

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09494

研究課題名（和文）小児と成人の卵胞発育の差異に適応させたヒト卵胞培養系の開発

研究課題名（英文）Development of a human follicle culture system adapted to differences in follicle development between children and adults

研究代表者

奥宮 明日香 (Okunomiya, Asuka)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70893791

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）：小児・若年がん患者が、がん治療前に卵巣を保護するために卵巣を凍結した場合、卵巣にがん細胞が混入しうるがん種では体外培養によって成熟卵子を得る必要がある。小児と成人では卵胞の性質が異なり、適した培養方法が異なる可能性があり、マウス実験でFiglaという遺伝子が幼若/成熟個体の卵胞で異なる働きをすることが示唆された。違いを調べる実験が安定してできるように、ヒト及びマウスの卵巣組織を培養し、そこから取り出した卵胞を培養して卵子を得るといった実験方法を研究し、一定の成果を得た。また、現行の凍結法で卵巣を凍結すると卵胞の多くが消失することがわかったが、保護剤の有効な候補因子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス実験でFiglaという遺伝子が幼若/成熟個体の卵胞で異なる働きをすることが示唆された。ヒト及びマウスの卵巣組織を培養し、そこから取り出した卵胞を培養して卵子を得るといった実験方法を研究し一定の成果を得た。また、卵巣組織を凍結融解するとかなりの数の原始卵胞が減少することがわかったが、有効な保護剤の候補因子を同定することができた。今後は、安定した実験系と効率的な卵巣組織凍結法によって、小児と成人の卵胞の性質の違いを明らかにしたり、それぞれに適した効果的な卵胞の培養系の開発が進むことが期待され、白血病など卵巣へ転移の可能性のあるがん種の患者に対しても、温存後不妊治療の道が開かれることになる。

研究成果の概要（英文）：When children and young cancer patients freeze their ovaries to protect them prior to cancer treatment, mature oocytes need to be obtained by in vitro culture in cancer types where the ovaries can be contaminated with cancer cells. The nature of follicles differs between children and adults, and suitable culture methods may differ, and mouse experiments suggest that the gene Figla works differently in follicles from juvenile/mature individuals. In order to ensure that experiments to investigate the differences can be carried out in a stable manner, the experimental method of culturing human and mouse ovarian tissue and then culturing the follicles extracted from it to obtain oocytes was studied and certain results were obtained. It was also found that many follicles are lost when ovaries are frozen using the current freezing method, but a promising candidate factor for a protective agent could be identified.

研究分野：生殖医療

キーワード：体外卵胞培養系 凍結保護剤 がん生殖 小児がん 白血病

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年のがん治療の飛躍的進歩により、がん患者の生命予後が改善され、がん治療後の QOL 向上が重要視されるようになってきた。なかでも、抗がん剤や放射線治療によって性腺がダメージを負うことは多く、若年がん患者の妊孕能温存は重要課題のひとつである。女性の場合、排卵誘発によって卵子回収ができる場合には卵子・胚凍結が第一選択となるが、排卵誘発ができない小児がん患者や、成人であっても治療までに排卵誘発のための時間的猶予がない場合には卵巣組織凍結が選択される。治療後に凍結卵巣を融解移植し、挙児に至る例が全世界で 170 例を超えているが、卵巣組織に転移の可能性がある血液がんをはじめとしたがん種では、卵巣組織を移植することはできないことが問題であった。この場合、卵巣組織から卵胞を回収し、体外培養によって卵胞を十分に成長させ、続く体外成熟によって成熟卵を得ることができれば、転移の可能性がある卵巣組織を移植せずに済む。しかし、ヒトでは未だに確立された体外培養の方法がなく、小児由来の卵胞と成人由来の卵胞とでは性質用意するに差異があり、それぞれに適した培養系を用意するべきであると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、二次卵胞の幼若/成熟個体間の差異を見出しそれぞれの至適培養環境を検討することである。差異に基づいた至適培養環境の評価にあたって必要となる、安定した体外卵胞培養系の獲得も求められる。また、実臨床においては、凍結融解後の卵巣組織を用いるため、培養前の条件として凍結融解が卵巣組織に与える影響を加味する必要がある。

### 3. 研究の方法

(1) 小児と成人の卵胞の違いは何かを明らかにするために、マウス二次卵胞の卵母細胞を用いた幼若個体(10-12 日齢)と成熟個体(8 週齢)間の比較トランスクリプトーム解析を行った。

(2) 卵胞発育に関連する因子として、性腺特異的転写因子である Figla に着目し、マウス卵胞培養系を用いて、卵胞発育に関する働きを調べた。具体的には、二次卵胞の卵母細胞に Si-Figla をマイクロインジェクションして Figla の発現を抑制したうえで、卵胞を培養し、卵胞径を測定した。

(3) マウスの体外卵胞培養系(卵巣組織培養-卵胞培養-体外成熟)の安定化を図った。

(4) ヒト卵巣組織に占める、原始卵胞や発育卵胞の状況を、組織学的に評価した。

(5) ヒト卵巣組織を凍結融解した場合の、原始卵胞や発育卵胞の状況を組織学的に評価し、凍結保護剤の効果を検証した。

(6) ヒト卵巣組織から回収された卵胞を体外で培養し、発育を評価する方法を検討した。

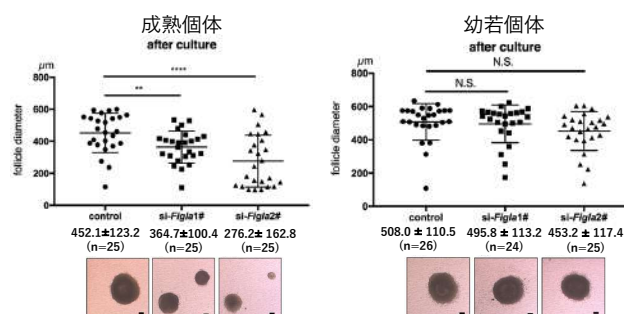
### 4. 研究成果

#### (1) マウス二次卵胞の卵母細胞の成熟/幼若個体間の比較トランスクリプトーム解析

卵胞発育にかかる遺伝子として figla、パスウェイとして酸化ストレス反応(グルタチオン代謝)、脂質代謝( $\beta$ 酸化)、及び cAMP 代謝に関わる因子が幼若/成熟個体間で発現量が異なるというデータを得た。

#### (2) マウス二次卵胞における Figla の働き

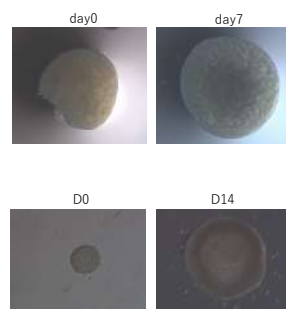
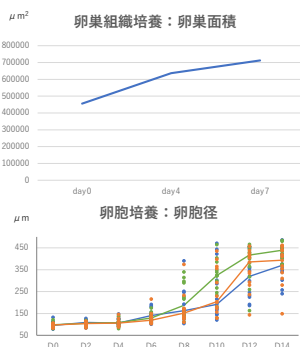
成熟個体では si-Figla1#, 2#のいずれも control に比較して卵胞径が有意に小さかった。一方で、幼若個体では si-Figla1#, 2#のいずれも control に比較して卵胞径に有意な差を認めなかった。このことから、Figla が成熟個体の二次卵胞においては卵胞発育を促進する働きを示すが、幼若個体



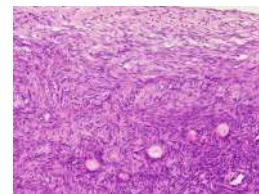
の二次卵胞においては卵胞発育に影響しない可能性が示唆された。

### (3) マウス体外卵胞培養系

マウス卵胞培養に用いてきた、インサートメンブレン (Transwell-COL) の流通が途絶えたため、急遽、別の器具を用いて培養系の安定を図った。この際に成長卵胞から卵母細胞卵丘細胞複合体を取り出し、体外成熟系によって MII 卵を獲得することもアウトカムとした。安定するまでにかなりの時間を要したが、一定の成果を得た。



24歳 卵巣組織切片

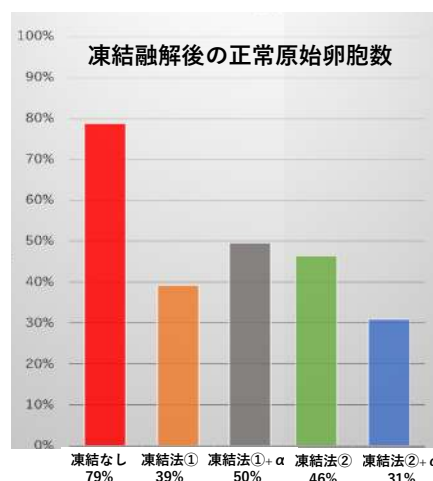


### (4) ヒト卵巣組織の原始卵胞及び発育卵胞数の評価

実験によって、ヒト卵巣切片に占める卵胞のほとんどが原始卵胞であり、二次卵胞以降の発育卵胞は、非常に数が少ないことが判明した。

### (5) ヒト卵巣組織の凍結融解後の原始卵胞数と凍結保護剤の効果

実臨床においては、凍結融解後の卵巣組織を用いるため、培養前の条件として凍結融解が卵巣組織に与える影響を加味する必要がある。現在広く用いられている既存の凍結法①②について、凍結融解後の卵巣組織の原始卵胞数を評価した。加えて、凍結融解操作による浸透圧変化等の卵巣毒性から卵巣を保護する目的で新規物質  $\alpha$  を添加した場合の、卵巣保護効果を検討した。結果、凍結融解によって原始卵胞数が半分以下に減ること、及び新規物質  $\alpha$  は従来の凍結法①に対して、卵巣保護効果を示すことが明らかとなった。



### (6) ヒトの体外卵胞培養系

(4)の結果より、卵巣切片を組織培養することで原始卵胞を二次卵胞に誘導し、二次卵胞を単離して卵胞培養する方針とした。最終的に、卵巣切片を8週間培養することで、回収される二次卵胞数が安定した。単離した二次卵胞の体外培養について、培養液へ添加する物質や培養環境(気相液相境界、ゲル包埋など)等について条件検討を繰り返し、一定の条件下で効率よく後期卵胞が得られるようになった。

総じて、二次卵胞の幼若/成熟個体間の差異を見出しそれぞれの至適培養環境を検討する点については、マウス卵胞を用いた実験によって、卵胞発育にかかる因子として性腺特異的転写因子である Figla が、幼若/成熟個体間で異なる働きをしている可能性が示唆された。また、差異に基づいた至適培養環境の評価にあたって必要となる安定した体外卵胞培養系について、一定の成果を得た。また、培養前の条件としての凍結融解が卵巣組織に与える影響について、既存の凍結法が正常原始卵胞数に与える影響を明らかにし、影響を緩和する有力な候補物質を見出すことができた。今後は、本研究による安定した実験系と効率的な卵巣組織凍結法によって、小児と成人の卵胞の性質の違いを明らかにしたり、それぞれに適した効果的な卵胞の培養系の開発が進むことが期待され、白血病など卵巣へ転移の可能性があるがん種の患者に対しても、温存後不妊治療の道が開かれることが期待される。

#### 【研究実績】

[Okunomiya, A.](#) et al. Figla promotes secondary follicle growth in mature mice. Scientific reports 11, 9842, doi:10.1038/s41598-021-89052-3 (2021).

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 2件）

1. 著者名 Okunomiya Asuka, Horie Akihito, Tani Hirohiko, Sato Yukiyasu, Takamatsu Shiro, Brown J. B., Sugimoto Miki, Hamanishi Junzo, Kondoh Eiji, Matsumura Noriomi, Mandai Masaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Figla promotes secondary follicle growth in mature mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89052-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sagae Yusuke, Horie Akihito, Yanai Akihiro, Ohara Tsutomu, Nakakita Baku, Kitawaki Yoshimi, Okunomiya Asuka, Tani Hirohiko, Yamaguchi Ken, Hamanishi Junzo, Lydon John P., Daikoku Takiko, Watanabe Hideto, Mandai Masaki	4. 巻 115
2. 論文標題 Versican provides the provisional matrix for uterine spiral artery dilation and fetal growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Matrix Biology	6. 最初と最後の頁 16~31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.matbio.2022.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Asuka Okunomiya, Akihito Horie, Baku Nakakita, Yoshimi Kitawaki, Yusuke Sagae, Hirohiko Tani, Yukiyasu Sato, Miki Sugimoto, J.B. Brown, Masaki Mandai
2. 発表標題 Figla promotes folliculogenesis of secondary follicles of mature mice
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会 International Session
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥宮明日香
2. 発表標題 がん生殖医療における卵巣凍結融解法の最適化
3. 学会等名 第13回日本がん生殖医療学会学術集会 学術奨励賞（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村充宏、奥宮明日香、櫻井梓、今北幸、池田愛紗美、下仲慎平、矢内晶太、小原勉、北脇佳美、万代昌紀、堀江昭史
2. 発表標題 卵巣に関する最新知見
3. 学会等名 第42回日本受精着床学会総会・学術講演会 ワークショップ-
4. 発表年 2024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	堀江 昭史  (Akihito Horie)  (30535836)	京都大学・医学研究科・講師    (14301)	

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