

主論文の要旨

**Establishment and characterization of cell lines from
human endometrial epithelial and mesenchymal cells
from patients with endometriosis**

〔 子宮内膜症患者の正所性子宮内膜の不死化上皮・間葉細胞の樹立 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：梶山 広明 教授)

村岡 彩子

【緒言】

子宮内膜症は逆流月経血内の子宮内膜が卵巣や腹膜など子宮内腔外に接着、増殖することが原因と考えられている疾患で、炎症・繊維化を引き起こし下腹部疼痛や不妊症の原因となる。月経時はほとんどの女性で子宮内膜組織が卵管経由で腹腔内に逆流するが、子宮内膜症の発症率は10%程度であることから、子宮内膜症成立のための未知なる発症メカニズムが存在すると考えられる。これまで、正常子宮内膜と子宮内膜症患者の子宮内膜を比較した網羅的遺伝子発現解析が行われ、子宮内膜症の発生や進展への関連が示唆される遺伝子が複数報告されている。適切なモデルを用いた validation が必要であるが、初代培養細胞の継代回数は限定されることなどから、実験系に使用可能な子宮内膜上皮・間葉細胞は適したものが存在しない。そこで、我々は、子宮内膜症成立の機序解明に使用可能な細胞の樹立を目的とし、本研究を行った。

【対象及び方法】

子宮内膜症が術前画像検索並びに術中・術後所見で診断されなかった2名を正常子宮内膜群、診断された2名を子宮内膜症群としてそれぞれの手術摘出子宮から子宮内膜組織を採取した。組織間の結合を細胞緩衝液内で震盪することで緩めたのち、腺管構造を形成する上皮細胞を収集し、単細胞に分散した後に上皮細胞用に工夫した培養液を用いて培養した。間質細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 培養液を用いて培養した。それぞれの培養細胞にレトロウイルスを用いて不死化遺伝子である CDK4, cyclin D1, TERT を遺伝子導入して不死化細胞を作成した。形質転換には Tet-Off システムを導入した発現ベクターを用いた。不死化遺伝子導入の後に細胞の更なる純化を目的とし、Magnetic activated cell sorting (MACS) 法を用いて上皮細胞と間葉細胞を選択した。樹立した不死化細胞の表現系の評価を目的として上皮・間葉細胞それぞれのマーカー遺伝子の発現定量、3D培養による腺管形成能、ホルモンレセプター発現定量とホルモン添加実験、及び RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を行った。

【結果】

上皮細胞マーカーとして cytokeratin8 と E-cadherin を、間葉細胞マーカーとして vimentin と fibronectin を用い、各細胞の遺伝子発現を Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) 法で検証した。不死化上皮細胞は上皮細胞マーカーを発現し、間葉細胞マーカーは発現せず、不死化間葉細胞はその逆の結果となり、それぞれに純化された細胞が作成出来ていることを確認した (Fig.1B)。また、それぞれの細胞マーカーの蛋白発現量を細胞免疫染色で確認し、遺伝子発現量と同じ結果を得た (Fig.1C)。不死化細胞が癌化形質を獲得していないことを確認するため、ドキシサイクリン投与下で導入不死化遺伝子の発現が有意に減少することを確認した (Fig.2A)。また不死化上皮細胞の増殖はドキシサイクリン投与下に抑制され、作成不死化細胞の増殖は導入遺伝子依存性であることを確認した (Fig.2B)。不死化上皮細胞は

初代培養細胞の極性を保ち、3D 培養で腺管様構造を形成した (Fig.2C)。形成された腺管構造は上皮細胞から構成されることを免疫組織学的染色にて確認した (Fig.2D)。不死化上皮細胞は初代培養上皮細胞の特徴を踏襲し、ホルモンレセプターが陽性であった (Fig.3A)。不死化上皮細胞の増殖はエストラジオール添加により促進され、プロゲステロン添加により抑制された (Fig.3B)。不死化細胞をマイクロアレイによる RNA シークエンスで網羅的に遺伝子発現解析し、公開データベースより正常内膜間葉細胞、子宮内膜癌細胞、子宮肉腫細胞の遺伝子発現データセットを引用して再解析を行った。主成分分析およびクラスタリング解析にて不死化細胞は癌細胞とは明らかに遺伝子発現パターンが異なることが示され、かつ、不死化間葉細胞は初代培養間葉細胞と類似した遺伝子発現パターンであることが示された (Fig.4A,B)。正常子宮内膜細胞よりも子宮内膜症患者の子宮内膜細胞で発現の高い遺伝子を用いてパスウェイ解析を行うと、上皮・間葉細胞共に既報で子宮内膜症に関連が示唆されるパスウェイが示された ($P < 0.05$, $FC > 2$, Fig.4C)。

【考察】

本研究では、新規に正常子宮内膜および子宮内膜症患者の子宮内膜の不死化上皮・間葉細胞を作成し、それぞれの細胞の特性を評価した。特に上皮細胞はその初代培養・継代が限定され、今回以下 3 点の工夫により実験系に用いることのできる適切な不死化上皮細胞を樹立出来たと考える。まず、上皮細胞は一般的な培養環境での増殖が困難であり、Wnt などの増殖因子添加により上皮細胞の特性を維持して培養できる環境を確立した。Wnt は腸管上皮細胞のオルガノイド形成にも必須の因子で細胞の極性維持や増殖に関与する。今回は子宮内膜上皮細胞にも Wnt を添加し、応用した。また、EpCAM マーカーを用いて細胞選択することで純化された上皮細胞集団を得た。EpCAM は子宮内膜上皮細胞に発現する膜貫通型蛋白であり、 β カテニンを転写因子として上皮細胞の増殖に関与し、かつ細胞間接着因子として機能する。上皮細胞と間葉細胞は増殖速度が異なり、上皮細胞集団に間葉細胞集団が混在すると、継代を経て間葉細胞集団が優位となってしまう可能性がある。今回適切な上皮細胞表面マーカーを用いて上皮細胞集団を集積させることで純化された上皮細胞集団を得た。最後に、不死化遺伝子は CDK4,cyclin D1,TERT を用いて細胞特性を保持し、かつ癌化形質を獲得しにくい不死化細胞を樹立した。不死化遺伝子の形質転換は時に初代培養細胞の染色体不安定性などを惹起し、癌化させる可能性がある。今回は細胞周期を進める因子として Retinoblastoma protein (Rb) とテロメラーゼに直接的に作用する CDK4,cyclin D1,TERT を不死化遺伝子として採用した。これらの遺伝子導入により p14ARF を介した p53 の安定化から癌化形質を獲得しにくい不死化細胞を作成できたと考える。

【結語】

我々の樹立した不死化細胞は子宮内膜細胞としての特性を維持し、内膜症発症メカニズムの探究に応用可能であると考えられる。