

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09629

研究課題名（和文）人工卵巣を用いた新規不妊治療技術の開発

研究課題名（英文）Development of novel infertility treatment technology using artificial ovaries

研究代表者

赤堀 太一（Akahori, Taichi）

埼玉医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90573171

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は卵巣から抽出した卵子幹細胞、顆粒膜前駆細胞から人工卵巣組織を体外で構築する。この人工卵巣を用いて、卵子幹細胞に最適な微小環境を構築し生理的な卵子の分化誘導を行う。これらの細胞を3次元培養し、人工卵巣を構築する。ウシ卵巣から抽出された卵子幹細胞および支持細胞である顆粒膜細胞の機能確認のために、培養細胞のPCR法による遺伝子発現の確認および、培養細胞の免疫蛍光染色による機能評価を行なった。卵巣組織から分離し、樹立した細胞の精度管理のための最適な条件を設定した。これにより、安定して目的の細胞を分離培養する事ができるようになり人工卵巣を用いた卵子幹細胞の分化誘導実験を行う準備が整っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖医療の治療成績は最近10年間ほぼ横ばいであり、新たな技術革新が必要である。申請者は、卵巣皮質内に少数存在する卵子への分化能をもつ卵子幹細胞の分離培養法を報告した。申請者は卵巣皮質から顆粒膜前駆細胞様細胞を分離培養できることを確認した。本研究では、これらの細胞を用いて、自己の卵巣組織由来の人工卵巣組織を体外で構築し、卵子幹細胞から受精可能な成熟卵子を誘導する。この技術により、従来よりも患者への負担が少なく効率の良い生殖医療技術を若年性悪性腫瘍患者や高度不妊症患者へ提供することができる。さらに、この新たな生殖医療技術は人口減少が切実な問題となっている本邦の未来に光明をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, artificial ovarian tissue is constructed in vitro from oogonial stem cells and granulosa progenitor cells extracted from the ovarian tissue. Using this artificial ovary, we construct an optimal microenvironment for oogonial stem cells and induce physiological oocyte differentiation. These cells are cultured three-dimensionally to construct an artificial ovary. In order to confirm the functions of oocyte stem cells and granulosa cells extracted from bovine ovaries, gene expression was confirmed by PCR of cultured cells and functional evaluation was performed by immunofluorescence staining. Optimal conditions were set for quality control of the established cells separated from the ovarian tissue. As a result, the target cells can be stably isolated and cultured.

研究分野：生殖補助医療

キーワード：卵子幹細胞 再生医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖医療の治療成績は最近 10 年間ほぼ横ばいであり、新たな技術革新が必要である。申請者は、卵巣皮質内に少数存在する卵子への分化能をもつ卵子幹細胞の分離培養法を報告した。申請者は卵巣皮質から顆粒膜前駆細胞様細胞を分離培養できることを確認した。本研究では、これらの細胞を用いて、自己の卵巣組織由来の人工卵巣組織を体外で構築し、卵子幹細胞から受精可能な成熟卵子を誘導する。

2. 研究の目的上述した技術により、従来よりも患者への負担が少なく効率の良い生殖医療技術を若年性悪性腫瘍患者や高度不妊症患者へ提供することができる。さらに、この新たな生殖医療技術は人口減少が切実な問題となっている本邦の未来に光明をもたらすことが期待できる。

3. 研究の方法本研究は以下の手順により卵巣から抽出した卵子幹細胞、顆粒膜前駆細胞から人工卵巣組織を体外で構築する。この人工卵巣を用いて、卵子幹細胞に最適な微小環境を構築し生理的な卵子の分化誘導を行う。これらの細胞を 3 次元培養し、人工卵巣を構築する。

採取し凍結保存した卵巣組織を融解し細切後、コラゲナーゼにて卵巣細胞懸濁液を作り、一次抗体として抗 DDX4 抗体を反応させる。次に蛍光標識された 2 次抗体を用いて DDX4 陽性細胞を FACS にて分離する。同時に、DDX4 陰性細胞も回収する。分離された細胞は、37° C、5%CO₂ の環境下でコロニー出現まで培養する。このようにして樹立した OSCs と顆粒膜前駆細胞様細胞を、OSCs:1 に対し顆粒膜前駆細胞様細胞:10 の割合で混合し、96 ウェルの U-bottom 非接着性培養ディッシュまたはナノカルチャーディッシュで 3 次元共培養する。このようにして作成した組織を約 1 週間培養した後、PTEN 阻害剤、Activin A, BMP4, FSH, 及び Estradiol などの因子を段階的に加える事により、より生体に近い微小環境を *in vitro* で再現し、卵胞発育を促し、OSCs の分化誘導を目指す。

4. 研究成果

上述した方法により構築した人工卵巣組織の HE 染色標本による評価では、一部の卵子幹細胞は人工卵巣内で集塊を形成し、扁平な細胞に取り囲まれた原子卵胞様構造を形成していることがわかった。この人工卵巣を培養し段階的に分化誘導因子を添加することにより人工卵巣組織から培養液中に大型の卵子様細胞が排出されることが観察された。この細胞は、40 μm に達し、免疫染色にて GDF9 に陽性を示したため、分化した卵子細胞であることが示唆された。しかし、このような細胞を検出する確率は低く、

より精度の高い培養条件の設定が必要と考えられている。我々は、今後の研究において、これらの培養条件を最適化すべく実験を繰り返していく方針である。同時に、現在使用しているウシ細胞から、ヒト卵巣組織への応用の準備を進めて行く方針としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤堀 太一
2. 発表標題 卵子幹細胞による新たな生殖医療技術の開発
3. 学会等名 第66回 日本生殖医学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤堀太一、円谷生美、高井泰
2. 発表標題 卵子幹細胞 (Oogonial Stem Cells: OSCs) を用いた 新たな妊孕性温存法の開発
3. 学会等名 第10回日本がん・生殖医療学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 赤堀太一、円谷生美、高井泰
2. 発表標題 卵子幹細胞 (Oogonial Stem Cells: OSCs) を用いた新たな生殖医療技術の開発
3. 学会等名 日本生殖発生医学会第 15 回学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 赤堀太一、高井泰
2. 発表標題 卵子幹細胞 (Oogonial Stem Cells: OSCs) を用いた新たな生殖医療技術の開発
3. 学会等名 第38回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 赤堀太一、円谷生美、高井泰
2. 発表標題 卵子幹細胞 (Oogonial Stem Cells: OSCs) の体外分化誘導法
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 赤堀太一、円谷生美、高井泰
2. 発表標題 卵子幹細胞による新たな生殖医療技術の開発
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴原浩章、赤堀太一、他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 526
3. 書名 妊孕性温存のすべて	

〔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
研究分担者	高井 泰 (Takai Yasushi) (60323549)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------