

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390447

研究課題名（和文） 卵子バンクの安全性向上にむけたヒト白血病発症 NOG マウスでの腫瘍細胞の挙動の検討

研究課題名（英文） Examination of the behavior of the human leukemia cells in immunodeficient mice: For the safety improvement of the ovarian bank

研究代表者

寺田幸弘（TERADA YUKIHIRO）

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10260431

研究成果の概要（和文）：

担癌女性患者などの卵巣組織を治療前に採取、保存して原疾患治療後に凍結融解後の卵巣より何らかの方法で卵子を回収するシステムが「卵子バンク」である。卵子バンクは若年がん患者などの妊孕性を担保する新しい技術として期待されている。しかし、担癌状態の治療前の卵巣組織を保存しておき治療後に使用することに関しての安全性の検証が未だなされていない。本研究では以下の検討を行い、上記の課題に関する検討を行った。

ヒト白血病モデル免疫抑制マウスの作成：ヒト白血病細胞への GFP 遺伝子導入とモデルマウスへの白血病細胞の移植生着の確認をした。GFP 導入効率は極めて低値で細胞群ごとに差が見られた。導入を確認できた白血病細胞を幼弱免疫抑制マウスに投与したが、その生着率も細胞群毎に差異がみとめられた。

モデルマウス体内での白血病細胞の挙動の検討：組織学的方法と他免疫抑制マウスへの移植による生存性の検討によりモデルマウス卵巣へのヒト白血病細胞の混入を検証した。細胞群ごとに生着率が大きく異なり現在までに卵巣にどの程度の確率で白血病細胞が混入するかのデータに関しては明確な結論は得られなかった。

生殖補助技術シミュレーションによる白血病細胞混入の検討：モデルマウスの卵子、卵丘塊を用いて生殖補助技術のシミュレーションを施行した。シミュレーションで得られた卵子を移植したマウス骨髄での腫瘍細胞の有無を検討したが明らかな腫瘍細胞はみとめられなかった。

研究成果の概要（英文）：

A system gathering the ovarian tissue from cancer patients before treatment is called as "ovarian bank". The ovarian bank is expected as a new technique which secure fertility of juvenile cancer women. However, the examination of the safety about using ovarian tissue before the treatment of cancer, is not yet done. We performed the following examination.

1) Production of the human leukemia model by using immunodeficient mouse: We introduced GFP gene into human leukemia cells, and confirmed the transplant engraftment of the leukemia cells to a model mouse. The GFP induction efficiency is extremely low level and a difference was found every cellular group. Leukemia cells after introduction of GFP gene, were transplanted into immunodeficient mice. The survival rates after transplantation were different on every cellular group.

2) Behavior of leukemia cells in the model mouse: We examined presence or absence of the human leukemia cells in the model mouse ovary, by histologic investigation and examination of the viability after transplantation into other immunodeficient mouse. The rate of survival is different greatly every cellular group. The clear conclusions were not obtained about the the probability of leukemia cells contamination to an ovary.

3) The examination of the leukemia cells contamination in mouse after assisted reproductive technology simulation: We examined the presence or absence of tumor cells with the mouse bone marrow after transplantation of embryos following simulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：産婦人科学

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：Oncofertility、卵子、卵巣凍結、生殖補助技術

1. 研究開始当初の背景

近年の悪性腫瘍診療の諸領域において、患者をただ救命する時代から治療後の quality of life を向上させる戦略の体系化が求められている。昨今の生殖医療の長足の進歩は、患者性腺あるいは配偶子を一時的に体外で保存することを可能にした。凍結保存した性腺、配偶子を悪性腫瘍治療後に融解し挙児にむけた治療に使用することが可能になれば、従来ならば治療後に妊孕性を喪失する可能性を秘めた悪性腫瘍の患者にも将来的な挙児のチャンスが生まれる。卵巣凍結保存に関しては、融解後卵子を組織から採取する必要がある。しかし、現在の体外培養系では卵巣皮質にある原始卵胞から成熟卵胞までの発育誘導は不可能である。その対応として凍結、融解卵巣組織の治療後自己移植が考えられる。これらのプロジェクト確立にむけた最大の問題は凍結、融解した卵巣組織は悪性腫瘍治療中の患者組織であり、移植により、悪性腫瘍が再発してしまう可能性が完全に否定できないことである。凍結保存されている卵子、卵巣が将来融解され、患者体内に戻された時、折角治癒した原疾患が再燃する“治療後自己悪性細胞移植による再発”を否定できる体系的な検証は未だ行われていない。

近年、ヒト組織の移植実験系におけるホストアニマルとして、種々の優れた免疫抑制マウスが開発されている。我々はこれらの免疫抑制マウスを用いたヒト卵巣移植系の実験を積み重ねている。最近では、NOD/SCID/IL2r^{null} (NOG) マウスを使用することにより、ヒト体内で発育したものとほぼ同サイズの成熟卵胞の発育を誘導することに成功した (Terada. Am J Reprod Immunol. 2008)。

ヒト白血病幹細胞を出生直後の NOG マウスに移植した、“ヒト白血病発症モデル NOG マウス”が最近発表された。このような疾患モ

デルを用いれば、ヒト白血病保持個体の卵巣組織あるいは卵子採取、そして卵子凍結保存から融解、移植までのすべてのシナリオをシミュレートすることが可能である。ヒト体内での検証が困難なヒト血液悪性疾患細胞の卵子、卵巣への混入と化学療法時の動態を明らかにすることは、より安全で有効な卵子、卵巣組織凍結保存プログラム確立への有益な情報をもたらす。

2. 研究の目的

ヒト白血病発症モデル免疫抑制マウスを用いて、ヒト体内での検証が困難なヒト血液悪性疾患細胞の挙動（卵子、卵巣への転移）を明らかにする。それらの知見をもとに、安全性と効率の高い血液悪性腫瘍患者の卵子、卵巣保存プログラム作成への基礎的な知見を集積することを目的とする。

3. 研究の方法

●ヒト白血病発症モデルマウスの作成

血液疾患患者骨髄生検時の余剰骨髄より分離選別して得られたヒト白血病幹細胞あるいはヒト白血病細胞株に GFP 遺伝子を導入した。導入後放射線照射を行った幼弱雌免疫抑制マウスに白血病幹細胞を静脈内投与してその生着を検討した。

●モデルマウス体内での白血病細胞の挙動の検討

モデルマウス卵巣へのヒト白血病細胞の混入を検討した。採取卵巣の step serial section を作成の上、移植前標識した GFP をターゲットとした蛍光励起下観察、免疫組織化学法にて移植腫瘍細胞の存在を同定した。さらに、生存性の検証法としてモデルマウス卵巣を別のマウスに移植、6 週間の生着期間のちホストマウス骨髄を採取して疾患発症の有無を検討した。

●白血病モデル免疫抑制マウスへのヒト卵巣皮質移植系による、ヒト卵巣組織への腫瘍移行の検討

ヒト白血病モデル免疫抑制マウスに婦人科手術時に採取されるヒト卵巣組織を移植する。成着を持った後、移植ヒト卵巣組織を摘出して腫瘍細胞の存在とその分布を検討した。

●生殖補助技術シミュレーションによる白血球細胞混入の検討

モデルマウスの卵子、卵丘塊を用いて体外受精のシミュレーション、ICSIのシミュレーションを施行した。受精卵は別のホストマウスに移植されマウス骨髄での腫瘍細胞の有無を検討した。

4. 研究成果

●各血液悪性疾患のヒト白血球細胞モデル免疫抑制マウスの作成

ヒト白血球細胞の GFP 導入効率は極めて低値であった。導入を確認できた白血球細胞株を幼弱免疫抑制マウスに投与したが、その生着率も細胞群ごとに差異がみとめられた。

●モデルマウス体内での白血球細胞の挙動の検討

組織学的な検証と他免疫抑制マウスへの移植による生存性の検証によりモデルマウス卵巣へのヒト白血球細胞の混入を検討した。採取卵巣の step serial section を作成の上、移植前標識した GFP をターゲットとした蛍光励起下観察、免疫組織化学法、ISH 法にて移植腫瘍細胞の存在の同定をこころみた。しかし、細胞群ごとに生着率が大きく異なり現在までに卵巣にどの程度リスク(確率)で白血球細胞が混入するかのデータに関しては明確な結論は得られてはいない。生存性の検証法としてモデルマウス卵巣を別の免疫抑制マウスに移植、6 週間の生着期間のちホストマウス骨髄を採取して疾患発症の有無を検討しているがこの件に関しても、いまだ明らかな知見は得られていないが疾患が発症した個体は存在しなかった。

●白血球細胞モデル免疫抑制マウスへのヒト卵巣皮質移植系による、ヒト卵巣組織への腫瘍移行の検討

モデルマウスに移植されたヒト卵巣組織を 6 週間ののち摘出し免疫組織化学法にて腫瘍細胞の存在を確認した。マウス体内に生着がみとめられたヒト卵巣組織内に腫瘍細胞が認められた例は存在しなかった。

●生殖補助技術シミュレーションによる白血球細胞混入の検討

モデルマウスの卵子、卵丘塊を用いて体外

受精のシミュレーション、ICSI のシミュレーションを施行した。受精卵は別のホストマウスに移植され 6 週間ののちマウス骨髄での腫瘍細胞の有無を検討したが明らかな腫瘍細胞はみとめられなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

1)Sato N, Terada Y : Temporal expression of functional low density lipoprotein receptors and catalytic enzymes in steroid hormone synthesis of mouse preimplantation embryos. Akita J Med. 39:1-12(2012)

2)Makino K, Kawamura K, Sato W, Kawamura N, Fujimoto T, Terada Y : Inhibition of Uterine Sarcoma Cell Growth through Suppression of Endogenous Tyrosine Kinase B Signaling. PLoS One. 7:e41049 (2012)

3)Kawamura K, Kawamura N, Kawagoe Y, Kumagai J, Fujimoto T, Terada Y : Suppression of hydatidiform molar growth by inhibiting endogenous brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling. Endocrinology. 153:3972-3981 (2012)

4)Ogawa M, Sato A, Mori K, Nagao D, Kamada K, Sato M, Terada Y : Clinical Significance of amniotic fluid glucose concentration in polyhydramnios. J Matern Fetal Neonatal Med. 25:1073-1076 (2012)

5)Ogawa M, Nagao D, Mori K, Sato M, Sato A, Shimizu D, Terada Y : Elastography for differentiation of subchorionic hematoma and placenta previa. Ultrasound Obstet Gynecol. 39(1): 112-114 (2012)

6)Kubo S, Shirasawa H, Fujimoto T, Satoh N, Shimizu D, Satoh A, Nanjo H, Tanaka T, Terada Y: Post-Hysterectomy Ovarian Cancer : Histological Characteristics and a Prediction of Occurrence of Ovarian Cancer by Immunohistological Inspections for Specimens in Initial Operations. Akita J Med. 38:121-129 (2012)

7)Hayasaka S, Ugajin T, Fujii O, Nabeshima H, Utsunomiya H, Yokomizo R, Yuki H, Terada Y, Murakami T, Yaegashi N: Risk factors for recurrence and re-recurrence of ovarian endometriomas

after laparoscopic excision. *J ObstetGynaecol Res.*37:581-58 (2011)

8)Shibuya Y, Terada Y, Kumagai J, Kumazawa Y, Saito M, Hoshiai T, Yaegashi N: Management of pregnancy achieved by oocyte donation to a woman with 47,XXX and POF.*J Mama Ovs Res.*28:139-142 (2011)

9)Ogawa M,Nagao D,Mori K,Kamada K,Sato A,Terada Y: Is a pericardiocentesis need for preventing hypoplastic lung in case with massive pericardial effusion? *Prenat Diag.*31:917-918(2011)

10)Kawamura K,Cheng Y,Kawamura N,Takase S,Okada A,Kawagoe Y,Mulders S,Terada Y,Hsueh AJPre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulose cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Human Reprod.*26(11):3094-3101(2011)

11)Miura H,Ogawa M,Hirano H,Sanada H,Sato A,Obara M,Terada Y:Neutrophil elastase and interleukin-6 in amniotic fluid as indicators of chorioamnionitis and funisitis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*158:209-213(2011)

12)Nabeshima H, Nishimoto M, Utsunomiya H, Arai M, Ugajin T, Terada Y, Yaegashi N : Total laparoscopic conservative surgery for an intramural ectopic pregnancy. *Diagn TherEndosc.*2010:504062. Equip(2010)

13)Kikuchi-Arai M, Murakami T, Utsunomiya H, Akahira J, Suzuki-Kakisaka H, Terada Y, Tachibana M, Hayasaka S, Ugajin T, Yaegashi N. Establishment of long-term model throughout regular menstrual cycles in immunodeficient mice. *Am J ReprodImmunol.* 64:324-32(2010)

14)Hasegawa H, Terada Y, Ugajin T, Yaegashi N, Sato K:A novel culture system for mouse spermatid maturation which produces elongating spermatids capable of inducing calcium oscillation during fertilization and embryonic development. *J Assist Reprod Genet.* 27(9-10):565-70(2010)

15)Terada Y, Schatten G, Hasegawa H, Yaegashi N.Essential roles of the sperm centrosome in human fertilization: developing the therapy for fertilization failure due to sperm centrosomal dysfunction.*Tohoku J Exp Med.* 220(4):247-58. Review(2010)

16)Terada Y, Ugajin T, Arai-Kikuchi M, Hayasaka S, Nabeshima H, Yaegashi N: Laparoscopic removal of the rudimental uterus followed by colpoepoiesis in a Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome patient with a functional endometrium and peritoneal endometriosis. *J Gynecol Surg.*26: 201-3(2010)

17)UgajinT, Terada Y, Hasegawa H, Velayo CL, Nabeshima H, Yaegashi N: Aberrant behavior of mouse embryo development after blastomere biopsy as observed through time-lapse cinematography. *Fertil Steril.*93:2723-8(2010)

18)UgajinT, Terada Y, Hasegawa H, Nabeshima H, Suzuki K, Yaegashi N: The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function. *J Assist Reprod Genetics.*27(2-3): 75-81(2010)

19)Hayasaka S, Murakami T,Nabeshima H, Terada Y, Yaegashi N: Laparoscopic management of recurrent rupture of an adnexal mass in the second trimester of pregnancy: A case report *Asian Journal of Endoscopic Surgery.*3: 201-3(2010).

〔学会発表〕(計9件)

1)河村和弘, 白澤弘光, 熊澤由紀代, 熊谷仁, 寺田幸弘 (2012) 卵子成熟抑制因子(oocyte maturation inhibitor ; OMI)の同定とその機能解析: C-type natriuretic peptide (CNP)による卵子成熟抑制と2次卵胞発育促進作用. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会, 4月, 神戸

2)寺田幸弘 (2012) 女性の身体加齢と卵子の構造変化. (招請講演) 第15回日本IVF学会学術講演会, 9月, 大阪

3)寺田幸弘 (2012) なくなっていくのちのながれを紡ぐ生殖医療の現在と将来. (特別講演) 第25回福島県母性衛生学会, 6月, 福島

4)寺田幸弘(2012)生殖細胞の形成と融合(受精)における形態変化。(教育講演)日本臨床細胞学会秋田県支部総会, 6月, 秋田
5)寺田幸弘(2011)細胞骨格の受精へのかかわり。(シンポジウム)第52回日本哺乳動物卵子学会, 5月, 栃木

6)寺田幸弘(2011)なくならないいのちのながれにおける細胞骨格の形成と崩壊。(教育講演)第56回日本生殖医学会学術講演会・総会, 12月, 横浜

7)寺田幸弘(2011)受精における精子中心体機能に関する私の研究のすべて。(招待講演)第144回日本生殖医学会関東地方部会, 7月, 東京

8)寺田幸弘(2010)なくならない命の流れ: 生殖医療(不妊症治療から命の誕生まで)の喜び。(特別講演)日本産科婦人科学会岩手地方部会集談会・日本産科婦人科学会公開講座, 10月, 岩手

9)寺田幸弘(2010) post ICSI event sin fertilization における配偶子の質. 第14回RMB(生殖医学・生物学)研究会シンポジウム, 11月, 徳島

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)
○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺田幸弘(TERADA YUKIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10260431

(2)研究分担者

張替秀郎(HARIKAE HIDEROU)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 50302146

熊谷仁(KUMAGAI JIN)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号: 60333936