

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591902
 研究課題名（和文）胚盤胞期胚での筋強直性ジストロフィーに対する着床前診断に関する研究
 研究課題名（英文）The research regarding clinical application of preimplantation genetic diagnosis for myotonic dystrophy in blastocyst stage embryos
 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・助教
 研究者番号：80326149

研究成果の概要：従来初期胚の段階で行われてきた筋強直性ジストロフィーに対する着床前診断を、診断に供する割球の増加を目的として胚盤胞期に行うことを前提に研究を行った。単一細胞を用いての PCR での DNA 増幅、胚盤胞期での胚生検、プライマーの組み合わせを替えての複数のプロトコールでの PCR 施行等の実験により、本疾患に対する胚盤胞での着床前診断の臨床応用への可能性と診断精度の向上が期待できる解析結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：筋強直性ジストロフィー、着床前診断、胚盤胞、胚生検、PCR

1. 研究開始当初の背景

近年の生殖補助技術、分子生物学の著しい進歩により胚移植前の体外受精胚の遺伝的解析がその生存性を損なうことなく可能となった。その技術は、実際に臨床の場でも着床前診断として応用され、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。

当初、X連鎖劣性遺伝病の夫婦の胚に対す

る性別診断で始まった着床前診断であったが、ヒトゲノムや疾患遺伝子に対する解析の発展とともに、最近では性別診断だけでなく様々な疾患に対する責任遺伝子レベルでの診断が可能となっており、欧米を中心とする諸外国より多くの遺伝性疾患に対する着床前診断の報告がされている。わが国においても、1998年10月に日本産科婦人科学会より着床前診断施行に対するガイドラインが発表され、日本においてもその臨床応用へ

の道が開かれた。

着床前診断においては、解析のために割球を生検された胚の凍結保存の安全性は確立されていないため、従来の着床前診断では胚移植までの数日で生検、診断を完了しなければならないという時間的制限や、1～2個の細胞より正確な診断を下さなければならないという検体の数的制限があり、診断精度の上で大きな障害となっている。

最近、生殖補助医療の臨床現場においては、受精卵の培養液、培養方法の発達により体外培養での胚盤胞までの到達率が以前に比較して高率になってきている。また、胚の凍結保存技術も進歩しており、初期胚のみならず胚盤胞の段階で凍結保存された受精卵の融解後の生存率についても良好な成績が報告されている。そのため、それらの技術を応用し、初期胚に比較し細胞数の増加した胚盤胞の段階で従来より多くの割球の生検を行い、その胚盤胞を凍結保存しておきその間に生検した割球の遺伝的解析を行えば、従来の着床前診断の短所であった解析にかけられる時間的制限、解析に供することのできる検体の数的制限を取り除くことができると考えられる。

申請者らは、従来着床前診断に対する基礎的研究として、fluorescence in situ hybridization (FISH) および quantitative fluorescence polymerase chain reaction (QF-PCR)による初期胚の単一割球の染色体異常の解析、胚盤胞での安全な胚生検および得られた細胞の解析などを行ってきた。また、現在当施設では、日本産科婦人科学会の認可を受け奥様が筋強直性ジストロフィー(DM1)罹患患者である夫婦の胚に対する着床前診断や染色体相互転座に起因する習慣流産の夫婦の胚をに対する着床前診断を行っている。

2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえ、従来初期胚の段階で行われていた筋強直性ジストロフィーに対する着床前診断を胚盤胞期の胚で行い、それによる診断精度・効率の向上、その結果として御夫婦が非罹患児を得ることへの貢献を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験Ⅰ：胚盤胞での胚生検

当施設での体外受精・胚移植治療により得られた受精卵のうち、胚の質が悪く移植に適さないものや、治療周期に妊娠が成立したため廃棄の予定となる凍結余剰胚を夫婦の同意を得て検討対象とする。これらの胚を市販の後期培養用の培養液を用いて桑実胚～胚盤胞まで体外培養し、本研究に供する。

マイクロマニピュレータおよびレーザー装置を使用して桑実胚～胚盤胞に発育した受精卵の透明帯に小孔を形成、そのまま12～24時間培養を継続し、胚の一部が透明帯の小孔を通して突出してきたところで、マイクロマニピュレータを使用して突出した部分の細胞塊を切除生検する。得られた細胞塊を顕微鏡下に観察を行い、細胞数、細胞の生存率等を計測する。

(2) 実験Ⅱ：単一細胞からのPCRの精度

単一細胞からのPCRによるDNAの増幅の可否、解析率について、単核球、ヒト割球を用いて検討した。用いた単核球は、健常成人男性血液より抽出した。ヒト割球は、実験Ⅰと同様の胚より初期胚の段階で生検したものをを用いた。

これらの検体に対し、DM1の責任領域である19番染色体上のDMPKの3'側非翻訳領域にあるCTGリピート領域をnested PCRにより増幅し、得られたPCR productのfragment解析を行った。

単核球80細胞、割球39細胞(33胚由来)に対し、以下のプライマーを用いてPCRを施行した。

1st PCR

forward : DM102¹⁾ reverse : DMPK-R²⁾

2nd PCR

forward : DMPK-F²⁾ reverse : DMPK-R²⁾

(3) 実験Ⅲ：胚盤胞からの生検で得られた割球に対するPCR

実験Ⅰで得られた、胚盤胞から生検した複数の割球を用いてPCRを施行した。PCRのプロトコールは実験Ⅱと同様に行う。

(4) 実験Ⅳ：異なるプライマーセットでの PCR

異なるプライマーセットを用いた複数の PCR のプロトコールについて検討した。血液から抽出した DNA を対象として、実験Ⅱと同様の領域を nested PCR により増幅し、得られた PCR product の fragment 解析を行った。4 人の成人の血液より DNA を抽出し実験に用いた。その内 2 人は男性健常者、2 人は女性 DM1 罹患者で、4 人それぞれの CTG リピートの繰り返し回数は既知である。それぞれの DNA 1 ng (実験Ⅳ-1) あるいは 10pg (実験Ⅳ-2) を 7-8 検体ずつ PCR に供した。1st PCR のプライマーの組み合わせを以下のように設定した。

- Set A
forward : DM102¹⁾ reverse : DMPK-R²⁾
- Set B
forward : DM102 reverse : DM101¹⁾
- Set C
forward : DM102 reverse : DMOR²⁾

1st PCR のそれぞれの PCR product に対し、以下のプライマーを用いて 2nd PCR を施行した。

- forward : DMPK-F²⁾ reverse : DMPK-R²⁾
- 1) : J. Brook et al. Cell 68; 799-808, 1992
- 2) : N. Deen et al. Mol Hum Reprod 7; 895-951, 2001

4. 研究成果

(1) 実験Ⅰ：胚盤胞での胚生検

当施設での体外受精・胚移植治療により得られた受精卵のうち、胚の質が悪く移植に適さないものや、治療周期に妊娠が成立したため廃棄の予定となる凍結余剰胚 7 個を実験に供した。その内 6 個が、培養により胚盤胞へ発育した。その全てで生検を完遂でき、5 個 (83%) の胚盤胞は生検後も生存していた。採取した細胞数は顕微鏡下にそれぞれ 3-6 個と観察された。2 個の胚盤胞から得られた細胞塊に対しピペッティングにて分離を試みたが、いくつかの細胞はその操作中に破壊された。今後、細胞を破壊することなく個々に分離する方法の検討も必要と考えられた。

(2) 実験Ⅱ：単一細胞からの PCR の精度
単核球では、80 細胞中 62 細胞(77.5%)で、ま

た割球では 23 胚から得られた 39 細胞中 33 細胞(84.6%)で目的とする領域の DNA の増幅が認められた。単核球での結果のうち 6 検体 (9.7%)の結果は allele drop out と考えられた。

(表 1)

検体	PCR施行細胞数	DNA増幅(+) 細胞数	ADO
単核球	80	62 (77.5%)	6(9.7%)
割球	39	33 (84.6%)	

(3) 実験Ⅲ：胚盤胞からの生検で得られた割球に対する PCR

実験Ⅰで得られた4個の胚盤胞から得られた細胞塊を PCR に供し、その全てで DNA の増幅が得られた。

(4) 実験Ⅳ：異なるプライマーセットでの PCR

① 実験Ⅳ-1

3 種類のプライマーセットを用いたいずれのプロトコールとも、全ての検体において DNA の増幅が認められた。適正な fragment が検出された率は、set A では 100%、set B では 74.2%、set C では 80.6% であった(表 2)。

4 名それぞれから得られた DNA を用いた PCR の結果はほぼ同等であった。プライマーセットの違いによる、個人間の結果の差は殆どみられなかった。

primer set	検体数	DNA増幅(+)(%)	適正fragment検出(%)
A	31	31 (100)	31 (100%)
B	31	31 (100)	23 (74.2%)
C	31	31 (100)	25 (80.6%)

② 実験Ⅳ-2

10pg の DNA を用いた解析では、DNA の増幅がみられたのは、set A では 100%、set B では 74.2%、set C では 45.2%であった。適正な fragment が検出された率は、set A では 58.1%、set B では 22.6%、set C では 32.3%と、set A に比し、set B、set C で低い値であった(表 3)。また、それぞれのプライマーセットにより、4 名それぞれからの DNA の増幅率に多少の差がみられた。

primer set	検体数	DNA増幅(+)(%)	適正fragment検出(%)
A	31	31 (100)	18 (58.1%)
B	31	23 (74.2)	7 (22.6%)
C	31	14 (45.2)	10 (32.3%)

(5) 考察

① 胚盤胞での割球の生検はスムーズな施行が可能で、生検された胚盤胞の殆どは生検後も生存していた。採取された割球の細胞塊を分離する方法に関しては検討が必要である。今後、細胞を破壊することなく個々に分離する方法として、1. 生検後カルシウム、マグネシウムを含まない培養液での培養後の分離、2. マイクロマニピュレータを用いた微細なガラス針での機械的な分離、3. レーザーを用いた分離などを試み、その効果を検討予定である。

② ヒト単核球、割球を用いた1細胞からのPCRでは、DNAの増幅において良好な結果が得られた。

③ 胚盤胞からの生検で得られた割球の細胞塊(細胞数3~6個)をPCRに供し、その全てでDNAの増幅が得られ、1回のPCRに供する細胞数の増加による解析率の上昇が確認できた。

④ 今回の実験に用いた4人からの検体に対しては、用いたプライマーセット中、DNA増幅率、適正fragment検出率においてset Aが有用であった。

今後の着床前診断施行の際の参考になると思われるが、検体による差も予想されるため、着床前診断において実際に胚に使用前に、診断対象の胚の両親のDNAに対し複数のプロトコルで前もってPCRを行い、より正診率の高いプロトコルを実際の着床前診断では用いる事が望ましいと考える。

また、複数のプロトコルの正診率が同等であれば、複数の割球個々に対し異なったプロトコルでPCRを行う事で着床前診断の診断率は向上すると期待される。そのような観点で考慮すれば、複数の割球の採取が可能な胚盤胞での生検は、着床前診断において有用であると考えられる。

⑤ 1細胞レベル相当のDNA量からのPCRでは増幅率の低下、適正fragment検出率の低

下がみられた。1細胞のみの結果では診断が確定しない可能性があり、1胚当たり2細胞以上の割球を着床前診断に供することが正診率を向上させる上で必要であると考えられる。その点からも、複数の割球の採取が可能な胚盤胞での生検は有用であると考えられる。

⑥ 胚盤胞での着床前診断を行う場合は、その周期での胚移植は日程的に困難となり、診断した胚盤胞は凍結保存しておく必要が生じる。胚生検のため透明帯を開口された胚の凍結保存における生存率は低下するとの報告もあり、これらの胚盤胞の凍結保存法の工夫も今後の重要な検討課題の1つである。

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3件)

- ① 佐藤 剛、トリプレットリピート病に対する着床前診断、産婦人科の実際 58; 191-202、2009、査読無
- ② 佐藤 剛、着床前診断、日本医師会雑誌、136; 1118-1120、2007、査読無
- ③ Nishikawa N, Sato T, Meiotic segregation analysis in male translocation carriers by using fluorescent in situ hybridization. Int.J Androl, Online, 2007, 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 佐藤 剛、特別講演 当施設における着床前診断の実際、第8回静岡生殖医療研究会、2008年12月5日、浜松
- ② 佐藤 剛、着床前診断を施行した筋硬直性ジストロフィーの2症例、第60回日本産科婦人科学会学術講演会、2008年4月12-15日、横浜
- ③ 佐藤 剛、シポジウムPGD2007 筋強直性ジストロフィーの着床前診断の実際、第25回日本受精着床学会学術講演会、2007年10月27日、仙台

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・助教

研究者番号：80326149

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし