

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 平岡 毅大

.....

【背景・目的】

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・再生を繰り返し、マウスにおいても分娩ごとに修復が起きることで、来るべき妊娠に備えて組織の再建を繰り返す。このように高い再生能を有している子宮内膜であるが、その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、基礎生命科学の研究対象として興味深いだけでなく、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。具体的には、晩婚化・少子化の進む現代の日本社会において生殖補助医療技術は発達してきたが、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、これまで有効な治療法が確立されていない。子宮摘出後の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いるが、拒絶反応のリスクは高いハードルの一つといえる。これらのことから、子宮再生医療は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。子宮内膜組織の脱落・再生という現象は生体内でしか起こらないため *in vivo* の実験系が本質的であるが、ヒトの研究は倫理的な制約があるため、マウスなどの実験動物を用いた実験系の確立が必要である。本研究では、子宮・子宮内膜の再生を生体内で誘導し、再生過程を検証可能なマウスモデルを新規に確立し、再生を制御する分子生物学的機構を検討することを目的とした。

【方法】

野生型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、野生型または遺伝子改変レシピエントマウスの子宮に作成した 2×5mm 大の人工的欠損部位に縫合、移植した。移植日を Day 0 と定義し、Day 1、Day 3、Day 7、Day 28 に移植部位と対側子宮角を採取し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、免疫染色により組織学的検証を行った。また、ヒト子宮内膜検体についても免疫染色を行った。なお、ヒト検体については研究倫理委員会の承認のうえ、患者同意を得たものを研究に用いた。

【結果】

まず初めに DUM の HE 染色を行ったところ、DUM 内にドナー由来の細胞成分の遺残はなく、また DUM は子宮の細胞外基質構造を保っていることが明らかになった。この DUM をレシピエ

ントマウス子宮の人工的欠損部位に移植し、Day 28 に採取した移植部位の HE 染色を行ったところ、縫合糸に囲まれた DUM 内に、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再建されていた。この再生部位の機能を評価するため、移植後 1 か月の野生型レシピエントマウスを野生型の雄マウスと交配させた。その結果、膣栓の確認を妊娠 1 日目と定義すると、妊娠 4 日目に観察され受精卵の着床に必須の現象である上皮の増殖停止と間質の増殖亢進は正常に観察され、再生子宮の卵巢ホルモン応答能は正常であることが分かった。さらに、妊娠 19 日目に開腹したところ、移植部位における妊娠継続が確認され、帝王切開により移植部位から分娩した産仔の外表や重量は正常であったことから、再生子宮の機能が正常であることが示唆された。次に、このモデルを子宮内膜・子宮の再生過程を検証するための実験モデルとして用いるため、Day 1、Day 3、Day 7 のレシピエントマウス子宮検体を採取し、時系列による組織学的検討を行った。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 の再生管腔上皮の直下に観察され、筋層の再生は Day 7 には認められず、Day 28 に確認された。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。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 DUM 移植を行ったところ、移植後早期に DUM 上に出現する再生管腔上皮は、DUM 周囲の管腔上皮の移動により供給されていることが明らかとなった。

次に、卵巢から周期的に分泌される卵巢ホルモンすなわちエストロゲンとプロゲステロンが子宮の再生に与える影響について検証した。エストロゲンは排卵前の卵胞から主に産生され子宮内膜の増殖・肥厚に関わっており、プロゲステロンは排卵後の黄体より分泌され子宮内膜に着床能を付与することが知られているが、卵巢ホルモンが子宮内膜や子宮の再生にどう影響を与えるかについては明らかにされていなかった。そこで、卵巢を除去した野生型レシピエントマウスに DUM 移植を行い、再生組織と再生過程を評価した。その結果、Day 28 の移植部位の HE 染色にて正常な子宮組織の再生が確認され、さらに Day 1、Day 3、Day 7 における再生過程は卵巢を有するモデルと同様であった。このことから、子宮の再生に卵巢ホルモンは必須ではないことが示唆された。

次に、卵巢ホルモンに依存しない子宮再生誘導機序を明らかにするため、卵巢除去術後の DUM 移植モデルを用いてさらに詳細な検討を行った。細胞増殖の指標となる Ki67 の免疫染色を行ったところ、移植後 12 時間には DUM 周囲の上皮が増殖を開始し、移植後 24 時間には増殖がさらに亢進し、DUM 表面への細胞供給に寄与しているものと考えられた。また、子宮内膜の増殖に関わるエストロゲンの影響を評価するため、このモデルに 17β -エストラジオール (E_2) を投与し上皮の再生能を検証したところ、移植後 72 時間までの DUM 表面の管腔上皮の再生に著変を認めなかったことから、子宮上皮の再生過程において、エストロゲンの影響と重複する、あるいはそれを上回る分子経路が関与しているものと推測された。このエストロゲンによらない子宮上皮の再生誘導機序を明らかにするため、STAT3 という転写因子に注目した。STAT3 は、種々の臓器の損傷からの再生に関与していることが報告されているが、子宮に関しては、受精卵の着床

に必須の分子であることは明らかにされているものの、組織再生に関わる知見は得られていなかった。そこで、卵巣除去術後の DUM 移植モデルにおける活性型 STAT3 の発現を免疫染色で検証したところ、移植後 6 時間には移植部位における活性型 STAT3 の発現亢進が主に上皮において、さらに間質と筋層においても確認された。そこで STAT3 の子宮再生に関する機能を評価するため、子宮特異的 STAT3 欠損マウス (Δ STAT3) を作成し、卵巣除去後の DUM 移植モデルを用いて再生を検証した。移植後 24 時間における上皮の再生を評価したところ、 Δ STAT3 の DUM 表面に観察された再生上皮数は野生型と比較し有意に減少しており、再生上皮を供給するレシピエント上皮の増殖率が Δ STAT3 において有意に低下していたことが原因として考えられた。さらに、 Δ STAT3 の Day 7、Day 28 の組織像を評価したところ、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り、また、筋層の再生は Day 28 では観察されなかった。以上の結果から、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。

次に、生理的な子宮内膜・子宮の再生過程における STAT3 の機能について検討するため、マウスの分娩直後、ヒトの月経期・増殖初期の子宮における STAT3 の活性化を免疫染色により評価した。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。また、ヒト子宮内膜においては、月経直前の分泌後期には 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。さらに、子宮内膜の異所性発育を特徴とする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。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、DUM 移植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、DUM 移植の子宮再生実験モデルとしての有用性が示唆された。

【結論】

本研究では、脱細胞化組織を用いて生体内で構造的・機能的に正常な子宮を再生するマウス脱細胞化組織移植モデルを確立した。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。また、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り、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された。本モデル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、異所性子宮内膜発育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示唆された。