

令和元年6月17日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20216

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞を用いた効率的な卵巣組織移植法の開発

研究課題名(英文) Investigation of ovarian tissue transplantation with adipose-derived stem cells

研究代表者

高江 正道 (SEIDO, TAKAE)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：00621301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、本研究費を用いて脂肪組織由来幹細胞を用いた卵巣組織移植法の開発に取り組んできた。その中で、マウス脂肪組織から効率的にし脂肪組織由来幹細胞を採取し、卵巣組織移植に供することができることを確認した。しかしながら、2018年に同様の研究テーマでの報告が相次いだことから、独自性という点で本研究の内容を変更せざるを得ない状況となった。その後、我々は脂肪組織由来幹細胞の培養液に含まれる成長因子やエクソソームに着目し、細胞を直接的に使用しないCell free therapyの開発にシフトした。さらに、持続的にその効果を発揮する方法を考案し、有効性と安全性の検証を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が行った研究は、現在発展途中の卵巣組織移植の方法を改善するための研究であり、移植卵巣組織がより効率的に生着した結果、生殖機能の回復も改善されるという研究結果であった。これらのことは諸外国のほかの研究グループも確認しており、忍容性温存療法の発展に寄与するものと考えられる。さらに、本研究は再生医療という点においても意義が大きく、脂肪組織由来幹細胞の使用法の幅を広げる研究であったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We had investigated about ovarian tissue transplantation with adipose-derived stem cells (ASCs). Although we had demonstrated effectiveness of ASCs for ovarian tissue transplantation, other research groups also had reported effect of ASCs for ovarian tissue transplantation on several reports. To keep the originality of our research, we had shifted the goal of our research. Now we are investigation the "Cell free therapy" with medium which was used for ASCs culture.

研究分野：生殖医学

キーワード：卵巣組織移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、集学的治療による“がん”治療の発展によって“がんサバイバー”が増加しており、その“サバイバーシップ”に大きな社会的関心が寄せられている。なかでも、妊孕性に対する関心は大きく、化学療法などによって生ずる卵巣機能不全による永続的な不妊症を回避するため、治療前に卵子・受精卵凍結、卵巣組織凍結などの妊孕性温存療法を希望する患者が著しく増加している。さらに研究代表者は、良性卵巣腫瘍手術による卵巣不全発症のリスクも明らかにしており (Takae et al. PLoS One. 2014.)、良性疾患でも術前に妊孕性を温存することにより術後の卵巣機能不全の発症を回避できることが示唆される。従って、妊孕性温存治療の確立と治療成績の向上が急務となってきている。妊孕性温存治療の中で卵巣組織凍結保存では、これまで融解卵巣移植によって得られた児は世界でも未だ 130 例のみと少なく、その成績は決して満足できるものではない。その一因として、凍結融解した卵巣の移植時の虚血や再灌流障害、炎症による多数の卵胞死滅が問題とされており、凍結・解凍よりも重大なダメージであることが指摘されている (Kim et al. Fertil Steril. 2001.)。

卵巣移植を行った際には、血管新生により酸素が再供給され始めるまでの約 5 日間の虚血で、多くの卵胞が死滅することから (Van Eyck AS et al. Fertil Steril 2009)、これまで VEGF や S1P、FGF、hMG、CD34 陽性細胞、Vit E の添加などの血管新生因子や抗酸化剤の投与が検討されてきたが、個々の効果は限定的で、より有効な手段が模索されている。そのような背景のなか、我々は脂肪組織由来幹細胞に着目した。臍帯移植では、脂肪組織由来幹細胞との同時移植により、炎症細胞の浸潤抑制および血管新生による著明なグラフト生存期間の延長が報告されている (Ohmura et al. Transplantation. 2010)。脂肪組織由来幹細胞はあらゆる血液細胞と内皮細胞への分化能をもつ CD34 陽性細胞の割合が骨髄や臍帯血幹細胞に比べて高値であり (Kern et al. Stem Cell. 2006.)、骨髄幹細胞に比べ、細胞増殖が速い、生成促進因子を多く分泌する、

免疫抑制能が高い、といった利点がある。 (Zuk et al. Mol Biol Cell. 2002.)。骨髄幹細胞はこれまで多くの研究や臨床応用に用いられてきたが、骨髄採取の侵襲性の高さや、細胞増幅効率の低さといった問題があり、その適応拡大は容易ではない。また、近年の幹細胞治療の研究では iPS 細胞が注目されているが、その臨床応用には克服すべき点が数多く残されている。脂肪組織由来幹細胞は、比較的低侵襲で容易に細胞が採取でき、創傷、骨移植、急性心筋梗塞などの治療への臨床応用が試みられている。そこで本研究では、卵巣移植の際の脂肪組織由来幹細胞の同時移植により、血管新生の促進と炎症の抑制を図る方法を開発し、移植の際に生ずる卵胞数減少を抑制によって、卵巣組織移植による妊孕性温存療法の成績向上を目指した。

2. 研究の目的

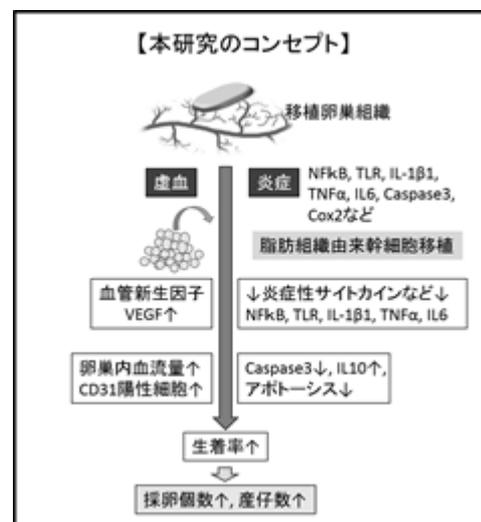
研究代表者らは、これまで『若年がん患者に対する妊孕性温存療法としての卵巣組織凍結保存』に関する臨床研究を進めてきた。近年、卵巣組織凍結・移植の技術は世界的に普及しつつあるが、得られた生児は未だ 130 人のみである。その理由の 1 つとして、凍結融解した卵巣組織を移植した際に生じる虚血や炎症によって、移植卵巣内の卵胞の多くが死滅してしまうことが挙げられる。本研究は、卵巣移植片に対する脂肪由来幹細胞との同時移植による、“より血管新生を促進させ、炎症が抑制された効率的な卵巣移植法”を開発し、若年がん患者の妊孕性温存、ひいては QOL の向上に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

【マウス卵巣における脂肪組織由来幹細胞の血管新生促進効果と炎症抑制効果について】

卵巣移植部位では血管新生がおこり卵巣が生着する。生着できなかった卵巣片は体内において壊死した後に吸収消失してしまう。また、移植時の炎症によっても移植組織は壊死を起こして吸収されてしまう。したがって、移植時の血管新生促進と炎症抑制は、卵巣移植の成績を大きく左右すると考えられる。本年度においては卵巣移植時の脂肪組織由来幹細胞の同時移植による血管新生促進および炎症抑制効果の有無について評価する。

6 週齢マウスの単徑部脂肪を 2-3 mm 角に細切し、既報に則り、コラゲナーゼ処理の後に遠心し、沈殿した有核細胞のみを単離し、初代培養する (Takehara et al. Laboratory investigation. 2013.)。得られた細胞をマルチカラーフローサイトメトリーにて解析し、CD45-かつ CD34+、CD31-であることを確認する。表現型が安定する 3 継代以降の細胞を用いて 1~2x10⁵ 細胞数以上を 20 μl の培養液に懸濁し、ドナーマウスの卵巣とともに 6 週齢レシピエントマウスの腎被膜下へ移植する (処理群)。なお、ドナーには卵胞が均一な 10 日齢マウスを使用し、卵胞の発育程度を比較できる実験系を作成する。また対側の腎臓には、卵巣移植の際に脂肪組織由来幹細胞を含まない培養液を同量注入し、非処理群とする。双方において、処置後に腎被膜を癒着防止吸収性



バリアフィルムによって被覆し、細胞培養液が漏出しないよう工夫する。その後、移植後のマウス卵巣に関して3日後、5日後、2週間後と、タイムコースを決めて血管新生の促進効果と炎症抑制効果を評価する。また、移植部位を卵巣窩、後腹膜、子宮近傍などに変更して、移植部位による差についても検証する。

1) 血管新生促進効果に関する検証

リアルタイム PCR 法およびウェスタンブロッティング法を用いて血管新生マーカーである VEGF および CD31 発現量を処理群と非処理群の間で比較する。また、免疫染色により移植卵巣での VEGF と CD31 の局在と発現の強さを両群間で比較する。さらに、移植後マウスに FITC コンジュゲートを尾静脈注射し、30 分後に屠殺して移植卵巣に含まれる血流量を両群間で比較する。

2) 炎症抑制効果に関する検証

脂肪組織由来幹細胞は、炎症性サイトカインや Caspase3 を減少させ、抗炎症作用や再灌流障害の軽減に寄与することが示されている (Chen et al. Translational Medicine. 2011.)。そこで、卵巣移植における脂肪組織由来幹細胞の炎症抑制効果について、炎症マーカーである CRP や COX2 の発現変化を ELISA 法にて処理群と非処理群の間で比較する。さらに、炎症シグナル伝達に關与する NF κ B、TLR、IL-1、TNF、IL6、IL10 の発現をリアルタイム PCR 法にて定量し、発現変化を両群間で比較する。アポトーシスの状態を検証するため、Caspase3 アッセイを行う。また、TLR および NF κ B のアンタゴニストや抗体を用い、細胞とともに移植した後の炎症効果についても同様に検証する。

【凍結融解卵巣における脂肪組織由来幹細胞による血管新生促進と炎症抑制に関する評価】

前述の実験系を用い、凍結融解後の卵巣に関しても評価を行う。研究代表者らが確立した凍結融解法 (Kawamura, Takae et al. PNAS. 2013.) にて、10 日齢のマウス卵巣を凍結する。凍結後 1 週間で半永久的に保存されることから、凍結 1 週間後に卵巣組織を融解し、移植後に前述の方法で血管新生促進と炎症抑制による評価を行う。

【血管新生促進と炎症抑制による卵巣移植片の生着率向上と卵子の質について】

血管新生促進と炎症抑制効果の併用による移植卵巣の生着率向上について評価する。移植卵巣の生着率が向上すれば、生着した卵巣重量は増加し、移植した内の卵胞も良好に保存され、発育卵胞数が増加し、過排卵処理により排卵数が増加すると考えられる。また、脂肪組織由来幹細胞の同時移植を用いた卵巣移植法で、機能的かつ正常な卵胞を得ることが出来るかを証明することが臨床応用において必須である。そこで、移植卵巣より得られる卵子の質とその正常性を評価する。

1) 血管新生促進と炎症抑制による移植片の生着率評価

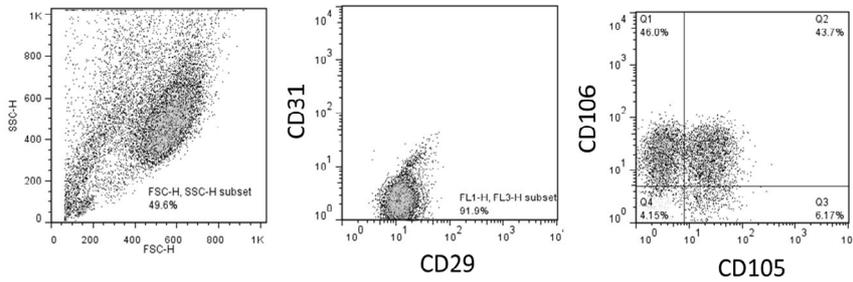
前年度の実験系と同様に、10 日齢マウス卵巣と脂肪組織由来幹細胞を同時に 6 週齢のレシピエントマウスの腎被膜下に移植する (処理群)。移植後 2 週間で卵巣を摘出し、固定後の卵巣重量の変化について非処理群 (卵巣と培養液のみを移植) と比較する。また薄切後 HE 染色し、既報 (Sato, Takae et al. Mol Endo. 2012) に従い、組織学的に各発育段階の卵胞数を計測し、発育卵胞数の増加を調べる。さらに、マウスを過排卵処理した後に移植卵巣を摘出し、排卵前卵胞より採取される成熟卵子数の増加を調べる。なお、血管新生や炎症が移植生着率を左右しているかどうかを検証する確認実験として、VEGF アンタゴニストや LPS (TLR4 アゴニスト) を用いて卵巣移植時の血管新生抑制および炎症惹起による生着効率低下を の方法を用いて検証する。

2) 移植卵巣由来の卵子の質とその正常性

移植した卵巣から得られた卵胞が機能的であるかを調べるために以下の検討をおこなう。前述の方法を用いて卵巣移植を行ったマウスにゴナドトロピンによる過排卵処理を施し、移植卵巣より得られた成熟卵胞に対して体外受精を行う。受精率、胚盤胞到達率について両群間で比較し、得られた胚盤胞期胚を仮親の子宮に胚移植し、産仔率および出生仔と胎盤異常の有無について形態学的評価を行う。また得られた卵胞のエピジェネティックな異常を検証する為に、インプリント遺伝子のメチル化解析を行い、両群間で比較する。

4. 研究成果

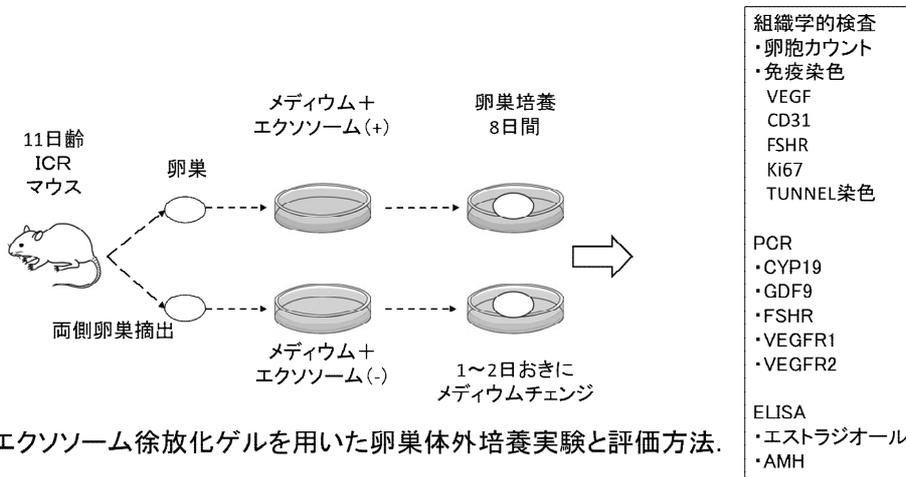
研究代表者らは、卵巣組織移植における脂肪組織由来幹細胞共移植の有用性について開発・検証をおこなった。研究を開始するにあたり、最初にマウスにおける脂肪組織由来幹細胞株の樹立を試みた。成人雄マウスから得られた脂肪組織より樹立した細胞株を FACS にて検証した結果、純度の高い脂肪組織由来幹細胞の細胞株であることを証明した (図参照)。当初はこれらの細胞を卵巣組織移植の際に共移植することにより、月経周期の早期回復、血管新生の促進など、脂肪組織由来幹細胞による卵巣移植の改善効果を証明していた。しかしながら、研究代表者らがこれらの知見を報告する前に、他の研究者らが本法の有用性について報告をした (Damous 2018, Manavella 2018)。そのため、研究の方針を転換せざるを得なくなり、脂肪幹細胞を用いた Cell free therapy へと転換した。Cell free therapy は、幹細胞そのものではなく、幹細胞から分泌される成長因子やエクソソームなどの物質を利用する方法であり、研究代表者らはエクソソームの利用を決断した。エクソソームの効果を長期にわたって発現させるため、これら



図, FACSによる脂肪幹細胞の確認.

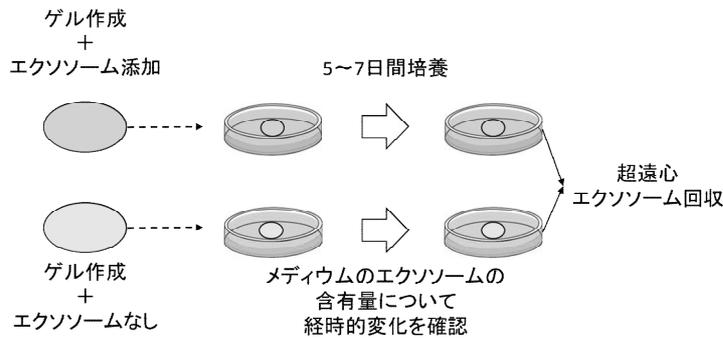
FL-1:CD29, FL-2:CD105, FL-3:CD31, FL-4:CD106

の徐放性ゲルの利用について着想した。その後、複数のバイオマテリアルについて条件を検討した結果、現在は京都大学の研究者らの協力を得て、エクソソームを特異的に徐放するゲルを用いた最適な Cell free therapy の条件検討を進めており、研究自体は継続している状況であり、一定の効果が得られた時点で論文報告することを予定している。実験系としては、以下のものを検討しており、まずは卵巣体外培養の実験系にエクソソームを添加して、その作用を検証する(下図参照)。



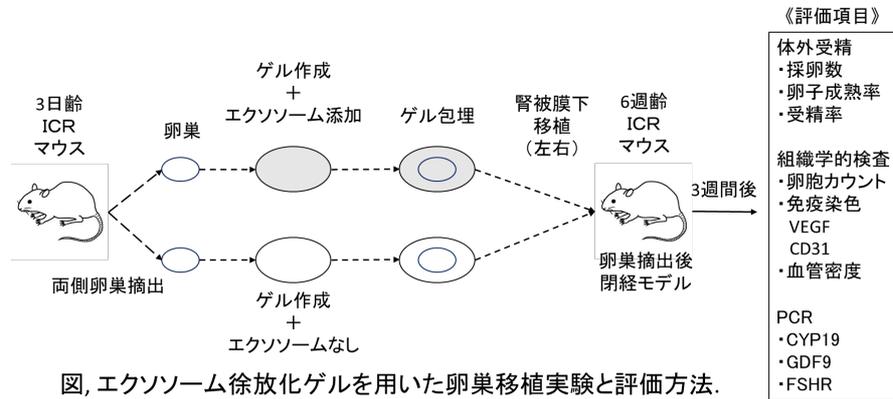
図, エクソソーム徐放化ゲルを用いた卵巣体外培養実験と評価方法.

次に、新規バイオマテリアルを用いてエクソソームの徐放性の確認を行う(下図)。



図, 新規バイオマテリアルによる, エクソソーム徐放の確認.

それらが確認されたところで、実際に卵巣移植の実験系においてエクソソームおよびエクソソーム徐放性のゲルを用い、その効果を検証する予定である(下図)。



5. 主な発表論文等
なし(準備中)

〔雑誌論文〕(計 0 件)
なし(準備中)

〔学会発表〕(計 0 件)
なし(準備中)

〔図書〕(計 0 件)
なし(準備中)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
なし

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)
なし

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 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし：

(2)研究協力者
なし

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。