

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20131

研究課題名(和文) 再生医療を利用した移植卵巢の機能改善に対する新規治療開発

研究課題名(英文) Therapeutic development for functional improvement of transplanted ovaries using regenerative medicine

研究代表者

大島 乃里子 (OSHIMA, Noriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30611058

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)：凍結卵巢移植における移植片の生着不良と機能低下に対して本研究を開始した。研究の結果、動物実験レベルにおいては毛細血管シートの早期血流回復における有意性が認められず、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、細胞上清から抽出したエクソソームを使用した実験に変更した。しかしながらこれらの注入においても有意な血流回復を得ることができなかった。一方、他疾患モデルの同実験においてはエクソソームにて血流の早期再開が認められた。部位あるいは注入量・回数等で効果に差がある可能性があり幹細胞由来エクソソーム自体は今後組織再生や血流再開において有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん診療の飛躍的進歩により「がんサバイバー」が増加し、治療終了後の生活の質に注目が集まっている。特に小児・若年女性に対するがん治療の副作用としての生殖機能の廃絶に対して、卵巢実質をがん治療前に凍結保存し治療後に移植する治療法が急速に確立されている。その際に移植時の組織生着のための早期血流回復は、他臓器移植同様不可欠かつ重要な課題である。本研究では毛細血管シート移植や細胞移植、エクソソーム注入などの方法を試したが、その結果、エクソソームの注入が最も効果が期待できる方法である可能性が示唆された。今後さらなる研究により実用化に向けて検討を進めていくことが必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was initiated for graft failure and loss of function in ovary freezing transfer. As a result of the study, no significance was found in the early blood flow recovery of the capillary sheet at the animal experiment level, and the experiment was changed to an experiment using vascular endothelial precursor cells, mesenchymal stem cells, and exosomes extracted from cell supernatants. However, even with these injections, significant blood flow recovery could not be obtained. On the other hand, in the same experiment of other disease models, early resumption of blood flow was recognized in exosome. There is a possibility that the effect may differ depending on the site or the injection amount, the number of times, etc. It was suggested that the stem cell-derived exosome itself is useful for tissue regeneration and blood flow resumption in the future.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 エクソソーム 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、がん診療の飛躍的進歩により、がんを克服した「がんサバイバー」が増加し、治療終了後の生活の質に注目が集まっている。治療の進歩による生存率の上昇は、治療終了後にも長い人生が待っていることを意味し、特に若年者にとってはがん治療によっておこる不可逆的な身体的変化と長期にわたり付き合っていかななくてはならない。その中で特に注目されているのが、小児・若年者に対するがん治療の副作用としての生殖機能の廃絶である。

現在、日本の年間がん罹患患者の33万人が女性であり、35歳未満のがん罹患数は660人、40歳未満では2000人にのぼり、生殖可能年齢層以下のがん罹患数は決して少なくない。過去においては小児・若年層のがん治療の生存率が低かったことから、長期生存を得た患者に対する性腺機能不全については、女性であれば卵巣機能不全による骨粗鬆症の回避や、血管内皮障害の進行抑制を目的とした女性ホルモン補充療法が中心となる治療であった。しかし、現在は妊娠・出産といった『妊孕性の温存』が、社会からも患者個人からも大きく期待されている。

これまでに、医療技術の進歩やデータの蓄積に伴い、子宮・卵巣がんに対する子宮・卵巣温存手術がすすんできた。しかし、進行がんや使用する抗がん剤の種類によっては、受精卵や未受精卵の凍結保存を行う必要がある。しかしこの技術も、未婚の患者や卵巣機能が未発達な小児・若年者の患者に対しては適応できない。そこで、注目されているのが卵巣実質をがん治療前にそのまま凍結保存する、卵巣凍結・移植である。近年、諸外国では治療前に凍結保存した卵巣をがん治療の終了後に体内に移植する技術が急速に確立されつつあり、日本においても臨床応用がまさに始まったところである。

しかしながら、妊孕性温存法としての卵巣移植の大きな問題点として、移植手術からホルモンの回復を認めるまでに3.5~6.5カ月と長期間を要し、有効に保存できる卵胞数が少ないことが挙げられる。これは、融解・移植を行った卵巣組織生存期間が短い事実によって推測され、主な原因として卵巣が生着するまでの血流途絶による低酸素状態により、卵胞が死滅するためと考えられている。これまでに、移植数週間後に移植部位に手術操作を行って血管新生を促す方法が検討されているが、血流促進するだけのために再度手術を行うこと若年患者に高侵襲であり回避したい。そのほかには、もともと周囲に存在した血管を付着させたままで卵巣を凍結する方法などが検討されているが、その血管が移植した際に機能するとは限らないため、十分な血流回復が認められてはならず、この問題においてはさらなる検討が不可欠である。

2. 研究の目的

このような血流不全による卵巣機能回復遅延の問題を解決すべく、今回我々は、これまでの研究において開発した毛細血管シートを用いて、移植卵巣への早期血流導入を試みることににより、移植卵巣の早期生着による機能改善をはかり、最終的には凍結卵巣移植による妊孕性温存の成功率を上昇させることを本研究の主眼とした。

我々の研究グループでは、これまでの研究において、印刷技術を応用し、血管内皮細胞を用いて、任意にパターンニングされた毛細血管網を *in vitro* で作成する技術を世界で初めて考案し、報告してきた (BBRC 2007, ECR 2008, ATVB 2010, Tissue Engineering 2010, Inflammation and Regeneration 2011)。本方法は血管内皮細胞を培養し細胞数を増幅させた後、親・疎水を利用してパターン化した基板に播種し、その後組織に転写することにより組織上で血管構造を構築するという方法である。このパターンニング基板を利用して血管内皮細胞を羊膜上に転写して血管を形成し、この血管付羊膜を移植することにより、マウス下肢虚血部位の血流改善と機能回復が認められることは既に確認されている。そこで、この生体外での毛細血管シート作成技術を移植卵巣の早期血流再開に応用する。

移植に使用する細胞外マトリクスについては、共同研究により作成した高圧処理脱細胞羊膜を使用する。この高圧処理脱細胞羊膜上で毛細血管網を移植した研究において (2010 ATVB) 有用性が確認されている。実際の移植を考慮した際に、弾力性がありフレキシブルな形状をとることが可能な操作性に優れたスキャフォールドが必須だが、羊膜はその条件を満たす材料である。問題となる病原性や免疫拒絶反応については、高圧酸素処理脱細胞処理を行うことによりウイルスや免疫原性を除去したため回避可能となった。

一方、これまでにヒト末梢血や臍帯血、脂肪細胞より、血管内皮前駆細胞や間葉系幹細胞を効率的に単離・培養する方法 (2010 ATVB, 2011 Inflammation and Regeneration) について検討を行っており、本研究において生体材料から脈管材料を単離・培養して、移植材料として使用する。

これらの手法を統合・応用し、卵巣機能の早期回復のための早期血流回復を *in vitro*, *in vivo* レベルで解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト皮膚毛細血管内皮細胞・成人末梢血由来血管内皮前駆細胞・臍帯血由来血管内皮前駆細胞を用いた生体外毛細血管シートの作成

(2) 毛細血管シートのマウス虚血モデルへの移植

本研究では生体外で作成した毛細血管シートを移植することにより早期血流回復を目指したが、移植可能な毛細血管数が少ないことなどに起因すると思われる有意な血流回復が認められなかったため、研究方法の変更を行った。血管内皮前駆細胞や間葉系幹細胞自体あるいは間葉系幹細胞上清から抽出したエクソソームを使用することとして以下の研究を行った。

(3) 胎盤付属物由来間葉系幹細胞の培養上清からのエクソソーム抽出と虚血モデルへの注入

4. 研究成果

(1) ヒト皮膚毛細血管内皮細胞・成人末梢血由来血管内皮前駆細胞・臍帯血由来血管内皮前駆細胞を用いた生体外毛細血管シートの作成

まず移植に必要な毛細血管を生体外で作成するためのパターンニング基板の調整を行った。これまでにヒト臍帯血由来血管内皮前駆細胞を利用してリソグラフィーを用いた生体外毛細血管作成を行ってきたが、本研究では自己細胞の使用を目標とし、成人由来細胞を利用するため、実際に移植に使えるようなスキャホールドである脱細胞羊膜上で毛細血管の作成を行う必要がある。これまでに行った実験において、血管内皮細胞はその由来やプライマリーカルチャーで採取した細胞に関してはコロニーの差によって基板への接着強度に相違があることが判明しており、管腔形成までの時間についても細胞の由来によって異なることがわかっているため、時間変化と基板接着強度の調整のためパターンニング基板の UV 照射ジュールの調整を行った基板での実験をおこなった。照射ジュールを段階に分け、それぞれの強度での接着強度の確認を行い、照射ジュールを固定した基板に細胞を播種し、細胞培養時間と基板への接着までの時間の調整を行った。その結果、基板への細胞接着強度をより強くすると転写が困難になることが判明したため、適切なジュールにおいて、臍帯由来細胞と比較して成人細胞は長い時間のインキュベーションを行い、脱細胞羊膜への細胞転写時間についても長時間おく必要があることが判明した。この基板を用いて基板への細胞播種(図1)、付着した血管内皮細胞のスキャホールドへの転写(図2)、転写した細胞の毛細血管形成(図3)を確認した。しかしながら、ヒト皮膚毛細血管内皮細胞・成人末梢血由来血管内皮前駆細胞は増殖能が低く、毛細血管を作成するために十分な数を得ることが困難であること、付着や転写時間が長時間かかることから、本研究においては臍帯血由来血管内皮前駆細胞を使用することとした。

この検討において、成人末梢血由来血管内皮前駆細胞の増殖における適切な条件の検討も行ったが、増殖能の低さの他に安定性が不良であったため、安定性の強化のためペリサイトとの共培養も行った。最終的に臍帯血由来血管前駆細胞を使用するにあたり、ペリサイトと同様の役割を担う間葉系幹細胞胎盤付属物から採取した。

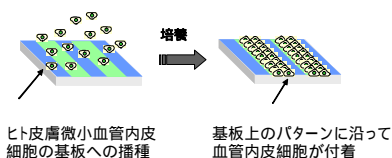


図1 細胞の基板への播種

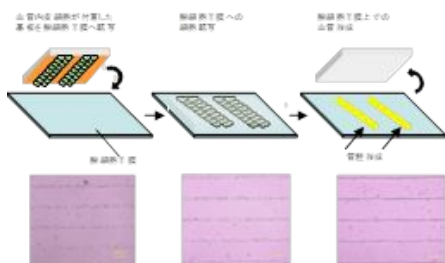


図2 基板から細胞外基質への細胞印刷(転写)

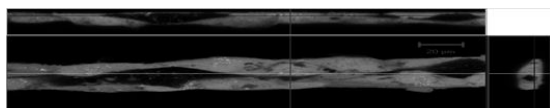


図3 転写した細胞の細胞外マトリックス上での管腔構造形成

(2) 毛細血管シートのマウス虚血モデルへの移植

移植シートの評価のためマウス下肢虚血モデルを作成し評価を行った。まず、臍帯血由来血管内皮前駆細胞を内皮細胞として、胎盤付属物由来間葉系幹細胞をペリサイトとして、生体外で作成した毛細血管シートをマウスに移植し、安定した血流再開がおこるかについてカラードプラーを用いてモデルの検証を行った。図4は虚血下肢と無虚血の下肢の左右差を比較した血流の経時的変化である。移植後28日まで検証を行ったが、羊膜単独に比較して毛細血管移植をお行った群では血流が早期に再開する傾向は認められるものの有意差を認めなかった。そのため、その原因について検討を行ったところ、以下の2点の問題が考えられた。1つは、マウスモデルにおいてはマウス個体自体の大きさが小さいことが影響し、小さな移植片しか移植できないため、移植可能な毛細血管数も必然的に少なくなってしまふ。このため血流の早期再開を促進するには不十分な数の血管しか移植できていない可能性がある点である。もう1つは、ここまでの実験により、移植した血管そのものが既存の血管と融合している箇所が組織学的に高率に認められないことから、毛細血管自体の融合率が低い可能性があるという点である。

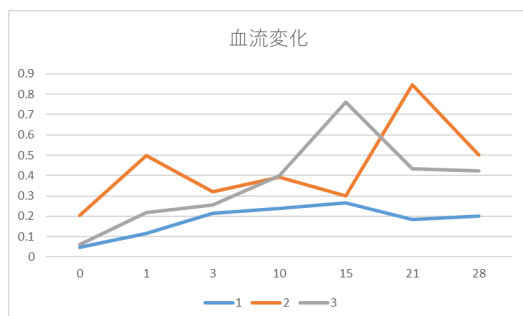


図4 虚血部位の移植後血流変化

- 1: 羊膜シートのみ移植
- 2: 臍帯血由来血管内皮前駆細胞羊膜シートの移植
- 3: 臍帯血由来血管内皮前駆細胞と胎盤付属物由来間葉系幹細胞で作成した羊膜シートの移植

(3) 胎盤付属物由来間葉系幹細胞の培養上清からのエクソソーム抽出と虚血モデルへの注入

これまでの実験の問題点を踏まえ、毛細血管を構成する細胞あるいは細胞が分泌する何らかの物質を用いて実験を行う方針とし、胎盤付属物由来間葉系幹細胞を用いて、幹細胞自体あるいは培養上清からエクソソームを抽出し、それを局所注入する方法への実験変更を行った。まず胎盤由来間葉系幹細胞としてヒト胎盤、羊膜、臍帯それぞれの由来の幹細胞を採取し、由来の違いによる特徴についての解析を行い、治療に適切な間葉系幹細胞を選択した。その上で間葉系幹細胞とその培養上清からエクソソームを抽出し、既存モデルに局所投与して効果を確認する実験を行った。

マウス虚血部位への血管内皮前駆細胞あるいは間葉系幹細胞自体を注入した場合、注入量が増加すると注入部位に浮腫を来し、むしろ局所の血流の悪化を示すという結果となったため、それぞれの培養上清を濃縮しそこから得られるエクソソームを注入する方法に変更して実験を行い、カラードプラー法により血流改善の比較検討をおこなった。その結果、虚血部位の血流回復が早期になる傾向は認められるものの、血流回復の速度と最終的な回復程度において注入群とコントロール群で有意差を認めるには至らなかった。

以上より、今回使用した細胞あるいは細胞が分泌するサイトカインは卵巣機能回復に関して有意に改善させるほどの機能は有していない、あるいは機能回復に至るには細胞量や分泌量自体が不足している可能性が示唆された。本研究においては局所注入について単回投与で実験をおこなったが、他疾患モデルにおいては複数回投与において有意に血流が回復することが確認されているため、量的な問題が関与している可能性はあることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Komaki M, Numata Y, Morioka C, Honda I, Tooi M, Yokoyama N, Ayame H, Iwasaki K, Taki A, Oshima N, Morita I. Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Oct 3;8(1):219

〔学会発表〕(計 1件)

Oshima N, Nakahama K, Miyasaka N, Morita I. Tissue engineered lymphatic microvessels using

cell-printing technology. 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society. 2018 Sep.

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。