

Perspectives of Reproductive Science



編集会議

編集委員長 吉村やすのり^{いのち}生命の環境研究所 吉村 恭典 先生

編集委員 順天堂大学医学部附属順天堂医院 産科・婦人科 教授 河村 和弘 先生
東京医科大学病院 産科・婦人科 准教授 小野 政徳 先生

特集論文

● 雄マウスから機能的卵子の*in vitro*形成

Generation of functional oocytes from male mice *in vitro*

● 乳癌発症後に妊娠を試みるための内分泌療法の中断

Interrupting Endocrine Therapy to Attempt Pregnancy after Breast Cancer

● タイムラプス胚選択の有無を含めた非断続的胚培養と、断続的標準培養による臨床アウトカムの3群比較

多施設共同二重盲検無作為化比較試験 (SelectTIMO試験)

Clinical outcomes of uninterrupted embryo culture with or without time-lapse-based embryo selection versus interrupted standard culture (SelectTIMO): a three-armed, multicentre, double-blind, randomised controlled trial

編集委員長



Yasunori Yoshimura

吉村やすのり
いのち
生命の環境研究所
吉村 泰典 先生

編集委員



Kazuhiro Kawamura

順天堂大学医学部附属順天堂医院
産科・婦人科 教授
河村 和弘 先生

編集委員



Masanori Ono

東京医科大学病院
産科・婦人科 准教授
小野 政徳 先生

雄マウスから機能的卵子の*in vitro*形成

吉村(司会) これまで体外での卵子産生は、2003年にマウスES細胞を用いた報告以来、数多くの研究が行われてきました。今回取り上げるのは、雄マウスのiPS細胞から卵子を*in vitro*で産生し、別の雄マウスの精子と受精させて仔を得たという報告です。ポイントは、iPS細胞の性をオスからメスに転換することができた点にあると思います。河村先生、概略を説明していただけますか。

河村 本研究を報告された林克彦教授のグループは、iPS細胞およびES細胞から卵子を産生する研究に取り組まれていて、始原生殖細胞様細胞(PGCL細胞)から卵子を産生する技術を確立されています。その後、XOおよびXYの始原生殖細胞からの卵子産生にチャレンジしていましたが、うまくいきませんでした。その解決策として今回、XOおよびXYの始原生殖細胞からY染色体の除去とX染色体の複製を行い、PGCL細胞を誘導して、12.5日齢の雌性腺の体細胞と混合培養して再構成卵巣を作製し、体外培養によりMII期卵子を得て、野生型精子との体外受精胚移植により産仔の作出に成功しました。

吉村 これまでのiPS細胞を用いたマウスやヒトの卵子や精子の産生の研究と、どういう点で異なっているのでしょうか。

小野 成熟卵子や精子への分化の最終段階には、卵子にはXX、精子にはXYの性染色体が必要とされてきました。したがって、XYの性染色体を持つES細胞あるいはiPS細胞からは、卵子は基本的にはできないと言われてきました。

今回の研究では、細胞を継代していく中で、XYがXOの核型となり、さらにまた培養を継続してXOからXX、XOの細胞が分裂するときに、片方の細胞にだけXが入り込んでくる染色体分配エラーという現象を利用して、XXの核型を持つ細胞を得ました。実際にこの細胞から、新生仔が得られたという点に新規性があります。

吉村 XYのiPS細胞を9回継代した後、XOのサブクローンが得られました。その割合は1.1%とのことですが、低率ですね。

河村 はい。マウスのES細胞は1~3%で培養中に自然にY染色体を喪失することが報告されています。同じ多能性幹細胞と

考えるとiPS細胞でこの割合は妥当だと考えます。

吉村 最終的に630個の受精卵が得られ、7匹が生まれていますが、やはり低率ですね。

河村 同じ技術を用いて行ったES細胞からPGCL細胞を経て卵子を産生し生仔を得た報告では、316個の受精卵から11匹のマウスが生まれています。確率としては低いですが、今回の結果がほぼ同等の成績であることは注目される点だと思います。

吉村 この技術がヒトにおいて確立すれば、どのようなメリットがあるのでしょうか。例えば、XOのターナー症候群の女性でも、卵子を形成することが可能になるのでしょうか。

小野 理論的には可能になると思います。

吉村 Y染色体が自然消滅するというのですが、ヒトにおいても加齢や喫煙などにより、Y染色体が消失した細胞が増加すると言われてますね。

河村 Y染色体の喪失は、複数種のがんで観察されていますが、臨床的意義や生物学的意義については十分究明されていません。男性の膀胱癌患者において、Y染色体の喪失と予後不良との関係性や、膀胱癌細胞株を調べた際、Y染色体を喪失した腫瘍の方が、喪失していない腫瘍に比べて悪性度が高く、T細胞性免疫応答が低下し、治療反応性が悪かったことが報告されています。今後研究が進めば、男性のがん発症・死亡が女性より多い原因としてY染色体の喪失が関与している可能性がさらに明らかになると思います。

吉村 興味深いですね。さて、ヒトiPS細胞を使用した研究では、女性から卵子のもとになる細胞は作られています、卵子までは発育していない状況です。将来的にヒト研究はどこまで進むのでしょうか。

河村 個人的には、最終的にヒト卵子の産生は可能になると期待しています。しかし、iPS細胞から産生したヒト卵子が正常であるかの判断をどのように行うかが問題です。現在、卵子を破壊して評価する方法がほとんどで、臨床には使えません。得られた卵子のほぼ全てが正常である(または異常なものをほぼ全て排除できる)という技術レベルに到達するのが前提にあり、この前提が得られて初めてIVFやICSIがヒトに応用された時のような倫理観の変革やその時代の社会状況の大きなうねりの

中、臨床で実施されるのではないかと考えています。

吉村 iPS細胞の臨床応用については、いかがでしょうか。研究が継続されていますが、再生医療で有益とされる結果が得られていない状況にあります。ES細胞と比べて、どうでしょうか。

河村 ES細胞からiPS細胞に多能性幹細胞研究がスイッチした最大のメリットは、卵子あるいは受精卵を使わなくて済むことです。ドナーが必須であることについて倫理的に考えた時に、iPS細胞においてはその問題がないため、受け入れられた面もあると思います。

吉村 小野先生は今後のiPS細胞のあり方についてどのように考えていますか。

小野 多くのハードルを乗り越えた先に、臨床応用につながる可能性は十分あると思います。実際の取り組みとして、京都大学のiPS細胞研究所では、あらかじめ多くのドナーからiPS細胞を作製し、安全性と有効性を確認した細胞のストック化が進められています。また、iPS細胞を用いた製剤に関するリスクとして腫瘍形成が懸念されます。①製剤に残存した未分化なiPS細胞、②移植後の増大、③移植後のがん化の3点に注意し、未熟な細胞やコピー数多型、プラスミド残存、がん関連遺伝子変異がないか等を確認し、腫瘍形成のリスクを低下させる必要があります。さらに、試薬や機材、原料となる細胞も臨床で使用が可能なレベルのものとし、製造工程では複数の工程内検査項目を設定する必要性などが考えられます。

吉村 河村先生はどうでしょうか。

河村 別の側面では、コストに対する国民理解をどう進めるかが次の課題だと思っています。もちろん、先ほどお話しされた安全性・安全面が一番大事なところですが、それだけでは済まないところがあります。

また、iPS細胞に限らず、新しい技術を臨床応用するためには多くのハードルがあり、その中には、残念ながら新しい技術の臨床応用を阻みかねない仕組みもあると感じています。iPS細胞は日本発の技術ですが、海外で実施中の臨床試験の方が多く、日本で行われているものはわずかです。今後日本が科学で世界をリードするためには、もっと臨床試験を実施しやすくなるような変革が望まれます。

吉村 大変よくわかります。現在、iPS細胞は創薬やメカニズムを研究するための手段としても重要な意味を持っています。本来iPS細胞は再生医療のために出てきた技術と考えると、残念ながら実用化にはまだ時間がかかりそうです。

乳癌発症後の妊娠

吉村 現在、わが国の女性は、生涯において9人に1人は乳癌

に罹患するといわれています。乳癌の若年化も認められ、癌治療後の妊孕性は非常に大きな問題となっています。しかし、乳癌治療後の妊娠や内分泌療法の中断に関するエビデンスは、いまだ十分ではありません。小野先生には、乳癌発症後の妊娠を試みるため、内分泌療法の中断に関する論文を取り上げていただきました。

小野 乳癌は比較的若年で罹患し、その治療には性腺感受性の高い薬剤を使用する上、加齢による妊孕性の低下が問題になるため、この多施設国際共同単群試験は非常に注目されています。本試験の目的は、既に内分泌療法を受けているホルモン受容体 (HR) 陽性の乳癌女性、かつ妊娠を望む患者に対して、内分泌療法の一時的な中断が安全かどうかを調べることでした。対象患者は、HR陽性早期乳癌の42歳以下の女性、ステージIからIII、術後18~30ヵ月間にわたり内分泌療法を受け、その後妊娠のため治療の一時的な中断を希望する方です。主要評価項目は、追跡調査中に観察された乳癌イベントの数、副次評価項目は妊孕性、妊娠結果、出産結果、母乳育児、生殖補助医療 (ART) の実施、内分泌療法の再開、遠隔再発です。

試験の結果、HR陽性の乳癌患者において、内分泌療法の一時的な中断後、短期的 (追跡期間3年間) には、遠隔再発を含む乳癌イベントのリスクは上昇しませんでした。

吉村 その後の妊娠・出産に関してはいかがですか。

小野 妊娠・出産に関する情報が入手できた497例のうち、74.0% (368例) が試験期間中に妊娠し、出生児は365人でした。215例 (43.3%) が試験参加中にARTを受けました。全出生児のうち、低出生体重児は29人 (7.9%) で、先天異常は8人 (2.2%) でした。通常の集団とほぼ変わらない値かと思えます。35歳未満の症例では85.7%が妊娠しました。35~39歳では76.0%、40~42歳は52.7%でした。妊娠に関連する乳癌イベントのハザード比は0.53 (95%信頼区間0.27~1.04) で、乳癌イベントが増加することはありませんでした。

吉村 安全性については、より長期のフォローアップが必要と思いますが、いかがでしょうか。

小野 はい。今回の報告は3年間の短期的なフォローアップですので、長期的にフォローアップを継続していくことで、治療一時的な中断の安全性が明らかになってくると言えます。

吉村 本論文について、河村先生のお考えはいかがですか。

河村 HR陽性の患者さんに対してARTを施行するにあたり、E₂の影響が気になります。ヒトでのE₂値の安全域は明確ではありませんので、今後、E₂値との関連についても研究が進められることを希望します。

小野 試験ではアロマターゼ阻害剤を使い、E₂の影響を抑えて採卵しています。しかし長期的な影響は今後のデータで確認す



ることが必要だと思います。

吉村 乳癌は5年以上経ってから再発する方もいるので、さらに長期のフォローが必要かもしれませんね。

タイムラプスマonitoringの有用性

吉村 現在タイムラプス (TL) モニタリングは、胚の選択システムとして非断続的胚培養によって、臨床成績の向上に役立つと考えられています。3報目は、TLの有用性に関する論文を取り上げました。

河村 本研究はGeri[®]+TLインキュベーター (Genea Biomedx) を使用して行われた、多施設共同二重盲検無作為比較試験 (RCT) です。オランダの15施設が参加し、1,731組のカップルを対象としており、類似のRCTでは最大規模のものです。TLモニタリングに期待されているのは、より優れた胚の選択方法です。つまり、胚を連続観察することにより、より多くの形態学的な情報を入手できますので、これをもとに胚の選択アルゴリズムを構築し、これまで培養士が行ってきた一般的な形態学的評価よりも優れた胚の選択を可能とすることです。また、TLモニタリングを使用しない場合は、胚をインキュベーターから取り出して観察する必要があり、その結果培養液の温度やpHなどが変化し、胚に悪影響を与えることが懸念されますが (断続的培養)、TLインキュベーターは内蔵されたカメラで形態解析を行うため、胚をインキュベーターから取り出さず安定した培養環境が得られる (非断続的胚培養) ことも利点となります。この2つの期待される利点について、この研究では対象を次の3群に無作為に割り付けし、比較しています。①EEVATL胚選択+非断続的培養 (TLE群)、②通常の胚選択+非断続的培養 (TLR群)、③通常の胚選択+断続的培養 (対照群)

なお、胚の形態学的評価のTLモニタリングによる自動解析は、EEVA (early embryo viability assessment) という培養3日目の初期胚で良好胚を予測するアルゴリズムを用いており、研究では3日目に胚移植を行っています。胚の培養は全てGeri[®]+TLインキュベーターを用いており、断続的培養としてあえてTLインキュベーターから胚を外に出して観察しています。主要評価項目は、12ヵ月間の累積継続妊娠率と予後良好集団 (41歳未満で5個以上の卵子が採卵され、4個以上の受精卵が得られた患者) における新鮮単一胚移植後の継続妊娠率です。

吉村 量的にも大変な研究ですが、どのような結果だったのでしょうか。

河村 累積継続妊娠率は、TLE群で50.8% (293/577例)、TLR群で50.9% (295/579例)、対照群で49.4% (284/575例) であり、3群間で有意差を認めませんでした。また、予後良好集団における解析も同様に3群間で有意差を認めませんでした。一方、年齢群別の12ヵ月間の累積継続妊娠率について、39歳以上の女性群では、TLR群よりTLE群で高い値を示しました。しかし、39歳以上の女性群の症例数が少なく十分な結論には至っていません。

吉村 継続妊娠率や出生率に改善は認められなかったとの結果は、どのように解釈したらいいのでしょうか。

河村 EEVAアルゴリズムでの胚選択の優位性や、胚をインキュベーターの外で観察するデメリットは認められなかった。つまり、通常やり方で十分であるという結論です。しかし、本研究では受精確認時にはTLモニタリングを使用しておらず通常の顕微鏡で行っており、その有用性は検証されていません。個人的には、受精時の形態観察にTLは有用であると考えています。

吉村 現在、ARTの先進医療として、TLが認められていますが、この結果を受けてどう考えたらいいのでしょうか。

河村 本試験を含め、これまでのRCTでは、TLモニタリングの胚選択と非断続的胚培養による臨床成績の向上への明らかな有用性は示されておられません。しかし、人工知能など新しい技術やアルゴリズムを搭載したTLモニタリングが次々に開発されていますので、先進医療として今後もその有用性について適切な臨床試験を行いながら評価していく必要があると考えます。だからこそ有用性が明確になれば、その段階で先進医療から外れ、一般保険診療になるのではないかと私は考えています。

小野 臨床ではTLが普及する傾向がみられますが、現段階ではその有効性に確証がないということが示されたという意味で有意義な論文だと思います。しかし、河村先生もおっしゃられたように、技術革新が進めば、局面も変わってくると思います。

吉村 国立研究開発法人日本医療研究開発機構でも、人工知能を用いたTLの評価を行っていますので、このような研究が進むことが今後必要になってくるだろうと思います。

今日はお忙しいところ、お二人の先生には貴重なご意見をいただきまして、ありがとうございました。



雄マウスから機能的卵子の*in vitro*形成

Generation of functional oocytes from male mice *in vitro*
Murakami K et al. Nature. 2023;615(7954):900-906.

Point Y染色体を除去し、X染色体を複製することにより、ES細胞とiPS細胞の性を雄から雌に転換できた。

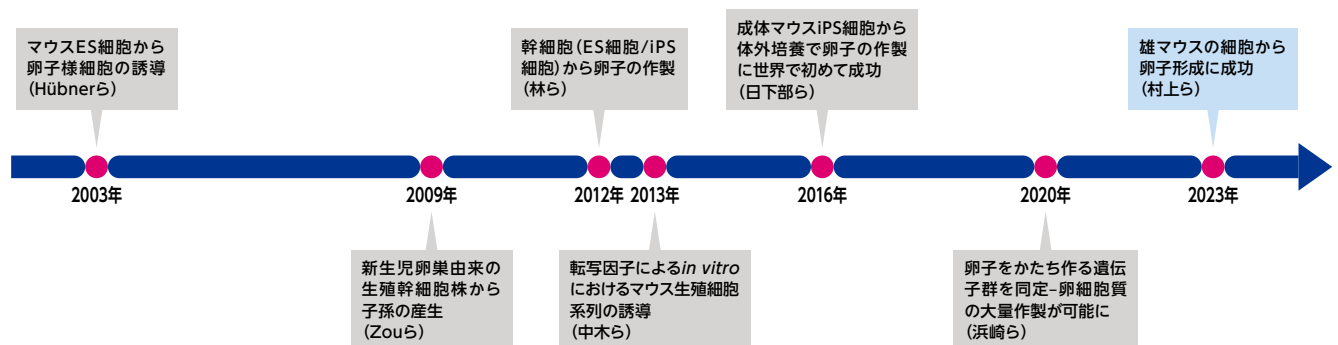
性染色体異常は、男性と女性の両方において配偶子の形成を著しく損なう。卵子の場合、余分なY染色体の存在やX染色体の喪失が、成熟過程における妨げとなる。今回、マウスES細胞およびiPS細胞を用いて、XY性染色体セットから余分なY染色体を除くことで効率的にXXに転換する方法を紹介する。この方法を用いることで、ダウン症候群のモデルである16番染色体トリソミーの根絶も可能であった。このように人為的な性転換により作製された正倍数体XX ES (またはiPS) 細胞は、天然のXX ES (またはiPS) 細胞と同等の効率で成熟卵母細胞に分化できた。さらに、成熟した雄マウスの尾から作製したiPS細胞を完全に機能的な卵子に分化させ、受精後に新生仔を得ることに成功した。

学術的背景

体外培養による卵子の産生は2003年のHübnerらのマウスES細胞を用いた報告以降、段階的に進歩を遂げてきた(図1)。マウスによるこれまでの研究から、成熟した卵子または精子への分化の最終段階には、それぞれXXまたはXYの性染色体が必要

であることが示されている。したがって、性染色体異常のある細胞から機能的な卵子を産生するには、Y染色体の除去やX染色体の重複が必要となる。

図1 多能性幹細胞からのマウス卵子の分化に関する主な研究



結果

● **ES細胞の培養による性転換**
始原生殖細胞 (PG細胞) および始原生殖細胞様細胞 (PGCL細胞) のレポーター遺伝子である *Blimp1*-mVenus (BV)、PG およびPGCL細胞および卵子のレポーター遺伝子である *Stella*-ECFP (SC) の両者が組み込まれたES細胞 (BVSCN2 XY) のX染色体に、DsRed (赤色蛍光タンパク) 発現ベクターをノックインし、BVSCN2 X^RY ES細胞 (以下、X^RY ES細胞) を作製した (図2A)。

X^RY ES細胞を8回継代した時点において、Y染色体を喪失したX^RO ES細胞が6%の細胞 (87個中5個) で確認された。X^RO ES細胞を引き続き培養すると、細胞分裂の過程で2本に複製されたX染色体が誤って片方の細胞だけに入り込む現象 (染色体分配エラー) による、X^RX^R ES細胞の出現が確認された (図2A)。

次に、染色体分配エラーを促進するリバーシン処理 (0.02 μM、

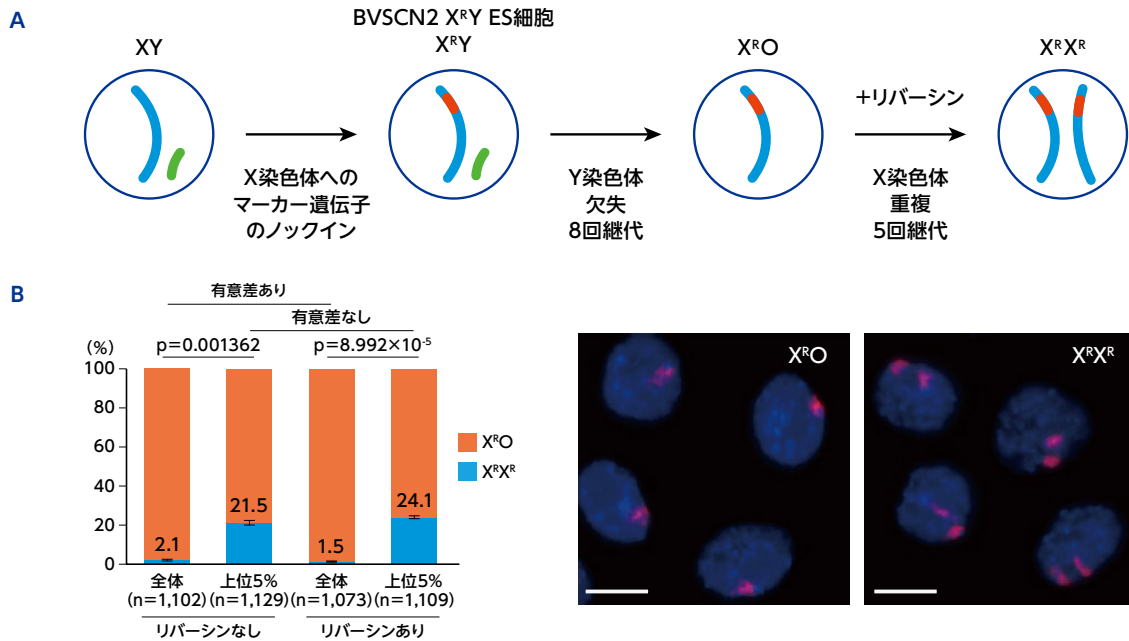
10時間)による、 $X^R X^R$ ES細胞の出現率の改善について検討した。DsRedのシグナル強度(高いとX染色体が2コピーである可能性が高い)が上位5%の画分に含まれる $X^R X^R$ ES細胞の割合は、リバーシン処理のなし、ありでそれぞれ $21.5 \pm 1.2\%$ 、 $24.1 \pm 0.6\%$ であり、 $X^R X^R$ ES細胞の出現率を高める上で必須ではないものの、プラスの効果があることが示された(図2B)。 $X^R O$ ES細胞をリバーシンで処理し、DsRedのシグナル強度が上位0.02%の画分は定性・定量PCRで $X^R X^R$ であり、以後、「 $X^R X^R$ ES細胞」として扱った。

● 性転換したES細胞から卵子の誘導

性転換したXX ES細胞の生殖細胞への分化能について評価するために、 $X^R X^R$ ES細胞、 $X^R Y$ ES細胞および $X^R O$ ES細胞からPGCL細胞を誘導した。誘導率は、 $X^R X^R$ (16.3%)、 $X^R Y$ (8.0%)、 $X^R O$ (7.0%)であった。天然のXX ES細胞(DsRedをノックインする前のES細胞)と同等のレベルでX染色体不活性化が観察された。

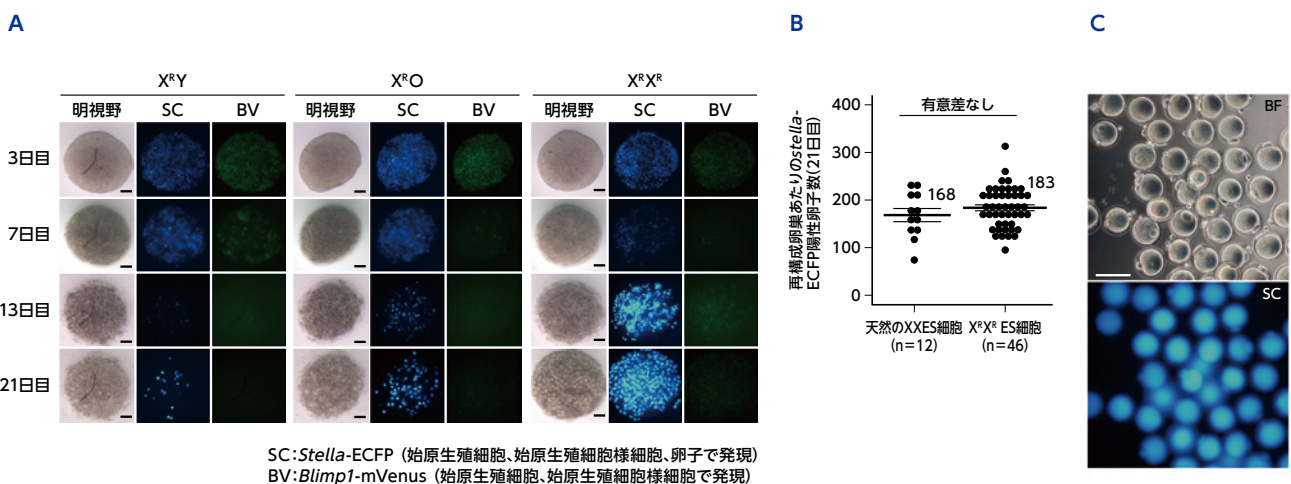
次に、PGCL細胞を12.5日胚の雌性腺体細胞と混合培養し、凝集塊(再構成卵巣)を形成させた。培養21日目に

図2 ES細胞の性転換



(A) ES細胞の性転換手順の概略 (B) $X^R O$ ES細胞からの $X^R X^R$ ES細胞の単離 (左) 各画分における $X^R X^R$ ES細胞の割合(すべてのDsRed標識細胞、またはDsRed標識細胞の上位5%)。数値は3回の独立した実験の平均値±標準偏差(両側Welchのt検定)。(右) X染色体のDNA蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション分析。スケールバー、10 μ m。

図3 性転換したES細胞から *in vitro*での卵子の産生



(A) $X^R Y$ 、 $X^R O$ 、 $X^R X^R$ ES細胞を使用した再構成卵巣の *in vitro* 分化誘導。スケールバー、200 μ m。(B) 再構成卵巣 (rOvary) あたりの *Stella*-ECFP陽性卵子数。天然のXX ES細胞は8回の実験における12の再構成卵巣、 $X^R X^R$ ES細胞は12回の実験における46の再構成卵巣における平均値±標準偏差を示す(両側Welchのt検定)。(C) $X^R X^R$ ES細胞からMII期卵子の産生。スケールバー、100 μ m。

おける再構成卵巣あたりのSC陽性細胞の数は、 $X^R Y$ ES細胞や $X^R O$ ES細胞よりも $X^R X^R$ ES細胞で明らかに多く、天然のXX ES細胞と遜色なかった (図3A,B)。再構成卵巣から取り出したSC陽性細胞はその後、体外培養によりMII期卵子にまで成熟した (図3C)。

● 16トリソミーを有するES細胞からの卵子発生 ……………

染色体分配エラーによる16番染色体のトリソミーマウスは、ダウン症候群のモデルとして使用されるため、BVSC XY+16 ES細胞はダウン症候群における卵子発生のモデルに使用できる。BVSC XY+16 ES細胞にDsRed発現ベクターを挿入し、16トリソミーを持つES細胞 (BVSC $X^R Y$ +16 ES細胞) を樹立した。 $X^R Y$ ES細胞と同じ要領で培養するとY染色体が欠落した $X^R O$ +16 ES細胞が出現し、リバーシ処理によりX染色体が2コピーとなった細胞をゲノム解析したところ、6個中3個 (50%) が $X^R X^R$ +16であることが示され、残りの3個は完全な正倍数体であった。これは、ES細胞株の短期間培養により16番染色体の除去とX染色体の重複の両方が起こったことを示している。

0.02 μ Mのリバーシを使用した場合、X染色体の分配エラー率は増えたが、常染色体の分配エラー率に変化は認めなかった (ただし、リバーシの濃度を0.1 μ Mとした場合、5番、9番、12番、19番染色体の分配エラー率の増加が観察されている)。

● 性転換iPS細胞から卵子の誘導 ……………

雄マウス体細胞由来のiPS細胞から機能的な卵子を得ることが可能か検討した。iPS細胞は、BVをもつ (SCはもたない) 8週齢雄マウスの尾部由来線維芽細胞から作製した。iPS細胞のX染色体にDsRedをノックインしたBV $X^R Y$ iPS細胞 (以下、 $X^R Y$ iPS細胞) を作製し、これを9回継代すると1.1%の頻度でBV $X^R O$ iPS細胞 (以下、 $X^R O$ iPS細胞) が検出された。 $X^R O$ iPS細胞をリバーシ処理後、DsRedのシグナルが強い上位の0.02%画分から採取したクローン (n=4) のすべてにおいて2本のX染色体を有することが確認された。

これら $X^R X^R$ iPS細胞は先述の雌性腺体細胞との混合培養により、PGCL細胞、初代卵母細胞、卵核前期卵子、およびMII期卵子に分化できた。一方、 $X^R Y$ iPS細胞および $X^R O$ iPS細胞から生殖細胞の分化は、卵子発生の初期の段階で著しく妨げられた。

$X^R X^R$ iPS細胞由来のMII期卵子は、野生型精子との体外受精で2細胞期胚に发育した。これらを偽妊娠マウスへ移植したところ、1.1%の胚 (630匹中7匹) から新生仔が得られた。7匹の新生仔マウスはいずれも順調に成長し、うち2匹は他のマウスと交配することで仔を作ることができた。

● 単一の雄性iPS細胞からの子孫 ……………

XY iPS細胞とこれをXXに性転換したiPS細胞を由来とする子孫の生成が可能か検討した。 $X^R Y$ iPS細胞または $X^R X^R$ iPS細胞をBALB/cマウスの胚盤胞に注入し、 $X^R Y$ iPS細胞から成長した雄キメラマウスと $X^R X^R$ iPS細胞から成長した雌キメラマウスを作製した。キメラマウスと野生型BALB/cマウスとの交配による仔の毛色から判断すると、生殖系列伝達率は

$X^R Y$ iPS細胞で100% (74匹中74匹、6同腹仔)、 $X^R X^R$ iPS細胞で97% (97匹中94匹、10同腹仔) であった。

これらのキメラマウス同士を交配することで得られた17匹の仔マウスのうち、4匹が単一の雄性iPS細胞からの子孫であることが確認された。

● 性転換ES細胞の表面マーカーを用いた分離 ……………

今回の性変換システムは、X染色体に組み込まれたレポーターに大きく依存しており、他の動物への適用が制限される。そこで、XXとXOを区別するための内因性表面マーカータンパク質の同定を試みた。しかし、X染色体に遺伝子があり、X染色体の数と発現レベルが相関する表面タンパク質は同定できなかった。代わりに、CD38をコードする遺伝子 (5番染色体) の発現がXX ES細胞においてXO ES細胞の2.9倍高いことを発見し、CD38タンパク質の発現レベルにおいてもXO ES細胞よりもXX ES細胞で高いことが確認された。

これらの結果に基づき、XO ES細胞の集団からCD38を高発現する集団 (XX ES細胞に変化した細胞) の選別を試みた。CD38抗体を用いたFACSにより、レポーター遺伝子を持たない (*Blimp1*-mVenus、*Stella*-ECFPおよびDsRedが組み込まれていない) XO ES細胞からXX ES細胞を22%の効率で単離することができた。

まとめ

成熟した雄マウス由来のiPS細胞を出発材料として機能的な卵子の形成に成功し、受精後に新生仔が得られることまで確認できた。

Keyword

Blimp1-mVenus

PG細胞/PGCL細胞を可視化するレポーター遺伝子 (緑色の蛍光を発する)

Stella-ECFP

PG細胞/PGCL細胞および卵子を可視化するレポーター遺伝子 (シアン色の蛍光を発する)

リバーシ

紡錘体形成チェックポイント阻害剤

X染色体不活性化

2本のあるX染色体の1本だけを不活性化することで、雌雄間でX染色体の遺伝子量 (転写量) の差を補正するメカニズム

CD38

受容体/酵素機能を備えた多機能細胞表面タンパク質であり、シグナル伝達、細胞接着、環状ADPリボース合成などのさまざまな活動を媒介する。

乳癌発症後に妊娠を試みるための内分泌療法の中断

Interrupting Endocrine Therapy to Attempt Pregnancy after Breast Cancer
Partridge AH et al. N Engl J Med. 2023;388(18):1645-1656.

Point

ホルモン受容体 (HR) 陽性の早期乳癌女性が妊娠のために内分泌療法を一時中断しても、遠隔再発を含む乳癌イベントの短期リスクを高めることはなかった。

乳癌の既往歴のある若い女性の妊娠を試みるための補助内分泌療法の一時的な中断を評価する単一グループ試験が実施された。ステージI~IIIの乳癌で、術後内分泌療法を18~30ヵ月受けており、妊娠を希望する42歳以下の女性を対象とした。516例のうち497例で妊娠状況が追跡された。そのうち368例(74.0%)が1回以上の妊娠を経験し、317例(63.8%)が出産を経験、計365の児が生まれた。1,638患者・年の追跡調査で、乳癌のイベントは44例に見られた。3年間の乳癌イベントの発生率は、治療中断群で8.9% (95%CI 6.3~11.6)、対照コホートで9.2% (95%CI 7.6~10.8)であった。対照コホートと比較し、遠隔再発を含む乳癌イベントの短期リスクを高めることはなかった。

学術的背景

妊娠中のエストロゲンおよびプロゲステロンレベルの上昇、特にHR陽性の乳癌女性において、乳癌の再発リスクを高める可

能性について疑問が持たれている。しかし、乳癌治療後の妊娠や、内分泌療法の中断に関する前向き研究のデータは不足している。

POSITIVE試験

試験デザイン	多施設国際共同単群試験
対象患者	HR陽性の早期乳癌の女性(42歳以下)。ステージI~IIIのHR陽性乳癌で18~30ヵ月の術後内分泌療法を受け、妊娠するために治療の中断を希望するもの。
プロトコール	患者は登録前の1ヵ月以内に内分泌療法を中断した。患者が妊娠を試みる前に3ヵ月の休薬期間が指定されていた。内分泌療法の中断期間は、妊娠の試み、妊娠(または妊娠の失敗)、出産、および授乳(希望があり、可能であれば)を考慮し、最長2年間とした。生殖補助医療は許容された。1年経過しても妊娠しなかった場合、生殖能力の評価を実施することが強く推奨された。妊娠および授乳の完了、あるいは妊娠に失敗した後は、予定されている5~10年間の治療を完了するために内分泌療法を再開することが強く推奨された。
主要評価項目	総患者・年数の追跡調査中に観察された乳癌イベント(同側における浸潤性乳癌の局所再発、領域再発、遠隔再発、対側における浸潤性乳癌)の数
副次評価項目	妊孕性、妊娠結果、出産結果、母乳育児、生殖補助医療の実施、内分泌療法の再開、遠隔再発
統計解析	SOFIT試験およびTEXT試験の結果に基づき、乳癌イベントの2%の年間リスクは許容可能であると判断した(4%のリスクは受け入れられないと判断した)。一次分析は1,600患者・年にわたる追跡調査後に実施する予定だった。一次分析の時点までに観察された乳癌イベントが46件以下であれば、妊娠を試みるための内分泌療法の中断は短期的には安全と考えられた。 SOFIT/TEXT試験の症例のうち本試験の基準を満たした1,499例を外部対照コホートとした。対照コホートとの比較には、①ブートストラップマッチング法、②未調整対照コホートとの直接比較、③Cox比例ハザードモデルによる多変量解析の3つの方法を用いた。

結果

●患者背景

2014年12月～2019年12月の期間に518例が登録され、516例が主要評価項目の解析対象に含まれた。2022年6月1日のデータベースロック時点で1,638患者・年が蓄積され、追跡期間中央値は41ヵ月であった。登録時の年齢中央値は37歳(範囲:27～43)で、34.3%の症例が35歳未満であった。大多数の症例(93.4%)はステージIあるいはIIであった。リンパ節転移が1～3個の症例が29.3%、4～9個の症例が4.5%を占めた。62.0%の症例が化学療法を受けていた。

●乳癌の発症と遠隔再発

44件の乳癌イベントが認められ、安全閾値として事前規定した46件よりも少なかった。3年間の乳癌イベントの発生率は、治療中断群で8.9%(95%CI 6.3～11.6)、対照コホートで9.2%(95%CI 7.6～10.8)、絶対差は-0.2ポイントであった(95%CI -3.1～2.8、ブートストラップマッチング法)。

対照コホートと比較した治療中断群の調整ハザード比は0.81(95%CI 0.57～1.15)であった。遠隔再発は22件で、3年間の遠隔再発率は、治療中断群で4.5%(95%CI 2.7～6.4)、対照コホートで5.8%(95%CI 4.5～7.2)、絶対差は-1.4ポイントであった(95%CI -3.5～1.0、ブートストラップマッチング法)、ハザード比は0.70(95%CI 0.44～1.12)であった(図1)。

直接比較法を使用した場合も同様の結果であった。乳癌イベントの3年間の累積発生率の差について、登録時の人口統計学のおよび疾患の特性、および治療歴に基づきサブグループ解析を実施したが、既知の予後因子に対する期待と一致していた。

●妊娠と出産に関する結果

妊娠状況に関する情報が入手できた497例のうち、74.0%(368例)が試験期間中に妊娠し、生産児は365(単胎335、双胎15組)であった。215例(43.3%)が試験参加中に生殖補助医療を受けていた。全出生児のうち、低体重(2,500g未満)は29(7.9%)で、先天異常は8(2.2%)だった。

Cox 比例ハザードモデルによる調整解析では、妊娠に関連する乳癌イベントのハザード比は0.53(95%CI 0.27～1.04)であった。

ランドマーク解析では、妊娠に関連する乳癌イベントのリスク増加は示されなかった。妊娠の成功と関連する要因は若年であることがロジスティック回帰モデルにより示され、35歳未満の症例の85.7%が妊娠したのに対し、35～39歳の症例では76.0%、40～42歳の症例で52.7%であった。

●中断期間

2年以上再発のない415例のうち、治療中断後に内分泌療法を再開した症例は304例(73.3%)であった。患者の半数が治療の中断から26ヵ月以内に治療を再開していた。データベースロック時点で内分泌療法を再開していない111例(26.7%)のうち、88例(79.3%)は現在妊娠を試みているか、妊娠中または最近妊娠していた、あるいは授乳中であった。

まとめ

POSITIVE 試験では、HR陽性の乳癌女性において妊娠を可能とするために内分泌療法を一時中断した後、短期的には乳癌転帰の明らかな悪化を認めなかった。安全性についてさらに詳しく知るには、より長期の追跡調査が必要である。

Keyword

ブートストラップマッチング法

データセットから無作為に何度もリサンプリングして母集団の特徴の推定を試みる統計手法

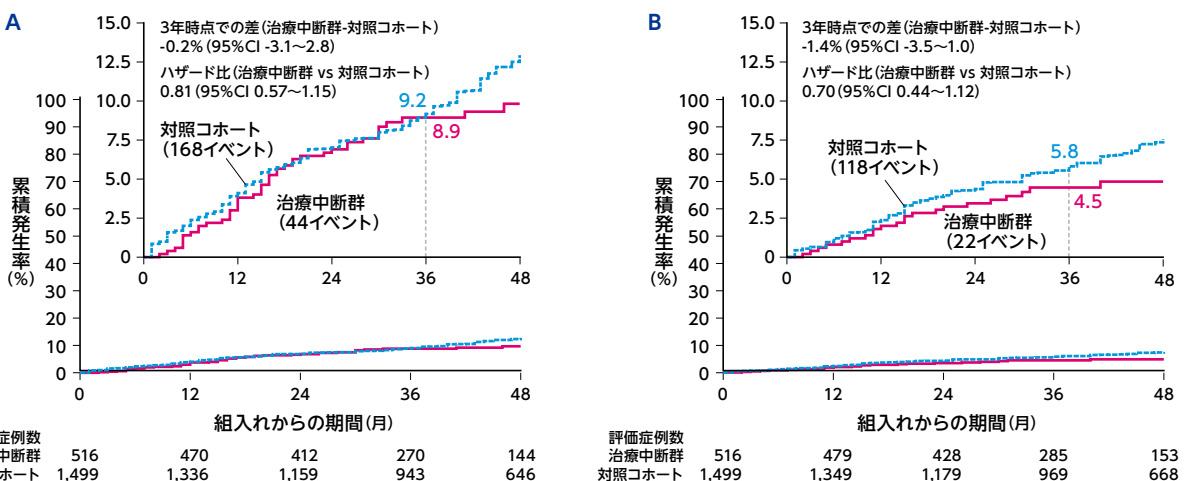
SOFT/TEXT 試験

HR陽性乳癌の閉経前女性におけるさまざまな内分泌療法を比較するために設計された臨床試験

ランドマーク解析

任意の時点まで生存した患者だけを対象に解析する方法

図1 乳癌イベントおよび遠隔再発の累積発生率



乳癌イベント(A)および遠隔再発(B)に関する累積発生率の推定値について、ブートストラップマッチング法により比較した。対照コホートでは、2年間で内分泌療法を受けた時点を0としている。挿入図は、y軸を拡大したグラフを示す。

タイムラプス胚選択の有無を含めた非断続的胚培養と、断続的標準培養による臨床アウトカムの3群比較

多施設共同二重盲検無作為化比較試験 (SelecTIMO試験)

Clinical outcomes of uninterrupted embryo culture with or without time-lapse-based embryo selection versus interrupted standard culture (SelecTIMO): a three-armed, multicentre, double-blind, randomised controlled trial
Kieslinger DC et al. Lancet. 2023;401(10386):1438-1446.

Point 継続妊娠率や出生率などの臨床アウトカムは、タイムラプスモニタリングで改善を認めなかった。

オランダの不妊治療クリニック15施設で体外受精(IVF)または卵細胞質内精子注入法(ICSI)を実施した1,731組のカップルを対象に、タイムラプスモニタリングの効果を検討する無作為化比較試験を行った。モニタリングシステムとして、胚の解析を自動で行う自動解析ソフトウェアEEVA™(EEVA)に連結可能なタイムラプスインキュベーターGERI®+を用い、EEVAを用いた胚選択の効果と、インキュベーターからの取り出しが不要な非断続的培養の効果を評価することとした。EEVAタイムラプス胚選択+非断続的培養(TLE群)、通常の胚選択+非断続的培養(TLR群)、通常の胚選択+通常の断続的培養(対照群)の3群で比較した結果、12ヵ月間の累積継続妊娠率はTLE群が50.8%、TLR群が50.9%、対照群が49.4%で、3群間に有意差は認められなかった($p=0.85$)。また、予後良好集団での新鮮単一胚移植後の継続妊娠率についてもTLE群が38.2%、TLR群が36.8%、対照群が37.8%で、3群間に有意差は認められなかった($p=0.90$)。以上の結果より、タイムラプスの培養環境と胚選択では臨床アウトカムの改善が認められず、成績の改善を見越して広く一般に使用することは疑問視された。

学術的背景

タイムラプスモニタリングは、その胚選択システムと非断続的培養条件によって臨床アウトカムを改善すると考えられており、世界中の生殖医療の現場で使用が増加しつつある。タイムラプスインキュベーターでは、内蔵カメラによって胚の発育状況が継続的に記録・自動解析される。そのため、通常の方法に比べ胚発育における形態学的な変化のイベントを見逃すことがなく、胚選択の精度を改善するとされている。また、形態評価のために胚を培養器から取り出す必要がなく、温度や培養液のpHなどの安定した培養条件が得られ、かつ胚の取扱いに伴う人為的損傷のリスクも最小限に抑えることができる。しかし、臨床的有用性については、これまで高品質なエビデンスは十分得られていない。

本試験は、タイムラプスモニタリングにより臨床アウトカムが改善するかどうかを評価した、過去最大規模の検証的な多施設二重盲検化比較試験である。対象患者を3群に無作為化し、EEVA胚選択または非断続的培養によって、新鮮胚移植と凍結融解胚移植による累積継続妊娠率や出生率が改善するか、12ヵ月の追跡調査によって評価した。

結果

全対象中87.9%(1,522/1,731例)が新鮮胚移植を受けた。その他は、卵巣過剰刺激症候群のリスク(88例)、胚発育不良(38例)、受精なし/使用できる配偶子なし(83例)という理由で受けなかった。

Intention-to-treat (ITT) 集団における12ヵ月間の累積継続妊娠率は、TLE群で50.8%(293/577例)、TLR群で50.9%(295/579例)、対照群で49.4%(284/575例)であり、3群間で有意差を認めなかった($p=0.85$ 、表1)。

予後良好集団(41歳未満で5個以上の卵子が採卵され、4個以上の受精卵が得られた患者)における新鮮単一胚移植例の継続妊娠率は、TLE群で38.2%(125/327例)、TLR群で36.8%(119/323例)、対照群で37.8%(123/325例)であり、3群間で有意差を認めなかった($p=0.90$ 、表1)。

年齢群別の12ヵ月間の累積継続妊娠率について、39歳以上の女性群では、TLR群よりTLE群で累積継続妊娠率が高かった(表1)。なお、同年齢群においてTLE群と対照群では差はなく(表1)、年齢群別の評価についてはより多くのサンプル数での検証が必要とされた。

重篤な有害事象は計10件(TLE群5件、TLR群4件、対照群1件)報告されたが、いずれも試験手順との因果関係は認められなかった。

まとめ

本試験では、1つのタイムラプスシステムの検証のみ行ったが、他のシステムにおいても、その基本原則に大きな差はないと考えられる。タイムラプスマニタリングは潜在的利益をもたらす可能性はあるが、臨床的利益が認められない場合は、患者の追加費用負担は支持されない。

Keyword

EEVA (early embryo viability assessment: 早期胚生存率評価)

培養3日目の初期胚で良好胚を予測するアルゴリズムで、5日目の胚盤胞形成まで待つ必要がない。なお、最終的に移植する胚は、予測アルゴリズムの情報を参考に通常の形態学的評価と併せて決定される。

表1 臨床アウトカムの結果

% (例数)	TLE群	TLR群	対照群	TLE群 vs TLR群	TLR群 vs 対照群	TLE群 vs 対照群
				オッズ比 (95%信頼区間)		
全体集団 (ITT集団)						
累積継続妊娠率	50.8 (293/577)	50.9 (295/579)	49.4 (284/575)	0.99 (0.79-1.25)	1.06 (0.84-1.33)	1.06 (0.84-1.33)
累積出生率	48.7 (281/577)	48.4 (280/579)	48.2 (277/575)	1.01 (0.81-1.28)	1.01 (0.80-1.27)	1.02 (0.81-1.29)
累積流産率	15.9 (92/577)	16.2 (94/579)	17.4 (100/575)	0.98 (0.71-1.34)	0.92 (0.68-1.25)	0.90 (0.66-1.23)
新鮮単一胚移植例 (予後良好集団)						
継続妊娠率	38.2 (125/327)	36.8 (119/323)	37.8 (123/325)	1.06 (0.77-1.46)	0.96 (0.69-1.31)	1.02 (0.74-1.40)
出生率	36.4 (119/327)	35.6 (115/323)	37.2 (121/325)	1.05 (0.76-1.45)	0.92 (0.67-1.27)	0.96 (0.70-1.32)
流産率	9.8 (32/327)	9.3 (30/323)	9.2 (30/325)	1.05 (0.62-1.77)	1.01 (0.59-1.72)	1.06 (0.63-1.79)
年齢群別累積継続妊娠率 (サブグループ解析)						
35.0歳未満	54.5 (182/334)	60.7 (201/331)	56.1 (175/312)	0.77 (0.57-1.05)	1.20 (0.88-1.67)	0.94 (0.69-1.28)
35.0~38.9歳	48.5 (79/163)	44.2 (76/172)	46.4 (81/174)	1.17 (0.76-1.80)	0.92 (0.60-1.41)	1.08 (0.70-1.65)
39.0歳以上	40.0 (32/80)	23.7 (18/76)	31.5 (28/89)	2.10 (1.05-4.21)	0.68 (0.34-1.37)	1.44 (0.76-2.71)

SelectTIMO試験

試験デザイン	多施設共同二重盲検無作為化比較試験
対象期間	2017年6月~2020年3月
対象患者	オランダの不妊治療クリニック15施設でIVFまたはICSIを実施し新鮮単一胚移植を希望する1,731組のカップル
プロトコール	胚培養はいずれの群も同一のインキュベーター (Geri®+) を使用して行った。TLE群およびTLR群では、受精を確認した1日目から3日目まで、インキュベーターから取り出さず培養を行った。対照群では、胚の形態を1日1~2回インキュベーターから取り出し評価した。TLE群での胚の選択は、自動解析評価 (EEVA) の結果と形態学的評価によって行われた。TLR群での胚の選択は、EEVAの結果を使用せず、形態学的評価によって行われた。全ての群で、凍結保存まで同一のインキュベーターで胚培養は継続された。12ヵ月の追跡調査における妊娠率の評価には、新鮮胚移植例および凍結融解胚移植例が含まれた。
臨床アウトカム	【主要】12ヵ月間の累積継続妊娠率、予後良好集団 (5個以上の卵子および4個以上の受精卵を有する41歳未満の女性) における新鮮単一胚移植例の継続妊娠率【副次】新鮮単一胚移植例の出生率、累積出生率、流産率、3つの年齢群別の12ヵ月間の累積継続妊娠率など
統計解析	ITT集団について、両側カイ二乗検定を用いて有意水準0.05で3群比較を行い、ロジスティック回帰分析を用いて対比較を行った。オッズ比と差の絶対値は95%信頼区間と共に示した。事前に規定された3つの年齢群 (35.0歳未満、35.0~38.9歳、39.0歳以上) についてサブグループ解析が行われた。



Perspectives of Reproductive Science 発刊にあたって

生殖の領域で最新のトピックスを紹介し解説する、「Perspectives of Reproductive Science」をスタートすることになりました。生殖医療では新しい技術や治療方法が開発され、取り入れられ、評価されてきました。近年の生殖医学の発展には目覚ましいものがあり、今後多くの新しい技術や治療方法が検討され、報告されると見込まれます。本誌第1号では、雄マウスの尾由来のiPS細胞から卵子、新生仔を得た報告を含め3報を解説しました。当面、2回/年のペースでその時点における最新の研究や臨床のトピックスをお届けする予定です。本誌が日頃の診療や研究で少しでも参考になれば幸いです。

編集委員長 **吉村 泰典** 吉村やすのり^{いのち}生命の環境研究所
編集委員 **杉野 法広** 山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学講座教授
岩瀬 明 群馬大学大学院医学系研究科産科婦人科学教授
河村 和弘 順天堂大学医学部附属順天堂医院 産科・婦人科 教授
小野 政徳 東京医科大学病院 産科・婦人科 准教授