

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04342

研究課題名（和文）AYA世代がん患者に対する性腺組織凍結技術を用いた新たな生殖医療技術の開発

研究課題名（英文）Development of the new technology of fertility preservation for the AYA cancer patients

研究代表者

鈴木 直（Nao, Suzuki）

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：90246356

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本邦においても、小児・AYA世代（AYA世代とは、5歳から39歳までの思春期から若年の世代）の一部の女性がん患者に対する、治療開始前の妊孕性温存療法（将来がんを克服した後に子供を授かることができるための治療）が導入されつつある。小児・思春期世代のがん患者にとって唯一の妊孕性温存療法である卵巣組織凍結保存は、10年を超える長期にわたる保管が必要となる。本研究成果によって、長期保管体制におけるヒューマンエラーを防ぐ安全性を担保する新たな保管システムの開発に成功し、さらに長期保管のための耐凍剤の安全性を示す成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん治療の進歩に伴いがんを克服した小児・AYA世代がんサバイバーが増加している。一方、一部のがん治療によって卵巣や精巣の機能が低下することで、将来の患者の妊孕性の喪失（卵子や精子の数が減少し、がん治療後に子供を授かることが不可能になってしまうこと）等を引き起こす場合がある。我々は、小児・AYA世代のがん医療の充実とがんサバイバーシップ向上（将来子供を授かる選択肢を残す試み）に主眼をおいて研究を進めてきた。本研究成果は、新たな妊孕性温存技術である卵巣組織凍結保存の安全性を明らかにしたこと、安全な長期保管体制の構築に寄与すること、から学術的・社会的意義が高いものと確信している。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the number of childhood and AYA (Adolescent and Young Adult is the age from 15 to 39 years old) generation cancer survivors who have overcome cancer has been increasing with the progress of multidisciplinary treatment in cancer treatment. On the other hand, cancer treatment for childhood and AYA (CAYA) cancer patients may cause gonadal dysfunction or loss of fertility depending on the treatment method. In Japan, fertility-preserving therapy before the start of cancer treatment for some female CAYA cancer patients has recently been introduced. Ovarian tissue cryopreservation, the only fertility-preserving therapy for children and adolescents with cancer, requires long-term storage for more than 10 years. As a result of this research, we succeeded in developing a new storage system that ensures the safety against human error in the long-term storage system and obtained the results showing the safety of antifreeze for long-term storage.

研究分野：がん研究

キーワード：卵巣組織凍結保存 妊孕性温存療法 小児・AYA世代がん がん・生殖医療 がんサバイバーシップ 耐凍剤 卵巣輸送

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2015年6月に厚生労働省主催の「がんサミット」にて「がん対策加速化プラン」が策定された。そこで、「小児期、AYA世代、壮年期、高齢期等のライフステージに応じたがん対策」の重要性が示され、ライフステージに応じたがん対策の中に「生殖機能障害に対する実施」が盛り込まれた。本邦では2013年に日本生殖医学会が「未受精卵子および卵巣組織の凍結・保存に関するガイドライン」を、2014年には日本産科婦人科学会が「医学的適応による未受精卵子および卵巣組織の採取・凍結・保存に関する見解」を示し2016年に一部改訂している。Donnez J博士の卵巣組織凍結・移植による初めての生児獲得に関する報告(Lancet 364, 2004)以降、現在標準的な卵巣組織凍結法は緩慢凍結法となっており、当施設からの2症例(ガラス化凍結による世界初)(Human Reprod 30, 2015)を除いて全例緩慢凍結法を用いた生児獲得(計60例: Donnez J et al; J Assist Reprod Genet 32, 2015)となっている。緩慢凍結法は高価なプログラムフリーザーを用いて凍結保護剤で処理した検体を一定の速度で冷却する方法であり、細胞外に形成される氷晶による細胞への物理的障害が予想されるため、融解後の卵胞発育過程における卵母細胞の発育と顆粒膜細胞の成熟のバランスが損なわれているとの報告がある(Keros V et al; Human Reprod 24, 2009)。一方、凍結保護剤で処理した検体を直接液体窒素に投入し急速に凍結するガラス化法は、超急速に冷却するため氷晶形成が起こりにくく組織へのダメージが少なく短時間で行えるなどのメリットがある。我々はこれまでに、文部科学研究費(基盤研究C: 卵巣組織移植に関する基礎的研究-若年女性がん患者の生活の質向上を志向して, 2008-2010、基盤研究C: 効率の良い卵巣組織凍結・移植法の確立を目指した研究-若年女性癌患者のために, 2011-2013)を用いてカニクイザルによる卵巣組織凍結・移植に関する前臨床試験を行い、液体窒素の管理が可能であればどの施設でも施行可能な新たな卵巣組織ガラス化凍結技術の開発に成功した(Reprod Biomed Online 21, 2010, Human Reprod 27, 2012)。そして、2010年以降当学倫理委員会承認後に卵巣組織ガラス化凍結法を臨床応用した結果、世界で初めて本技術による生児獲得に成功し(Proc Natl Acad Sci USA 100, 2013 110, Human Reprod 30, 2015)現在252名の卵巣組織ガラス化凍結保存を行っている。しかしながら、卵巣組織凍結・移植の技術が広く妊孕性温存治療として普及するためには、摘出卵巣を保存・輸送し、凍結管理するシステムの確立が必要である。一方、卵巣組織を融解し移植する際にどの卵巣組織片により多くの原始卵胞が存在しているかを非侵襲的に移植前に明らかにする手段は皆無である。卵巣組織移植が成功したか否かは、移植後約半年経過した後の月経周期の回復や血中ホルモン値の推移で判断するしか方法が無く、不成功に終わった場合には再度移植が必要となることから、再発のリスクを有するがん患者にとって時間的にも身体的にも負担がかかる現状がある。一方、AYA世代男性がん患者の妊孕性温存としては古くから精子凍結が行われている。非侵襲的技術である精子凍結は、がん治療まで時間的余裕が無い場合でも施行可能で有る利点を有している一方で、小児思春期世代のA(思春期)世代男性がん患者においては精子凍結でさえも施行不可能である場合もある。そこで、欧米では卵巣組織凍結の成果を参考に精巣組織凍結の臨床応用が始まっており、エジンバラクライテリアなどの指針が英国から示されている現状があるが(Wallace H et al; Lancet Oncol 15, 2014)精子の分化に関する問題や至適な凍結法や移植部位に関する問題が未解決となっている。以上の背景から、本研究においては、本領域における革新的な妊孕性温存療法に関する研究開発を目的として、以下の研究課題を計画している。卵巣組織輸送に関する研究-齧歯類あるいは霊長類を用いた安全性と有効性の検証を目指した前臨床試験、新しい卵巣予備能検査の開発-OCT光学系の構築と安全性試験、非侵襲的卵巣予備能検査への有効性の実証、ガラス化凍結法を用いた精巣組織凍結法の開発。

### 2. 研究の目的

近年、がん治療における集学的治療の進歩に伴いがんを克服したAYA(思春期・若年)世代がんサバイバーが増加している。一方、AYA世代がん患者に対するがん治療は、治療法によっては性腺機能不全や妊孕性の消失等を引き起こす場合がある。その様な中でがんサバイバーのQOL向上に対する関心が高まり、生殖年齢にあるAYA世代がん患者における妊孕性喪失の重大性が再認識されつつある。2004年のDonnez J博士による、若年女性ホジキン病患者の卵巣組織凍結・移植による初めての生児獲得の報告が本領域のブレークスルーとなり、欧米ではOncofertility(がん・生殖医療)という新しい領域が確立された。本研究は、AYA世代がん患者に対する生殖機能温存を意識した、より安全でより有効性の高い革新的な妊孕性温存療法の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)卵巣組織輸送に関する研究

我々は、全国各地の病院で妊孕性温存目的に摘出した卵巣を卵巣組織凍結保存が可能である施設まで輸送所要時間を24-48時間必要であると考えている。そこで、我々は輸送中に血流のない摘出卵巣の恒常性を維持するための主要条件として輸送中の卵巣組織保存設定温度に着目して、研究を進めた。卵巣組織内壊死の有無を判断するため、ウシ卵巣を用いてqPCR法にて卵巣組織培養後のアポトーシスマーカーであるCaspase3の発現率を複数の温度条件下で検討した。さらに、小児患者における数十年間に渡る卵巣組織凍結保存期間中の検体紛失や検体取り違えを防ぐために、液体窒素中に作動可能なRFIDタグを使用した専用の卵巣組織凍結デバイスの開発検討を行った。

専門家に関わらず指示に従う能力があり、その能力が類似していることを示すため、参加者全員

に Uchida-Kraepelin(UK)テストを施行した。6名の参加者がウシ卵巣組織を用いた閉鎖型ガラス化法で卵巣組織の凍結保存ならびに融解を行った。なお、コンピューターによりランダムで選択された3名は従来法で、3名はRFIDタグを用いた方法で施行した。

#### (2)凍結融解卵巣組織内における遺残耐凍剤濃度の研究

2017年中村らは、卵巣組織凍結（緩慢凍結法とガラス化凍結法）後の融解卵巣組織内の遺残耐凍剤（凍結保護剤）濃度の検討を行い、ガラス化凍結法では緩慢凍結法と比較して融解直後の凍結卵巣組織内で耐凍剤濃度が高く残存することを報告した(Nakamura et al; Reproductive Bio Medicine Online, 2017)。しかしながら、中村等の実験手法は融解直後の組織内耐凍剤濃度を測定しており、臨床の現場に則した実験結果とはならないことから、ウシ卵巣を用いてガスクロマトグラフィーによる卵巣組織内耐凍剤濃度および、形態学的（免疫組織化学染色および電子顕微鏡による細胞内小器官などの観察）、分子生物学的（定量的PCR）手法を用いて解析を行った。具体的にはウシ卵巣組織を用いて、凍結卵巣組織（緩慢凍結法：DMSO、ガラス化凍結法：PrOH、ガラス化凍結法：EGの3群）を対象として、融解直後、融解後30分、1時間、2時間後の耐凍剤希釈培養を実施し、ガスクロマトグラフィーにて緩慢凍結法とガラス化凍結法共に組織内耐凍剤濃度を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1)卵巣組織輸送に関する研究

様々な条件の下、研究を進めた結果、最終的に至適温度条件は4℃であることを確認することができた。本結果は、我々のげっ歯類を用いた我々の研究グループによる先行研究（Kamoshita et al; Hum Reprod, 2016）と同様であった。液体窒素中に作動可能なRFIDタグを使用した専用の卵巣組織凍結デバイスの開発研究では、

二次元バーコードとRFIDタグシステムを組み合わせることにより閉鎖型ガラス化法における凍結保存と融解のヒューマンエラーが軽減し、卵巣組織凍結保存業務の効率が向上した。

その成果を、Journal of Assisted Reproduction and Geneticsに発表した(Sato T, Suzuki N et al: JARG, 2019)。現在、陸路の他に空路での卵巣輸送を念頭に入れ、航空法に従った規格の容器を作成するにあたり設定温度の管理方法に関して継続的に検討している。

#### (2)凍結融解卵巣組織内における遺残耐凍剤濃度の研究

ガスクロマトグラフィーにて緩慢凍結法とガラス化凍結法共に組織内耐凍剤濃度を測定した結果、希釈培養2時間後には自然拡散により卵巣組織内に残存する耐凍剤が3群全てにおいて漸減しゼロに近づくことが確認できた。さらに、融解卵巣組織内のアポトーシス関連遺伝子発現量もRT-PCR/q-PCRにより評価した結果、融解直後のアポトーシス関連遺伝子発現量は、緩慢凍結法とガラス化凍結法共に低値であることが確認できた。現在本研究成果の論文執筆中であり、2020年7月までにHuman Reproduction誌へ投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takae Seido, Tsukada Kosuke, Sato Yorino, Okamoto Naoki, Kawahara Tai, Suzuki Nao	4. 巻 7
2. 論文標題 Accuracy and safety verification of ovarian reserve assessment technique for ovarian tissue transplantation using optical coherence tomography in mice ovary	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 43550 ~ 43550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep43550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉下陽堂, 鈴木由妃, 柏木恵, 古山紗也子, 上川篤志, 戸澤晃子, 鈴木直
2. 発表標題 卵巣組織移植術における融解卵巣組織内の凍結保護剤遺残に関する安全性の検討
3. 学会等名 第19回日本生殖工学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉下陽堂, 上川篤志, 鈴木由妃, 佐藤匠, 戸澤晃子, 鈴木直
2. 発表標題 AYA世代がん患者に対する卵巣組織移植術における融解卵巣組織内の凍結保護剤遺残に関する安全性の検討
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高江正道
2. 発表標題 妊孕性温存治療の最前線
3. 学会等名 JSAWI2017（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉下 陽堂  (Sugishita Yodo)  (20587745)	聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師   (32713)	
研究分担者	塚田 孝祐  (Tsukada Kosuke)  (00351883)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授   (32612)	
研究分担者	高江 正道  (Takaе Seido)  (00621301)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師   (32713)	