

自己間葉系幹細胞を活用した子宮内膜細胞の増生による 着床不全治療法の開発

再生医療を活用した新規生殖医療チーム（課題番号：147013）

研究期間：平成 26 年 7 月 29 日～平成 29 年 3 月 31 日

研究代表者：宮本新吾 研究員：城田京子、伊東裕子

1. 緒言

我々は平成26-28年度に推奨研究プロジェクト助成金として総経費111万円の予算を標記の研究の一部として遂行してきました。本研究を終えるにあたり、ここに研究の概要と成果を纏めました。

2. 研究組織

研究代表者

宮本 新吾 福岡大学医学部産婦人科・教授

研究分担者

城田 京子 福岡大学医学部産婦人科・教授

伊東 裕子 福岡大学医学部産婦人科・講師

3. 研究目的

本邦では、一人の女性が一生の間に生む子供の数が1.41と漸増傾向であるものの欧米諸国と比較するとかなり低い水準にとどまり、少子化が大きな国家的問題となっています。一方で、晩婚化により高齢出産が増加していることも周知の事実です。このような社会背景のなか、今後、女性の社会進出が活性化することから高齢女性の妊孕性を高めることが少子化対策の大きな一つとなると期待されます。女性の高齢化による妊孕性の問題において、精子と卵による受精、受精卵の子宮内への着床、着床した受精卵の子宮内での発育の3つが問題となります。現在まで、顕微授精の技術的な進歩により受精については概ね解決されています。しかしながら、受精卵の子宮内への着床については全く治療法がないことが問題となっています。

着床不全を原因とする子宮内膜細胞の特徴は、細胞の胞体が小さく萎縮し細胞層は薄層化しています。このこ

とは、高齢に伴う子宮内膜細胞層を構成する子宮内膜細胞及び支持する間質細胞への血流不全を示しています。したがって、外的に子宮内膜細胞の増殖を促すホルモン補充では十分な治療とならないことから、子宮内膜組織の血液還流を改善することが最も有効な治療となると考えられます。

骨髄由来間葉系幹細胞あるいは脂肪幹細胞は、組織に移植されるとさまざまな増殖因子を分泌し血流改善に大きく寄与し、組織を修復・再生することが報告されています。

そこで、本研究では、自己間葉系幹細胞を用いて(1) *in vitro*による子宮内膜間質細胞との共培養による増殖因子・血管新生因子の産生亢進による有効性試験、(2) *in vivo*としてマウス子宮内へ移植後の病理組織変化を検証する有効性及び安全性試験を市販の間葉系幹細胞とともに採取した間葉系幹細胞で行い、ヒトへの投与による第1相試験に向けた非臨床試験を完了することを目的とします。

4. 研究成果

(1) *in vitro*による子宮内膜間質細胞との共培養による増殖因子・血管新生因子の産生亢進による有効性試験
＜方法＞

- ① ヒト子宮内膜間質細胞株である T-HESC 細胞を Cell Explorer で染色して、超低接着表面プレート (Costar7007, 丸底) に 3×10^4 cells/50ul/well で播いて浮遊培養を行う。
- ② ヒト皮下組織から採取した脂肪幹細胞を 1000 cells/50ul/well を添加する。
- ③ 24時間、48時間、72時間共培養後の細胞集塊の面積と細胞から抽出した VEGF mRNA の発現量を Real-Time PCR 法で解析する。

<結果>

- ① T-HESCの細胞集塊の面積は脂肪幹細胞を加えることによって、脂肪幹細胞を加えないT-HESCの細胞集塊の面積と比較して、24時間で $5.8 \pm 2.3\%$ 、48時間で $24.2 \pm 6.4\%$ 、72時間で $21.5 \pm 9.6\%$ 有意に増加した。
 - ② 脂肪幹細胞を加えたT-HESC細胞のVEGF mRNAの発現量は、脂肪幹細胞を加えていないT-HESC細胞と比較して、24時間で $31.8 \pm 8.2\%$ 、48時間で $18.6 \pm 4.9\%$ 、72時間で $5.7 \pm 3.4\%$ 有意に増加した。
- (2) in vivoとしてマウス子宮内へ移植後の病理組織変化を検証する有効性及び安全性試着床不全モデルマウスの作製

<方法>

- ① マウス(ICR、雌、5週齢)の背部を切開して、子宮周囲の脂肪組織を同定し、その脂肪組織を牽引して子宮を固定し、子宮内に95%エタノールを注入して、子宮内膜を損傷させ内膜が菲薄化した着床不

全モデルマウスを作製した。

- ② ①で作製した着床不全モデルマウスを用いて、95%エタノールを注入してから10日後(月経周期2サイクル後)のマウスの子宮内にコントロールとして生理食塩水を注した群と 1×10^6 個のヒト脂肪幹細胞を注入した群とに分け、注入して7日後の子宮内膜増殖能の評価を行った。

<結果>

- ① ヒト脂肪幹細胞はMHCクラスII分子を欠損しており免疫原性はないと考えられており、種の違うマウスの子宮内に投与してもアレルギー反応や体重減少は起こさなかった。
- ② 図1に示すように、子宮内膜の厚みは、コントロール群では $54 \pm 5.3 \mu\text{m}$ (mean \pm SD, N=8)であり、ヒト脂肪幹細胞群では $268 \pm 28.6 \mu\text{m}$ (mean \pm SD, N=9)とヒト脂肪幹細胞群で有意に高値であった(P<0.01)。

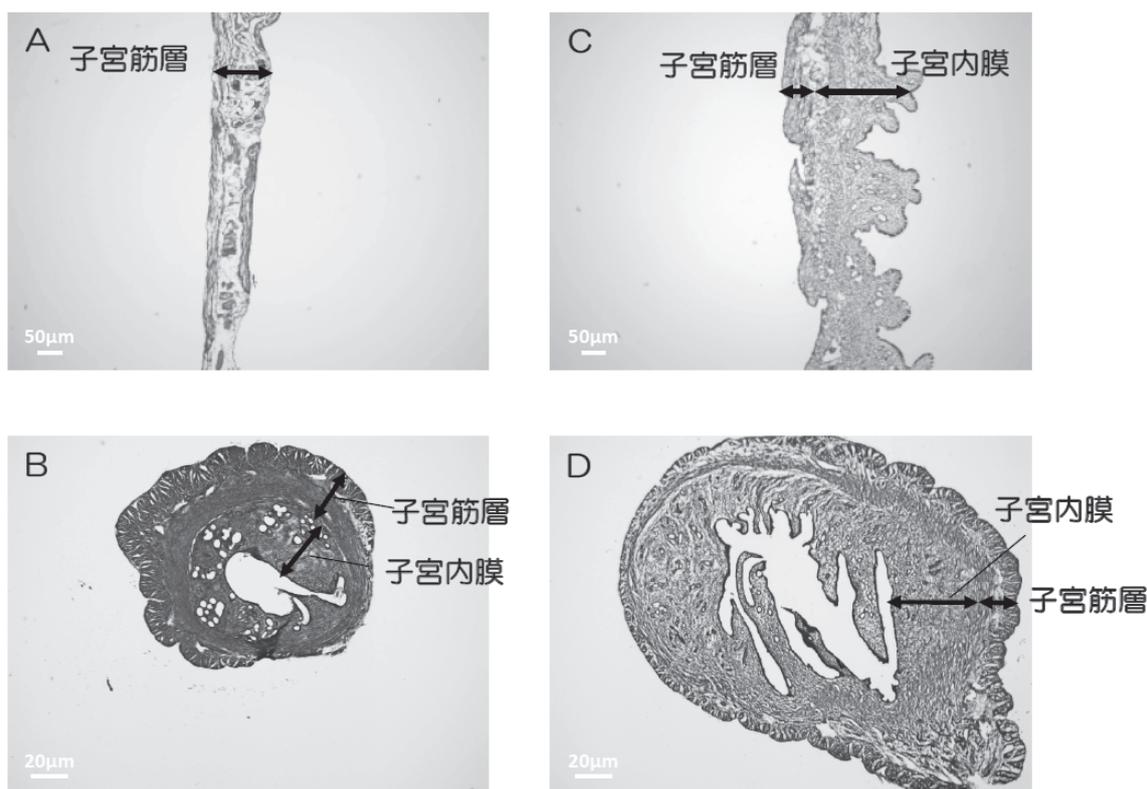


図1. 脂肪幹細胞による子宮内膜再生

AとBは着床不全モデルマウスの子宮内に生理食塩水を注入した子宮の矢状断面(A)と横断面(B)を示し、CとDは着床不全モデルマウスの子宮内に 1×10^6 個のヒト脂肪幹細胞を注入した子宮の矢状断面(C)と横断面(D)を示し、いずれもHE染色図である。

5. 結語

今回の研究では、in vitro及びin vivoの実験からヒト脂肪幹細胞は子宮内膜間質細胞の血管新生能と増殖能を

促進させることが明らかとなりました。今後は着床不全患者に対するヒト脂肪幹細胞の臨床応用を目指して、①大型動物を用いたヒト脂肪幹細胞の非臨床試験、②特定認定再生医療等委員会へ提供計画の申請、③福岡大学病

院における臨床研究の実施体制の構築を行っていきます。

謝辞

本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである（課題番号：147013）。

6. 研究業績

<2014年—2016年>

1. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. Shiota K, Yotsumoto F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakajima K, Miyamoto S. *Fertil. Steril.* 105:315-321, 2016.
2. Anti-tumor Effect of Intravenous Administration of CRM197 for Triple-negative Breast Cancer Therapy. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Fukagawa S, Odawara T, Manabe S, Ishikawa T, Kuroki M, Yasunaga S, Miyamoto S. *Anticancer Res.* 36:3651-3657, 2016.
3. Warburg effect regulated by amphiregulin in the development of colorectal cancer. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Suzaki Y, Yagi H, Odawara T, Manabe S, Ishikawa T, Kuroki M, Mekada E, Miyamoto S. *Cancer Med.* 4:575-587, 2015.
4. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Souzaki R, Taguchi T, Kuroki M, Miyamoto S: Validity of HB-EGF as Target for Human Neuroblastoma Therapy. *Anticancer Res.* 35:433-444, 2015.
5. DNA methylation analysis of human myoblasts during in vitro myogenic differentiation; de novo methylation of promoters of muscle-related genes and its involvement in transcriptional down-regulation. Miyata K, Miyata T, Nakabayashi K, Okamura K, Naito M, Kawai T, Takada S, Miyamoto S, Hata K, Asahara H. *Hum Mol Genet.* 24:410-423, 2015.
6. Proteolysis of EphA2 Converts It from a Tumor Suppressor to an Oncoprotein. Koshikawa N, Hoshino D, Taniguchi H, Minegishi T, Tomari T, Nam SO, Aoki M, Sueta T, Nakagawa T, Miyamoto S, Nabeshima K, Weaver AM, Seiki M. *Cancer Res.* 75:327-3339, 2015.
7. p16/CDKN2A FISH in Differentiation of Diffuse Malignant Peritoneal Mesothelioma from Mesothelial Hyperplasia and Epithelial Ovarian Cancer. Ito T, Hamasaki M, Matsumoto S, Hiroshima K, Tsujimura T, Kawai T, Shimao Y, Marutsuka K, Moriguchi S, Maruyama R, Miyamoto S, Nabeshima K. *Am J Clin Pathol.* 143:1-9, 2015.
8. Contribution of transcription factor, SP1, to the promotion of HB-EGF expression in defense mechanism against the treatment of irinotecan in ovarian clear cell carcinoma. Miyata K, Yotsumoto F, Nam SO, Odawara T, Manabe S, Ishikawa T, Itamochi H, Kigawa J, Takada S, Asahara H, Kuroki M, Miyamoto S. *Cancer Med.* 3:1159-1169, 2014.
9. Pre-clinical study of BK-UM, a novel inhibitor of HB-EGF, for ovarian cancer therapy. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Suzaki Y, Yagi H, Odawara T, Manabe S, Ishikawa T, Kuroki M, Mekada E, Miyamoto S. *Anticancer Res.* 8:4615-4620, 2014.
10. Rapid progression of Nulliparous labor increases the risk of preterm delivery in a subsequent pregnancy. Kurakazu M, Yoshizato T, Miyake Y, Goto M, Eguchi F, Miyamoto S. *Med Bull Fukuoka Univ.* 41:65-70, 2014.