

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18205

研究課題名（和文）がん患者のための妊孕性温存における卵細胞傷害の原因と改善方法の究明

研究課題名（英文）Investigating the causes and remedies for oocyte injury in fertility preservation for cancer patients.

研究代表者

鈴木 由妃（Suzuki, Yuki）

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：00836992

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ICRマウスより獲得したM 卵子を新鮮卵子群と凍結融解卵子群に分けてそれぞれ評価を行った。走査型電子顕微鏡による内部構造変化の評価では、新鮮卵子群と比較して凍結融解卵子群においてミトコンドリアの密度の低下とミトコンドリアの膨化を認めた。Mito-tracker Green(MTG)、TMREでの蛍光染色施行後、共焦点レーザー顕微鏡でミトコンドリアのクラスター分布およびその面積の解析評価では、両群間のクラスター数に有意差を確認した。定量PCR及びデジタルPCRのミトコンドリアDNAコピー数の評価では両者間に有意差は認めなかった。凍結卵子における障害は細胞死を誘導する障害ではないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若年がん患者における妊孕性温存療法の一つとして卵子凍結が注目を浴びている中、本研究は卵子凍結における低出生率について着目した。今回の検討では卵子の凍結融解におけるダメージを検討した。顕微鏡下観察による形態的評価では新鮮卵子同様全く異常のない凍結融解卵子であっても、卵子の凍結融解ストレスによるミトコンドリア障害が生じていることを明らかにした。卵子凍結では卵子の細胞死を誘導するほどのダメージではないが、ミトコンドリアをはじめとしたオルガネラの障害が生じることが示唆された。本研究により凍結融解障害が凍結卵子における妊娠率低下の原因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：MII oocytes acquired from ICR mice were divided into fresh and frozen-thawed oocyte groups for evaluation. The evaluation of internal structural changes by scanning electron microscopy showed a decrease in mitochondrial density and mitochondrial swelling in the freeze-thawed oocyte group compared to the fresh oocyte group, and after fluorescent staining with Mito-Tracker Green (MTG) and TMRE, the mitochondria were analyzed by confocal laser scanning microscopy. The analysis and evaluation of the cluster distribution and its area showed a significant difference in the number of clusters between the two groups. Quantitative PCR and digital PCR evaluation of mitochondrial DNA copy number showed no significant difference between the two groups. Frozen oocyte damage was found not to be a cell death-inducing disorder.

研究分野：卵子凍結

キーワード：妊孕性温存療法 卵子凍結 ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

アメリカ生殖医学会では2013年にガイドラインで成熟卵子凍結保存は臨床上確立された技術であると発表し、卵子凍結では、15-18個の卵子が必要と述べている。凍結卵子1個あたりの生児獲得率は6-7%と決して高い値とは言えず、卵子凍結の治療成績の向上が望まれる。

GV卵子では成熟体外培養(In Vitro Maturation)を実施し、M卵子へ成熟させる必要があるが、その技術は確立しておらずIVMで培養したM卵子は自然に得られたM卵子と比較し胚発育率は低く、卵子凍結ではM(第二減数分裂前期)が一般的であり、未熟卵子GV期での凍結は実施されていない。ミトコンドリアは酸化的リン酸化を通じて大半のATP産生を担い、生体におけるエネルギー代謝の中心であり、細胞酸素消費の90%を占め、1-5%の活性酸素を発生させ、細胞内最大の活性酸素発生源となる。(Kang.D et al: Clin. Chem. Lab. Med. 41:1281-1288:2008) 卵子凍結での生児獲得率が低いのは、凍結がストレスとなりうるということが知られているが、ミトコンドリア機能にどのような影響を及ぼすのかについて報告はない。

### 2. 研究の目的

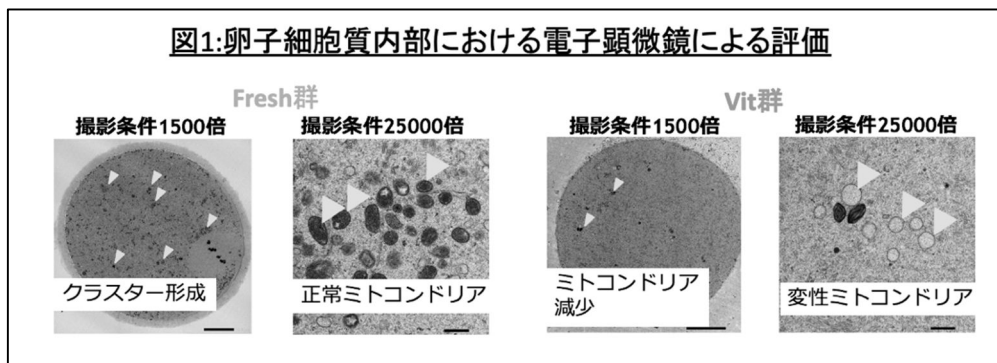
卵子凍結保存の技術および治療成績の向上を目指しMII卵子の凍結融解過程に起こる傷害を評価するため、卵子凍結における凍結ストレスに対するミトコンドリア動態を検証する。

### 3. 研究の方法

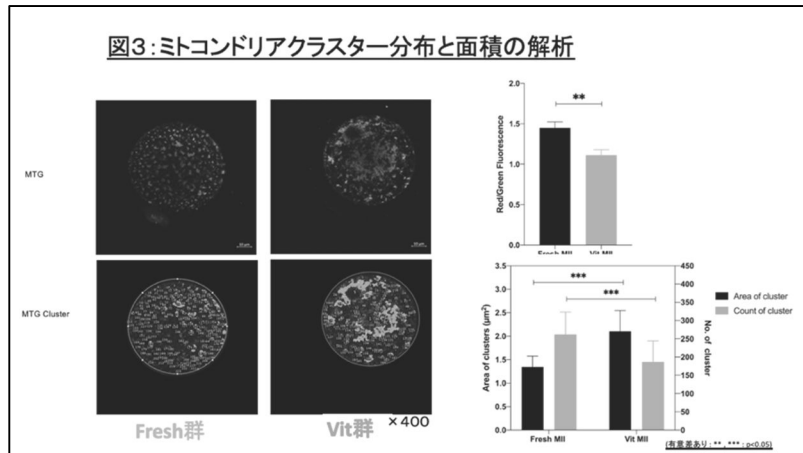
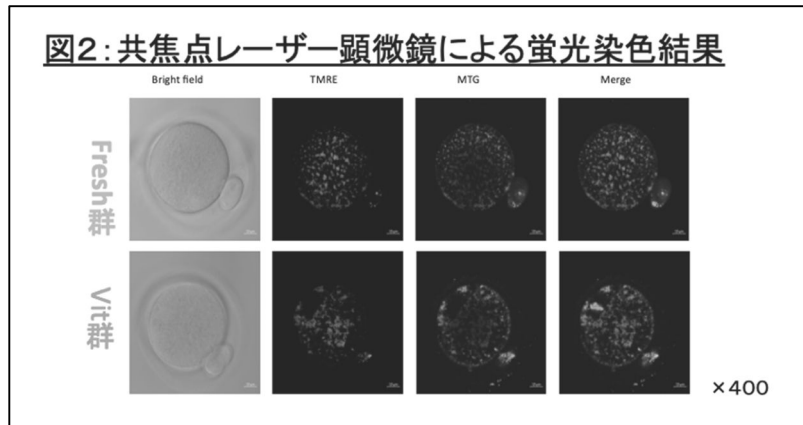
6-12週齢ICRマウスより獲得したM卵子を新鮮卵子群、凍結融解卵子群の2群に分け、走査型電子顕微鏡を用いてミトコンドリアを観察した。また、それぞれのミトコンドリアの分布および膜電位の評価としてMito-tracker Green(MTG)、TMREでの蛍光染色施行後、共焦点レーザー顕微鏡にてミトコンドリアのクラスター分布およびその面積の2D解析を実施した。ミトコンドリア恒常性評価として、RT-qPCRおよびデジタルPCRにてミトコンドリアDNAコピー数評価、ミトコンドリア恒常性関連遺伝子MFN1、MFN2、Dnm1、Opa1、Fis1、SIRT3を解析した。

### 4. 研究成果

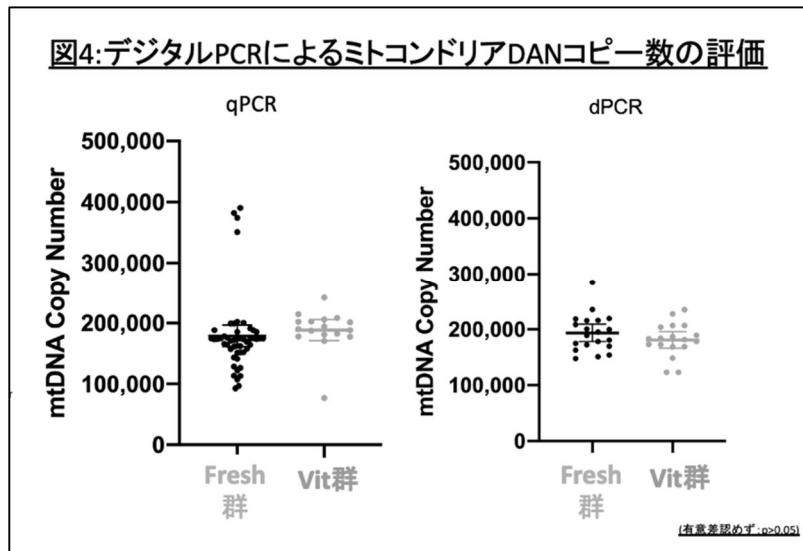
(1)走査型電子顕微鏡による評価では、凍結融解卵子群においてミトコンドリアの密度の低下と膨化が考えられた。(図1)



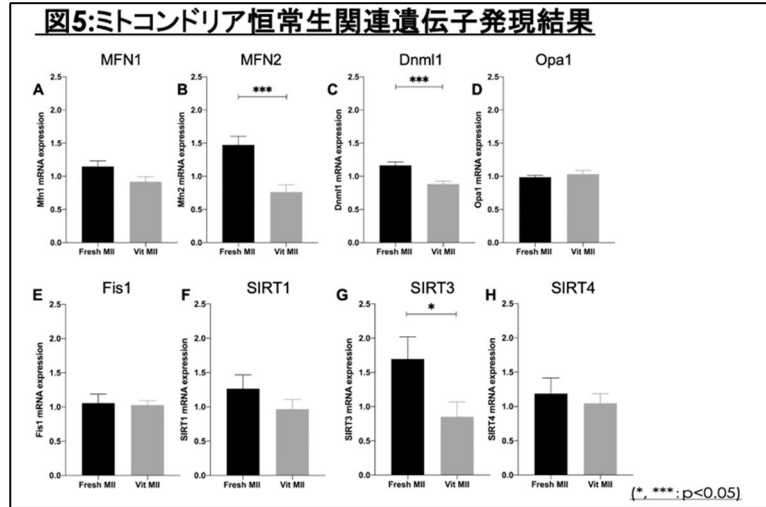
(2) 共焦点レーザー顕微鏡によるミトコンドリアのクラスター分布およびその面積の解析では、両群間にクラスター数に有意差を確認した。  
( $p < 0.05$ ) (図2、図3)



(3) ミトコンドリアのコピー数の評価では、両者間に有意差は認めなかった。  
( $p > 0.05$ ) (図4)



(4)ミトコンドリア恒常性関連遺伝子の解析では、MFN2、Dnm1、SIRT3 で凍結融解卵子群において遺伝子発現の有意差な低下を認めた。  
( $p < 0.05$ )(図5)



顕微鏡下観察による形態学的評価では新鮮卵子と同様全く異常のない凍結融解卵子であっても、卵子の凍結融解ストレスによるミトコンドリア障害が生じていることを明らかにした。一方でアポトーシスに至るほどの大きなダメージは受けないことが考えられ、ミトコンドリア内部の変化が何らかの傷害を引き起こし卵子凍結における妊娠率の低下の原因となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 由妃、杉下 陽堂、鈴木 直
2. 発表標題 未受精卵子凍結における凍結ストレスに対するミトコンドリア動態の検証
3. 学会等名 第68回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木由妃、孟令博、杉下陽堂、上川篤志、戸澤晃子、長谷川潤一、鈴木直
2. 発表標題 未受精卵子凍結におけるミトコンドリア動態の検討
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、孟令博、杉下陽堂、鈴木直
2. 発表標題 未受精卵子凍結におけるミトコンドリア動態の検討
3. 学会等名 第12回日本がん・生殖医療学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------