

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09474

研究課題名(和文)染色体異常モザイク胚から健常児が生まれるのはなぜか？

研究課題名(英文)Why are healthy children born from mosaic embryos?

研究代表者

宮腰 藍衣 (Miyakoshi, Ai)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：40866513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：着床後胚における核型変化とミトコンドリア機能の影響の評価を目的とした。同意のもと研究へ提供された余剰胚を生検し、着床後発生モデルとして残存胚体外培養を行った。培養前後の検体に核型・mtDNA解析を行った。培養後、正常核型胚の割合が有意に増加し($p = 0.002$)、モザイク胚の割合は有意に減少した($p = 0.005$)。さらに、ミトコンドリアがヒト胚の核型の変化や培養性の関連を調べるために、mtDNAを評価した。正常核型もしくは培養が成功した胚はmtDNA変異が少なかった。以上からヒト胚でも核型変化が存在することが示唆され、mtDNA変異が着床後発生に阻害することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、本研究においてヒト胚でも着床後の経過で核型に変化がありうることを確認した。また、mtDNA変異がヒト胚の着床後発生に核型・発生可能性の双方に影響を与える一つの要因となりうることを判明した。これらを総合するとミトコンドリアの機能は、モザイク胚の発生過程における異常核型細胞の減少やヒト着床後胚の良好な発生において重要な因子の一つである可能性がある。本研究では体外培養を用いているなど複数の限界があるためさらなる研究が必要であるが、より詳細な理解を得ることができた暁には、より移植に適した胚を選択できるようになる可能性があり、臨床的妊娠率を高めることができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We aimed to study changes of karyotype and influences of mitochondrial function during post-implantation development. We biopsied trophoctoderms from donated embryos, and performed in vitro culture with remained embryos as model for post-implantation development. Karyotyping and mtDNA assay were performed on biopsied samples and post-culture samples. After culture, the rate of euploid embryos significantly increased ($p = 0.002$), while that of mosaic embryos significantly decreased ($p = 0.005$). Moreover, we evaluated the mtDNA to determine whether mitochondria are associated with karyotype changes and culturability in the human embryo. Euploid and culturable embryos had fewer mutations than aneuploid and non-culturable embryos. Our results suggested that karyotype changes existed in human mosaic embryos. The correlation between mtDNA mutations and in vitro culture suggested that the mtDNA mutations influence mitochondria function under embryo development and karyotype purification.

研究分野：生殖医療

キーワード：染色体モザイク 着床前診断 ミトコンドリア ミトコンドリアDNA 着床後経過

1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療の治療成績向上を目的とした異数性染色体異常に関する着床前診断は、胚から生検した細胞を解析し染色体異常の有無を同定する手法で、現在日本で多施設共同研究がこなわれている。このとき単一胚から採取した全細胞で結果が一致しなければ染色体異常モザイクと診断される。染色体異常モザイクの発生率は報告によって異なるが、初期胚で 73%、胚盤胞では母体年齢により上昇するが 16%程度と報告された(Taylor et al., 2014)。

染色体異常モザイク胚の移植報告(Greco et al., 2015)では 66.7%が着床しないか流産に至り、妊娠成立への影響は大きいことが明らかになっている。しかし同報告では流産例以外の全例(33.3%)で染色体健常児を得ており、同グループが症例数を増やして行った報告(Spinella et al., 2018)でもその数値は 30.8%となっている。これらの報告から、染色体異常モザイク胚を移植しても染色体健常児を得る可能性があることが分かった。しかし、どのようなメカニズムで染色体異常モザイク胚の妊娠成立後に異常細胞が消えて染色体健常児を得られるのかは不明で、実臨床に適応していくためにはメカニズムの解析が重要である。

胚生検は一部のみの細胞を採取しているため、採取部位による結果の違いが想起される。中国のグループが胚盤胞の複数個所を生検した報告では、15.6%の胚で部位による染色体の違いがあった(Huang et al., 2017)。また、マウス染色体異常モザイク胚では発生過程で染色体異常細胞が減少し正常細胞が増えていったという報告(Bolton et al., 2016)もあり、ヒトの発生過程でも同様の変化が起きているのではないかと考えられる。さらにミトコンドリアコピー数が少ない卵子・胚の質が不良とする報告(Zeng et al., 2007)があり、その正常細胞救済のメカニズムにも mtDNA コピー数が関与している可能性も想定される。

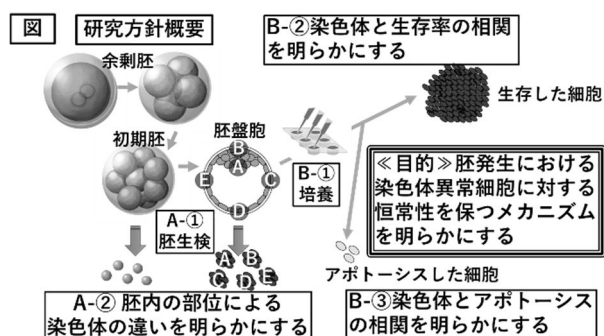
2. 研究の目的

本研究の目的は上記仮説を証明するために、染色体異常モザイク胚における染色体異常細胞・正常細胞構成の部位による違いを明らかにし、生検後残った細胞を培養し、経時的に追跡して異常細胞が発生過程で淘汰されるのか否か、その経過をミトコンドリアと関連して明らかにすることである。

ヒトの着床前診断、特にその結果が染色体異常モザイク胚であった際の臨床利用方法は検討中であり近年生殖医療の成績向上に向けて大変注目されている。着床前診断に関する報告は最近急増しており、特に染色体異常モザイク胚が大変注目されているトピックである。我々の研究では、胚の部位による染色体・mtDNA コピー数の違いを比較するだけでなく、生検後に培養を行って染色体異常有無・mtDNA コピー数応じたその後の細胞の生存率を比較する。さらに培養過程で死んだ細胞を解析し、どのような細胞が死んでいるのかを分析してマウスでは証明されている正常細胞レスキューがヒトでも起きることを検証するため、染色体異常モザイク胚の臨床応用の科学的根拠を提供できると考える。

3. 研究の方法

本研究では、研究使用への同意のうえで患者から横浜市立大学附属市民総合医療センター生殖医療センターへ提供された余剰胚を使用する。その胚の顕微操作による生検で得られた細胞の染色体解析を行った後、全胚培養をしていく。研究方針概要を図に示す。



A. 胚の部位による染色体異常細胞の比率の違いを明らかにする

胚生検

前述した胚盤胞の複数個所生検を行った中国のグループから報告では 51 個の胚を対象としているということ、当センターで得られる余剰胚の数から 50 個の胚を対象として研究を行う。顕微操作によって、胚から細胞を採取する。受精後 5-7 日目程度に相当する胚盤胞の、内部細胞塊(ICM、図A)から 1 か所、栄養外胚葉(TE)から 2~4 か所生検する。4 つの TE は、ICM を 12 時方向として胚盤胞を配置したときに、0 時(ICM の裏、図B)、3 時(図C)、6 時(ICM の対側、図D)、9 時(図E)方向からと規定する。採取にあたっては 5~10 細胞を目安とする。

胚の部位による染色体の遺伝学的解析

生検した細胞から抽出した DNA を用いての染色体数・構造解析(次世代シーケンサ)、ミトコンドリアコピー数解析(real time PCR)を行う。部位間で比較し、その結果を部位ごとに比較し染色体異常細胞含有率やミトコンドリアコピー数が部位による傾向、栄養外胚葉のどの部位(図B~E)が ICM(図A)と最も相関が強いのか、を明らかにする。

B. 発生過程で染色体異常細胞の淘汰がどのように起こるかを経時的に評価する

生検後の胚培養

生検後胚を日本で培養が許可されている原始線条が発現するまでもしくは 14 日以内のみ全胚培養を行い、胚の状態を下記のように評価する。

染色体解析結果と細胞株生存期間の比較

培養後生存している細胞株間で、A- での染色体・ミトコンドリア解析結果を比較し、その内容・存在部位・染色体異常細胞含有率と細胞株の生存(培養可能)期間がそのように相関を持つかを評価する。

胚培養中の細胞生検

培養の過程で死んだ細胞と生き残った細胞に対して顕微操作を行ってそれぞれ採取して、その染色体・ミトコンドリアコピー数を解析し細胞の生死による傾向を評価する。

4. 研究成果

27 個の胚の提供をうけ、胚 1 個当たり 1~3 個の培養前・後検体を収集し、合わせて 88 個の DNA サンプルが得られた。生検後体外培養は平均して受精後 12.3 日まで可能であり、研究倫理上最長培養日数である 13 日まで培養できた胚を培養可能胚と定義した。培養前には正常核型胚が 14.8%、モザイク胚が 66.7%、完全異数性胚が 18.5%であったのに対して培養後では、正常核型胚が 58.3%で、モザイク胚が 25.0%、完全異数性胚が 16.7%と、正常核型胚が有意に増加し ($p = 0.002$)、モザイク胚が有意に減少していた ($p = 0.005$)。核型や培養可能日数による mtDNA コピー数との関連は認めなかった。しかし mtDNA 変異数が、培養後に正常核型以外であった胚(モザイク胚 + 異常核型胚)では平均 1.22 個/胚であったのに対して、正常核型であった平均 0.27 個/胚正常核型と優位に変異数が少なかった ($p = 0.01$)。また培養不可能胚では平均 1.14 個/胚であったのに対して、培養可能胚では平均 0.44 個/胚と少ない傾向があった ($p = 0.053$)。mtDNA コピー数は同一胚に由来する検体間で大きな差を認めたが、mtDNA 変異については一致していた。

核型分析の結果、培養前後で核型構成が変化してモザイク胚が減少して正常核型胚が増加した。このことからヒトのモザイク胚においても、マウスで既に報告されているような異常核型細胞を排除する機構が存在する可能性が考えられた。核型に関して詳細な部位による違いは同定されなかったが、mtDNA コピー数は検体間で差があり胚生検で胚全体の mtDNA コピー数の評価が困難であることが判明した。また、核型や培養日数と mtDNA コピー数の間には関係性を見つけることはできなかったが、mtDNA 変異解析によって、正常核型胚と培養可能胚といったいわゆる良好な発生経過が予測される胚では mtDNA 変異数が少ないことが分かった。本研究では詳細な因果関係までは明らかにできていないが、胚発生には mtDNA 変異の数が影響を与えることが示唆される結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ijuin Akifumi, Ueno Hiroe, Hayama Tomonari, Miyai Shunsuke, Miyakoshi Ai, Hamada Haru, Sueyoshi Sumiko, Tochihara Shiori, Saito Marina, Hamanoue Haruka, Takeshima Teppei, Yumura Yasushi, Miyagi Etsuko, Kurahashi Hiroki, Sakakibara Hideya, Murase Mariko	4. 巻 11
2. 論文標題 Mitochondrial DNA mutations can influence the post-implantation development of human mosaic embryos	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1215626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1215626	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akifumi Ijuin
2. 発表標題 Mitochondrial DNA mutations can influence the post-implantation chromosomal purification and development in human embryos.
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomonari Hayama, Akifumi Ijuin, Hiroe Ueno, Haru Hamada, Ai Miyakoshi, Mayuko Nishi, Marina Saito, Haruka Hamanoue, Mitsuru Komeya, Teppei Takeshima, Shinnosuke Kuroda, Hideya Sakakibara, Yasushi Yumura, Etsuko Miyagi, Mariko Murase
2. 発表標題 Purifying selection for aneuploidy cells in mosaicism embryo at post-implantation stage.
3. 学会等名 37th Virtual Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	上野 寛枝 (Hiroe Ueno) (20425713)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・研究員 (22701)	
研究分担者	葉山 智工 (Tomonari Hayama) (70819903)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・講師 (22701)	
研究分担者	村瀬 真理子 (Mariko Murase) (80315796)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授 (22701)	
研究分担者	浜之上 はるか (Haruka Hamanoue) (90573759)	横浜市立大学・附属病院・講師 (22701)	

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