

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20197

研究課題名(和文) 医原性卵巣機能不全に対する妊孕性温存を目的とした卵巣組織凍結・再移植の基礎的研究

研究課題名(英文) The basic experiment of human ovarian tissue freezing-thawing and xenotransplantation in nude mice for fertility preservation

研究代表者

村上 直子 (MURAKAMI, Naoko)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：30768718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト卵巣組織をガラス化法または緩慢凍結法で凍結保存し各凍結法の手順で融解した群と、融解後にヌードマウスの腹腔内に異種移植した群と、凍結・融解・移植のいずれもしなかったコントロール群との3つに分け、凍結や融解の処置や異種移植が組織構造や卵胞の発育にどのように影響するのかを評価した。

コントロール群と凍結・融解のみを施行した群では、卵胞が存在する皮質間質の線維化は認められず、卵胞の発育の程度に有意差は認められなかった。異種移植した群では間質は著明に線維化していたが、2次卵胞以降の発育卵胞が認められた。異種移植した群において、生着率、線維化の程度、卵胞発育の程度に凍結法による差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若年がん女性などでの妊孕性温存処置の一つに卵巣組織凍結・融解再移植があるが、再移植後の卵巣組織では原始卵胞が著明に減少し、卵巣機能を維持できる期間には個人差が大きいことが判明している。

本研究では、原始卵胞の維持に関わる卵巣皮質の間質構造は卵巣組織の凍結や融解処置では変化せず、再移植後の卵巣組織では線維化に伴い正常な間質組織が減少し、発育した初期卵胞が認められたことから、再移植後の生着過程で生じる間質の線維化が卵胞発育の活性化、原始卵胞の減少に関連することが示唆された。移植に伴う組織構造の恒常性の維持に関与している分子メカニズムの解明は、妊孕性温存処置の治療効果の改善につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The biopsied ovarian tissue was divided into three groups; fresh-ungrafted tissue group, cryopreserved by vitrification or slow freezing and thawed-ungrafted tissue group and harvested-grafted tissue, to assess the status of follicle and fibrosis in ovarian cortex after xenografting in order to understand how ovarian tissue cryopreservation and grafting may affect follicular morphology and cortical structures.

All fresh-ungrafted tissue and thawed-ungrafted tissue showed presence of primordial follicles and no apparent fibrosis in cortex. In follicular structures and stromal fibrosis, neither there was no difference according to the freezing method. Harvested-grafted tissue subjected to both vitrification and slow freezing showed advanced follicular growth and intense fibrosis.

研究分野：がん生殖医療

キーワード：がん生殖医療 妊孕性温存 卵巣組織凍結

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんなどに対する卵巣障害性を有する化学療法や、卵巣を照射野に含む放射線療法は、医原性卵巣機能不全や難治性不妊症の原因となり得る。がん治療の進歩により生命予後は改善されつつあり、原疾患の治療の前後に妊孕性を温存することは、がん患者の QOL の改善に寄与すると考えられる。妊孕性温存処置の一つに卵巣組織を摘出して凍結させ、その後融解して再移植するものがあるが、その利点として、迅速に施行できること、大量に卵胞を温存できる可能性があること、自家移植後に自然月経の再開と自然妊娠が望めることが挙げられる。しかし、融解 - 再移植後の卵巣組織では原始卵胞が著明に減少し、卵巣機能を維持できる期間には個人差が大きいことが判明している。その原因として、再移植後の卵巣組織の低酸素ストレスや、再灌流障害が考えられている。卵巣組織凍結の成績を向上させることは、がん罹患した若年女性の QOL を改善させる選択肢を増やすことに繋がると考えられる。

2. 研究の目的

卵巣組織の凍結融解再移植をヒト女性において実験的に検討することは倫理的に困難であるため、本研究ではヌードマウスを用いたヒト卵巣皮質組織の凍結融解再移植モデルを作成し、凍結、融解および生体への再移植による卵巣皮質の組織構築の形態的変化や卵胞の発育動態を検討することにより、卵巣組織凍結の成績向上に繋がる分子病理学的機序を明らかにすることを目的とする。また、凍結法をガラス化法とプログラムフリーザーによる緩慢凍結法とに分け、凍結法の違いにより卵巣皮質の組織構築や卵胞の発育動態に差異が生じるかについても検討する。

3. 研究の方法

本研究は、長崎大学病院倫理委員会と長崎大学動物実験委員会の承認を得て施行された。

(1) ヒト卵巣組織の採取について

平成 28 年度から平成 29 年度の間に、早期子宮がんや卵巣を摘出する必要がある未閉経の女性にインフォームド・コンセントを施行し、書面による同意を得られた子宮頸癌 5 名、子宮体癌 1 名の計 6 名から卵巣組織を採取した。対象女性の平均年齢は 30.7 ± 3.0 歳 (21 ~ 31 歳) で、月経不順はなく、手術時に卵巣に肉眼的な異常がないことを確認したうえで母指頭大の卵巣皮質を生検した。

(2) 卵巣組織の取り扱いについて

採取した卵巣組織の一部は未凍結のまま永久標本とし、Fresh-ungrafted 群 (コントロール群) とした。残りをガラス化法または緩慢凍結法で凍結した。凍結組織の融解時に一部はヌードマウスに移植せずに Thawed-ungrafted 群とした。融解した残りの組織をヌードマウスに移植し、生着後に回収できたものを Harvested-grafted 群とした。

(3) 凍結法とヌードマウスへの移植について

短冊状にトリミングした後に、ガラス化法では北里バイオファルマ社の Ova Cryo Kit Type M[®] と Ova Cryo Device Type M[®] を用いて凍結した。緩慢凍結法では、Dolmans MM[®] (Reproduction, 2007) の方法により、朝日ライフサイエンス社のプログラムフリーザー-KRYO 10[®] を用いて凍結した。各凍結法に対応した手順に沿って凍結した組織を融解し、 2×2 mm に細切した。10 週齢のメスのヌードマウス (BALB/c-nu) 6 匹の腸間膜および子宮間膜に 3-4 片ずつ移植し、4 ~ 12 週間飼育した後に生着した移植片を摘出した後に安楽死させた。

(4) 組織学的検討について

ブアン固定、パラフィン包埋後に $5 \mu\text{m}$ の連続切片を作成し、 $20 \mu\text{m}$ 毎に HE 染色および Masson's Trichrome 染色を行った。正常の皮質特異的間質の有無、線維化の程度 (Masson's Trichrome 染色)、卵胞の有無と卵胞発育の程度について評価した。

4. 研究成果

ガラス化法では、49 片を 16 匹のヌードマウスに移植し、34 片を回収した。なお、移植術後に死亡したヌードマウスはいなかった。生着率は 69 % で、線維化を伴うものは 31 片 (91 %) あった。皮質特異的間質を有するものは 15 片 (44 %) あり、8 片 (23 %) に卵胞が認められた。認められた卵胞には、原始卵胞、移行卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞の各段階の卵胞が含まれていた。緩慢凍結法では、20 片を 6 匹のヌードマウスに移植した。移植術後に 3 匹 (移植数 11 片) が腹腔内出血により死亡した。計画通りに飼育期間を終了した 3 匹のヌードマウスから 7 片を回収した。生着率は 78 % で、回収したすべての移植片に線維化を認めた (100 %)。皮質特異的間質を伴うものは 4 片 (57 %) あり、3 片 (43 %) に卵胞が認められた。一次卵胞と二次卵胞が認められ、原始卵胞、移行卵胞、胞状卵胞は認められなかった。凍結法による、生着率、線維化率、皮質特異的間質を含む割合、卵胞を含む割合に有意差は認められなかった。Fresh-ungrafted 群では原始卵胞は温存され、卵巣皮質の間質組織の線維化は認められなかった。Thawed-ungrafted 群

でも原始卵胞は温存されており，卵巣皮質の間質組織の線維化は認められず，凍結法による差異はなかった．Harvested-grafted 群では，いずれの凍結法においても原始卵胞は減少し，温存された卵胞の中には一次卵胞，二次卵胞，胞状卵胞の各段階の発育卵胞が認められ，卵巣皮質の間質組織の著明な線維化が認められた．卵巣皮質の間質構造は凍結 - 融解の過程には有意な影響を受けていなかったが，凍結法によらず移植 - 生着の過程において正常な間質構造が喪失し卵胞の活性化が認められたことから，原始卵胞の維持には卵巣皮質の正常な間質構造が必要と推察された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 村上直子, 北島道夫, 永田典子, 井上統夫, 金内優典, 三浦清徳, 竹下浩明, 橋迫美喜子, 田畑和宏, 木下直江, 増崎英明	4. 巻 37
2. 論文標題 不妊治療中に左付属器膿瘍と直腸瘻をきたした腸管子宮内膜症の1例	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本エンドメトリオーシス学会誌	6. 最初と最後の頁 155-160
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kitajima Michio, Miura Kiyonori, Inoue Tsuneo, Murakami Yuko, Kitajima Yuriko, Murakami Naoko, Taniguchi Ken, Yoshiura Ko-ichiro, Masuzaki Hideaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Two consecutive successful live birth in woman with 17 hydroxylase deficiency by frozen/thaw embryo transfer under hormone replacement endometrium preparation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gynecological Endocrinology	6. 最初と最後の頁 381-384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09513590.2017.1393512	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 Kitajima Michio, Murakami Naoko, Taniguchi Ken, Kitajima Yuriko, Tsukamoto Ozora, Miura Kiyonori, Masuzaki Hideaki	4. 巻 35
2. 論文標題 Histomorphological Aspects of the Ovarian Cortex Regarding Ovarian Reserve and Local Pelvic Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Mammalian Ova Research	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1274/jmor.35.21	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 Koga Tomohiro, Umeda Masataka, Endo Yushiro, Ishida Midori, Fujita Yuya, Takatani Ayuko, Shimizu Toshimasa, Sumiyoshi Remi, Igawa Takashi, Fukui Shoichi, Nishino Ayako, Kawashiri Shinya, Iwamoto Naoki, Ichinose Kunihiro, Tamai Mami, Nakamura Hideki, Origuchi Tomoki, Murakami Naoko, Kitajima Michio, Kawakami Atsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 Effect of a gonadotropin-releasing hormone analog for ovarian function preservation after intravenous cyclophosphamide therapy in systemic lupus erythematosus patients: a retrospective inception cohort study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1287-1292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.13318	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 Noguchi Masashi, Kitajima Michio, Abe Shuhei, Murakami Naoko, Kitajima Yuriko, Miura Kiyonori, Masuzaki Hideaki	4. 巻 39
2. 論文標題 Huge uterine fibroid arising from primary uterine cervical diverticulum: a case report and review of the literatures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology	6. 最初と最後の頁 1186-1187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01443615.2019.1588237	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 村上直子, 北島道夫, 梶村 慈, 松本加奈子, 原田亜由美, 北島百合子, 三浦清徳	4. 巻 3
2. 論文標題 医原性早発卵巣機能不全と診断された後に排卵周期が再開した2例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本がん・生殖医療学会誌	6. 最初と最後の頁 52-56
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 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 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Naoko Murakami, Michio Kitajima, Nozomi Aihara, Yuriko Kitajima, Kaname Ooyama, Kiyonori Miura, Hideaki Masuzaki
2. 発表標題 Comprehensive analysis of immune complex antigen in seminal plasma and follicular fluids of infertile couple with low fertilization rate.
3. 学会等名 第41回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上直子, 嶋田貴子, 北島百合子, 北島道夫, 増崎英明, 三浦清徳
2. 発表標題 長期の不妊治療中に高用量MPA療法を繰り返した 2例
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上直子, 北島道夫, 福島愛, 松本加奈子, 北島百合子, 増崎英明, 三浦清徳
2. 発表標題 ホルモン補充周期での凍結融解胚移植における子宮内膜発育不全の臨床背景に関する検討
3. 学会等名 第37回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoko Murakami, Michio Kitajima, Miki Yamada, Yuriko Kitajima, Kiyonori Miura
2. 発表標題 Current fertility consultation and preservation for iatrogenic ovarian failure in Nagasaki University Hospital
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上直子, 北島道夫, 北島百合子, 三浦清徳
2. 発表標題 ヌードマウスの腹腔内に異種移植したヒト凍結融解卵巣組織の生着率と組織構築に関する検討
3. 学会等名 第10回日本がん・生殖医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上直子, 北島道夫, 下村友子, 北島百合子, 瀧口大輔, 古里文吾, 吉田敦, 三浦清徳, 永井毅, 増崎英明
2. 発表標題 診断に難渋したテストステロン産生性嚢胞性卵巣腫瘍の一例
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 村上直子、北島道夫、相原希美、谷口憲、北島百合子、大山要、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 男性不妊に関連した精漿中免疫複合体のイムノコンプレキソーム法による網羅的解析
3. 学会等名 第37回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、相原希美、谷口憲、北島百合子、大山要、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 不妊を伴う子宮内膜症に特異的な免疫複合体抗原の特定を目的とした卵胞液の免疫複合体解析
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 村上直子、北島道夫、渡邊灯、北島百合子、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 月経周期異常を呈する若年女性におけるAMHを含めた内分泌プロファイルと臨床症候との関連
3. 学会等名 第23回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、相原希美、谷口憲、北島百合子、大山要、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 卵胞液中に存在する子宮内膜症合併不妊症に特異的な免疫複合体抗原の網羅的解析
3. 学会等名 第40回日本エンドメトリーオーシス学会講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 医原性早発卵巣機能不全と診断された後に排卵周期が再開した2例
3. 学会等名 第9回 日本がん・生殖医療学会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、谷口憲、北島百合子、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 当科における乳がん患者に対する生殖医療の現況
3. 学会等名 第74回九州・沖縄生殖医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、下村友子、谷口憲、北島百合子、瀧口大輔、吉田敦、三浦清徳、古里文吾、永井毅、増崎英明
2. 発表標題 テストステロン、LH、AMHが高値を示し続発性無月経を呈した卵巣腫瘍の1例
3. 学会等名 第62回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、谷口憲、北島百合子、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 正所性子宮内膜におけるAMHR2の発現動態に関する検討
3. 学会等名 第39回日本エンドメトリーシス学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoko Murakami, Michio Kitajima, Ken Taniguchi, Masanori Kaneuchi, Kiyonori Miura, Hideaki Masuzaki
2. 発表標題 Comparison of continuation rate of dienogest and oral contraceptives in women with endometriosis.
3. 学会等名 13th World Congress on Endometriosis - WCE 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、井上統夫、谷口憲、三浦清徳、木下直江、福岡順也、増崎英明
2. 発表標題 Isolated Leydig cell dysfunctionを呈したXY femaleの一例
3. 学会等名 第73回九州・沖縄生殖医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、永田典子、井上統夫、金内優典、三浦清徳、竹下浩明、増崎英明
2. 発表標題 不妊治療中に左付属器膿瘍と直腸瘻をきたした腸管子宮内膜症の1例
3. 学会等名 第254回長崎産科婦人科学会・長崎県産婦人科医会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 村上直子、原田亜由美、濱口大輔、北島道夫、金内優典、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 BMI 40 kg/m ² の高度肥満例に対する全腹腔鏡下子宮全摘術の2例
3. 学会等名 第56回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、原田亜由美、谷口憲、長谷川ゆり、井上統夫、三浦清徳、木下直江、福岡順也、増崎英明
2. 発表標題 当科で経験したY染色体を有する女性性分化疾患の2例
3. 学会等名 第61回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、谷口憲、井上統夫、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 妊孕性温存を試みた活動性SLE女性の1例
3. 学会等名 第31回日本生殖免疫医学会学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 村上直子、北島道夫、谷口憲、金内優典、三浦清徳、増崎英明
2. 発表標題 当科における医原性卵巣機能不全に対する妊孕性温存の現況
3. 学会等名 第255回長崎産科婦人科学会・長崎県産婦人科医会学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴原浩章, 村上直子, 北島道夫, 増崎英明, 善本知広, 本原剛志, 片瀨秀隆, 早川 智, 野島道生, 松井聖, 佐野 統, 佐藤裕公, 井川正人, 永松 健, 藤井知行, 竹下俊行, 米田 哲, 斎藤 滋, 山本樹生, 甲賀かをり, 大須賀 讓, 河村和弘, 繁田 実, 長谷川昭子, 吉野 修	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 730
3. 書名 実践 臨床生殖免疫学	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----