

## 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3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591995

研究課題名（和文） 異性間における生殖臓器移植と生殖細胞導入の解析

研究課題名（英文） Heterosexual genital organ transplantation and analysis of germ cell trafficking

研究代表者

難波 祐三郎 (NAMBA YUZABURO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00335605

研究成果の概要（和文）：

性同一性障害に対する機能的再建手術の一つに異性間の生殖臓器移植が考えられる。精巣移植においては大動脈を犠牲にする従来の方法から、超微小外科を応用した移植法を開発した。同性間精巣移植ではテストステロンの分泌と精子形成を確認した。同性間卵巣移植ではエストロゲンの分泌と妊娠を確認した。異性間精巣移植ではテストステロンの分泌を確認したが cell trafficking は確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：

Heterosexual genital organ transplantation is one of the functional reconstructions for Gender Identity Disorder. We developed a new super-microsurgical testis transfer not sacrificing aorta. In the cases of homosexual testis transfer we recognized testosterone secretion and sperm formation and estrogen secretion and pregnancy in ovary transfer. In the cases of heterosexual testis transfer we recognized testosterone secretion, but we could not recognize cell trafficking phenomenon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：形成外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：生殖臓器移植、生殖細胞導入、性同一性障害

## 1. 研究開始当初の背景

我々は2001年1月から国内では2施設目となる性同一性障害患者に対する性別適合

手術を開始した。患者は性別適合手術で乳房、外性器の形態など外表面は望む性の形にすることはできても、内性器を有し子孫をつくる

ことは不可能である。これを可能とするための異性間生殖器官移植を臨床応用するにあたり、異性間で移植された精巣および卵巣からつくられる精子と卵子のDNAが、レシピエント由来になっているのかということは倫理的に非常に重要な問題である。本研究の目的は動物実験でこの現象を検証し、臨床応用への道を探求することにある。

## 2. 研究の目的

(1) 成熟個体における生殖細胞は卵巣または精巣原基よりつくられ、その幹細胞は成長過程でそれぞれの生殖原基に移動が完了されているものとされていた。特に卵母細胞の増殖は胎生期のみで起こり、出生直後にはその増殖能は失われると信じられていたが、骨髄の中には卵母細胞にもなりうる Germline stem cell (生殖幹細胞) が存在することが報告された。同様に精巣の生殖幹細胞も骨髄から供給されることが報告されている。同様の現象が生殖臓器を移植した際にも起こるかどうかは不明であり、本研究では GFP-Tg ラットを用いて異性間 (Sex mismatch) に精巣および卵巣を移植し、レシピエントの骨髄から供給された生殖幹細胞がグラフト内に移動 (Cell trafficking) するかどうかを明らかにすることが主なる目的である。GFP-LEW トランスジェニック (Tg) ラット (プロモーター: CAG) はおわんクラゲ由来の蛍光タンパク質である Green Fluorescent Protein (GFP) を遺伝子導入されたトランスジェニックラットであり、さまざまな組織に GFP の遺伝子が発現している。我々は遺伝子導入された TG ラットの精巣および卵巣を、蛍光顕微鏡を用い励起光下 (489nm) にて観察し GFP の発現を確認している。

(2) 具体的に何を明らかにするのか

① マイクロサージャリーを用いたラットの精巣移植および卵巣移植術を確立し、性ホルモンの定量、精子および卵子の形成を組織学的に評価、交配後の妊娠の有無を確認することで、グラフトの生殖機能を明らかにすること。

② ①により確立された移植法により GFP-Tg ラットを用いた精巣移植および卵巣移植をおこない、レシピエントの骨髄からグラフト内に供給された生殖幹細胞の細胞移動現象 (cell trafficking) を明らかにすること。

③ Gender Identity Disorder モデルとして、異性間に生殖臓器移植をおこない性ホルモンの定量、精子および卵子の形成を組織学的に評価しグラフトの生殖機能を明らかにすること。GFP-Tg ラットを用い異性間に移植された生殖臓器から作られる精子および卵子が cell trafficking によりレシピエント由来のものになっているのかを明らかにすること。

(3) 生殖臓器の Germline stem cell (生殖幹細胞) が骨髄の中にも存在することが報告され (1,2)、生殖臓器移植においてグラフトのなかにレシピエントの骨髄から生殖幹細胞が供給され、そこから成熟したレシピエント由来の精子および卵子がつくられることが予想される。現在のところ、骨髄由来の生殖幹細胞が正常に発育、受精するかは不明であり、精巣および卵巣を移植する実験系で骨髄由来の生殖幹細胞の移動現象を解析した報告はなく、また異性間における移植で同様の現象が起きるかどうかを検証した報告もない。

本研究の独創的な点として、マーカー遺伝子で標識された骨髄を移植することで生殖幹細胞の cell trafficking を解析するのでは

なく GFP-Tg ラットを用いた生殖臓器を移植する実験で髄由来の生殖幹細胞の移動現象を解析すること、さらにこのことを発展させて異性間での生殖臓器移植でも同様の現象がおきるかを確かめることであると考え。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生殖臓器移植モデルの確立

移植は LEW-LEW 間 (syngeneic) に行い、精巣動静脈あるいは卵巣動脈を栄養血管とし手術用顕微鏡下に血管吻合を行う。従来の Sun Lee モデルは donor vessel の大動静脈を recipient vessel の大動静脈に end to side に血管吻合するものであった。我々の方法では精巣動静脈あるいは卵巣動静脈 (donor vessel) を大腿動静脈の分枝である superficial epigastric vessel (recipient vessel) に血管吻合し、そけい部の皮下に辜丸あるいは卵巣を留置することで、腹腔内操作を行わない低侵襲手術が可能となる (図 1)。術後評価は 2 ヶ月後として、血清テストステロンあるいはエストロゲン値を測定。また移植組織標本を作製し、精細管構造、セリトリ細胞、精子形成能あるいは卵巣構造、卵子形成能の検証を行う。

次いで免疫抑制剤投与による精巣・卵巣機能の解析を行う。これには成熟 BN ラット (ドナー) 成熟 LEW ラット (レシピエント) を用いる。開発した精巣・卵巣移植モデルを用い、FK506 (0.64mg/kg) を投与する。プロトコールは 2 週間連日、3 週目、4 週目投与とする。術後 2 ヶ月目に評価を行う。血清テストステロンあるいはエストロゲン値を計測し、各種免疫組織化学染色にて精巣・卵巣の形態学的解析を行う。

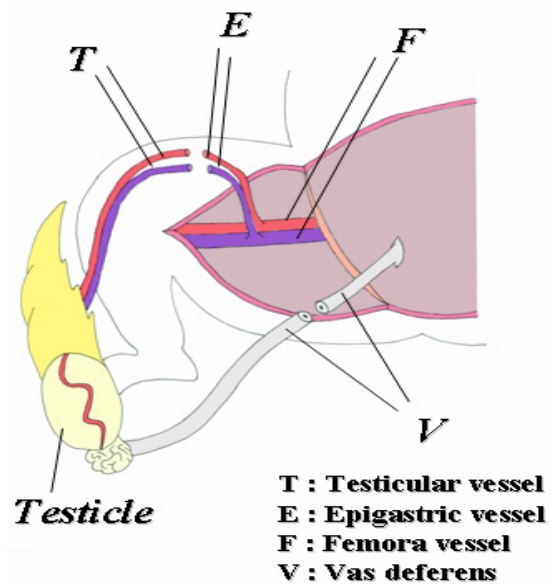


図 1 低侵襲精巣移植のシエーマ

追加研究として精巣陰茎同時移植法の開発を行う。ラットを用いた陰茎移植はすでに報告されているが、精巣陰茎の同時移植はまだ報告されていない。本研究者は外陰部動脈と精巣動脈の血管吻合を行うことで本移植モデルの確立を図る予定である (図 2)。

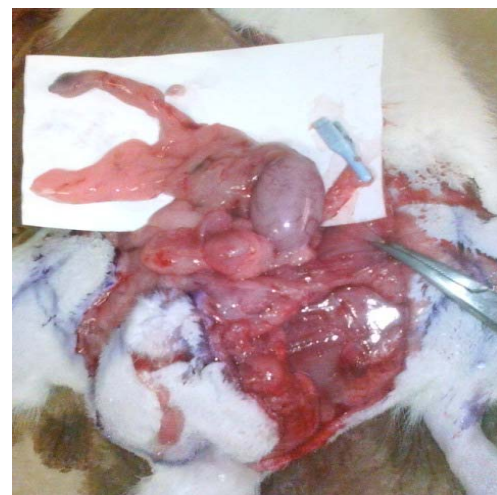


図 2 移植用に拳上した精巣・陰茎

(2) GFP-トランスジェニックラットを用いた生殖細胞の幹細胞研究

(1) により確立された生殖臓器移植法により GFP-Tg ラットを用いた精巣移植および卵巣移植を行い、レシピ

エントの骨髄からグラフト内に供給される生殖幹細胞の細胞移動現象 (cell trafficking) を明らかにする。この実験系ではLEW ラット (8 週齢) をドナー、GFP-Tg ラット (8 週齢) をレシピエントに使用する。GFP 陰性の精巣および卵巣を GFP-Tg ラットに移植する。生殖幹細胞の cell trafficking が起こった場合、レシピエントの GFP 陽性骨髄細胞から生殖幹細胞が GFP 陰性のグラフト内に供給されるため、グラフト内に GFP 陽性細胞が同定されるはずである。この場合の GFP 陽性細胞とは生殖幹細胞のことであるが、それが精子および卵子にまで分化していくかは不明である。移植後のグラフトを蛍光顕微鏡で観察し、免疫組織化学染色および PCR 法にて GFP 陽性細胞を同定し、生殖幹細胞の細胞移動現象を解析する。

#### ①GFP-Tg-ラットにおける精巣の GFP 表出の確認

LEW ラットと GFP-Tg-ラットの精子が区別できるかを確認するために、両者の精巣組織を励起下で観察しその輝度を調べる。また、免疫組織化学染色を行い GFP の表出を確認する。

#### ②GFP-Tg-ラットを用いた精巣移植

本モデルに従い、LEW ラットの精巣を GFP-Tg-ラットに移植する。同時にレシピエントの除睾術も行う。GFP-Tg-ラットの系統は LEW であり、この移植においては免疫反応は惹起されない。つまり免疫抑制剤は不要である。このことは LEW ラットから GFP-Tg-ラットへの皮膚移植で確認されている。

#### ③移植精巣の cell trafficking の解析

移植精巣にレシピエント由来の精子 (GFP positive の精子) が形成されているかを確認する。移植精巣を励起光下で観察し精細管および精子の輝度を調べる。また、免疫組織化学染色にて確認を行う。他にも分子生物学的手法として、PCR、FACS を用いて移植精巣の cell trafficking の解析を行う。

#### (3) Sex mismatch による生殖臓器移植

この実験系では LEW ラット (8 週齢) をドナーとレシピエントに使用し、マイクロサージャリーを用いてそれぞれ卵巣摘出したメスラットに精巣を移植し (この場合 Y 抗原により拒絶反応がおこるため免疫抑制剤である FK506 を投与する)、精巣摘出したオスラットに卵巣移植する。移植後のグラフトの機能として、性ホルモンの定量、精子および卵子の形成を組織学的に評価する。同時に GFP-Tg ラットを用い異性間に移植された生殖臓器から作られる精子および卵子が cell trafficking によりレシピエント由来のものになっているのかを明らかにする。この実験系では LEW ラット (8 週齢) をドナー、GFP-Tg ラット (8 週齢) をレシピエントに使用する。それぞれ卵巣摘出した雌性 GFP-Tg ラットに GFP 陰性精巣を移植し (この場合 Y 抗原により拒絶反応がおこるため免疫抑制剤である FK506 を投与する)、精巣摘出した雄性 GFP-Tg ラットに GFP 陰性卵巣を移植する。生殖幹細胞の cell trafficking が起こった場合、レシピエントの GFP 陽性骨髄細胞から生殖幹細胞が GFP 陰性のグラフト内に供給されるため、グラフト内に GFP 陽性細胞が同定されるはずである。この場合異性間における生殖臓器移植のため、それが精子および卵子にまで分化していくかは不明である。移植後のグラフトを蛍光顕微鏡で観察し、免疫組織化学染色および PCR 法にて GFP 陽性細胞を同定し、生殖幹細胞の細胞移動現象を解析する。

#### (4) 上記ラットを用いた交配

上記実験系が成功裏に終了した場合の予備実験として計画。卵巣・精巣単独移植では不可能であり、卵巣子宮・精巣陰茎同時移植が成功して初めて可能となる。

#### 4. 研究成果

同性間で移植された精巣の組織標本を観察すると間質細胞には血管および間細胞が認められ、精細管基底層の精祖細胞から内腔へ向かって細胞が成熟し、精子形成が認められていることが分かった。本実験では全10例中7例で精子形成が認められた。

一方、テストステロンの分泌は移植群では全例で認められたが、精巣摘出のみのコントロール群では全例でテストステロンの分泌を認められなかった。精子形成が認められなかった3例について組織標本を観察すると、精細管はやや委縮し、精祖細胞からの正常な成熟過程を確認することができなかった。しかし、間質には血管および内分泌機能を担う間細胞も認められホルモンを分泌するのに耐える機能を残していることがわかった。

卵巣移植モデル群5例全てでエストロゲンの分泌を認めた。また内1例が妊娠し胎児を確認した。卵巣摘出のみのコントロール群5例全てでエストロゲンの分泌を認めなかった。異性間での精巣移植では、移植した精巣は固くなり正常の柔らかさは失われていたが、テストステロンの分泌は認められた。また、精子の形成は認められず、精細管の変性が起こった。レシピエント組織と接触している部分（外周部分）は黒く、蛍光染色で光って染まった。また精巣内の血管や精細管も蛍光染色で光って染まるため（図3）、レシピエント由来の遺伝子を持った組織が発現している可能性がある。即ち、本実験で細胞導入（Cell Trafficking）が起こった可能性を示唆している。ただし、雄 LEW ラットの精巣を GFP-TG ラットに移植して、光る精子が一つでも発現すれば明らかに細胞導入（Cell Trafficking）が起こった証明になるが、その実証は得られなかった。

今後、本実験の発展形として、同性間生殖臓

器移植における細胞導入の解析を行いたいと考えている。

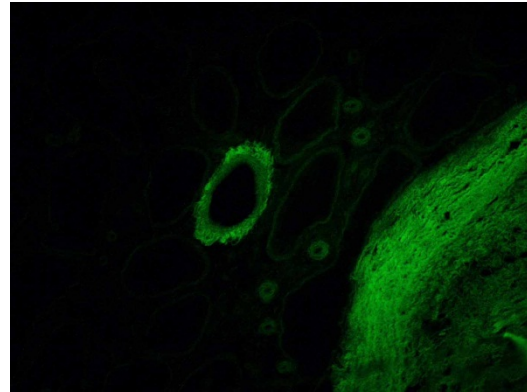


図3 蛍光染色で光る精細管と精巣内血管

#### 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1件）

- ① 山下修二、難波祐三郎、木股敬裕、実験的精巣移植、PEPARS、査読有、59巻、2011、93-97

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 祐三郎 (NAMBA YUZABURO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00335605

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし