

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03830

研究課題名(和文) がんサバイバーシップ向上を志向した妊孕性温存療法の革新的な技術開発

研究課題名(英文) Innovative Technological Development of Fertility Preservation Treatment Oriented to Improve Cancer Survivorship

研究代表者

鈴木 直 (SUZUKI, Nao)

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：小児・AYA世代がん患者等に対する妊孕性温存療法の技術革新を志向して5つの研究を進めた。研究1.白血病患者における卵巣内のMRD(微小残存腫瘍)と卵巣移植の実現可能性を検証する研究、研究2.卵巣組織凍結保存拠点化に向けた研究、研究3.卵巣移植の至適な技術開発に向けた研究、研究4.新しい精巣組織凍結法の開発、研究5.抗腫瘍薬の性腺毒性の評価。生児獲得に至る小児・AYA世代がんサバイバー数は増加傾向にあるが、本領域は、対象ががん患者であることから「安全性」と「有効性」を志向して、がん・生殖医療の根幹をなす妊孕性温存療法で用いられる技術のさらなる技術革新が急務となっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん・生殖医療の技術革新は依然課題が山積している。そこで本研究では、新しい技術や未だ臨床応用されていない技術の革新を志向して、がん・生殖医療に関わる新しい臨床技術開発を目的とした5つの研究を行った。本研究成果が、小児・AYA世代がん患者が将来希望をもってがんと闘うことができる、その「希望」に繋がると確信している。

研究成果の概要(英文)：With an orientation toward technological innovation in fertility preservation (FP) treatment for childhood and AYA generation cancer patients, five research studies were conducted to develop technologies that can be deployed in Oncofertility medicine. 1.Research to examine MRD in the ovary and feasibility of ovarian transplantation in leukemia patients; 2. Research to establish an ovarian tissue cryopreservation center; 3.Research to develop optimal techniques for ovarian transplantation; 4.Development of new testicular tissue cryopreservation techniques; 5.Evaluation of gonadotoxicity of antitumor drugs (TKIs). The number of childhood and AYA generation cancer survivors who go on to acquire live births is on the rise, but since the target patients in this field are cancer patients, there is an urgent need for further innovation in the technologies used in FP treatment, which is the cornerstone of Oncofertility medicine, with an orientation toward "safety" and "efficacy".

研究分野：がん・生殖医療

キーワード：小児・AYA世代がん 妊孕性温存 卵巣組織凍結・移植 卵巣輸送 精巣組織凍結・移植 性腺毒性 MRD がん・生殖医療

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がん治療の集約化により治療成績は向上し、がん治療後に寛解したがん患者が増加しつつある。小児・AYA (思春期・若年成人) 世代がん患者に対して、性腺毒性を惹起する化学療法や放射線療法等によるがん治療が行われた場合、妊孕性 (生殖機能) が低下又は喪失する場合がある。2004 年に欧州で若年女性悪性リンパ腫患者において、がん治療開始前に凍結保存した卵巣組織の融解移植による世界初の生児獲得の報告 (Lancet 2004) がブレイクスルーとなり、欧米では「がん・生殖医療 (小児・AYA 世代がん患者に対する妊孕性温存)」に関する概念が広がった。がん・生殖医療とは、「がん患者の診断、治療および生存状態を鑑み、個々の患者の生殖能力に関わる選択肢、意思および目標に関する問題を検討する生物医学、社会科学を橋渡しする学際的な一つの医療分野である。臨床においては患者と家族が子どもを持つため、また、その意味を見つめなおすための生物医学的、社会科学的なほう助を行うことにより、生殖年齢およびその前のがん患者の肉体的、精神的、社会的な豊かさをもたらすことを目的としている (日本がん・生殖医療学会)」。2021 年 4 月から、国と自治体による小児・AYA 世代がん患者等に対する妊孕性温存療法に係る経済的支援が研究事業の一環として開始した。がん・生殖医療の対象患者が一般的な不妊症患者ではなく、がん患者であることから、妊孕性温存療法のアウトカム (がん側と生殖側) を集積することで、本領域のエビデンスを創出することが本研究促進事業の目的となっている。一方我々は、2006 年に霊長類を用いた新しい卵巣組織凍結保存法 (ガラス化凍結) を開発し、世界初の生児獲得に成功した。現在、生児獲得に至る小児・AYA 世代がんサバイバー数は増加傾向にあるが、本領域は対象ががん患者であることから「安全性」と「有効性」を志向して、がん・生殖医療の根幹をなす妊孕性温存療法で用いられる技術のさらなる技術革新が急務となっている。

2. 研究の目的

小児・AYA 世代がん患者等に対する妊孕性温存療法の技術革新を志向して、がん・生殖医療の診療の場に展開できる技術開発を目的として、5 つの研究を進めた。研究 1. 白血病患者における卵巣内の MRD (微小残存腫瘍) と卵巣移植の実現可能性を検証する研究、研究 2. 卵巣組織凍結保存拠点化に向けた研究、研究 3. 卵巣移植の至適な技術開発に向けた研究、研究 4. 新しい精巣組織凍結法の開発、研究 5. 抗腫瘍薬の性腺毒性の評価。

3. 研究の方法

研究 1. 白血病患者における卵巣内の MRD (微小残存腫瘍) と卵巣移植の実現可能性を検証する研究：白血病患者モデルを、GFP 遺伝子を組み込んだマウス由来白血病細胞株 (EL4 細胞) の経尾的な投与により作製した。白血病を発症した。マウス卵巣 (MRD 卵巣) は卵巣移植実験や卵巣内に浸潤した悪性細胞数の測定、組織学的解析に用いた。さらに凍結保存した MRD 卵巣の同所移植により、残存悪性細胞数と再発性との関係を検討した。

研究 2. 卵巣組織凍結保存拠点化に向けた研究：摘出された臓器は血流を有さないが、摘出卵巣に対して温度や pH の管理、卵巣運搬用保存液の還流、酸素や栄養補給の供給が重要であると考えている。液体窒素の環境下における細胞組織の保存管理の為に IC タグ (RFID (Radio Frequency Identification)) とリーダーライタによる卵巣組織検体管理システムの開発を行った。一方、卵巣運搬装置は温度計、pH メーター、保存容器内部液還流装置、圧力管理装置を取り付け、摘出された卵巣検体の恒常性を保つ装置の開発を行った。

研究 3. 卵巣移植の至適な技術開発に向けた研究：齧歯類並びに霊長類を用いて、大綱を標的とした新たな卵巣移植方の開発に向けた研究を進めた。

研究 4. 新しい精巣組織凍結法の開発：精巣組織凍結・移植においては、標準的な凍結方法と移植方法が確立していない現状がある。そこで、我々は卵巣組織凍結で成功したガラス化凍結法を精巣組織凍結に応用すべく、齧歯類を用いた研究を進めた。

研究 5. 抗腫瘍薬の性腺毒性の評価：チロシンキナーゼ阻害薬 (第二世代: ダサチニブ・ニロチニブ、第三世代: ポナチニブ) の卵巣毒性に関する検証実験をすすめた。In vitro 研究では、マウス (ICR day9-11) の卵巣を摘出し、-MEM と 3% BSA を添加した培地の上にメンブレンを敷き、その上に卵巣を置いて卵巣培養を 7 日間行った。それぞれヒビクル群 (0.1% DMSO) とチロシンキナーゼ阻害薬 (通常量と高用量) を添加したもので分け培養液は 2 日間ごとに交換し回収した培養液はすべて -24℃ に保存する。ELISA 法によりエストロゲン値を測定した。また 7 日目の卵巣は PCR 培養用と組織用に分けてそれぞれアッセイを行った。一方、in vivo 研究では、5 週齢マウスに 2 週間経口投与を行い、生理的食塩水とチロシンキナーゼ阻害薬の通常量と高用量の 3 群を用意し、経口投与を行い、卵巣毒性の評価を行った。

4. 研究成果

COVID19 パンデミックの影響で必要な物品や試薬が欠品になり、当初の予定より研究の遅延

が少なくなかったが、研究をそのような中でも遂行することができた。

研究 1. 白血病患者における卵巣内の MRD(微小残存腫瘍)と卵巣移植の実現可能性を検証する研究：経腹的あるいは経尾的な両方の移植法において、卵巣内に浸潤する細胞数には、移植細胞のクローンによる違いや個体差、さらには卵巣の左右差などが生じることが明らかになった。具体的には、GFP 抗体を用いた免疫組織化学により卵巣内の浸潤白血病細胞の確認、MRD 卵巣の同系統マウスへの同所移植により白血病が伝搬されることを確認した。また、卵巣組織凍結・融解を介した卵巣移植の実験においても同様の結果であった。一方、GFP 遺伝子配列を利用した qPCR により MRD 卵巣内の悪性細胞数を測定する実験系を確立した。今後はクローンの選別や移植後時間の調節により卵巣内に安定的に浸潤する MRD モデルの作製を検討していく。

研究 2. 卵巣組織凍結保存拠点化に向けた研究：10 年以上の長期にわたって凍結保存が必要となる妊孕性温存検体の安全な管理システム開発を志向して、ヒューマンエラーが発生しないトレーサビリティが安定した管理システムを開発することができた。一方、卵巣運搬システムの開発に関して、卵巣輸送装置の要求仕様として、(1)臓器を保存液に浸し外界から隔離する、(2)保存液を定圧で加圧する(0~1kgf/cm²)、(3)保存液の温度を一定に保つ(4~35℃)、(4)輸送に適したコンパクト性と動力源の選択に関する研究を進めた。

研究 3. 卵巣移植の至適な技術開発に向けた研究：まずは、齧歯類並を用いて、大網を標的とした新たな卵巣移植方の開発に向けた研究を進めた。その結果、齧歯類の解剖学的位置関係より、移植は成功したものの評価が困難であることが明らかとなった。具体的には、マウスの大網が大変薄い組織であり隣臓が近傍に存在することから、良い評価を行うことが難しい結果が得られた。そこで、霊長類であるカニクイザルを用いて、生卵巣(未凍結)を、対称群(大網無し)と実験群(大網有り)に分けて、後腹膜、卵管周囲に移植した。移植後、血中 E2 値、P4 値、FSH 値、LH 値を測定し、ホルモン動態を確認することで卵巣移植の成果検証を現在も続けている。

研究 4. 新しい精巣組織凍結法の開発：精巣組織移植の系を確立する目的で、齧歯類の精巣(未凍結)を用いて評価実験を進めた、齧歯類背部への移植が至適部位となりうる事実を得ることができた。そこで、現在、精巣(未凍結)とリコンビナント VEGF を用いた精巣(未凍結)の 2 群(リコンビナント VEGF は 3 つの濃度群に分けて)の移植を終えたところである。

研究 5. 抗腫瘍薬の性腺毒性の評価：in vitro 研究で卵巣培養の実験において、ダサチニブの場合、卵巣は血管新生系を阻害し、卵巣機能的には卵胞・卵子には影響を及ぼさないことが PCR にて明らかになった。しかし、E2 値を測定した結果、E2 値はダサチニブ投与群で低下した結果、卵巣機能に影響がないという点で矛盾が生じている可能性が明らかになった。現在、in vivo 研究において、卵胞カウントや免疫染色を進めている。一方、ニロチニブの場合、卵巣毒性を有していない結果を得ることができた(遺伝子発現並びに E2 値もコントロールと比較して有意な差無し)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上川篤志、孟令博、杉下陽堂、高江正道、戸澤晃子、長谷川潤一、鈴木直
2. 発表標題 白血病モデルマウスを用いた卵巣組織凍結における微小残存病変（MRD）の評価
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木由妃、杉下陽堂、古山紗也子、上川篤志、戸澤晃子、鈴木直
2. 発表標題 -196 の液体窒素内で動作可能なRFIDを用いた新規卵巣組織凍結検体管理システムの開発
3. 学会等名 第13回日本がん・生殖医療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木由妃、杉下陽堂、上川篤志、戸澤晃子、鈴木直
2. 発表標題 -196 の液体窒素内で動作可能なRFIDを用いた新たな卵巣組織凍結検体管理システムの開発
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上川篤志、杉下陽堂、高江正道、鈴木直
2. 発表標題 微小残存病変（MRD）マウスモデルを用いた卵巣移植の実現可能性を検証する研究
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩端秀之, 小沢あずさ, 板井駿, 高江正道, 尾上弘晃, 鈴木直
2. 発表標題 人工卵巣の開発 - 卵巣組織移植におけるリスク軽減を目指して
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------