

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11089

研究課題名(和文) 妊孕性温存のためのヒト卵巢凍結保存と移植後の血管新生促進による成熟卵子の作出

研究課題名(英文) Cryopreservation of ovarian tissue

研究代表者

本橋 秀之 (Motohashi, Hideyuki)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号：20554380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：若年女性のがんに罹患すると、抗がん剤や放射線治療によって不妊になるリスクが増大する。そこで生存性に優れた卵巢組織凍結保存法を開発することを目的とした。本研究では、まず最初にガラス化保存新規デバイスを開発し、それらに最適化したガラス化保存プロトコルの確立を行った。次に動物モデルにより、開発したガラス化保存デバイスおよび最適化プロトコルにもとづいて卵巢組織を凍結融解し、移植によってその後の体内発育能や卵子の体外成熟能を検証した結果、組織の生着、卵胞発育および卵母細胞成熟が確認され、本卵巢組織ガラス化保存法の有効性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若年女性のがんに罹患すると、抗がん剤や放射線治療によって不妊になるリスクが増大するが、本研究では卵巢凍結保存法の改良を通じて、若年女性がん患者でもがん治療後に子供を持つ希望が生まれ、少子化の緩和と生殖医学の発展への一助となる。

研究成果の概要(英文)：The cancer treatments in young women such as anti-cancer drugs and radiation can affect fertility by several biologic systems. The purpose of this study was to develop a novel cryopreservation method for ovarian tissue. In this study, an improved vitrification for ovarian tissue resulted in survival and subsequent development in vivo and oocyte maturation in vitro after cryopreservation.

研究分野：生殖工学

キーワード：卵巢凍結保存

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

若年女性のがんに罹患すると、抗がん剤や放射線治療によって生殖細胞がダメージを受け不妊となることが問題となっている。そこで、がん治療開始前に原始卵胞を含む卵巣組織を採取して凍結保存しておき、治療後に生殖能力を回復させる治療が注目されている(Silber, Mol Hum Reprod, 18: 59-67,2012; Hachem et al., Future Oncol, 10: 1767-1777, 2014)。このため、より有効性の高い卵巣組織の凍結保存法の発展が期待されている。

卵巣組織の凍結保存を経て、がん治療後に妊孕性を回復させる方法は自家移植による妊孕性回復等が考えられてきた。自家移植は最も自然な方法であるが、移植する卵巣組織にがん細胞が混入する可能性は否定できない。実際に、白血病患者由来の凍結卵巣組織の移植モデル実験において、がん細胞のコンタミネーションが報告されている(Dolmans et al., Blood, 116: 2908-2914,2010)。したがって、自家移植は一定の危険性が伴う。

そこで、新たな可能性として異種移植系を用いた妊孕性回復が議論されている(Dittrich et al., Fertil Steril, 103:1557-1565, 2015)。Dittrichらは、倫理面や安全性について議論しつつ、発生能の高さから判断して異種移植による生殖補助医療が現実的なオプションとなり得ることに言及しており、まさに今後の展開が注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、第一に卵巣組織をターゲットとした新規の凍結保存法を開発することに主眼を置いて、ガラス化保存新規デバイスの開発、凍結保存および融解プロトコルの改良を行うことを最初の目的とした。従来のガラス化保存法は、直接液体窒素に投入して凍結するため、周囲に蒸気が継続的に発生し、冷却速度が低下することが考えられる。そこで、生存性に優れた卵巣凍結保存を実現するためには、超急速冷却に優れた、ガラス化保存新規デバイスを開発する必要があり、なおかつそれに適した凍結・融解プロトコルを検証して改良を行い最適化する必要があると考えられる。

第二に、凍結・融解後の卵巣組織を有効に発生させ、卵胞発育や卵母細胞成長および成熟を促すためには、卵巣組織移植における血管新生やそれに伴う移植後組織の生着性の向上が求められる。そこで、一連の卵巣組織移植プロトコルの改良を行って、従来法より生着性および発生能に優れた移植法を確立することを目的とする。以上により、卵巣組織凍結保存・融解・移植による妊孕性温存システムを開発することを目的とし、本研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ガラス化冷却デバイスの開発と有効性の検証

まず、卵巣凍結保存に特化したガラス化保存デバイスの開発を行った。デバイスの候補を複数製作し、それぞれのデバイスについて、卵巣組織の凍結・融解操作を行い、有効性を従来法と比較し検証した。凍結融解操作時に温度計測を行い、各デバイスや操作法ごとの温度変化を計測した。温度融解後に組織細胞の生存性および損傷性を評価した。これらの得られたデータの指標から最適な凍結融解プロトコルを選別し、卵巣凍結保存に特化したガラス化保存法を確立した。

### (2) 卵巣組織の自家移植プロトコルの検討

卵巣組織の移植後の発生能については、動物モデルを用いて検討を行った。メス

マウス性成熟個体（ICR）より卵巣を摘出し、開発したガラス化保存デバイスおよび最適化により確立したガラス化保存・融解プロトコールによって、卵巣組織の凍結・融解操作を実施した。融解後の卵巣組織を腎被膜下に自家移植して in vivo 発生させ、その後の発生能を調査した。in vivo 発生の最終段階において、ゴナドトロピン（eCG）の投与を行った。移植・in vivo 発生後のマウスの腎臓を摘出し、移植卵巣組織を回収後、卵母細胞-卵丘細胞複合体（OCCs）を回収して、体外成熟（IVM）を実施した。

#### 4．研究成果

##### （１）ガラス化冷却デバイスの開発と有効性の検証

新規ガラス化保存デバイスを試作し、凍結操作時における温度変化を計測した結果、従来法に比べ冷却能の有意な向上が認められた（ $P<0.05$ ）。さらにデバイス法や操作法による超急速冷却および融解時の温度変化および組織細胞生存性の指標をもとに、最適なガラス化保存デバイスを確定し、それを用いた場合に最適な結果が得られる凍結融解操作プロトコールが確立された。

##### （２）マウス卵巣組織の自家移植プロトコールの検討

実験動物モデルを用いた卵巣組織の移植試験の結果、移植卵巣組織における高い生着能、胞状卵胞への発育および卵子発生が確認された。回収された卵母細胞-卵丘細胞複合体（OCCs）に対して体外成熟（IVM）を行った結果、一部の卵母細胞は減数分裂を再開し、最終的に卵母細胞成熟（第二減数分裂中期（MII）への進行）が認められた（図1）。以上の結果に基づく指標から、体内発生における最適化条件が明らかとなり、本卵巣ガラス化保存法の確立およびその有効性が示された。

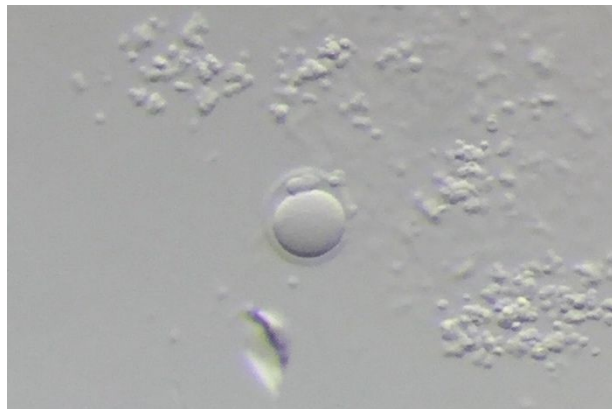


図1．体外成熟した卵母細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本橋秀之
2. 発表標題 性腺組織の凍結保存とその意義 ヒトの妊孕性温存と動物の遺伝資源保全 ヒトから動物へ？
3. 学会等名 第2回ライフサイエンス技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2017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	中塚 幹也  (Nakatsuka Mikiya)  (40273990)	岡山大学・保健学研究科・教授    (15301)	
研究分担者	舟橋 弘晃  (Funahashi Hiroaki)  (50284089)	岡山大学・環境生命科学研究科・教授    (15301)	
研究分担者	若井 拓哉  (Wakai Takuya)  (60557768)	岡山大学・環境生命科学研究科・准教授    (15301)	
研究分担者	高山 修  (Takayama Osamu)  (80650879)	岡山大学・環境生命科学研究科・客員研究員    (15301)	