

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18044

研究課題名（和文）人工卵巣を用いたマウス原始卵胞発育の機能的解析

研究課題名（英文）The analysis of the primordial follicle growth using the artificial ovary.

研究代表者

岩端 秀之（Iwahata, Hideyuki）

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：70770923

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では人工卵巣デバイスを用いて単離卵胞の発育および、卵母細胞の生存・成熟を誘導できるかを検証した。型コラーゲンから作成した人工卵巣デバイスを用いて卵胞培養液中のホルモン値の推移やタイムラプス、免疫組織学的検査を用いて生体外、生体内での卵胞はの生存・発育および、アポトーシス誘導や卵胞周囲の血管新生誘導の有無などを確認し、成熟卵胞の獲得に成功した。今後人工卵巣より獲得した成熟卵胞の機能などを確認していく必要があると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

月経発来前の小児女性がん患者にとって唯一の妊孕性温存療法である卵巣組織凍結・移植は“研究段階の技術”ではあるが、本邦においても実施件数が増加傾向にある。その最大の懸念は、卵巣組織内に存在する腫瘍細胞が移植時に再移入する可能性であるが、そのリスクに対して今回の人工卵巣のような新規技術の開発が重要であり、今回の研究結果は安全かつ効率的な人工卵巣の開発と臨床応用への第一歩となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined whether an artificial ovarian device can induce the development of isolated follicles and the survival and maturation of oocytes. Using an artificial ovarian device made from type IV collagen, we confirmed the survival and development of follicles in vitro and in vivo, as well as the induction of apoptosis and angiogenesis around the follicles, using time-lapse and immunohistological examinations of the hormone levels in the follicle culture medium, and successfully obtained matured oocytes. In the future, it will be necessary to confirm the function of mature oocytes obtained from artificial ovaries.

研究分野：がん・生殖医療

キーワード：人工卵巣 妊孕性温存 卵巣組織移植 微小残存病変

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児・AYA 世代がん患者に対する妊孕性温存療法の 1 つである卵巣組織凍結は、月経発来前の小児女性がん患者にとって唯一の妊孕性温存療法となり、卵巣組織凍結・移植は“研究段階の技術”ではあるが、本邦においても実施件数は近年増加傾向にある。卵巣組織凍結・移植における最大の懸念は、卵巣組織内に存在する腫瘍細胞が移植時に再移入する可能性であるが、近年ではそのリスクに対して「人工卵巣」を用いた新たな移植方法が考案されている。今後安全かつ効率的な人工卵巣の開発と臨床応用を踏まえ、より実地臨床に近い条件での検証に基づいた知見が必要と考えられ、人工卵巣を用いた単離卵胞の発育に関する研究を立案した。

2. 研究の目的

小児がん患者などでは本法以外には妊孕性を温存する技術がなく、現在安全な卵巣組織移植法の開発が急務となっている。今回「人工卵巣」を用いた新たな卵胞細胞移植法について注目した。本法は従来の卵巣組織移植とは異なり、卵胞のみを移植するため、移植片に微小残存病変が混入するリスクを限りなくゼロに低減することができる方法とされている。現段階の「人工卵巣」の問題点として(1)人工卵巣に用いる最適な素材および形態について確立されていないこと、(2)既報の人工卵巣では卵胞発育における機能的な評価が困難であり、本法の有用性についても基盤となる知見が乏しいこと、さらに今までに解明されていない(3)原始卵胞の発育に必要な物質または卵胞数などの知見が乏しいことが挙げられる。本法の臨床応用を目指し、より実地臨床に近い条件での検証が必要と考えられ、人工卵巣を用いた原始卵胞の発育を改善するための知見を確立するため、本研究では卵胞の生存効率が良く、生殖・内分泌機能を長期間持続するための人工卵巣を作製するにあたり、卵胞の生存により良い環境を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

二次卵胞及び早期胞状卵胞を用いて新規に作製した人工卵巣の有効性を検証する。

(1) 人工卵巣の作製

卵胞径 150 ~ 180 μ m の二次卵胞に適した金属モールドを作成し、アガロースやコラーゲンなど、人工卵巣の素材となるゾル溶液を滴下する。ゲル化した後に取り出し、卵胞を充填するための凹みを持つデバイスを作成する。

(2) 卵胞単離 (器械的単離法)

本研究では日齢 16-17 日のマウスを用い、27 ゲージ注射針を用いて直接卵巣から器械的に卵胞を単離する。

(3) 人工卵巣の機能評価

単離した卵胞を人工卵巣デバイスに充填し、*in vitro*にて 8 日間卵胞発育を観察する。観察には卵胞径の増大 (タイムラプスによる観察) および培養液中のエストラジオール (E2) 値の上昇を確認し、デバイス間での比較を行う。また、*in vivo*にて上記にて単離された原始卵胞を人工卵巣へ植え付け、6-7 週齢同種マウスへ移植する。移植後 3-4 週で 57BL/6 由来の産仔が得られるか確認する。また、その後デバイスを採取し切片を作成、HE 染色にて卵胞発育の有無、CD31 や VEGF (血管内皮細胞増殖因子) を用いた免疫組織学的染色による血管新生の有無を確認する。卵胞の発育が認められれば、卵胞を採取し、卵胞単離による卵子への影響を調査するため、成熟卵子の獲得が可能かを評価する。その後獲得した成熟卵子の受精率、胚盤胞到達率、

産仔獲得率、流産率、外表奇形の有無を検証する。さらに研究が進めば VEGF などを含むゲルやシートで卵胞を植え付けた人工卵巣を覆い、それを移植することによって月経が発現するまでの期間、月経が持続する期間についてゲルを使用しない群をそれぞれ比較・検証する。

4. 研究成果

上述した方法によりアガロース(A)やコラーゲン(C)を素材とした人工卵巣デバイスを作成した。マウス卵巣より器械的に卵胞単離を行い、直径や 150~180 マイクロメートルの初期二次卵胞を約 20 個デバイスへ充填し *in vitro* および *in vivo* での有用性の評価を行った。*in vitro* 研究ではそれぞれの素材のデバイス上の卵胞発育を 8 日間観察した。評価には卵胞径、培養液中のエストラジオール(E)値を用いた。本研究において A デバイスでの卵胞発育と比較して C デバイスでの卵胞発育は、卵胞径の増加および培養液中の E 値の上昇の点で明確であった。さらに発育した卵胞から低率であるものの成熟卵子を獲得することに成功した。

また、*in vivo* 研究において同種マウスに卵胞を充填した C デバイスを腹膜へ移植した。移植後 2 週間で卵胞の生存、卵胞径の増大を確認することができた。

さらに、移植から約 3 週間後に採取した卵胞は切片を作成し HE 染色、さらには GDF9 または BMP15 を用いた免疫組織学的染色や TUNEL 法を用いて、卵胞発育の証明および卵胞へのダメージの評価、および CD31 や VEGF (血管内皮細胞増殖因子) を用いた免疫組織学的染色による血管新生の有無を確認を行った。TUNEL 法では人工卵巣内のアポトーシスは有意に確認できなかった。また卵胞周囲に CD31 や VEGF 陽性を示す細胞が散見され、血管新生の誘起を示唆する所見であった。

また、移植後 3 週間の人工卵巣デバイスから低率であるものの成熟卵子を獲得することに成功した。今後成熟卵子の媒精や顕微授精による受精能の評価や胚発生評価を行い、人工卵巣の機能的評価を進めていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 岩端秀之、鈴木直	4. 巻 28
2. 論文標題 がん患者の妊孕性温存 - がん・生殖医療の実践	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 200 205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hideyuki Iwahata, Azusa Mukae, Seido Takae, Yodo Sugishita, Nao Suzuki
2. 発表標題 Possibility of Artificial Ovary
3. 学会等名 Philippine Society for Fertility Preservation, Ovarian Tissue Cryopreservation Workshop（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hideyuki Iwahata, Azusa Mukae, Seido Takae, Yodo Sugishita, Nao Suzuki
2. 発表標題 Development of the artificial ovary to reduce the risk of reimplantation of minimal residual disease in ovarian tissue transplantation.
3. 学会等名 The 3rd International Congress of the Asian Oncology Society（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩端秀之、岩端由里子、小沢あずさ、高江正道、洞下由記、鈴木直.
2. 発表標題 卵巣移植における微小残存病変再移植のリスク低減を目指した人工卵巣の開発について
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 岩端秀之、迎あずさ、高江正道、鈴木直
2. 発表標題 人工卵巣の開発
3. 学会等名 第80回聖マリアンナ医科大学 医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩端秀之、迎あずさ、板井駿、高江正道、尾上弘晃、鈴木直
2. 発表標題 人工卵巣の開発 - 卵巣組織移植におけるリスク低減を目指して -
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩端秀之、高江正道、鈴木直	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 288
3. 書名 新版 卵巣組織凍結・移植 新しい妊孕性温存療法の実践	

〔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