

平成30年6月7日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10680

研究課題名(和文) 胚盤胞腔液内のDNAを用いた無侵襲性着床前診断技術の確立と臨床への応用

研究課題名(英文) Development and clinical application of non-invasive preimplantation genetic diagnosis using cell free DNA in blastocoel fluid

研究代表者

佐藤 剛 (Sato, Takeshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80326149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胚盤胞腔液(BCF)内に存在するcell free DNA(cfDNA)を回収、増幅し、着床前診断を前提とした遺伝的解析を行った。

BCF内のcfDNAの回収・増幅は可能であった。全ゲノム増幅の方法としては、DNA増幅成功率、回収量において、MDAに比しPicoPlexで良好であり、BCF内cfDNAの増幅にはPicoPlexが適していることが示された。

BCF内にわずかに存在するcfDNAを網羅的に均等に増幅するのは技術的に困難であり、array CGHでの胚の染色体の数的異常の評価における十分な結果は得られなかった。しかし、単一遺伝子疾患の診断は十分可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cell free DNA(cfDNA) in the blastocoel fluid(BCF) was collected and amplified, and with which genetically analysis was performed.

Removal and amplification of cfDNA in BCF was successfully carried out. As a method of whole genome amplification, PicoPlex was suitable for amplification of cfDNA in BCF because it was shown that PicoPlex was superior to MDA in amplification success rate and recovery amount.

It seems to be technically difficult to comprehensively and uniformly amplify cfDNA that is slightly present in BCF, so sufficient results in the assessment of numerical abnormality of the all chromosomes using array CGH were not obtained. However, the results demonstrated that diagnosis of monogenic diseases was sufficiently possible.

研究分野：産科婦人科

キーワード：着床前診断 胚盤胞腔液 WGA MDA PicoPlex array CGH

1. 研究開始当初の背景

着床前診断の技術が、20年程前より臨床に導入され、様々な遺伝的疾患が胚の段階で診断されており、児が罹患者となる可能性のある夫婦は大きな恩恵を受けている。

また着床前診断は、相互転座やロバートソン転座等の染色体構造異常の保因者である習慣流産の夫婦の胚に対しても流産の回避を目的として行われているが、現時点までに自然妊娠と比較して生児獲得率を向上させるというエビデンスは得られていない。その理由の1つとして、診断の検体として1~数個の細胞を発育中の胚から採取すること(胚生検)が、胚発生に悪影響を与え、子宮への胚移植後の着床を阻害しているということが挙げられている。そのため、胚への侵襲を伴う胚生検操作を改善するあるいは排除することは、着床前診断後の胚の着床率を向上させ生児獲得率の改善につながると期待される。

体外受精・胚移植治療等の生殖補助医療において、余剰胚の凍結保存は前核期胚から胚盤胞期までのすべての段階で行われうるが、胚盤胞期で凍結保存を行う場合、その直前に胚盤胞腔を穿刺し胚盤胞腔液を吸引除去することにより、凍結時の大きな氷晶の形成を回避し融解後の胚盤胞の生存率を向上させることが報告されており、実際に一般臨床として施行されている。

そのような処理を胚盤胞に対して行った場合、得られた胚盤胞腔液は通常破棄されるが、胚盤胞腔液内に胚のDNAが存在することが報告されている。胚盤胞1個あたり0.3-0.5nlの胚盤胞腔液が得られ、その中に平均9.9pgのDNAが存在することが報告されているが、このDNA量は、1細胞あたりのDNA量約4pgを上回っており、通常単一細胞で診断を行う着床前診断の技術を用いれば、その量のDNAでの診断は十分可能であると言える。

胚盤胞腔液内に存在するDNAを用いて着床前診断を行うことが可能となれば、従来のように胚生検を行う必要がなく、胚への侵襲を取り去り胚発生への悪影響を排除することが可能となり、妊娠率、生児獲得率の向上が期待できる。また、着床前診断の解析対象として用いる検体には、胚盤胞の凍結保存のための操作中に得られ本来破棄される胚盤胞腔液を用いるため、着床前診断のために新たに胚に操作が加わることはなく、無侵襲性の着床前診断といえる。

2. 研究の目的

胚盤胞腔液内に存在するDNAを全ゲノム増幅(WGA)の技術により増幅し、それを検体として着床前診断を前提とした遺伝的解析を行う。その結果と、胚盤胞腔液を採取した胚の細胞を用いた解析結果とを比較し、胚盤胞腔液内DNAを用いた解析の精度向上のため、DNA増幅や解析方法の改善を行う。そ

れにより、従来の着床前診断で行われていた胚生検が不要な、無侵襲性の着床前診断技術の確立とその臨床への応用を目的とする。

3. 研究の方法

<胚盤胞腔液採取>

当施設で、染色体相互転座あるいは筋強直性ジストロフィーのため着床前診断を施行し、異常の結果のため移植の対象とならず凍結保存されていた胚を、夫婦の同意を得て検討対象とする。それらの胚を胚盤胞まで培養した後、胚盤胞腔液(BCF)をマイクロマニピュレータを用いて穿刺・吸引する。

<BCF内のcell free DNAの増幅>

得られたBCF内のcell free DNA(cfDNA)を、multiple displacement amplification法(MDA)あるいはPicoPlex法により全遺伝子増幅(whole genome amplification; WGA)を行う。増幅されたDNAを精製後定量し、増幅の程度を解析する。

<増幅されたBCF内cfDNAを用いたarray CGHによる全染色体解析>

増幅されたBCF内cfDNAをCyanine 3あるいはCyanine 5で蛍光標識し、正常男性リンパ球および女性リンパ球から抽出したDNAをreferenceとしarray CGH(aCGH)用スライドガラス上でhybridizationを行う。Hybridization後、スライドガラスの洗浄、蛍光シグナルのスクアナでの読み取りを行い、得られたデータを専用のソフトウェアを用いて解析し全染色体のコピー数に関する情報を得る。

<増幅されたBCF内cfDNAを用いたnested PCRによるDMPK責任遺伝子近傍CTGリピート数の解析>

筋強直性ジストロフィーは、19番染色体上のミオトニン・プロテインキナーゼ(DMPK)責任遺伝子近傍(3'非翻訳領域)のCTGリピートの増加により発症する。増幅されたBCF内cfDNAを用いて、そのCTGリピート領域をnested PCRにより増幅し、得られた増幅産物のfragment解析を行いリピート数を同定する。

<胚盤胞の栄養外胚葉細胞を用いた解析>

BCFを採取した胚盤胞よりマイクロマニピュレータを用いて5~8個の栄養外胚葉(TE)細胞を生検し、それらのDNAをWGA後、aCGHによる全染色体の解析およびnested PCRによるDMPK近傍CTGリピート数の解析を行う。また、生検後の胚盤胞(biopsied BC: bBC)から抽出したDNAを用いて同様の解析を行う。

<BCF内cfDNAおよびTE細胞を用いた解析結果の整合性に関する検討>

BCF内cfDNAおよびTE細胞を用いた解析

結果の整合性、一致率を検討し、TE 細胞での結果を基準として、BCF 内 cfDNA を用いた解析の精度、着床前診断への応用の可能性について検討する。

4. 研究成果

< BCF 採取 >

12 個の廃棄予定の胚盤胞を解析に用いた。胚盤胞腔液 BCF 採取は、すべての胚盤胞で生存性に障害を与えることなく完遂できた (BCF 回収完遂率: 100%)。

< BCF 内 cfDNA の増幅 >

得られた BCF 内の cfDNA を WGA の技術を用いて増幅した。12 検体中、8 検体 (66.7%) で増幅が可能であり、増幅後の DNA 濃度は、 $33.93 \pm 26.62 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (mean \pm SD) であった。WGA の方法として MDA を用いた場合、7 検体中 3 検体 (42.9%) で DNA 増幅が成功し、DNA 回収量は $2.87 \pm 1.03 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であった。一方、PicoPlex を用いた場合は、5 検体中 5 検体 (100%) で DNA 増幅が成功し、DNA 回収量は $52.56 \pm 9.06 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であった。DNA 増幅成功率、回収量とも、MDA に比し PicoPlex で良好であった。

< 増幅された BCF 内 cfDNA を用いた aCGH による全染色体解析 >

増幅された BCF 内 cfDNA 8 検体を用いて aCGH を行い、全染色体の数的異常に対する解析を施行した。全ての検体で解析可能な結果が得られた。MDA および PicoPlex で増幅した BCF 内 cfDNA での解析結果の DLR-SD 等の QC は同等であった。しかし、BCF を採取した胚盤胞から得られた TE 5-10 細胞、および bBC を用いた解析結果との間に乖離がみられた。

< 増幅された BCF 内 cfDNA を用いた nested PCR による DMPK 責任遺伝子近傍 CTG リピート数の解析 >

増幅された BCF 内 cfDNA 8 検体を用いて筋強直性ジストロフィーのトリプレットリピート領域の fragment 解析を行った。全ての検体で評価可能な結果が得られた。筋強直性ジストロフィーに対する着床前診断を施行し罹患胚の診断のため本研究に用いた胚盤胞 5 個において、BCF での結果と TE、bBC の結果との比較では、全ての検体で解析結果が一致していた。

【考察】

BCF 内の cfDNA の回収は可能であり、これらの DNA の WGA 技術での増幅は可能であった。WGA の方法としては、DNA 増幅成功率、回収量において、MDA に比し PicoPlex で良好であり、BCF 内 cfDNA の増幅には PicoPlex が適していることが示された。

BCF 内にわずかに存在する cfDNA を網羅的に均等に増幅するのは技術的に困難であ

り、WGA の方法として PicoPlex を用いても aCGH での胚の染色体の数的異常の評価における十分な結果は得られなかった。しかし、単一遺伝子疾患の診断は十分可能であることが示された。

今回の研究では、検体として凍結保存胚を使用したことによる影響が危惧される。凍結保存胚盤胞を融解した後では、BCF 内の DNA の量や質の低下がありうる。本来であれば、凍結前に BCF を採取し、胚盤胞の凍結保存胚中に採取した BCF を用いて解析を行い、移植胚の決定をすることが望ましい。そのような方法であれば、aCGH の解析でも評価に値する十分な結果が得られることも期待できる。

今後、着床前診断で罹患胚の結果のものなど、凍結保存前に廃棄が決定した胚盤胞を提供してもらい研究に用いる等、研究方法を検討することにより、臨床応用する上でのより有用なデータが得られると考えられる。

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 7 件)

1. Sawada Yuki, Sato Takeshi, Saito Chieko, Ozawa Fumiko, Ozaki Yasuhiko, Sugiura-Ogasawara Mayumi. Clinical utility of decorin in follicular fluid as a biomarker of oocyte potential. *Reproductive Biology* 17;2018:33-39. DOI:10.1016/j.repbio.2017.12.001 査読あり
2. 佐藤 剛. 生殖医療—知っておきたい最新トピックス 6. 着床前スクリーニング. *産科と婦人科* 85; 2018: 277-282. 査読無
3. 佐藤 剛. 着床前診断、着床前スクリーニングの実際. *東海産科婦人科学会雑誌* 53; 2016: 25-31. 査読無
4. 佐藤 剛. 特集 話題の生殖医療 着床前診断、着床前スクリーニング. *現代医学* 64; 2016: 3-9. 査読無
5. 杉浦真弓、佐藤 剛、尾崎康彦. 不育症のエビデンス～命の大切さについて考える～. *思春期学* 34; 2016: 20-24. 査読無
6. Ikuma S, Sato T, Sugiura-Ogasawara M, Nagayoshi M, Tanaka A, Takeda S. Preimplantation Genetic Diagnosis and Natural Conception: A Comparison of Live Birth Rates in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Associated with Translocation. *PlosOne*. 17; 2015: 1-12. DOI: 10.1371/journal.pone.0129958. 査読あり
7. 佐藤 剛. 着床前診断、着床前スクリーニングの現状. *東海産科婦人科学会雑誌* 52; 2015: 17-24. 査読無

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 佐藤 剛. 「妊娠と授乳中のくすりと母と子の健康」不妊症の診断と治療. 第 10 回 あ

- いち・くすりフォーラム 2018年2月4日 名古屋
- 梅本幸裕、岩月正一郎、佐々木昌一、武田知樹、野崎哲史、窪田泰江、窪田裕樹、佐藤 剛、杉浦真弓、安井孝周. 顕微鏡下精巢内精子採取術に対する採精予測因子の検討 -Sertoli cell only syndrome と Inhibin B の関連-. 第 62 回日本生殖医学会学術講演会 2017年11月16, 17日 下関
 - 松本洋介、佐藤 剛、吉原紘行、伴野千尋、澤田祐季、岩月正一郎、梅本幸裕、安井孝周、杉浦真弓. Micro-TESE にて採取した精子を用いた ICSI におけるペントキシフィリンによる精子活性化の有用性. 第 62 回日本生殖医学会学術講演会 2017年11月16, 17日 下関
 - 澤田祐季、佐藤 剛、吉原紘行、伴野千尋、松本洋介、尾崎康彦、杉浦真弓. 体外受精・胚移植治療における卵胞液中 decorin の臨床的意義. 第 62 回日本生殖医学会学術講演会. 2017年11月16, 17日 下関
 - 武田知樹、岩月正一郎、野崎哲史、神谷浩行、窪田裕樹、窪田泰江、松本洋介、伴野千尋、澤田祐季、佐藤 剛、佐々木昌一、梅本幸裕、杉浦真弓、安井孝周. 名古屋市立大学病院での他施設連携による精子採取の成績. 第 39 回中部生殖医学会学術集会 2017年6月24日 名古屋
 - 澤田祐季、佐藤 剛、伴野千尋、松本洋介、松川 泰、杉浦真弓. 体外受精・胚移植治療における卵胞液中 Decorin の臨床的意義. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 2017年4月13日~16日 広島
 - 松本洋介、佐藤 剛、澤田祐季、松川泰、北折珠央、尾崎康彦、杉浦真弓. 原因不明習慣流産患者の着床前スクリーニングに関する意識調査. 第 61 回日本生殖医学会学術講演会 2016年11月3, 4日 横浜
 - 梅本幸裕、岩月正一郎、佐々木昌一、武田知樹、野崎哲史、窪田裕樹、松川泰、窪田泰江、出原麻里、佐藤 剛、杉浦真弓、安井孝周. ホルモン補充療法における精巢内組織変化の検討. 第 61 回日本生殖医学会学術講演会 2016年11月3, 4日 横浜
 - 鈴森伸宏、武田恵利、熊谷恭子、後藤志信、大瀬戸久美子、松川泰、松本洋介、澤田祐季、佐藤 剛、杉浦真弓、梅本幸裕、佐々木昌一. 染色体異常をもつ男性不妊患者に対する遺伝カウンセリング. 第 38 回中部生殖医学会学術集会 2016年6月18日 津
 - 梅本幸裕、佐々木昌一、武田知樹、野崎哲史、岩月正一郎、窪田裕樹、松川泰、出原麻里、佐藤 剛、杉浦真弓、郡健二郎、安井孝周. ホルモン補充療法における精巢内組織変化の一例. 第 38 回中部生殖医学会学術集会 2016年6月18日 津
 - 松本洋介、佐藤 剛、北折珠央、片野衣江、尾崎康彦、杉浦真弓. 原因不明習慣流産患者の着床前スクリーニングに関する意識調査. 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 2016年4月21日~24日 東京
 - 武田恵利、鈴森伸宏、熊谷恭子、松本洋介、小川紫野、大瀬戸久美子、佐藤 剛、杉浦真弓. 男性因子による不育症で来院した染色体異常に対する遺伝カウンセリング. 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 2016年4月21日~24日 東京
 - 佐藤 剛. 特別講演 「着床前診断、着床前スクリーニングの現況と展望」. 第 12 回東海 ART カンファレンス 2016年2月28日 名古屋
 - 佐藤 剛. 専攻医教育プログラム「着床前診断、着床前スクリーニングの実際」. 第 136 回東海産科婦人科学会 2016年2月13日, 14日 岐阜
 - 澤田祐季、佐藤 剛、齋藤知恵子、出原麻里、松川 泰、杉浦真弓、岩月正一郎、梅本幸裕、佐々木昌一. MD-TESE 由来の不動精子を用いた ICSI 後、電気刺激による人為的活性化を施行した卵子のタイムラプスモニタリング. 第 33 回日本受精着床学会学術講演会 2015年11月26日、27日 東京
 - 伊熊慎一郎、永吉 基、田中 温、竹田 省、佐藤 剛、杉浦真弓. 均衡型転座に起因する反復流産患者に対する着床前診断と自然妊娠の生児獲得率の比較. 第 33 回日本受精着床学会学術講演会 2015年11月26日、27日 東京
 - 佐藤 剛. 特別講演「着床前診断、着床前スクリーニングの現状」. 松阪・伊勢・志摩地区産婦人科医会研修会 2015年11月19日 伊勢
 - 佐藤 剛. シンポジウム 5 「着床前診断の現状と課題」 「着床前胚における染色体異常解析の生児獲得率改善への効果」 日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015年10月14日-17日 東京
 - 佐藤 剛. 「着床前診断、着床前スクリーニングの現状」. 平成 27 年度 日本医師会生涯教育講座 産婦人科 2015年8月22日 名古屋
 - 浅野智子、片野衣江、小川紫野、澤田祐季、松川 泰、後藤志信、佐藤 剛、杉浦真弓. 帝王切開癒痕部妊娠および頸管妊娠に対する当院での治療例. 第 101 回愛知産科婦人科学会学術講演会 2015年7月4日 名古屋
 - Shinichiro Ikuma¹, Takeshi Sato, Mayumi Sugiura-Ogasawara, Motoi Nagayoshi, Atsushi Tanaka, Satoru Takeda. Preimplantation Genetic Diagnosis and Natural Conception: A Comparison of Live Birth Rates in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Associated with Translocation. 31st Annual Meeting of

- European Society of Human Reproduction and Embryology 2015年6月14日~17日 Lisbon, Portugal
22. 梅本幸裕、佐々木昌一、岩月正一郎、窪田裕樹、出原麻里、佐藤 剛、杉浦真弓、郡健二郎、安井孝周. 高度乏精子症における精子採取の検討. 第37回中部生殖医学会学術集会 2015年6月6日 名古屋
 23. 松川 泰、佐藤 剛、齋藤知恵子、澤田祐季、松本洋介、出原麻里、杉浦真弓. 洗浄精子を用いた人工授精により妊娠成立した精液アレルギーの一例. 第37回中部生殖医学会学術集会 2015年6月6日 名古屋
 24. Yuki SAWADA, Takeshi SATO, Chieko SAITO, Yasushi MATSUKAWA, Mari IZUHARA, Mayumi SUGIURA, Shoichiro IWATSUKI, Yukihiko UMEMOTO, Shoichi SASAKI. Time-lapse monitoring of oocytes activated artificially with electrical stimulation following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with immotile sperm retrieved by micro-dissection testicular sperm extraction (MD-TESE). IFFS / JSRM International Meeting 2015 2015年4月26日-29日 横浜
 25. Yasushi MATSUKAWA, Takeshi SATO, Chieko SAITO, Yuki SAWADA, Mari IZUHARA, Mayumi SUGIURA, Ryoji KUBO, Yoichi SHINTANI. Successful pregnancy after artificial insemination with washed sperm in a case of human seminal plasma allergy. IFFS / JSRM International Meeting 2015 2015年4月26日-29日 横浜
 26. 松川 泰、佐藤 剛、澤田祐季、出原麻里、杉浦真弓. 洗浄精子を用いた人工授精により妊娠成立した精液アレルギーの一例. 第67回日本産科婦人科学会学術講演会 2015年4月9日-12日 横浜
 27. 伊熊慎一郎、佐藤 剛、杉浦真弓、永吉基、田中 温、竹田 省. 着床前診断は均衡型転座に起因する反復流産患者の生児獲得率を改善するか?. 第67回日本産科婦人科学会学術講演会 2015年4月9日-12日 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 剛 (SATO TAKESHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80326149

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし