

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09469

研究課題名(和文) 多光子励起イメージング技術による新規低侵襲卵巣内がん微小残存病変の検出

研究課題名(英文) The new non-invasive detection system of minimal residual disease in human ovarian tissue using multi photon excitation imaging technology

研究代表者

佐治 史恵 (Saji, Fumie)

大阪大学・医学部附属病院・技術職員

研究者番号：40600987

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)：本研究では多光子励起イメージング技術により、卵巣における原始卵胞などの各種卵胞と微小残存病変である卵巣内がん細胞を非侵襲的に区別化するための最適なイメージング条件の構築を目的とした。

マウス卵巣における原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞および胞状卵胞等各発育段階の卵胞を区別化することに成功したが、目的としたヒト卵巣における原始卵胞の特定にはいたらなかった。一方、卵巣がんの卵巣において分解されたコラーゲン組織を検出することに成功し、正常卵巣と比較して有意な差が見られた。この結果は非侵襲的な卵巣がん診断への応用が期待できるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤治療や放射線治療は生殖機能低下を引き起こす可能性があるため、がん患者における妊孕能(妊娠できる能力)の温存治療が近年、重要視されている。初経前や早急な原疾患の治療が必要な女性患者に対しては、卵巣凍結が唯一の治療方法となるが、凍結卵巣組織にがん細胞が混入していた場合、融解移植後にがんの再発が懸念される。本研究では卵巣がん卵巣においてコラーゲン組織の分解が見られ、正常卵巣と比較してコラーゲン組織観察所見に明らかな相違が見られ、間接所見ではあるが卵巣がん細胞を非特異的に鑑別できる可能性が示唆された。この結果は非侵襲的な卵巣がん細胞の同定への応用が期待できるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish optimal imaging conditions using multiphoton excitation imaging technology to non-invasively distinguish between various follicles, such as primordial follicles, and intraovarian cancer cells as minimal residual disease in the ovary.

We successfully distinguished follicles at different developmental stages-primordial follicles, primary follicles, secondary follicles, and antral follicles-in the mouse ovary. However, we were unable to identify primordial follicles in the human ovary. On the other hand, we successfully detected degraded collagen in cancerous ovarian tissue, the findings not present in normal ovarian tissue. These results suggest potential clinical application for non-invasive ovarian cancer diagnosis.

研究分野：生殖医学

キーワード：微小残存病変 卵巣凍結 多光子励起イメージング技術 原始卵胞

1. 研究開始当初の背景

医学の発達とともにがん患者の生存率は劇的に向上し、治療後の患者の生活の質の維持も注目されている。抗がん剤治療や放射線治療は生殖機能低下を引き起こす可能性があるため、がん患者における妊孕能(妊娠できる能力)の温存治療が近年、重要視されている。生殖補助医療の発達により女性患者に対するがん治療前の受精卵や卵子凍結が可能となり、多くの症例で実施されている。しかしながら、初経前や早急な原疾患の治療が必要な女性患者に対しては、卵巣凍結が唯一の治療方法となる。がん治療前に凍結保存した卵巣組織を治療終了後に融解移植することにより生児を獲得した例が報告されており (Edward W, et al. *N Engl J Med* 377:1657-65. 2017) 本施設でも実施している。一方、凍結卵巣組織にがん細胞が混入していた場合、融解移植後のがんの再発が懸念される。移植した組織が原因となるがんの再発を防止するため、凍結した組織に微小残存病変 (Minimal residual disease: MRD) がないことを検証する必要がある。現行では、卵巣組織の一部を組織学的検査や免疫染色、がん特異的マーカーを使用した PCR などで検査することにより MRD の有無を侵襲的に診断しているが (Dolmans MM, et al. *Fertil Steril* 99:1514-22. 2013)、これらの方法は卵巣組織全体を検査していないため凍結卵巣組織への MRD の混入を完全に否定できない。また、診断に使用した組織は、その後の治療(凍結-融解移植)に使用することができないため、卵巣組織全体を診断に使用することは不可能である。そのため、卵巣への転移リスクが高いとされている白血病などの患者や、卵巣自体の悪性腫瘍患者は、卵巣組織凍結保存の適応とならない。以上の問題点を解決するため、非侵襲的な新規 MRD 診断法の開発が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では卵巣の細胞とがん細胞を非侵襲的に区別化するための最適なイメージング条件を構築し、卵巣皮質内 MRD を検出することを目的とした。加えて、卵巣組織内原始卵胞部位特異的切り出しによる、凍結-融解移植の最適な凍結組織サイズの決定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス卵巣内卵胞の多光子励起イメージング技術による可視化

卵巣組織凍結に用いられる組織片の観察において、より深部を観察できる最適な励起波長及び観察条件の構築は非常に重要である。組織診断では卵巣組織の一部を薄切した切片を診断しているにすぎないが、多光子励起顕微鏡ではより広範囲の観察ができると考えた。その際に問題となるのが深達度であるが、照射するレーザー波長を変化することで第2高調波発生光や第3高調波発生光による細胞画像検出及び細胞より検知される自家発光検出画像を比較することで、より深達度の高いレーザー波長の検索を行った。まずは摘出したマウス卵巣を観察用グラスに静置し、多光子励起顕微鏡により観察した。

(2) ヒト卵巣における多光子励起イメージング技術による最大観察可能範囲の探索

マウス卵巣観察結果を参考に、ヒト卵巣は摘出された卵巣の一部より髓質部を切除し、約1mm厚の皮質部(妊孕性温存に必要とされる発育前段階である原始卵胞が主に含まれる部位)をマウス卵巣同様に2種類の多光子励起顕微鏡にて観察を行なった。

(3) ヒト卵巣がん多光子励起顕微鏡画像解析

ヒト卵巣細胞とがん細胞の区別化のため、正常ヒト卵巣と卵巣がん卵巣を多光子励起顕微鏡にて観察比較した。それぞれの卵巣を妊孕性温存療法における凍結時と同様に皮質側厚さ約1mmになるよう髓質部を取り除き観察した。

4. 研究成果

(1) マウス卵巣内卵胞の多光子励起イメージング技術による可視化

励起可能範囲 700~1080nm および 820~1300nm の2種類の多光子励起顕微鏡を使用し、50nm 間隔でマウスより摘出した卵巣を網羅的に観察した。励起可能範囲 700~1080nm 多光子

励起顕微鏡では780nm付近で明瞭な卵胞画像が得られ、780nmで観察すると1層の扁平な顆粒膜細胞に覆われた原始卵胞が確認できた。加えて顆粒膜細胞が立方化した1次卵胞及び、2層の顆粒膜細胞に覆われた2次卵胞が確認された(図1)。また、卵胞を形成する細胞が明らかに異なる形態を示した卵胞が確認され黄体化卵胞と考えられた。励起可能範囲820~1300nm多光子励起顕微鏡では1170nmで2次卵胞に加えて卵胞腔の内部に卵子を内蔵した胞状卵胞も確認できた(図2)。しかしながら、1層の顆粒膜細胞をもつ卵胞は確認されたが、顆粒膜細胞の形態までは判別が困難であり、原始卵胞か1次卵胞かの判別は難しかった。これらの結果より、マウス卵胞の判別には780nm付近での観察が最適であると考えられた。

(2) ヒト卵巣における多光子励起イメージング技術による最大観察可能範囲の探索

ヒト卵巣に対して約1mm厚の皮質部を励起可能範囲50nm間隔で網羅的に観察したが、髄質側からの観察において原始卵胞を含め、卵胞の発育段階にかかわらず、卵胞らしき所見は確認できなかった。加えて、皮質側(卵巣表層部)より観察を試みたが同様に卵胞らしき所見は確認できなかった。観察が終了した卵巣皮質部をホルマリン固定し、連続切片によるヘマトキシリン・エオジン染色にて原始卵胞の有無を確認したところ、約1mm厚卵巣皮質部の表層部より約0.3から0.6mmの部位に原始卵胞が確認された。対して、2種類の多光子励起顕微鏡では卵巣における自家発光を検出する深度は0.1から0.2mm程度であることが確認され、原始卵胞存在部まで到達していないことが予想された。これらの結果より、卵巣皮質部を1mm以下に菲薄化して再度観察を行なったが明らかな原始卵胞の特定には至らなかった。原因として、卵巣組織に対する顕微鏡の検出深度が原始卵胞を検出できていない可能性に加えて、本研究に使用した卵巣が生殖適正年齢を超過した卵巣であり、残存原始卵胞の減少が懸念された。原始卵胞が多く残存すると考えられる若年の卵巣による確認が必要である。

(3) ヒト卵巣がん多光子励起顕微鏡画像解析

正常卵巣と卵巣がん卵巣の観察画像を比較したところ、卵巣がん卵巣においてコラーゲン組織の観察所見に明らかな違いが見られた。卵巣がん卵巣においてコラーゲン組織が分解されることにより、正常卵巣との観察画像における相違を示していると考えられ、間接所見ではあるが卵巣がん細胞を非特異的に鑑別できる可能性が示唆された。今後さらなる画像の集積が必要である。

以上より、本研究ではマウス卵巣における原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞および胞状卵胞等各発育段階の卵胞を区別化することに成功した一方で、目的としたヒト卵巣における原始卵胞の特定にはいたらなかった。しかしながら、卵巣がん卵巣においてコラーゲン組織の分解が見られ、正常卵巣と比較してコラーゲン組織観察所見に明らかな相違が見られた。この結果は非侵襲的な卵巣がん細胞の同定への応用が期待できるものである。

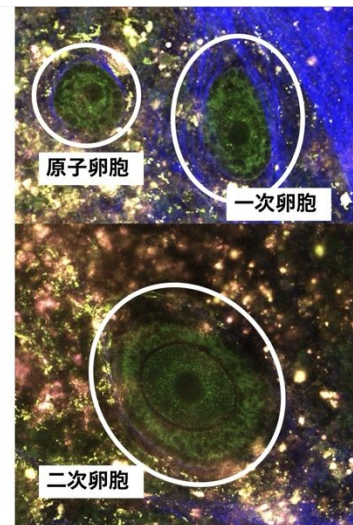


図1 マウス卵巣多光子励起顕微鏡画像(780nm)

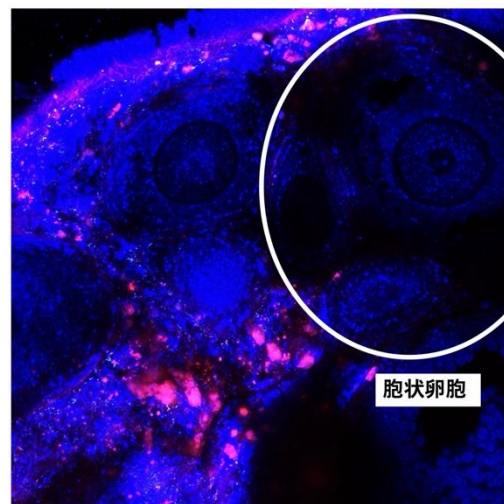


図2 マウス卵巣多光子励起顕微鏡画像(1170nm)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	瀧内 剛 (Takiuchi Tsuyoshi) (40733358)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授(常勤) (14401)	
研究分担者	松井 崇浩 (Matsui Takahiro) (50747037)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	木村 正 (Kimura Tadashi) (90240845)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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