

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462792

研究課題名(和文) 同性間生殖臓器移植における細胞導入の解析

研究課題名(英文) Homosexual genital organ transplantation and analysis of germ cell trafficking

研究代表者

難波 祐三郎 (NAMBA, YUZABURO)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：00335605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生殖組織移植による生殖機能の再建の可能性は性同一性障害のみならず、腫瘍切除後の再建にも重要なテーマである。同性間の精巣移植においては超微小外科手技による低侵襲移植法を確立し、テストステロン分泌と精子形成がより高い成功率で得られた。卵巣移植においてもエストロゲンの産生と妊孕性を確認した。GFPトランスジェニックラットを用いた実験ではgerm cell traffickingは実証できなかった。陰茎移植手技を確立し今後連続した陰茎精巣同時移植へ改良予定である。

研究成果の概要(英文)：Reconstruction of the reproductive function with genital organ transplantation is important theme for patients who has gender identity disorder or reproductive disorder due to tumor resection. We modified our super-microsurgical testis transplantation procedure at homosexual model, and acquired minimally invasive result. In the testis transplantation models, we recognized testosterone secretion and sperm formation at higher rate. In the ovary transplantation models, we recognized estrogen secretion and pregnancy. In the transplantation model using GFP-transgenic rats, germ cell trafficking could not be demonstrated. We established penis transplant procedure. And we would like to improve this method to penis-testis co-transplantation.

研究分野：形成外科

キーワード：生殖臓器移植 性同一性障害 生殖細胞導入

1. 研究開始当初の背景

我々は2001年1月から国内2施設目となる性同一性障害患者に対する性別適合手術を開始、2010年には国内初となる岡山大学病院ジェンダーセンターを設立し、性同一性障害の治療の他、性分化疾患および外性器の再建を行っている。

現在の性別適合手術では形態上近似したものを形成できるが、生殖機能までを再建することは不可能であり、また精巣・卵巣を含む悪性腫瘍切除後の再建においても同様の問題が存在する。生殖臓器の形成手術における最終目標は、期間限定型を含む生殖可能な性器を再建するということである。

以前より、成熟個体における生殖細胞は卵巣または精巣原基より形成され、その幹細胞は成長過程でそれぞれの生殖原基に移動が完了されているものとされていた。特に卵母細胞の増殖は胎生期のみで起こり、出生直後にはその増殖能は失われると信じられていたが、骨髄中には卵母細胞になり得る Germline stem cell (生殖幹細胞) が存在することが報告された⁽¹⁾。同様に精巣の生殖幹細胞も骨髄から供給されることが報告されている⁽²⁾。

生殖幹細胞の移動現象 (cell trafficking) が生殖臓器を移植した際にも発生するかは不明であるが、これが起こるのであれば、生殖臓器移植の未来が大きく開かれる。

<引用文献>

(1) Johnson J et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 122: 303-315, 2005

(2) Nayernia K et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cell. *Laboratory Investigation*. 86: 654-663, 2006

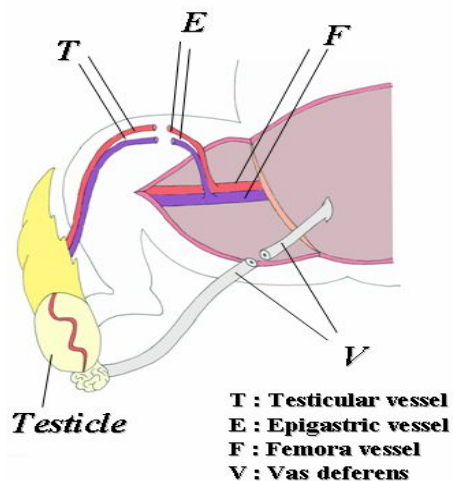
2. 研究の目的

生殖臓器移植を臨床応用するにあたり、他者から移植された精巣および卵巣から造られる精子・卵子の遺伝子が、レシピエント由来になり得るかということは非常に重要な問題である。本研究の目的は動物実験でこの現象を検証し、臨床応用への道を探求することにある。

前回の研究 (課題番号 22591995) では、男性から女性への性転換症患者と女性から男性への性転換症患者間での交換型生殖臓器移植を想定して、ラットを用いた異性間での同時生殖臓器移植を研究した。残念ながらメスラットに移植した精巣において正常な精子形成が認められず、Cell trafficking を確認することが出来なかった。その結果を踏まえ、今回は精巣癌あるいは卵巣癌拡大切除後の再建における期間限定型精巣・卵巣移植を想定し、同性ラット間での生殖臓器移植における Cell trafficking 現象の解析を目的とした。

3. 研究の方法

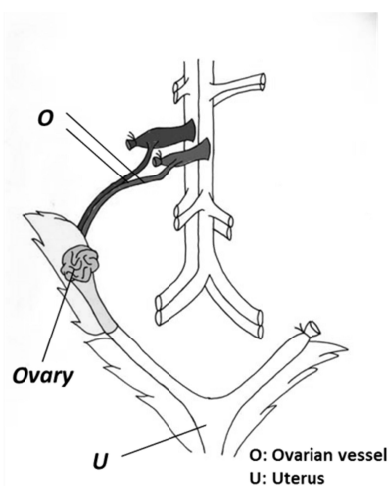
(1) ラット低侵襲生殖臓器移植モデルの確立



低侵襲精巣移植のシエマ

手技確立のため Syngeneic な移植モデルとして成熟 LEW ラット間でモデル作成を行う。生殖臓器移植は、精巣動静脈あるいは卵巣動脈を栄養血管とし手術用顕微鏡下に血管吻合を行い完成させる。

従来の Sun Lee モデルは donor vessel の大動静脈を recipient vessel の大動静脈に end to side に血管吻合するものであった。精巣移植における我々の方法は精巣動静脈 (donor vessel) を大腿動静脈の分枝である superficial epigastric vessel (recipient vessel) に血管吻合するものである。ただし卵巣移植は従来法である。そして鼠蹊部の皮下に睾丸あるいは卵巣を留置する。精巣移植では腹腔内操作を行わない低侵襲手術が可能となる。



卵巣移植のシエマ

移植 2 ヶ月後に血清テストステロンあるいはエストロゲン値を測定、また移植組織標本作製し、精細管構造、セルトリ細胞、精子形成能あるいは卵巣構造、卵子形成能の検証を行う。

(2) 免疫抑制剤投与における影響の評価

実際の臨床応用を考慮し、生殖臓器移植モ

デルを Allogeneic に作成して解析する。成熟 BN ラット (ドナー) 成熟 LEW ラット (レシピエント) を用い、FK506 (0.64mg/kg) を投与する。プロトコールは 2 週間連日、3 週目、4 週目投与とする。術後 2 ヶ月目に (1) と同様の解析を行う。

(3) GFP-トランスジェニックラットを用いた生殖細胞の幹細胞研究

(1) で確立した生殖臓器移植モデルを GFP-Tg ラット - LEW ラット間で作成し、レシピエント骨髄から移植臓器内に供給される生殖幹細胞の細胞移動現象 (cell trafficking) を明らかにする。LEW ラット (8 週齢) をドナー、GFP-Tg ラット (8 週齢) をレシピエントに設定し、GFP 陰性の精巣および卵巣を GFP-Tg ラットに移植する。生殖幹細胞の cell trafficking が起こった場合、レシピエントの GFP 陽性骨髄細胞から生殖幹細胞が GFP 陰性のグラフト内に供給されるため、グラフト内に GFP 陽性細胞が同定される。この場合の GFP 陽性細胞とは生殖幹細胞のことであるが、それが精子および卵子にまで分化していくかは不明である。移植後のグラフトを蛍光顕微鏡で観察し、免疫組織化学染色および PCR 法にて GFP 陽性細胞を同定し、生殖幹細胞の細胞移動現象を解析する。

GFP-Tg ラットの系統は LEW であり、この移植においては免疫反応は惹起されない。つまり免疫抑制剤は不要である。このことは LEW - GFP-Tg 間の皮膚移植で確認されている。

(4) 精巣陰茎同時移植モデルの確立

まず実験系には雄性成熟 LEW ラットを用いて、移植は LEW-LEW 間 (syngeneic) に行う。精巣移植では精巣動静脈を栄養血管とし、

で確立した低侵襲移植法を用いる。同時に陰茎移植を行う。

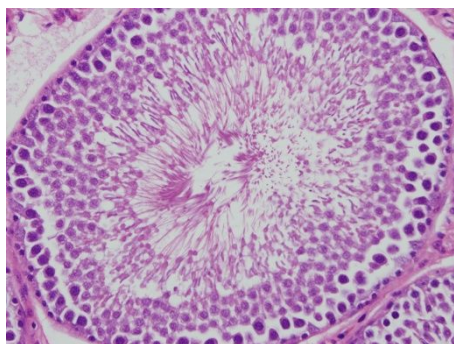
陰茎海綿体と大伏在動脈、陰茎背静脈と大伏在静脈を吻合する。

(5) 上記ラットを用いた交配

上記実験系が成功裏に終了した場合の予備実験として計画。卵巢・精巣単独移植では不可能であり、精巣陰茎同時移植が成功して初めて可能となる。

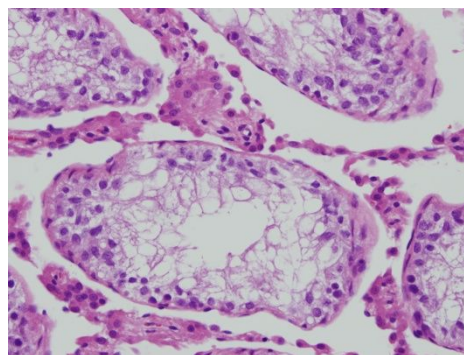
4. 研究成果

Syngeneicな同性間で移植された精巣の組織標本を観察すると間質細胞には血管および間細胞が認められ、精細管基底層の精祖細胞から内腔へ向かって細胞が成熟し、精子形成が認められていることが分かった。本実験では全20例中15例で精子形成が認められた。



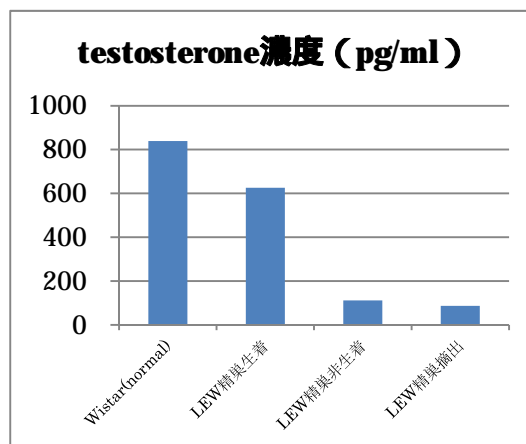
精子形成が認められた精細管 (HE 染色)

精子形成が認められなかった5例について組織標本を観察すると、精細管はやや委縮し、精祖細胞からの正常な成熟過程を確認することができなかった。この変化は、血管吻合後の血流障害等、手技的な問題で生じた変化と思われる、これらは移植後非生着群とした。

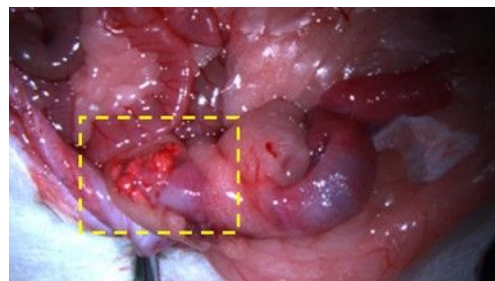


精子形成が見られない精細管 (HE染色)

テストステロンの分泌は移植後生着群では全例で認められたが、精巣摘出のみのコントロール群では全例でテストステロンの分泌は認められなかった。移植後非生着群でも同様にテストステロンの分泌は認められなかった。



卵巢移植については、Syngeneicに移植された卵巢は全て生着が認められ、エストロゲンの分泌を認めた。更に、1例において正常オスラットとの交配で移植後に妊娠し、胎児を確認した。



移植後の卵巢



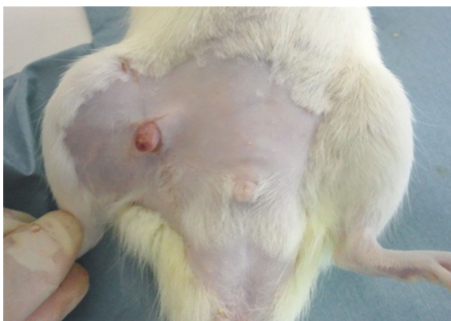
移植後に得られた胎児

GFP-Tg ラットを用いた移植実験では、前回同様、精細管および血管への蛍光発現が認められ、GFP 遺伝子発現で修飾されたレシピエント由来組織の流入が示唆されたが、精子形成は認められなかった。これは単純な手技的問題の他に、ラット系列間の免疫反応の可能性も否定できず、GFP-Tg と LEW 間であっても免疫抑制剤投与を含めた、手技の改良が必要と思われた。

陰茎移植も LEW-LEW 間で行われ、良好な生着を認めた。



移植前の陰茎



右鼠径部に移植し生着した様子

先に開発した精巣移植と同時に精索が連続した状態で移植されるよう手技の改良を進める予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

難波 祐三郎 (NAMBA YUZABURO)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：00335605

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし