

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24年6月4日現在

機関番号：11401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22791512  
 研究課題名（和文）凍結保存卵巣からの卵子再生：効率的な妊娠への新たな手技の確立  
 研究課題名（英文）Regeneration of oocytes from frozen ovaries: establishment of novel method for efficient pregnancy  
 研究代表者  
 熊澤 由紀代（KUMAZAWA YUKIYO）  
 秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：70400504

研究成果の概要（和文）：本研究では、卵巣断片を体外培養下で PI3K/PKB 経路を刺激することで休眠している原始卵胞を活性化させ、その卵巣断片を体内に移植することで活性化原始卵胞を發育させ、最終的に排卵前卵胞まで達した卵胞より成熟卵子を回収した。さらに、体外受精胚移植を行い、正常な産子を得た。この手法は、卵胞發育が認められない不妊患者のうち、原始卵胞が残存している患者への卵子再生による自らの卵子を用いた妊娠成立への新たな手法の開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we could activate dormant primordial follicles following the in vitro treatment of ovarian fragments to stimulate PI3K/PKB signaling system. The transplantation of these cultured ovarian fragments allowed to grow the activated primordial follicles to preovulatory stage. We could retrieve mature oocytes from the preovulatory follicles and normal pups were delivered after in vitro fertilization and embryo transfer. This method is expected to develop a novel method for pregnancy by using autologous oocytes in patients who lack follicle development but have residual primordial follicles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：産婦人科学

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：原始卵胞、卵胞發育、PTEN、PI3K、ゲノムインプリンティング

1. 研究開始当初の背景

卵巣には卵子の源たる卵母細胞を含む原始卵胞が多数存在する。原始卵胞は各性周期において活性化され、發育卵胞となり下垂体からのゴナドトロピンの作用により發育を続ける。排卵刺激となる黄体ホルモン

(luteinizing hormone:LH)の多量分泌(LHサージ)により、卵胞内の卵母細胞は第一減数分裂を完了し、二次卵母細胞となり排卵され、精子との受精に備える。

悪性腫瘍、ターナー症候群、早発閉経などでは、化学療法・放射線治療のためや病

態の進行により卵巣内の原始卵胞が喪失し、卵巣機能不全に陥り不妊となる。これに対して、卵巣機能不全になる前に卵巣を摘出、小さな断片として体外で凍結保存し、治療後あるいは妊娠希望のときに卵巣を解凍・移植することで、移植した卵巣が生着して卵子が再生されることが期待される。この方法により、2007年7月までに、世界で6人の妊娠例、4人の出産例が報告されているが、いずれも多数の卵巣断片を移植しており、その生着期間も短い。従って、一個の卵巣断片あたりの卵子回収率は非常に悪く、この点が改善されなければ、臨床に応用できない。特に原疾患が悪性腫瘍の場合、移植する卵巣を病理組織学的に十分検索しても100%確実に悪性腫瘍細胞の存在を検出できる方法はなく、移植する断片数が多いことはリスクを伴う。

卵巣における卵胞発育は、ゴナドトロピンにより制御されていることが知られている。しかし、初期の卵胞発育はゴナドトロピン非依存性であり、局所因子の関与が考えられている。移植された卵巣断片には、多数の原始卵胞が含まれるが、ゴナドトロピン依存性発育を示す卵胞は極わずかである。卵巣断片の生着期間を延長するには、血行再構築の問題から限界がある。卵巣断片に存在する原始卵胞を活性化することにより、ゴナドトロピンに反応する卵胞を得るほうが効率がよい。

しかし、原始卵胞の活性化については、未だ不明の部分が多い。近年、卵子特異的なノックアウトマウスの表現型解析から、phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN)が原始卵胞の活性化に関与している可能性が報告された(1-2)。原始卵胞内卵母細胞におけるPTENのgene deletionにより、原始卵胞の活性化が認められた。このことは、PTENは原始卵胞の活性化を抑制しており、PTENによる抑制機構が解除されると原始卵胞が活性化されることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、卵巣断片を体外にてPTEN抑制剤処理をすることで、原始卵胞を活性化させ移植した卵巣断片からの効率的な卵子再生を試み、妊娠成立への新たな手法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### マウスを用いた動物実験

(1)生後3日目のマウス卵巣には発育卵胞は認められず、ほとんどが原始卵胞である。そこで、その卵巣を摘出し、体外でPTEN抑制剤(bpv(pic))を作用させ、原始卵胞の活性化を誘導する。後述の検討方法により、

原始卵胞の活性化を評価して卵巣培養におけるbpv(pic)の至適濃度、培養時間を決定する。

(2)PTEN抑制剤で処理した卵巣と非処理の卵巣を、卵巣を切除した同系統の成体マウスに移植する。卵巣切除は、内因性の卵胞発育ホルモン(follicular stimulating hormone:FSH)の基礎レベルを上昇させ、卵胞発育に適した状態にするために行う。また、移植部位は、血流の豊富な腎被膜下、広背筋内を候補として検討する。移植後経時的に卵巣を採取し、組織学的に卵巣内の卵胞発育を調べ、PTEN抑制剤処理群、非処理群の比較を行う。PTENは癌抑制因子としても知られていることから、この一時的な処理により、移植卵巣に癌が発生しないかどうかについて、移植後3, 6, 12, 18ヶ月の長期間にわたって検討する。

(3)マウスにFSHを投与して卵巣刺激を行い、卵胞発育を促進させて排卵前卵胞まで発育させる。マウスでは、FSHによる卵胞発育は48時間で排卵前卵胞に到達するため、FSH投与後、48時間でLHを投与して卵子成熟を誘導する。

(4)マウスの卵子成熟は、LH投与後10-12時間で完了し、成熟した卵子は12-14時間後に排卵される。従って、LH投与後10時間で卵巣を摘出し、卵巣内の排卵前卵胞から成熟卵子を機械的に単離して、同系統の雄マウスより採取した精子を用いて体外受精を行う。受精卵を妊孕性のある雌マウスの子宮内に移植して妊娠の有無について検討する。この手法により得られた成熟卵のゲノムインプリンティング異常の有無について、当該遺伝子のメチル化を比較検討する。

(5)受精卵の移植によって得られた仔に対して、組織学的検索、行動異常の有無、妊孕性、寿命の検討などを行い、本法の安全性について十分に検討する。

動物実験モデルを確立した後、ヒト検体を用い以下の研究を行う。本研究は、当大学および関連学会の倫理委員会の許可を受けて行う。ヒト検体は、十分なインフォームドコンセントの後、同意を得られた場合にのみ使用する。

(1)当科において、良性卵巣腫瘍の診断で手術により切除した卵巣から、正常卵巣の部分採取し、1-5mm角の卵巣断片を作製する。これまでの報告から、卵巣凍結に適していると考えられているvitrification法

にて卵巣断片を凍結する。解凍後に、動物実験にて至適化した条件で PTEN 抑制剤を作用させ、原始卵胞の活性化を誘導する。

(2)PTEN 抑制剤で処理した卵巣と非処理の卵巣を、卵巣を切除した免疫抑制マウス(SCID マウス)に異種移植する。動物モデルと同様に、経時的に卵巣内の卵胞発育を調べ、PTEN 抑制剤処理、非処理群の比較を行う。移植卵巣断片に癌が発生しないかどうかについても検討する。

(3)移植卵巣断片にゴナドトロピン反応性の卵胞が認められる時期を特定できたら、FSH、LH を順次投与して卵胞発育を促進させ、卵子成熟を誘導する。免疫抑制マウスより移植したヒト卵巣断片を摘出し、卵巣内より成熟卵子を採取する。

#### 4. 研究成果

(1)生後 3 日目のマウスの卵巣を摘出し、体外で PTEN 抑制剤(bpv(pic))を作用させ、原始卵胞の活性化を誘導を試みた。PTEN 抑制剤で処理した卵巣と非処理の卵巣を、卵巣を切除した同系統の成体マウスに移植し、各条件の至適化を行った。移植部位は、血流の豊富な腎被膜下が最も適していた。bpv(pic)の至適濃度、培養時間はまだ検討の余地がある。組織学的に卵巣内の卵胞発育を検討したところ、上記条件で原始卵胞の活性化が確認された。レシピエントマウスの寿命に相当する長期観察期間中に、一時的な PTEN 抑制剤処理を施した卵巣が移植後に癌を発生することはなかった。卵巣移植翌日より FSH 投与を開始し、18 日後には LH 刺激に反応する卵胞の発育が認められた。LH 投与後 10-12 時間で卵巣を摘出し、卵巣内の排卵前卵胞から卵子を圧出したところ、成熟卵子が得られた。得られた卵子を同系統の雄マウスより採取した精子を用いて体外受精を行い、受精卵を偽妊娠マウスの子宮内に移植して産子を得ることができた。出生マウスは組織学的検索、行動異常の有無、妊孕性、寿命の検討において全て正常であった。成熟卵のインプリンティング遺伝子のメチル化解の結果、ゲノムインプリンティング異常は認められなかった。

(2)良性卵巣腫瘍の診断で手術により切除した卵巣から、正常卵巣の部分を採取し、1-5mm 角の卵巣断片を作製した。vitrification 法を用いて卵巣断片を凍結保存した。解凍培養-移植の準備が整った状況で卵巣断片を解凍した。解凍卵巣断片を PTEN 抑制剤の存在下で培養し、休眠原始卵胞の活性化が誘導されることを確認した。PTEN 抑制剤で処理した卵巣と非処理の卵巣を、卵巣を切除した免疫抑制マウス(SCID マウス)に異種移植した。ヒ

トでは原始卵胞から成熟した胞状卵胞に達するまで 6 ヶ月以上かかることが知られていることから、FSH を 6 か月投与し最後に hCG を投与して卵子成熟を誘導して成熟卵子を採取することに成功した。得られた卵子は紡錘体など構造上は正常であった。倫理的観点からこの時点では受精実験は行わなかった。マウスと同様、移植卵巣断片に癌の発生は認めなかった。

今後、DNA マイクロアレイを用いてこの手法により得られた成熟卵および受精卵と体内で発育した成熟卵、受精卵との遺伝子発現プロファイルの比較検討し、卵子の正常性について更に検討を行い、臨床応用を目指して研究を継続する予定である。

#### 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 Kawamura K, Kawamura N, Kumazawa Y, Kumagai J, Fujimoto T, Tanaka T. Brain-Derived Neurotrophic Factor/Tyrosine Kinase B Signaling Regulates Human Trophoblast Growth in an in Vivo Animal Model of Ectopic Pregnancy. *Endocrinology*, 152, 1090-1100, 2011, DOI: 10.1210/en.2010-1124, 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ①熊澤由紀代, 小川正樹, 佐藤朗, 長尾大輔, 森耕太郎, 鎌田久美子, 寺田幸弘 (2011) 羊水過多症における羊水糖濃度測定の有効性. 第 47 回日本産科・新生児医学会, 2011.7.10~12, 札幌
- ②熊澤由紀代, 熊谷仁, 河村和弘, 白澤弘光, 児玉英也, 寺田幸弘 (2011) 腹腔鏡下手術後の痛みについての検討. 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2011.8.29~31, 大阪
- ③熊澤由紀代, 白澤弘光, 熊谷仁, 児玉英也, 寺田幸弘 (2011) 子宮腺筋症症例における IVF による妊娠の予後. 第 49 回日本生殖医学会, 2011.10.15, 福島

[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

熊澤 由紀代 (KUMAZAWA YUKIYO)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70400504

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：