

氏名	ひらかわ とよふみ 平川 豊文		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1954 号		
学位授与の日付	令和 4 年 9 月 13 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Trophic and Immunomodulatory Effects of Adipose Tissue Derived Stem Cells in a Preclinical Murine Model of Endometriosis (子宮内膜症モデルマウスを用いた脂肪組織由来間葉系幹細胞の組織保護効果および免疫調整効果の検討)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	小玉 正大
	(副査) 福岡大学	教授	羽賀 宣博
	福岡大学	准教授	角田 俊之

内容の要旨

【目的】

子宮内膜症は月経困難症、生殖能の喪失、癌の発症を誘起し、女性の QOL を著しく損なう重篤な疾患であるが、既存の内分泌療法や手術療法では根治は望めない。子宮内膜症の病態は、月経周期に伴う異所性子宮内膜からの出血による慢性炎症と、それに引き続いて起こる強い線維化であり、現在多くの線維化改善を期待した治療薬の開発が試みられているが、十分な成果をえていないのが現状である。子宮内膜症の病態の中心である炎症と線維化を同時に改善できる脂肪組織由来間葉系幹細胞（ASCs : Adipose derived Mesenchymal Stem Cells）による細胞治療は、同疾患への治療応用の可能性があると着想した。本研究は、子宮内膜症モデルマウスを作成し、ASCs 投与による抗子宮内膜症効果の検討と病変縮小のメカニズムについて解明することを目的とした。

【対象と方法】

- ASCs の分離 : ICR マウスの脂肪組織から ASCs を得た。間葉系幹細胞 (MSC) の陽性マーカーである CD105, CD29, Sca-1 と陰性マーカーである CD45 を用いて ASCs 中の MSC の割合をフローサイトメトリーで測定した。幹細胞の特性を強力に保有する早期継代 ASCs (E-ASCs; Early passage of ASCs) と、特性を失う後期継代 ASCs (L-ASCs; Late passage of ASCs) をそれぞれ実験に用いた。

- 子宮内膜症モデルマウスの作成：ドナーマウスの子宮内膜組織をレシピエントマウスの腹腔内に移植し、子宮内膜組織移植説を基にした子宮内膜症モデルマウスを作成した。子宮内膜組織の移植から 28 日後に腹腔内を観察し、子宮内膜症性病変を確認した。子宮内膜症早期モデルとして移植 1 日目に ASCs を投与した群 (E-ASCs-D1, L-ASCs-D1)、子宮内膜症進行モデルとして移植 15 日目に ASCs を投与した群 (E-ASCs-D15, L-ASCs-D15) をそれぞれ作成した。コントロール群は、移植 1 日目に PBS を投与した。投与経路はいずれも尾静脈投与とした。
- ASCs の抗子宮内膜症効果の検討：各群において、摘出した子宮内膜症性病変の総重量、個数、総表面積を比較した。また、病変組織の HE 染色、マッソントリクローム染色、Ki67 免疫染色を用いて、病変の間質厚、線維化、細胞増殖能をそれぞれ評価した。さらに、病変組織から抽出した RNA の定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) を行い、炎症促進遺伝子 (*Mcp1*, *Il6*, *Lif*)、線維化促進遺伝子 (*Tgfb1*)、抗炎症遺伝子 (*IL4*, *IL10*)、血管新生関連遺伝子 (*Vegfa*)、マトリックスメタプロテアーゼ遺伝子 (*Mmp2*, *Mmp9*)、ホルモンレセプター遺伝子 (*Er1*, *Pgr*) の測定を行い、治療効果に相関する遺伝子群を検索した。
- ASCs のホーミング能力の検討：クサビラオレンジ (Ku0) 遺伝子組み換えマウスを用いて、赤色蛍光蛋白遺伝子導入の ASCs (Ku0-ASCs) を作成した。子宮内膜症モデルマウスに Ku0-ASCs を尾静脈投与し、蛍光顕微鏡を用いて ASCs の子宮内膜症病変へ集積するホーミング能力を確認した。

【結果】

- ASCs の細胞特性と子宮内膜症モデルマウスでの治療効果：MSC の割合は、E-ASCs では $44.8 \pm 3.2\%$ であったのに対し、L-ASCs ではわずかに $1.7 \pm 0.3\%$ のみであった。E-ASCs 投与によって子宮内膜症早期および進行モデルにおける子宮内膜症病変は有意に減少したが、L-ASCs の投与ではいずれのモデルにおいても病変の縮小を認めなかった。これらの結果から、幹細胞の特性を有している ASCs (E-ASCs) は、初期および進行期の子宮内膜症病変の増大を抑制することが示唆された。
- ASCs 投与による子宮内膜症病変の形態学的影響：HE 染色における E-ASCs 投与群の病変間質厚は、コントロール群と比較し有意に菲薄化していた。マッソントリクローム染色では、子宮内膜症性病変の間質組織は主に膠原繊維から構成されていた。これらの結果から、子宮内膜症性病変が間質の線維化を伴いながら徐々に増大し、E-ASCs の投与は間質の線維化を抑制することで子宮内膜症性病変の増大を阻止していると考えられた。さらに Ki67 免疫染色を行い、E-ASCs 投与群の子宮内膜症上皮細胞における Ki67 陽性細胞の割合はコントロール群と比較し有意に低値であった。この結果から、子宮内膜症上皮細胞は子宮内膜症病変において増殖を続けており、E-ASCs を投与するとその増殖能力が抑制されることが示唆された。
- ASCs 投与による子宮内膜症病変の標的遺伝子の変化：子宮内膜症性病変の RT-qPCR

では、E-ASCs 投与群における炎症促進遺伝子、線維化促進遺伝子の発現レベルは、コントロール群と比較し有意に低かった。その他の遺伝子群においては、有意差を認めなかった。これらの結果から、炎症促進遺伝子や線維化促進遺伝子は子宮内膜症病変においては常に発現しており、E-ASCs の投与がこれらの遺伝子発現を抑制することで、抗子宮内膜症効果をもたらしていると考えられた。

- ASCs のホーミング効果の検討：Ku0-ASCs を尾静脈投与した子宮内膜症モデルマウスの腹腔内の観察において、Ku0-ASCs は子宮内膜症病変への集積を認めており、病理切片においても同様の蛍光シグナルを確認できた。このことから、全身投与された ASCs は炎症の主座である子宮内膜症病変にホーミング能力によって集積し、抗炎症作用をきたしている可能性が示唆された。

【結論】

ASCs はホーミング能力によって子宮内膜症病変に集積し、組織保護および免疫調節効果によって、子宮内膜症様病変の増大を抑制することが示された。ASCs による細胞治療は、子宮内膜症患者の革新的な治療法となり得ると考えられる。

審査の結果の要旨

本論文は、子宮内膜症に対する脂肪組織由来間葉系幹細胞による細胞療法の有効性とその機序について、モデルマウスを用いて評価した研究である。

本邦では現在 5.5 組に 1 組の夫婦が不妊症と診断されている。今後の少子高齢化社会を支えるにあたって、画期的な生殖補助医療の開発が必要不可欠である。不妊症の原因疾患は多岐にわたるが、その中でも子宮内膜症は卵巣因子、卵管因子、子宮因子など様々な因子に影響し、不妊症の原因疾患として重要な疾患である。しかし、既存の内分泌療法や手術療法では根治は望めないため、新規治療法の開発が切望されている。子宮内膜症の病態の中心である炎症と線維化を同時に改善できる脂肪組織由来間葉系幹細胞による細胞治療は、同疾患への治療応用の可能性があるかと着想した。本研究は、子宮内膜移植説を基にした子宮内膜症モデルマウスを用いて脂肪組織由来間葉系幹細胞投与による抗子宮内膜症効果を明らかにし、子宮内膜症患者の革新的な治療法となり得る可能性を示した。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さ、審査員との質疑応答は以下の通りである。

1. 斬新さ

間葉系幹細胞を用いた細胞治療による他疾患への臨床応用の報告はあるが、脂肪組織由来間葉系幹細胞による抗子宮内膜症効果の検討の報告は、本研究が初めてであり、斬新な研究内容である。

2. 重要性

子宮内膜症は月経困難症、生殖能の喪失、癌の発症を誘起し、女性の一生を通じて Quality of Life を著しく損なう重篤な疾患であるが、既存の治療では根治は望めない。本研究によって示された脂肪組織由来間葉系幹細胞による抗子宮内膜症効果は、今後の子宮内膜症の治療法の新たな選択肢として期待を抱かせる重要な研究である。

3. 研究方法の正確性

本研究に用いた間葉系幹細胞の分離方法や子宮内膜症モデルマウスの作成方法は、当研究室や共同研究施設で以前より確立された方法である。また実験は複数回施行され、再現性があることも示されていた。統計学的処理も適切に行われており、十分な正確性がある。

4. 表現の明確さ

本論文は明確な表現による質の高い論文であり、2022年5月16日付で Scientific Reports からオンライン出版されている。申請者のプレゼンテーションも明確なものであった。

5. 主な質疑応答

Q1: クサビラオレンジトランスジェニックマウスの脂肪幹細胞を用いた場合、間葉系幹細胞を標識した蛍光色素と色がオーバーラップしないのか。

A1: モデルマウスに投与した細胞は蛍光色素で標識していないため、色がオーバーラップしたということはない。

Q2: 後期継代の脂肪幹細胞は何継代くらいから後期継代と表現するのか。また培地は異なる組成のものを使用したか。

A2: 一般的に脂肪幹細胞は6継代程度までが実際に細胞治療として使用できると言われている。今回使用した後期継代の間葉系幹細胞は、幹細胞の分化を進め、その能力を十分に落とすために、20継代という継代数で実験を行った。培地は継代を重ねても、同じ培地を使用した。

Q3: Ki67免疫染色では、子宮内膜症上皮細胞の評価のみを行ったのか。病変間質の評価はどのようなのか。

A3: ki67免疫染色では上皮細胞の評価のみを行い、間質の評価はHE染色での間質厚とマ

ッソントリクローム染色での線維化の程度で評価した。

Q4：内膜症性病変で病変炎症促進遺伝子、線維化促進遺伝子が特異的に低下しているが、遺伝子レベルで何かストーリーは組み立てられるか。もっと大きな遺伝子群が動いている可能性があるが、RNA シークエンスでの網羅的解析はしてないのか。

A4：炎症が抑制された結果として *Il6* が低下し、*Mcp1* の低下は免疫細胞による過剰な免疫反応を抑えている結果ではないかと考えている。また *Tgfb1* は線維化が抑制された結果として低下している。病変内容液や腹水の採取ができなかったため、RNA シークエンスでの網羅的解析までは行えなかった。

Q5：クサビラオレンジが発現している間葉系幹細胞は、どの程度の割合か。投与した細胞数の割に、病変で確認できた細胞数が少ないように思える。

A5：実際に発現している細胞数をカウントしたわけではないので、具体的な割合はわからないが、写真で見た限りは半分以下ではないかと思われる。また静脈内投与した細胞の多くは肺にトラップされるため、病変に集積した細胞数は多くはないと考えられる。

Q6：脂肪組織由来間葉系幹細胞が線維化を抑制するというのは既知の事実なのか。

A6：線維化抑制効果というのは一般的に言われており、肝硬変等の線維化をきたす疾患で有効であることが報告されている。子宮内膜症も線維化をきたす疾患であると言われていたため、今回本研究を行った。

Q7：対照群と治療群とで比較すると治療効果を認めているが、治療群の中で子宮内膜症初期モデルと進行モデルでの病変に差がない場合、初期に投与することの有用性というのが言えないのではないか。

A7：本実験においては、初期モデルと進行モデル間に有意差は認められなかった。しかし初期モデルは子宮内膜移植の翌日という炎症反応が非常に活発な時期での治療であったのに対し、進行モデルは移植から2週間後であり炎症がある程度落ち着いてからの投与となったことが影響しているのではないかと考えている。

Q8：今回子宮内膜症に対して間葉系幹細胞による細胞療法を行う着想に至った経緯を教えてください。

A8：子宮内膜症が強い炎症と線維化をきたす疾患なので、間葉系幹細胞の持つ抗炎症作用や抗線維化作用と合致していると考えた。

Q9：脂肪組織由来間葉系幹細胞による卵巣機能回復という話が出てきたが、この場合の投与経路はどのようなものか。

A9：尾静脈投与を行った。

Q10：レシピエントマウスの子宮は残しているのか。間葉系幹細胞の集積を見る場合、残った子宮がコントロールになると思うが、その評価は行ったのか。なぜ通常の子宮内膜組織には集積せず、腹腔内に移植した内膜組織組織にだけ集積するのか。異所性子宮内膜への選択性は病態発症機転に起因するか。

A10：レシピエントマウスの子宮は残している。マウスの病理切片で子宮は確認したが、幹細胞の集積は認められなかった。腹腔内に散布された子宮内膜組織は生着部位で炎症を起こしており、その炎症性サイトカインの存在下で活性化した間葉系幹細胞がインテグリン $\beta 1$ やインテグリン $\alpha 4/\beta 1$ 複合体を発現する。これらは、炎症によってvascular cell adhesion molecule (VCAM) -1が発現した内皮細胞に接着する働きを持つため、そういった機序が働いているのではないかと考えている。

Q11：モデルマウスの作成や治療はBALB/cマウスを使用しているが、クサビラオレンジ遺伝子組み替えマウスはC57BL/6マウスを使用している。マウス種が違くとアロ抗原を認識した免疫反応を引き起こしたりするのではないか。

A11：間葉系幹細胞は種が違っても免疫応答は起こりにくいと考えられる。また実際、同種移植で拒絶反応を回避する多数の報告がある。

Q12：脂肪組織由来間葉系幹細胞は分化が進んでいくと、最終的にどのような細胞に分化していくのか。

A12：顕微鏡で観察すると、早期継代と比較して紡錘形が強く痩せた細胞として観察でき、老化が進んだ細胞群であったと考えられる。

Q13：抗炎症性サイトカインや抗線維化物質が直接的に分泌されず、炎症抑制や線維化抑制の機序により子宮内膜症が改善した理由として、どのようなことが考えられるのか。

A13：間葉系幹細胞は、炎症性サイトカインの存在下で、プロスタグランジン E2 や cyclooxygenase-2 (COX-2) の分泌を亢進させ、T細胞、NK細胞、および樹状細胞の機能を阻害し、抗炎症作用を示していると考えられる。線維化抑制に関しては、マクロファージを抗炎症性マクロファージに形質転換させることで、その効果をもたらすと考えられる。

Q14：子宮内膜細胞が腹腔内に生着するにあたり、その間に免疫細胞の関与があると思うが、今回は病理切片でその確認は行ったか。

A14：今回は病理切片での免疫細胞の確認は行っていない。

本論文は、以上の内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さ、及び質疑応答の結果を踏まえ、審査員で討議の結果、学位論文に値し、学位申請者についても学位授与に値すると評価された。