

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10391

研究課題名（和文）凍結胚移植法によるART出生児の神経行動学的発達に及ぼす影響についての実証的研究

研究課題名（英文）An Empirical Study of the Effects of the Frozen Embryo Transfer Method on the Neurobehavioral Development of ART Births

研究代表者

宮内 尚子 (miyauchi, 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：年々普及する生殖補助医療（ART）では、凍結胚移植法（FET）が主流で、その出生児には、自閉症などの神経行動学的発達障害を引き起こす可能性が高いと報告されている。本研究では、大規模前向きコホート調査のデータを活用し、FET出生児の徹底的な縦断的観察研究を実施。次に、FET出生児の胎盤組織を用い、発達や精神行動に影響を及ぼす影響についてエピゲノム解析を行い、遺伝的安全性の評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はエピゲノム解析と疫学調査を組み合わせた独自の発想に基づく研究計画であり、その成果は科学・医学領域のみならず、社会や政策にも影響を及ぼすものとなる。また、GI遺伝子の発現量の変化は、出生児の体格や性差にも影響を及ぼし、その制御機構の破綻は、先天性疾患に限らず、乳幼児の発達、小児期の行動異常にも影響を及ぼすことも知られている。今回の解析では、FET法に対して感受性の高いゲノムインプリンティング（GI）遺伝子領域を明らかにしFET操作と行動異常との関連について科学的な検証を行った。FET法の安全性とリスクを詳細に検証することで、次世代の健康社会をデザインする重要な知見となり得ると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Recently, the number of the patients with assisted reproductive technology (ART) has increased in our country. Frozen embryo transfer (FET) has become a main method. It has been pointed out that children born with FET techniques are more likely to develop neurobehavioral developmental disorders such as autism. This study utilized data from a large prospective cohort study to conduct a thorough longitudinal observational study of the birth status and physical and neurobehavioral development of FET-derived offspring in light of their growth. Next, we performed epigenetic analyses using highly purified placental cells from the postnatal placentas of FET offspring to assess their genetic safety supported by scientific evidence and to examine the risk factors.

研究分野：分子生物学

キーワード：凍結胚移植 不妊治療 胎盤 低分子RNA (miRNA)

1. 研究開始当初の背景

最近我が国の生殖補助医療 (ART) 由来出生児は、年間 5 万人を超え、その約 70% は凍結胚技術 (FET) が利用されている (日本産婦人科学会集計 2019)。この FET 法は、一般にグレードの高い胚を利用するため、新鮮胚移植法と比較して妊娠率は高い。しかし一方で、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リスクとの関連性も示されている (Ishihara O et al. Fertil Steril 2014 他)。また、米国では自閉症や多動性障害の発症リスクが高いこと (約 2-4 倍) も報告されている (Bearman P et al. APHA 2015 他)。しかしながら、これらの報告は、いずれもサンプルサイズが小さく、十分な数の対照群 (自然妊娠) が設定されていないため、正確な評価がなされているとは言えない。また、我が国では FET 出生児の身体的・神経行動学的発達 (自閉症・注意欠如・多動性障害等) については、これまで詳細な調査がなされていない。したがって、FET 法の安全性について実態把握が急務であり、その対応は次世代社会のための重要課題の一つである。

これまで申請者らは、大規模な全国前向きコホート調査 (10 万人の子どもの健康調査) のデータを活用し、自然妊娠群と比較し、FET 群では、1) 男児の出生が多いこと、2) 一卵性双胎の発症頻度が高いこと等を報告してきた。また、胎盤組織より高純度に精製した胎盤細胞を分離する方法を確立させ、低分子 RNA (miRNA) について、解析を行った実績がある。miRNA は、21~25 塩基の低分子 RNA で、標的 RNA に結合し、分解またはその翻訳抑制を行うエピゲノム修飾の一つで、出生児の健康を評価することができる。

2. 研究の目的

本研究では、FET 法が、小児の健康、特に精神行動学的発達に、どのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とする。そのため、エコチル調査のデータを活用し、FET 出生児の基本属性を基に、出生後の身体的発育、精神神経学的な発達に関する縦断的な観察研究を行う。また、FET 出生児の胎盤細胞を用いた神経行動発達に關与する主にインプリンティング遺伝子のエピゲノム解析 (miRNA 含む) を行い、疫学とエピゲノムの両面より、遺伝的安全性とリスクの評価を行う。

3. 研究の方法

(1) FET 治療と自閉症、自閉症スペクトラム障害の関連性について

ART 群 (IVF, ICSI) (3,032 名)、非 ART 群 (人工授精、排卵誘発) (4,198 名)、自然妊娠群 (約 90,000 名) の 3 群に分類した。また、ART に関する情報が明確でない方 (6,094 名) は、除外した。ASD の評価には、国際統計的疾患および健康問題分類第 10 版 (ICD-10) の自己式質問票を用いて診断、基本属性に加え、Kessler 6 scale (K6)、8-Item Short-Form Health Survey (SF-8)、Medical Outcomes Study (MOS8) 等を実施した。また、妊娠中および出産における疾患、新生児の健康状況は、医療記録から収集した。

(2) FET 由来出生児の胎盤細胞を用いたエピゲノム変異の解析

満期胎盤組織より、消化酵素を用い、胎盤構成細胞を分離、精製した。次に、神経行動学的に影響を及ぼす GI 遺伝子の発現を調節するエピゲノム (DNA メチル化、miRNA) について、自然妊娠の胎盤細胞と比較した。有意な変化を認めた場合、遺伝子予測プログラム (G0 解析) を用い、リスク要因となるかどうか検討を行った。

(3) FET法の遺伝的安全性とリスク評価と総括

FET 出生児の胎盤について、有意差を認める GI 遺伝子の DNA メチル化と miRNA のターゲット遺伝子を予測し、ASD などの疾患発症のリスク要因となるかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) FET 治療と自閉症、自閉症スペクトラム障害の関連性について

ART と ASD の関連のある共変量を明らかにし、多変量ロジスティック回帰分析を行った。その結果、全体としては ART と ASD との関連は認められなかった (OR 1.13, 95%CI 0.93-1.33)。しかし、ART を受けた母親の年齢を 35 歳以上と 35 歳以下に分けた場合、35 歳未満の ART は ASD のリスク増加に有意な関連を認めた (adjusted OR 2.43, 95%CI 1.19-4.98)。反対に、35 歳以上の場合は、有意差を認めなかった。35 歳未満の母親と 35 歳以上の母親の生活習慣の違いについて検討すると、35 歳未満の場合、比較的健康水準が低く、経済力も低い傾向にあった。また、受動喫煙を含む喫煙の影響も大きく受けていることも判明した。これまで ASD のリスク因子として、母親の肥満、糖尿病、帝王切開、抗うつ剤の使用などの報告はあるが、今回の調査では ART 自体への影響は確認できなかった。しかし、根本的な理由は明らかではないが、ART を受けた 35 歳未満の母親の特徴として、母体の体調不良や社会経済的環境の悪化の可能性がある。そのため今後も、児の成長や発達について継続して調査を行う必要があると考える。

(2) FET 出生児の胎盤組織を用いたエピゲノム変異の解析

胎盤組織の細胞分離：

満期胎盤組織より高純度で細胞性栄養膜 (CT) 細胞を精製 (95%以上) した (図 1)。

低分子 RNA (miRNA) の解析：

胎盤発生やメチル化制御に関わる miRNA の発現量について比較検討し、RT-qPCR 法にて解析した。FET 出生児の満期胎盤のエピゲノム特性と ASD や AD/HD に関する遺伝子との関連性について評価した。

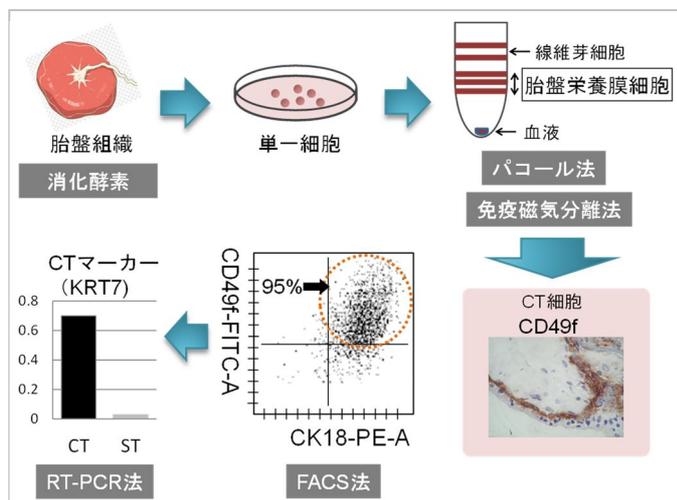


図 1 胎盤絨毛より CT 細胞を分離・精製

CT細胞は95%純度、 10^7 個以上を単離。FACS及びRT-PCR法で確認した。CT:細胞性栄養膜細胞

その結果、精神発達と密接な関係を示す低分子 RNA では、miR-134-5P、miR-30d-5P、miR-221-3p の 3 種類の遺伝子が FET 胎盤で有意な変異を認めた (図 2)。

(3) FET 法の遺伝的安全性とリスク評価と総括

FET 由来の胎盤構成細胞を用いて、自閉症関連遺伝子 (35 遺伝子) (Schepici G et al. Brain Science 2019) の発現について解析した。その結果、著しく活性が低下する遺伝子 (5 種類) 、活性が上昇する遺伝子 (11 種類) を確認した。この結果より FET に由来する胎盤細胞と自閉症発症との関連性が示された。直接的な証拠ではないため、引き続き縦断的な調査研究が必要であると示唆された。

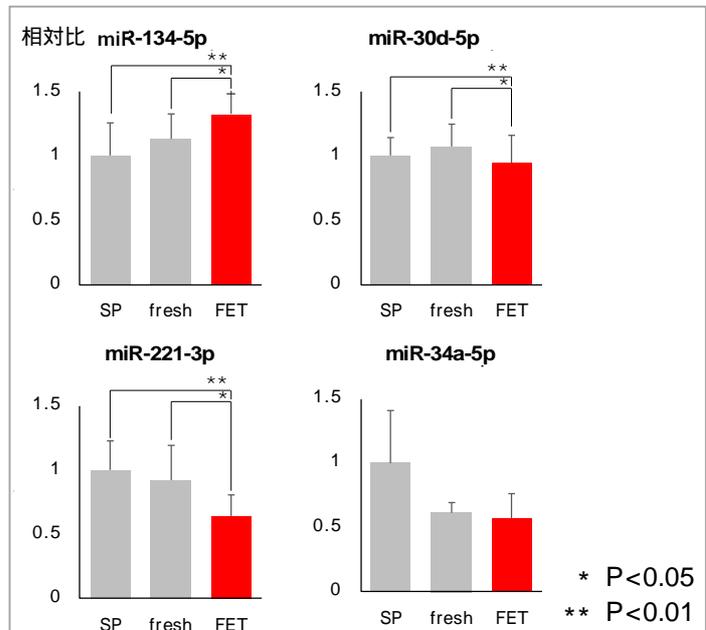


図 2 精神神経発達に関する miRNA
4 つの miRNA のうち、3 つで発現量に有意差を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 濱田裕貴, 宮内尚子, 有馬隆博.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 臨床婦人科産科	

1. 著者名 大池 輝, 小林 枝里, 小林 記緒, 柴田 峻, 岡江 寛明, 北村 茜, 宮内 尚子, 有馬 隆博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館 / ニューサイエンス社	5. 総ページ数 5
3. 書名 ヒトTS細胞を用いた胎盤疾患モデルの構築	

〔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	小林 記緒 (kobayashi norio) (10803885)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究 分担者	小林 枝里 (kobayashi eri) (70634971)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

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