

第109回 生命倫理専門調査会及び第8回「ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方」
見直しに係るタスクフォースの合同開催
於 中央合同庁舎第4号館 11階 教養第1特別会議室

ヒト胚（受精卵）を用いた 臨床と研究の現状

2018年6月25日

山田 満穂

慶應義塾大学医学部 産婦人科学教室

ヒト胚をめぐる研究と臨床

・わかっていること

- ・ ヒト胚を用いた体外受精により、形態良好な受精卵であれば良好な妊娠成績を得られる
- ・ 多くの胚は途中で発生停止、あるいは流産する

・わかっていないこと

- ・ ヒト受精卵の染色体異常（mosaicなど）の頻度
- ・ 染色体異常の発生原因
- ・ ヒト胚の”発生”を司る遺伝子とその機能

実験動物モデルを用いて得られた知見は果たして
そのままヒトに当てはめることができるのか？

体外受精の治療周期数は増加の一途

年別 治療周期数



1978年以来400万人近くの出生児

2013年

日本 44,951 babies

米国 67,996 babies

ヨーロッパ 134,106

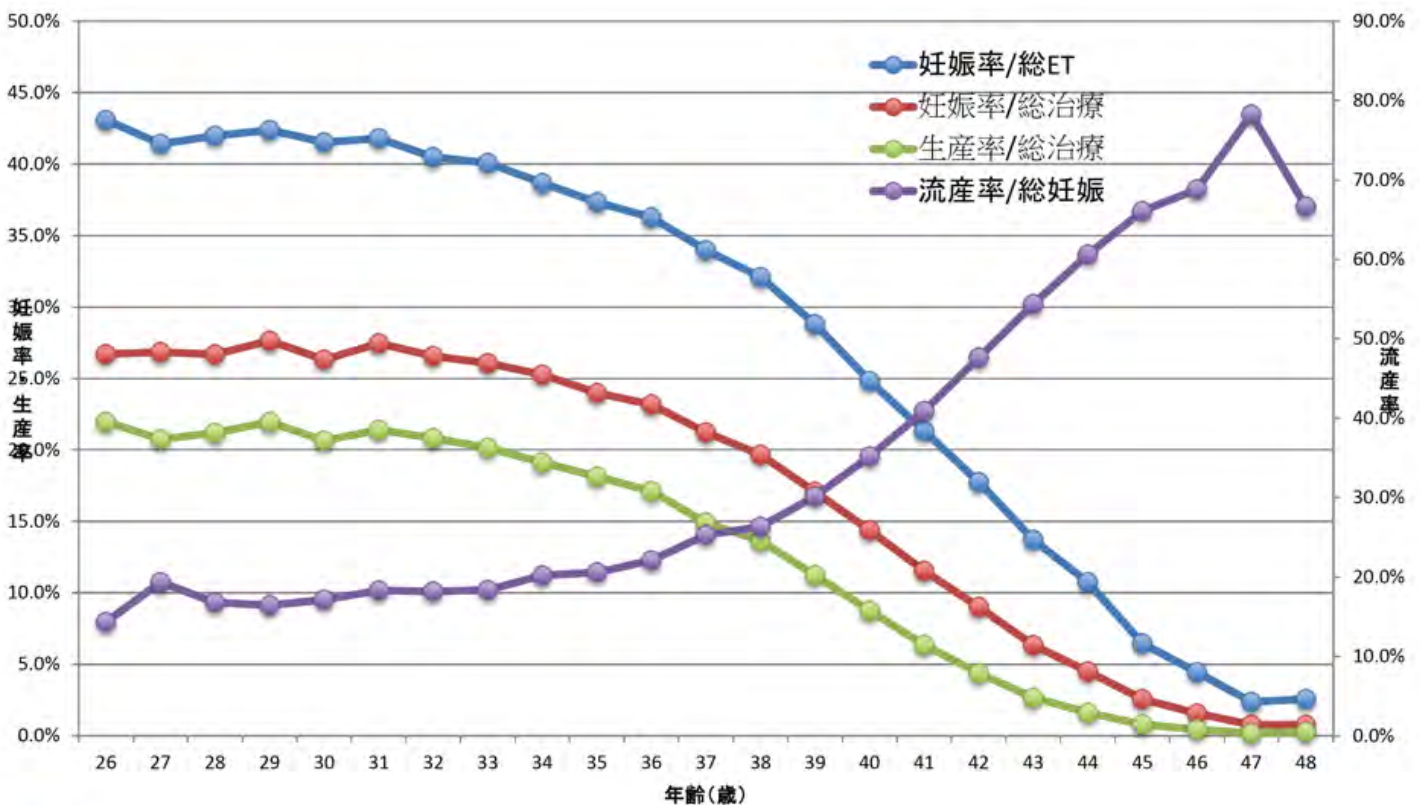
babies

(2011)



着床前期胚の質的向上は最重要課題

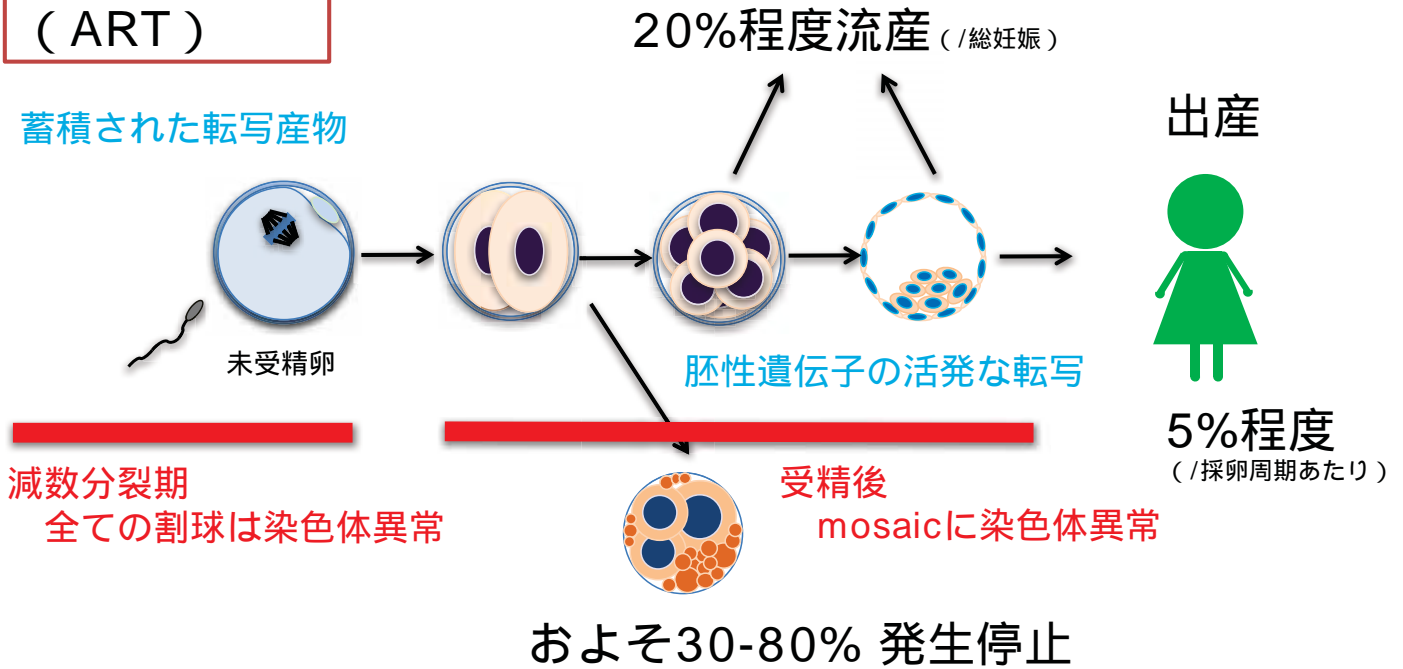
母体加齢とともに流産率は上昇する



体外受精ではおおくの胚（卵子あたり30-80%）が発生停止し、20%程度は流産する（いわば”胎児病”）

生殖補助医療 (ART)

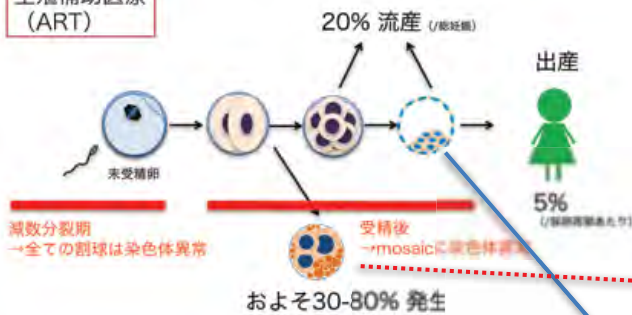
蓄積された転写産物



わかっていること

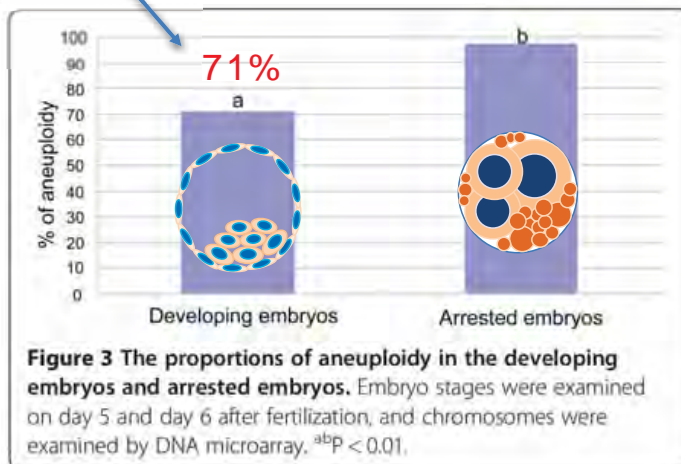
体外受精の問題の背景に染色体異常がある

生殖補助医療 (ART)



Tested: 45 blastocysts and 45 arrested embryos
Diagnosed by Array CGH

異数性の有る胚の割合



なぜ発生停止・流産するのか？

- わかっていないこと
 - ヒト受精卵における遺伝子レベルでの働き
 - 染色体異常の発生原因
 - ヒト受精卵の染色体異常 (mosaicなど) の頻度 etc

Agenda

Part I.

卵子・受精卵における遺伝子レベルのはたらき

Part II.

次世代シーケンサーを用いた

PGT-Aが明らかにする

減数分裂過程および受精後の染色体異常の発生頻度

実験動物モデルで得られた結果が、ヒトにおいても当てはまるとは限らない

Cell Reports
Letter

OPEN
ACCESS
Cell Press

Data from Artificial Models of Mitochondrial DNA Disorders Are Not Always Applicable to Humans

Julie Steffann,^{1,*} Nadine Gigarel,¹ David C. Samuels,² Sophie Monnot,¹ Roxana Borghese,¹ Laetitia Hesters,² Nelly Frydman,³ Philippe Buret,¹ René Frydman,¹ Alexandra Benachi,⁴ Agnes Rotig,¹ Arnold Munnich,¹ and Jean- Paul Bonnefont¹

¹Université Paris-Descartes; Sorbonne Paris Cité, Institut IMAGINE and INSERM U781; Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75743 Paris, Cedex 15, France

²Center for Human Genetics Research, Department of Molecular Physiology and Biophysics, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA

³Service de Biologie et Génétique de la Reproduction

⁴Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Unité INSERM U782 Hôpital Antoine Bécélère, 92141 Clamart cedex, France

*Correspondence: julie.steffann@inserm.fr

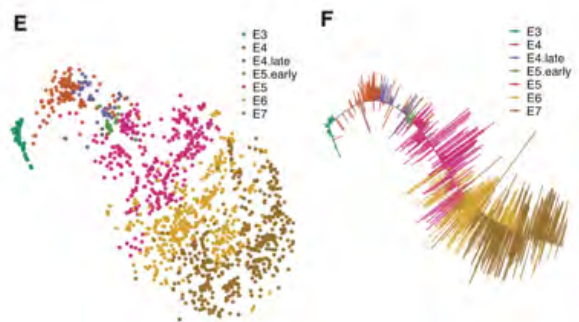
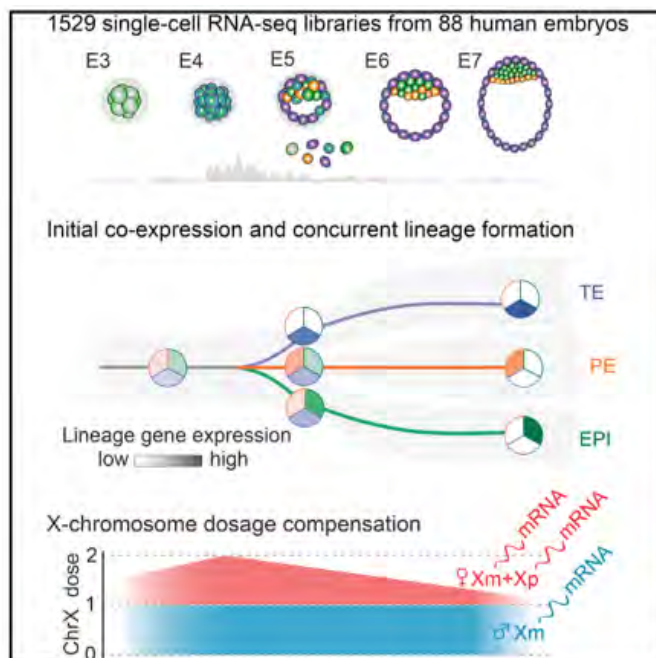
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.005>

ヒト初期胚発生過程の詳細な遺伝子発現の検討

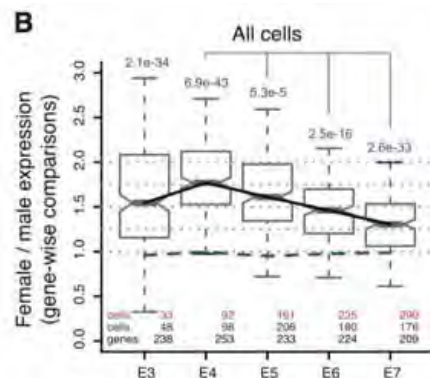
Cell

Resource

Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos



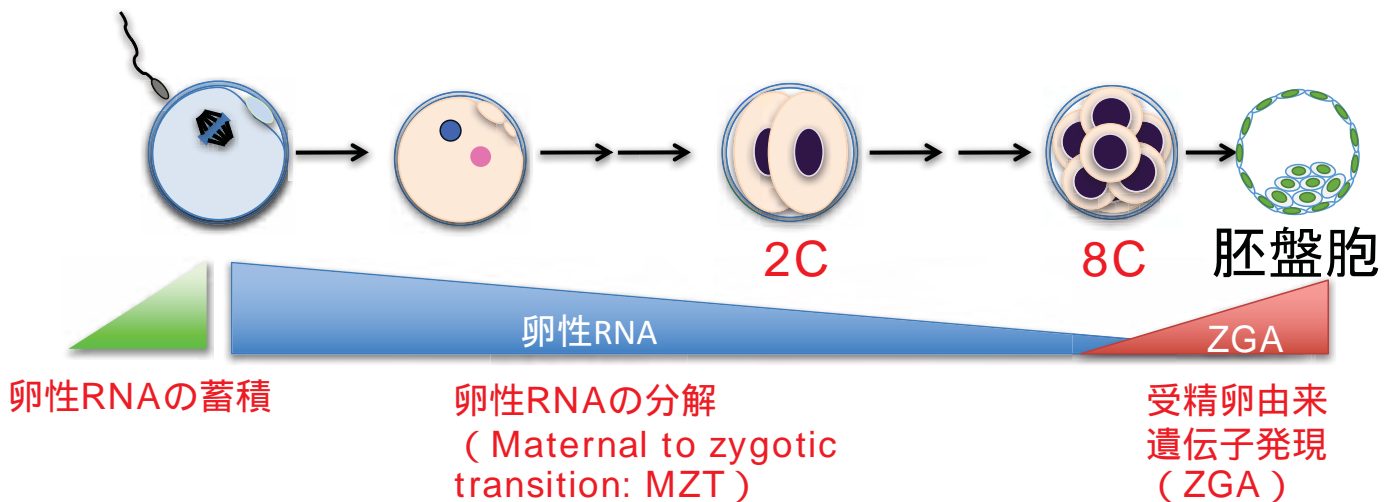
初期胚の転写状態は継時的に変化



X染色体不活性化は動物モデルとことなりbiallelic expression

Petropoulos et al., Cell 2016

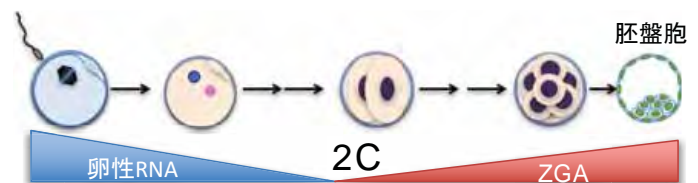
初期胚発生においては、 遺伝子発現がカスケード状に引き起こされる



- 卵性RNAの蓄積と分解
- カスケード状に胚性ゲノムの活性化：Zygotic Genome Activation (ZGA)が引き起こされる
(ヒトは8細胞期から、マウスは2細胞期から)

マウスモデルの検討で明らかとなった 発生過程における遺伝子の働きの重要性

マウス初期胚発生において
は2CからZGA開始



① 卵性遺伝子

- ex. *Oct4* 遺伝子は発生や全能性獲得に関わる

卵性遺伝子 *Oct4* の機能喪失実験



② 卵性遺伝子から胚性 遺伝子へのスイッチ

③ 胚性遺伝子

- ex. *Zscan4* 遺伝子, *Hmgpi* 遺伝子は胚発生や全能性獲得に関わる

胚性遺伝子 *Hmgpi* の機能喪失実験



ヒト卵子・初期胚における
個々の遺伝子の挙動と働きはわかっていない

① 卵性遺伝子

英国Human Fertilisation & Embryology Authority (HFEA) は**正常な胚発生を検討**することを目的に、ヒト胚(受精卵)を用いたゲノム編集の基礎実験を2016年に容認

NATURE | NEWS

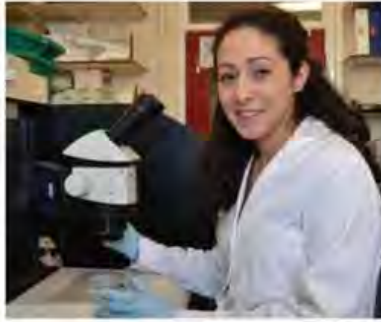
UK scientists gain licence to edit genes in human embryos

Team at Francis Crick Institute permitted to use CRISPR-Cas9 technology in embryos for early-development research.

Ewen Callaway

01 February 2016 Updated: 01 February 2016

Scientists in London have been granted permission to edit the genomes of human embryos for research, UK fertility regulators announced. The 1 February approval by the UK Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) represents the world's first endorsement of such research by a national regulatory authority.



Kathy Niakan

Callaway. *Nature*, 2016

"It's an important first. The HFEA has been a very thoughtful, deliberative body that has provided rational oversight of sensitive research areas, and this establishes a strong precedent for allowing this type of research to go forward," says George Daley, a stem-cell biologist at Boston Children's Hospital in Massachusetts.

妊娠を目的に胚移植を行うことは法律違反とした

ARTICLE

doi:10.1038/nature20081

Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis

Norah M. E. Fogarty¹, Abdul-Mu'Carthy², Kirsten E. Saiters¹, Benjamin E. Powell¹, Neda Khatami¹, Paul Blakeley¹, Rebecca Lee¹, Ray Elder¹, Saeed F. Wamath¹, David Kim¹, Vishnu Muralidharan¹, Jero Kikwiringi¹, Jin-Soo Kim^{1,2}, Daphne Wells¹, Ludovic Vallier^{1,3,4}, Alessandro Berezney^{1,5}, James M. A. Tanner¹ & Kathy N. Niakan¹

目的

流産の原因の解明

候補遺伝子

ヒトOCT4遺伝子

実験手法

CRISPR-Cas9を用いた機能喪失実験

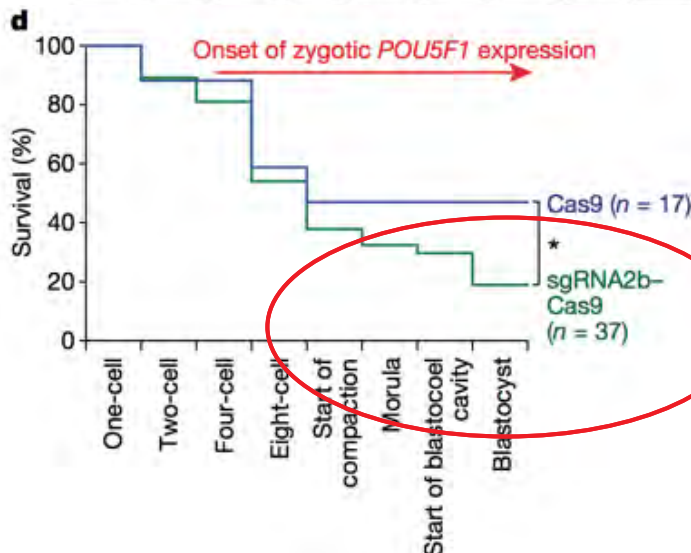
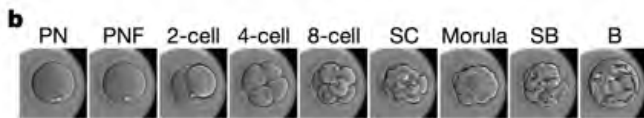
サンプル

58個のヒト初期胚
(不妊クリニックから提供)

① 卵性遺伝子

ヒト初期胚発生におけるOCT4遺伝子の役割

OCT4遺伝子をゲノム編集されたヒト受精卵での検討

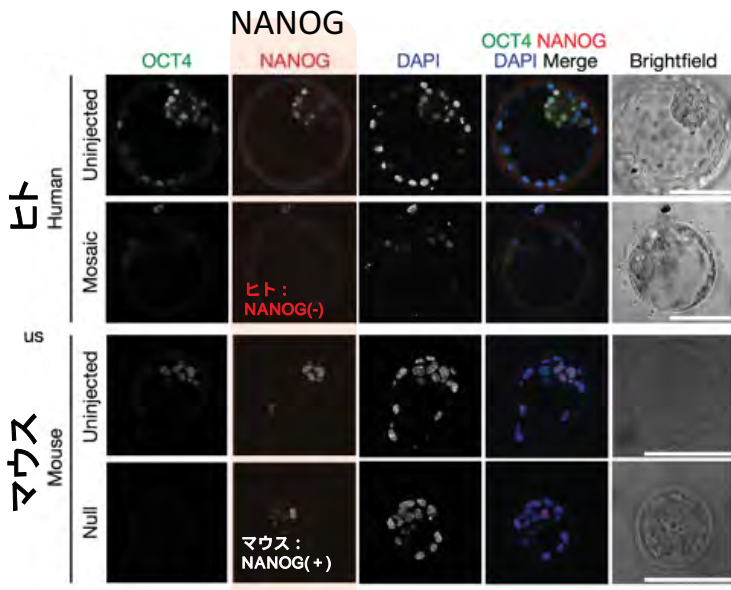


Fogarty, et al., *Nature* 2017

- 卵割のタイミングは変わらなかった
- 8細胞期までの発生停止率は62% (23/37)と上昇
(Cas9-microinjected control embryos 53% (9/17))
- **胚盤胞発生率は19% (7/37)と有意に低下**
(Cas9-microinjected control embryos 47% (8/17))
- 発生した胚盤胞の特徴
 - 将来胎児となる内部細胞塊の細胞数が減少
 - 胚を保護する作用のある透明帯が薄くなっていた

① 卵性遺伝子

ヒトおよびマウス初期胚発生におけるOCT4遺伝子の果たす役割の違い

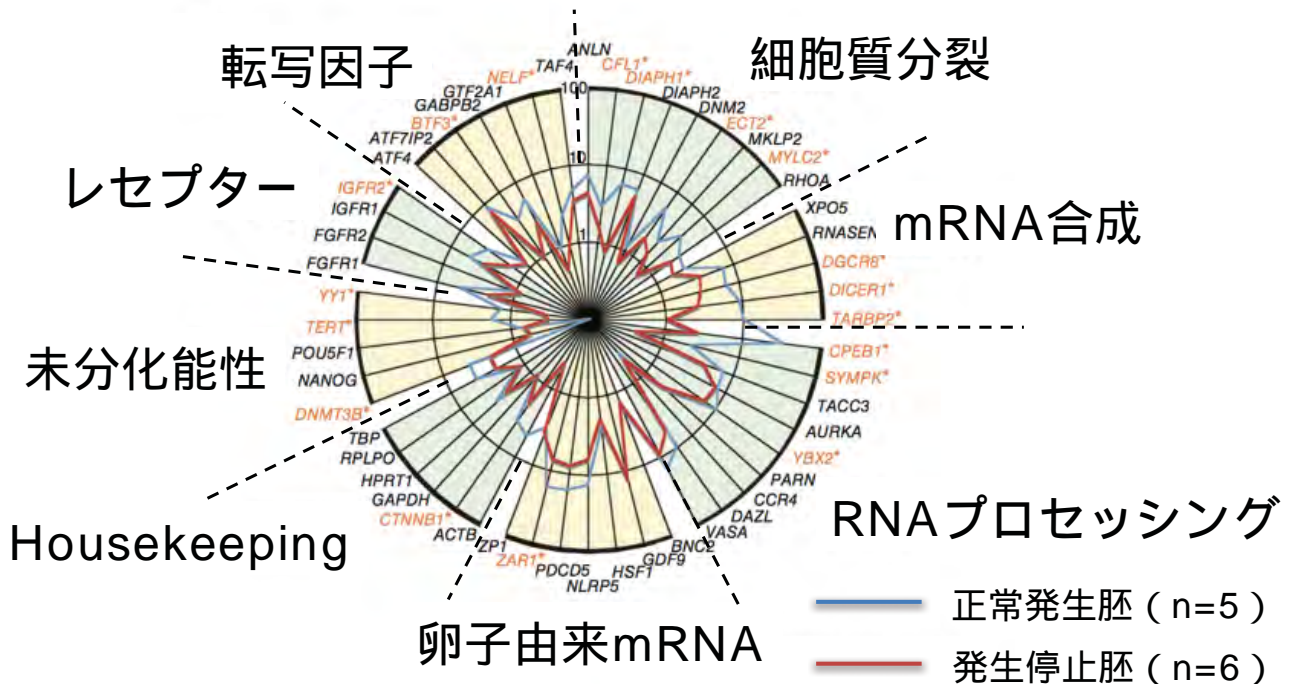


Fogarty, et al., Nature 2017

- ヒトOCT4-nullの細胞
 - CDX2 (胎盤の形成に重要な遺伝子) 遺伝子の発現低下
 - NANOGを含めた多能性のあるepiblastへの制御因子の発現が低下
- マウスOCT4-nullの細胞
 - Nanogを含めた遺伝子の発現は維持され胚盤胞に発生した

ヒト受精卵を用いた検討により、マウスとのNANOGの発現パターンのちがいがはじめてわかった

卵性遺伝子から胚性遺伝子へのスイッチ ヒト体外受精 (IVF) における発生停止胚の転写の検討

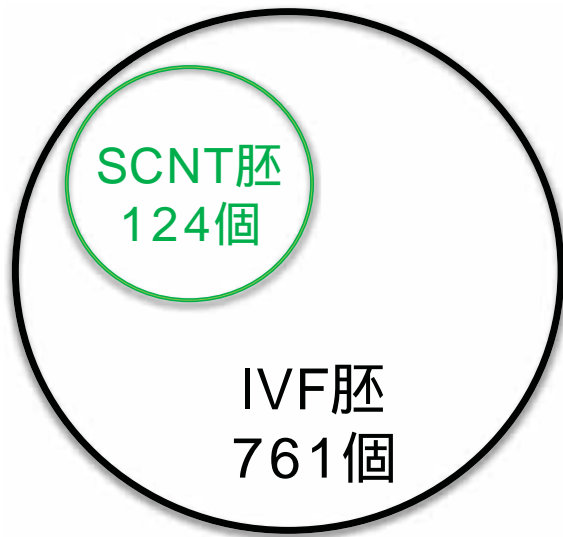


胚性 (受精卵) ゲノムからの転写を誘導する遺伝子群の発現が低下

Pera et al. Nat Biotech 2010

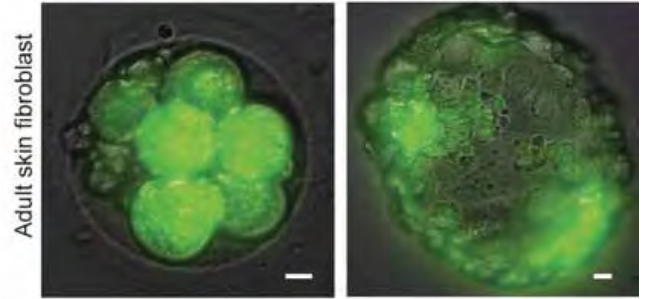
胚性遺伝子の活性化

ヒト体細胞核移植胚（SCNT胚）における発生停止胚の転写の検討



ヒトIVF 8細胞期胚の転写産物 761個
ヒトSCNT胚の転写産物 124個

Egli et al. *Nature*, 2011



8細胞期胚

胚盤胞期胚

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によるSCNTプロトコルは**胚性遺伝子の発現（転写）を引き起こすことで胚発生を改善**

Yamada et al. *Nature*, 2014

Part I. ヒト卵子・受精卵における遺伝子レベルのはたらきのまとめ

1. ヒト卵子、初期胚を用いた観察、介入研究が海外で行われるようになってきた
2. 適切な遺伝子発現のカスケードを引き起こすことが、ヒト初期胚発生において重要
3. ヒト初期胚における遺伝子発現と機能は、動物モデルとこととなる挙動を示す
4. 卵子・受精卵における遺伝子の発現と機能は、ヒト卵子・受精卵を用いないとわからない

Agenda

Part I.

卵子・受精卵における遺伝子レベルのはたらき

Part II.

次世代シーケンサーを用いた

PGT-A (Preimplantation genetic testing: 従来の着床前スクリーニング PGS) が明らかにする

減数分裂過程および受精後の染色体異常の発生頻度

PGT-Aは受精卵の染色体の数が正常かどうか診断する遺伝学的検査



Greco et al. *SpringerPlus* 4:22, 2015

- 胚の一部の細胞（割球）を生検することで遺伝情報を得る
- 染色体の数が正倍数性の胚を見極めて胚移植を行う
- 分子細胞遺伝学的手法により診断
 - Fluorescence in situ hybridization (FISH)
 - 定量的リアルタイムPCR (qPCR)
 - array comparative genome hybridization (array CGH)
 - single-nucleotide polymorphism (SNP) array
 - 次世代シーケンサー (next-generation sequencing: NGS)

2017.2.14着床前検査、180人分登録へ 6施設で臨床研究 日本産科婦人科学会はPGT-Aの臨床研究を開始

トップ > No.4843 > ニュース記事

> 着床前スクリーニング、RCTに向け有用性検証【日産婦特別臨床研究】

着床前スクリーニング、RCTに向け有用性検証【日産婦特別臨床研究】

日本産科婦人科学会は14日、「着床前遺伝子スクリーニング」(PGS、用語解説)の流産予防効果の検証に向け、特別臨床研究の対象者の仮登録を始めたことを公表した。会見した司原稔常務理事(徳島大、写真中央)は、「PGSの有用性が分からなければ、実のある倫理的な検討には進めない。海外のデータは出てきているが、日本人のデータを得て判断したい」と述べた。



日産婦は、重篤な遺伝性疾患児を出産する可能性があるなどの場合に限り、特定の遺伝子異常を診断する「着床前遺伝子診断」(PGD)を認めているが、PGSについては倫理的観点から禁止。しかし、妊娠年齢の高齢化に伴い、染色体の数的異常による体外受精の不成功率・流産が増加していることから、公開シンポジウムを開催するなどしてPGSの“解禁”に理解を求めてきた。

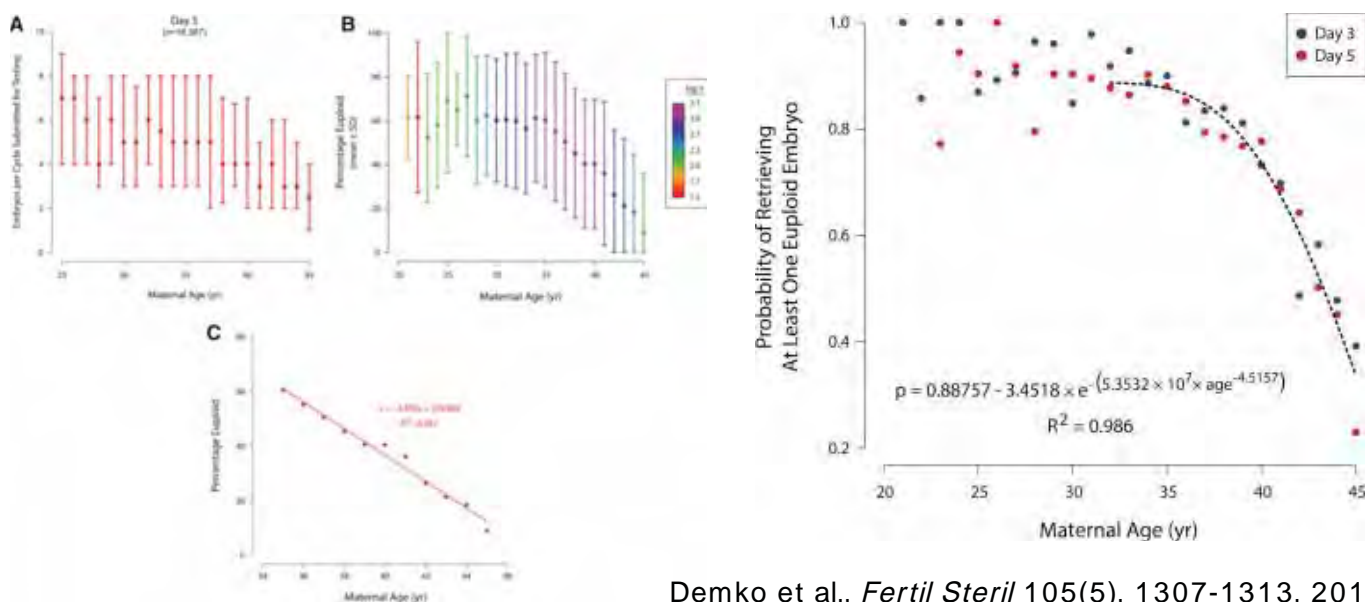
特別臨床研究は、無作為比較化試験(RCT)のパイロット試験として実施するもの。対象者は、満35~42歳で、①体外受精が3回以上不成功(反復体外受精・胚移植不成功例)、②原因不明習慣流産一の女性。①②ともPGS実施群40例、通常の体外受精を行う対照群10例の計50例の計画で、出生率の改善を主要評価項目とする。

解析は東京女子医大、名古屋市大、藤田保健大などで行い、体外受精は名古屋市大、IVF大阪クリニック(東大阪市)、セント・ルカ産婦人科(大分市)などで実施する。国内のPGS研究をリードしてきた慶大は14日現在、学内の倫理委員会の承認が下りていないが、日産婦によると、承認され次第、解析・体外受精の両方の実施施設として参加する見込みだという。

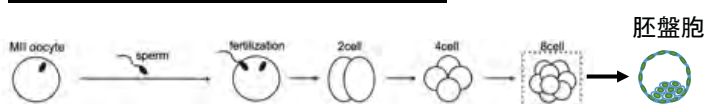
Part II. PGT-A

- A. 減数分裂過程における染色体異常
- B. 受精後の染色体異常
- C. PGT-Aにまつわる問題

母体加齢により減数分裂過程におけるエラーが増加し、染色体異常が増加する



染色体正常な胚盤胞



20 ~ 30代前半: 5個に3個
40歳: 5個に1個

Part II. PGT-A

- A. 減数分裂過程における染色体異常
- B. 受精後の染色体異常
- C. PGT-Aにまつわる問題

受精後に起こる染色体異常は 母体年齢に依存せず一定の確率で起こる

Age (y)	Euploid (%)	Aneuploid (%)	Mosaic and aneuploid (%)	Mosaic aneuploid/euploid (%)	Total
Egg donor	61.2	14.8	6.5	17.4	1,972
<35	48.2	18.6	6.6	26.6	2,363
35-37	43.9	26.4	9.3	20.5	1,572
38-40	33.1	35.6	13.5	17.9	1,526
41-42	17.0	51.6	17.5	13.9	689
>42	10.6	57.6	21.2	10.5	436

cited from the conception paper by Munne et al., *Fertil Steril* 105(5), 1146-1149, 2016

**年齢にかかわらず20%程度
高い頻度で染色体mosaicは生じうる**

Part II. PGT-A

- A. 減数分裂過程における染色体異常
- B. 受精後の染色体異常
- C. PGT-Aにまつわる問題**

Mosaic比率と着床率、妊娠率、流産率

- Mosaic胚をhr-NGSで診断
- 着床率
 mosaic 30.1% (染色体正常胚 55.8%)
- 妊娠継続率
 mosaic 15.4% (染色体正常胚 46.2%)

Ruttanajit et al., *Prenat Diagn* 36, 154-162, 2016

- 流産率
 mosaic 55.6% (染色体正常胚17.2%)

Fragouli et al., *Hum Genet* in press

Mosaic胚を移植に用いる基準は？

- **20-40%のmosaic胚**は移植に用いることが考慮される
 - もしeuploidの胚が得られない患者なのであれば、20-40%のmosaic胚は移植に用いても良いと提言
 - 一方40-60%のmosaic比率の胚盤胞は移植胚としてもっともpriorityが下がる、あるいは、用いない方が良い
 - Mosaic胚の中には生児獲得に至るものも含まれる
 - 20-40%のmosaic率の胚の場合はeuploidのICMを有していることが多い

Munne et al., *Hum Reprod* 32, 743-749, 2017

特定のchromosomeを避けるべきかとの議論が行われている

- Chromosome 14, 15: uniparental disomy
- Chromosomes 2,7,16: IUGR
- Chromosome 13, 18, 21: trisomy
- no adverse effect reported

Munne et al., *Fertil Steril* 107(5), 1085-1091, 2017
PGDIS Newsletter 2016

ガイドライン作成の試みと患者へのIC

PGDIS 2016 newsletter

医療者への
recommendations

PGDIS Newsletter, July 19, 2016

PGDIS POSITION STATEMENT ON CHROMOSOME MOSAICISM AND
PREIMPLANTATION ANEUPLOIDY TESTING AT THE BLASTOCYST
STAGE

1. 着床前期胚の一部（5細胞程度）しか検査していないため、正診率は100%とは限らないことを患者に伝える
2. Mosaic胚の可能性と胚移植、着床に関わるリスクを伝える
3. Euploidと診断された胚盤胞移植はaneuploidと診断された胚よりも成績は良い
4. Mosaic胚しか得られなかった患者については、
 - a. 再度の採卵を検討
 - b. low riskと判定された胚を移植し、継続した遺伝カウンセリングを行う
 - c. 継続monitoringと出生前診断を考慮する

Part II. PGT-Aに関する結果のまとめ

1. PGT-AにはNGSを用いることが潮流となってきた
 - Meiosis過程の胚の診断には従来の方法でも可能
 - Mitosis過程で起こるmosaicの診断は、NGSが有利
2. Mosaic胚が想像以上に多いことがあきらかになってきた
 - Mosaic率が高いと妊娠率が低く、流産率は高くなる
 - Mosaic率が40%以下であれば、移植が考慮される
 - 特定の染色体を避けるかどうか議論されている
3. Evidenceの蓄積が求められている
4. 遺伝カウンセリングの重要性が増している

発生に関する様々な視点での
十分な知識がない現状が浮き彫り