

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09545

研究課題名（和文）均衡型染色体相互転座を有する不育症患者における染色体交互分離の予測因子の探索

研究課題名（英文）Exploration of predictive factors for frequencies of alternate segregation during meiosis of recurrent pregnancy loss patients with reciprocal translocations

研究代表者

佐藤 剛 (Sato, Takeshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・准教授

研究者番号：80326149

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：均衡型染色体相互転座を有する不育症カップルの胚盤胞から採取した栄養外胚葉細胞を検体として、染色体構造異常について解析した。分割期胚と胚盤胞での各染色体分離様式の頻度に違いがあることが判明し、発生が進むに連れ不均衡の程度の強い染色体構造異常を有する胚は、交互分離胚や不均衡の程度の弱い構造異常を有する胚に比較して、淘汰される可能性が高いと考えられた。胚盤胞では、転座保因者の性別や端部着糸型染色体が転座に関わることが、染色体分離様式と関連がある可能性が明らかとなった。交互分離胚の頻度を予測する因子の特定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

均衡型染色体相互転座を有する不育症カップルの胚盤胞での染色体分離様式の頻度（特に交互分離の頻度）とそれに関連する因子についての知見を明らかにし、解析結果を複合的に検討することにより、交互分離の頻度が低くPGT-SRの効果が期待出来る症例の条件を抽出する。それを元に、拳児を望むそれぞれのカップルに対して、推奨すべき妊娠方法（自然妊娠あるいはPGT-SR）の選択についての有益な情報を提供することが可能となる。それにより、均衡型染色体相互転座を有する不育症カップルが流産を繰り返すことなく生児を獲得することに寄与し、ひいては少子化対策にも繋がることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Chromosome structural rearrangements were examined using trophectoderm cells obtained from blastocysts of couples with recurrent pregnancy loss due to reciprocal translocation. It was found that the frequencies of each chromosome segregation pattern differed between cleavage-stage embryos and blastocysts. Embryos with structurally abnormal chromosomes, exhibiting a high degree of imbalances, were considered more likely to be eliminated as development progressed compared to embryos with alternate segregation or weaker degrees of imbalances. In blastocysts, the sex of the translocation carrier and the involvement of acrocentric chromosomes in translocations were found to be possibly related to the mode of chromosome segregation. However, specific factors predicting the frequency of embryos derived from alternate segregation were not identified.

研究分野：生殖内分泌、生殖生理、不妊症、不育症

キーワード：均衡型染色体相互転座 染色体分離様式 流産 不育症 PGT-SR 分割期胚 胚盤胞

## 1. 研究開始当初の背景

均衡型染色体相互転座では、配偶子形成時の減数分裂において、転座に関わる2種類の染色体の相同染色体4本が対合して四価染色体を形成し、一部の遺伝子の組換えを行った後分離が起こる。この分離様式には、交互分離、隣接型分離、隣接型分離、3:1分離、4:0分離があるが、交互分離以外のものは不均衡分離であり、形成された配偶子の染色体構成は不均衡となる。カップルのどちらかが均衡型染色体相互転座を有する場合、胚の半数以上は染色体構成が不均衡となり、殆どは着床しないか妊娠成立しても流産に終わることとなる。

このようなカップルに対しては、転座そのものの治療はできないが、流産を予防する目的で、体外受精で得られた胚の一部の細胞を用いて染色体の状態を解析する着床前胚染色体構造検査 (preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangements: PGT-SR) が対処法の選択肢の1つとなる。PGT-SRは、1998年より臨床応用されており、わが国では日本産科婦人科学会発表の「『着床前診断』に関する見解」に則り、同学会より認可を受けた施設において限定的に施行されている(2020年当時)。PGT-SRは欧米を中心に広く普及してきているが、申請者らは、世界で初めてPGT-SR実施群と非実施群を比較する研究を行い、両群で累積生児獲得率や生児獲得までの期間に差がないことを明らかにした。この研究は、現在でも唯一の比較研究であるため、欧州ヒト生殖医学会 (European Society of Human Reproduction and Embryology; ESHRE)が発表した不育症に関するガイドラインにおいてもこれを引用し、「PGT-SRに関するエビデンスは限られており明らかな効果は示されていない」としている。

PGT-SRでは、解析結果よりその胚の受精前の配偶子形成時の染色体分離様式も特定が可能である。染色体分離様式に影響を与える因子についてはこれまでいくつかの報告があるが、妊娠方法の選択に有用と考えられる、生児獲得に繋がる交互分離の頻度を予測する方法はない。申請者らは、日本で着床前胚遺伝学的検査 (PGT) が始まった当初から PGT-SR を実施して症例を蓄積してきており (図1)、これまで施行した分割期胚での PGT-SR の結果より、配偶子形成時の染色体分離様式の頻度とそれに影響を及ぼす因子についても検討してきた。その結果、現在までに以下の知見が得られている。

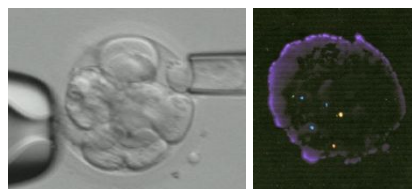


図1 <分割期胚生検、FISH法でのPGT-SR結果>  
(自施設データ)

- 保因者の性別・年齢、転座部分のサイズ、減数分裂における四価染色体の形態は、交互分離の頻度に影響を与えなかった。
- 女性が転座保因者の場合、男性が保因者である場合より、3:1分離の頻度が有意に高かった。
- 転座染色体の着糸点による分類、転座切断点、転座部分のサイズ等、さまざまな指標を用いて分離様式の頻度に違いがないかを模索したところ、両転座部分のサイズが切断点を有する各腕のサイズの50%未満の場合、それ以外の場合に比し、隣接型分離の頻度が有意に高いことを見出した。

不均衡型の染色体構成を有する胚のうち、転座部分のサイズが大きいものや、3:1分離や4:0分離などに由来する不均衡の程度が強いものは、胚盤胞まで発生するあいだに淘汰される可能性があり、分割期胚と胚盤胞期での解析では、各染色体分離様式の頻度が異なることが推測される。また、より着床期に近い胚盤胞期での頻度の方が、生理的な状態に近いと考えられ、着床・妊娠成立、流産との関連もより強く表れることが推測される。

前述の通り、申請者らの検討では、PGT-SRにより正常核型あるいは均衡型と診断された胚を移植した場合は、妊娠後の流産率は低下できるが、症例あたりの生児獲得率や生児獲得までの期間は自然妊娠と比較して改善されなかった。このような状況において、申請者は、どのような症例において PGT-SR を施行すべきか適用基準の必要性を感じていた。染色体分離様式に関連する諸因子を複合的に解析し、より交互分離の頻度が高い条件の組み合わせ、より不均衡分離の頻度が高い条件の組み合わせを導きだせれば、どのような症例に対して PGT-SR をすべきかの判断が可能となる。そこで、これまでの我々の分割期胚での知見を元に、分割期胚より着床に近い段階である胚盤胞での解析を行うことに着目し、上記関連についての研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえ、これまでの申請者らの研究で得られた分割期胚での知見を元に、本研究では均衡型染色体相互転座を有する不育症カップルの胚盤胞での染色体分離様式の頻度（特に交互分離の頻度）とそれに関連する因子についての検討を行う。

そして、それらの結果より、各分離様式の頻度の分割期胚での解析結果との違いの有無、その内容を分析する。また、解析結果を複合的に検討することにより、交互分離の頻度が低く PGT-SR の効果が期待出来る症例の条件を抽出し、拳児を望むそれぞれのカップルに対して、推奨すべき妊娠方法（自然妊娠 あるいは PGT-SR）の選択についての有益な情報を提供することにより、生児獲得に寄与することを目的とする。

## 3. 研究の方法

1) 対象：均衡型染色体相互転座を有する不育症夫婦

2) 方法 1：各カップルより以下の情報を収集する

保因者性別

保因者年齢

転座染色体の着糸点による分類

転座部分のサイズ

転座部分の転座切断点が存在する腕のサイズに対する割合

四価染色体の形態

3) 方法 2：PGT-SR 施行

調節卵巣刺激、経膈採卵施行

得られた卵子に対し、卵細胞質内精子注入法（ICSI）施行し受精を試みる

受精卵を培養し、胚盤胞まで発生したものより、マイクロマニピュレータを用いて栄養外胚葉細胞（TE）を 5-10 個生検(図 2)

採取した栄養外胚葉から抽出した DNA を用いて全ゲノム増幅を施行

増加された DNA を検体として次世代シーケンサーにより染色体構成の解析施行

( Ion ReproSeq PGS Kit 使用 ) ( 図 2 )

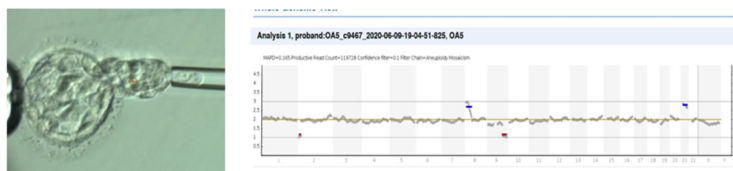


図 2 <胚盤胞生検、NGS での PGT-SR 結果> ( 自施設データ )

PGT-SR 解析結果より、配偶子時点での染色体分離様式を特定する

4) 検討項目

各症例の染色体分離様式と、2)で得られた因子との関連について検討する。

5) 上記実験結果より諸因子を複合的に解析し、より交互分離の頻度が高い条件の組合せ、より不均衡分離の頻度が高い条件の組合せを導き出し、生児獲得率を高めるために PGT-SR をすべきかどうかの適用基準の設定をめざす。

#### 4. 研究成果

##### 1) 胚盤胞での各染色体分離様式の頻度と分割期胚での頻度との比較

どちらかのパートナーが均衡型染色体相互転座を有するカップル 13 組から得られた胚盤胞 146 個に対して、PGT-SR を施行した。解析結果から特定した、それぞれの胚盤胞の受精前の染色体相互転座保因者の配偶子における各染色体分離様式の頻度は、交互分離 48.7%、隣接型分離 31.1%、隣接型分離 9.2%、3:1 分離 10.9%であった (表 1)。

これらの結果と、当施設でこれまでに行った分割期胚 391 個における結果との比較では、交互分離と隣接型分離の頻度は、胚盤胞期での解析の方が有意に高く ( $p < 0.01$ )、3:1 分離の頻度は、胚盤胞期での解析の方が有意に低かった ( $p < 0.01$ ) (表 1)。

上記結果より、不均衡の程度の強い染色体構造異常を有する胚は、正常あるいは均衡型や不均衡の程度の弱い構造異常を有する胚に比較して、分割期胚から胚盤胞へ発生する段階で淘汰される可能性が高いことが推測された。

解析対象	症例数	解析対象胚数	交互分離	隣接 I 型分離	隣接 II 型分離	3:1 分離	4:0 分離
分割期胚	18	391	87(26.1%)	62(18.6%)	25(7.5%)	123(36.9%)	7(2.1%)
胚盤胞	13	146	58(48.7%)	37(31.1%)	11(9.2%)	13(10.9%)	0(0%)

##### 2) 胚盤胞期での各因子の染色体分離様式への影響

###### 保因者性別

保因者性別での比較 (男性保因者 5 症例 vs. 女性保因者 8 症例) では、交互分離 42.5 vs. 51.9%、隣接型分離 40.0 vs. 26.6%、隣接型分離 12.5 vs. 7.6%であり、それらの分離様式の頻度に差はみられなかった。3:1 分離は 5.0 vs. 13.9%と女性が保因者の場合、高率となる傾向が認められた (表 2)。

保因者性別	症例数	解析対象胚数	交互分離	隣接 I 型分離	隣接 II 型分離	3:1 分離	4:0 分離
男性	5	50	17(42.5%)	16(40.0%)	5(12.5%)	2(5.0%)	0(0%)
女性	8	96	41(51.9%)	21(26.6%)	6(7.6%)	11(13.9%)	0(0%)

###### 保因者年齢

採卵時あるいは採精時における保因者年齢と、各染色体分離様式の頻度には、関連は認められなかった。

###### 転座染色体の着糸点による分類

転座染色体の着糸点による分類と交互分離胚の割合との関連は認められなかった。

転座染色体のどちらかに端部着糸型染色体が含まれる場合(A(+))、それ以外の場合(A(-))に比較し 3:1 分離の頻度が高い傾向が認められた (表 3)。

保因者性別	症例数	解析対象胚数	交互分離	隣接 I 型分離	隣接 II 型分離	3:1 分離	4:0 分離
A(+)	4	51	20(48.8%)	12(29.3%)	1(2.4%)	8(19.5%)	0(0%)
A(-)	9	95	38(48.7%)	25(32.1%)	10(12.8%)	5(6.4%)	0(0%)

### 転座部分のサイズ

転座に関わる染色体における、転座部分のサイズと、各染色体分離様式の頻度には、関連は認められなかった。

### 転座部分の転座切断点が存在する腕のサイズに対する割合

転座に関わる染色体における、転座部分の転座切断点の存在する腕に占める割合と、各染色体分離様式の頻度には、関連は認められなかった。

### 四価染色体の形態

減数分裂時に形成される四価染色体の形態と、各染色体分離様式の頻度には、関連は認められなかった。

## 3) 考察

今回の研究により、分割期胚と胚盤胞での各染色体分離様式の頻度に違いがあることが判明し、発生が進むに連れ不均衡の程度の強い染色体構造異常を有する胚は、交互分離胚(正常あるいは均衡型)や不均衡の程度の弱い構造異常を有する胚に比較して、淘汰される可能性が高いと考えられた。その理由として、分割期胚から胚盤胞へ発生する時期に胚性ゲノムの活性化が開始することも一因であることが推測される。

そのため、胚盤胞では症例間での各染色体分離様式の頻度の均霏化、均質化が起こっており、配偶子の時点での染色体分離様式の違いが分割期胚ほど反映されていないと考えられる。

われわれのこれまでの研究により、分割期胚では、以下の知見が得られている。

- 女性が転座保因者の場合、男性が保因者である場合より、3:1 分離の頻度が有意に高い。
- 両転座部分のサイズが切断点を有する各腕のサイズの 50%未満の場合、それ以外の場合に比し、隣接型分離の頻度が有意に高い。

本研究において、胚盤胞では、

- 女性が保因者の場合 3:1 分離の頻度が高い傾向が認められる
- 転座染色体のどちらかに端部着糸型染色体が含まれる場合、それ以外の場合に比較し 3:1 分離の頻度が高い傾向が認められる

という結果が得られたが、有意な差には至らなかった。その理由として、上述の不均衡の程度の強い染色体構造異常を有する胚の淘汰が関わっていると考えられ、差が小さくなり検出が困難となることは自然な帰結とも言える。

胚の染色体構成を解析する時期については、臨床的には異常胚が淘汰されてから解析できる(解析対象が減らせる)胚盤胞での解析が望ましいと言えるが、分割期胚の方がその症例の本来の染色体分離様式に近い状態での解析が可能と考えられる。しかし、受精や初期分割の段階で、不均衡の程度が大きな分離様式(4:0分離など)の配偶子や胚は淘汰されることも推測されるため、分割期胚の時点でも正確な分離様式の割合は分からず、配偶子(精子、卵子)の段階で解析するのが理想であるが、臨床的には困難である。

本研究のこれまでの経過では、交互分離胚の頻度を予測する因子の特定には至らなかった。今後、更に研究を進め、症例及びデータを蓄積、増加し、また、新たな因子も探索することにより、交互分離胚の頻度を予測する因子の特定を目指す予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mayumi Sugiura-Ogasawara, Takeshi Sato	4. 巻 28
2. 論文標題 The uncertain science of preimplantation genetic testing in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 1732-1733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41591-022-01920-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐藤 剛	4. 巻 52
2. 論文標題 「生殖補助医療の進歩と周産期医療」 [生殖補助医療(ART)の立場から] 「PGT-Aの現状と今後の展望」 「エビデンスからみたPGT-Aの有用性」	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 329-334
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sawada Yuki, Sato Takeshi, Nagaya Masashi, Saito Chieko, Yoshihara Hiroyuki, Banno Chihiro, Matsumoto Yosuke, Matsuda Yukino, Yoshikai Kaori, Sawada Tomio, Ukita Norimichi, Sugiura-Ogasawara Mayumi	4. 巻 43
2. 論文標題 Evaluation of artificial intelligence using time-lapse images of IVF embryos to predict live birth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive BioMedicine Online	6. 最初と最後の頁 843 ~ 852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rbmo.2021.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐藤 剛	4. 巻 75
2. 論文標題 生殖医療の基礎知識アップデート 患者説明に役立つ最新エビデンス・最新データ [生殖補助医療] 「PGT-Aの現状」	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 134 ~ 143
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 佐藤 剛	4. 巻 52
2. 論文標題 生殖補助医療の進歩と周産期医療 [生殖補助医療(ART)の立場から]「PGT-Aの現状と今後の展望」「エビデンスからみたPGT-Aの有用性」	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 329～334
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 佐藤 剛	4. 巻 152
2. 論文標題 生涯教育シリーズ104 『遺伝を考える』分割期胚、FISH	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 52～53
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 剛
2. 発表標題 特別講演 「ヒト着床前胚の遺伝学的情報の解析」
3. 学会等名 第74回名古屋市立大学医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 剛
2. 発表標題 不育症におけるPGT-SR、PGT-Aの有用性
3. 学会等名 第4回日本不育症学会認定講習会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 剛
2. 発表標題 生涯研修プログラム10「不育症」2) 着床前遺伝学的検査 (PGT-SR/A) の現状
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 剛
2. 発表標題 着床前胚染色体異数性検査 (PGT-A) の現状と課題
3. 学会等名 岐阜県医師会母体保護法指定医講習会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 剛、岩城 豊、吉原紘行、伴野千尋、澤田祐季、松本洋介、杉浦真弓
2. 発表標題 均衡型染色体相互転座を有する不育症夫婦の配偶子形成時減数分裂における各染色体分離様式の頻度と影響を受ける因子
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 剛、小澤史子、齋藤知恵子、岩城 豊、吉原紘行、伴野千尋、澤田祐季、松本洋介、杉浦真弓
2. 発表標題 シンポジウム9 着床前診断 2. 着床前胚染色体構造検査
3. 学会等名 日本人類遺伝学会大66大会 第28回日本遺伝子診療学会大会 合同開催 (招待講演)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 佐藤 剛、岩城 豊、吉原紘行、伴野千尋、澤田祐季、松本洋介、杉浦真弓
2. 発表標題 均衡型染色体相互転座を有する不育症夫婦の配偶子形成時減数分裂における各染色体分離様式の頻度と影響を受ける因子
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 剛
2. 発表標題 生涯研修プログラム10「不育症」2) 着床前遺伝学的検査 (PGT-SR/A) の現状
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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