

学 位 論 文 の 要 旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 産科婦人科学分野	氏 名	もりした みどり 森下 みどり
<p>主論文の題名</p> <p>Conditions for improved accuracy of noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy : Focusing on the zona pellucida and early blastocysts</p> <p>主論文の要旨</p> <p>【目的】</p> <p>ヒト胚の染色体異常率は20～80%と高く、特に女性の年齢と厳密に関連しており、着床不全や流産の主な原因となっている。これらの問題を克服する手段の一つとして、体外受精(IVF)では異数性着床前遺伝学的検査(PGT-A)が実施されている。PGT-Aは胚の栄養外胚葉(TE)細胞の一部を生検し、その染色体異常を検出する手法であり、高齢患者において胚移植当たりの妊娠率を改善し、流産率を低下させることが報告されている。しかし、TE生検は胚への侵襲性が高く、胚の生存率やその後の発育に悪影響を与える可能性があり、より侵襲性の低い検査法が望まれている。1948年にヒト血液中に無細胞DNA(cfDNA)が存在することが発見され、2013年にはヒト胚の使用済み培養液(SCM)中に胚由来のcfDNAが存在することが報告された。2016年には、SCMを用いた次世代シーケンサー(NGS)による非侵襲的PGT-A(niPGT-A)が報告された。しかしながら、TE生検に比べて一致率が低く、臨床応用のためにはSCM生検や培養技術の更なる最適化が必要とされている。本研究では、niPGT-Aの最適化を目的に、胚盤胞(BL)の培養時間や透明帯の有無が一致率に与える影響を評価し、臨床応用を前提として初期BL(BL2)でも解析可能かを検証した。</p> <p>【方法】</p> <p>2022年12月までにみのうらレディースクリニックおよび三重大学医学部附属病院でIVFを受けた24名の患者の同意のもと、廃棄されたBLを35個使用した。BLを融解し、BLが収縮している間にTE生検のためレーザーによる孵化補助術を施行し、37℃、5%CO₂、6%O₂のタイムラプス条件下で個別に培養した。5個の5日目のBL(d5-BL)を8時間、16時間、24時間培養後、SCMを生検した(SCM群)。続いてBLのTE細胞を生検し(TE群)、TE生検後の胚について透明帯(ZP)を機械的に除去し</p>			

て採取した(WE 群)。また、ZP を含まない 5 日目の BL(ZP free; ZF) は、融解直後に酸性タイロート溶液で ZP を除去した後に 24 時間培養して同様に 3 パターンの生検を行った。4 日目の BL2(d4-BL2)についても 24 時間培養し、同様に 3 パターンの生検を行った。各サンプルを Igenomix 社に移送して NGS 解析を実施した。主要評価項目として、WE、SCM、TE 群間の核型一致率を分析し、副次評価項目として収縮回数を分析した。

【結果】

35 個の BL に対して実施した核型解析において、患者の平均年齢は 36.9 ± 2.9 歳であった。16 時間および 24 時間の SCM は全例で解析に成功し、一方で 8 時間は 60% (3/5) の症例で成功した。また、WE と SCM の一致率は、8 時間で 20% (1/5)、16 時間で 60% (3/5)、24 時間で 100% (5/5) となり、8 時間と 24 時間の間に有意差が認められた。収縮回数については、それぞれ 0.8 ± 1.1 回、 3.0 ± 0.9 回、 4.4 ± 1.3 回であり、8 時間と 24 時間の間に有意差が認められたことから、培養時間は 24 時間が最適であることが判明した。次に 24 時間培養での ZP の有無が一致率に与える影響を評価した結果、ZF では 1 例が解析不成功であったが一致率は 50.0% (5/10) と ZP ありとの間に有意差は認められなかったが低下傾向があった。最後に d4-BL2 においても 24 時間培養後に同様の解析を実施したところ 40.0% (4/10) と d5-BL との間に有意差が認められ一致率は低下していた。しかしながら 4 例が解析不成功であり、不成功症例を除いた場合に一致率は 66.7% (4/6) となり有意差は認められないが低下傾向にあった。また収縮回数については ZF と d4-BL2 で共に有意差は認められなかった。

【結論】

本研究では niPGT-A の臨床応用に向けて培養条件の最適化を検討した。その結果、少なくとも niPGT-A には 24 時間の培養が必要であることが確認された。ZP による影響を調べるため、ZP の有無による SCM の一致率を比較した結果、ZF の SCM では一致率が低下する傾向が確認されたことから、ZP は niPGT-A の精度向上に重要であることが示された。d4-BL2s で 24 時間培養した SCM を用いた niPGT-A では、SCM の一致率は低率であり、さらなる条件の最適化が必要であった。その原因として cfDNA の発達に重要な役割を果たすアポトーシスが低頻度であったため、cfDNA が不足し一致率が低下した可能性がある。また本研究ではサンプルサイズが小さいことが結果に影響した可能性もあり、今後検体数を増やして最適化される必要がある。