

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659739

研究課題名(和文) 分裂期 FISH による新たな着床前診断法の開発

研究課題名(英文) Utility value of blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis

研究代表者

富山 僚子 (TOMIYAMA, Ryoko)

日本医科大学・医学部・アシスタント・スタッフ

研究者番号：40409214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：着床前診断のために施行される胚生検において、複数個の細胞を採取でき、胎児の構成に寄与しない胚盤胞期の栄養芽細胞の採取は、生検後の胚の着床能への影響がより少ないと考えられる。本研究において生検したマウス胚盤胞は、2-5時間で全ての胚が再拡張し、低侵襲かつ既に胚盤胞へ発生する能力を示していることから培養途中での診断胚のロスが少なく、着床前診断に有用であると考えられた。また、コルセミド処理により分裂期の細胞は有意に増加し、胚盤胞生検により分裂期細胞を用いた診断の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Embryo biopsy intended for preimplantation genetic diagnosis (PGD) is generally performed on cleavage stage, but it tends to be harmful for embryo viability. Trophoctoderm biopsy from blastocyst is seen to be less invasive, since inner cell mass is remain intact after biopsy. In this study it could be easily biopsied several number of trophoctoderm cells and all of blastocysts expanded again after biopsy. Some blastocyst cells treated by Colcemid were significantly interrupted mitosis, which drug efficacy was confirmed by Hoechst and Propidium iodide staining. On the other hand, fluorescent signals of whole chromosome painting probes were strongly detectable as for lymphocyte FISH. Trophoctoderm biopsy followed by examination using mitotic stage cells was likely to be useful for PGD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・生殖医学

キーワード：胚盤胞生検 分裂期

1. 研究開始当初の背景

習慣流産の原因の 5%は夫婦の染色体均衡型転座と言われている。

本邦における着床前診断は、日本産科婦人科学会の平成 18 年の着床前診断に関する見解により、染色体転座に起因する習慣流産（反復流産を含む）に着床前診断の審査対象が拡大された。以降、本邦においても習慣流産カップルに対する着床前診断が多く実施されている。現在の着床前診断で主に用いられる卵割期割球を用いた間期核 FISH 法は熟練した技術が必要で、“正常型”と“均衡型”の判別は出来ないため、流産を免れる胚と診断されても、両親と同じ均衡型転座の染色体と表現型を受け継ぐ事がある。アレイ CGH 法により染色体転座を診断する方法は、胚生検後、解析そのものは専門施設へ委託するため簡便ではあるが、目的とする染色体以外の過不足情報も同時に得られてしまい、しかも“正常型”と“均衡型”の判別は出来ない。

また、卵割期における胚生検と比較し多数の細胞が採取出来る胚盤胞生検は、技術的には可能であるものの、間期核 FISH を実施するに際し多数の細胞を用いるメリットに乏しく、また胚盤胞凍結が必須となるなどの理由から、実施施設は着床前診断・スクリーニングの 1%に満たないと ESHRE により報告されている。

2. 研究の目的

現在国内外で用いられている着床前診断法の多くは、分割期胚の、明瞭な核が認められる(間期核)の割球 1(または 2)個を転座部分テロメアプローブ 2 種類と、逆サイドのテロメアプローブ、またはどちらか一方(または双方の)染色体のセントロメア近傍プローブ、計 3(または 4)種類の FISH 用 DNA プローブを用いて FISH を行うという手順で遂行されている。卵割期の割球は他の体細胞に比べてサイズが大きいため、細胞質を除去しつつ核をスライドグラス上に確実に固定するためには、熟練した技術が必要である。この技術を、染色体転座に起因する習慣流産のための着床前診断に応用するにおいては、核内 DNA の位置によってはシグナルが見えにくいことやアーチファクトの出現などが問題である。また、FISH シグナルの個数により判定する現行の方法では、“正常型”と“均衡型”の区別は出来ない。

胚盤胞を構成する栄養芽細胞は、直径約 20 μm と卵割期割球と比較し小型であり、細胞質が少ない事、胚全体の細胞数が多いため生検後の胚発生への影響が少ない事、胎児の発生に寄与する内部細胞塊への侵略がないこと、などの理由から胚盤胞から生検する栄養芽細胞の診断への利用の有用性が推察される。

本研究では、胚培養や染色体検査の一般的

な手法を用い、かつ診断に苦慮することのない、染色体転座に起因する習慣流産患者のための着床前診断法の開発を目指し、胚盤胞生検の有用性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リンパ球の fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法における Whole Chromosome Painting (WCP) プローブの効率を検討した。

リンパ球は FicolI 液にて分離し、Matsunami APS スライドグラス上に塗抹標本作製した。FISH は Kreatech 社の FISH Reagent Kit (KBI-60005) を、WCP プローブは Kreatech 社の WC1, red および WC14, green を用いた。70-100%エタノールによる脱水後、probe mix をスポットし、カバーガラスを載せて封入した。ThermoBrite を用い、denaturation (75、10分)、hybridization (37 加湿、overnight) の条件下にて行った。hybridization 後は DAPI による対比染色を行い、蛍光顕微鏡下にて観察した。

(2) 6-8 週齢の BDF1 雌マウスに PMSG-hCG 投与による過排卵処理を行い、hCG 投与と同時に同系雄マウスと一晩同居させた。hCG 投与より 72 時間後に卵管・子宮灌流により桑実胚期の胚を回収し、vitrification 法にて凍結保存し、適宜融解して実験に用いた。

融解し、追加培養して得た胚盤胞から栄養芽細胞を生検し、生検細胞の染色と生検後の胚盤胞の生存性について検討した。胚生検は、マイクロマニピュレーターに搭載した RI 社の Saturn 5 Active™ directional laser system を用いて行った。

胚盤胞へ発生した胚の内部細胞塊(ICM)から遠い位置の透明帯をレーザー照射により開口し、レーザー刺激で収縮した胞胚腔が再拡張し透明帯開口部からハッチング開始するまで追加培養した。透明帯開口部からヘルニア状に突出した栄養芽細胞を生検用の 25 μm マイクロピペットで保持し、陰圧をかけながら頸部に 400mW で 5 μm ホールのレーザーを連続照射し、数個の栄養芽細胞を採取した。

生検後の胚盤胞は培養を継続し、胞胚腔の再拡張を観察した。

(3) 胚盤胞培養時に 0.1 $\mu\text{g/ml}$ コルヒチンまたはコルセミドを添加し、6 時間または 16 時間細胞分裂阻害処理を行った。0.2% Triton-X 100 添加 PBS にて溶解した 0.1mg/ml Propidium Iodide (PI) に 30 秒、続いて 100% エタノールに溶解した Hoechst33342 に 4、4 時間-overnight の浸漬で胚盤胞の二重染色を行い、薬剤効率を確認した。

4. 研究成果

(1) 染色体全腕とハイブリダイズする Whole Chromosome Painting (WCP) プローブを用いてリンパ球の FISH を行った。セントロメアあるいはテロメアプローブと比較し明瞭なシグナルであり、アーチファクトが診断に与える影響も少ないと考えられた。(図1)

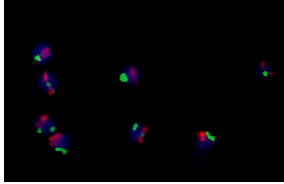


図1.
リンパ球 FISH 像
Red:1 番染色体
Green:14 番染色体
blue:核

(2) マウスの胚盤胞からマイクロマニピュレーターを用いて栄養芽細胞を生検した。(図2)

透明帯開口部よりヘルニア状に突出した栄養芽細胞をピペットで吸引し、茎部をレーザー照射することで容易に生検が可能であった。

卵割期胚の生検および診断は、“不均衡型でない”と診断された胚であっても、良好な発生を示す胚とは限らず、胚盤胞へ至る前に発生を停止し、移植出来ない場合がある。本研究において生検後の胚盤胞は全て再拡張し、生存を確認できたことから本法による生検は低侵襲であり、既に胚盤胞へ発生している発生能の良好な胚であることから診断胚のロスが少ない有用な方法であると考えられたが、凍結融解後の生存性を確認する必要がある。



図2. 胚盤胞生検

1. 透明帯開口部より突出した栄養芽細胞をバイオプシーピペットにより保持
2. 吸引圧をかけながら細胞間にレーザーを照射
3. 栄養芽細胞塊が分離される
4. 生検細胞塊と生検後に胞胚腔が萎縮した胚盤胞

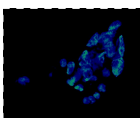


図3. 生検細胞のヘキスト染色像

(3) 分裂期の細胞を得るため、細胞分裂阻害剤の効果を検討した。マウスの胚盤胞をコルヒチンあるいはコルセミドで処理し、PI とヘ

キストによる二重染色し、分裂期細胞をカウントした。臨床応用する際のタイムスケジュールを考慮し、薬剤感作は6時間または16時間とした。

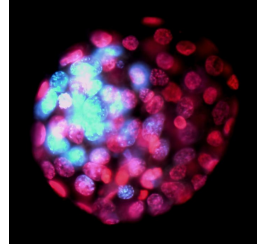


図4. 胚盤胞染色
Red: 栄養芽細胞
Blue: 内部細胞塊

染色体形成の観察された細胞は無処理区で2/187個(1.1%)だった。6時間の細胞分裂阻害剤処理を行ったところ、コルヒチン処理区36/300個(12.0%)に比較しコルセミド処理区は49/233個(21.0%)と有意に多い分裂期の細胞が観察された。さらにコルセミド処理を16時間に延長したところ、44/145個(30.3%)と分裂期細胞は有意に増加した。コルヒチン16時間では細胞が萎縮し、判定不能となったことから、胚盤胞細胞の細胞分裂阻害には、誘導体であるコルセミドの方がより適していると考えられた。胚盤胞生検では通常5-6個の細胞が採取出来ることから、分裂期細胞を用いた診断の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富山僚子 (TOMIYAMA, Ryoko)
日本医科大学・産婦人科・
アシスタントスタッフ
研究者番号：40409214

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：