

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2009

課題番号：18591811

研究課題名 (和文) 性同一性障害患者の卵巣を用いたヒト卵巣組織の凍結保存法の発展と確立

研究課題名 (英文) Cryopreservation of human ovarian tissue derived from gender identity disorder patients

研究代表者

高井 泰 (TAKAI YASUSHI)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60323549

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：性同一性障害、卵巣、凍結保存法、アポトーシス

1. 研究計画の概要

現在のヒト卵巣組織の凍結保存技術には様々な克服すべき問題点があるが、悪性腫瘍の治療により生殖機能の傷害が懸念される女性にとって切実かつ喫緊の課題である。また、直接の研究対象となる性同一性障害患者にとっても、治療の選択肢と可能性を拡大する上で、決して小さくない意義を有すると考えられる。

性同一性障害患者より切除された卵巣は通常の組織学的検査に用いられる以外は廃棄されていたが、本研究では余剰部分から豊富な卵巣組織の提供を受け、種々の方法や実験条件で卵巣組織の凍結・融解を行い、残存卵子数の算出およびアポトーシス関連遺伝子群の発現を検討することで、ヒト卵巣にとって最適な凍結・融解方法の確立を目指す。

また、ヒト卵巣組織を免疫不全 SCID マウスに異種移植し、一定期間後の卵巣組織を同様に検討することで、ヒト卵巣にとって最適な条件の確立を目指す。

更に、ヒト卵巣組織の体外培養を行い、これまでに知られている種々の卵子生存因子を培養系に添加し、一定期間の培養後の卵巣組織を同様に検討することで、ヒト卵巣にとって最適な体外培養系の確立を目指す。

2. 研究の進捗状況

(1) ヒト卵巣組織皮質部における卵胞密度

ヒト卵巣組織を性同一性障害患者から書面による同意を得て採取した。性同一性障害患者はテストステロン製剤の投与により無月経または稀発月経だったが、23-29 歳では 62 ± 32 (37-98) 個/mm³ (平均 ± 標準偏差、最小-最大; 以下同じ)、30-37 歳では 47 ± 43 (2-88) 個/mm³、40-44 歳では 2 ± 2 (1-4) 個

/mm³ の原始卵胞を凍結前の卵巣組織片に認めた。

(2) DAP 法によるヒト卵巣凍結保存および免疫不全マウスへの異種移植

性同一性障害患者から得られた卵巣組織を実体顕微鏡下に 0.5mm 角 (Cryotop 法) または 1.0-2.0mm 角 (DAP 法) に細切した。Cryotop 法では、平衡液 (エチレングリコール (EG)、ジメチルスルホキシド (DMSO) 含有) に室温で 20 分間卵巣組織を浸漬した後、凍結液 (EG、DMSO、ショ糖含有) に 3 分間浸漬してから Cryotop に収容し、液体窒素に投入した。DAP 法では、DMSO を含む PBI 培地に 4 で 5 分間卵巣組織を浸漬した後、冷却した DAP213 液 (DMSO、アセトアミド、プロピレングリコール含有) を加えて 4 で 5 分間処理し、液体窒素に投入した。凍結後融解した卵巣組織を、予め卵巣を部分切除した免疫不全マウス (NOD-SCID マウス) の卵巣嚢内に移植した。異種移植の 4 週間後、Cryotop 法では 12.5% (8 個中 1 個) の組織片が生着したが、DAP 法では 70.0% (10 個中 7 個) の組織片が生着した ($P < 0.05$)。7 個の生着した組織片のうち、4 個で卵胞を認めた。DAP 法でガラス化凍結保存したヒト卵巣組織は、卵胞発育能を有することが示唆された。

(3) Cryotissue 法によるヒト卵巣凍結保存および免疫不全マウスへの異種移植

最近、Cryotop 法を改良した Cryotissue 法によりウシおよびヒト卵巣組織のガラス化凍結保存に成功したとの報告がなされた。そこで、ヒト卵巣組織を 35 人の性同一性障害患者から書面による同意を得て採取した。ヒトでの再移植手術を想定

し、卵巣組織片を大きくし、最終的には10mm四方・厚さ1mmとした。Cryotissue法では、平衡液(エチレングリコール(EG)、ジメチルスルホキシド(DMSO)含有)に室温で25分間卵巣組織を浸漬した後、凍結液(EG、DMSO、ショ糖含有)に15分間浸漬してから液体窒素に投入した。凍結後融解した卵巣組織を、SCIDマウスの皮下に移植した。DAP法で凍結後、融解した卵巣組織では、全卵子の1/3~1/6くらいの頻度で色調・形態が不良な卵子を認め、SCIDマウスに移植した組織片では卵胞を認めることができなかった。一方、Cryotissue法で凍結後、融解した卵巣組織では、色調・形態が不良な卵子の明らかな増加は認めなかった。SCIDマウスに移植した組織片の生着を認めた。ヒト組織片を大きくした場合、今後さらに検討を加える必要があると考えられる。

3. 現在までの達成度 やや遅れている (理由)

ヒトでの再移植手術を想定して卵巣組織片を大きくした場合、小動物で開発・確立された従来のDAP法では安定した成績を得ることが困難であることが示唆されたため、同法の最適化を試みたが良好な成績が得られなかった。

4. 今後の研究の推進方策

(1) SCIDマウスへ移植したヒト卵巣切片における卵胞数・アポトーシスの解析

性同一性障害患者よりインフォームドコンセントを得て卵巣を切除し、Cryotissue法により凍結保存する。得られた新鮮卵巣切片あるいは凍結融解切片を免疫不全SCIDマウスの卵巣嚢内あるいは皮下へ移植し、生体内で培養を行った後、卵巣組織における変化をアポトーシスを指標として観察・評価する。血管新生因子、活性酸素阻害物質、卵子アポトーシス阻害物質などを移植前後に局注し、卵子生存率や卵胞発育の有無を観察する。

(2) ヒト卵巣切片の体外培養系における卵胞数・アポトーシスの解析

性同一性障害患者より得られた新鮮卵巣切片あるいは凍結融解切片を体外培養系(ex vivo system)で培養する。一定期間の培養の後、1)と同様に卵巣組織における変化をアポトーシスを指標として観察・評価する。培養系に卵子生存因子や後期卵胞発育促進因子を添加し、卵子生存率や卵胞発育の有無を観察する。

5. 代表的な研究成果

(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6件)

Takai Y, Matikainen T, Jurisicova A, Kim MR, Trbovich AM, Fujita E, Nakagawa T,

Lemmers B, Flavell RA, Hakem R, Momi T, Yuan J, Tilly JL, Perez GI: Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. *Apoptosis* 12:791-800, 2007. (査読有)
Perez GI, Jurisicova A, Wise L, Lipina T, Kanisek M, Bechard A, Takai Y, Hunt P, Roder J, Grynopas M, Tilly JL: Absence of the proapoptotic Bax protein extends fertility and alleviates age-related health complications in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5229-5234, 2007. (査読有)

Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezaki Y, Kamei Y, Osuga Y, Fujiwara T, Takai Y, Momoeda M, Yano T, Taketani Y: Elevated Serum Bisphenol A Levels under Hyperandrogenic Conditions may be Caused by Decreased UDP-glucuronosyltransferase Activity. *Endocr J* 53:485-491, 2006. (査読有)
Seki H, Matuoka K, Inooku H, Takeda S: TNF-alpha from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line. *J Obstet Gynaecol Res* 33:408-416, 2007. (査読有)

Kobayashi A, Miyake H, Hattori H, Kuwana R, Hiruma Y, Nakahama K, Ichinose S, Ota M, Nakamura M, Takeda S, Morita I: In vitro formation of capillary networks using optical lithographic techniques. *Biochem Biophys Res Commun* 358:692-697, 2007. (査読有)

Nakasato N, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S: A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15. *Biochem Biophys Res Commun* 351:540-546, 2006. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

高井泰, 林直樹, 関博之, 竹田省, 石原理: ヒト卵巣組織のガラス化凍結保存とマウスへの異種移植. 第60回日本産科婦人科学会総会・学術講演会; 4月12-15日; 横浜; 2008.

Takai Y: Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. The 35th Annual Meeting of the Japan Society for Low Temperature Medicine; 11月22日; Tokyo; 2008.

Suekuni K, Takai Y, Suzuki H, Takamatsu A, Harashina T, Hayashi N, Seki H, Takeda S, Ishihara O: Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. 卵巣に関する国際カンファレンス 2007; 11月2-3日; 箱根; 2007.