

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18221

研究課題名（和文）遺伝子発現プロファイル解析に基づいたヒト卵子体外培養系の構築と妊孕性温存への応用

研究課題名（英文）Development of a culture system using gene expression analysis in human oocytes and its application to fertility preservation.

研究代表者

田崎 秀尚（Tasaki, Hidetaka）

岡山大学・生殖補助医療技術教育研究センター・助教

研究者番号：00862012

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）：本研究ではヒト卵母細胞を体外発育させる目的で、研究協力の同意が得られた患者卵巣組織ならびに組織から単離した未発育卵胞を用いて培養条件の検討を行った。その結果、卵巣組織中の一次卵胞は、気相液相界面培養により二次卵胞へと成長した。さらに、卵巣組織から単離した発育途上卵胞は、低吸着wellプレートを用いることで、従来の2次元培養に比べ生体に類似した球体の卵胞形態を維持し、培養開始時に直径100 μ m前後であった卵胞直径は、1mm以上の胞状卵胞まで成長した。しかし、培養卵胞から回収した卵母細胞は、体外成熟培養による減数分裂能を有しておらず培養系のさらなる改良が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療による生殖線毒性を回避するため、妊孕性温存療法への注目が高まる中、凍結保存による卵巣への影響や、融解したヒト卵母細胞の培養条件が確立されていないといった課題がある。本研究の成果から、ヒト卵母細胞を体外発育させる基礎的培養条件が確立し、今後は凍結融解前後の遺伝子発現解析の結果をもとに培養系を改良することで、体外発育培養によるがん生殖医療への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to establish in vitro growth culture system of human oocytes, culture conditions were investigated using patient ovarian tissue, which obtained consent for research cooperation. As a result, primary follicles in the ovarian tissue grew into secondary follicles by air-liquid interface culture. Furthermore, the developing follicles isolated from the ovarian tissue maintained a spherical follicle morphology similar to an in vivo follicles compared to traditional two-dimensional culture by using a low-adsorption well plate. Around 100 μ m at the start of the culture, the follicle diameter grew to more than 1 mm in diameter. However, the oocytes recovered from the cultured follicles did not have meiotic potential by in vitro maturation culture, suggesting that further improvement of the culture system is necessary.

研究分野：生殖医学

キーワード：卵母細胞 スフェロイド IVG 妊孕性温存

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、若年がん患者の妊孕性温存治療として、卵巣凍結保存が注目されている。がん治療前に卵巣を凍結保存することで、化学療法や放射線治療の生殖腺毒性による妊孕性喪失や早発閉経などを回避できる。一方で、凍結処理は細胞に損傷を与え、融解後に細胞の質が低下してしまう。さらには、卵巣移植を介した悪性腫瘍細胞の再導入リスクが危惧されている。これら問題の解決策として、体外で卵子を産生・作出する研究が進められてきた。特に、基底膜により完全に隔離されている卵胞内への悪性細胞の混入リスクは排除できる。近年、体外培養系で始原生殖細胞から成熟卵子を作出し、産仔獲得の成果がマウスにおいて報告され、ヒト卵子の完全体外培養系の道が開かれつつある。しかしながら、ヒト卵子発育機序は不明な点が多く、研究結果は再現できていない。また凍結処理が体外培養時の卵子発育機序にどのような影響を及ぼすのかは明らかとなっていない。

代表者は、マウスに比べ卵子の発育期間が長くヒトに近いブタを対象に体外培養系の研究を行ってきた。生体内外における卵子発育機序の差異を解析し、これを体外培養系に補うことで成熟卵の獲得に成功した。卵子の発育に重要である顆粒層細胞を対象に、生体内と体外培養時の遺伝子発現を比較し、代謝活性の違いを見出した。この結果を基に、体外培養系に糖を補うことで卵子の発育能力が向上することを示した。また、卵胞腔の形成にはエストロゲンが重要な因子であることを示し、体外で卵胞腔形成を促進することで成熟卵の獲得に成功した。

このような背景から、安全な妊孕性温存治療を実現するためには、卵子の体外培養系の構築が唯一無二であり、卵子発育過程における顆粒層細胞の遺伝子発現や代謝活性の変化が、体外培養系構築の重要な手がかりとなると考えた。またヒト卵子発育機序は生体内でどのようにして支持され、そして体外培養および凍結処理においてどのような変化が起こるのか、については明らかではなく解決すべき課題である。

2. 研究の目的

本研究では、卵子発育を支持する顆粒層細胞の遺伝子発現プロファイルに着目し、凍結処理や体外培養が顆粒層細胞の卵子発育能に影響を与えるか検討する。生体内外での細胞機能の違いを候補とし培養系を改善することで、ヒト卵子体外培養系を確立する。

3. 研究の方法

研究協力の同意が得られた患者卵巣組織を本研究に用いた。卵巣表層は1mm程度に薄切し、1cm×1cmの卵巣切片を作成した。卵巣切片は、緩慢凍結法ならびガラス化凍結法を用いて保存した。卵巣切片は2mm×2mmに細切し液相気相培養に供試した。培養後、4%PFA またブアン液で固定し、パラフィン包埋した。卵巣切片を酵素処理し、未発育卵胞を単離した。未発育卵胞は、2次元培養、3次元培養または液相気相培養し、生存率、発育率を比較した。卵巣組織単離直後、凍結融解後、体外培養後に得られた卵胞はトランスクリプトーム解析用に保存した。

4. 研究成果

卵巣表層を気相液相界面培養することで、一次卵胞は二次卵胞へと成長した。しかし、3週間の培養期間では初期胞状卵胞の出現は認められなかった。卵巣組織から酵素処理にて単離した未発育卵胞は、低吸着wellプレートを用いることで、従来の2次元培養より生体に類似した球体の卵胞形態を維持する培養系を構築した。この培養系を用いることで直径100μm前後の未発育卵胞は、1mm以上の胞状卵胞まで成長することが示された。しかし、培養卵胞から回収した卵子卵丘細胞複合体は、体外成熟培養による減数分裂能を有しておらず培養系のさらなる改良が必要であると考えられる。研究当初に計画された手術予定の延期とキャンセルにより遺伝子発現解析用のサンプル確保に難航したため、期間内に解析が行えなかった。今後は凍結融解前後の遺伝子発現解析の結果をもとに改良した培養系を用いて、体外発育培養による妊孕性温存療法の開発に繋げていきたい。

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 山中寛子, 田崎秀尚, 大月純子
2. 発表標題 高張液処理はマウス未受精卵内に細胞外液を流入させる
3. 学会等名 第39回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田崎秀尚, 山中寛子, 大月純子
2. 発表標題 浸透圧ストレスに対する卵細胞膜の修復機構
3. 学会等名 第63回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田崎秀尚, 山中寛子, 大月純子
2. 発表標題 マウス卵細胞膜の修復機構におけるカルシウムイオンの関与
3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022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
---------	---------