

| | |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | 設楽 明宏 (秋田県) |
| 専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 医博甲第 1044 号 |
| 学位授与の日付 | 令和 3 年 3 月 22 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研究科・専攻 | 医学系研究科医学専攻 |
| 学位論文題名 | Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophectoderm biopsy (使用済み培養液中の cell free DNA は、TE 生検と比較して長期培養後胚の chromosomal status をよく反映している) |
| 論文審査委員 | (主査) 高橋 勉 教授 (副査) 久場 敬司 教授 板東 良雄 教授 |

学位論文内容要旨

論文題目 **Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophoctoderm biopsy**

(論文題目の和訳) 使用済み培養液中の cell free DNA は、TE 生検と比較して長期培養後胚の chromosomal status をよく反映している

申請者氏名 設楽 明宏

研究目的

高度生殖医療において Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) は胚選択における客観的情報をもたらすものとして期待されており、着床率の向上や流産率の低下が報告されている。一般的な PGT-A の方法では、胚盤胞期の栄養外胚葉細胞 (trophoectoderm: TE) から 5 個程度の細胞を生検し核型解析を行う。しかし、TE 生検の結果が胚そのものの核型を表現しているとは言い難い。さらには TE 生検による胚への侵襲が懸念されている。TE 生検にうって変わる PGT-A の手法として、使用済みの培養液中の cell free DNA を解析する非侵襲性着床前診断 (non-invasive PGT-A: niPGT-A) が提唱されているが、その運用は定まっていない。

近年確立された胚培養システムにより、in vitro で最大 14 日間までの胚長期培養が可能になった。我々はこの胚長期培養プロトコルを使用し、TE 生検並びに使用済み培養液が、受精後最大 10 日の胚染色体をどれほど反映しているかを検討する実験を行なった。

研究方法

本研究は 2006 年から 2016 年の間に秋田大学病院で 12 人の不妊患者から回収された 20 の余剰胚を、秋田大学及び日本産婦人科学会の倫理委員会の承認と患者から個別同意を得た上で使用した。胚凍結時の平均患者年齢は 35.6±3.2 年で、平均採卵回数 1.6±0.9 回であった。20 個の胚は 5 日目もしくは 6 日目で凍結されていたものを Cryotop Safety Kit (Kitazato, Japan) を使用して融解した。融解した胚は Sequential Blast™ medium (ORIGIO, Denmark) で回復培養を行ったのち、酸性タイロード (Kitazato, Japan) にて透明帯を除去した。透明帯除去後に 6dpf (days post-fertilization) で TE 生検を行い、PGT-A サンプルとした。回復培養に用いた使用済培養液を niPGT-A サンプルとして回収した。TE 生検後に IVC medium (Cell

Guidance Systems, Cambridge) にて、in vitro で最大 10dpf まで培養した。長期培養後の outgrowth をサンプリングし、それぞれ次世代シーケンシングによる染色体分析を行った。

研究成績

胚盤胞よりそれぞれ TE 生検細胞 = PGT-A サンプル (n=20)、使用済み培養液 = niPGT-A サンプル (n=20)、長期培養後胚 = outgrowth サンプル (n=20) が得られ、NGS での解析を行った。niPGT-A サンプルと outgrowth サンプルの一致率は 9/16 (56.3%) で、PGT-A サンプルと outgrowth サンプルの一致率は 7/16 (43.8%) であった。Outgrowth サンプルに対して niPGT-A は感度 100%、特異度 87.5%、陽性的中率 88.9%、陰性性的中率 100%、偽陽性率 12.5%、偽陰性率 0% であった。同じく PGT-A は感度 87.5%、特異度 77.8%、陽性的中率 87.5%、陰性的中率 75%、偽陽性率 14.3%、偽陰性率 22.2% であった。

結論

この研究は、長期培養胚と PGT-A/niPGT-A の関係について評価した最初の研究である。本研究の結果は、染色体結果の一致率、感度、特異度、偽陰性率から niPGT-A が PGT-A よりも優れている可能性があることを示唆している。培養中の胚では、内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) と TE の両方がアポトーシスを起こし、使用済み培養液の DNA はこれらの細胞系統の両方に由来している可能性がある。また過去の報告で ICM と TE から、異数性・正倍数性細胞の両方がアポトーシスを起こし、TE 細胞と比較して高い割合の ICM 細胞がアポトーシスを起こすことを示している。使用済み培養液の cell free DNA は ICM と TE の両方由来の DNA を反映するため、TE 生検よりも胚盤胞全体の染色体状態を表しているという仮定を裏付けている。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：高橋 勉

申請者：設楽 明宏

論文題名：Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophoctoderm biopsy（論文題目の和訳）使用済み培養液中の cell free DNA は、TE 生検と比較して長期培養後胚の chromosomal status をよく反映している

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、高度生殖医療における胚選択 preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) における課題である trophoctoderm (TE) 生検による胚への侵襲を回避できる新たな非侵襲性着床前診断 (non-invasive PRG-A: niPGT-A) として、胚培養における使用済みの培養液中 cell free DNA を解析する方法の可能性を研究した。1) PGT-A サンプル、2) niPGT-A サンプル、3) 長期培養胚サンプル、について次世代シーケンサー (next generation sequencer: NGS) により解析検討して、染色体結果の一致率、感度、特異度、偽陰性率から niPGT-A が PGT-A よりも優れている可能性があることを示唆する結果を示した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

本研究では近年確立された胚培養システムにより可能となった胚長期培養を用いて、TE 生検並びに使用済み培地が、受精後最大 10 日の胚染色体をどれほど反映しているか NGS を用いて検討した点が斬新である。その結果、niPGT-A サンプルと長期培養後胚サンプル

の一致率は 56.3%、PGT-A サンプルと長期培養後胚の一致率は 43.8%であった。そして、長期培養後胚サンプルに対して niPGT-A は感度 100%、特異度 87.5%、陽性的中率 88.9%、陰性的中率 100%、偽陽性率 12.5%、偽陰性率 0%であった。同じく PGT-A は感度 87.5%、特異度 77.8%、陽性的中率 87.5%、陰性的中率 75%、偽陽性率 14.3%、偽陰性率 22.2%との結果を得た。

2) 重要性

高度生殖医療における胚選択における客観的情報を胚への侵襲を除外できる新たな検査方法に関する検討を、最近の胚培養システムと NGS を用いて行っており、今後の生殖医療に関わる内容であり重要である。

3) 研究方法の正確性

本研究は適切な対象数を用いて行われており、研究方法も正確に実施され、詳細な統計学的な検討も加えており、客観的な評価法で、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

新たな niPGT-A として、胚培養における使用済みの培養液中 cell free DNA を解析する検査の可能性を検討するための研究目的、方法、研究結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。