

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659722

研究課題名(和文) 異所性妊娠モデル動物を用いた新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular targeting therapies for ectopic pregnancy using its model mice

研究代表者

河村 和弘 (Kawamura, Kazuhiro)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10344756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：異所性妊娠の薬物療法としてメトトレキサート(methotrexate, MTX)が広く用いられてきた。しかし、より効果が高く副作用の少ない薬物療法の開発が期待されている。本研究では、DNA microarrayを行って絨毛発育に重要な細胞内シグナルを探索し、絨毛組織検査および異所性妊娠モデル動物を用いてその異所性妊娠の薬物療法の分子標的としての有用性を検討した。その結果、3つの細胞内シグナルが同定できた。

研究成果の概要(英文)：Although methotrexate has been widely used for medical treatment of ectopic pregnancy, the development of more effective medical treatment with less adverse effects is anticipated. In this study, we performed DNA microarray analyses to find cell signaling pathway important for growth of villous tissues. Using villous tissue explants and an animal model for ectopic pregnancy, we evaluated their potential as candidates for molecular targeting therapy. We could find 3 targets with high potentials for development of novel medical therapies for ectopic pregnancy.

研究分野：産婦人科

キーワード：異所性妊娠 モデル動物 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

異所性妊娠の薬物療法としてメトトレキサート (methotrexate, MTX) が広く用いられてきた。しかし、MTX は進行症例には効果が低く、口内炎、悪心嘔吐など様々な副作用を示すため、より効果が高く副作用の少ない薬物療法の開発が期待されている。

新たな薬物療法の候補となる物質の生体内での有効性、副作用の有無の評価にはモデル動物が必須であるが、異所性妊娠をひきおこす実験動物は存在しない。ヒトの絨毛細胞は他の動物と比較して組織への浸潤能が非常に高いため異所性妊娠をひきおこすが、実験動物には異所性妊娠は認められない。これまで、絨毛癌細胞株や不死化絨毛細胞株などを用いて絨毛細胞の発育・生存に関する研究はなされてきた。しかし、異所性妊娠では絨毛細胞は「組織」を形成し、間質と分化した3種類の絨毛細胞 (syncytiotrophoblast, cytotrophoblast, extravillous trophoblast) からなるため、細胞株を用いた研究では薬物の効果を正確に評価できないと考えられる。また、薬物投与による副作用の発生の有無は、モデル動物を使用して治療に有効な薬物投与量と投与経路が確定されなければ検証することが困難である。

申請者は、人工妊娠中絶時の子宮内容物を患者の同意と倫理委員会の承認のもと採取し、無菌的に顕微鏡下で絨毛組織を単離して小断片化し、重症免疫不全マウスの腎臓被膜下に移植することで異所性妊娠モデル動物の作出に初めて成功した (Kawamura et al. *Endocrinology*, 2011)。移植したヒト絨毛組織はマウス腎臓に正着し、3種類の絨毛細胞からなる組織構造を保ったまま増殖を続けた。本研究計画ではこのモデル動物を用いることで、新たな薬物療法の候補となる物質の生体内での有効性、副作用発生の有無を正確に評価することが可能と考える。

既存の MTX による薬物療法は、MTX の葉酸拮抗剤としての DNA 合成阻害作用に依存しており、絨毛細胞特異的なものではなく、口内炎、悪心嘔吐など様々な副作用が生じる。絨毛細胞発育に重要な細胞シグナルを同定し抑制標的とすることで、絨毛細胞に特異的な副作用の少ない新たな薬物療法の開発が可能と考える。

候補物質の探索には、絨毛細胞発育に重要かつ特異的な細胞シグナルのマイクロアレイを用いた網羅的同定が有用である。申請者はこの方法に習熟しており、これまで卵子成熟を促進する多くの新規因子の同定を行ってきた (Kawamura et al. *PNAS*, 2005; *Dev Biol*, 2008; *Dev Biol*, 2009, *J Mamm Ova Res*, 2011)。また、マイクロアレイデータ解析のためのツールを独自に開発し、インタ

ーネット上で公開している。

異所性妊娠は全妊娠の1%に認められ、我が国における患者は年間1万人に上る。これまで有用なモデル動物がなく、新たな薬物療法の開発は進んでいなかった。本研究は申請者が確立したモデル動物と分子生物学的手法により、有効かつ副作用の少ない分子標的治療の開発に取り組む。

2. 研究の目的

本研究は絨毛細胞発育に必要な細胞シグナルを網羅的に同定し、その効果的な抑制方法を探す。さらに、細胞シグナル抑制による絨毛細胞発育阻害効果を、モデル動物を用いて生体内で判定する。研究期間内には以下のことを明らかにする。

(1) DNA マイクロアレイを用いて絨毛細胞の発育に重要な細胞シグナル(リガンド/受容体)の候補を網羅的に同定する。

(2) 絨毛組織における細胞シグナル(リガンド/受容体)の局在を明らかにし、候補因子を絞り込む。

(3) 絨毛組織培養による候補因子の一次スクリーニングの後、その細胞シグナルによる絨毛発育制御機構を解明し、生体への投与が可能なシグナル抑制方法を探る。

(4) 異所性妊娠モデル動物用いて、シグナル抑制効果の判定を行う。

3. 研究の方法

(1) 絨毛細胞の発育に重要な細胞シグナル(リガンド/受容体)の候補の網羅的同定

本研究では、DNA マイクロアレイを応用して絨毛細胞の発育に重要な細胞シグナルの候補となるリガンド/受容体を網羅的に同定する。

① ヒト絨毛組織検体の採取

患者の同意と倫理委員会の承認のもと、人工妊娠中絶患者から得られた子宮内容物から実体顕微鏡下で絨毛組織を単離する。申請者の所属する大学病院では人工妊娠中絶患者が少ないため、当大学の関連病院にも検体の採取の協力を仰ぐ。用いる絨毛組織の妊娠週数による絨毛細胞発育シグナルの差異を考慮する必要がある。そこで、異所性妊娠の診断が可能で、外科的治療が必要となる卵管破裂がおこる前の絨毛として、妊娠 6, 7, 8 週の各妊娠週数の絨毛組織を準備する。これらの週数の絨毛組織に共通な細胞シグナルを見出すことで、どの妊娠週数の異所性妊娠においても有効な薬物療法が開発できると考える。

②DNA マイクロアレイ比較解析

絨毛細胞発育に重要なリガンド/受容体は、他の組織・臓器に比べ絨毛組織での発現が高いものが候補となると考え、DNA マイクロアレイによる比較解析を行うことで候補因子を探索する。申請者らは既に他組織・臓器(脳、肺、肝臓、腎臓、子宮内膜、子宮間質)でのDNA マイクロアレイを行い、そのデータを独自に開発した解析ツールに保存している。ヒト絨毛組織のDNA マイクロアレイを行う際には、患者の個人差をできる限り排除するため、妊娠6, 7, 8週の各妊娠週数の絨毛組織をそれぞれ5人の患者から必要量集めてプールした上でtRNAの回収を行い、DNA マイクロアレイに供する。

③マイクロアレイデータマイニングによる絨毛細胞発育に重要なリガンド/受容体の網羅的同定

絨毛組織のDNA マイクロアレイにより得られたデータを他の組織・臓器の発現データと比較して候補となるリガンド/受容体を見出す。データ解析には申請者らが開発し、インターネット上で公開しているツールを用いる

(http://bdi.stanford.edu/EDI/init/init_A.asp)。これらの手法により絨毛細胞発育に重要なリガンド/受容体の候補が網羅的に同定できる。

(2)絨毛組織におけるリガンド/受容体の局在

3種類の絨毛細胞のうち、細胞増殖に関与するのはcytotrophoblastとextravillous trophoblastであることから、候補の受容体がこれらの細胞に局在しているかどうかで、候補の絞り込みを行う。

①絨毛組織におけるリガンド/受容体の免疫染色

候補となったリガンド/受容体の絨毛組織での局在を明らかにするため、特異的抗体を用いた免疫染色を行う。

②絨毛組織におけるリガンド/受容体の in situ hybridization

良い抗体が手に入らず免疫染色による解析が困難なものに関しては、in situ hybridizationにより局在を明らかにする。

(3)候補因子による絨毛発育制御機構の解明とシグナル抑制方法の探索

絨毛組織における受容体の局在を手がかりに更に絞り込んだ候補に対して絨毛発育制御機構を解明し、その細胞シグナルを抑制する方法を探索する。その際には生体に投与可能な方法を選択する。

①絨毛細胞発育に必要な細胞シグナルの一

次スクリーニング

受容体の局在により絞り込んだ候補に対して詳細な絨毛発育制御機構の解析を行う前に、候補因子が実際に絨毛細胞発育に重要であるかどうかを確認するため、申請者が確立した絨毛組織培養を用いた一次スクリーニングを行う

(Kawamura et al. Endocrinology, 2011)。絨毛発育に必須なリガンド/受容体による細胞シグナルを抑制するため、低分子化合物、リガンドもしくは受容体の中和抗体、合成した受容体の細胞外ドメインなどを絨毛組織培養下で添加し、その絨毛発育抑制効果を、絨毛細胞 outgrowth、組織グルコース消費、細胞増殖マーカー、アポトーシスマーカー、の各定量により判定する。マイクロアレイをベースとする網羅的検索では非常に多数の候補が同定されることが推測されるが、この一次スクリーニングにより最終候補の絞り込みが可能となると考える。

②候補因子による絨毛発育制御機構の解明

一次スクリーニング後に得られた最終候補による絨毛発育制御機構を明らかにする。受容体の下流域の細胞増殖、生存に関与する細胞シグナルについて、他の細胞で明らかにされているシグナル経路を参考に、培養した絨毛組織を用いたWestern blotによる酵素リン酸化解析やCaイオン、cAMP、cGMP定量などを行い、重要なシグナルを同定する。

③候補因子の細胞シグナル抑制方法の探索

最終候補のリガンド/受容体とその細胞シグナルが明らかとなった後、細胞シグナル抑制方法を探索する。抑制に際しては生体に投与可能な物質を使用する必要があることから、受容体の細胞シグナルを抑制する小分子化合物、リガンドおよび受容体の中和抗体もしくはsiRNAの利用が考えられる。既存のこれらの抑制物質の有無を検索し、存在しない場合には比較的作製が容易で生体への投与の実績のあるリガンドまたは受容体の中和抗体の作製を行う。

(4)異所性妊娠モデル動物用いたシグナル抑制効果の判定

本研究計画では異所性妊娠モデル動物を用いて、生体内での最終候補の細胞シグナル抑制効果と副作用発生の有無を評価する。

①異所性妊娠モデル動物の作製

シグナル抑制効果の評価解析ツールとしての異所性妊娠モデル動物を申請者が確立した方法により作製する。重症免疫不全マウスの腎臓を麻酔下に小切開を施して体外に牽引しておき、人工妊娠中絶患者より得られた一定量の絨毛組織小断片を腎被膜下に移植し閉腹する。

②シグナル抑制効果の判定

異所性妊娠動物にシグナル抑制物質を投与し、その効果と副作用発生の有無を判定する。投与終了後にマウスを解剖して組織を摘出し、絨毛組織の免疫組織学的検索、細胞増殖マーカー、アポトーシスマーカー、hCG-βの定量により効果判定を行う。また、マウス体重測定、各臓器の組織学的検査、行動異常の有無、妊孕性・催奇形性の有無、について次世代の動物まで調べ副作用の発生を検索する。

4. 研究成果

同意の得られた妊娠 6, 7, 8 週の人工妊娠中絶患者 (各 n=5) からそれぞれ子宮内容物を採取し、実体顕微鏡下で機械的に絨毛組織を単離した。プールした検体から tRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った (Agilent Whole Hume Genome DNA microarray)。絨毛細胞発育に重要なリガンド/受容体は、他の組織・臓器に比べ絨毛組織での発現が高いものが候補となり、上記の週数の絨毛組織に共通な細胞シグナルを見出すことで、どの妊娠週数の異所性妊娠においても有効な薬物療法が開発できると考え、DNA マイクロアレイの解析結果をこれまで我々が他組織・臓器 (脳、肺、肝臓、腎臓、子宮内膜、子宮間質) で得たデータと比較解析して絨毛発育に重要なリガンド/受容体の候補因子を探索した。

次に異所性絨毛組織の細胞増殖に関与する cytotrophoblast と extravillous trophoblast に候補因子の受容体が局在しているかを確認し、候補の絞り込みを行った。特異的抗体を用いた免疫染色にてリガンド/受容体の cytotrophoblast と extravillous trophoblast の発現が確認できたものは 12 候補であった。現在、複数の候補で適切な抗体が無く、in situ hybridization により局在を確認している。

12 の候補因子に対して実際に絨毛細胞発育に重要であるかどうかを確認するため、申請者が確立した絨毛組織培養を用いた一次スクリーニングを行った。それぞれの候補に対し低分子化合物、リガンドもしくは受容体の中和抗体、合成した受容体の細胞外ドメインのいずれかを用いて絨毛組織培養を行い、その絨毛発育抑制効果を、絨毛細胞 outgrowth、組織グルコース消費、細胞増殖マーカー、アポトーシスマーカー、の各定量により判定した。

この一次スクリーニングにより最終候補を絞り込み、3つの候補因子を得た。これらの候補因子の受容体以降の細胞増殖、生存に関与する細胞内シグナルの解析を in silico アッセイにて解析し、その関与について特異的抑制剤を用いた絨毛組織培養にて確認した。

最終候補のリガンド/受容体とその細胞シグナルを明らかにし、次に細胞シグナル抑制方法を検討した。抑制に際しては生体に投与可能な物質を考慮し、受容体の細胞シグナルを抑制する小分子化合物、リガンドおよび受容体の中和抗体、siRNA を用いた。

3 つの候補のうち、brain derived neurotrophic factor/Neurotrophine tyrosine kinase receptor 2 はリガンドが分化した細胞である syncytiotrophoblast, cytotrophoblast で産生され、受容体は cytotrophoblast と extravillous trophoblast に発現していた。絨毛組織培養にて細胞シグナルを抑制する小分子化合物 (K252a) および合成した受容体の細胞外ドメインは cytotrophoblast と extravillous trophoblast の分化、増殖、生存を抑制した。残りの 2 つの候補 (特許出願準備中) に関しても、そのシグナル抑制により同様の cytotrophoblast と extravillous trophoblast の分化、増殖、生存を抑制効果が認められた。

重症免疫不全マウスの腎被膜下に人工妊娠中絶患者より得られた一定量の絨毛組織小断片を移植して作製した異所性妊娠モデル動物にシグナル抑制物質を投与し、投与終了後にマウスを解剖して組織を摘出し、絨毛組織の免疫組織学的検索、細胞増殖マーカー、アポトーシスマーカー、hCG-βの定量を行った。K252a による brain derived neurotrophic factor/Neurotrophine tyrosine kinase receptor 2 シグナルの抑制は cytotrophoblast の分化と増殖を抑制することで移植した絨毛組織の発育を抑制した。その効果は陽性コントロールとして用いた既存の異所性妊娠の薬物療法である MTX より顕著であった。残りの 2 つの候補も異所性妊娠モデル動物においてシグナル抑制を行ったが、絨毛発育抑制効果を認めたものの、その効果は MTX より劣った。

シグナル抑制剤投与後のマウス体重測定では特に減少を認めなかった。今後は、各臓器の組織学的検査、行動異常の有無、妊孕性・催奇形性の有無、について次世代の動物まで慎重に調べ副作用の発生を検索し、臨床応用を目指した研究を行って行く予定である。

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)

研究者番号:

[雑誌論文] (計 13 件)

①Kakogawa J, Nako T, Kawamura K,

Nakamura S, Mochiduki A, Kanayama N,

Tanaka M. Successful pregnancy after

sacrectomy combined with chemotherapy and radiation for Ewing's sarcoma case report and literature review. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*,10,1016,2014,DOI:10.1016/j.jpaga.2014.06.009,査読あり

- ②Takae S, Kawamura K, Sato Y, Nishijima C, Yoshioka N, Sugishita Y, Horage Y, Tanaka M, Ishizuka B, Suzuki N. Analysis of late-onset ovarian insufficiency after ovarian surgery: retrospective study with 75 patients of post-surgical ovarian insufficiency, *PloS One*,23,98174,2014,DOI:10.1371/journal.pone.0098174.eCollection2014,査読あり
- ③Nishijima C, Kawamura K, Okamoto N, Kawamura N, Ishizuka B, Tanaka M, Suzuki N. Regulation of preimplantation embryo development in mice by FMS-like tyrosine kinase ligand. *Journal of Mammalian Ova Research*,31,45-51,2014,査読無し
- ④Nishijima C, Kawamura K, Okamoto N, Sato Y, Kawamura N, Ishizuka B, Tanaka M, Suzuki N. Regulation of preimplantation embryo development in mice by FMS-like tyrosine kinase ligand. *J Mammal Ova Res*,31,45-51,2013,査読あり
- ⑤Kawamura K, Kawamura N, Okamoto N, Manabe M. Suppression of choriocarcinoma invasion and metastasis following blockade of BDNF/Trk B signaling. *Cancer Med*,2,849-861,2013,DOI:10.1002/cam4,査読あり
- ⑥Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh AJW. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*,110,17474-17479,2013,DOI:10.1073/pnas.1312830110,査読あり
- ⑦Okamoto N, Kawamura K, Kawamura N, Nishijima C, Ishizuka B, Suzuki N, Hirata K. Effects of maternal aging on expression of sirtuin genes in ovulated oocyte and cumulus cells. *J Mamm Ova Res*,30,24-29,2013,査読あり
- ⑧Cheng Y, Kawamura K, Takae S, Deguchi M, Yang Q, Kuo C, Hsueh AJW. Oocyte-derived R-spondin2 promotes ovarian follicle development. *FASEB J*,27,2175-2184,2013,DOI:10.1096/fj.12-223412,査読あり
- ⑨Kawamura K, Chen Y, Shu Y, Cheng Y, Qiao J, Behr B, Pera RA, Hsueh AJ. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth in vitro using autocrine/paracrine growth factors. *PloS One*,7,e49328,2012,DOI:10.1371/journal.pone.0

049328,査読あり

- ⑩Makino 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,DOI:10.1371/journal.pone.0041049,査読あり
- ⑪Kawamura 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, DOI:10.1210/en.2012-1167,査読あり
- ⑫Cheng Y, Kawamura K, Deguchi M, Takae S, Mulders SM, Hsueh AJ. Intraovarian thrombin and activated protein C signaling system regulates steroidogenesis during the periovulatory period. *Mol Endocrinol*, 26, 331-340, 2012, DOI: 10.1210/me.2011-1187, 査読あり
- ⑬Sato Y, Cheng Y, Kawamura K, Takae S, Hsueh AJ. C-type natriuretic peptide stimulates ovarian follicle development. *Mol Endocrinol*,26,1158-166,2012,DOI: 10.1210/me.2012-1027,査読あり

[学会発表] (計 14 件)

- ①Kawamura K, Development of new infertility treatment based on Akt stimulation and Hippo suppression in ovarian follicles, Young Scientific meeting for Sexual Differentiation, 2014年12月09日~2014年12月10日、静岡/静岡
- ②Kawamura K, Highlights in embryology & hot topics and predictors of ART outcomes, Global Fertility Academy, 2014年12月04日~2014年12月05日、東京
- ③Kawamura K, New infertility treatments of patients with primary ovarian insufficiency (POI), Ovarian Follicles from Basic Science to Clinical Application, 2014年11月9日、スタンフォード大学(アメリカ・Palo Alto)
- ④Kawamura K, Ovarian Grafting Video, Lunch Workshop, 2014年09月10日~2014年09月12日、グレースホテル(オーストラリア・シドニー)
- ⑤Kawamura K, In vitro activation as a tool for treating infertility related to premature ovarian failure, The 7th World Congress on Mild Approaches in Assisted Reproduction, 2014年09月10日~2014年09月12日、グレースホテル(オーストラリア・シドニー)
- ⑥Kawamura K, Successful pregnancies and a birth after in vitro activation (IVA) of ovarian follicles in patients with primary ovarian insufficiency, The 66th Annual meeting of the Korean Society for Reproductive Medicine, 2014年05月31日、

ソウル大学病院(韓国・ソウル)

- ⑦ Kazuhiro Kawamura, In vitro activation(IVA) as a Novel Infertility Treatment for Primary Ovarian Insufficiency, 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、2013 年 05 月 10 日～05 月 12 日、北海道・札幌
- ⑧ 河村和弘, 卵胞活性化技術(IVA : in vitro activation)を用いた早発卵巣機能不全患者の新たな不妊治療法、第 31 回日本受精着床学会学術講演会、2013 年 08 月 08 日～2013 年 08 月 09 日、大分・別府
- ⑨ 河村和弘, 婦人科癌治療と卵巣凍結保存による妊孕性温存、第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2013 年 07 月 19 日～2013 年 07 月 21 日、東京・ホテルグランパシフィック LE DAIBA
- ⑩ 河村和弘, 卵胞活性化技術のトランスレーショナルリサーチ：早発卵巣機能不全に対する新たな不妊治療法の確率、New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders, 2013 年 07 月 13 日、東京
- ⑪ 河村和弘, 西島千絵, 吉岡信人, 杉下陽堂, 高江正道, 洞下由紀, 石山めぐみ, 石塚文平, 田中守, 鈴木直, brain-derived neurotrophic factor(BDNF)/tyrosine kinase B(TrkB) signaling による胞状奇胎の発育制御とその分子機構の解明、第 17 回生殖内分泌学会、2012 年 12 月 08 日、東京・東京ステーションコンファレンス
- ⑫ 河村和弘, 早発卵巣不全患者の卵子の再生：休眠原始卵胞の活性化による成熟卵子の産出、第 57 回日本生殖医学会学術講演会・総会、2012 年 11 月 08 日、長崎・長崎ブリックホール
- ⑬ 河村和弘, 最新の不妊・不育症の治療について、第 490 回横浜市産婦人科医会月例研究会、2012 年 10 月 25 日、神奈川・横浜
- ⑭ 河村和弘, 早発卵巣不全の新たな不妊治療法の開発、第 17 回勝川 ART 研究会、2012 年 10 月 13 日、愛知
〔図書〕(計 6 件)
- ① Hsueh AJW, Kawamura K, Follicle and oocyte development dynamics. In Biology and pathology of the oocyte. Cambridge University Press.62-72,2013
- ② 河村和弘, 第三章 体外受精とエイジングへの対応 IVF のための排卵誘発法の工夫. 医歯薬出版株式会社, 166-170, 2013
- ③ 高江正道, 河村和弘, 石塚文平. 卵巣の予備能, がん・生殖医療 妊孕性温存の診療(卵巣組織凍結), 医歯薬出版株式会社, 22-33, 2013
- ④ 橋本周, 鈴木直, 河村和弘, 杉下陽堂, 森本義晴. 卵巣組織凍結, がん・生殖医療 妊孕性温存の診療, 医歯薬出版株式会社, 166-175, 2013
- ⑤ 高江正道, 西島千絵, 吉岡伸人, 杉下陽堂, 洞下由紀, 石山めぐみ, 河村和弘, 鈴木直. ASCO2013 最新トピックス-妊孕性温存に関するガイドライン概要, 医歯薬出版株式会社, 275-281, 2013
- ⑥ 河村和弘, IVA 卵巣組織凍結・移植 新しい妊孕性温存療法の実践, 医歯薬出版株式会社, 122-128, 2013

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 和弘 (KAWAMURA, KAZUHIRO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10344756

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：