

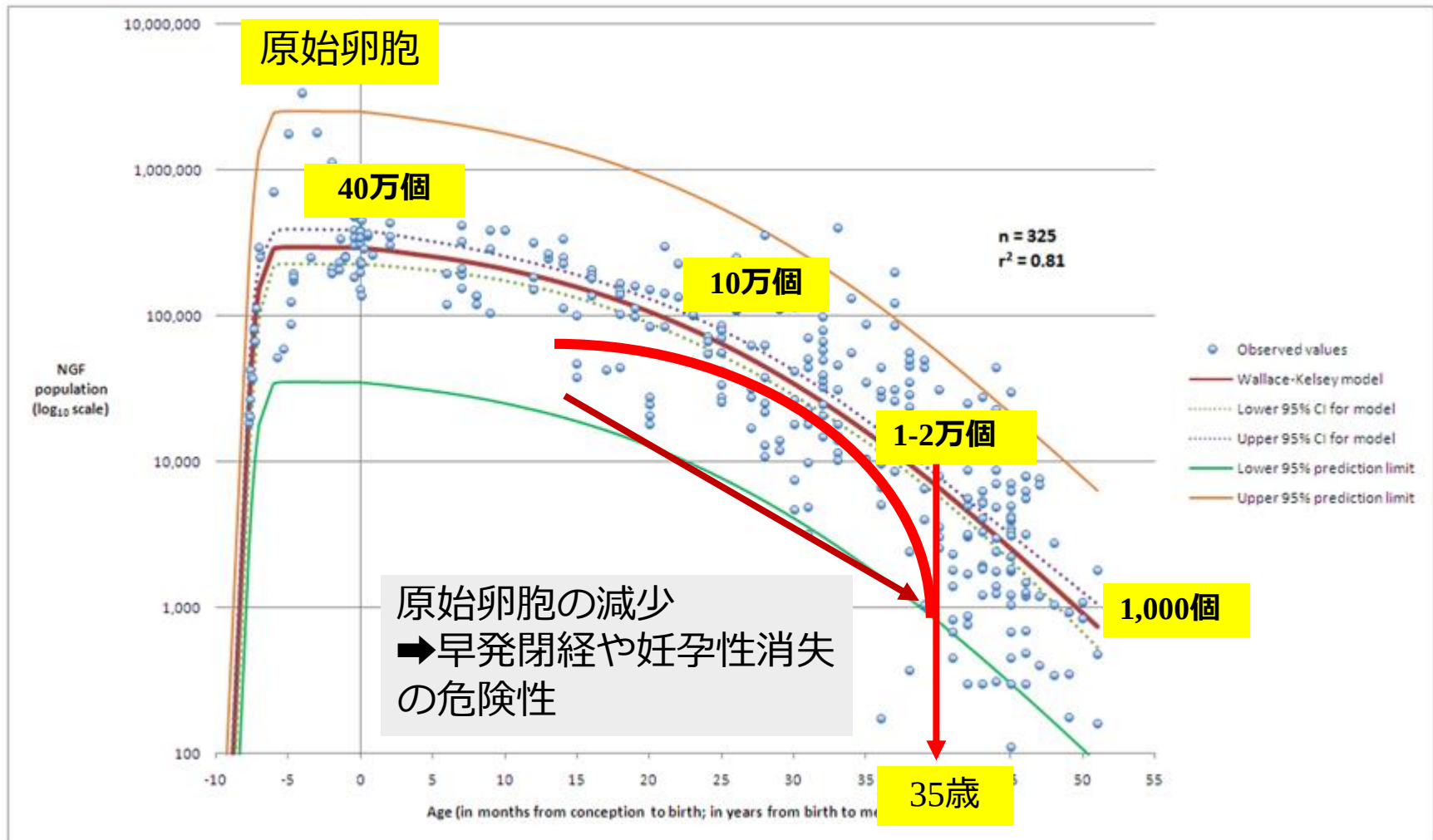
女性ががん患者・サバイバーの妊孕性温存 を志向して行われた卵巣組織凍結保存切片 における腫瘍細胞混入をdroplet digital PCR を用いて評価する方法の開発

聖マリアンナ医科大学病院 小児科
神奈川県立こども医療センター 血液腫瘍科
慶野 大

はじめに

- 近年、小児がんの治療成績は著しく向上しており、5年生存率が約80%に達している。
- 強力な化学療法や放射線療法を行うことで、女性小児がん患者は、寛解後の早発閉経など女性としてQOLの低下や妊孕能消失などの問題を抱える。
- 2015年11月から当院生殖医療センターで小児患者を対象とした卵巣組織凍結保存の臨床試験を開始している。

小児患者における妊孕性喪失のリスク



妊孕性温存方法の比較

方法	温存までの時間	臨床的妊娠率	対象年齢	特記事項
胚凍結	約2週間	30－40%	月経発来後	パートナーが必要
卵子凍結	約2週間	10－20%	月経発来後	成熟卵胞の採取が必要
卵巣組織凍結 (OTC)	いつでも可能	60例以上の 出産症例あり	思春期前 でも可能	まだ実験的

成人の妊孕性温存（2010年～がん・生殖医療外来 開始）

🧪 臨床試験 2009年12月 卵子凍結, 卵巣組織凍結 承認

小児の妊孕性温存

🧪 臨床試験 2015年11月 卵巣組織凍結 個別審査開始

臨床試験 2016年11月 卵巣組織凍結 承認

聖マリアンナ医科大学における小児OTC の対象患者

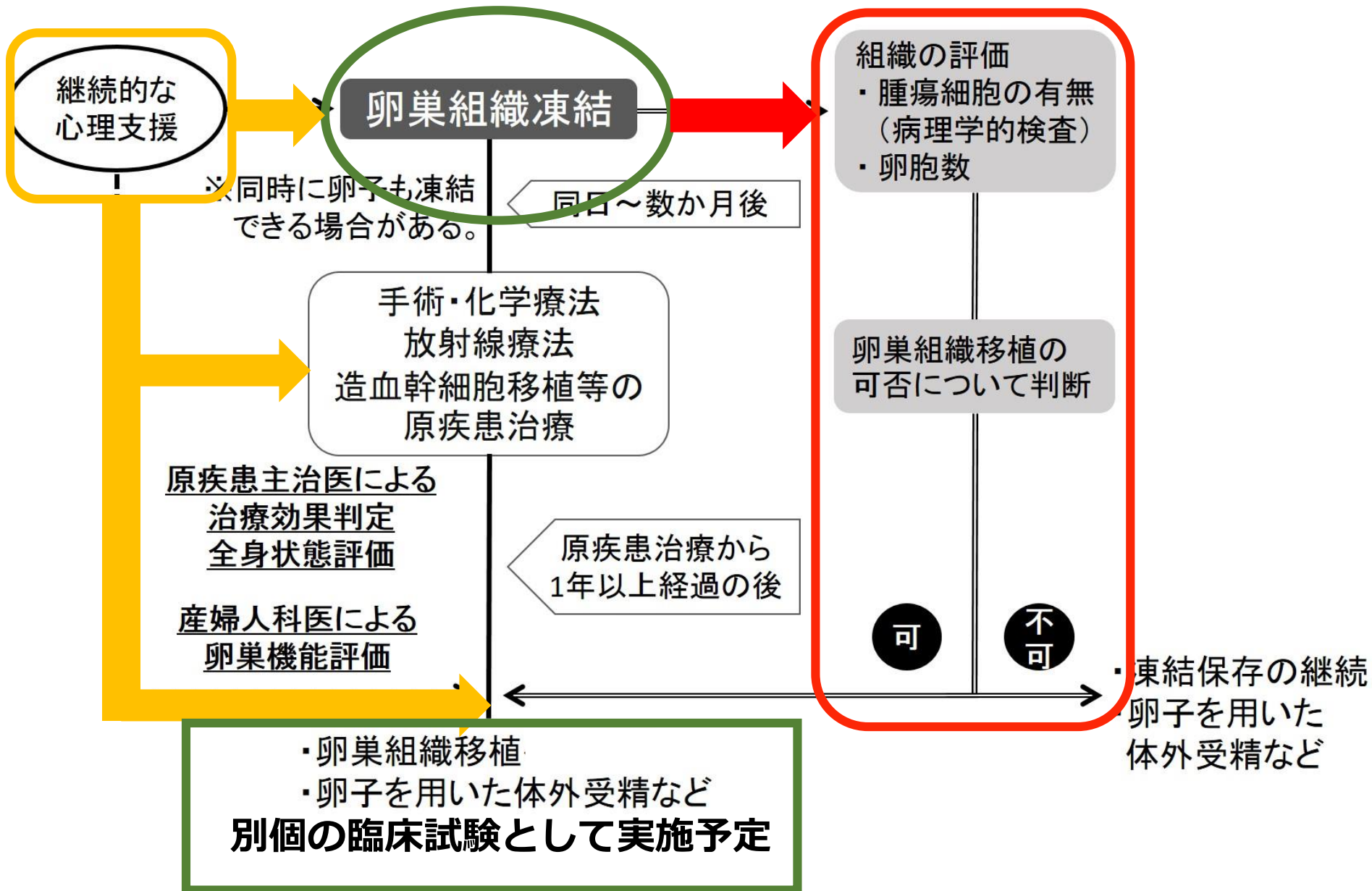
適応基準

- 悪性腫瘍、血液疾患もしくは免疫疾患であることが確認されていること
- 原疾患の主治医からの書面による妊孕性温存の依頼があること
- 17歳以下で同意 (インフォームドアセント、コンセント) の得られる小児 (とくに下限年齢は設けない)
- 長期予後が期待できること
- 本試験の内容の説明を受け、十分な理解の上、患者本人及び保護者の自由意思による文書での同意が得られること

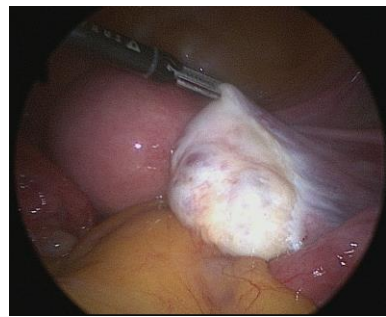
除外基準

- 手術不能な状態のとき
- 試験担当医師が被験者として不適当と判断したとき

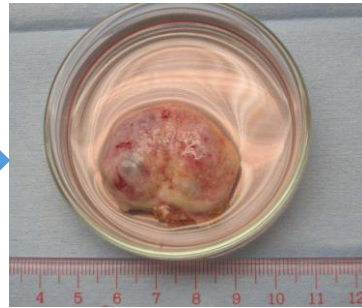
臨床試験のアウトライン



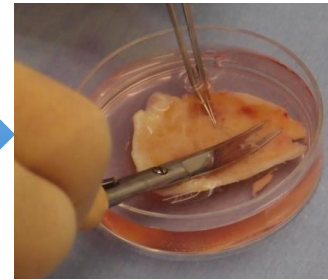
ガラス化法によるOTC の実際



腹腔鏡下卵巣切除



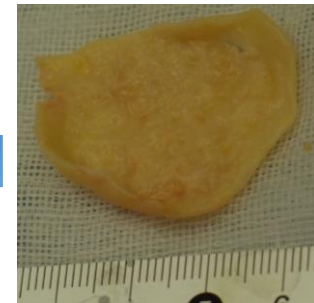
採取卵巣



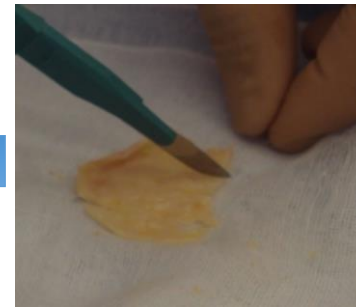
髄質除去



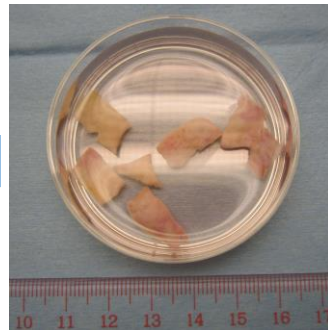
卵子保存



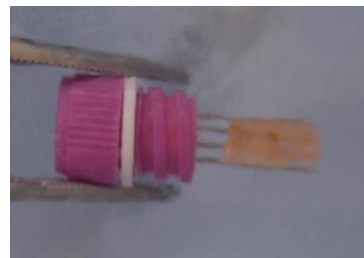
卵巣皮質



皮質を切片化
(1cm×1cm×1mm)

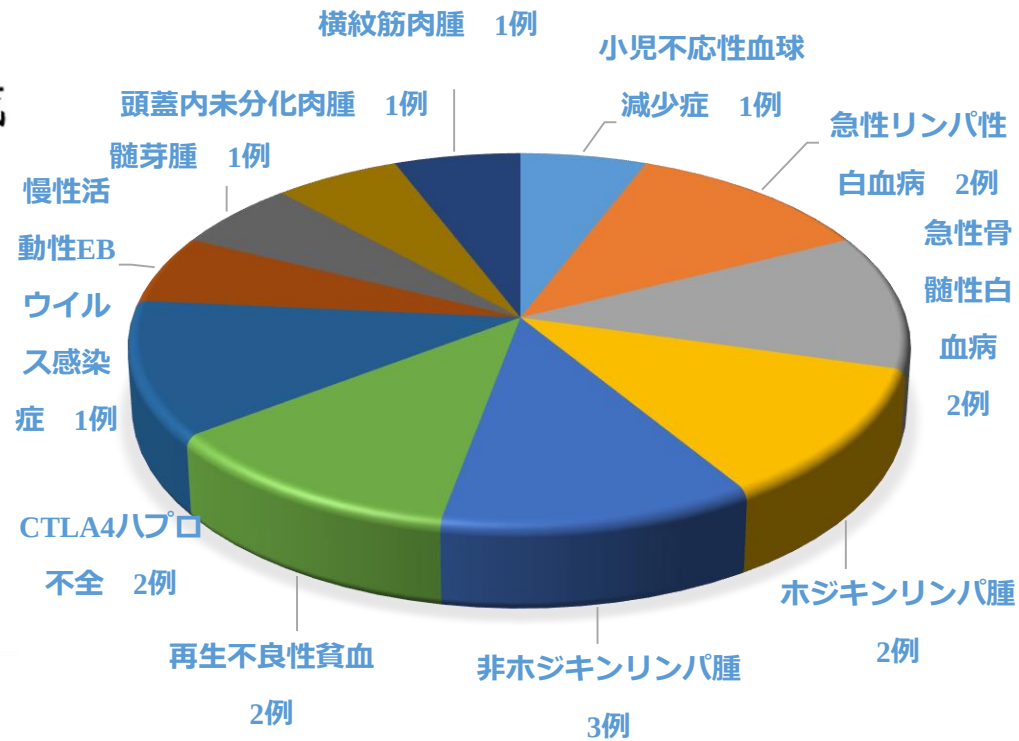
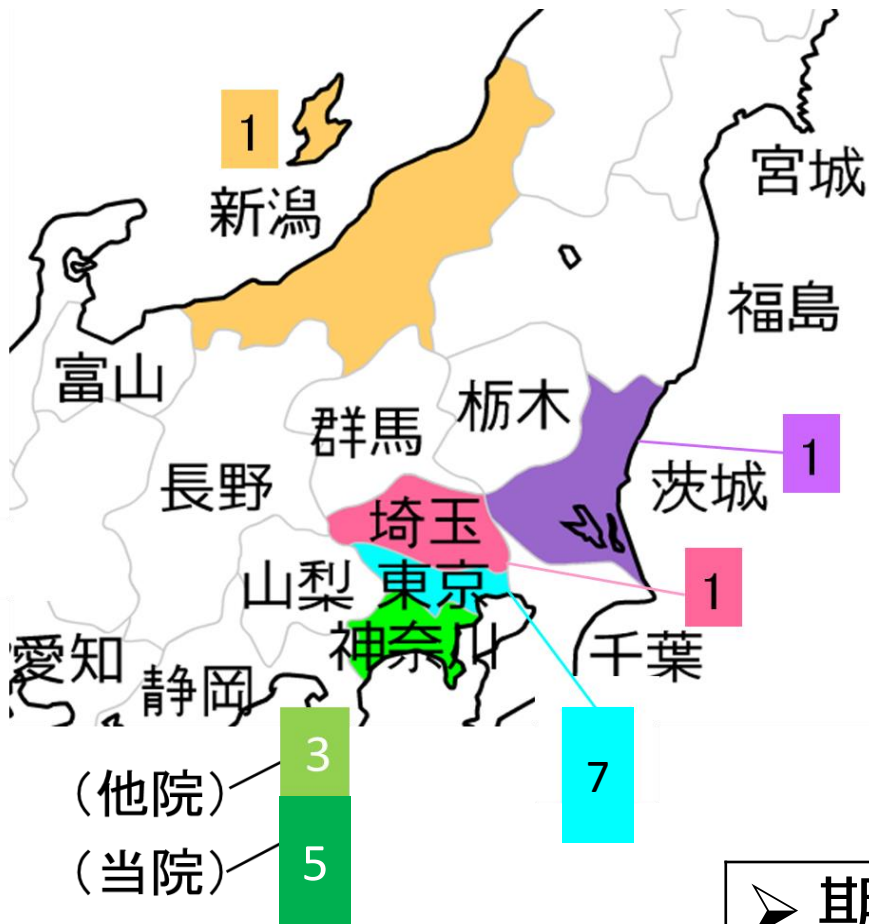


保存液に浸した
シート状の皮質



液体窒素で凍結

OTC 実施例



➤ 期間: 2015年12月～2019年03月

➤ 年齢: 13.5歳 (8-16歳)

OTC 実施例

OTC 前に化学療法: 12/18例
造血細胞移植症例: 13/18例

卵巣組織凍結切片: 9片 (2-20片)
卵子: 4個 (0-24)→ 成熟卵子 0個 (0-9)
全例に原始卵胞が確認された

✓ ALL の症例 (1例) で腫瘍細胞の混入を認めた

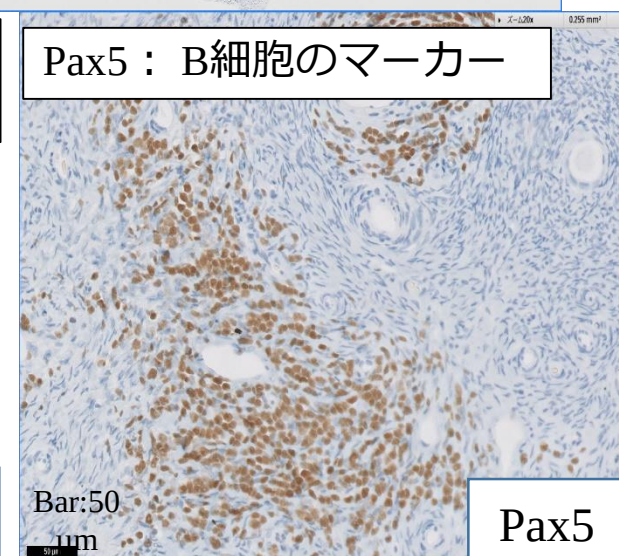
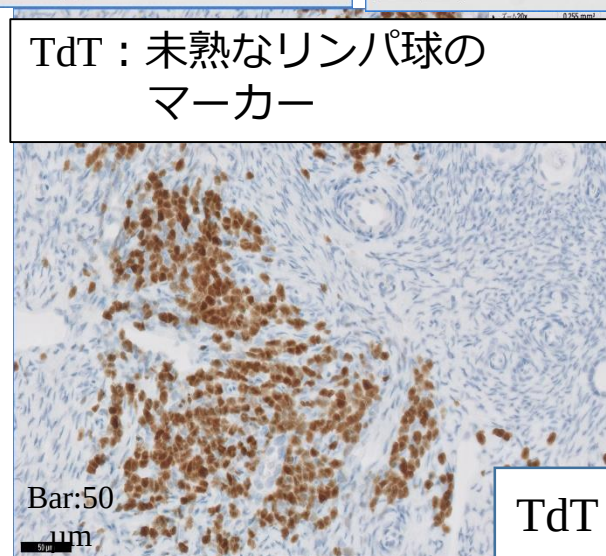
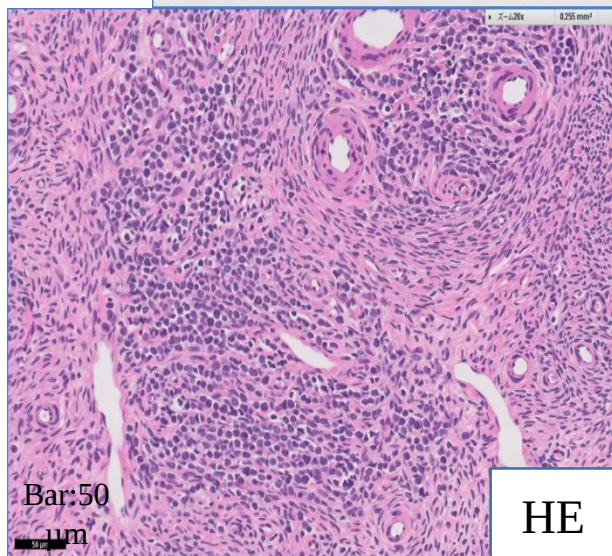
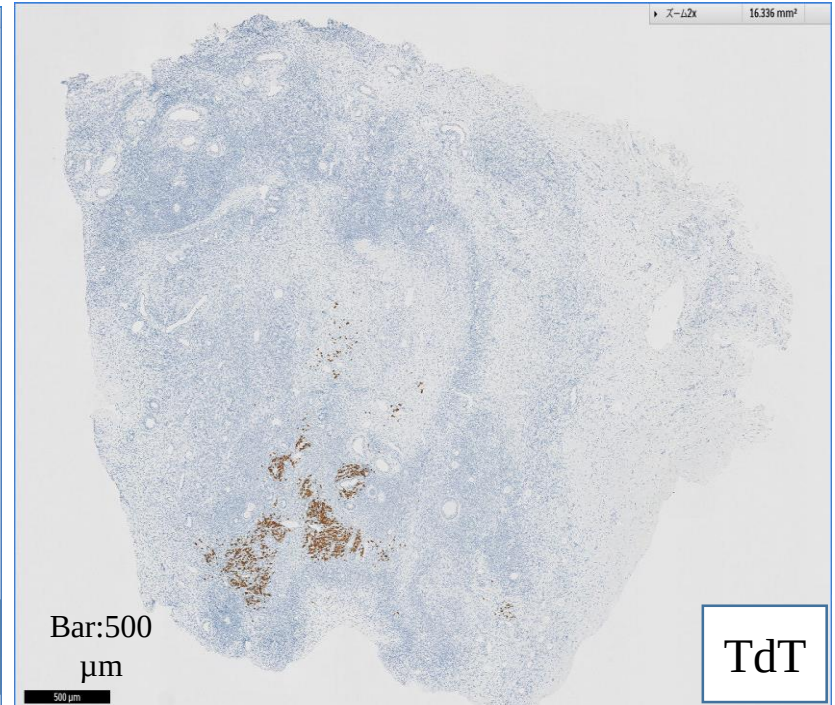
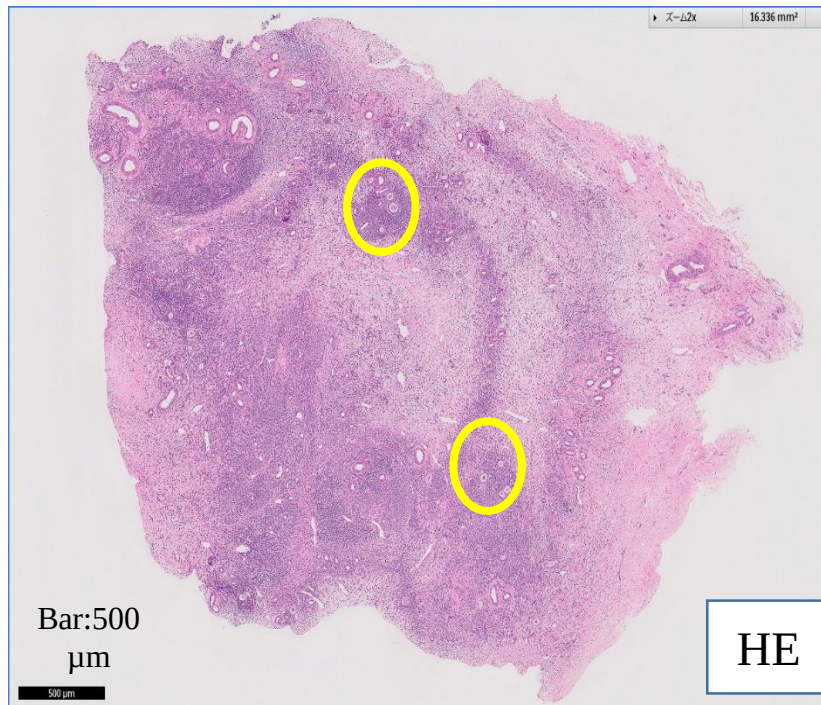
OTC 実施例

術中合併症: 発熱・腹部膨満 1例
術中のアレルギー症状 1例

観察期間: 中央値 7か月 (0-34)
急性リンパ性白血病 2例: 移植後再発
治療終了後自然月経再開 1例
ホルモン補充療法 2例

小児、思春期患者に対するOTC は、比較的安全に行うことができ、妊孕性温存の有力な選択肢

腫瘍細胞混入症例 (ALL 症例)



TdT : 未熟なリンパ球の
マーカー

Pax5 : B細胞のマーカー

小児OTC の長所と短所

長所

- ・ 経腔操作を必要としない
- ・ 初潮前でも可能
- ・ 排卵誘発を待たずに行え、治療を急ぐことの多い小児患者でより有用と考えられる
- ・ 多数の原始卵胞を貯蔵でき将来の妊娠につながる可能性が高い
- ・ 再移植により卵巣機能の回復が期待できること

短所

- ・ 侵襲性がある操作を必要とする
- ・ 白血病などでは腫瘍細胞の混入のリスクがある
- ・ 保険適応外の治療である



一般社団法人 日本癌治療学会

小児、思春期・若年がん患者の
妊孕性温存
に関する診療ガイドライン

2017年版

JSCO Clinical Practice Guidelines 2017
for Fertility Preservation in Childhood,
Adolescent and Young Adult Cancer Patients

総論
女性生殖器
乳腺
泌尿器
小児
造血器
骨軟部
脳
消化器

金原出版株式会社

【小児】

- ✓ 思春期以降の女児の場合は、未受精卵子凍結保存が考慮される。 推奨グレード C1
- ✓ 思春期前の女児に対する妊孕性温存法としては卵巣組織凍結保存が唯一の方法である。また、思春期以降でも、治療開始までの時間的猶予がない場合は、卵巣組織凍結保存の対象となる。ただし、現在は研究段階にあり、限られた施設で臨床研究として行われるべきである。 推奨グレード C1

【造血器腫瘍】

- ✓ 急性白血病では、卵巣組織凍結保存は白血病細胞の混入の危険性のために一般的には推奨しない。 推奨グレード C2
- ✓ その他の造血器悪性腫瘍では、卵巣凍結保存は研究段階であるものの、施行可能な施設において考慮される。 推奨グレード C1

悪性腫瘍が卵巣に転移するリスク

高リスク	中リスク	低リスク
白血病 神経芽細胞腫 バーキットリンパ腫 卵巣癌	乳癌 (stage IV, 浸潤性小葉癌) 大腸癌 子宮頸癌(腺癌) 非ホジキンリンパ腫 Ewing 肉腫	乳癌 (stage I - II, 浸潤性乳癌) 子宮頸癌 (扁平上皮癌) ホジキンリンパ腫 骨肉腫 非遺伝性横紋筋肉腫 ウィルムス腫瘍

Dolmans, M.M, *Fertility and sterility*. 2013.

Von Wolff, *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2018.

※欧州造血細胞移植学会小児疾患ワーキンググループでは、
将来的な科学の発展も考慮し、若年の白血病に対する
卵巣組織凍結を許容する考えを示している。

Balduzzi A, et al. *Bone Marrow Transplant*. 2017.

凍結卵巣組織保存切片の微小残存病変 (MRD) 解析

- リアルタイムPCR (RT-qPCR) やマルチカラーフローサイトメトリーを用いた評価が報告されている。
- Dolmans らは、RT-qPCR を用いて18例中9例でMRD が陽性であったこと、卵巣組織を移植した免疫不全マウスの18例中4例で白血病腫瘍を形成したことを報告したが、一方で、MRD 陽性の9例中5例では免疫不全マウスで白血病細胞を認めなかったことも報告している。

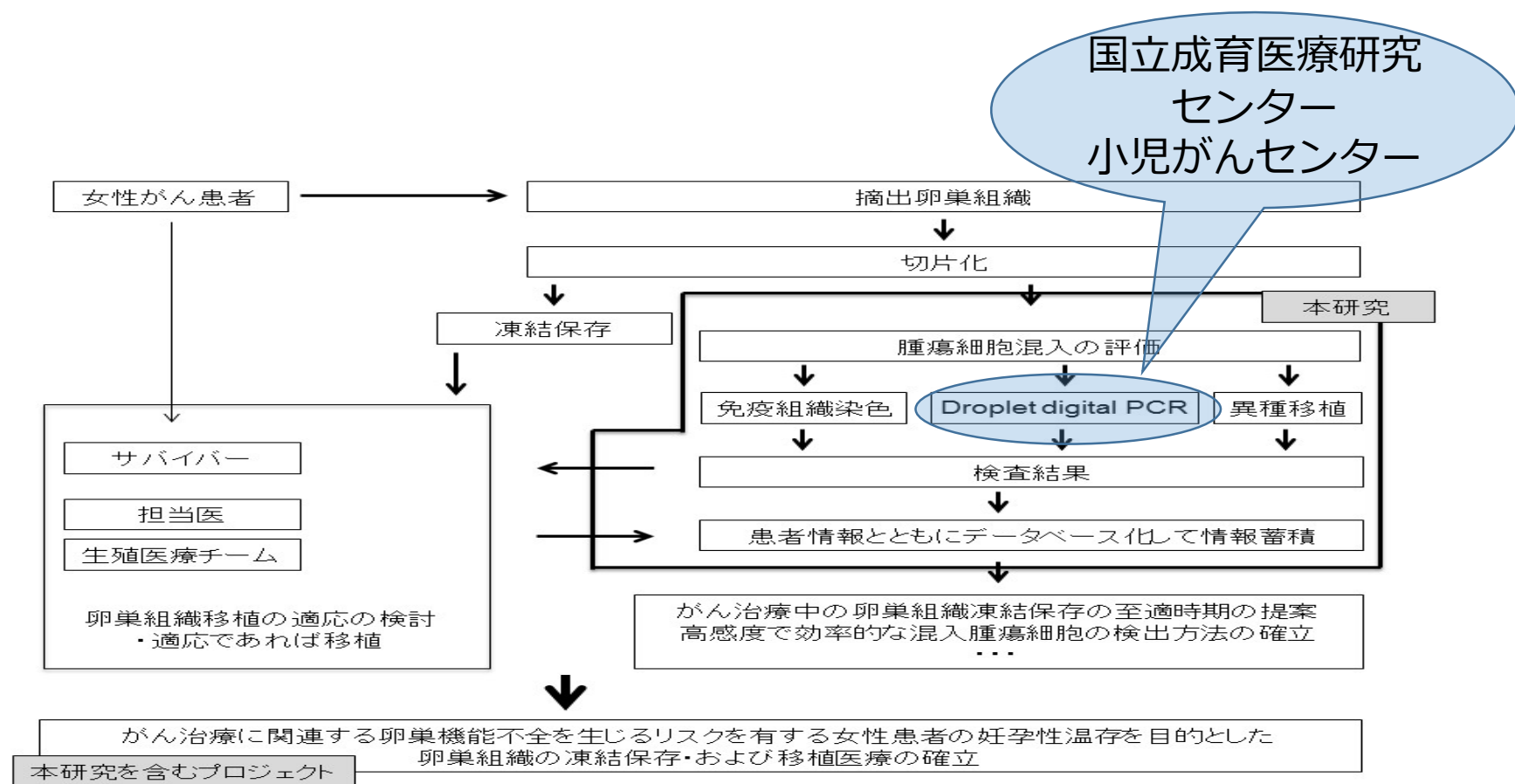
Zver T, et al. *J Assist Reprod Genet* 32, 1263-1266 (2015).

Dolmans, M.M., et al. *Human reproduction* 31, 2292-2302 (2016).

Dolmans, M.M., et al. *Blood* 27, 2420-2429 (2012).

- 以前の報告では、卵巣凍結組織切片のMRD 評価と再発に関して明らかにはなっていないため、より正確なMRD 測定法での評価が必要と考えられる。

卵巣組織凍結保存切片の droplet digital PCR (ddPCR) MRD 研究



目的

- Droplet digital PCR (ddPCR) の高感度で正確な定量性を活用し、卵巣組織のMRD測定法を確立すること

対象者

- 卵巣組織凍結保存者で本研究への参加に同意した女性がん患者・サバイバー

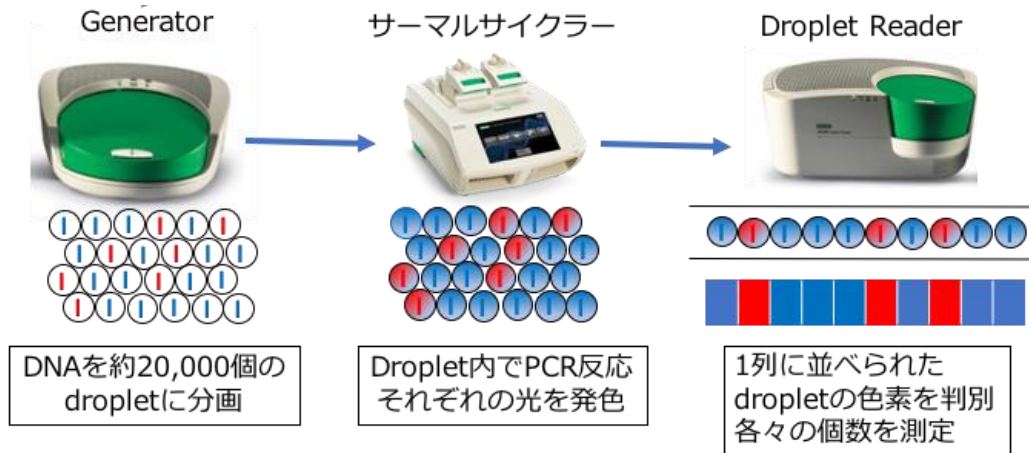
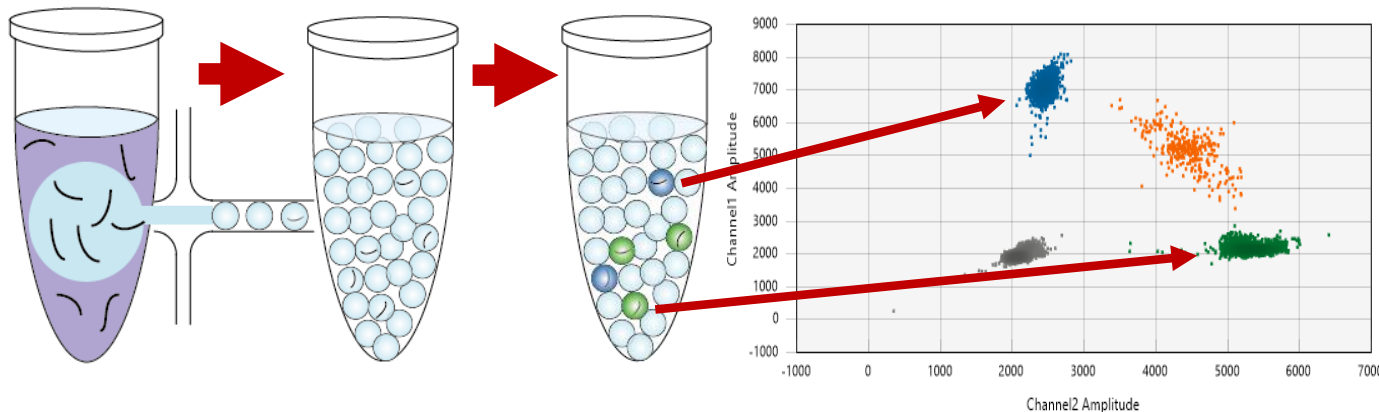
Droplet digital PCR (ddPCR)について



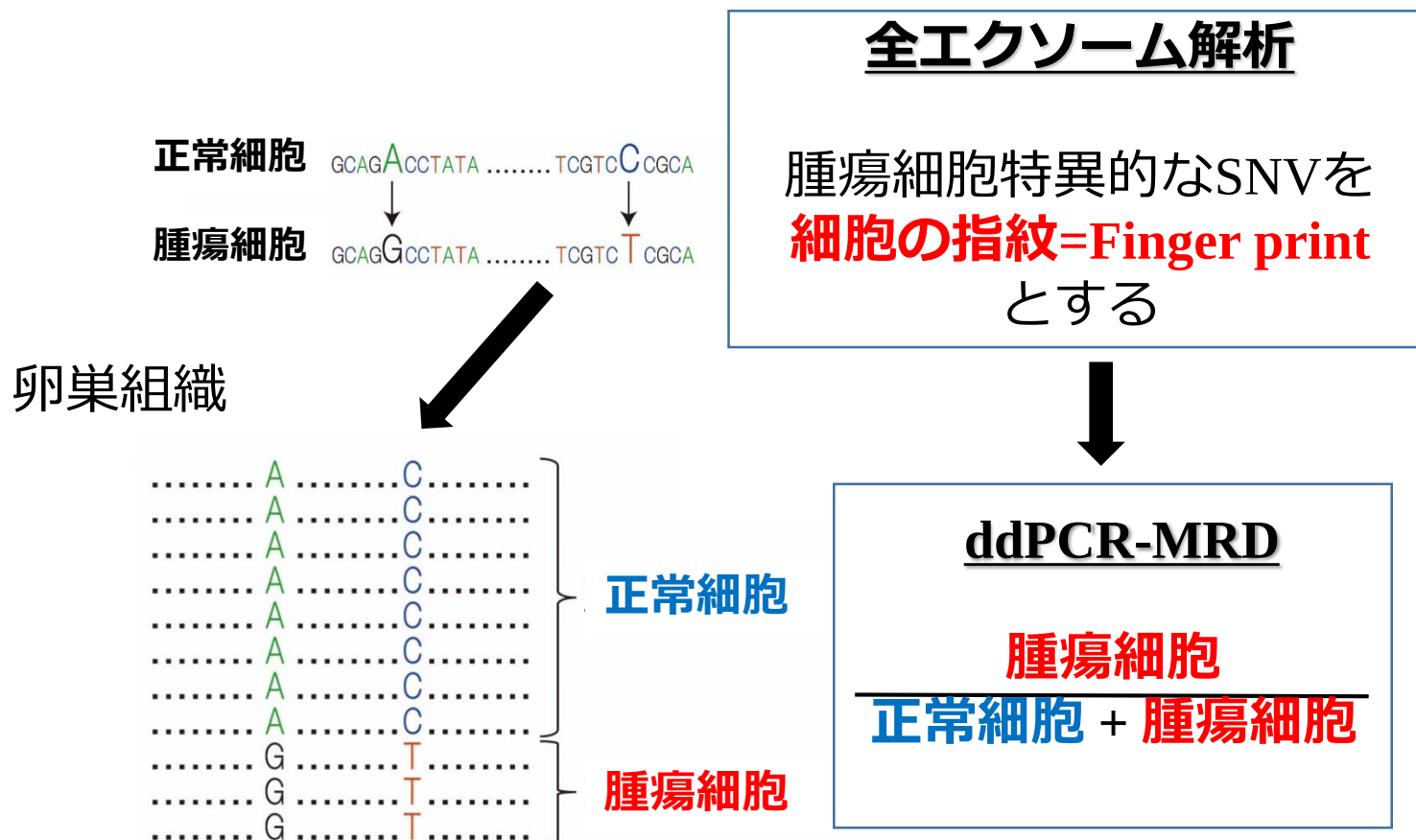
1. Droplet作製

2. PCR

3. 発色したDroplet数を数える



卵巣組織のddPCR-MRDについて



primer/probeの選択

- 1症例につき4-6個の標的とするSNVを選択し、それぞれの多型について特異的なprimer/probeを設計、作製する。
- 正常ゲノムにおけるMRD 陽性率が $1.0E-5$ 以下、かつ腫瘍ゲノムを用いた希釈系列により $1.0E-4$ 以下の感度を有するprimer/probeセットを用いてMRDを測定する。

進捗状況

No	疾患情報	検体情報	検体備考	DNA濃度 ng/uL (Qubit)	使用可能 液量	総gDNA (ng)	シーケンス 状況
1	BCP-ALL	爪 (Germline)		1.94	20	38.8	読み足し
		腫瘍		282	50	14100	済
2	AML	爪 (Germline)		7.34	20	146.8	読み足し
		腫瘍		1.76	20	35.2	済
3	未分化肉腫	血液 (Germline)		149	50	7450	済
		腫瘍	FFPE	5.46	15	81.9	読み足し
4	AML	爪 (Germline)		7.5	20	150	済
		腫瘍		14.6	20	292	読み足し
5	$\gamma\delta$ T リンパ腫	Germline		316	50	15800	シーケンス 待ち
		Tumor	塗抹	2.8	25	70	シーケンス 待ち
6	心臓移植後 T-LPD	Germline		256	50	12800	シーケンス 待ち
		腫瘍	FFPE	0.72	15	10.8	ライブラリ 作製待ち

最後に

- まだ解析途中であり、成果が出ていないため、申し訳ございません。
- 今後、成果が出せるように研究を続けていければと思います。