

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591833

研究課題名(和文)人工毛細血管システム等を用いたヒト卵巣組織の凍結保存・再移植法の発展と確立

研究課題名(英文)Development of novel strategy for fertility preservation using cryopreserved ovarian tissue

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：凍結保存したヒト卵巣組織を融解し、生殖細胞特異的なタンパクであるDDX4に対する抗体を用いた蛍光活性細胞分離法によって、卵子幹細胞(OSCs)とみられる細胞を分離した。ヒトOSCsは4ヶ月以上の培養増殖後も初期生殖細胞特異的な遺伝子および蛋白を維持していた。ヒトOSCsをヒト卵巣組織片に注入し、この組織片を免疫抑制マウスに異種移植すると、1-2週間後に未熟な卵胞を認めた。雌の生殖細胞は出生後に増殖しないという従来の学説の変更を迫る画期的な発見であるとともに、悪性腫瘍患者の妊孕性温存(抗がん剤や放射線治療の前に卵子や卵巣を保存しておくこと)や卵子生成メカニズムの研究にも応用が可能と思われる。

研究成果の概要(英文)：A fluorescence-activated cell sorting-based protocol was used with adult human ovarian cortical tissue to purify rare mitotically active cells that have a gene expression profile that is consistent with primitive germ cells. Once established in vitro, these cells (oogonial stem cells; OSCs) can be expanded for months and can spontaneously generate oocytes, as determined by morphology, gene expression and haploid (1n) status. Injection of the human OSCs into human ovarian cortical biopsies leads to formation of follicles containing oocytes 1-2 weeks after xenotransplantation into immunodeficient female mice. Thus, ovaries of reproductive-age women, similar to adult mice, possess OSCs that can be propagated in vitro as well as generate oocytes in vitro and in vivo.

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：生殖医学 妊孕性温存 卵巣 凍結保存 幹細胞 性同一性障害

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ヒト卵巣組織の凍結保存技術の重要性と問題点

#### ① 悪性腫瘍患者に対する未受精卵子の凍結保存の問題点

若年女性の白血病や乳癌などの悪性腫瘍に対する治療成績が改善されてきたが、抗癌剤・放射線の卵巣毒性や卵巣切除により卵巣機能が失われ、医原性不妊となる症例も少なくない。近年、このような悪性腫瘍症例に対して、未受精卵子の採卵・凍結保存が施行されているが、卵子の凍結保存には排卵誘発剤による卵巣刺激がほぼ必須であり、これにより悪性腫瘍の治療が遅れることが懸念されること、多くとも 20 個程度の卵子しか得られず、その妊娠率も必ずしも高いとは言えないことが問題である。

#### ② ヒト卵巣組織の凍結保存の利点と問題点

一方、卵巣組織の凍結保存は、低侵襲な腹腔鏡下手術を用いて比較的早期に検体が採取できるとともに、卵巣皮質に何千という卵子を含むため、凍結・融解・移植などによる損傷を考慮しても得られる卵子の数、妊娠率が飛躍的に高くなることが期待できる。最近、悪性リンパ腫患者に対して卵巣組織の凍結保存を施行し、治癒後にこれを融解・再移植して妊娠・出産し得たと報告された (Donnez et al., *Lancet* 364:1405-1410, 2004) が、卵巣組織の凍結保存・融解法はいまだ理想的な状況とは言えず、確立されていないのが現状である。最近、研究協力者の香川らは、Cryotissue 法によりヒト卵巣組織のガラス化凍結保存に成功したと報告され、我々も性同一性障害患者から採取した卵巣組織を DAP 法や Cryotissue 法によりガラス化凍結後、免疫抑制マウスに異種移植し、卵胞の発育を得ている。しかしながら、凍結保存・融解した卵巣組織を再移植した場合、移植後の血管再生前に約 70%の原始卵胞が死滅するとも言われており、いかにして移植後の卵子生存率を高めるかが、更なる課題となってきた。また、卵巣組織の患者への同種移植では、移植した組織に腫瘍細胞が含まれている可能性も指摘されている。

### (2) 人工毛細血管システムや血管新生因子徐放製剤による血流再生

移植組織の生着において、局所へ血液を供給するための血管は不可欠である。通常、血管新生によって虚血部位への血流供給が行われるが、*ex vivo* において人工的に血管を作成し移植する事により早期の血流回復が期待される。近年、連携研究者である東京医科歯科大学大学院医歯薬総合研究科・森田育男研究室では、印刷技術を用いた *in vitro* capillary formation 法を用いて人工的にデザインした毛細血管網を作成することに世界に先駆けて成功した (Kobayashi et al., *Biochem Biophys Res Commun* 358:692-697, 2007)。更に、連携研究者・赤

堀は同技術を更に発展させ、ウシ内皮細胞で作成した人工毛細血管システムをヌードマウスの皮下に異種移植し、生体内でも血管として機能させることに成功した。

また、近年、血管新生因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含有した徐放製剤を下肢血管障害患者の虚血部位に局所投与することにより早期に血流が再生し、疼痛や潰瘍の軽減を得たとの報告がなされ (Marui et al., *Circ J* 71:1181-1186, 2007)、冠動脈疾患などへの応用も期待されている。

更に、連携研究者である帯広畜産大学教授・鈴木らは、凍結イヌ卵巣組織の SCID マウスへの異種移植において、血管新生因子であるアシアロエリスロポエチンの局所投与により、卵子残存率の改善を得た (Suzuki H et al., *J Assist Reprod Genet* 25:571-575, 2008)。

これら最新の再生医学技術を応用することにより、移植したヒト卵巣組織への早期の血流供給を促進することにより、移植したヒト卵巣組織の生着率や卵子残存率を改善できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

ヒト卵巣組織の凍結保存と融解・再移植は、悪性腫瘍の治療により生殖機能の傷害が懸念される若年女性にとって切望される生殖技術であるが、その妊娠率はいまだ低く、再移植時の生着率や卵子残存率をいかに高めるかが喫緊の課題である。本研究では、性同一性障害患者から得られた卵巣組織を、従来の緩慢凍結法に比べて簡便でヒト卵巣組織の凍結保存に最適化した Cryotissue 法により凍結し、申請者らが近年開発した人工毛細血管システムと種々のヒト血管新生因子徐放剤の存在下に免疫抑制マウス等に再移植することにより、従来より効率の良い凍結・再移植系を確立し、悪性腫瘍患者等に臨床応用することを目的とする。

また、凍結した卵巣組織を融解して FACS 法などを用いて卵子幹細胞を分離同定し、種々の方法や実験条件でこれを増殖させ、卵子に分化させる。成人のヒト卵巣においても、実験動物同様に生殖幹細胞が存在し、増殖させることが可能であること、卵子に分化させることが可能であることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 性同一性障害患者より提供された卵巣を、Cryotissue 法で凍結後に融解し、各種の卵子生存因子や血管新生因子徐放剤の存在・非存在下に免疫不全 SCID マウスへ異種移植する。2-4 週間後に残存卵胞数およびアポトーシス関連遺伝子群の発現を比較・検討する。

(2) ヒトの末梢血から血管内皮前駆細胞を得て人工毛細血管システムを作成し、ヒト卵巣組織と同時に免疫不全マウスに異種移植し、同様に検討することで、更なる生着率・

卵子残存率の改善を目指す。

(3) 凍結・融解後の卵巣組織片を卵子生存因子や卵胞発育促進因子の存在下に体外培養し、卵子生存率の改善や卵胞発育の有無を検討する。

(4) 凍結卵巣組織を融解後、酵素処理によってばらばらの細胞集塊とし、生殖細胞特異的抗原である DDX4 を用いた FACS 法によってごく少数の細胞を分離抽出する。RT-PCR および免疫染色によって VASA、DAZL、OCT4、STELLA など生殖細胞特異的遺伝子や蛋白の発現の有無を検討する。得られた細胞を継代培養し、DDX4 の発現や生物学的特性を引き続き有するかどうかを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 卵巣組織からのヒト卵子幹細胞 (OSCs) の分離

性同一性障害に対する性別適合手術を受けた 20 代から 30 代前半までの 6 人の卵巣を Cryotissue 法で凍結保存した。この凍結ヒト卵巣組織を融解した細胞懸濁液から、従来の分離法 (Zou K et al, Nat Cell Biol 11:6361-6362, 2009) を改良した、生殖細胞特異的な RNA helicase である DDX4 (DEAD box polypeptide 4) の細胞外ドメインを認識する抗体を用いた FACS (蛍光活性細胞分離法) によって、OSCs とみられる細胞を分離した (図 1)。このヒト OSCs は直径 5-8 $\mu$ m の細胞で、卵巣中にごくわずかに (懸濁生細胞中の約 1.7%) 存在し、PRDM1、DPPA3、IFITM3、TERT などの初期生殖細胞に特異的な mRNA を発現していた (図 2)。ヒト OSCs を、マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を feeder として 4-8 週間培養したところ、MEF 非存在下で安定的に増殖する細胞が得られ、4 ヶ月以上の培養後も前述した初期生殖細胞特異的な mRNA および蛋白を発現していた (図 3)。ヒト OSCs は対象とした 6 人全ての卵巣から得られた。

図 1 凍結ヒト卵巣組織から分離されたヒト卵子幹細胞 (OSCs)

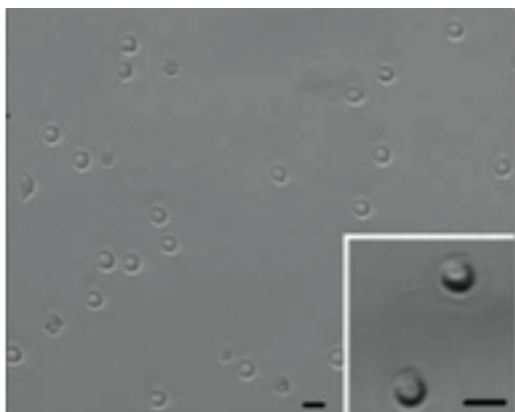


図 2 ヒト OSCs における生殖細胞特異的 mRNA の発現

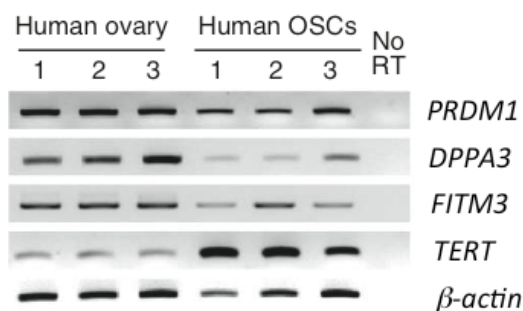
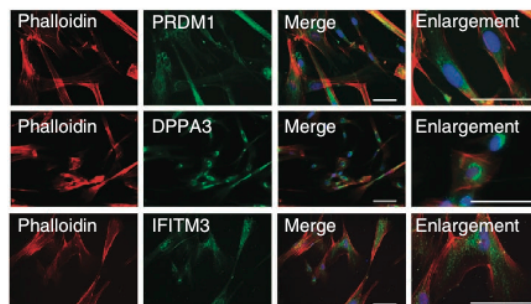


図 3 継代培養したヒト OSCs における生殖細胞特異的蛋白の発現



(2) ヒト卵子幹細胞 (OSCs) からの卵子の産生

培養ヒト OSCs では、継代の 72 時間後をピークとして直径 35-50 $\mu$ m の大きな細胞が産生された (図 4)。この大細胞は DDX4、KIT、YBX2、LHX8 などの mRNA および蛋白を発現しており、卵母細胞と考えられた。更に継代 72 時間後のヒト OSCs では減数分裂特異的な DMC1 および SYCP3 の発現を核に認め (図 5)、FACS を用いた核 DNA 量分析では生殖細胞 (卵子) と思われる 1n 細胞を認めた (図 6)。

また、ヒト OSCs を GFP で標識してからヒト卵巣組織の細胞懸濁液と培養したところ、24 時間後には直径 50 $\mu$ m 超の大きな GFP 陽性細胞を小さな GFP 陰性細胞が取り囲む卵胞に類似した構造を認めた (図 7)。これは、ヒト OSCs から卵母細胞が産生され、卵巣組織懸濁液中の顆粒膜細胞が周囲に結合したものと考えられた。更に GFP 標識ヒト OSCs をヒト卵巣組織片に注入し、この組織片を免疫抑制マウスに異種移植すると、1-2 週間後に GFP 陽性細胞を扁平な細胞が取り囲んだ原始卵胞を認めた (図 8)。この GFP 陽性細胞は卵母細胞特異的な LHX8 および YBX2 を発現しており (図 9)、特に YBX2 は減数分裂の複糸期 (相同染色体の対合・交差・相同組み替えが起こる) に特異的なマーカーである点が重要である。倫理的・法的理由からヒト OSCs から得られた卵子をヒト精子と受精させることはできなかったが、同様の方法でマウス卵巣から分離された細胞を GFP で標識して成体マウスの卵巣に移植し、ゴナドトロピン製剤によって排卵誘発したところ、GFP を発現した成

熟卵子が得られ、マウス精子との体外受精で胚盤胞が得られた。なお、従来の分離法で得られた卵子幹細胞を GFP で標識して不妊マウスの卵巣に注入したところ、GFP を発現する産仔が得られている。

図 4 ヒト OSCs から生成された大細胞

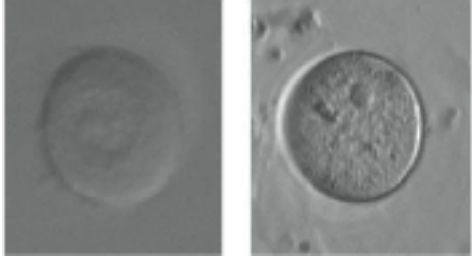


図 5 ヒト OSCs における減数分裂特異的蛋白の発現

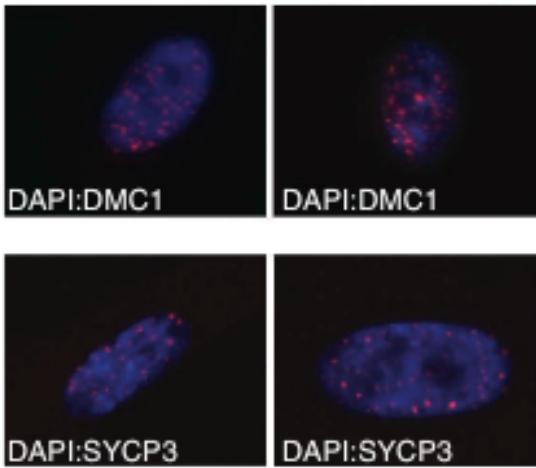


図 6 ヒト OSCs からの 1n 細胞の生成

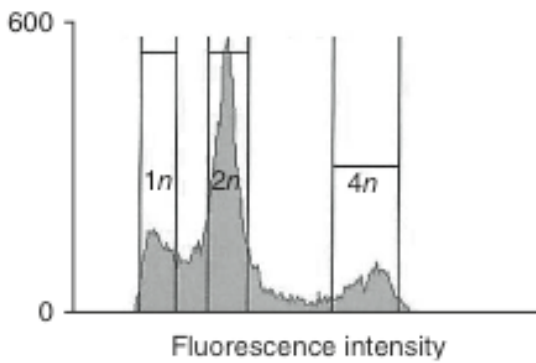


図 7 ヒト OSCs による *in vitro* での卵胞類似構造の形成

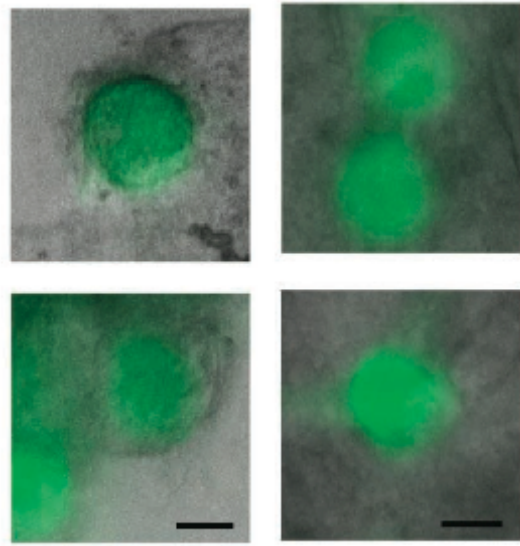


図 8 GFP 標識ヒト OSCs を注入したヒト卵巣組織

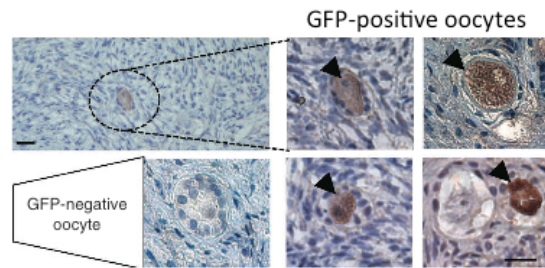
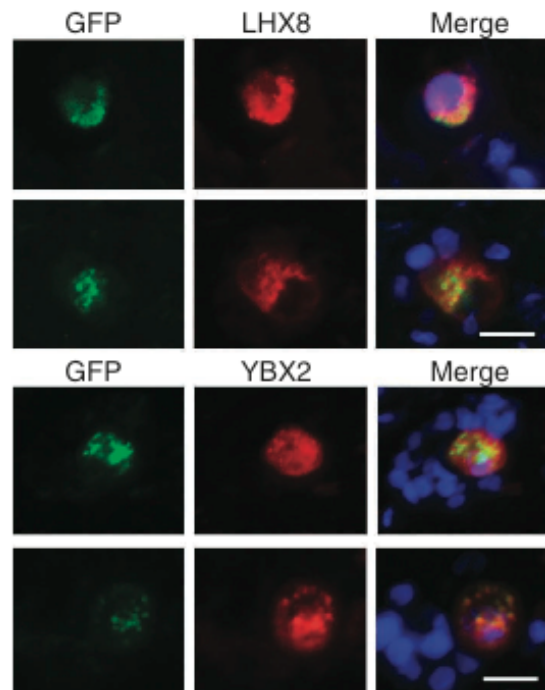


図 9 GFP 標識ヒト OSCs 由来卵胞での卵母細胞特異的蛋白の発現



以上の知見は精子幹細胞研究で広く受け入れられた手法を応用して得られたものだ

が、凍結保存したヒト卵巣組織からヒト OSCs が分離・同定され、卵子が産生されることを強く示唆している。また、ヒト OSCs は数ヶ月以上にわたって分裂・増殖が可能であり、雌性生殖細胞は出生後に増殖しないという従来の学説の変更を迫る画期的な発見でもある。更に、ヒト OSCs を注入したヒト卵巣で、わずか 1-2 週間のうちに OSCs 由来の原始卵胞が認められたことより、ヒト成人卵巣においても、他の動物同様に、卵胞新生を支持する仕組みが存在することが示唆された。

#### 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 92 件)

1. 高井 泰: 【幹細胞と生殖医学】 卵子幹細胞. 産科と婦人科 81: 329-335, 2014, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/0226090006> (査読なし)
2. Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O (他 4 名) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2005. Fertil Steril 101: 366-378, 2014, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188870> (査読有)
3. Ishihara O, Araki R, Kuwahara A (他 3 名) : Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: an analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan. Fertil Steril 101: 128-133, 2014, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24268706> (査読有)
4. 高井 泰: 卵子幹細胞研究の最近のトピック. 臨床婦人科産科 67: 172-176, 2013, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2013077661> (査読なし)
5. 高井 泰: 【生殖系列細胞の凍結】 卵子の凍結保存. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 20: 141-147, 2013, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2013214457> (査読なし)
6. 梶原 健, 高井 泰, 岡垣 竜吾(他 2 名、5 番目), 田谷 順子, 石原 理: 【生殖系列細胞の凍結】 わが国の生殖補助医療における卵子・胚凍結の現状. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 20: 149-154, 2013, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2013214458> (査読なし)
7. 高井 泰, 関 博之, 石原 理: 【不妊と周産期医療】 卵子、卵巣の凍結技術の進歩. 周産期医学 42: 979-983, 2012, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2012322222> (査読なし)
8. White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H (他 1 名) L: Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. Nat Med 18: 413-421, 2012, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366948> (査読有)
9. Suzuki H: Cryopreservation of canine embryos and resulting pregnancies. Reprod Domest Anim 47 Suppl 6: 141-143, 2012, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23279484> (査読有)
10. 高井 泰, 関 博之, 石原 理: 【卵子のエイジング】 生殖医療の将来 卵巣凍結. 産科と婦人科 78: 987-991, 2011, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2011285025> (査読なし)
11. 石原 理, 高橋 幸子, 梶原 健(他 2 名、5 番目) : 【性ステロイドホルモン製剤の使い分け】 性ステロイドホルモンの臨床応用 性同一性障害と性ステロイド. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 18: 157-162, 2011, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2011249455> (査読なし)
12. 石原 理, 岡垣 竜吾, 高井 泰: ホルモン/卵巣機能/ヘルスケア 性同一性障害 (GID: Gender Identity Disorder). 産婦人科学レビュー 2011: 163-166, 2011, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2011270071> (査読なし)
13. Ishihara O, Kuwahara A, Saitoh H: Frozen-thawed blastocyst transfer reduces ectopic pregnancy risk: an analysis of single embryo transfer cycles in Japan. Fertil Steril 95: 1966-1969, 2011, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377154> (査読有)
14. Akahori T, Kobayashi A, Komaki M (他 6 名、9 番目) : Implantation of capillary structure engineered by optical lithography improves hind limb ischemia in mice. Tissue Eng Part A 16: 953-959, 2010, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19947885> (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

1. 高井 泰: がん・生殖医療のこれからのために. 岐阜県がん・生殖医療ネットワーク GPOFs 2014 ミーティング, 岐阜, 2 月 14 日, 2014
2. 高井 泰: 女性血液疾患患者の妊孕性温存 1- 卵子凍結、胚凍結. がんと生殖に関するシンポジウム 2014-血液疾患患者さんの妊孕性温存対策のこれからのを考える-, 東京, 2 月 2 日, 2014
3. 高井 泰: 卵子老化と生殖医療. 第 30 回埼玉県母性衛生学会総会・学術講演会, さいたま, 11 月 30 日, 2013
4. Takai Y: Recent Progress and New Trends of ART in Japan - A brief review



for oogonial stem cells in human ovary. The International Federation of Fertility Societies 21st World Congress on Fertility and Sterility Regional Meeting, Boston, MA, Oct 14, 2013

5. 高井 泰: 乳がん患者に対する妊孕性温存～がん生殖医療 update～. 12th Kyushu Brest Cancer Workshop～ホルモン療法の基礎と臨床～, 福岡, 7月6日, 2013
6. 高井 泰: 卵子幹細胞研究の現状と未来. 第125回関東連合産科婦人科学会総会・学術集会, 6月16日, 2013
7. 高井 泰: 妊孕性温存療法の提言その1-卵子凍結, 胚凍結. がんと生殖に関するシンポジウム 2013-妊孕性温存の診療を考える-, 東京, 4月21日, 2013
8. 高井 泰: 最新情報提供セッション「生殖医療・生殖医学研究とGIDのたいせつな関係」GIDと卵子幹細胞. GID(性同一性障害)学会第15回研究大会, さいたま, 3月23-24日, 2013
9. 高井 泰: 生殖医療と遺伝カウンセリング 最近の諸問題 卵子凍結, 卵子提供, 卵子幹細胞. 第57回日本生殖医学会学術講演会, 長崎, 11月8-9日, 2012
10. 高井 泰: シンポジウム「Oncofertility: 生殖医療と腫瘍科学の融合」がん・生殖医療における生殖補助医療の現状と課題. 第30回日本受精着床学会学術講演会, 大阪, 8月30-31日, 2012
11. 高井 泰, 林直樹, 大久保 貴司(他5名, 7番目と8番目): 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-臨床応用に向けて. 第62回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 東京, 4月23-25日, 2010

〔図書〕(計5件)

1. 高井 泰: 胚凍結. がん・生殖医療-妊孕性温存の診療, 鈴木直, 竹原 祐編. 東京, 医歯薬出版, 156-165, 2013
2. 高井 泰: 絨毛検査, 羊水検査, 臍帯穿刺, 児頭採血, 母体血による胎児診断. 目でみる妊娠と出産, 東京, 文光堂, 76-77, 2013
3. 高井 泰: 卵子幹細胞. 卵巣組織の凍結・移植-新しい妊孕性温存療法の実践, 鈴木直編. 東京, 医歯薬出版, 139-148, 2013
4. 高井 泰: がん細胞の再移入に関して. 卵巣組織の凍結・移植-新しい妊孕性温存療法の実践, 鈴木直編. 東京, 医歯薬出版, 103-113, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

赤堀 太一 (AKAHORI TAICHI)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90573171

関 博之 (SEKI HIROYUKI)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20179328

石原 理 (ISHIHARA OSAMU)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70176212

森田 育男 (MORITA IKUO)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 60100129

鈴木 宏志 (SUZUKI HIROSHI)  
帯広畜産大学・原虫病センター・教授  
研究者番号: 60333473

橋本 フミ恵 (HASHIMOTO FUMIE)  
城西大学・薬学部・教授  
研究者番号: 10077977

徳留 嘉寛 (TOKUDOME YOSHIHIRO)  
城西大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 70409390