

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893298

研究課題名(和文)細胞シートによる人工卵巣の構築

研究課題名(英文)A trial of artificial ovary formation by cell sheet engineering

研究代表者

高山 修 (TAKAYAMA, Osamu)

岡山大学・学内共同利用施設等・助教

研究者番号：80650879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞シートによる卵巣培養を行うため、まずマウス卵巣を用いて諸条件の基礎的検討を行った。培養環境下でマウス線維芽細胞(MEF)の細胞シートを積層することを試み、一定の割合で培養中にも積層状態を維持することができた。マウス卵巣培養において卵巣直径の増大がみられたが、長期間にわたる細胞シートの積層状態の維持は不可能であった。ヒト卵巣培養における検討では、MEFの調整培地とアルギン酸ゲルの利用により卵巣の成長を確認した。本研究により、細胞シートそのものでの人工卵巣構築には課題が残るが、調整培地やゲルの利用による代替法により、人工的に卵巣内環境を再現することは可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that cancer patients could pregnant by transplantation of cryopreserved ovarian tissue following chemo- or radiation-therapy. However, this method may have a risk of re-introduction cancer cells to the patient after medical treatment. Although this risk may be avoided by using in vitro embryo production techniques following in vitro growth of follicular oocytes, it is difficult to grow oocytes from early pre-antral follicles, especially earlier than secondary follicles. Current study was undertaken to find a possibility of in vitro growth of human early pre-antral follicles by cell sheet engineering. Our data show that human early primary follicles can grow in vitro, but the follicular development stops until 1 week after the start of culture. Further studies are required to find more suitable culture conditions for follicular survival.

研究分野：生殖補助医療

キーワード：生殖補助医療 卵巣培養

1. 研究開始当初の背景

出生時のヒトの卵巣に存在する生殖細胞は約 200 万個あるが、一生涯で排卵に至る卵子は、500 個未満といわれている。これは、ヒトを含む単胎動物の性周期では、多くの原始卵胞が淘汰により閉鎖され、最終的に 1 個の卵が排卵されるためである。これまでに女性へのがん治療において、化学療法や放射線療法により、妊孕能が失われることが知られている。また、近年のライフプランの変化により、不妊症に悩むカップルが増えてきている。このような問題を解決するために、本来閉鎖へ至る多くの生殖細胞を利用する方法が模索されてきた。その一つの解決策として、がん治療における妊孕能温存のために治療前に凍結した卵巣組織細胞を移植する方法があるが、これは移植片にがん細胞が混在する危険性を排除できない問題がある。この問題を回避する方法として、卵胞の体外培養がある。これは卵胞を体外において培養し、体外受精可能な成熟卵まで発育させてから体外受精を行い、受精卵のみを母体へ戻すことでがん細胞の混入を防ぐという戦略である。卵胞培養は、主にマウスでの研究が進められており、その研究を元にヒトへ応用も試みられている。無刺激のヒト成人卵巣では、初期の 2 次卵胞や 1 次卵胞、休止状態の原始卵胞がほとんどであり、より多くの生殖資源を活用するためには、これらの初期卵胞を標的とした卵胞培養系の開発が必須である。近年、よりよい卵胞培養環境の構築のため 3 次元培養と呼ばれる方法が試みられている。これは、卵胞のオートクライン効果を期待して、卵胞の周りをゲルで固めて培養する方法である。これまでマカクザル、ヒトなどの霊長類(Xu *et al.* 2011 Human reproduction, Xu *et al.* 2010 Human reproduction) でも研究が行われており、これらの研究では 2 次卵胞からの卵胞培養において生存率や成長率などは良好な成績を示しているものの、成熟卵の獲得については非常に低率であり、それ以前の初期卵胞からの発育についてはいまだに困難な状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、この培養法からさらに一歩進み、卵巣に近い培養環境を構築するために、細胞シート工学が利用できないか検討した。細胞シート工学とは、温度応答性ポリマーにより培養細胞を酵素処理など行うことなく、細胞外マトリクスを保持したシート状(2D)のまま利用できる方法である。このシートを積層することで機能性のある人工臓器の 3 次元構築が出来る可能性があり、再生医療の分野で近年急速に研究・開発が進められてきている。本研究は、細胞シートを作製し、卵胞をそのシートで挟んで培養することで、高いパラクライン効果や細胞間の連携が期待できる疑似卵巣の構築(人工卵巣)を目指すことを目的として開始した。

3. 研究の方法

(1) 培養条件の検討(マウス)

細胞シートは、細胞を積層出来ることが最大の特長であるが、層数を増やしすぎると培養液が中心の細胞まで浸透せず、死滅・変性する恐れがある。また、卵細胞が通常の細胞より数百倍の大きさであること、卵胞が特殊な構造であることから、卵胞培養をする上で、細胞シートの最適な層数が存在することが予想される。そのため、最適な層数を検討した。細胞シートに使用した細胞種は、ES のフィーダー細胞としても利用されるマウス胎児線維芽細胞(MEF)を使用した。また、卵胞を直接細胞シートに密着させる方法と卵胞をアルギン酸ゲルなどに包埋させてから細胞シートを挟む方法を比較した。培養は 37、5%CO₂ in air の気相条件下で行った。また、MEF は 5%FBS を添加した DMEM で培養を行った。マウス卵胞は、5%FBS, 10 µg/ml インシュリン、5.5 µg/ml トランスフェリン、6.7 ng/ml セレン酸ナトリウム、0.1 IU/ml FSH を添加した MEM で培養を行った。

(2) 卵胞培養における細胞シートの効果(マウス)

上記の結果を利用して、マウス卵胞培養における細胞シート法の効果を検討した。マウスは発生工学研究で多くの実績のある B6D2F1 マウスの 10 日齢を使用した。対象とする卵胞は、初期 2 次卵胞(約 100 µm)以下の卵胞とした。

(3) 卵胞単離法の検討(ヒト)

ヒト卵巣組織の研究および取扱いは、岡山大学倫理委員会の承認を得て行った。卵巣からの卵胞単離法は、主に機械的単離法とコラゲナーゼによる酵素処理法の 2 種類がある。一般的に卵胞培養において、機械的単離法は卵胞の採取数は少ないものの、基底膜が残り卵胞腔形成が出来るため、成長の判定がしやすいこと、酵素処理法は、卵胞は多くとれるものの、基底膜が破壊されるため卵胞腔形成が困難であり、卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体として発育していくという特徴がある。ヒトにおいてその資源は限られてくるため、採取できる卵胞数を調査することは重要である。また細胞シート法に適した卵胞単離法も不明のため、どちらの方法が適しているかを検討した。機械的単離法は、ヒト卵巣の表層を細切したあと、注射針で慎重にトリミングした。酵素処理法は、卵巣表層を細切し、2.0mg/ml コラゲナーゼにより行った。

(4) 卵胞培養における調整培地の効果(ヒト)

マウスでの検討において、細胞シートの特性上長期間の積層状態の維持は困難であることが判明した。そこで、細胞シートを積層する方法の代替法として、マウス線維芽細胞の調整培地の利用を検討した。マウス線維芽細胞の調整培地は、T-25 フラスコに播種後、サブコンフルエントの状態に IVG 培地に置換し、1 日おきに回収して利用した。ヒト卵胞は、

37、5%CO₂ in air の気相条件下で、5%SSS、10 µg/ml インシュリン、5.5 µg/ml トランスフェリン、6.7 ng/ml セレン酸ナトリウム、0.1 IU/ml FSH を添加した MEM で培養を行った。

(5) 卵胞培養におけるアルギン酸ゲル濃度の検討(ヒト)

上記(4)の検討で、酵素処理法を採用した結果、卵胞培養中に顆粒膜細胞から卵母細胞が放出されてしまう現象が見られた。酵素処理により卵胞表面が傷つき、放出しやすくなったためと考えられるが、この現象を回避するため、アルギン酸ゲルの使用を検討した。先に検討している調整培地に対する効果も調べるため、アルギン酸ゲルの濃度(2% vs 0.5%)と合わせて検討した。

4. 研究成果

(1) 培養条件の検討(マウス)

人工卵巣を3次元構築するため、培養条件下でMEFによる細胞シートを積層することを試みるものの、積層そのものが難しく、また積層できても培養中にはがれるなど困難であったが、積層時に寒天やゼラチンを用いることにより、一定の割合で培養中にも積層状態を維持することが可能になった。また、細胞シートの層数は、培養中積層状態を維持するためには3層以上は難しく、2層が最適であることが判明した。卵胞を直接細胞シートに密着させる方法とアルギン酸ゲルに包埋させてから挟む方法を比較したところ、ゲルに包埋することにより卵胞-ゲル複合体の直径が大きくなり、シート内に収めることが難しくなった。よって、細胞シートを使用する場合は、直接卵胞と細胞シートを密着させる方法を採用した。

(2) 卵胞培養における細胞シートの効果(マウス)

マウス卵胞培養における細胞シートの効果を調べるため、上記(1)で検討した方法により卵胞培養を行った。卵胞単離法は、酵素処理法、機械的単離法のどちらでも充分量の卵胞数が確保できることを確認し、機械的単離法によって得られた2次卵胞の一部を積層した細胞シートの中で培養したところ、卵胞直径の増大がみられ、細胞シートによる卵胞培養が一定期間可能であることを確認した。しかし、細胞シートの特性上、培養条件下では1週間以上の積層状態を保つことは困難であり、すべてのシートが培養途中ではがれてしまった。

(3) 卵胞単離法の検討(ヒト)

上記(2)のマウス卵巣の検討では、卵胞単離法としては、酵素処理法、機械的単離法どちらも充分な卵胞数の確保は出来たが、ヒト卵巣はマウスと比較すると大きく、症例によって年齢も広範囲(25-48歳)にわたることから、諸条件が異なる可能性があるため、卵巣単離法の検討を行った。卵巣表層を10x10x1 mmの薄片に切り出した後、細切しトリミングを

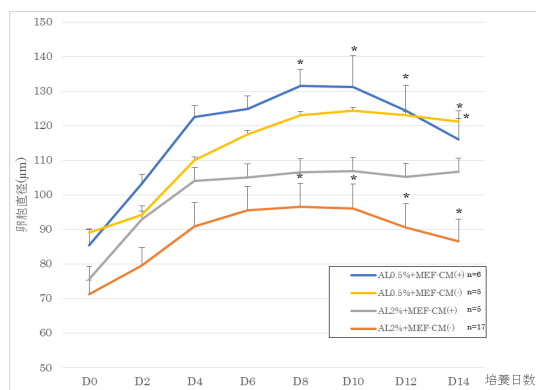
行った機械的単離法の場合、卵胞一つあたりの単離に時間がかかる上、1切片あたり2~3個の卵胞の採取しか出来なかった。一方、同様に卵巣表層の薄片を細切した後に、2.0mg/mlのコラゲナーゼに30分~1時間、37のウォーターバスで振盪させて酵素処理を行った結果、1切片あたり5~20個の卵胞の採取が出来、ヒトにおいても酵素処理法が卵胞単離法として効率が良いことが明らかとなったため、以降の検討では酵素処理法を採用した。

(4) 卵胞培養における調整培地の効果(ヒト)

上記(2)での検討において、マウスでは短期間でも細胞シートによる効果が認められたが、細胞シートの特性上、長期間の積層状態の維持は困難であることが判明した。そこで、細胞シートを積層する方法の代替法として、マウス線維芽細胞の調整培地の利用を検討した。ヒト卵胞は、これまでの知見から体外発育が困難であり、かつ卵巣内で多量の存在が予想される直径60-100µmの一次~初期二次卵胞を対象とした。体外発育培地に調整培地を利用した区では、調整培地を使用しない区に比べ、卵胞直径の有意な増加が見られたことから、ヒト卵胞培養においてもMEFによる調整培地は有効であることが示唆された。

(5) 卵胞培養におけるアルギン酸ゲル濃度の検討(ヒト)

上記(4)の検討において、卵胞培養中に顆粒膜細胞から卵母細胞が放出される現象が見られたため、卵胞をアルギン酸ゲルで包埋して培養する方法を検討した。アルギン酸ゲルは、2.0%と0.5%で比較したところ、0.5%の区で卵胞直径の有意な増加が見られた。



以上のことから、本研究により細胞シートそのものを人工卵巣として構築することは、長期培養を目的とした場合は課題が残るが、調整培地やアルギン酸ゲルを利用するなどの工夫により、体外培養環境においても人工的に卵巣内環境を再現することは可能であることが明らかになった。臨床応用のためには、培養期間を延長するためのさらなる検討が必要である。

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

高山修、本橋秀之、中塚幹也、舟橋弘晃
ヒト初期1次卵胞の体外培養の試み、第
13回生殖バイオロジー東京シンポジウ
ム、平成26年7月27日、都市センター
ホテル、千代田区、東京

O Takayama, Motohashi H.H,
Okudaira Y, Li Y, Ferre P, Athurupana
R, Nakatsuka M and Funahashi H. In
vitro development of human early
pre-antral follicles within alginate
hydrogels, Ovarian Club IV,
2014.11.15-16, Novotel Tour Eiffel
Hotel Paris, France

高山修、本橋秀之、奥平裕一、李 楊、
Pilar Ferre、Rukmali Athurupana²⁾、
中塚幹也、舟橋弘晃、ヒト初期卵胞の体
外培養(IVG)における培養条件の検討、第
59回日本生殖医学会学術講演会、平成
26年12月4日、京王プラザホテル、新
宿区、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

高山 修 (TAKAYAMA OSAMU)

岡山大学・生殖補助医療技術教育研究センタ
ー・助教

研究者番号：80650879

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：