学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	環境生命科学
専　攻 Division	農生命科学
学生番号 Student No.	77502955
氏　名 Name	Xingqiang WEI

学位論文題目 Title of Thesis（学位論文題目が英語の場合は和訳を付記）

体外受精における妊娠率向上に寄与する要因および不妊原因に関する研究

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

我が国における出産児の 14 人に 1 人が体外受精により産まれており、累計で 70 万人を突破した(2019 年、厚生労働省）。体外受精では通常 1 前核(1PN)形成や 3 つ以上の前核形成は異常受精と判断され廃棄されるが、異常受精の一種である 1PN 接合子に由来する胚盤胞移植により正常な健康な新生児が生まれることが報告されており、正常 2 倍体 1PN 形成のメカニズム解明が必要である。一方、不妊の約 10-20%は原因不明であり、原因解明が求められている。本研究では体外受精において見られる異常受精のメカニズム解明および不妊原因となる遺伝子変異の解明を目的とした。

はじめに、異常受精とされている 1PN 接合子のうち、生児獲得の可能性のある雌雄両方のゲノムを含む 1PN 形成のメカニズムを調べ、この 1PN 由来胚移植の妥当性/安全性を調べることを目的とした。体外受精後、通常は雌雄の 2 つ前核（2PN）を形成するが、約 3－6%に 1PN 形成が起こることが報告されている。1PN 形成の原因には、①単為発生に起因する雌性 1PN、②雄性前核形成不全による雌性 1PN、③雌性前核形成不全に起因した雄性 1PN、④前核の核膜形成時に雌性雄性両方のゲノムを含む状態の前核が形成、⑤雌性前核と雄性前核形成後に融合が考えられる。①-③は 1 倍体 1PN であり児の獲得に至らないが、④と⑤は 2 倍体であることから児が生まれる可能性が考えられる。よって本研究では受精後に起こる卵細胞質内の動態に注目した。体外受精の場合、第二極体放出後、精子の膜融合部位に受精丘が形成され、続いて細胞質内に Cytoplasmic Wave(CW）が起こる。第二極体は雌性前核形成のサインであり、受精丘/CW は雄性前核形成のサインであることから、両サインを有する 1PN の動態解析を行い 2 倍体 1PN 形成のメカニズムを調べた。細胞質内の CW の動きはベクトル解析ソフトウェア（Flownizer 2D,(株）ディテクト）によるベクトル解析により確認し、1PN 形成の動態解析は 2 種類の経時的自動連続観察システム（EmbryoScope:ES, VitroLife 社および iBIS, アステック社）を用いて第二極体放出の位置、受精丘もしくは CW の起点が確認できた 726 個（ES:229 個、iBIS:477 個）の接合子の後方視的解析を、岡山大学倫理委員会(研 2101-009)および英ウィメンズクリニック倫理委員会(2020-11)承認を得て行った。第二極体放出起点と受精丘/CW 起点の距離を測定し、1PN となる場合の距離のカットオフ値を ROC 曲線解析により求め、雌雄ゲノムを含む 1PN 形成の確率を算出した。受精丘の出現から後退までの平均時間は、100(±37）分であり、受精丘後退後 15～30 分以内にすべてが受精丘後退地点より CW を開始した。第二極体放出起点と、受精丘/CW 起点の距離のカットオフ値は ES:17μm（AUC:0.987, CI:0.976-0.999)、 iBIS:18μm (AUC:0.972, 95%CI:0.955-0.988)であった。また、雌雄ゲノムを含む 1PN の理論的発生率(半径 18μm 地点の表面積/全体の表面積)は 2.7%であり、IVF 全体の 1PN 率(4.3%(145/3337)）の 62.8%であった。IVF 後の 1PN 由来胚の倍数性を調べた既報は 2 報あり、それぞれ 62%(Sultan ら, 1995)と 87%（Van der Heijden ら, 2009）であると報告している。したがって、女性と男

氏名 Name	Xingqiang WEI

性のゲノムを含む 1PN の発生率は約 2.7%～3.7%(4.3%×0.62～0.87)であり、本研究で見つかった理論的な発生率である 2.7%と一致した。本研究において、第二極体放出起点から半径 18μm 以内に精子が侵入した際に雌雄合体 1PN 形成が起こることが判明した。ヒト MII 期卵母細胞では、微絨毛・表層顆粒の分布が均一であることが報告されており、雌雄ゲノム含有 1PN 形成は自然妊娠においても同程度の確率で起こっていると推測されることから、体外受精後の雌雄両方のゲノムを含む 1PN 形成は 2PN と同等に正常受精と判断可能であることが示唆された。

次に、体外受精後に 2PN が確認され正常受精と判断されるも 3 倍体である胚を連続自動経時的観察により検出する方法の確立を試みた。3 倍体は 2-3%に起こり、早期流産の原因となる染色体異常の約 15%が 3 倍体であることが報告されている。体外受精で得られた胚の場合、3 倍体胚は受精後に通常 3 前核を有していることから受精後の観察で判定することが可能であると考えられてきたが、2PN 形成を確認し正常受精と判断した胚の移植にて 3 倍体であるものがあることが近年日本でも臨床研究が開始された着床前診断にて発覚するようになってきた。本研究では経時的自動連続観察システムにより前核形成の詳細解析を行い、極体放出失敗後に二つの雌性前核が融合し一つの大きな前核を形成することにより、3 倍体の 2PN 形成が起こることが判明した（岡山大学倫理委員会承認：研 1712-001）。妊娠に至った胚の雄性前核の大きは、前核崩壊直前にほぼ等しくなることが報告されており、雌性前核が雄性前核より大きい場合、3 倍体もしくは、3 倍体を主体とする染色体異常胚であることが考えられ、本発見により経時的自動連続観察システムを用いた 3 倍体 2PN 形成胚の判別が可能となった。これにより、着床前スクリーニング検査の盲点である“XXX の 3 倍体検出“を可能にすることが出来ると同時に、受精卵の一部をサンプリングして解析するという侵襲的な方法による胚へのダメージや流産の問題を回避でき、染色体異常胚移植による流産という過程を削減できることから、母体側の負荷やリスクも軽減できる。

最後に、体外受精反復不成功患者を対象とした遺伝子変異の網羅的解析を行い、不妊原因となる遺伝子変異を調べることを目的とした解析を行った。卵成熟機構には未解明の部分が存在し、不妊原因が卵の異常によるものである場合には現在の医療では治療できないことが多い。実際、体外受精反復不成功患者は少なくなく、金銭面のみならず精神面の負担も大きいことから本研究では体外受精反復不成功患者を対象に不妊原因となる遺伝子変異を探るため、2021 年 1 月から 10 月の間に英ウィメンズクリニックにおいて体外受精を行った患者のうち体外受精反復不成功患者 25 人と同クリニックスタッフで自然妊娠出産し本研究参加に同意が得られた 10 人の血液から DNA を抽出し、次世代シーケンシング（NGS）による遺伝子変異の網羅的解析を行った(岡山大学倫理委員会承認: 研 2006-036)。NGS 解析の結果、自然妊娠出産者 10 人に存在しない High impact な変異（フレームシフト変異など塩基の挿入や欠失により作られたタンパク質のほとんどが機能しなくなる変異）が 57 遺伝子に存在し、うち 7 遺伝子（*ADAM33, CEP89, CRIPAK, OR52N4, PDZRN3, RAET1E, SPATA31A3*）において、患者群と 8.3KJPN データベースの対照群間のアレル頻度に有意な差が検出された。また、完全不妊が存在しない状態でハーディワインベルグ平衡（HWE）が成立すると仮定した場合、9 遺伝子(*ADAM33, CEP89, OR2T29, OR52J3, OR52N4, RABL2A, RNF17, SPATA31C1, WWTR1*)において対象患者における実測値と Human Genetic Variation Database（HGVD）からの算出値に乖離が生じていることが判明した。よって、*ADAM33, CEP89, CRIPAK, OR52N4, PDZRN3, RAET1E, SPATA31A3, OR2T29, OR52J3, RABL2A, RNF17, SPATA31C1, WWTR1* の 13 遺伝子の変異が不妊原因の候補となった。

本研究では体外受精においてこれまで異常受精とされていた 1PN には雌雄両方のゲノムを含む正常 2 倍体接合子であることがあり、そのメカニズムが明らかになった。また、経時的自動連続観察システムにより第二極体放出地点から 18μm 以内の精子侵入地点を捉えることにより正常 2 倍体 1PN を判別する方法を確立し、さらに第二極体放出後の雌性前核形成を追跡することにより 3 倍体 2PN を判別する方法を確立した。いずれも生殖補助医療に直ちに役立つ発見である。体外受精反復不成功患者を対象とした遺伝子変異の網羅的解析では、上記の 13 の遺伝子変異が不妊原因の候補となることが判明し、今後の生殖医療の発展に貢献することが期待できる。