

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09458

研究課題名（和文）卵巣組織凍結Vitrification法における新規凍結融解方法の確立

研究課題名（英文）The development of a new thawing method of ovarian tissue vitrification

研究代表者

杉下 陽堂 (Yodo, Sugishita)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20587745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：1)ウシ卵巣組織を超急速冷凍法Vitrificationにて凍結する。卵巣組織内における卵子や他オルガネラの生存率向上を目指し、加圧条件1.5atm、2.0atm、2.5atm下に凍結保護剤を卵巣組織に浸漬し、Vitrificationを実施した。結果組織的及びRT-PCRにおけるデータでは一部有意な差を認めた。2) Vitrificationの問題点は、1デバイスずつ凍結実施することが非効率でありSolid Surface Vitrification法を応用し、凍結実施効率を上げることが可能となった。3)高周波を用いた卵巣融解は、温度調整管理が非常に難しく、今後さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣組織凍結技術は、小児がんサバイバーにおける妊孕性温存療法として唯一の選択肢であり、実施例が増えている。卵巣組織凍結法は、緩慢凍結法とVitrification法の2つが提唱されるが、未だ確立した技術ではない。本研究は凍結卵巣内の卵子生存に大きく凍結保護剤の組織内浸漬が重要であることが理解でき、効率よく卵巣組織を凍結する手法をも確立できた。しかし簡便な融解方法を確立すべく、高周波を検討しているが、組織における融解温度の均一化と、急激な温度上昇をコントロールすることが難しい。今後より簡便な卵巣組織凍結、融解法を確立することが、小児がんサバイバーの妊孕性温存における急務であると考えている。

研究成果の概要（英文）：1) Bovine ovarian tissue is frozen by Vitrification, a super-rapid freezing method. In order to improve the survival rate of oocytes and other organelles in the ovarian tissue, Vitrification was performed by immersing the ovarian tissue in cryoprotectant under 1.5 atm, 2.0 atm, and 2.5 atm conditions. The results of histological and RT-PCR data showed some significant differences.2) The problem with Vitrification is that it is inefficient to freeze one device at a time, so the Solid Surface Vitrification method was applied to increase the freezing efficiency. 3) Frozen Ovarian warming using radiofrequency was difficult to control the warming temperature, and the further study is needed.

研究分野：凍結医学、卵巣生理学、抗酸化剤、ミトコンドリア代謝

キーワード：卵巣組織凍結 Vitrification 妊孕性温存 卵子 細胞小器官

1. 研究開始当初の背景

2018年3月にがん対策推進基本計画(第3期)が閣議決定され、国が取り組むべき施策としてAYA(adolescent and young adult:思春期・若年)世代の生殖機能温存を掲げ、喫緊の課題となっている。思春期前の小児及び抗癌剤や放射線療法といった卵巢毒性のあるがん治療の開始まで時間的猶予が切迫した若年女性では、卵巢組織凍結による妊孕性温存療法が唯一の選択肢であり、その実施数は増加の一途を辿っている。卵巢組織凍結法には、緩慢凍結法や申請者らが開発したVitrification法の2つが提唱されている。緩慢凍結法は低濃度の凍結保護剤の温度を緩徐に下げ、細胞の外に氷晶形成する事で細胞内脱水を促す凍結保存方法であり、凍結処置に数時間かかり特殊な大型機器を要し、実施可能施設が限定される欠点がある。一方、Vitrification法は高濃度の凍結保護剤を用い、短時間で急速に細胞内を脱水すると共に急激に冷却する事で細胞質をガラス化し凍結保存する方法である。特殊な大型機器は不要で、場所を選ばず簡便に施行できるという利点がある。近年、一定時間高濃度の凍結保護剤に組織を浸漬することで凍結保護剤の毒性に関連した細胞死が誘導される可能性が指摘された(Best et al, Arch Gynecol Obstet, 2015)。どちらが最適な卵巢組織凍結方法かは結論が出ておらず(Amorim et al, RBM, 2011)、既報のプロトコールでは卵巢組織凍結融解移植後の卵胞形成率、生児獲得率は低く安定した治療成績の報告がないのが現状である。研究代表者はVitrification法を最適な凍結方法として確立することを目指し、プロトコールの改善検討を重ねてきた。我々は2006年からVitrification法における組織傷害のメカニズムの解明と成績向上を目指し検討してきた。組織傷害の原因は(1)高濃度凍結保護剤による細胞傷害と(2)凍結融解時の細胞内氷晶形成にあることを見出し、2010年にエチレングリコールを用いたVitrification法のプロトコールを開発し(Hashimoto et al, RBM, 2010)、臨床応用され2例の生児獲得症例を報告した(Suzuki et al, Hum Rep, 2015)。残るもう一つの原因である細胞内氷晶形成による卵巢組織障害においては、電子顕微鏡下で凍結融解後の卵巢組織内の卵子にミトコンドリアの膨化および内膜の崩壊、変性ミトコンドリアの増加と間質細胞の核の萎縮といった氷晶形成を疑う所見を認め、卵巢組織の不完全な脱水/濃縮が影響していることを確認した。組織傷害の原因として(1):凍結保護剤が細胞及びオルガネラへの浸透が悪い、(2):凍結時の冷却速度が遅い、(3):融解時の加温速度が遅いの三点に着目した。細胞内オルガネラの代表としてミトコンドリアがある。ミトコンドリアは二重膜構造を呈し、内膜は透過性が極めて低く凍結保護剤が入りにくく氷晶形成が起こりやすい細胞小器官と言える。融解後卵巢組織における変性ミトコンドリアの抑制が、細胞生存率の向上につながることを見出し、凍結融解卵巢組織の組織傷害の指標となることを見出した。

2. 研究の目的

本研究は卵巢組織凍結・融解後の卵子の生存率を向上させるために凍結融解後の卵巢組織中の卵子における細胞小器官ミトコンドリア・間質細胞核の核障害の程度及び原因を評価し、(1)組織内脱水の改善、(2)効率の良い冷凍速度の改善、(3)融解時の温度上昇環境の改善を目指す。

3. 研究の方法

(1)組織内脱水の改善:融解後卵巢組織内凍結保護剤遺残濃度と組織障害の評価

ウシ卵巢組織から髓質部分を削り、皮質部分を1cm×1cm×1mmのシート状の卵巢組織切片を対象とした。卵巢組織切片をVitrification法で凍結・融解し、融解直後と融解培養後の卵巢組織内部の各凍結保護剤(DMSO、エチレングリコール、プロパンダイオール)の遺残濃度をガスクロマトグラフィ法にて評価した。

凍結処置において、卵巢組織切片を凍結液に浸漬する際、特殊な加圧容器内で加圧条件下(非加圧、1.5atm、2.0atm、2.5atm)で実施した。各加圧下凍結処置後の凍結融解卵巢組織の組織障害の評価として免疫染色にて実施し、アポトーシス率、DNA障害率をRT-PCR法、免疫染色法を実施した。また併せて融解卵巢組織から卵胞を核出しその生存率、アポトーシス率、DNA障害率をニュートラルレッドによる染色法とRT-PCR法で比較検討した。

(2) Solid surface vitrification法を応用した凍結速度の効率化の立証

液体窒素中にデバイスを投入する従来の凍結処置と、液体窒素中のアルミニウム板における液面上の表面にデバイスの静置し凍結処置を行うSolid surface vitrification法それぞれの凍結処置時におけるデバイスの冷却温度変化を検討した。凍結した卵巢組織は肉眼による卵巢組織内氷晶形成の有無、卵巢組織障害評価としてアポトーシス率、DNA障害率をRT-PCR法で、組織内卵胞の生存率をニュートラルレッドによる染色法で評価した。

(3) 高周波を用いた卵巢融解方法の開発

高周波加温デバイスにて凍結卵巢組織を一度に温度上昇し、組織障害の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) 組織内脱水の改善

凍結融解卵巣組織内凍結保護剤遺残濃度は、融解実施後 60 分でほぼ組織内凍結保護剤濃度はほぼゼロになることを確認した。加圧条件は 1.5atm、及び 2.0atm では、卵胞生存率及びアポトーシス率、DNA 障害率が低下することが確認できたが、2.5atm 以上であると有意な差を得られず、組織障害を誘導する可能性が示唆された。

(2) Solid surface vitrification 法を応用した凍結速度の効率化の立証

Solid surface vitrification 法では、デバイスを同時に凍結することに対して、1 つ 1 つデバイスを凍結保存することと、何ら遜色のない凍結技術を提供できることが示唆された。

(3) 高周波を用いた卵巣融解方法の開発

高周波加温デバイスでの加温の結果、デバイス内の加温は均一ではなく、検体を静置する位置により大きくばらつきがあることが明らかになった。

凍結卵巣融解において、高周波を用いることで簡便に一度に複数の組織を融解できる可能性を考え、高周波を用いる融解方法を検討したが卵巣組織内部の温度を均一化することが難しく、また組織内の温度が 37 度以下を維持する温度条件の設定が非常に困難であることが明らかになり、良好な実験条件を設定できない問題点が生じた。高周波を用いた場合は組織の一部であれば、非常に良好な融解方法である可能性が示唆されるが、卵巣組織内における融解温度は、組織の厚み、面積、組織の枚数、高周波にどのような方法で卵巣組織を当てるかなどのパラメータの調整が必要となることが明らかになった。高周波をどの組織にも均一に当てること、また高周波デバイスによっては複数の組織で融解を実施した場合、特に凍結保護剤を拡散し、水と置換する方法が手技的に困難であった。今後更なる研究としては、企業との共同研究が望ましいことが示唆された。

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Meng Lingbo, Sugishita Yodo, Nishimura Sandy, Uekawa Atsushi, Suzuki-Takahashi Yuki, Suzuki Nao | 4. 巻 107(5) |
| 2. 論文標題 Investigation of the optimal culture time for warmed bovine ovarian tissues before transplantation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biology of Reproduction | 6. 最初と最後の頁 1319-1330 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioac161 | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Sugishita Yodo, Meng Lingbo, Suzuki-Takahashi Yuki, Nishimura Sandy, Furuyama Sayako, Uekawa Atsushi, Tozawa-Ono Akiko, Migitaka-Igarashi Junko, Koizumi Tomoe, Seino Hibiki, Natsuki Yasunori, Kubota Manabu, Koike Junki, Edashige Keisuke, Suzuki Nao | 4. 巻 37(3) |
| 2. 論文標題 Quantification of residual cryoprotectants and cytotoxicity in thawed bovine ovarian tissues after slow freezing or vitrification | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Human Reproduction | 6. 最初と最後の頁 522 ~ 533 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/humrep/deab274 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計2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、孟令博、鈴木由妃、上川篤志、鈴木直 |
| 2. 発表標題 小児・AYA世代がん患者に対する卵巣組織凍結・融解卵巣移植に要する至適時間の検討 |
| 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 杉下陽堂、鈴木直 |
| 2. 発表標題 卵巣組織凍結・移植～そのコツとピットフォール～ |
| 3. 学会等名 第12回日本がん・生殖医療学会学術集会（招待講演） |
| 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 |
|---------------|--|--------------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 鈴木 直 (Suzuki Nao) (90246356) | 聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|