

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07660

研究課題名（和文）急性白血病患者に対する安全な卵巣組織移植を目指した卵巣内微小残存病変評価法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for evaluation of minimum residual disease in the ovary for safe ovarian tissue transplantation in patients with acute leukemia.

研究代表者

藤井 伸治（Fujii, Nobuharu）

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：60362977

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：岡山大学病院で卵巣組織凍結を受けた原疾患が急性白血病の女性患者5症例のうち、死亡例、追跡不可能例を除く2症例を対象とした。対象患者の凍結卵巣検体及び口腔粘膜検体からそれぞれDNAを抽出し、全エクソンシーケンスとターゲットシーケンスを実施した。診断時の腫瘍サンプルの入手が困難であり、腫瘍との直接比較は実施できなかったが、今回解析した2症例において、急性骨髄性白血病、および急性リンパ性白血病関連の遺伝子変異は同定されず、明らかな卵巣内への白血病クローン細胞の混入は否定的な結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血器疾患女性患者において、卵巣組織凍結は重要な妊孕性温存の選択肢であるが、急性白血病では卵巣内の微小残存病変(MRD)による再発リスクの問題が解決されていない。そのため、未だ実臨床での卵巣組織移植は禁忌であり、卵巣組織凍結は「将来的な技術の発展にも期待し一部の施設で研究的に実施されている」状況である。一方、卵巣組織凍結を実施した患者が長期生存し、拳児を希望するケースが徐々に増え始めている。拳児には年齢的なタイミングも重要であるため、現在の技術において可能範囲で、最大限精度の高い方法でMRDを評価することは、卵巣移植で拳児を試みることを検討する上で有用な情報となり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Of five female patients with acute leukemia who underwent ovarian tissue cryopreservation at Okayama University Hospital, two patients were included in the study. DNA was extracted from frozen ovarian and oral mucosa samples of the subject patients, respectively, and whole exon sequencing and target sequencing were performed. Although direct comparison with tumors could not be performed due to the difficulty in obtaining tumor samples at the time of diagnosis, no acute myelogenous leukemia- or acute lymphocytic leukemia-related genetic mutations were identified in the two cases analyzed in this study, and the results were negative for obvious leukemic clonal cell contamination in the ovaries

研究分野：造血器腫瘍患者の妊孕性温存

キーワード：妊孕性温存 卵巣組織凍結 微小残存病変

1. 研究開始当初の背景

(1) 造血器腫瘍における妊孕性温存の現状

造血器腫瘍患者に対する治療成績の向上による長期サバイバーの増加に伴い、化学療法、放射線療法、造血幹細胞移植後の QOL に関する意識が急速に高まっている。特に全がんにおける造血器腫瘍の割合が 20-40% を占める小児、AYA 世代において、将来子どもを持つ可能性を残す妊孕性温存は重要な課題である。現在、女性の妊孕性温存で実績があるのは未受精卵保存、受精卵保存であるが、造血器腫瘍患者に対しては治療の緊急性により温存の機会を得られないことが問題となってきた。2017 年に研究代表者(藤井)が AMED 大須賀班で実施した全国調査においても、急性白血病における未受精卵保存、受精卵保存は 40 歳未満の患者 112 例中 10 例(8.9%)に実施されているのみである。また、研究分担者(中塚)が岡山大学病院産婦人科で卵子保存を試みた急性白血病 3 例のうち 2 例において採卵個数が 1 個以下であり、妊孕性温存は困難を極めることが明らかとなった。(未発表データ)

(2) 急性白血病に対する卵巣組織凍結

未受精卵保存、受精卵保存が実施できない患者に対しては、卵巣組織を凍結保存し、原疾患治療後に解凍して自家移植を行う卵巣組織移植が欧米を中心に開発され、既に世界的には 100 例を超える生児が獲得されている。しかし、卵巣内の微小残存病変による再発リスクの問題が未解決であることから、急性白血病に対しては「禁忌」とされてきた。その一方、将来的な医療技術の進歩に期待して、急性白血病に対しても卵巣組織凍結は実施されている。

(3) 造血幹細胞移植の全身放射線照射に対する卵巣遮蔽

造血幹細胞移植の標準的前処置として用いられる全身放射線照射により妊孕性はほぼ廃絶することが知られている。卵巣遮蔽による妊孕性温存が主に本邦から報告されており、実施症例数が増加している。しかし、遮蔽による白血病再発リスクの増加の可能性は否定されていない。現在は標準リスクの第一寛解期の患者が適応と考えられているが、第一寛解期の急性白血病患者における卵巣内の白血病の有無については報告がなく、特に寛解期でありながら再発リスクの高い患者に対する卵巣遮蔽の可否についてはわかっていない。そのため凍結卵巣組織における微小残存病変の検討は、卵巣遮蔽を考慮する際の再発リスクを考慮する上で重要である。

(4) 凍結卵巣組織内微小残存病変の評価法の現状と新規評価法の必要性

白血病患者の凍結卵巣組織における微小残存病変(MRD)の評価は、免疫組織染色、RT-PCR、免疫不全マウスへの移植実験などが報告されている。免疫組織染色による検討は簡便であるが、部位的な差異および感度の低さが問題である。RT-PCR は腫瘍特異的なマーカーを有しない 40%前後の白血病患者においては実施不可能である。免疫不全マウスへの移植実験は in vivo assay として報告されているが、その結果をヒトでも同様に解釈できるかはわかっていない。そのため現状では、これらの評価法による複数の結果を総合的に評価している。急性白血病患者の治療成績改善に伴い、本邦でも今後、凍結卵巣組織を用いた妊娠、拳児を希望する患者の増加が予想される。再現性および汎用性があり、RT-PCR に必要な特異的な分子マーカーの存在しない患者に対しても広く応用できる MRD 評価法の確立は急務である。

2. 研究の目的

本研究では、凍結卵巣組織を用いた次世代シーケンス法による微小残存病変の評価法を

確立し、白血病患者において、再発リスクを増加させることなく安全な卵巣組織移植が実施されるための、基礎データを提供することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 研究の開始に際し、「凍結保存卵巣内の残存癌細胞の評価を行う多施設後方視的観察研究」として岡山大学倫理委員会で承認を受けた(研 1909-044)。岡山大学病院産婦人科において、卵巣組織凍結を受けた症例は全 8 症例で、原疾患が急性白血病であった 5 症例を対象症例として適格性のスクリーニングを行った。
- (2) 患者基本情報として、性別、生年月日、疾患名、卵巣組織凍結実施日、卵巣組織凍結実施時の造血器腫瘍の状況(分子遺伝学的寛解/血液学的寛解/非寛解)、造血幹細胞移植症例については移植日、転帰、最終生存確認日を診療記録より抽出した。研究に使用する凍結時の卵巣組織を決定し、体細胞遺伝子変異を同定する上での比較対象として、正常細胞(口腔粘膜の擦過による)を、患者の同意を得て新たに採取した。
- (3) 対象患者の凍結卵巣検体及び口腔粘膜検体からそれぞれ DNA を抽出し、whole exome sequencing (WES)と TruSight™ Oncology 500 (TS0500, Illumina)パネルを用いた targeted sequencing (TS)を実施した。TS0500 は AML 及び MDS を含む各がん種について米国の主要ガイドラインのバイオマーカーに対応する 523 の遺伝子パネルである。同一患者の凍結卵巣検体と口腔粘膜検体にて同定された遺伝子変異を比較し、卵巣のみで同定された遺伝子変異に関して、Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)を用いて、AML 及び ALL に関する既知の遺伝子変異と照合した。

4. 研究成果

- (1) 対象となった 5 例のうち死亡例が 2 例あった。2 例はいずれも他院から岡山大学病院に卵巣組織凍結を依頼された患者であり、紹介元施設にコンタクトをとるも追跡が不可能であった。また、1 例においては倫理的な側面から対象として不適格と判断し、最終的 2 症例が本研究の対象となった。研究期間の 2 年目より、他施設共同研究へと研究計画書を変更し、症例数の拡大を試みたが、症例の追加は得られなかった。
- (2) 症例 1 は思春期に診断された T-ALL、症例 2 は 30 代前半に診断された FLT3-ITD 変異陽性 AML であった。いずれも第一寛解期かつ非血縁者間同種骨髄移植前に、腹腔鏡下卵巣部分摘出術が施行された。
- (3) 症例 1 では Illumina 社の NovaSeq6000 を Platform として用い、WES を行った。得られた変異の数は、口腔粘膜のみに見られた変異が 36312 個、口腔粘膜と凍結卵巣に共通して見られた変異が 96652 個、凍結卵巣のみに見られた変異が 10788 個であった。凍結卵巣にのみ認められた変異の中で Depth ≥ 100 、変異アリル頻度 ≥ 0.01 、dbSNP151 に未登録の SNV をフィルターとしたところ、20 個の変異が抽出された。この 20 個の変異を最終的に COSMIC で検索したところ、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病関連の変異は認めなかった。
- (4) 症例 2 では、Illumina 社の NextSeq550 を Platform として用い、TS を行った。得られた変異の数は、口腔粘膜のみに見られた変異が 388 個、口腔粘膜と凍結卵巣に共通して見られた変異が 1202 個、凍結卵巣のみに見られた変異が 25 個であった。症例 1 と同様のフィルターで検討したところ、該当遺伝子は認めなかった。
- (5) 問題点：MRD 測定のためには診断時の腫瘍サンプルが必要であるが 1 例は 10 年以上前の他

院の症例であり、腫瘍との直接比較は叶わなかった。今後拡大する卵巣移植の安全性の担保という側面からも、診断時のサンプルを可能な限り保存しておくことが大切であると考えられた。

- (6) 本研究の限界と結果：診断時のサンプルでのシーケンスが行えていないこと、未知の変異が内在する可能性があることが limitation であるが、今回解析した 2 症例において、AML/ALL 関連の遺伝子変異は同定されず、明らかな卵巣内への白血病クローン細胞の混入は否定的な結果であった。今後、さらに症例数を重ねる必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 鴨井千尋、藤井伸治、嶋田明、名和由一郎、前田嘉信	4. 巻 62
2. 論文標題 中国地方・四国地方における造血器悪性腫瘍患者に対する妊孕性温存体制の実態調査	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 281-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.62.1388.	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 -

1. 著者名 Okamoto S, Fujii N, Yoshioka N, Harada M, Tanimoto M, Maeda Y, Suzuki N, Osuga Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Nationwide survey of fertility preservation in patients with hematological malignancies in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 438-442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-020-01801-y	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神原 由依、藤井 伸治、福見 拓也、櫻野 千明、鎌田 泰彦、中塚 幹也、木口 亨、前田 嘉信
2. 発表標題 新規に診断されたALL患者においてブレドニゾロンprephase期間中に卵子凍結保存をし得た1例
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦田知宏、藤井伸治、遠西大輔、櫻野千明、中塚幹也、前田嘉信
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植前に実施された卵巣組織凍結における卵巣内微小残存病変の評価
3. 学会等名 日本造血免疫細胞療法学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 藤井伸治.(分担)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 234
3. 書名 造血細胞移植看護基礎テキスト ~不妊対策~	

1. 著者名 鈴木直ら(編)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 415
3. 書名 新版 がん・生殖医療 第2章09 がん患者の現況(血液疾患・白血病, リンパ腫)	

〔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	遠西 大輔 (Ennishi Daisuke) (20825096)	岡山大学・大学病院・研究教授 (15301)	
研究 分担者	中塚 幹也 (Nakatsuka Mikiya) (40273990)	岡山大学・保健学域・教授 (15301)	

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
---------	---------