

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16768

研究課題名(和文) iPS細胞からミュラー管細胞への分化機序の解明：新規不妊治療法の創出を目指して

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of differentiation from iPS cells to mural tubules:
Toward the creation of new infertility treatment methods

研究代表者

武内 大輝 (Takeuchi, Hiroki)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50739612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：不妊治療は少子高齢化が進む我が国によって喫緊の課題であるが、子宮内膜機能不全に対する治療法は未だ改善に乏しい。我々は不妊因子の中でも雌性生殖器由来の不妊の新規治療法の開発を目指して、多能性幹細胞から雌性生殖器の初期発生に重要なミュラー管上皮細胞への誘導系の開発を試みた。ミュラー管上皮細胞への誘導は詳細が不明であるが、申請者はBMP経路とレチノイン経路に着目し、中間中胚葉～体腔上皮細胞～ミュラー管上皮細胞の誘導に、FGF経路とレチノイン酸経路の活性化とBMP経路の阻害を同時に実施する事が重要である事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでミュラー管の詳細な発生機序は不明であったが、本課題においてミュラー管上皮細胞の発生・誘導には、FGFシグナル経路とレチノイン酸経路の活性化に加え、BMP経路の阻害が重要である事を実証した。これらの発見は、更なる機序解明のための重要な知見となり学術的意義は大きいと考えられる。また不妊治療において過去20年であまり改善していない妊娠率を向上させるため、技術開発のための研究ツールを提供するだけでなく、移植細胞療法や再生医療などへの応用も期待でき、社会的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Infertility treatment is an urgent issue in Japan where the birthrate is declining and the population is aging, but the cure for endometrial insufficiency remains poorly improved. With the aim of developing a new treatment method for infertility derived from female reproductive organs among the infertility factors, we attempted to develop an differentiation method from pluripotent stem cells to Mullerian epithelial cells which are important for early development of female reproductive organs. Although the details of the differentiation of mueller duct are unknown, We focused on the BMP signaling and retinoic acid pathways and investigated their importance. We demonstrated that the activation of FGF signal pathway and retinoic acid pathway and inhibition of BMP signaling pathway are important in the differentiation of mesodermal - coelomic epithelial cells -Mullerian epithelial cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：生殖医療 再生医療 ミュラー管上皮細胞 体腔上皮細胞 中間中胚葉細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

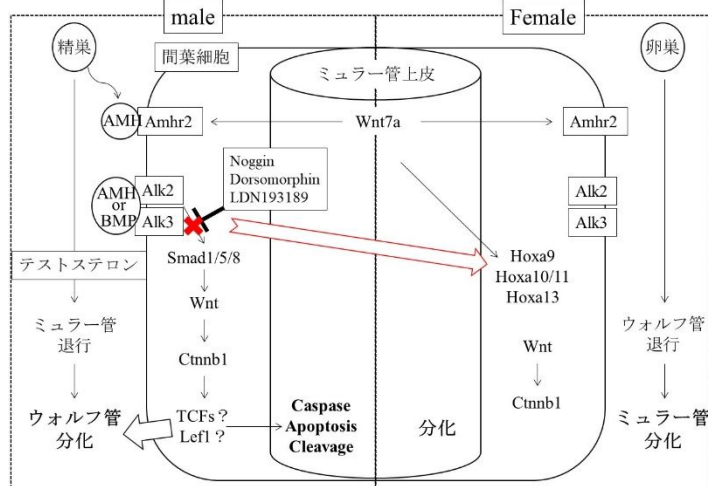
1. 研究開始当初の背景

(1)近年の不妊患者の増加に伴い、体外受精件数は右肩上がりです。不妊因子は様々あり、卵子の不妊因子は研究が進み臨床応用も進んでいるが、着床の不妊因子となる子宮内膜組織に起因する不妊要因の研究は、*in vitro* の研究ツールが少なくあまり進展していない。

ヒト iPS 細胞(human induced pluripotent stem cells: ヒト iPSCs)を含むヒト多能性幹細胞(human pluripotent stem cells: hPSCs)は病態の解明や創薬ツールとしての報告があり¹⁾、加えて各臓器細胞の移植ドナー細胞としての利用が期待されている。子宮関連疾患についても患者由来 iPSCs から子宮関連細胞を誘導し病態を再現することで、治療薬や病態機構の解明のためのツールとしての利用も期待される。しかしながら、hPSCs からの精子や卵子といった生殖細胞や各種臓器の細胞への分化誘導に関しては多数の報告がある中、雌性生殖器への誘導の報告は少ないのが現状である。その理由の一つに子宮・卵巣・付属器は生命維持に直接関わる組織ではない事があげられる。しかしながら不妊患者が増加する中、子宮性不妊の根治療法は無いのが現状であり、卵子や精子側の問題を克服できても妊娠までのハードルが高く、新たな治療方法が期待されている。加えて、子宮内膜の発生は、Ye 等の報告から²⁾、子宮内膜は中胚葉経路で分化することは判明したが、途中の段階であるミュラー管(Mullerian Duct: MD)までの機序についても不明な点が多く、その発生機序については殆ど解明されていない。

(2)MD の間葉細胞で発現している抗ミュラー管ホルモンレセプター (Anti-Mullerian Hormone receptor:AMHR)2 レセプターは精巣から分泌される AMH が結合し AMH シグナルが活性化されると、R-Smad(SMAD1/5/8)が活性化され R-SMAD/SMAD4 複合体を形成して核内へ移行し AMH 経路を活性化すると推定されている。骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein;BMP) レセプターであり AMH レセプターでもある ALK2 と ALK3 に AMH が結合することにより R-SMAD が活性化されると MD が退行し、一方で精巣より分泌されるテストステロンによりウォルフ管が分化する事が示唆されている。加えて ALK2 と ALK3 のノックアウトマウスにおいては MD が退行しない事が報告されている^{3), 4)}。MD におけるレチノイン酸に関する詳細な機序は不明であるが、レチノイン酸レセプターの変異により MD の一部の形成が阻害される事が報告されているため^{5), 6)}、レチノイン酸シグナルが MD の形成と維持に重要であることが示唆されている。

図1 生殖器の発生の概略図



2. 研究の目的

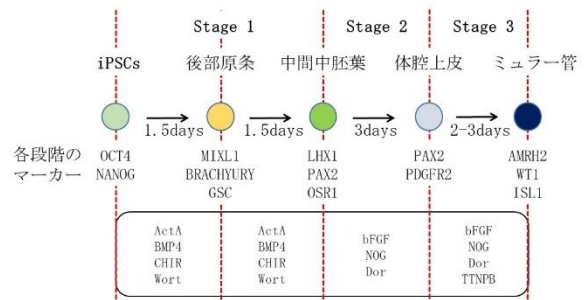
本研究では、中胚葉の発生に沿った step-wise な方法で誘導を行うことで、これまで明らかにされていなかったヒト iPSCs からミュラー管様上皮細胞(Mullerian Duct like-Epithelial Cells: MDECs)への誘導法を *in vitro* で確立することを主目的とする。本研究は以下の課題を設定する(図 2)。

- (1) Activin/Nodal 経路と BMP 経路の活性化に加え、wnt/ β カテニン経路の活性化とホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(Phosphoinositide 3-kinase;PI3K)経路の阻害による中間中胚葉への誘導系の構築
- (2) 線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factors;FGF)経路の活性化と BMP 経路の阻害による体腔上皮細胞への誘導系の構築
- (3) レチノイン酸経路の活性化による MDECs への誘導系の構築

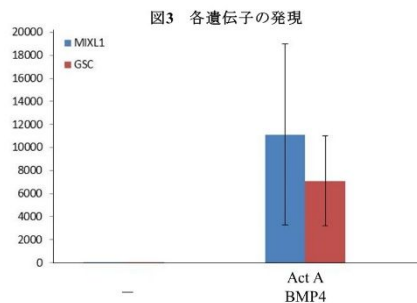
3. 研究の方法

- (1) iPSCs から後部原条への誘導において、既に報告されている Activin A(Act A)と BMP4 を添加したところ、マーカーである MIXL1 と GSC の発現の有意な上昇が認められた(図 3)。また申請者は内胚葉誘導や心筋などの中胚葉細胞への誘導に Wnt/ β

図2 誘導方法



カテニン経路の活性化と PI3K 経路の阻害が有効である事を報告している⁷⁾。今回の誘導系で中間中胚葉への誘導効率を高めるため、Wnt/ β カテニン経路を活性する選択的 glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) 阻害剤である CHIR99021(CHIR) と PI3K inhibitor である Wortmannin(Wort)を使用し、中間中胚葉マーカーである *OSR1*・*LHX1*・*PAX2* 遺伝子発現と *LHX1*・*PAX2* タンパク質の発現を確認した。



- (2) 次の誘導段階である体腔上皮細胞への誘導を行う。誘導には ALK2/3 選択的阻害剤である LDN193189(LDN) 若しくは Dorsomorphin(Dor)、BMP アンタゴニストである NOGGIN(NOG)の添加により BMP 経路を阻害することで体腔上皮細胞への誘導を促す。マーカーとして *PAX2*・*HOXA10*・*HOXA13* 遺伝子発現と *HOXA10* タンパク質の局在を確認した。
- (3) 体腔上皮細胞から MDECs へ誘導する。誘導には、レチノイン酸経路の RAR アンタゴニストである TTNPB により活性化し、MDECs マーカーである *AMHR2*・*WT1*・*ISLET1* の遺伝子発現と *WT1* タンパク質の局在の確認と陽性細胞率を測定した。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞株(409B2)は、理研より分与された雌性株を使用した。

- (1) 中間中胚葉までの誘導には、Act A と BMP4 に加えて、CHIR と Wort を添加する事で、マーカー遺伝子である *OSR1*・*LHX1*・*PAX2* の発現が顕著に上昇する事が確認された(図 4)。また、免疫蛍光染色により、マーカーである *LHX1*・*PAX2* タンパク質の局在も確認された(図 5)。このことから、多能性幹細胞から中間中胚葉への誘導には、Activin/Nodal 経路と BMP 経路の活性化に加え、wnt/ β カテニン経路の活性化と PI3K 経路の阻害が重要である事が明らかとなった。

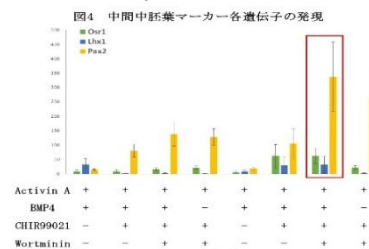


図5 中間中胚葉マーカータンパク質の局在

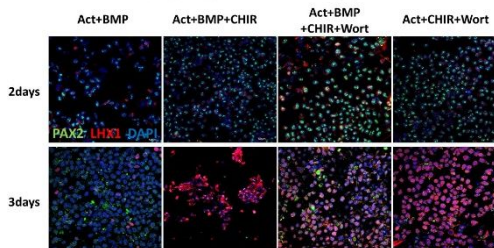


図6 体腔上皮誘導におけるBMP経路の影響

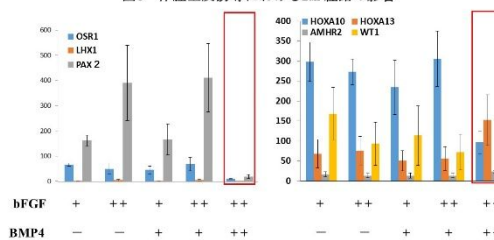
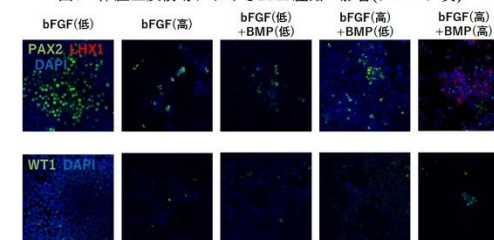


図7 体腔上皮誘導におけるBMP経路の影響(タンパク質)



- (2) 中間中胚葉から体腔上皮細胞への誘導について、研究当初は詳細な報告はなかった。そこで我々は、研究背景に記載した BMP レセプターである *Alk2/3* の阻害による R-SMAD の不活性化に着目した。最初に上記仮説が正しいかを確認するため、BMP 経路の活性化を BMP4 添加により確認したところ、BMP4 添加により *OSR1*・*LHX1*・*PAX2* に加えて *HOXA10* と *WT1* の遺伝子発現が低減する事とタンパク質局在も同様の結果となる事が確認され(図 6&7)。我々の仮説が正しい事が立証された。次に BMP 経路阻害剤である Dor と LDN と NOG と、FGF 経路活性化剤であり BMP 抑制に働く basicFGF を添加したところ、bFGF+NOG+Dor の添加においてマーカー遺伝子とタンパク質の発現の上昇が確認された(図 8&9)。これらの結果から、体腔上皮細胞への誘導には FGF 経路の活性化と BMP 経路の抑制が重要である事が明らかとなった。

- (3) 体腔上皮細胞の誘導で、MD マーカーである *WT1* の発現が上昇していたことから、MDECs への誘導は bFGF+NOG+Dor の添加をベースに、レチノイン酸経路を活性化するために TTNPB を添加した。その結果、TTNPB の添加により *WT1* 遺伝子の

発現上昇とタンパク質局在が認められ、WT1 陽性細胞率も 3 割程が確認されたが、予想していた程の誘導効率ではなかった。我々は陽性細胞数の上昇の為にレチノイン酸経路の活性化が中間中胚葉から体腔上皮細胞の誘導の際にも必要ではないかと考え、TTNPB を添加したところ、更なる WT1 遺伝子の発現上昇とタンパク質局在に加え、5 割程の陽性細胞率が確認された(図 10 & 11)。これらの結果から、中間中胚葉から MDECs の誘導には FGF 経路の活性化と BMP 経路の抑制に加え、レチノイン酸経路の活性化が重要である事が明らかとなった。

図8 体腔上皮誘導におけるマーカー遺伝子の発現

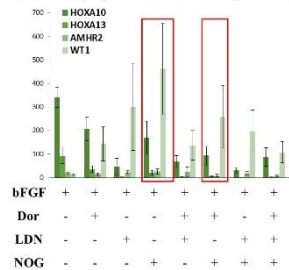


図10 MDECs誘導におけるマーカーの遺伝子発現

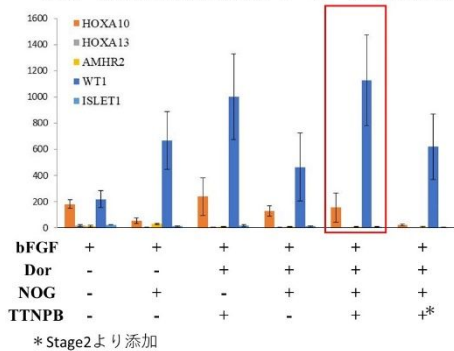


図9 体腔上皮誘導におけるマーカータンパクの発現

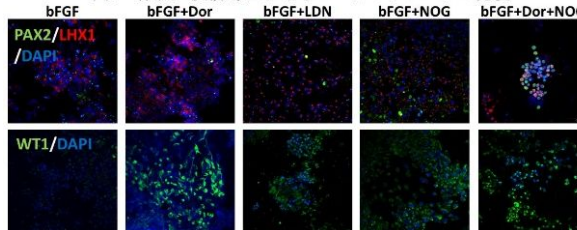
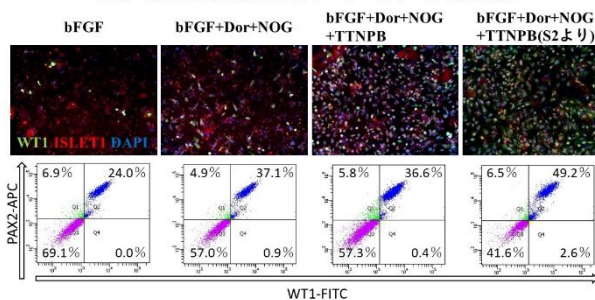


図11 MDECs誘導におけるマーカータンパク質の発現



本研究では、発生機序が明らかとなっていない中間中胚葉から MD への誘導系開発を目的として、様々なシグナル経路の活性化と阻害を行うことで、各誘導段階でのそれらの経路の重要性の解明を目指して研究を行った。中間中胚葉の誘導には、これまで報告されていた Activin/Nodal 経路と BMP 経路の活性化に加え、新たに wnt/ β カテニン経路の活性化と PI3K 経路の阻害が重要である事を発見した。また MD の誘導において、FGF 経路と BMP 経路とレチノイン酸経路に着目し、FGF 経路とレチノイン酸経路の活性化と BMP 経路の阻害が重要である事を発見した。現在、腎皮膜下移植による *in vivo* 誘導で、誘導した MDECs が子宮内膜細胞に分化するかを確認中である。今後は誘導した MDECs が妊孕性に係わる機能を有するかを検討する予定である。

<引用文献>

- 1) Matsumoto Y, *Stem Cells*. 2015 Jun;33(6):1730-42
- 2) Ye L et al., *PLoS One*. 2011;6(6):e21136.
- 3) Jamin SP et al., *Nat Genet*. 2002;32(3):408-10.
- 4) Orvis GD et al., *Biol Reprod*. 2008;78(6):994-1001.
- 5) Kastner P et al., *Development*.1997;124(2):313-26.
- 6) Mendelsohn C et al., *Dev Biol*. 1994 Nov;166(1):246-58
- 7) Takeuchi et al., *Scientific Reports*. 2014;4:4488. doi: 10.1038/srep04488

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 前沢 忠志, 赤阪 未来, 真川 祥一, 二井 理文, 西岡 美喜子, 武内 大輝, 田中 博明, 池田 智明	4. 巻 36ページ
2. 論文標題 多脾症候群、心奇形の術後における進行性の貧血の症例に対して、体外受精により妊娠・出産に至った1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本受精着床学会雑誌	6. 最初と最後の頁 317-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 学, 武内 大輝, 前沢 忠志, 神田 英輝, 有馬 公伸, 池田 智明, 杉村 芳樹
2. 発表標題 PDE5阻害薬(Tadalafil)による乏精子症モデルマウスの精液所見改善効果
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東本 誠也, 武内 大輝, 前沢 忠志, 西岡 美喜子, 森下 みどり, 真柄 栄梨, 池田 智明
2. 発表標題 卵巣凍結時に回収した卵子の低侵襲な妊孕性温存療法としての有用性の検討
3. 学会等名 第60回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真柄 栄梨, 武内 大輝, 東本 誠也, 前沢 忠志, 西岡 美喜子, 森下 みどり, 池田 智明
2. 発表標題 当センターのIVF実施患者におけるBMIと妊孕性との相関性について
3. 学会等名 第60回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武内 大輝, 西岡 美喜子, 前沢 忠志, 福井 愛実, 吉川 堅斗, 北野 裕子, 池田 智明
2. 発表標題 DefinedでXeno-freeな新規ヒト精子凍結保存液の開発
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西岡 美喜子, 前沢 忠志, 阪本 美登, 道端 肇, 渡邊 純子, 北野 裕子, 武内 大輝, 池田 智明
2. 発表標題 卵巢広汎性浮腫合併不妊に体外受精・胚移植を行った一例
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 愛実, 武内 大輝, 前沢 忠志, 西岡 美喜子, 北野 裕子, 渡邊 純子, 道端 肇, 阪本 美登, 吉川 堅斗, 池田 智明
2. 発表標題 当院におけるアンタゴニスト製剤を用いた排卵抑制効果の検討
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 学, 武内 大輝, 前沢 忠志, 神田 英輝, 池田 智明
2. 発表標題 PDE5阻害薬(Tadalafil)による乏精子症モデルマウスの精液所見改善効果
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川 堅斗, 武内 大輝, 前沢 忠志, 西岡 美喜子, 北野 裕子, 渡邊 純子, 道端 肇, 阪本 美登, 福井 愛実, 池田 智明
2. 発表標題 当センターにおける凍結用ラベルの問題点および改善に向けた取り組み
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 純子, 前沢 忠志, 西岡 美喜子, 北野 裕子, 道端 肇, 阪本 美登, 武内 大輝, 福井 愛実, 池田 智明
2. 発表標題 胚移植反復不成功患者に対するERA・EMMA・ALICE検査の有用性
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道端 肇, 西岡 美喜子, 福井 愛実, 阪本 美登, 北野 裕子, 渡邊 純子, 武内 大輝, 前沢 忠志, 池田 智明
2. 発表標題 ホルモン補充周期における凍結融解胚盤胞移植決定時の血中エストラジオール値は臨床的妊娠率に影響するか
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前沢 忠志, 武内 大輝, 阪本 美登, 道端 肇, 北野 裕子, 福井 愛実, 二井 理文, 渡邊 純子, 西岡 美喜子, 池田 智明
2. 発表標題 当院での卵巣組織凍結保存の実際
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武内 大輝
2. 発表標題 今後の生殖補助医療技術の研究と開発～ 培養士と研究者としての視点から～
3. 学会等名 第16回東海ARTカンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西岡 美喜子、前沢 忠志、北野 裕子、武内 大輝、池田 智明、伊井 憲子、種村 浩
2. 発表標題 脳腫瘍術後放射線治療中に体外受精・胚凍結保存を行った一例
3. 学会等名 日本生殖医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前沢 忠志、北野 裕子、西岡 美喜子、武内 大輝、池田 智明
2. 発表標題 当院でのがん患者に対するランダムスタート法による卵巣刺激
3. 学会等名 日本生殖医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内 大輝
2. 発表標題 ヒト人工多能性幹細胞からミューラー管細胞への誘導
3. 学会等名 日本生殖工学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----