

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20170

研究課題名(和文) ヒト卵子凍結におけるコヒーシン蛋白関連の加齢性変化と、卵子凍結安全性に関する検討

研究課題名(英文) Cohesin protein-related age-related changes and the safety of oocyte freezing

研究代表者

白澤 弘光 (Hiromitsu, Shirasawa)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60598019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では主に非刺激下摘出卵巣から未成熟卵子を回収し、体外成熟培養、単為発生プロセスをタイムラプス下に観察した。未成熟卵子回収手法についてはこれまでの子宮体癌摘出卵巣において、開腹および腹腔鏡下に得る独自の手法を用いた。回収した未成熟卵子については体外成熟培養を施行し、これまでのハンドメイドの培養液と商業メディウムによる体外成熟培養成績の比較などを行った。また成熟卵子に対しては単為発生プロセスを詳細に観察し、第1極体放出タイミングとその後の単為発生成績の関連を明らかにした。また単為発生プロセスにおいて卵凍結-融解を行い、その後次世代シーケンサを用いた異数性評価も行い安全性を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果によって各年齢層における体外成熟培養後の単為発生能および卵子凍結安全性に関する評価が、染色体異数性およびタイムラプスイメージングによる動的挙動を踏まえて施行することが可能となった。これらの知見はヒト単為発生由来胚盤胞作成および効率的な多能幹細胞作成プロセスにも寄与する所見であり、その意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, immature oocytes were mainly recovered from non-stimulated resected ovaries and observed under in vitro maturation culture and time lapse of the parthenogenetic activation process. For immature oocyte retrieval, we used a unique method of open and laparoscopic retrieval in endometrioid adenocarcinoma patients with resections of ovaries. The collected immature oocytes were cultured for in vitro maturation, and the results of in vitro maturation culture with commercial medium were compared with those of the previous hand-made culture medium. For mature oocytes, we observed the parthenogenetic activation process in detail and clarified the relationship between the timing of first polar body release and subsequent parthenogenetic activation process performance. In addition, egg freezing and thawing were performed in the parthenogenetic activation process, followed by aneuploidy evaluation using a next-generation sequencer to observe the safety.

研究分野：生殖医学

キーワード：体外成熟培養 単為発生 タイムラプスイメージング 次世代シーケンサー 異数性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト卵子を用いた研究は研究目的に卵子を得るハードルから、卵子回収から研究に供するまでのタイムラグを生じることが多い。しかし卵子の加齢性変化はヒト個体加齢による変化のみならず、体外に卵子が放出された後の時間的変化も考慮する必要があり、卵子回収後速やかに研究に供されるシステムが望ましい。我々は 2013 年に子宮体癌摘出卵巢より未成熟卵子を回収し、その後の体外成熟培養(in vitro maturation, IVM)によって成熟卵を得る手法を報告し、これらの成熟卵を用いた研究成果を複数発表してきた。

近年生殖医療においては、いわゆる「卵子老化」が生殖医療の成績に与える影響が分子生物学的、染色体異数性など複数の視点から研究されている。しかし前述の研究資料としてヒト卵子を得るハードルから、非ヒトにおける卵子研究ほど体外成熟培養、受精プロセス、受精後の胚発生、長期胚培養など各種ステージにおける評価が進んでいないのが実情である。

今回我々はヒト卵子の凍結を含めた安全性を、コヒーシンなどの染色体分離過程とヒト個体加齢に影響を与える因子を含めて、検討を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は大きく 2 つに分かれる。一つは安定した研究資料としてのヒト卵子回収・収集システムの確立と、それにより得られた未成熟卵子を用いた体外成熟培養-単為発生-卵子凍結および融解を含めた評価である。これらの評価に関してはタイムラプスイメージング、次世代シーケンサを用いた異数性評価及び蛍光免疫染色などのデータを用いることで、多角的な評価が可能となる。

3. 研究の方法

ヒト対象としては 45 歳以下の子宮体癌 IA 期患者であり、その手術時摘出卵巢を用いた。また単一施設では回収未成熟卵子に制限があることから、共同施設からも未成熟卵子を回収し、輸送による卵子収集も行った。

卵胞液輸送後の IVM 成績を、非輸送群と比較することで効率的な輸送方法の確立および、輸送後の発生能を評価することで今後の妊孕性温存(fertility preservation)にも寄与する知見を得ることが可能である。輸送方法としては 36 度保温バッグ内に CO2 発生装置を用い、IVM メディアキットによる washing medium と卵胞液を混和した上で輸送する方法と、卵胞液を 37 度保温下魔法瓶内のチューブ内にて輸送する 2 つの方法を用いた。対象としては非卵胞液輸送群の IVM 成績として評価を行った。

体外成熟培養は IVM メディウムを用いて、その過程をタイムラプスイメージング(TLI)により評価した。第 1 極体(first polar body, fPB)放出のタイミングを記録し、IVM 開始から 24 時間以内に fPB を放出した早期放出群、IVM から 24-48 時間で fPB を放出した後期放出群の 2 群に分けて、その後の単為発生過程を TLI にて観察した。単為発生は 6-DMAP、カルシウムイオノファを用いて刺激を行い、その後に single step medium を用いて 140 時間の培養を行った。この間の培養過程も TLI にて観察している。単為発生過程で卵割をストップした卵においては Oct-4, Cdx-2、染色体に対する蛍光免疫染色を行い、その後凍結-融解プロセスを経た後に次世代シーケンサを用いた異数性評価を行った。

4. 研究成果

本研究成果は論文(1)Shirasawa H, et al. Oocyte collection and in vitro maturation after train transportation of human follicular fluid aspirated from resected non-stimulated ovaries of patients with endometrial adenocarcinoma. *Reprod Med Biol.*(2019)および(論文 2) Shirasawa H,et al. The timing of the release of the first polar body predicts the cleavage rate after parthenogenetic activation for human oocytes obtained by in vitro maturation. *Fertility and Sterility.*(2019)にて外部に報告している。論文(1)にて卵胞液輸送群の成熟率を 38.6%、非輸送群の成熟率が 69.2%と、卵胞液輸送群で有意に成熟率が低下する($p=0.013$)ものの、非輸送群でも患者当たり平均 8.1 個の未成熟卵子回収が可能であり、研究に供する際の有用性を報告している。また、論文(2)にて 5 症例 50 個の未成熟卵子に対する IVM により成熟率は 56.0%であり、早期放出群($n=15$)、後期放出群($n=13$)それぞれの単為発生成績は、2 細胞以上に分裂したのが早期放出群、後期放出群それぞれ 33.3%、46.2%($p=0.488$)であるものの、8 細胞以上では 0%、30.8%($p=0.02$)と有意に後期放出群で卵割が進んでいることを明らかにした(表 1)。また後期放出群では morula 以上は 15.4%であった。また、単為発生にて卵割をストップした卵においても異数性を認めない卵を確認し、現在データを解析中である(unpublished data)。

論文(2)の表 1

	Early group (n=15)	Late group (n=13)	p value
≥ 2cell	33.3% (n=5)	46.2% (n=6)	p=0.488
≥ 8cell	0%	30.8% (n=4)	p=0.020
≥ morula	0%	15.4% (n=2)	p=0.206

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hiromitsu Shirasawa, Yukiyo Kumazawa, Wataru Sato, Kazumasa Takahashi, Yukihiro Terada	4. 巻 112
2. 論文標題 The timing of the release of the first polar body predicts the cleavage rate after parthenogenetic activation for human oocytes obtained by in vitro maturation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fertility and Sterility	6. 最初と最後の頁 e142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.07.491	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 -
1. 著者名 Shirasawa Hiromitsu, Ono Natsuki, Kumazawa Yukiyo, Sato Wataru, Sato Naoki, Ihara Motomasa, Yaegashi Nobuo, Terada Yukihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Oocyte collection and in vitro maturation after train transportation of human follicular fluid aspirated from resected non-stimulated ovaries of patients with endometrial adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 180~189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12265	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 -
1. 著者名 Iwasawa Takuya, Takahashi Kazumasa, Goto Mayumi, Anzai Mibuki, Shirasawa Hiromitsu, Sato Wataru, Kumazawa Yukiyo, Terada Yukihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Human frozen-thawed blastocyst morphokinetics observed using time-lapse cinematography reflects the number of trophectoderm cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0210992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210992	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 -
1. 著者名 白澤弘光	4. 巻 8
2. 論文標題 若手の最新研究紹介コーナー ヒト卵子凍結におけるコヒーシン蛋白関連の加齢性変化と、卵子凍結安全性に関する検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 産科と婦人科	6. 最初と最後の頁 970-972
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 -

1. 著者名 Shirasawa Hiromitsu, Terada Yukihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation and research material	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 258 ~ 267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12042	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 -

1. 著者名 Hiromitsu Shirasawa, Yukiyo Kumazawa, Wataru Sato, Natsuki Ono, Yukihiro Terada	4. 巻 19
2. 論文標題 In vitro maturation and cryopreservation of oocytes retrieved from intra-operative aspiration during second enucleation for ovarian tumor: A case report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gore.2016.11.009	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 -

1. 著者名 Tatsunori Shimizu, Takehiro Sato, Katsushi Tsukiyama, Hiroki Fujita, Shunsuke Kato, Manabu Hoizumi, Hiromitsu Shirasawa, Takuma Narita, Yukihiro Terada, Yutaka Seino, Yoichiro Yamada	4. 巻 158
2. 論文標題 Food intake affects sperm-egg fusion through the GIP/PSG17 axis in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2134-2144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2016-1861	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 -

1. 著者名 Yohei Onodera, Kazumasa Takahashi, Mayumi Goto, Mibuki Anzai, Natsuki Ono, Hiromitsu Shirasawa, Wataru Sato, Hiroshi Miura, Naoki Sato, Akira Sato, Yukiyo Kumazawa, Yukihiro Terada	4. 巻 12
2. 論文標題 The location of "8"-shaped hatching influences inner cell mass formation in mouse blastocysts.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0175150	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiromitsu Shirasawa, Yukiyo Kumazawa Wataru Sato, Kazumasa Takahashi Yukihiro Terada
2. 発表標題 The timing of the release of the first polar body predicts the cleavage rate after parthenogenetic activation for human oocytes obtained by in vitro maturation
3. 学会等名 American Society for Reproductive Medicine 2019 Scientific Congress & Expo
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白澤 弘光, 熊澤由紀代, 佐藤 亘, 高橋 和政, 富樫嘉津恵, 尾野 夏紀, 九島 紫織, 寺田 幸弘
2. 発表標題 単為発生刺激と顕微授精における前核持続時間の差異と解釈について
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白澤弘光、熊澤由紀代、佐藤亘、岩澤卓也、尾野夏紀、坂口太一、九島紫織、安西実武貴、高橋和政、寺田幸弘
2. 発表標題 当院における妊孕性温存目的の卵子凍結におけるIVM活用と今後の課題
3. 学会等名 第60回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromitsu Shirasawa
2. 発表標題 Time lapse imaging study of relationship between the timing of the first polar body release after in vitro maturation for non-stimulated human oocytes and the parthenogenetic process
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白澤弘光, 熊澤由紀代, 佐藤亘, 高須賀緑, 金森恭子, 兒玉英也, 寺田幸弘
2. 発表標題 形態的評価を考慮した、当院における40歳以上の患者に対する移植個数の検討
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白澤 弘光・熊澤 由紀代・佐藤 亘・高橋 和政・安西 実武貴・吉川 諒子・岩澤 卓也・寺田 幸弘
2. 発表標題 妊孕性温存を目的とする術中卵子回収・IVM・卵子凍結における、極体放出過程のタイムラプス観察意義
3. 学会等名 第59回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白澤弘光, 熊澤由紀代, 佐藤亘, 岩澤卓也, 高橋和政, 安西実武貴, 寺田幸弘
2. 発表標題 ヒト未成熟卵子に対するIVM後の第1極体放出のタイミングに着目した, 単為発生過程のタイムラプス解析
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiromitsu Shirasawa
2. 発表標題 In vitro maturation of immature human oocytes retrieved from non-stimulated ovaries resected from patients with gynecologic cancer and from intraoperative non-stimulated ovaries in patients undergoing surgery for non-cancer indications
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白澤弘光・熊澤由紀代・佐藤亘・尾野夏紀・安西実武貴・高橋和政・寺田幸弘
2. 発表標題 非刺激下摘出卵巢から得たヒト未成熟卵子に対する、IVM 過程のタイムラプス解析
3. 学会等名 第58回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熊澤由紀代、白澤弘光、佐藤亘、清水大、寺田幸弘
2. 発表標題 腹腔鏡下手術後に卵巢境界悪性腫瘍の診断に至り、根治術時に術中卵子回収を施行した1例
3. 学会等名 第57回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白澤弘光
2. 発表標題 地方における高齢女性とART：現状と今後の課題
3. 学会等名 第62回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白澤弘光，熊澤由紀代，尾野夏紀，佐藤 亘，兒玉英也，寺田幸弘
2. 発表標題 ART施行中の患者に対する腹腔鏡下・開腹下筋腫核出術に関する成績の比較検討
3. 学会等名 第54回東北生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 白澤弘光, 尾野夏紀, 佐藤 亘, 熊澤由紀代, 寺田幸弘
2. 発表標題 片側のみ卵巣が残存し核出既往のある患者において, 非卵巣刺激下に行う手術時の未成熟卵子回収個数をいかに予測するか
3. 学会等名 第61回日本生殖医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiromitsu Shirasawa, Yukiyo Kumazawa, Wataru Sato, Natsuki Ono, Hideya Kodama, Yukihiro Terada
2. 発表標題 In vitro maturation of immature human oocytes retrieved from non-stimulated ovaries resected from patients with gynecologic cancer and from intraoperative non-stimulated ovaries in patients undergoing surgery for non-cancer indications
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
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