

氏名	小林 充		
学位 (専攻分野の名称)	博士 (畜産学)		
学位記番号	甲 第 837 号		
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 21 日		
学位論文題目	<b>培地中の細胞外ミトコンドリア DNA を用いた胚盤胞期胚の非侵襲的評価</b>		
論文審査委員	主査 教授・農学博士	野村 こう	
	教授・博士 (農学)	岩田 尚孝	
	教授・博士 (畜産学)	桑山 岳人	
	教授・博士 (農学)	白砂 孔明	
		博士 (農学) 橋本 周*	
		博士 (農学) 塚本 智史**	

### 論文内容の要旨

ヒト生殖補助医療は、世界的に一般的かつ周知の医療となりつつある。

卵巣刺激法による過排卵処理の普及や培養技術の向上により、患者は一度の採卵で多数の卵子および胚を得られることが可能となったが、多胎妊娠を防止する観点から移植胚数は原則 1 個とされている。そのため、複数個の胚が得られた患者は移植胚を選別する必要があり、適切に胚を評価、選別することは患者の出産までの期間と費用の削減に繋がる。近年、胚盤胞評価方法は、形態的評価やタイムラプスインキュベーターによる形態動的データを用いた評価に代わり、胚の細胞を一部採取し次世代シーケンサーなどにより胚の染色体正常性を判定したうえで胚移植を行う遺伝的評価が加わり生産率の向上に寄与している。しかしながら、遺伝的評価は細胞を採取する必要があり胚への侵襲的なダメージが危惧されている。そこで、胚を培養した培養後培地 (Spent culture medium: SCM) に含まれる胚由来の cell-free DNA (cf-DNA) が新たな遺伝的評価ソースとして着目されている。SCM 中には、胚ゲノム由来の cf-DNA (cf-nDNA) の他にミトコンドリアゲノム由来の cell free mitochondrial DNA (cf-mtDNA) が存在しており、SCM 中の cf-mtDNA は、cf-n-DNA と比較して約数百倍の量が検出される。これまでのヒト胚を用いた研究では、分割期胚 (Day 3) における SCM 中の cf-mtDNA が多いほど、その後の胚盤胞発生率および分割期胚移植における着床率が高いことが報告されている。しかしながら、胚盤胞期胚まで培養した SCM 中の cf-mtDNA と胚盤胞の品質との関係性およびタイムラプスインキュベーターにより得られる形態動的データとの関係性について調査した報告はない。本研究は、SCM 中に含まれる cf-mtDNA が胚盤胞の評価や移植のための胚選別に利用可能か否かについて明らかにす

\*大阪市立大学 准教授

\*\*放射線医学総合研究所 主幹研究員

るため、ブタ単為発生胚およびヒト胚を培養した SCM 中に含まれる cf-mtDNA をリアルタイム PCR により定量し、胚との関係性について解析した。まず、SCM 中の cf-mtDNA 量の測定として適切な条件や傾向を明らかにするために、ブタ単為発生胚を用いて SCM 中の cf-mtDNA 量と透明帯の有無、胚の細胞数、異なる ploidy (倍数性)との関連性を解析した。その結果、SCM 中に含まれる cf-mtDNA 量は、胚の細胞数、透明帯の存在に影響しないことが示された。一方で、SCM 中の cf-mtDNA は、Day2 や Day3 よりも Day4 や Day7 に有意に多く、二倍体胚に比べて一倍体胚において有意に多いことが示された。これらの結果により、SCM 中の cf-mtDNA は胚の細胞数や透明帯の存在に影響されずに胚の ploidy を評価するソースとして利用できる可能性が示唆された。つぎに、ヒト胚を培養した SCM 中に含まれる cf-mtDNA 量が拡張胚盤胞の評価および選別に利用できるか否かについて解析した。また、タイムラプスインキュベーターで培養した胚の SCM を用いることで、胚の挙動および形態動的データと SCM 中の cf-mtDNA 量の関係について調査した。SCM 中の cf-mtDNA 量は、患者年齢、AMH 値、BMI、累積採卵回数および移植回数と有意な相関は認められず、また Gardner 分類に基づく ICM および TE の形態評価の違いにおいても差は認められなかった。さらに、cf-mtDNA 量は、媒精方法および培養日数 (Day 5 or 6)の違いにおいても有意な差は認められなかった。一方で、胚の動的パラメーターのうち、tEB (拡張期胚盤胞) - tSB (胞腔形成開始) および tEB (拡張期胚盤胞) - tB (拡張前胚盤胞期胚) の所要時間において cf-mtDNA 量と正の相関が認められた。これらの時間は胚盤胞の拡張に要した時間 (拡張時間)に相当しており、拡張時間が長い胚ほど SCM 中の cf-mtDNA 量が多いことが示された。

また、胚盤胞の収縮 (blastocyst collapse: BC)現象が起きた胚における cf-mtDNA 量は BC が起きていない胚と比べて有意に多いことが示され、BC の回数と cf-mtDNA 量が有意な正の相関関係にあることが示された。さらに、BC が起きた胚は、BC が起きなかった胚と比較して拡張時間 (tEB-tSB, tEB-tB 共に)が有意に長いことが示された。これらの結果は、対象胚を形態良好胚のみに限定した場合であっても同様の傾向が確認された。以上の結果から、SCM 中の cf-mtDNA は、胚盤胞の拡張過程において発生した BC 現象により、胞腔液に多数蓄積している cf-mtDNA が胚体外へ放出されていることが考えられた。

また、既報では BC が起きた胚の移植後の妊娠率および生産率が有意に低下することや、拡張時間 (tEB-tSB)の所要時間が遅延した胚の正倍数性率が低下することが報告されていることから、拡張時間と BC と相関する SCM 中の cf-mtDNA は胚盤胞の質を評価するネガティブマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

## 審査報告概要

ヒトでは生殖補助技術が盛んに用いられている。一般に、一度の採卵で患者は多数の卵子や胚を得られるが、移植に用いることができる胚は一つであるため、胚質を評価する方法を確立することは妊娠率を高めるだけでなく、移植後の予後も改善することができる。本研究では、胚を培養した後の培地から DNA を抽出しその中に含まれているミトコンドリアゲノムに由来する細胞外 DNA (cf-mtDNA) とタイムラプスインキュベーターを用いて得た胚の動態、患者の背景そして胚の質を比較し、培地の細胞外 DNA 量を胚質判別に利用することが可能かどうかについて検討した。胚の胚盤胞期胚に到達してから拡張に至る時間や胚盤胞期胚の胞胚腔崩壊現象の有無は cf-mtDNA 量と関係している事が明らかになった。また家畜の胚を用いた試験で胚の倍数性の違いが cf-mtDNA 量に影響することを示した。本研究は培地中の細胞外 DNA 量を非侵襲的な指標として用いて胚を選別する基板となる知識を示し、新規性のあつる知見を多く得たことから、審査員一同は博士(畜産学)の学位を授与する価値があると判断した。