

3次元細胞共培養法を用いた ウマ着床期子宮内膜モデルの確立

羽 田 真 悟

臨床獣医学研究部門・助教

1. 目 的

申請者らは、これまでに、ウマの着床時の胚と母体間におけるシグナル伝達に関わる因子を検出・解析し、着床のメカニズムにせまる興味深い成果をあげた。しかし、この結果は妊娠13、19および25日目に採取された子宮内膜から得られた情報であり、そのメカニズムを解明するには細胞培養を用いて現象を再現し、詳細を調査する必要がある。子宮内膜の構造と性質には密接な関係があり、マウスにおいて、単一細胞の培養では生体内での子宮内膜の機能を誘導・模倣できないことが知られている。そこで本研究では、子宮内膜上皮、腺上皮および間質の細胞を3次的に組み合わせ、本来の性質を十分に発揮する子宮内膜モデルを確立することを目的とする。

2. 方 法

・細胞の採取

本学において解剖した雌ウマから子宮を採取し、内腔に0.76% EDTA-PBS液を入れインキュベートした後、内膜上皮細胞をメスで擦り取り、回収した。回収した細胞はコラーゲンゲル上で培養し、1度継代した後回収、凍結し、液体窒素中に保存した。内膜上皮を除去した子宮内膜は、ハサミで細かく切り刻み、コラゲナーゼ処理することで子宮腺と間質を溶液中に浮遊させた。その後、口径の違うナイロンメッシュを用いて残った組織、腺上皮塊、その他単離した細胞を分離し、腺上皮塊は凍結、保存し、単離細胞は培養し間質細胞を得た後凍結、保存した。

・3次元培養法の検討

①48well プレートを用いたコラーゲンゲル培養

間質細胞を解凍し、9cm ディッシュで増殖させた後、間質細胞20万、解凍した腺上皮塊50個を300 μ lのコラーゲンタイプ1-Pゲル内に埋入した。ゲルが硬化した後、内膜上皮細胞を解凍、播種し、48時間培養した。

②凝集コラーゲンゲル培養

①で作成した方法同様に、子宮内膜組織を想定して間質細胞20万、腺上皮塊2000個、を埋入し、内膜上皮細胞を播種し48時間培養した後、ゲルをwellの壁面から剥離して凝集させた。

③細胞凝集培養

コラーゲンゲルを使用せずに、間質細胞20万、腺上皮2000個を遠心により凝集させ、そのまま24時間培養し、凝集塊が安定した上に内膜上皮細胞を播種して48時間培養した。

各条件での培養終了後、細胞を4% パラホルムアルデヒド含有 PBS で固定し、30% スクロース含有 PBS を十分浸透させた後 OCT コンパウンドを用いて凍結包埋した。包埋後、7 μ m 厚の凍結切片を作成し、HE 染色して観察した。

・性ステロイドホルモン添加による遺伝子発現の変化

48well コラーゲングル培養および凝集コラーゲングル培養にて作成した疑似子宮内膜に、エストラジオール (E_2) またはプロゲステロン (P_4) をそれぞれ発情期または黄体期の血中濃度を基準に段階的に濃度を変えて添加し、培養した。培養後、mRNA を回収し、その効果を発情周期に同調して発現量が変化する因子についてリアルタイム PCR を用いて解析することで評価した。

3. 結 果

・3次元培養法

48well プレートに作成したゲルで培養した場合、間質細胞および腺上皮塊はまばらに存在した。腺上皮細胞は、本来の構造 (図1) が崩壊し細胞が扁平になっていた (図2)。ゲルを凝集させた場合、ゲル塊は直径3mm 程度まで収縮したが、間質細胞、腺上皮ともに本来の構造の密度は得られなかった。また、内膜上皮細胞は扁平で、本来の円柱状の形状は得られなかった (図3)。細胞のみを凝集して培養した場合、直径1mm 程の塊が得られ細胞の密度は増加したが、腺構造および上皮が認められなかった (図4)。

・性ステロイドホルモン添加による遺伝子発現の変化

発情期に発現が上昇することが知られている Estrogen receptor 1, Progesterone receptor, 黄体期に発現が上昇する Progesterone receptor membrane component 1, Osteopontin などの因子について調べたが、現在のところ一定の結果は得られていない。



図1. 正常な子宮内膜の HE 染色像
LE: 内膜上皮, GE: 腺上皮, S: 間質

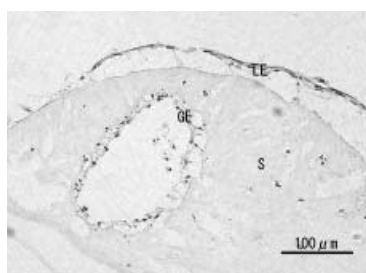


図2. 48well プレートを用いたコラーゲングル培養の HE 染色像
LE: 内膜上皮, GE: 腺上皮, S: 間質

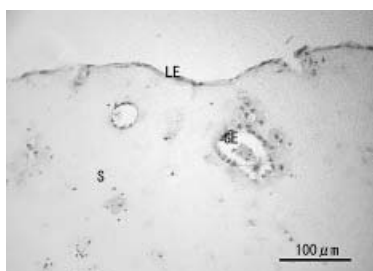


図3. 凝集コラーゲングル培養の HE 染色像
LE: 内膜上皮, GE: 腺上皮, S: 間質

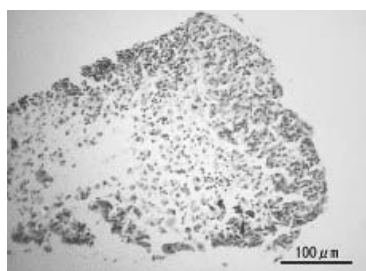


図4. 細胞凝集培養の HE 染色像

4. 考 察

子宮内膜細胞の培養による研究では、単一細胞の培養による単一の機能について行われているものが主体である。しかし、性ステロイドホルモンに対する子宮内膜の機能発現には間質細胞と腺上皮および内膜上皮の相互作用が重要であることを示した報告があることから、子宮内膜の機能を正確に評価するためには共培養系を用いて発情周期を再現することが必要と考えられる。本実験ではまず48well プレートにコラーゲンゲルを作成して用いたが、生体の細胞密度と比較すると程遠いものであった。ゲル内には数10万の細胞が存在しているため、それ以上細胞数を増加させることは細胞に対する培養液量の不足を招くと考えられ、ゲルを凝集させることを考えた。48well に形成したゲルは、細胞を含まないとそのままの大きさで維持されるが、細胞を含んでいると、その量に比例するように収縮することが実験によりわかった。20万の間質細胞および2000個の腺上皮塊を包埋したゲルは直径 3 mm 程まで収縮したが、それでも細胞密度は生体と比較して低かった。細胞のみを凝集させた場合、細胞密度は高かったが、腺構造がみられず、細胞が無秩序に増殖した可能性が考えられる。以上の培養方法の中では、形態的にはコラーゲンゲルを凝集させて培養したものが一番生体に近い状態であると考えられた。この培養法を用い、より生体に近づけるには細胞濃度を上げる、もしくはコラーゲン密度を下げるにより細胞密度を増加させることや、培養時間を長くして内膜上皮細胞の十分な増加や円柱上皮化を促すなどの対策を行う必要がある。加えて、機能面では発情周期を再現するためのホルモン処理や培養条件、場合によっては新たな添加物等も考慮する必要がある。

キーワード：ウマ, 子宮内膜, 培養