再生は可能である

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

A. 卵巣除去術後の DMT における子宮再生過程の検証。Day 1 に扁平な細胞が DUM 表面に出現し、Day 3 にかけて管腔上皮の再生が進み、Day 7 に再生管腔上皮の直下に間質の再生が誘導され、Day 28 には筋層を含む子宮組織全体が再生した。B. Day 28 の CK8/ $\alpha$ SMA 免疫染色。再生子宮は正常子宮と同等の染色を示した。各群 3 検体検討した。図のスケールバーは 200 $\mu$ m、DUM は脱細胞化子宮組織、UT はレシピエントマウスの子宮、l は管腔上皮、g は腺上皮、s は間質、m は筋層を示す。矢頭は DUM 表面の扁平な細胞を示す。

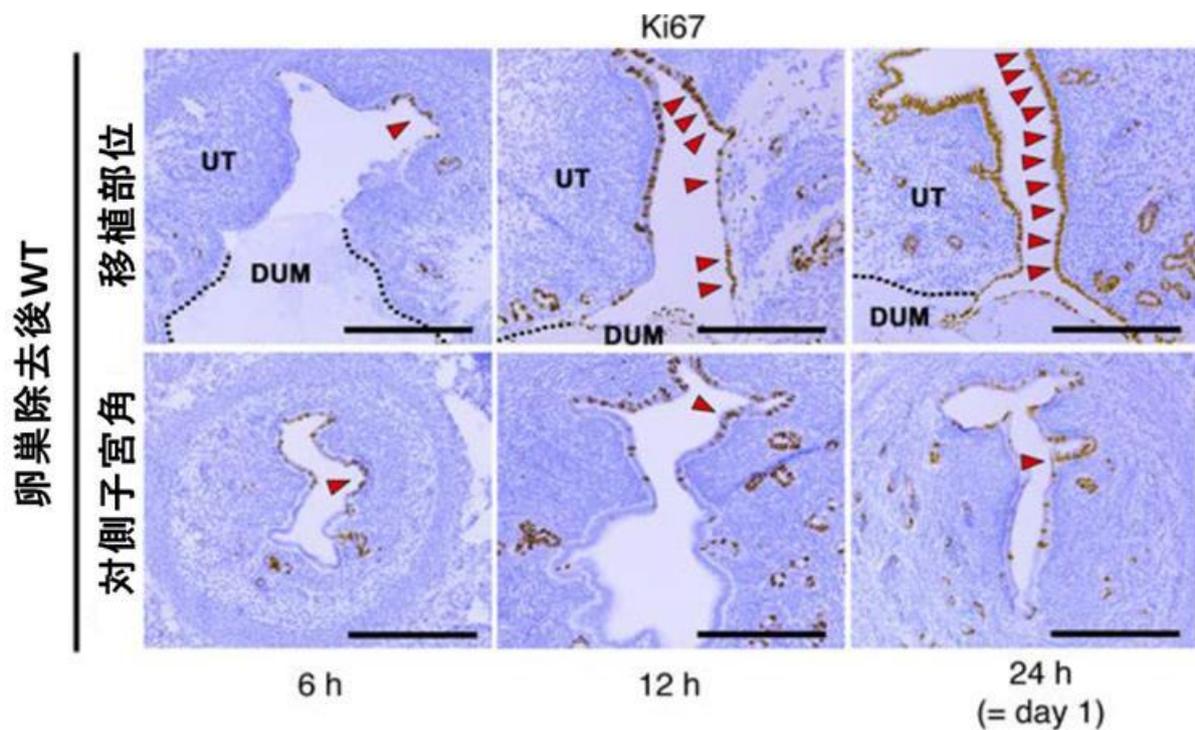


図 13. 子宮上皮再生はエストロゲンの非存在下において速やかに開始する

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

卵巣除去術後の DMT における移植後早期の Ki67 染色。DMT 後 12 時間にレシピエントマウスの上皮における増殖が対側子宮角と比較し亢進し始め、DMT 後 24 時間には増殖がさらに亢進しており、DUM 上への細胞の供給源になっていると考えられた。各群 3 検体検討した。図のスケールバーは 200 $\mu$ m、DUM は脱細胞化子宮組織、UT はレシピエントマウスの子宮を示す。矢頭は Ki67 陽性を呈する増殖中の上皮を示す。

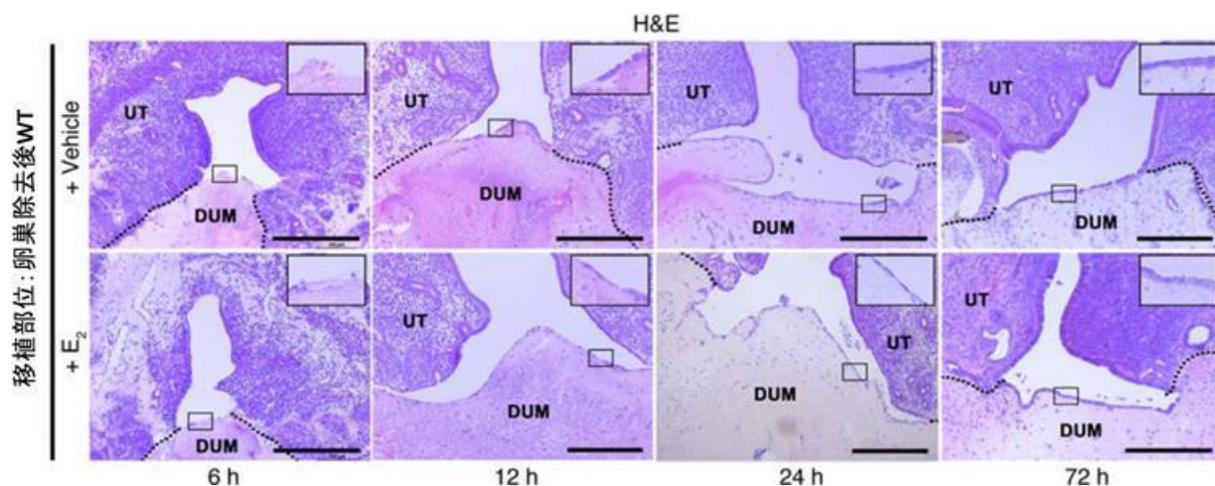


図 14. エストロゲンは管腔上皮の再生に影響を与えない

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

卵巣除去術後の DMT モデルに  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) を投与し、Day 3 までの DUM 表面の上皮再生を検証した。対照群と  $E_2$  投与群における明確な差は確認されず、上皮の再生機序にはエストロゲン以外の影響が大きいことが示唆された。各群 3 検体検討した。図のスケールバーは  $200\mu\text{m}$ 、DUM は脱細胞化子宮組織、UT はレシピエントマウスの子宮を示す。

## STAT3 は子宮上皮再生に重要である

本モデルにおける子宮再生制御機構の分子生物学的考察を行うにあたり、移植部位・移植部周囲レシピエント子宮と対側子宮角の遺伝子発現を定量 PCR や DNA マイクロアレイを用いて解析した。特に、再生研究が非常に進んでいる腸上皮の研究報告を参考に、Lgr5 や Axin2 などの幹細胞マーカーや、再生を制御する Wnt 経路を構成する分子群[38]に着目して解析を行ったが、いずれの分子も特筆すべき挙動を示さなかった（データ不掲載）。この原因として、既述の Wnt 経路などを介する再生機序と異なり、本モデルにおいては組織の損傷に伴う急性炎症が大きく影響していることが挙げられた。急性炎症と組織再生を媒介する分子については研究が盛んにおこなわれているが、そのなかでも転写因子 STAT3 は皮膚や肝臓、心臓など、様々な臓器において組織の損傷からの再生過程に重要な役割を果たしていることが知られているため[39-49]、本モデルの再生においても STAT3 が再生に寄与している可能性について疑い、着目するに至った。子宮上皮の再生を制御する機序を検討するため、STAT3 という転写因子に着目した。転写因子 STAT3 は、肝臓や心臓など様々な臓器における組織修復・再生に関与していることが知られている[39-49]。子宮に関しては、STAT3 の活性化が着床に不可欠な要素であることは知られているが[50, 51]、組織の修復・再生という観点から検証がなされたことはなかった。子宮再生における STAT3 の役割について検討するため、まず卵巣除去術後の DMT モデルにおける活性型 STAT3 (phosphorylated STAT3, pSTAT3) の発現を評価した。その結果、DMT 後 6 時間の時

点で STAT3 の活性化が移植部周囲のレシピエント上皮において、また弱いながらも間質や筋層において認められ (図 15)、DMT 後 24 時間には上皮の染色はさらに顕著となった (図 15)。そのため、再生における STAT3 の機能について評価するために、子宮特異的 STAT3 欠損マウス ( $\Delta$  STAT3) を作成し、卵巣除去術後の DMT モデルにおける上皮の再生を野生型 (WT) と比較した。DUM はいずれも野生型ドナーマウス由来の DUM を用いた。まず、DMT 後 24 時間の  $\Delta$  STAT3 の移植部位において STAT3 の活性化が起きていないことを pSTAT3 免疫染色にて確認した (図 16A)。同時に、Ki67 免疫染色では、 $\Delta$  STAT3 の上皮における染色は WT と比較し散発的であった (図 16A)。次に、DMT 後 24 時間における DUM 上の扁平な細胞すなわち再生上皮の細胞数を数えたところ、 $\Delta$  STAT3 は WT と比較し有意な減少を認めた (図 16B)。 $\Delta$  STAT3 レシピエント上皮の Ki67 陽性率を計測したところ有意な低下が認められたため (図 16C)、細胞増殖能の低下による DUM 表面への再生上皮供給低下が、 $\Delta$  STAT3 における上皮再生低下の原因の一つとして疑われた。

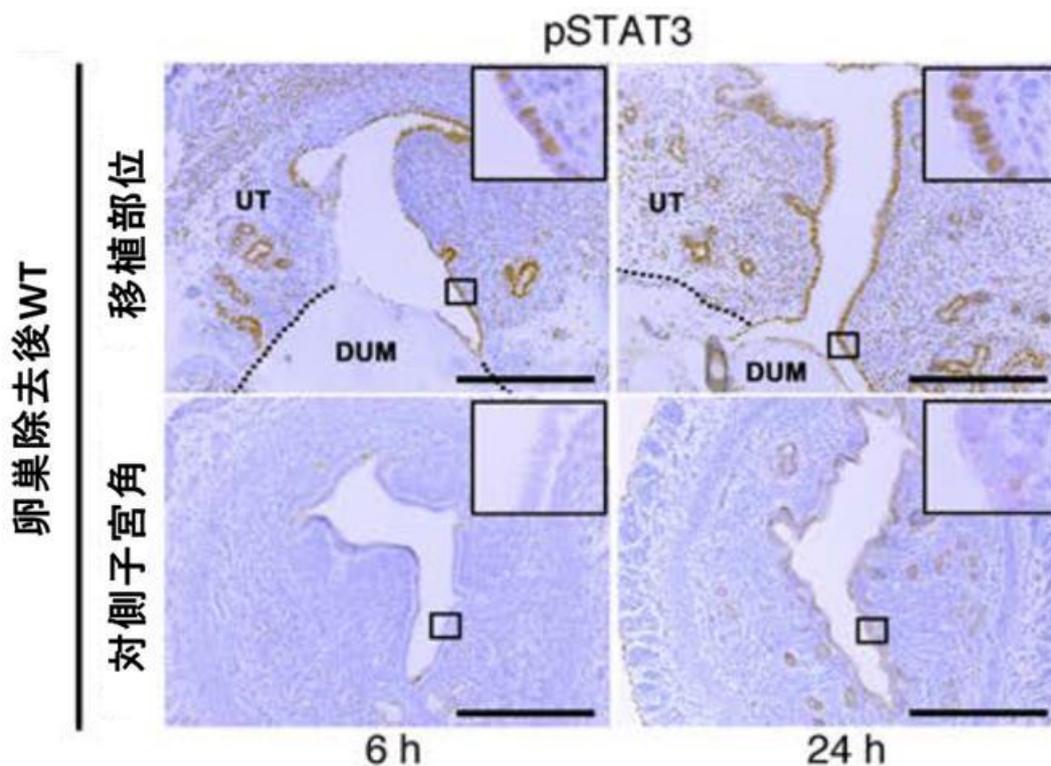


図 15. 移植部位では移植後早期に STAT3 の活性化が誘導される

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

卵巣除去後の DMT モデルにおける移植後早期の pSTAT3 免疫染色。移植後 6 時間に移植部周囲のレシピエント上皮において、そして軽度であるが間質や筋層において STAT3 の活性化と核内移行が観察された。移植後 24 時間にはさらに強い上皮の染色結果を得た。各群 5 検体検討した。図のスケールバーは 200 $\mu$ m、DUM は脱細胞化子宮組織、UT はレシピエントマウスの子宮を示す。

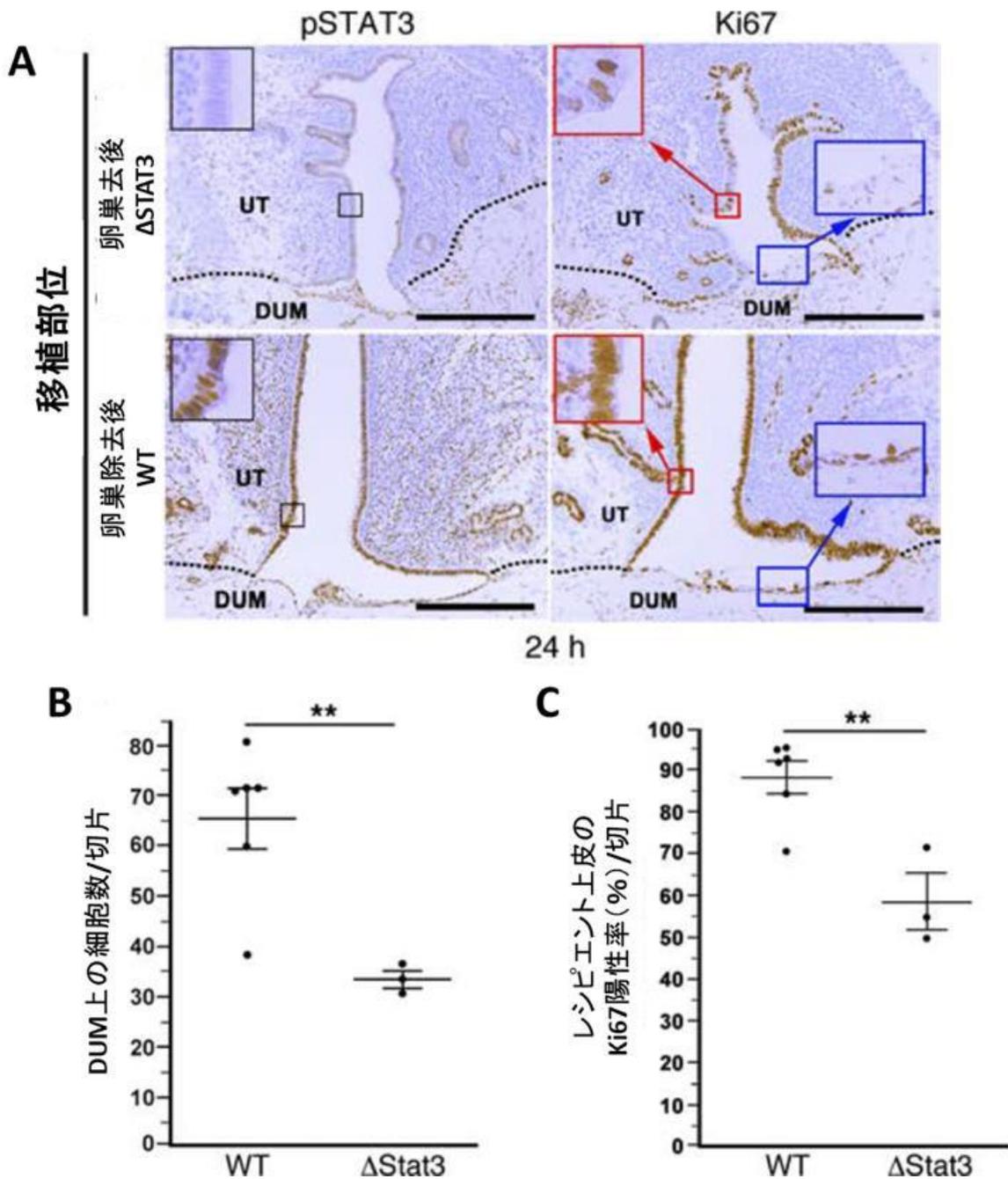


図 16. 子宮特異的 STAT3 欠損マウスでは管腔上皮の再生能が低下している

(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

A. DMT 後 24 時間における子宮特異的 STAT3 欠損マウス ( $\Delta$  STAT3) と野生型マウス (WT) の pSTAT3 免疫染色と Ki67 染色。 $\Delta$  STAT3 の移植部位では STAT3 の活性化が起きておらず、Ki67 染色は WT に比し散発的な染色を呈した。B. DMT 後 24 時間における DUM 上の再生上皮すなわち扁平な細胞の細胞数。 $\Delta$  STAT3 は WT と比較し有意な減少を認めた。C. DMT 後 24 時間におけるレシピエントマウス上皮の Ki67 陽性率。 $\Delta$  STAT3 は WT と比較し有意な低下を認め、DUM 表面への再生上皮供給低下

の原因の一つとして疑われた。WTは5検体、 $\Delta$ STAT3は3検体検討した。図のスケールバーは200 $\mu$ m、DUMは脱細胞化子宮組織、UTはレシピエントマウスの子宮を示す。数値は平均 $\pm$ 標準誤差である。\*\*は、群間に有意差があることを示す ( $P < 0.01$ )

## STAT3 は子宮間質と筋層の再生にも重要な役割を果たす

次に、間質や筋層の再生における STAT3 の機能について検討するため、 $\Delta$  STAT3 の Day 7、Day 28 の組織像を評価した。その結果、間質の再生は Day 7 では認められず、Day 28 の再生上皮の直下に部分的な再生が認められたのみであった (図 17)。また、筋層の再生は Day 28 では観察されなかった (図 17)。

DMT モデルを用いた以上の検討により、上皮、間質、筋層を含む子宮全体の再生に STAT3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。同時に、本モデルは、子宮の再生を定量的に評価できる有力な実験モデルとなり得ると考えられた。

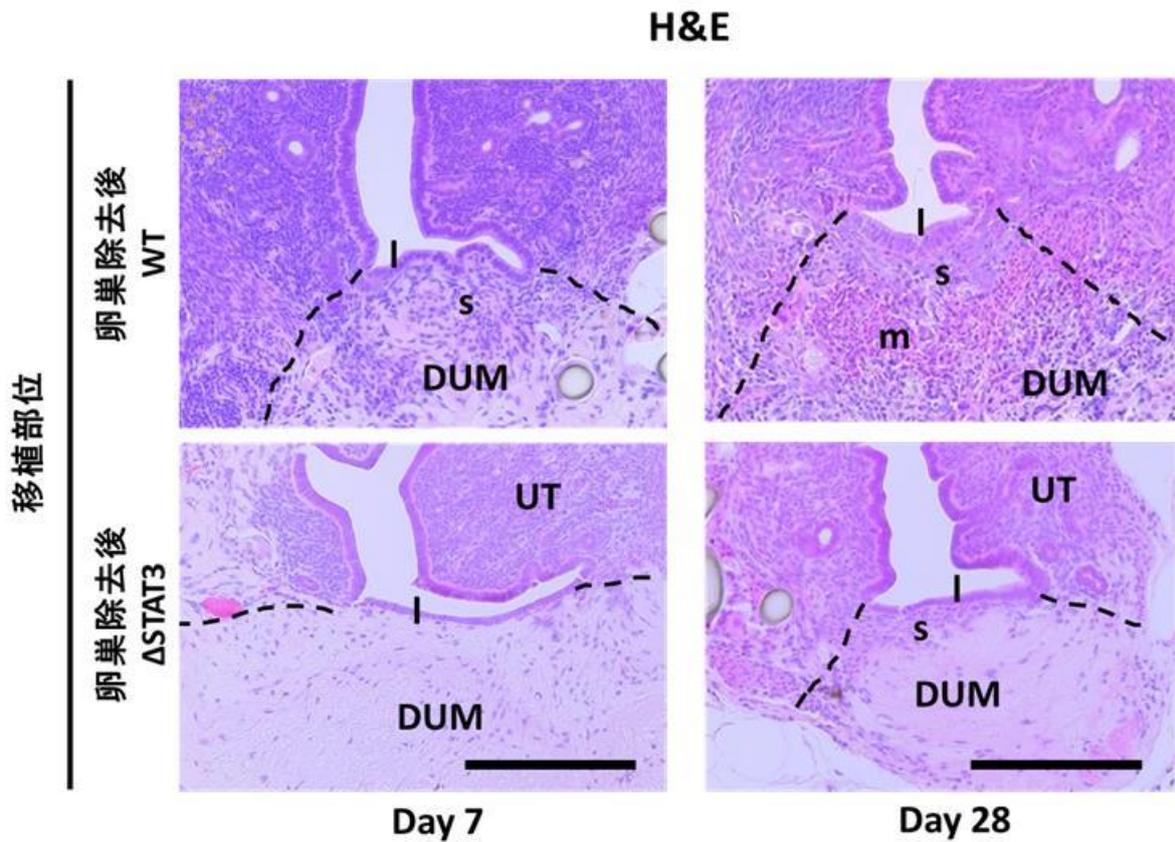


図 17. 子宮特異的 STAT3 欠損マウスでは間質や筋層の再生能も低下している  
 Day 7、Day 28 における子宮特異的 STAT3 欠損マウス ( $\Delta$ STAT3) の移植部位における HE 像。間質の再生は Day 7 では認められず、Day 28 の再生上皮の直下に部分的な再生が認められた。また、筋層の Day 28 では観察されなかった。各群 3 検体検討した。図のスケールバーは 200 $\mu$ m、DUM は脱細胞化子宮組織、UT はレシピエントマウスの子宮、l は管腔上皮、s は間質を示す。

## 生理的な子宮再生過程において STAT3 は活性化される

次に、生理的な子宮内膜・子宮の再生プロセスにおける STAT3 の関与について知見を得るため、マウスの分娩直後、ヒトの月経期・増殖初期について pSTAT3 免疫染色による STAT3 の活性化を評価した。その結果、マウス子宮において、発情休止期には STAT3 の活性化を認めなかったが、再生が開始する分娩直後の子宮では主に上皮において、そして弱いながらも間質や筋層において STAT3 の活性化を認めた (図 18)。また、ヒト子宮においては、月経直前である分泌後期には STAT3 の活性化を認めなかったが、再生が開始する月経期・増殖初期においては主に上皮において、そして弱いながらも間質や筋層において STAT3 の活性化を認めた (図 18)。以上の結果より、DMT による人工的な子宮再生だけでなく、生理的な子宮内膜・子宮再生過程においても STAT3 が活性化され、何らかの役割を果たしていることが示唆された。

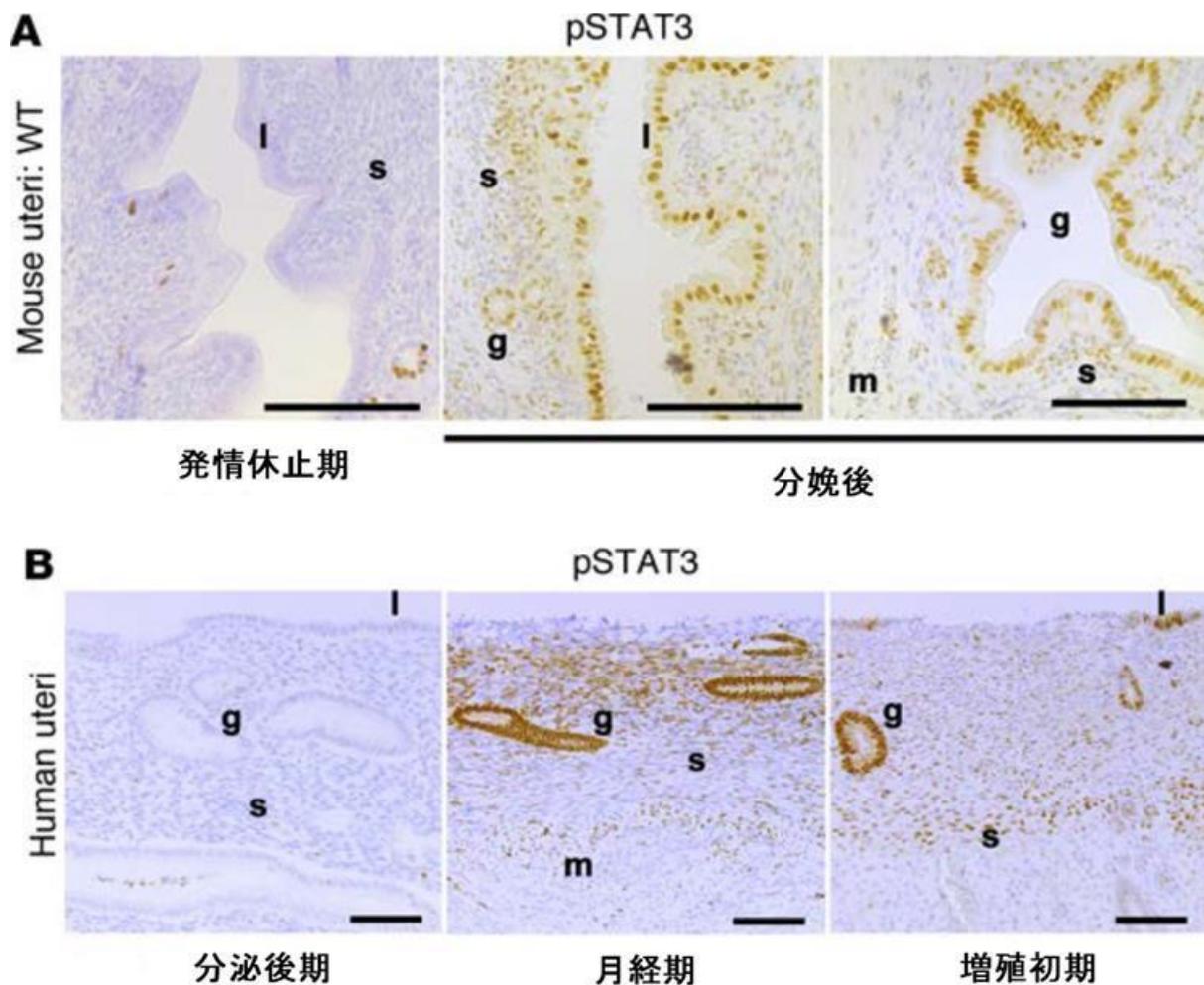


図 18. 生理的な子宮再生の過程において STAT3 は活性化される

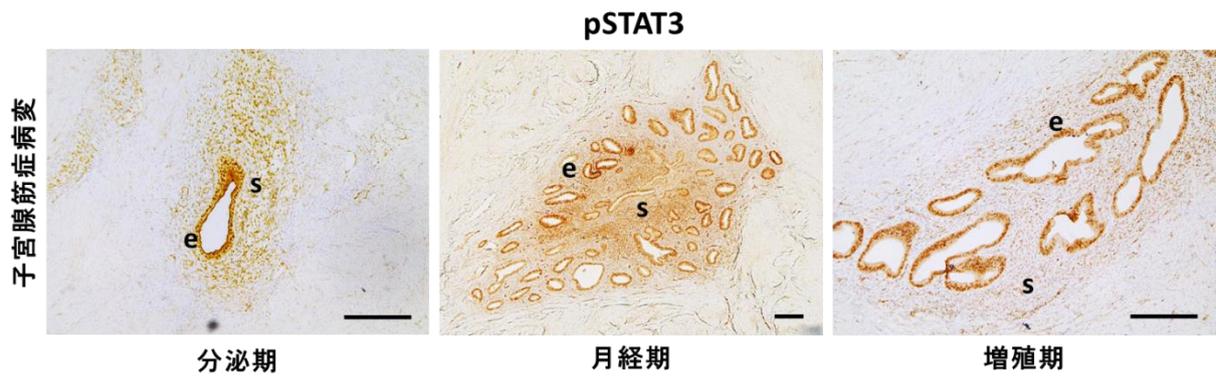
(Hiraoka T., et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized matrix transplantation. *JCI insight* 2016 Jun 2;1(8) :e87591. [34])

A: マウス子宮の pSTAT3 免疫染色。発情休止期では STAT3 の活性化を認めないが、分娩直後には主に上皮において、そして弱いながらも間質や筋層において STAT3 の活性化を認めた。B. ヒト子宮の pSTAT3 免疫染色。月経直前である分泌後期では STAT3 の活性化を認めないが、月経期や増殖初期では主に上皮において、そして弱いながらも間質や筋層において STAT3 の活性化を認めた。各群 3 検体検討した。図のスケールバーは 100 $\mu$ m、l は管腔上皮、g は腺上皮、s は間質、m は筋層を示す。

## 子宮内膜の異所性発育において STAT3 は恒常的に活性化される

子宮腺筋症は、子宮内膜様組織が本来は存在しないはずの子宮筋層内に異所性に発育し、子宮の線維化・肥大を招き疼痛や出血といった症状をきたし、不妊症や流産との関連も示唆される疾患である。子宮内膜様組織が卵巣や骨盤内に発育する子宮内膜症の類縁疾患と考えられているが、発症原因や増悪機序については不明な点が多い。そこで、既述の結果より子宮内膜の発育に STAT3 の関与が示唆されることから子宮腺筋症の病態に STAT3 が関与していることを疑い、子宮腺筋症患者の子宮検体の pSTAT3 免疫染色を行った。その結果、正常子宮内膜と異なり、月経周期によらず恒常的に上皮と間質の STAT3 が活性化していることが明らかとなった (図 19)。この結果は、子宮内膜様組織の異所性発育に STAT3 が何らかの役割を果たしていることを裏付けている可能性がある。

以上の結果より、DMT を用いた検証によって STAT3 が子宮再生に重要な役割を果たしていることが示唆されただけでなく、月経や子宮腺筋症といった生理的・病的な子宮内膜の再生・発育にも STAT3 の活性化が関与していることが推定され、DMT モデルの実験モデルとしての有用性が示唆された。



**図 19. 子宮腺筋症病変において STAT3 は恒常的に活性化される**

子宮腺筋症病変の pSTAT3 免疫染色。正常子宮内膜と異なり、月経期、増殖期、分泌期のいずれにおいても上皮と間質の STAT3 の活性化を認めた。各群 3 検体検討した。図のスケールバーは 100 $\mu$ m、e は上皮、s は間質を示す。

## 考察

本研究では、ドナー由来の細胞成分を虚脱させ、細胞外基質のみを保存した脱細胞化子宮組織（DUM）をレシピエント子宮の人工的な欠損部位に移植することで、構造的にも機能的にも正常な子宮を再構築できる脱細胞化組織移植（DMT）モデルをマウスにおいて確立した。そして本モデルを用いた検討により、上皮の再生能が卓越していることや、子宮の再生に卵巣ホルモンは必須ではないこと、そして、上皮・間質・筋層を含む子宮全体の再生に STAT3 が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、DMT による子宮再生過程だけでなく、生理的な子宮再生過程や病的な子宮内膜の発育においても STAT3 の活性化を認めたことから、DMT は子宮内膜・子宮再生研究の有力な実験モデルになり得ることが示唆された。本モデルにおける脱細胞化の手順、および脱細胞化組織の生体内移植法という実験手法は Santosso らが報告したラットモデルと同様であるが、手技的に困難でかつ遺伝子改変技術が進んだマウスを用いて実験モデルを確立した点に本研究の新規性が認められると考えられる。

近年、ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生医学の進歩が目覚ましいが、様々な終末分化細胞から構成され正常な立体構造を有する機能的な臓器の作製は依然困難な課題である。これを克服するための手段として、細胞に「立体的な足場」を提供できる脱細胞化組織は有力な材料と考えられている。脱細胞化組織を用いた組織再生の試みは心臓、肝臓、肺、卵巣など様々な臓器で報告されているが[21-25]、その多くは試験管内での実験であり、脱細胞化組織内に細胞を播種し、還流培養により細胞を立体的に

培養するという研究手法が用いられている。本研究では対照的に、脱細胞化組織を直接生体内に移植し、組織が再構築される過程を観察するという手法を採用した。この方法の利点としては、再生を誘導した部位とそうでない対照の部位を比較することで再生に関わる分子経路を特定できる可能性があることや、その結果として子宮内膜や子宮の再生を促進する物質の同定につながり、子宮内容除去術後の子宮内膜再生不全による難治性不妊を解決したり、子宮手術後の治癒不全による子宮筋層の菲薄化を予防し、妊娠中の子宮破裂のリスクを低下させられたりする可能性が挙げられる。また、他の組織では組織の損傷からの再生過程に幹細胞が重要な役割を果たしていることが知られており[52]、例えば卵巣表層上皮は排卵という生理的な組織損傷からの修復過程で *Lgr5* 陽性組織幹細胞が盛んに増殖を行い再生に寄与することが知られているが[10]、組織幹細胞が同定されていない子宮においても、DMT モデルを用いて移植部位を詳細に観察することで幹細胞様の挙動を示す細胞の特定につながる可能性が挙げられる。

本研究では DMT を用い、子宮の *STAT3* の活性化が子宮上皮・間質・筋層の再生に重要な役割を果たしていることを示したが、具体的な分子経路の特定には至っていない。*STAT3* を活性化する分子は数多く存在し、代表的なものでは増殖因子である EGF やサイトカインである *IL-6*, *IL-11*, *LIF*, *oncostatin-M* などが挙げられるが、それらによって活性化された *STAT3* の機能は、細胞増殖・分化、炎症の増幅・抑制など、多岐にわたる[53]。本研究においては子宮の *STAT3* が直接的もしくは間接的に上皮の増殖

を促進していると考えられるが、子宮内膜の再生に好中球が重要な役割を果たすという報告や[54]、好中球などの免疫担当細胞から分泌される oncostatin-M が STAT3 を介して組織の再生を誘導するという他臓器での報告から[55]、免疫担当細胞由来のサイトカインが子宮の STAT3 を介して子宮の再生を促している可能性が考えられる。また、EGF ファミリーの一つである HBEGF は着床胚周囲の子宮内膜で誘導され、着床に関わる機能を有していることを示唆する報告もみられるが[56]、HBEGF は EGF 受容体を介して STAT3 を活性化することが知られているため、本モデルにおける子宮再生に際して STAT3 活性化を誘導している分子の一つである可能性も推測される。また、 $\Delta$  STAT3 においても約 50% の上皮に増殖が認められた理由については(図 16C)、gp130/Src/YAP 経路などの STAT3 を介さない経路によって再生が誘導されている可能性がある[39]。また、本研究では子宮特異的 STAT3 欠損マウスを用いたが、上皮・間質・筋層のいずれかの STAT3 がどう子宮の再生に寄与しているか、また、間質や筋層の再生機序などについては不明な点が多いため、今後は上皮特異的または間質特異的 STAT3 欠損マウスを用いて再生を比較検証する必要があると考えられる。

また、本研究では着床に必須の分子である STAT3 が再生にも重要な役割を果たしていることが示唆されたが、同様に妊娠に重要な役割を果たしていることが知られている COX2 は[57]、胃上皮の再生過程においては血管新生に重要な役割を果たしているという報告があり[58]、今後は本モデルを用いて子宮特異的 COX2 欠損マウスを作成し、再生能を評価する研究なども検討される。

本研究では子宮内膜の増殖を誘導することが知られているエストロゲンの非存在下においても子宮内膜・子宮の再生が可能であったが、これについては、組織損傷に伴う炎症に誘導される分子経路とエストロゲンにより誘導される分子経路が重複している可能性や、両者が独立して存在している可能性が推測される。実際、月経による子宮内膜の脱落から再生が開始するのは血中エストロゲン濃度が低値である月経期であることが知られており[59-62]、また、帝王切開後の子宮は無排卵による低エストロゲン状態にもかかわらず治癒することが可能である。

本研究は細胞の挙動・寄与に焦点を当てて子宮再生機序の検証を行ったが、移植した細胞外基質タンパク質が再生に与える影響についての検討は行っていない。Takehisa らの報告によれば、肝臓の脱細胞化組織を子宮の人工的欠損部位に移植したモデルにおいては腺組織の再生低下やプロゲステロン受容体の発現低下が見られたとしており (Takehisa C, et al. 69th Annual Congress of The Japna Society of Obstetrics and Gynecology. Tokyo, April 2017)、正常な子宮再生のためには子宮の細胞外基質が重要である可能性が推測される。今後は、脱細胞化組織の構成要素に関する検討や、人工的に生成した足場を移植することによる再生の評価などの実験を行うことで、細胞外基質が再生に与える影響についての検証も必要と考えられる。

DMT の臨床応用を考えた際に最も問題となるのは、細胞供給を周囲の組織に依存している点と考えられる。本研究のように、子宮のごく一部分の欠損を補填することは可能かもしれないが、例えば子宮手術により組織の大部分が欠損した場合や、先天

的に子宮の形成不全を認める症例に対しては本手法の適応は困難と考えられる。そのため、DMT を臨床に応用するためには ES 細胞や iPS 細胞、間葉系幹細胞などの幹細胞を用いて分化した細胞を大量に生産する技術や、それらを脱細胞化組織内で長期的に培養する培養技術の確立が必要と思われる。また、人工担体を用いた頭蓋骨欠損の再生研究のように[63]、再生を促進する物質を浸漬させた脱細胞化組織を移植することで、比較的大きな欠損も効率的に再生させることが可能になるかもしれない。この再生を促進する物質を特定するための実験モデルとしても、DMT は有用である可能性がある。

今後は様々な遺伝子改変マウスに DMT を用いることで子宮内膜や子宮の再生機序を明らかにし、再生医療への応用だけでなく月経の基礎的な機序の解明や、子宮内膜症や子宮腺筋症といった病的な子宮内膜の発育機序の解明にもつながることが期待される。

## まとめ

1. 脱細胞化組織を用いて部分的に子宮を再生する脱細胞化組織移植モデルを、遺伝子操作が容易なマウスで初めて確立した。
2. 本モデルを用いた検討により、子宮内膜や子宮の再生に卵巣ホルモンは必須ではないことが明らかとなった。
3. 子宮上皮の再生能は卓越しており、間質と筋層の再生能はそれに続くことが分かった。
4. 子宮の STAT3 は子宮全体の再生に重要な役割を果たしていることが示唆された。
5. 脱細胞化組織移植技術を用いたさらなる研究により子宮再生機序の解明が進み、子宮再生医療の発展が期待されるだけでなく、異所性子宮内膜増殖を本態とする子宮腺筋症や子宮内膜症の病態解明につながる可能性がある。

## おわりに

本研究では、子宮再生を評価する実験モデル、マウス脱細胞化組織移植モデルを確立し、STAT3が子宮の再生に重要な役割を果たしていることを確認した。子宮内膜や子宮の先天的・後天的な欠損は不妊治療における克服困難な課題の一つであり、子宮再生医療はこの難題に革新的な解決策を見出す可能性がある。月経ごとに脱落と再生を繰り返し高い再生能を有すると考えられる子宮内膜においてもその再生機序や幹細胞の存在は不明であり、それらを解明する有力な実験系が確立されていないのが子宮再生研究の現状といえる。この点において、子宮内膜や子宮の再生を生体内で人工的に誘導し、遺伝子改変技術も組み合わせて再生過程を検証する本モデルは、画期的な実験手法であると考えられる。将来的には再生を促進する物質の同定や、それと脱細胞化組織移植を組み合わせることによる臨床応用などへの発展が期待される。また、子宮内膜の再構築に関わっていると推定される分子経路は、子宮内膜症や子宮腺筋症の発症や増悪とも関連している可能性があり、これらの疾患の病態解明という点についても今後さらに研究を発展させてゆきたいと考えている。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただきました廣田泰講師、藤井知行教授、大須賀穰教授に心よりお礼を申し上げます。

## 引用文献

1. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, and Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*, 25: 341-73. (2004)
2. Haraguchi H, Saito-Fujita T, Hirota Y, Egashira M, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Koga K, Yamauchi N, Fukayama M, et al. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Mol Endocrinol*, 28: 1108-17. (2014)
3. Brannstrom M. Womb transplants with live births: an update and the future. *Expert Opin Biol Ther*, 17: 1105-12. (2017)
4. Taketani Y, Kozuma S, Fujii T, and Osuga Y. *Principles of Obstetrics and Gynecology*, 3: 40 - 93. (2014)
5. Kurita T. Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract. *Differentiation; research in biological diversity*, 82: 117-26. (2011)
6. Allen E. The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy*, 30: 297-+. (1922)
7. Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, and Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*, 16: 297-310. (2010)
8. Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, et al. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS One*, 5: e10387. (2010)

9. Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, et al. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 18700-5. (2007)
10. Ng A, Tan S, Singh G, Rizk P, Swathi Y, Tan TZ, Huang RY, Leushacke M, and Barker N. Lgr5 marks stem/progenitor cells in ovary and tubal epithelia. *Nat Cell Biol*, 16: 745-57. (2014)
11. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459: 262-5. (2009)
12. Boretto M, Cox B, Noben M, Hendriks N, Fassbender A, Roose H, Amant F, Timmerman D, Tomassetti C, Vanhie A, et al. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development*, 144: 1775-86. (2017)
13. Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L, Hollinshead M, Marsh SGE, Brosens JJ, Critchley HO, et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol*, 19: 568-77. (2017)
14. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, and Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage

- specification. *Cell*, 126: 677-89. (2006)
15. Vogel V, and Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7: 265-75. (2006)
  16. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PC, Pinter J, Pajeroski JD, Spinler KR, Shin JW, Tewari M, et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*, 341: 1240104. (2013)
  17. Fu J, Wang YK, Yang MT, Desai RA, Yu X, Liu Z, and Chen CS. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nature methods*, 7: 733-6. (2010)
  18. Mammoto T, and Ingber DE. Mechanical control of tissue and organ development. *Development*, 137: 1407-20. (2010)
  19. Jaalouk DE, and Lammerding J. Mechanotransduction gone awry. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10: 63-73. (2009)
  20. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474: 179-83. (2011)
  21. Ji R, Zhang N, You N, Li Q, Liu W, Jiang N, Liu J, Zhang H, Wang D, Tao K, et al. The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice. *Biomaterials*, 33: 8995-9008. (2012)

22. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, and Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*, 14: 213-21. (2008)
23. Wagner DE, Bonvillain RW, Jensen T, Girard ED, Bunnell BA, Finck CM, Hoffman AM, and Weiss DJ. Can stem cells be used to generate new lungs? Ex vivo lung bioengineering with decellularized whole lung scaffolds. *Respirology*, 18: 895-911. (2013)
24. Salvatori M, Katari R, Patel T, Peloso A, Mugweru J, Owusu K, and Orlando G. Extracellular Matrix Scaffold Technology for Bioartificial Pancreas Engineering: State of the Art and Future Challenges. *Journal of diabetes science and technology*, 8: 159-69. (2014)
25. Laronda MM, Jakus AE, Whelan KA, Wertheim JA, Shah RN, and Woodruff TK. Initiation of puberty in mice following decellularized ovary transplant. *Biomaterials*, 50: 20-9. (2015)
26. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, Milwid J, Kobayashi N, Tilles A, Berthiaume F, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*, 16: 814-20. (2010)
27. Miyazaki K, and Maruyama T. Partial regeneration and reconstruction of the rat uterus through recellularization of a decellularized uterine matrix. *Biomaterials*, 35: 8791-800. (2014)

28. Santoso EG, Yoshida K, Hirota Y, Aizawa M, Yoshino O, Kishida A, Osuga Y, Saito S, Ushida T, and Furukawa KS. Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on in vivo uterine regeneration in murine models. *PLoS One*, 9: e103201. (2014)
29. Hasegawa Y, Daitoku Y, Sekiguchi K, Tanimoto Y, Mizuno-Iijima S, Mizuno S, Kajiwara N, Ema M, Miwa Y, Mekada K, et al. Novel ROSA26 Cre-reporter knock-in C57BL/6N mice exhibiting green emission before and red emission after Cre-mediated recombination. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 62: 295-304. (2013)
30. Daikoku T, Ogawa Y, Terakawa J, Ogawa A, DeFalco T, and Dey SK. Lactoferrin-iCre: a new mouse line to study uterine epithelial gene function. *Endocrinology*, 155: 2718-24. (2014)
31. Soyol SM, Mukherjee A, Lee KY, Li J, Li H, DeMayo FJ, and Lydon JP. Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis*, 41: 58-66. (2005)
32. Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, and Akira S. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol*, 161: 4652-60. (1998)

33. Noyes RW, Hertig AT, and Rock J. Dating the endometrial biopsy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 122: 262-3. (1975)
34. Hiraoka T, Hirota Y, Saito-Fujita T, Matsuo M, Egashira M, Matsumoto L, Haraguchi H, Dey SK, Furukawa KS, Fujii T, et al. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. *JCI Insight*, 1: (2016)
35. Egashira M, and Hirota Y. Uterine receptivity and embryo–uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reprod Med Biol*, 12: 127-32. (2013)
36. Hou X, Tan Y, Li M, Dey SK, and Das SK. Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. *Mol Endocrinol*, 18: 3035-49. (2004)
37. Chung D, Gao F, Jegga AG, and Das SK. Estrogen mediated epithelial proliferation in the uterus is directed by stromal Fgf10 and Bmp8a. *Molecular and cellular endocrinology*, 400: 48-60. (2015)
38. Flanagan DJ, Pheasant TJ, Barker N, Schwab RH, Amin N, Malaterre J, Stange DE, Nowell CJ, Currie SA, Saw JT, et al. Frizzled7 functions as a Wnt receptor in intestinal epithelial Lgr5(+) stem cells. *Stem Cell Reports*, 4: 759-67. (2015)
39. Taniguchi K, Wu LW, Grivannikov SI, de Jong PR, Lian I, Yu FX, Wang K, Ho SB, Boland BS, Chang JT, et al. A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration. *Nature*, 519: 57-62. (2015)
40. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, and Longaker MT. Wound repair and regeneration.

- Nature*, 453: 314-21. (2008)
41. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr HA, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *The Journal of experimental medicine*, 206: 1465-72. (2009)
  42. Kida H, Mucenski ML, Thitoff AR, Le Cras TD, Park KS, Ikegami M, Muller W, and Whitsett JA. GP130-STAT3 regulates epithelial cell migration and is required for repair of the bronchiolar epithelium. *The American journal of pathology*, 172: 1542-54. (2008)
  43. Sano S, Takahama Y, Sugawara T, Kosaka H, Itami S, Yoshikawa K, Miyazaki J, van Ewijk W, and Takeda J. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity*, 15: 261-73. (2001)
  44. Neufert C, Pickert G, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Nikolae A, Ouyang W, Neurath MF, and Becker C. Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis. *Cell Cycle*, 9: 652-5. (2014)
  45. Fang Y, Gupta V, Karra R, Holdway JE, Kikuchi K, and Poss KD. Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early Jak1/Stat3 injury response required for zebrafish heart regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 13416-21. (2013)
  46. Liang J, Wang D, Renaud G, Wolfsberg TG, Wilson AF, and Burgess SM. The stat3/socs3a pathway is a key regulator of hair cell regeneration in zebrafish. [corrected]. *The Journal*

- of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32: 10662-73. (2012)
47. Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH, and Hogan BL. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111: E3641-9. (2014)
48. Adamson IY, and Bakowska J. Relationship of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor levels in rat lung lavage fluid to epithelial cell regeneration after bleomycin. *The American journal of pathology*, 155: 949-54. (1999)
49. Pociask DA, Scheller EV, Mandalapu S, McHugh KJ, Enelow RI, Fattman CL, Kolls JK, and Alcorn JF. IL-22 is essential for lung epithelial repair following influenza infection. *The American journal of pathology*, 182: 1286-96. (2013)
50. Sun X, Bartos A, Whitsett JA, and Dey SK. Uterine deletion of Gp130 or Stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Molecular endocrinology*, 27: 1492-501. (2013)
51. Lee JH, Kim TH, Oh SJ, Yoo JY, Akira S, Ku BJ, Lydon JP, and Jeong JW. Signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) plays a critical role in implantation via progesterone receptor in uterus. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27: 2553-63. (2013)
52. Reya T, and Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434: 843-50. (2005)

53. Hirano T, Ishihara K, and Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 19: 2548-56. (2000)
54. Kaitu'u-Lino TJ, Morison NB, and Salamonsen LA. Neutrophil depletion retards endometrial repair in a mouse model. *Cell and tissue research*, 328: 197-206. (2007)
55. Lorchner H, Poling J, Gajawada P, Hou Y, Polyakova V, Kostin S, Adrian-Segarra JM, Boettger T, Wietelmann A, Warnecke H, et al. Myocardial healing requires Reg3beta-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nat Med*, 21: 353-62. (2015)
56. <1999 Dey labHeparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1.pdf>.
57. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, and Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 91: 197-208. (1997)
58. <2012 COX2 胃上皮再生 Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers..pdf>.
59. McLennan CE, and Rydell AH. Extent of endometrial shedding during normal menstruation. *Obstetrics and gynecology*, 26: 605-21. (1965)
60. Ferenczy A. Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration. I. Scanning electron microscopy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 124: 64-74. (1976)

61. Ferenczy A. Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration. II. Transmission electron microscopy and histochemistry. *American journal of obstetrics and gynecology*, 124: 582-95. (1976)
62. Chan RW, Schwab KE, and Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biology of reproduction*, 70: 1738-50. (2004)
63. Takahashi Y, Yamamoto M, Yamada K, Kawakami O, and Tabata Y. Skull bone regeneration in nonhuman primates by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng*, 13: 293-300. (2007)