

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462557

研究課題名(和文) 若年性癌患者の妊孕性温存のための基礎検討 - 血管新生促進基材を用いた卵巣皮下移植 -

研究課題名(英文) Fertility preservation for girls and young women with cancer: Induction of vascularization into heterotopic ovarian tissue transplantation in a xenograft model

研究代表者

中村 仁美 (NAKAMURA, HITOMI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80467571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児期から若年期にがん罹患した患者のQOLの向上のため、妊孕性温存の選択肢について検討すべきという考え方が浸透しつつある。小児-若年がん患者に対する凍結融解卵巣移植による妊孕性温存は、未だ研究的レベルであるという認識であるものの、一方で他に選択肢がないために将来の技術の進歩を期待して保存されている症例も多くある。

凍結融解した卵巣の移植により生児を獲得するまでになかなか至らない原因の1つとして移植卵巣片に対して血流が充分でないためではないかと仮定し、移植卵巣片に積極的に血管新生を促進する戦略で研究を行った。

研究成果の概要(英文)：To improve the quality of life of young cancer survivors, there has recently been more discussion about the fertility preservation option. Ovarian tissue preservation is one option for fertility preservation for young cancer patients, but for some of them it is the only option. Worldwide there are only about 20 babies reported as being born using cryopreserved ovarian tissues.

We hypothesized that the low efficiency of this procedure might be caused by lack of blood supply for the transplanted ovarian tissues. We tried to develop a new controlled release sheet which can induce the formation of new vessels to supply enough blood to the transplanted ovarian tissues.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

- (1) 寛解した小児がんおよび若年性がんの経験者に早発閉経のリスクが高い事が知られている。悪性腫瘍に対する、手術療法、放射線療法、化学治療は長足の進歩を遂げ、今や小児がんや若年性がんの経験者の長期生存は珍しい事ではない。しかしこれら化学療法や放射線療法により早発閉経や将来の妊孕性を失うという問題が生じる。
- (2) 心理学研究において、寛解した若年性がんの経験者は、癌治療の開始から平均して 10 年後に子供がいない事にたいして後悔と怒りを感じるという事が報告されている。近年、多くの先進国において、若年性がんの QOL の向上のために妊孕性温存の選択肢について説明するべきとの考え方が浸透しつつある。
- (3) 小児および未婚女性がん患者の妊孕性温存の選択肢として、治療における (i) 未受精卵子の凍結保存もしくは (ii) 卵巣の一部を凍結保存する事がある。しかしながら、初経発来以前の女兒においては (ii) 卵巣組織片の凍結保存の選択肢しかない。
- (4) 技術的には、現状においては第 1 減数分裂完了以降の卵子でない凍結保存および体外成熟が困難である。1986-2006 年までの研究報告において、1 つの成熟卵子 (metaphase II) を得るために約 100 個の原始卵胞が必要である。さらに実際に卵子を採取するために卵巣刺激をする必要があり、卵子の採取までにある程度、時間がかかる事から、(ii) 卵巣組織片の凍結保存の選択肢しかない場合もある。
- (5) 現在までに、若年性女性の悪性腫瘍の患者に対して、治療前に卵巣組織片の凍結保存による妊孕性温存により、寛解後に生児を得た症例は約 23 例のみである。小児期のがん治療前に妊孕性温存目的に凍結保存した卵巣組織片を用いた妊娠症例は未だ報告がない。現状として凍結保存した卵巣組織片を融解、自家正所 (卵巣が元有った位置) 移植をする事により、月経周期の回復を認めるものの、成熟卵胞を得るまでになかなか至らない。
- (6) 動物、特にマウスでは凍結融解した卵巣の卵巣嚢への正所移植により、安定して産仔が得られているのに対して、ヒトでなかなか同様の結果が得られない。
- (7) この原因の一つにマウスとヒトにおいて卵子の成熟期間の違いが考えられる。そして卵成熟には十分な血流が必要で

あると考えられている。この事から月経周期の回復を認めるものの成熟卵胞を得られない原因のひとつとして移植卵巣片に対して十分な血流がないためではないか? と考えた。

- (8) 凍結融解し、移植しようとする卵巣組織片に原疾患にかかわるがん細胞が混入しているリスクについて常に考慮する必要がある。そのため、卵巣組織片への転移リスクが高いがんでは免疫不全動物に移植、もしくは ex-vivo で卵胞発育を促す試みが検討されてきたが、未だ実験レベルである。
- (9) 免疫不全マウスの皮下、腹膜、腎臓被膜下などへヒト卵巣組織片の移植が試みられており、特に腎臓被膜下においては移植片への血管新生もよく、large antral stage までの成熟が報告されている。しかしながら、成熟卵子が得られた報告はまだない。
- (10) 卵巣組織片へのがん細胞の混入のリスクが低い場合でも、自家正所移植をしたところで、成熟卵胞を採卵して体外受精-胚移植術 (IVF-ET) の施行が必要であり、成熟した卵胞を確実に採卵する事を考慮する必要がある。通常の IVF-ET においても、卵巣の癒着などにより、経膈超音波下に穿刺が不可能な事もある。そこで、(a) 貴重な成熟卵胞を確実に採卵し回収する事、(b) 移植片からの癌の再発リスクを考慮し、ヒトもしくは免疫不全動物の皮下に移植を行い、ヒトであれば治療後に移植片を摘出する戦略を考えた。

2. 研究の目的

- (1) これまでの正所移植も皮下を含む異所移植においても、結果的に成熟卵子がなかなか得られない原因として、移植片に十分な血流が得られていない事が考えられる。そこで、移植片の血流改善、組織生着に十分な血管新生を積極的に促す戦略を考えた。
- (2) 本研究では、血管新生を積極的に促すための、生体分解性物質でシートを作製し、物質 X を徐放する事ができるシートにした。これを凍結融解した卵巣組織片とともに皮下に移植、ここから成熟卵子を回収し、IVF-ET を施行する治療戦略の下基礎研究を行う事を本研究の目的とした。
- (3) 本研究では、血管新生を積極的に促すための、物質 X を徐放する生体分解性物質で作製されたシートの作製、至適化についてマウスを用いた基礎検討を行う事を目的とした。

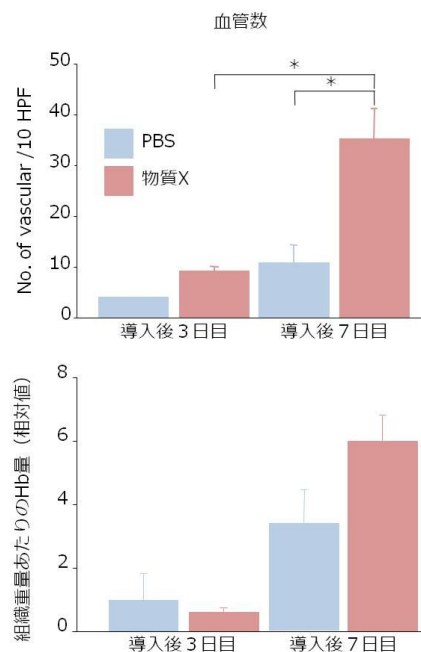
3. 研究の方法

- (1) 物質 X を徐放する生体分解性物質で作製されたシートの作製：
シートそのものの分解性能を検討し、その後、物質 X を徐放する速度と物質 X の放出量について検討を行い、最適化を行った。
- (2) マウスを用いた同種移植実験系における徐放シートの最適化：
生殖年齢のマウスは深麻酔下に開腹、卵巢を摘出し、その後閉腹する。摘出した卵巢は細切、凍結保存した。これを融解し、深麻酔下に、卵巢摘出したマウスに物質 X を徐放する生体分解性物質で作製されたシートと共に移植した。移植卵巢の評価として以下(i)-(ii)の評価を行った。
 - (i) 移植卵巢片の血流の評価：
深麻酔下に ICG をマウス尾静脈より静脈投与し、870nm の近赤外線励起光を照射、CCD カメラで近赤外蛍光を測定する事により、血流動態を検討した。
 - (ii) 移植卵巢片における卵胞発育の評価：
卵胞の発育を観察するため、過排卵処理を行った。深麻酔下に超音波診断装置を用いたモニターを行った。採血して血清中の AMH (Anti-Mullerian Hormone) を測定し、卵巢予備能の評価を行った。その後、移植卵巢片を摘出し、組織学的な検討を行った。
- (3) 免疫不全マウスを用いた異種正所移植実験系における徐放シートの最適化：
(2)で得られたデータをもとに最適化し物質 X 徐放シートを作製した。マウス摘出卵巢のマウスへの自家皮下移植の最適条件を下に、次に凍結ヒト卵巢片を、メス免疫不全 SCID マウスに物質 X 徐放シートとともに移植した。
大阪大学医学部附属病院倫理委員会の承認の下、大阪大学医学部附属病院産婦人科で婦人科良性および悪性疾患のために卵巢を摘出する閉経前の女性に、手術前に同意を求め、同意を得られた場合に摘出卵巢を提供頂いた。ヒト卵巢に関してはすべての過程において大阪大学医学部附属病院倫理委員会の規程に従った。インフォームドコンセントの上で提供された摘出ヒト卵巢は無菌的に皮質を分離し、1 x 3 mm に細切し、プログラムフリーザーを用いて凍結し、液体窒素中に凍結保存した。ヒト凍結卵巢片は急速融解し、一部を組織切片とし、形態学的に凍結融解による損傷を検討した。残りの組織をメス SCID マウスに移植した。凍結融解したヒト卵巢組織片を深麻酔下に SCID マウスにゼラチンハイドロゲルと共に移植した。移植卵巢の評価は(2)と同様に施行した。

- (4) 免疫不全マウスを用いた異種異所移植（皮下移植）実験系における徐放シートの最適化：
(3)の最適条件を下に、次に凍結ヒト卵巢片を用いて、メス免疫不全 SCID マウスに物質 X 徐放シートとともに他家皮下移植する検討を行った。ヒト凍結卵巢片は急速融解し、一部を組織切片とし、形態学的に凍結による損傷を検討した。残りの組織をメス SCID マウスに移植し(3)と同様の評価を行った。
- (5) すべての動物実験は本学倫理委員会の承認の下施行した。ヒト卵巢組織の提供と取り扱いについては本学臨床研究倫理委員会の承認を得て、倫理委員会の規程に従い施行した。

4. 研究成果

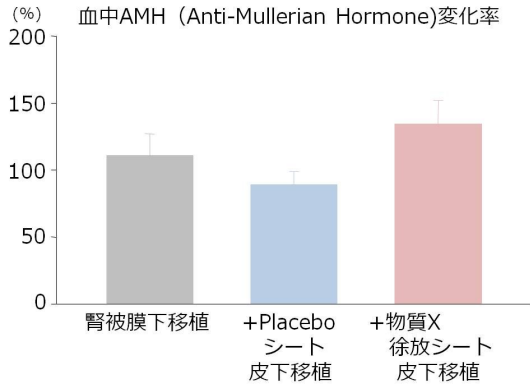
- (1) 生体分解性物質を用いて徐放シートを作製した。薬剤の徐放量および速度について、最終的にシートをマウス皮下に移植し、移植後3日目および7日目における血管新生について評価検討した。物質 X 徐放シートとコントロールとして溶媒である PBS のみを含浸したシートを同様にしてマウス皮下に移植した。移植後7日目において物質 X 徐放シートを移植した群では 10 視野あたりの血管数および組織中のヘモグロビン量の増加が認められた。



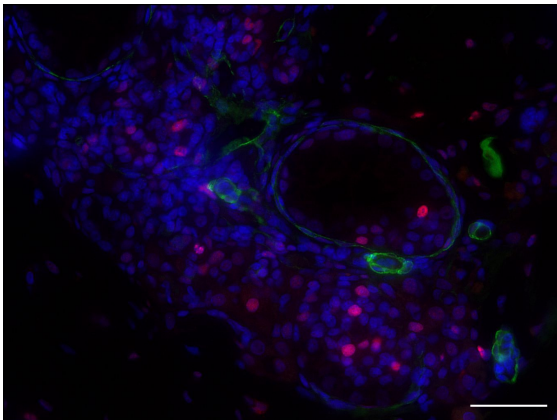
- (2) in-vivo における評価 (同種異所移植)：
(1)の条件の物質 X 徐放シートを用いて、同種異所移植を行い評価した。卵巢摘出したマウスに、凍結融解したマウス卵巢組織片を(i)コントロールとして血管新生がしやすいと考えられている腎被膜下に移植、(ii)背部皮下に PBS を含浸し

たシートと共に移植(placebo 群) (iii) 背部皮下に物質 X 徐放シートとともに移植の 3 群で比較検討を行った。

それぞれの個体において、卵巣移植後の血中 AMH レベルを 100%とした時にの卵巣移植後 2 週間後における血中 AMH レベルの相対値を検討した。

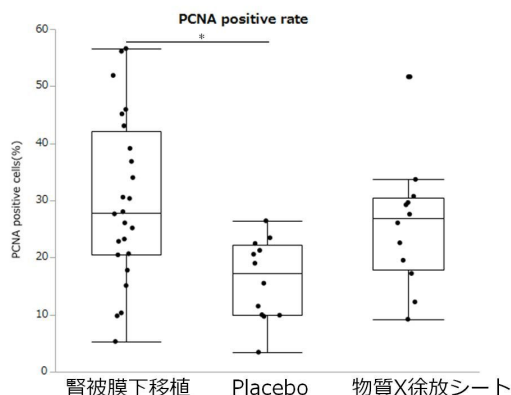


血中 AMH 値は、物質 X 徐放出シートとともに背部皮下に移植した群において、placebo 群および腎被膜下に移植した群より上昇する傾向が認められた。



背部皮下にマウス卵巣を徐放シートとともに移植し、移植 4 週間後に摘出し免疫組織学的検討を行った(上図;抗 SMS 抗体 -Alexa Fluor®488 : 緑色, 抗 PCNA 抗体 -Alexa Fluor®555: 赤色, DAPI: 青色)。

それぞれの群において、PCNA 陽性細胞の比率を検討すると、腎被膜下移植と比較して、Placebo シートとともに卵巣組織片を背部皮下に移植した群においては、



PCNA 陽性細胞が有意に低値を示したが、物質 X 徐放出シートとともに背部皮下に卵巣組織片を移植した群における移植卵巣片では PCNA 陽性細胞の割合は腎被膜下に移植した群と有意差を認めなかった。

(3) in-vitro および in-vivo の系において物質 X 徐放シートの最適化を行い、このシートを用いて、ヒト卵巣組織片を免疫不全マウス背部皮下に移植する系において物質 X 徐放シートの最適化を行い、現在最終評価を行っている。本研究で得られた結果を元に臨床研究をめざし、将来的に若年性がん患者の卵巣凍結による妊孕性温存方法におけるあらたな方法の確立をめざす。

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 26 件)

すべて査読あり

1. Miyake T, Kumasawa K, Sato N, Takiuchi T, Nakamura H, Kimura T. (2016) **Soluble VEGF receptor1 (sFLT1) induces non-apoptotic death in ovarian and colorectal cancer cells.** Sci Rep. (in press) doi: 10.1038/srep24853
2. Ito Y, Maehara K, Kaneki E, Matsuoka K, Sugahara N, Miyata T, Kamura H, Yamaguchi Y, Kono A, Nakabayashi K, Migita O, Higashimoto K, Soejima H, Okamoto A, Nakamura H, Kimura T, Taniguchi T, Hata K. (2015) **Novel Nonsense Mutation in the NLRP7 Gene Associated with Recurrent Hydatidiform Mole.** Gynecol Obstet Invest. (in press)
3. Naoi H, Kumasawa K, Nakamura H, Nishikawa A, Kimura T. (2016) **Investigation of the Prognosis of 28 Patients with Retained Placenta After Delivery.** Gynecol Obstet. (in press)
4. Kumagai M, Marui A, Tabata Y, Takeda T, Yamamoto M, Yonezawa A, Tanaka S, Yanagi S, Ito-Ihara T, Ikeda T, Murayama T, Teramukai S, Katsura T, Matsubara K, Kawakami K, Yokode M, Shimizu A, Sakata R. (2016) **Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia.** Heart Vessel. 31(5):713-21. doi: 10.1007/s00380-015-0677-x.
5. Kakigano A, Tomimatsu T, Mimura K, Kanayama T, Fujita S, Minato K, Kumasawa K, Taniguchi Y, Kanagawa T, Endo M, Ishihara T, Namba T, Mizushima T, Kimura T. (2015) **Drug repositioning for preeclampsia therapeutics by in vitro screening: phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil restores endothelial dysfunction via induction of placental growth factor.** Reprod Sci. 22:1272-1280. doi: 10.1177/1933719115574340.

6. Nakajima K, Fujita J, Matsui M, Tohyama S, Tamura N, Kanazawa H, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Sano M, Goto S, **Tabata Y**, Fukuda K. (2015) **Gelatin Hydrogel Enhances the Engraftment of Transplanted Cardiomyocytes and Anginogenesis to Ameliorate Cardiac Function after Myocardial Infarction**. PLoS One. 10(7): e0133308. doi: 10.1371/journal.pone.0133308.
 7. Tamura E, **Tabata Y**, Yamada C, Okada S, Iida M. (2015) **Autologous fat augmentation of the vocal fold with basic fibroblast growth factor: Computed tomographic assessment of fat tissue survival after augmentation**. Acta Otolaryngol. 135(11): 1163-1167. doi: 10.3109/00016489.2015.1064544.
 8. **Nakamura H**, Hosono T, Minato K, Hamasaki T, **Kumasawa K**, **Kimura T**. (2014) **Importance of optimal local uterine blood flow for implantation**. J Obstet Gynaecol Res. 40:1668-1673. doi: 10.1111/jog.12418.
 9. **Tabata Y**. (2014) **Positioning of tissue engineering in regenerative medicine**. Inflammation and Regeneration. 34(1): 1-3. doi: 10.2492/inflammregen.34.001.
 10. Hakuba N, **Tabata Y**, Hato N, Fujiwara T, Gyo K. (2014) **Gelatin hydrogel with basic fibroblast growth factor for tympanic membrane regeneration**. Otol Neurotol. 35(3): 540-544. doi: 10.1097/MAO.0000000000000200.
 11. Furuya H, **Tabata Y**, Kaneko K. (2014) **Bone regeneration for murine femur fracture by gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor with different release profiles**. Tissue Eng Part A. 20(9-10): 1531-1541. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0763.
 12. Thang NM, **Kumasawa K**, Tsutsui T, **Nakamura H**, Masaki H, Ono T, **Kimura T**. (2013) **Overexpression of endogenous TIMP-2 increases the proliferation of BeWo choriocarcinoma cells through the MAPK-signaling pathway**. Reprod Sci. 20:1184-1192. doi: 10.1177/1933719113477485.
 13. **Kimura T**, Ogita K, **Kumasawa K**, Tomimatsu T, **Tsutsui T**. (2013) **Molecular analysis of parturition via oxytocin receptor expression**. Taiwan J Obstet Gynecol. 52:165-170. doi: 10.1016/j.tjog.2013.04.004.
 14. Ishimura T, Komura M, Komura H, Otani Y, Komuro H, Sugiyama M, Terawaki K, Suzuki K, **Tabata Y**, Iwanaka T. (2013) **Slow release of basic fibroblast growth factor (b-FGF) promotes growth of tracheal cartilage**. J pediatr Surg. 48(2): 288-292. doi: 10.1016/j.jpedsurg.
1. Koizumi K, **Nakamura H**, Matsuzaki T, Kuroda S, Yasui Y, Furuya K, Miyake T, Takiuchi T, **Kumasawa K**, **Kimura T**. (2015) **Development of a new local drug delivery system for the uterus using bio-nanocapsule**. American Society for Reproductive Medicine Annual Meeting. Baltimore, U.S.A. 10.19-21/15.
 2. **Nakamura H**, Hosono T, Goa S, Yasui Y, Koizumi K, Takiuchi T, Kumasawa K, Yamamoto M, Arakawa M, Kimura T. (2015) **Vaginal electrical impedance is an effective parameter to evaluate the prospect of uterine receptivity**. IFFS/JSRM International Meeting 2015. Yokohama, Japan. 4.26-29/15.
 3. 熊澤 恵一. (2014) **簡易にできる高血圧モデルマウスの作成**. 第 29 回日本生殖免疫学会(シンポジウム) 東京. 12.11-13/14.
 4. **Kumasawa K**. (2014) **The exploration of preeclampsia model mice**. 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy. Tokyo, Japan. 9.18-20/14.
 5. Furuya K, **Kumasawa K**, Matsuzaki S, Mimura K, Taniguchi Y, Hashimoto K, Kimura T, Kanagawa T, **Kimura T**. (2013) **Analysis and obstetrical management in patients with extremely AMA**. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility. Kobe, Japan 11.13/13
 6. **Nakamura H**, Masaki H, Fujimori Y, **Kumasawa K**, **Tsutsui T**, **Kimura T**. (2013) **Modelling uterine macrophage-epithelial cell communication in vitro using peripheral blood monocytes**. 第 65 回日本産科婦人科学会. 札幌. 5.10-12/13.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 仁美 (NAKAMURA, Hitomi)
大阪大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：8 0 4 6 7 5 7 1

(2) 研究分担者

田畑泰彦 (TABATA, Yasuihiko)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：5 0 2 1 1 3 7 1

木村 正 (KIMURA, Tadashi)
大阪大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：9 0 2 4 0 8 4 5

筒井 建紀 (TSUTSUI, Tateki)
大阪大学大学院・医学系研究科・准教授
研究者番号：0 0 2 9 4 0 7 5
(平成 25 年度まで分担者として参画)

熊澤 恵一 (KUMASAWA, Keiichi)
大阪大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：9 0 4 4 4 5 4 6

(3) 研究協力者

田中絢香 (TANAKA, Ayaka)

〔学会発表〕(計 73 件)

1. Koizumi K, **Nakamura H**, Matsuzaki T, Kuroda S, Yasui Y, Furuya K, Miyake T, Takiuchi T, **Kumasawa K**, **Kimura T**. (2015) **Development**