

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：17K09188

研究課題名(和文)凍結胚移植法による出生児の身体的発育と神経行動学的発達に関する研究

研究課題名(英文) Study on physical development and neuroethological development of offspring by frozen embryo transfer

研究代表者

宮内 尚子 (Miyuchi, Naoko)

東北大学・医学系研究科・技術補佐員

研究者番号：60596162

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)：近年、生殖補助医療(ART)と出生児の精神神経発達障害の関連性について注目されている。本研究では、ARTによる出生児への影響について疫学調査と胎盤を用いたエピゲノム解析により比較した。その結果、胚盤胞移植は、性比と一卵性双胎の発生頻度に影響を及ぼすこと、凍結胚移植による胎盤で特異的に変化のみられる低分子RNAが存在することが示された。これらの結果は、ART操作が出生児のエピゲノムに影響を及ぼす可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、疫学調査の結果に基づき、ART、特に凍結胚移植の出生児への性差及び一卵性双胎の頻度において影響がみられることが判明した。またART由来の胎盤組織のエピゲノム解析により、影響を受けやすい遺伝子領域を明らかにし、科学的な検証を行い、不妊治療の影響を安全性とリスクの両面で評価することができた。これらの成果は、ARTによる胚発生過程におけるエピゲノムの変動が生じやすいことや変化が継承され胎児へその特性が移行するなど学術的な意義の存在と社会的意義の存在が示唆された。将来の自閉症や行動異常などへの傾向についても予測することができ、今後の研究継続の必要性を痛感した。

研究成果の概要(英文)：Recently, attention has been focused on the relationship between assisted reproductive technology (ART) and neuropsychiatric developmental disorders in the offsprings. In this study, the effects of ART on the offsprings were compared by epidemiological studies and epigenome analyses of the placenta. As a result, blastocyst transfer affects the sex ratio and the frequency of occurrence of monozygotic twins, and that there were small RNAs that are specifically changed in the placenta by frozen embryo transfer. These results suggested that the ART could affect the epigenome of the offspring.

研究分野：母子保健

キーワード：不妊治療 胚盤胞移植(FET) 低分子RNA(miRNA) 胎盤

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の生殖補助医療 (ART) 出生児は累計で 40 万人を超え、その大部分は凍結技術を利用して妊娠している。この凍結胚移植 (FET) による治療では、採卵周期に移植する新鮮胚移植 (Fresh) より、一般的に妊娠率は高いことが報告されている。また FET では、排卵誘発などによる子宮内膜の環境改善、あるいは卵巣過剰刺激症候群を回避することができる等の利点も示されている。これには、凍結可能な胚は、グレードの高い胚を利用するため、妊娠率が高いと指摘する研究者もいる。一方で、最近の海外の報告では、FET による出生児の場合、Fresh による出生児より、出生体重は増加し、また男児の割合が多くなる傾向にある事が報告されている (文献 )。加えて、巨大児や癒着胎盤、妊娠高血圧症候群などの周産期合併症の発生頻度も増加することが注目されている (文献 )。しかし、最近の我が国の状況や科学的エビデンスに欠けているため、正確な評価ができていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、胚盤胞移植 (BT) と性比、一卵性双胎との関連について大規模コホート調査のデータを基に評価することと、FET 由来児の出生後の身体的および神経行動学的発達について、大規模な疫学調査と生体試料を用いたエピゲノム解析を行うことにより、より明確な評価を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 凍結胚移植と一卵性双胎、性差、周産期合併症との関連について：年齢、BMI、栄養、ストレス等の生活環境が、出生児の体重や性比に影響を及ぼすことが報告されている。大規模前向きコホート調査を活用し、大多数例の自然妊娠群と比較することにより、我が国の BT 出生児の出生状況への影響について多変量解析により検討した。
- (2) FET 児の胎盤組織を用いたエピゲノム変異の解析：FET 児は、Fresh ET 児と比較し体重の増加を示す。FET が実施される時期の受精卵は、児の発育に機能するゲノムインプリントが不安定な時期である。本研究では、胎盤構成細胞を分離、精製し、神経行動学に関連する遺伝子の発現を調節するエピゲノム (マイクロ RNA) について、自然妊娠の胎盤と比較する。有意な変化を認めた場合、遺伝子予測プログラム (GO 解析) にてリスク要因となるか検討した。

## 4. 研究成果

- (1) 凍結胚移植と一卵性双胎、性差、周産期合併症との関連について：

近年、胚盤胞移植 (BT) 法を用い、妊娠率の向上が報告されている。一方で、BT 後は男児の出生の比率が高く、また、一卵性双胎 (MZT) の発生も増加しているという報告もある。本研究では、BT と性比、MZT の関係について交絡因子により補正し、多変量解析により正確に評価した。解析には、大規模前向き全国調査の全固定データ (103,099 名) を使用した。ART 群 (BT 群 2,020 名、ET (分割胚) 群 728 名)、非 ART 群 (人工授精や排卵誘発剤のみの不妊治療) (3,546 名)、自然妊娠群 (92,022 名) のデータを抽出し、性比と MZT の頻度の比較を統計学的解析を行った。各グループ (自然、非 ART、ET、BT) における男児の率 (%) は、それ

ぞれ 51.3, 50.7, 48.9, 53.4%で、性比に偏りがみられ、BT では男児が有意に高い結果だった (SSR : AOR 1.095, 95% CI : 1.001-1.198) (文献 )。また、一卵性双胎の頻度 (%) は 0.27, 0.11, 0.27, 0.99%で、BT で有意に発生率が高いことが判明した (MZT : AOR 4.229, 95% CI : 2.614-6.684)。BT により男児の比率が高くなった理由として、男児胚の方が胚盤胞に到達するまでのスピードが速く、BT に優先的に選択されている可能性、または胚盤胞までの長期培養が男児胚に優位に働いている可能性が示唆された。また、MZT の発生頻度増加については、胚盤胞までの長期培養による環境ストレスにより細胞接着の低下が起こることが一つの要因と推測した。

## (2) FET 児の胎盤組織を用いたエピゲノム変異の解析 :

エピゲノムの分子機構として、胎盤特異的 microRNA (miRNA) の存在が知られている。miRNA は、21 ~ 25 塩基の RNA 分子で、特定の遺伝子に結合することで発現を抑制する機能を有している。また、胎盤絨毛のエキソソームより、母体血中に取り込まれるため、胎盤 (胎児) の機能を評価する指標として有用である。つまり、早産、妊娠高血圧症候群の病態解明の手掛かりとなる。本研究では、新鮮胚と凍結胚により妊娠し、出産時満期 (39-40 週) の胎盤の miRNA の発現を網羅的に比較し、その表現型との関連性について検討した (文献 )。その結果 FET 由来胎盤にユニークな miRNA の発現をボルケーノプロット解析にて明らかにした (39 遺伝子) インプリンティング領域 (C19MC) の miRNA と DNA メチル化に変化がみられた (MEG-3-

男児の出生率 (SSR)		OR	95% CI	P-value
Model 1	Sp	1.000 (reference)		
	Non-ART	0.984	(0.921 - 1.051)	0.638
	ET	0.901	(0.781 - 1.042)	0.160
	BT	1.100	(1.007 - 1.201)	0.035*
Model 2	Sp	1.000 (reference)		
	Non-ART	0.984	(0.921 - 1.051)	0.625
	ET	0.900	(0.780 - 1.041)	0.158
	BT	1.099	(1.006 - 1.201)	0.037*

一卵性双胎児 (MZT)		OR	95% CI	P-value
Model 1	Sp	1.000 (reference)		
	Non-ART	0.590	(0.262 - 1.330)	0.203
	ET	1.058	(0.261 - 4.291)	0.937
	BT	4.061	(2.544 - 6.481)	< 0.001**
Model 2	Sp	1.000 (reference)		
	Non-ART	0.589	(0.261 - 1.330)	0.203
	ET	1.070	(0.261 - 4.345)	0.924
	BT	4.115	(2.571 - 6.587)	< 0.001**

モデル1 : 母親交絡因子を補正  
モデル2 : 両親の交絡因子を補正

図 1 男児の出生率と一卵性双胎児の割合

多変量解析にて、4 群を比較した場合、モデル 1 では母親の交絡因子を補正、モデル 2 では両親の交絡因子の補正を行った。いずれも BT 群では有意差をもって男児の出生率が高い。また、一卵性双生児 (MZT) の頻度に関しても、モデル 1.2 とともに BT 群で有意差をもって他の群より高い。

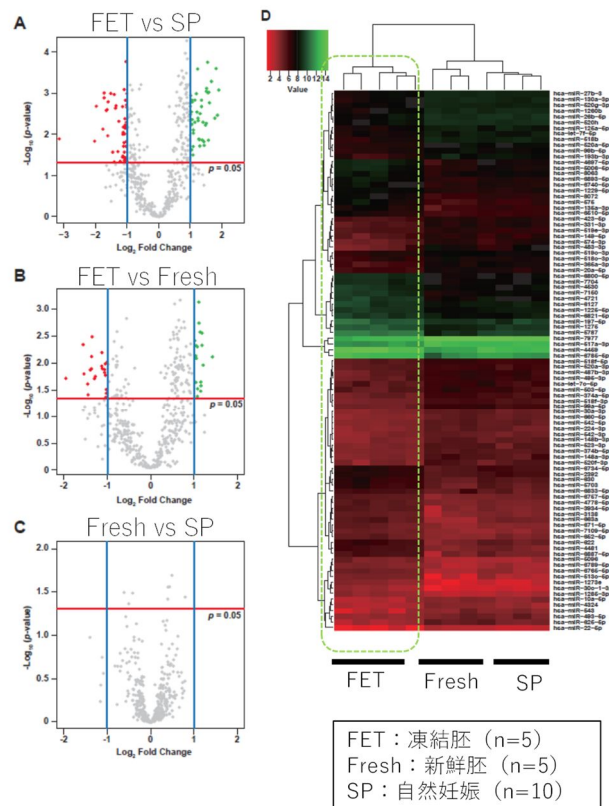


図 2 凍結胚移植胎盤 (39 40 週) の miRNA の網羅的な比較解析

FET 由来、新鮮胚由来、自然妊娠に由来する満期胎盤から、栄養膜細胞を高純度 (95% 以上) に精製し、miRNA を網羅的に比較検討。同程度の発現量で差を認めていないが、一部特徴的な変化もみられた

DMR,C19MC-DMR) 遺伝子生物学的機能(GO)解析より胎児、胎盤への成長、代謝、細胞移動などに関与する遺伝子がリストアップされた。パスウェイ解析より 2 型糖尿病や様々な癌と関連する経路が変化することが明らかとなった。胚の凍結操作により、miRNA を含むエピゲノムの違いにより、特にインプリントが確立、維持される時期の初期の胚を取り扱う際は、インプリント遺伝子の発現調節に変化がみられることが示された。ART 出生児が、様々な疾患や行動異常の頻度において、一般集団よりわずかではあるが高率であること

が最近確認されてきている。また、これが ART の影響であるのかは、現時点では混沌としている。しかし、ART が人為的行為であり、安全性を担保されなければならないことは事実である。今後も晩婚化社会の影響もあり、ART 出生児が増加することが十分予想される。我が国における ART 出生児の大規模な長期的な追跡調査が、今後重要であることは間違いない。

#### <引用文献>

- Wennerholm UB et al. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group. Hum Reprod. 28(9):2545-53. 2013
- Ishihara O et al. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: an analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan. Fertil Steril. 101(1):128-33. 2014
- Hattori H et al. The risk of secondary sex ratio imbalance and increased monozygotic twinning 1 after blastocyst transfer: data from The Japan Environment and Children's Study. Reproductive Biology and Endocrinology 17(1):27. 2019
- Hiura H et al. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas from frozen-thawed blastocyst transfer. Clinical Epigenetics. 9:79. 2017

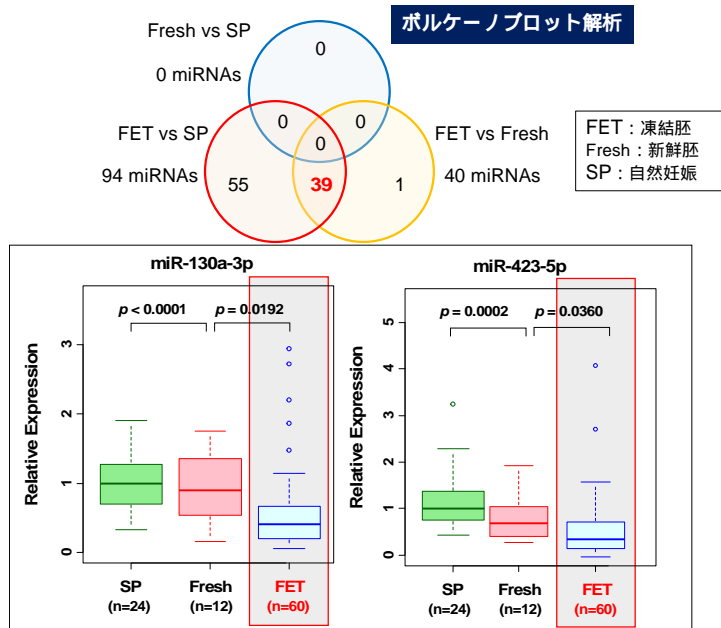


図3 miRNA の網羅的な比較解析

ボルケーノプロット解析により、3 群間を比較し、FET 由来胎盤に特異的な変化を示す miRNA を特定。変異を起こしている miRNA を GO 解析で検討すると、代謝や細胞増殖に関与するものが多く、また KEGG パスウェイ解析では、がんや糖尿病などの疾患に関与することがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Kyono K, Kagami M, Ogata T, Arima T	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of four imprinting disorders and ART	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-019-0623-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hattori H, Kitamura A, Takahashi F, Kobayashi N, Sato A, Miyauchi N, Nishigori H, Mizuno S, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Kuriyama S, Metoki H, Yaegashi N, Nakai K, Arima T; Japan Environment Childrens Study Group.	4. 巻 17
2. 論文標題 The risk of secondary sex ratio imbalance and increased monozygotic twinning after blastocyst transfer: data from the Japan Environment and Children's Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12958-019-0471-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimasu K, Tsuno K, Sato A, Miyauchi N, Yaegashi N, Nakai K, Arima T and Japan Environment Children's Study Group.	4. 巻 5
2. 論文標題 Lack of association between receiving ART treatment and parental psychological distress during pregnancy: Preliminary findings of the Japan Environment and Children's Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedicine & Society	6. 最初と最後の頁 5-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮内尚子、服部裕充、小林記緒、樋浦仁、有馬隆博	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 ART治療における遺伝的安全性とリスク	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------