

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670443

研究課題名(和文)造血幹細胞移植後不妊の新たなメカニズム

研究課題名(英文)A novel mechanism of posttransplant female infertility

研究代表者

豊嶋 崇徳 (TESHIMA, TAKANORI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40284096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植のGVHDと不妊の関連に注目し、マウス骨髄移植モデルを用いて研究を行った。その結果卵巣にドナーT細胞の浸潤、卵巣顆粒膜細胞にアポトーシスがみられ、卵巣GVHDの発症が確認できた。顆粒膜細胞由来のホルモンAMHの産生が低下し、排卵数の低下が認められた。さらに、移植後の交配実験ではGVHD群で出産能の低下がみられた。一方Methylprednisolone 10mg/kgの投与で卵巣GVHDの発症が抑制され、妊孕性が維持された。以上の結果から、卵巣はGVHDの標的臓器であり、GVHD予防が卵巣機能と妊孕性の維持に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Infertility associated with ovarian failure is a serious late complication for female survivors of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT). We have addressed whether GVHD could impact female fertility in murine models of allo-SCT. Our results demonstrate for the first time that GVHD induces infertility by targeting the granulosa cells in the ovaries and GVHD prevention could preserve ovarian functions. These results have important clinical implications in young female transplant recipients with nonmalignant diseases, where minimally toxic chemotherapies prior to SCT and conditioning regimen were used.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植 GVHD 卵巣 不妊 免疫抑制剤

1. 研究開始当初の背景

同種造血細胞移植は造血器悪性腫瘍の根治的治療法であるが、小児や若年患者の長期生存例が増えるにつれ不妊が切実な問題となっている。特に女性不妊が深刻な問題であり、その原因は移植前処置による性腺毒性であり、これら臓器毒性を回避すべくミニ移植や卵巣遮蔽が普及してきたが、移植前処置毒性の軽減のみで不妊が回避できるのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者は同種移植後に不妊率が高いことから、GVHD と不妊の関連に注目した。これを検討するため、移植前処置の影響を除外して妊孕性を定量的に評価できるモデルを開発した。これを用い、同種造血幹細胞移植後の不妊に及ぼす GVHD の影響を検討し、免疫抑制剤による GVHD 予防・治療によって妊孕性が回復することを証明する。

3. 研究の方法

移植前処置の影響を除外するため、移植前処置を用いないマウス移植モデルを使用した。GVHD 群は B6 → B6D2F1(♀)の同種骨髄移植を行い、非 GVHD 群は B6D2F1 → B6D2F1(♀)の同系骨髄移植を行う。移植後、経時的に GVHD 重症度をスコアでモニターし、卵巣と血清を採取し、病理学的、内分泌学的な評価を行った。卵巣 GVHD の定義は、卵巣周囲へのドナー T 細胞の浸潤(この実験ではドナーに B6-GFP マウスを使用する)と隣接する卵巣構成細胞のアポトーシス(satellitosis)、卵巣由来ホルモン AMH の産生低下で定義する。また妊孕性の評価のために、hCG 投与による過排卵実験を行い、成熟卵胞数をカウントする。移植後 2 週目より 150 日まで繰り返し健康♂マウスとの交配実験を行い、出産率、出産仔数をモニターした。また、同様の実験を低用量 busulfan と cyclophosphamide を用いた骨髄非破壊的移植前処置法を用いた移植実験においても実施した。最後に GVHD 予防として prednisolone を投与し、GVHD を予防することで妊孕性が回復しうるか、ホルモン値、卵巣病理、出産数、出産仔数などを指標として検討した。

4. 研究成果

同種造血幹細胞移植の GVHD と不妊の関連に注目し、マウス骨髄移植モデルを用いて研究を行った。その結果卵巣にドナー T 細胞の浸潤、卵巣顆粒膜細胞にアポトーシスがみられ、卵巣 GVHD の発症が確認できた。顆粒膜細胞由来のホルモン AMH の産生が低下し、排卵数の低下が認められた。さらに、移植後の交配実験では GVHD 群で出産能の低下がみられた。一方 Methylprednisolone 10mg/kg の投与で卵巣 GVHD の発症が抑制され、妊孕性が維持された。以上の結果から、卵巣は GVHD の標

的臓器であり、GVHD 予防が卵巣機能と妊孕性の維持に重要であることが示唆された。骨髄非破壊的移植前処置法を用いた移植実験においても GVHD による卵巣機能不全、女性不妊が確認された。本研究によって、卵巣が GVHD の標的臓器であること、それが不妊に関連することを世界に先駆けて証明できた。従来移植後の不妊は移植前処置による性腺ダメージによる影響と理解され、その毒性を最小とするためミニ移植が考慮されるようになった。しかし、本研究はそれのみでは不十分であり、GVHD の制御もあわせて重要であることを示すことになり、不妊対策の大きなブレイク・スルーの基盤データとなるものと考えられる。

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)

(雑誌論文)(計 17 件)

1. Teshima T : JAK inhibitors: a home run for GVHD patients?
Blood 123(24):3691-3693,2014. 査読有
DOI: 10.1182/blood-2014-04-570325
2. Takahata M, Hashino S, Onozawa M, Shigematsu A, Sugita J, Fujimoto K, Endo T, Kondo T, Tanaka J, Imamura M, Teshima T :
Hepatitis B virus (HBV) reverse seroconversion (RS) can be prevented even in non-responders to hepatitis B vaccine after allogeneic stem cell transplantation: long-term analysis of intervention in RS with vaccine for patients with previous HBV infection.
Transpl Infect Dis 16(5):797-801,2014. 査読有 DOI: 10.1111/tid.12283
3. Shiratori S, Fujimoto K, Nishimura M, Hatanaka KC, Kosugi-Kanaya M, Okada K, Sugita J, Shigematsu A, Hashimoto D, Endo T, Kondo T, Abe R, Hashino S, Matsuno Y, Shimizu H, Teshima T :
Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following reduced-intensity conditioning for mycosis fungoides and Sezary syndrome.
Hematol Oncol , 2014 Oct 14. [Epub ahead of print] . 査読有
DOI: 10.1002/hon.2162
4. Leemhuis T, Padley D, Keever-Taylor C, Niederwieser D, Teshima T, Lanza F, Chabannon C, Szabolcs P, Bazarbachi A, Koh MB :
Essential requirements for setting up a stem cell processing laboratory.
Bone Marrow Transplant 49(8):
1098-1105,2014. 査読有
DOI: 10.1038/bmt.2014.104

5. Takashima S, Eto T, Shiratsuchi M, Hidaka M, Mori Y, Kato K, Kamezaki K, Oku S, Henzan H, Takase K, Matsushima T, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Akashi K, Teshima T : The use of oral beclomethasone dipropionate in the treatment of gastrointestinal graft-versus-host disease: the experience of the Fukuoka blood and marrow transplantation (BMT) group. *Intern Med* 53(12):1315-1320,2014. 査読有 DOI: 10.2169/internalmedicine.53.1858
6. Shigematsu A, Kobayashi N, Yasui H, Shindo M, Kakinoki Y, Koda K, Iyama S, Kuroda H, Tsutsumi Y, Imamura M, Teshima T: High level of serum soluble interleukin-2 receptor at transplantation predicts poor outcome of allogeneic stem cell transplantation for adult T cell leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 20(6):801-805,2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.02.014
7. Shiratori S, Wakasa K, Okada K, Sugita J, Akizawa K, Shigematsu A, Hashimoto D, Fujimoto K, Endo T, Kondo T, Shimizu C, Hashino S, Teshima T: *Stenotrophomonas maltophilia* infection during allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience. *Clin Transplant* 28(6):656-661,2014. 査読有 DOI: 10.1111/ctr.12356
8. Shono Y, Shiratori S, Kosugi-Kanaya M, Ueha S, Sugita J, Shigematsu A, Kondo T, Hashimoto D, Fujimoto K, Endo T, Nishio M, Hashino S, Matsuno Y, Matsushima K, Tanaka J, Imamura M, Teshima T: Bone marrow graft-versus-host disease: evaluation of its clinical impact on disrupted hematopoiesis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 20(4):495-500,2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.12.568
9. Sugiyama H, Maeda Y, Nishimori H, Yamasuji Y, Matsuoka KI, Fujii N, Kondo E, Shinagawa K, Tanaka T, Takeuchi K, Teshima T, Tanimoto M: Mammalian target of rapamycin inhibitors permit regulatory T cell reconstitution and inhibit experimental chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 20(2):183-191,2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.11.018
10. Koyama M, Hashimoto D, Nagafuji K, Eto T, Ohno Y, Aoyama K, Iwasaki H, Miyamoto T, Hill GR, Akashi K, Teshima T: Expansion of donor-reactive host T cells in primary graft failure after allogeneic hematopoietic SCT following reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 49(1):110-115,2014. 査読有 DOI: 10.1038/bmt.2013.134
11. Eriguchi Y, Uryu H, Nakamura K, Shimoji S, Takashima S, Iwasaki H, Miyamoto T, Shimono N, Hashimoto D, Akashi K, Ayabe T, Teshima T: Reciprocal expression of enteric antimicrobial proteins in intestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 19(10):1525-1529, 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.07.027
12. Aoyama K, Saha A, Tolar J, Riddle MJ, Veenstra RG, Taylor PA, Blomhoff R, Panoskaltsis-Mortari A, Klebanoff CA, Socie G, Munn DH, Murphy WJ, Serody JS, Fulton L, Teshima T, Chandraratna RA, Dmitrovsky E, Guo Y, Noelle RJ, Blazar BR: Inhibiting retinoic acid signaling ameliorates graft-versus-host disease by modifying T-cell differentiation and intestinal migration. *Blood* 122(12):2125-2134, 2013. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2012-11-470252
13. Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, Murata M, Eto T, Kobayashi N, Taniguchi S, Imamura M, Ando K, Kato S, Mori T, Teshima T, Mori M, Ozawa K: Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *Int J Hematol* 98(2):206-213, 2013. 査読有 DOI: 10.1007/s12185-013-1399-4
14. Shimoji S, Kato K, Eriguchi Y, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Oda Y, Akashi K, Teshima T: Evaluating the association between histological manifestations of cord colitis syndrome with GVHD. *Bone Marrow Transplant* 48(9):1249-1252, 2013. 査読有 DOI: 10.1038/bmt.2013.44
15. Yamasaki S, Miyagi-Maeshima A, Kakugawa Y, Matsuno Y, Ohara-Waki F, Fuji S, Morita-Hoshi Y, Mori M, Kim S, Mori S, Fukuda T, Tanosaki R, Shimono T, Tobinai K, Saito D, Takaue Y, Teshima T, Heike Y: Diagnosis and evaluation of intestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantat

ion following reduced-intensity and myeloablative conditioning regimens.
Int J Hematol 97(3): 421-426, 2013.

査読有 DOI: 10.1007/s12185-013-1297-9

16. Shima T, Forraz N, Sato N, Yamauchi T, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K, McGuckin C, Teshima T: A novel filtration method for cord blood processing using a polyester fabric filter.
Int J Lab Hematol 35(4):436-446,2013.

査読有 DOI: 10.1111/ijlh.12039

17. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Hengan N, Numata A, Ito A, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K: Quantification of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic stem cell transplantation.

Blood 121(5):840-848, 2013. 査読有
DOI: 10.1182/blood-2012-02-409607

[学会発表](計 9 件)

1. Shimoji S, Hashimoto D, Kato K, Tsujigiwa H, Akashi K, Teshima T. Graft-Versus-Host Disease Targets Granulosa Cell of Ovarian Follicle and Causes Infertility after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2015 BMT Tandem Meetings, Feb 11-15, San Diego(USA)

2. 橋本 大吾, 豊嶋 崇徳: Key players in intestinal GVHD. 第76回日本血液学会学術集会, 2014年10月31日~11月2日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

3. 下地 園子, 加藤 光次, 辻極 秀次, 江里口 芳裕, 瓜生 英尚, 高嶋 秀一郎, 橋本 大吾, 宮本 敏浩, 岩崎 浩己, 赤司 浩一, 豊嶋 崇徳:

同種造血幹細胞移植後の不妊.

第76回日本血液学会学術集会, 2014年10月31日~11月2日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

4. Teshima T: Role of the intestinal tract for acute GVHD. Kolloquium 2014 Immunity and Infection. 2014.6.30, Freiburg(Germany)

5. Teshima T: Mechanisms of intestinal and pulmonary GVHD after allogeneic stem cell transplantation. Kolloquium 2014 Hematology and Oncology. 2014.6.30, Freiburg(Germany)

6. Teshima T: Reciprocal expression of antimicrobial peptides in GVHD. GvHGvL 2014. 2014.3.26-28, Regensburg(Germany)

7. Teshima T: Intestinal stem-niche system and microbiota after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Seminar at Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus. 2014.3.25, Dresden(Germany)

8. Shimoji S, Kato K, Tsujigiwa H, Eriguchi Y, Lee L, Uryu H, Takashima S, Hashimoto D, Akashi K, Teshima T. Graft-Versus-Host Disease Targets Ovary and Causes Infertility After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.

55th American Society of Hematology (ASH), Annual Meeting, December 5-8, 2013, New Orleans(USA)

9. 下地 園子, 豊嶋 崇徳, 加藤 光次, 江里口 芳裕, 宮本 敏浩, 竹中 克斗, 岩崎 浩己, 小田 義直, 赤司 浩一:

Cord Colitis Syndrome の特徴的病理所見は GVHD と CMV 腸炎でも見られる.

第74回日本血液学会学術集会, 2012年10月19日~21日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊嶋 崇徳 (TESHIMA TAKANORI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 40284096