様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成２４年　５月２５日現在

機関番号：14301
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2011
課題番号：23659778
研究課題名（和文）　グリア幹細胞由来因子を用いた生殖臓器の組織再構築誘導の試み
研究課題名（英文）　Induction of tissue remodeling of reproductive organs using glial stem cell-derived factors

研究代表者
藤原　浩（FUJIWARA HIROSHI）
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30252456

研究成果の概要（和文）：
本研究では神経組織の再構築に関与するグリア幹細胞の生殖器官の再構築に対する促進効果の有無を検討した。その結果、h-TERT 導入したヒト子宮内膜上皮細胞株の培養系で、グリア幹細胞の存在下にヒト子宮内膜上皮細胞間隙の接着および立体構造の再構築が促進されることが発見された。これらの知見はグリア幹細胞由来因子が生殖医療において新たな誘導因子として利用できる可能性を支持するものである。

研究成果の概要（英文）：
Co-Investigator Nishio found that when stem cells of the neural epithelium-derived glia cells were transplanted into the severed site of the cordotomized mature rat, a rapid and successful regeneration of neuronal axons beyond the lesion site was achieved during several days. Central neural tissues construct tree-dimensional structures, creating complicated neural networks, which are composed of neuroepithelium-derived neurons and glial cells. In this respect, central nervous system has been far evolved than ordinary 2-dimensional epithelial layer and therefore it is speculated that the role of the glial cells in reconstruction will throw a new insight to the process of the reconstruction in reproductive organs. Based on this concept, this study was aimed to elucidate new mechanisms of developing and/or reconstructive processes of granulosa cells, endometrial epithelial cell and trophoblasts that belong to epithelial cell-lineages. First, we screened the effects of glial cell-derived factors on the culture of granulosa cells, endometrial epithelial cells, and trophoblasts. As a result, human telomerase reverse transcriptase (h-TERT)-transfected humam endometrial epithelial cell line (provided from Dr. Kyo at Kanazawa University) promoted its intercellular connection in the presence of glial stem cells derived from EGFP-transgenic rats, showing the possibility that immature glia cell-derived soluble factors can be one of the candidates to induce reconstruction of reproductive organs and to become a useful tool in the field of reproductive medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学
キーワード：グリア細胞、組織再構築、生殖臓器、幹細胞、上皮細胞

１．研究開始当初の背景

これまで研究分担者の西尾は神経細胞の支持細胞であり同じく神経上皮由来であるグリア細胞の幹細胞に着目し、これを脱分化誘導して脊髄の切断部に移植した結果、従来では困難と考えられていた切断された脊髄軸索の早期の再生を実現した。神経組織は 3 次元立体構造を作りながらニューロンネットワークを構築している点で、2 次元平面構造を構築する通常の上皮組織に比して大きく進化しており、ゆえに神経組織の再構築に関与するグリア幹細胞の機能は注目に値する。

２．研究の目的

上記の背景のもとに本研究は、生殖臓器の組織再構築機構を顆粒膜細胞、子宮内膜上皮細胞、栄養膜細胞などの上皮細胞の再生・分化の制御という視点からとらえ直し、グリア幹細胞の生殖器官の再構築に対する促進効果の有無をスクリーニングして、グリア幹細胞由来因子が生殖医療において新たな誘導因子として利用できるかどうかについて検討することを目的として計画された。具体的にはラットから分離し,ブタ胎仔脳の extract によって分化誘導したグリア幹細胞を用いて、１）卵胞発育、２）黄体形成、３）卵の成熟、４）子宮内膜分化、５）胚の発生、６）胚の着床、および７）胎盤形成と胎仔の発育に対する作用を観察し、神経細胞の発生・再生・維持に重要なグリア幹細胞が生殖現象においても新たな誘導因子として利用できる可能性の有無について検討する。また生殖行動に対する作用も観察し、臨床応用の観点も含めて今後の新しい戦略とその展開に有用な情報を集めることを目標とした。

３．研究の方法

本研究では西尾がブタ胎仔脳 extract を用いてラットのグリア幹細胞を培養誘導してこれを代表者の藤原と分担者の佐藤に定期的に供給した。藤原はラット卵胞発育と卵の成熟、ラットおよびヒトの黄体形成、マウスおよびヒト子宮内膜の分化、およびマウスの胚発生に対するグリア幹細胞の作用を解析し、佐藤はラットの胚着床、胎盤形成・胎仔発育に対するグリア幹細胞の作用を解析した。また藤原と佐藤は手術および体外受精も担当し、研究協力者の堀江、杉並、松本はヒト黄体顆粒膜細胞、子宮内膜細胞の分離・培養、ラットおよびマウスの過排卵処置と胚の採取、胚培養と妊娠ラットを用いた実験を遂行し、動物飼育の管理は研究支援者が補助した。さらに新たに分担者となった藤原（智子）はグリア幹細胞を移植したラットについて生殖活動における変化について分析した。一方で新たに分担者となった荒木は移植グリア細胞および周囲組織細胞における糖鎖受容体の発現と antagonist の作用について検討した。

グリア幹細胞は enhanced green fluorescence protein (EGFP)を遺伝子導入した Sprague-Dawley (SD) strain ラットより分離培養した。具体的には生後 5 日目の新生仔ラットから脊髄を採取し、酵素処理下に細胞分離後 7.5%CO2 下にグリア細胞を培養した。一方で胎生 80 日齢のブタ胎仔を帝王切開で娩出後、大脳を採取してホモジネートの上清を調整し、これを HPLC を用いてブタ胎仔脳 extract を調整した。この extract を培養グリア細胞に添加して A2B5(+), GLAST(+)、GFAP(-)のグリア幹細胞を誘導した。13 日齢の SD strain (EGFP-transgenic) 雌ラットから卵巣を採取し、実体顕微鏡操作下に２次卵胞を分離し、分離した卵胞をグリア幹細胞の単層培養系に移して器官培養を FSH, IGF-1 の存在・非存在下で 14 日間施行し、卵胞径の変化、顆粒膜細胞数の変化、卵の形態変化、ステロイドホルモンの分泌能の変化を調べた。さらにこの培養系にブタ胎仔脳 extract を添加して卵胞構成細胞に対する直接作用またはグリア幹細胞を介した間接作用を観察した。一方で４週齢の SD strain (Wild type) 雌ラットに PMSG(5IU)を投与して卵胞発育刺激を、さらに 48 時間後に HCG(5IU)を投与して過排卵刺激を加え、翌日卵管内の卵と卵巣内の黄体数を数えて排卵数を同定した。

また ICR マウスの排卵誘発の系において交配後、卵管および子宮から 2 cell から blastocyst の段階の胚を採取し、グリア幹細胞の単層培養の上で培養して 2 cell block の有無、blastocyst 発生率や hatching 率の変化、さらに接着率の変化を検討した。グリア幹細胞上に接着後 spreading した胚については蛍光顕微鏡下にグリア幹細胞との関係を経時的に観察した。また Inner cell mass の分化能に関しても Eph-ephrin 分子群の発現変化を指標として組織染色または定量 PCR 法を用いて検討した。一方でヒト子宮内膜組織を良性疾患による子宮全摘手術例より患者同意のもと子宮内膜組織を採取し、酵素処理下に子宮内膜上皮細胞群と子宮内膜間質

細胞群に分離してそれぞれ単層培養系に供した後に子宮内膜上皮細胞を EGFP-transgenic ラットからのグリア幹細胞と共培養し、上皮の接着能の変化を BeWo-cell spheroid を用いて検討した。また分化の変化を DPPIV の発現を指標に flow cytometry 法および定量 PCR 法で確認し、さらに wound healing assay を用いて dish 上での子宮内膜上皮細胞損傷に対する migration 能の変化を調べた。またこれらの過程におけるグリア幹細胞と上皮細胞の相互作用を蛍光顕微鏡下に観察し、さらに同様の検討を h-TERT 導入ヒト子宮内膜上皮細胞株を培養して検討した。

４．研究成果

これらの一連のスクリーニング実験の中で、金沢大学の京先生から提供を受けた h-TERT 導入したヒト子宮内膜上皮細胞株と EGFP-transgenic ラットから採取したグリア幹細胞を共培養して、子宮内膜上皮細胞間の相互応答に対する作用を検討した実験系で、グリア幹細胞の存在下にヒト子宮内膜上皮細胞間隙の接着および立体構造の再構築が促進されることが発見された。これらの知見は本研究で作業仮説となっていたグリア幹細胞由来因子が生殖医療において新たな誘導因子として利用できる可能性を支持するものであり、今後の研究の発展が期待できると評価される。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

①Fujii H, Fujiwara H, Horie A, Suginami K, Sato Y, Konishi I. EphrinA1 stimulates cell attachment and inhibits cell aggregation through the EphA receptor pathway human endometrial carcinoma-derived Ishikawa cells. Hum Reprod 26(5):1163-1170, 2011　査読有り DOI 10.1093/humerep/der034

② Sato Y, Fujiwara H and Konishi I. Response to 'Retained products of conception with marked vascularity: Pseudoaneurysm hidden behind it'. J Obstet Gynaecol Res. 37(7):966, 2011　査読有り

③ Hosono K, Matsumura N, Matsuda N, Fujiwara H, Sato Y and Konishi I. Successful recovery from delayed amniotic fluid embolism with prolonged cardiac resuscitation. J Obstet Gynaecol Res. 37(8):1122-5, 2011　査読有り

〔学会発表〕（計 4 件）

①Fujiwara H. “Circulating immune cells can promote embryo implantation.”
31th Annual Meeting of The American Society for Reproductive Immunology. 2011.5.20. Salt Lake City, U.S.A.

② Fujiwara H. “Improvement of implantation rates using autologous peripheral blood mononuclear cells”
16th World Congress on In Vitro Fertilization. 2011.9.12. Tokyo, Japan

③ Fujiwara H. “Novel local regulatory mechanisms for human embryo attachment and invasion.” The 4th International Conference of Repeated Implantation Failure. 2011.11.12. 広州 中国

④藤原　浩
「免疫細胞による着床誘導機構」
第 56 回日本生殖医学会学術講演会 2011.12.8　横浜

〔図書〕（計 1 件）

①Fujiwara H, Sato Y, Ideta A, Aoyagi Y, Araki Y and Imakawa K. Immune regulation of human embryo implantation by circulating blood cells 2011: InTech Open Access Publisher.

６．研究組織

(1)研究代表者
藤原　浩（FUJIWARA HIROSHI）
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30252456

(2)研究分担者
西尾　健資（NISIO TAKESHI）
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：70303790

佐藤　幸保（SATO YUKIYASU）
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：00508236

荒木　慶彦（ARAKI YOSIHIKO）
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70250933

藤原　智子（FUJIWARA TOMOKO）
芦屋学園短期大学・生活創造学科・教授
研究者番号：60310744