

Title	配偶子形成過程におけるミトコンドリア関連遺伝子の網羅的探索と生殖補助医療への応用
Sub Title	Comprehensive analysis of mitochondria-related genes during gametogenesis and it's application to reproductive medicine
Author	佐藤, 卓(Sato, Suguru)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究機関では, 以下の進展が得られた. (1)ミトコンドリアのヘテロプラスミー定量解析のために, whole genome amplification (WGA)-PCR-RFLP-Image Jを用いて, 簡便・迅速かつ安価な診断系を構築した. (2)単一細胞におけるWGA-aCGHによる染色体異数性解析の結果, 着床前診断の際に発生した生検胚中63%に染色体数的異常が検出される結果を得た. (3)WGAの増幅効率の検討の結果, 変異と連鎖する複数の遺伝子多型を同時解析し, 胚がそれぞれの片親から引き継ぐ遺伝子型の組み合わせ診断(着床前ハプロタイピング)を可能とする効果をもたらした.</p> <p>We have obtained the following findings during the research period: (1)For detection of heteroplasmy for mtDNA mutations associated with the diseases, quick, simple and cheap diagnostic system using whole genome amplification (WGA)-PCR-RFLP-Image J simple was established. (2)As a result of chromosome aneuploidy analysis on single cell, 63% of the embryo which developed in the case of preimplantation diagnosis were revealed aneuploid. (3)As a effect of examination of the amplification efficiency of WGA, multi-locus simoultaneous analysis of targeted gene and STR markers closely linked to the gene enabled preimplantation genetic haplotyping.</p>
Notes	<p>研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2012 ~ 2013 課題番号 : 24791720 研究分野 : 医歯薬学 科研費の分科・細目 : 外科系臨床医学・産婦人科学</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24791720seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791720

研究課題名(和文) 配偶子形成過程におけるミトコンドリア関連遺伝子の網羅的探索と生殖補助医療への応用

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of mitochondria-related genes during gametogenesis and its application to reproductive medicine

研究代表者

佐藤 卓 (Suguru, Sato)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40383898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究機関では、以下の進展が得られた。(1)ミトコンドリアのヘテロプラズミー定量解析のために、whole genome amplification (WGA)-PCR-RFLP-Image Jを用いて、簡便・迅速かつ安価な診断系を構築した。(2)単一細胞におけるWGA-aCGHによる染色体異数性解析の結果、着床前診断の際に発生した生検胚中63%に染色体数的異常が検出される結果を得た。(3)WGAの増幅効率の検討の結果、変異と連鎖する複数の遺伝子多型を同時解析し、胚がそれぞれの片親から引き継ぐ遺伝子型の組み合わせ診断(着床前ハプロタイプング)を可能とする効果をもたらした。

研究成果の概要(英文)：We have obtained the following findings during the research period: (1)For detection of heteroplasmy for mtDNA mutations associated with the diseases, quick, simple and cheap diagnostic system using whole genome amplification (WGA)-PCR-RFLP-Image J simple was established. (2)As a result of chromosome aneuploidy analysis on single cell, 63% of the embryo which developed in the case of preimplantation diagnosis were revealed aneuploid. (3)As a effect of examination of the amplification efficiency of WGA, multi-locus simultaneous analysis of targeted gene and STR markers closely linked to the gene enabled preimplantation genetic haplotyping.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ミトコンドリア 加齢 減数分裂 卵子 着床前遺伝子診断 ミトコンドリア病

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは酸化的リン酸化回路を司る細胞内小器官であり、エネルギー産生の源である。内部に 16.5kbp の環状二本鎖 DNA であるミトコンドリア DNA(mtDNA)を有しており、核内 DNA との協調により酸素呼吸のための呼吸鎖複合体を形成する。現在までに、mtDNA 変異と疾患の関わりに関する研究が多くなされたが、近年ではアポトーシスと酸化ストレスとの関連が重要視されており、1つの研究分野をなしている。ヒトの生殖医学との関わりからは、抗加齢におけるコエンザイム Q10 や L-アルギニンを仲介した間接的なエビデンスの報告が散見されるものの、直接的な細胞遺伝学的論拠の報告は少ない。しかし、エネルギー産生能の低下が卵形成過程の減数分裂エラーと密接な関わりを持つことが有力視される。

また、ミトコンドリア遺伝病は、主に変異を有する mtDNA の蓄積を原因としてミトコンドリア機能不全に至る病態であり、神経や筋肉などのエネルギー要求性の高い組織で主要な病変を生じる。疾患頻度の高い 3 大疾患(慢性進行性外眼筋麻痺, MELAS, MERRF)と Leigh 脳症に関しては、多くの研究・臨床的報告が存在する。申請者のグループは、デュシエンヌ型筋ジストロフィー対象疾患とする本邦初の生児獲得の報告(2006)を嚆矢として、着床前遺伝子診断:

preimplantation genetic diagnosis(PGD)の臨床研究を実施してきた。近年対象疾患も多様化しており、ミトコンドリア病 Leigh 脳症患者を家系内にもつクライアントに対する PGD も実施してきた。ミトコンドリア病の PGD においては、体外受精(特に顕微授精)における初期分割期胚の割球の生検に引き続き、全 mtDNA 中に占める変異型 mtDNA の率(ヘテロプラズミー比率とよばれる)を定量し、その比率の低い胚を優先的に胚移植することで、重篤なミトコンドリア病罹患児の妊娠を回避しようとするものである。胚移植可能なヘテロプラズミー比率閾値が、対象病型毎に異なるなど、実施上の検討課題もあるが、実施の戦略は確立されている。今回は、PGD 基盤を有する利点を活用した、新たな細胞遺伝学的研究の構想に至った。すなわち、微量な細胞質に局在する mtDNA および mtDNA copy 数制御関連核遺伝子の網羅的解析を行い、当該胚の発達や IVF アウトカムとの比較から、重要な copy number variation(CNV)・1塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)とヘテロプラズミー比率閾値を抽出することを研究課題とし、幅広い遺伝子型をもつミトコンドリア遺伝病の PGD の安定的実施と、広くは IVF 成績の向上をもたらす診断系の構築を目標とした。

2. 研究の目的

- (1) mtDNA およびミトコンドリア関連核遺伝子領域をカバーする oligonucleotide tiling array の設計・開発(mtDNA array の開発)
- (2) ICSI/PGD の実施上で発生した極体と余剰胚・疾患罹患胚における割球およびフラグメンテーションを用いた全ゲノム増幅法(whole genome amplification: WGA)の実施と mtDNA array 解析による SNP 診断の精度検討・CNV 解析による増幅バイアスの評価
- (3) mtDNA array を用いたミトコンドリア遺伝病(特に 3 大疾患および Leigh 脳症)を対象疾患とする PGD の実施および(2)の解析において抽出された mtDNA 変異と得られた IVF/PGD アウトカムに基づく新たな胚発達関連遺伝子の同定と引き続く新 IVF システムの構築

3. 研究の方法

従前に報告されたミトコンドリア遺伝子特異アレイには Affimetrix 社のカスタムアレイを基盤とした Mitochip(Anne Hartmann et al. Human Mutation 2009)があるが、さらに近年開発され発展途上にある次世代シーケンサー(NGS)を用いた解析が有望である。いずれの方法を用いるにしても、稀少細胞由来の遺伝子解析に先立つ全ゲノム増幅法の技術の選択を最適化が必須となる。

検体として用いる割球は、実際の PGD にて単一遺伝子病の疾患罹患胚と診断された検体を使用する。胚への侵襲の問題を克服するために、初期分割期に発生したフラグメンテーションおよび極体を使用する。極体はヒト発生に関与せず、透明体内側に隣接して存在するため、安全確実に採取可能である。卵由来染色体不分離の遺伝情報を多く持つと考えられ、かつ顕微授精の実施時に採取可能な利点を有する第 1 極体が最大の標的細胞となる。研究の当初は患者由来株化リンパ球による解析を行う。

mtDNA 関連遺伝子解析と同時に、array CGH による染色体異数性同時診断のために、WGA による遺伝子増幅により十分な DNA 収量を得る。極体の異数性診断に使用する array CGH には BlueGnome 社の 24sure[®]を用いる。ヒト株化リンパ球を用いた単一細胞における異数性解析を実施し、WGA の種類に依存して、使用すべき DNA 抽出の方法・アレイ技術の種類の選択の最適化を検討する。mtDNA 解析に使用するオリゴアレイと、染色体コピー数解析のためのアレイとは異なるプラットフォームを選択する必要がある。

mtDNA array を用いたミトコンドリア遺伝病(特に 3 大疾患および Leigh 脳症)を対象疾患

とする PGD の実施, 同時に染色体不分離と関連する mtDNA 関連情報を反映させた移植候補胚の決定

上述の mtDNA アレイを基礎に, 極体・胚自身(割球とフラグメンテーション)の有する mtDNA の copy 数または SNP および CNV 解析を行う。同時に得られる極体の減数分裂時の不分離のパターンや頻度について調べ, その責任遺伝子を抽出するパイオインフィマティクスを行う。

4. 研究成果

変異ミトコンドリアのヘテロプラズミーの定量解析のために, 変異のホモプラズミーであるプラスミド DNA を正常プラスミド DNA により段階希釈し, 蛍光 PCR 法を用いて作成した検量線を用いて解析を行った。また分割期の割球 1 細胞における mtDNA および核ゲノムにおけるミトコンドリア関連 DNA の網羅的解析の実施には, oligonucleotide tiling array の技術開発が必要と考えていたが, さらに簡便・迅速かつ安価な診断系の構築を目指し, 家系内変異の部位特異的 PCR に代わり whole genome amplification (WGA) を遺伝子増幅に導入し, RFLP 法解析とオープンソースソフトウェアである Image J を用いた診断系を構築した。既知のヘテロプラズミー比率を有する抽出希釈 DNA を multiple displacement amplification (MDA) を採用して全ゲノム増幅を行い, 増幅産物に対して RFLP-電気泳動-Image J によりヘテロプラズミー比率を算出した。検体のヘテロプラズミー比率は, 既知の値と同程度かやや低い値で算出され, 検体の変異のヘテロプラズミー状態であることを推定することが概ね可能であった。

核ゲノムの網羅的解析はミトコンドリア関連遺伝子および染色体異数性解析を含むが, 特に単一細胞における染色体異数性解析の実施可能性と精度について検討した。解析染色体均衡型構造異常を有する PGD 希望のクライアントに対し, PGD を実施し, PicoPlex(BlueGnome 社)を用いて全ゲノム増幅を行い, aCGH 解析を実施した。生検胚中 80% が異数性診断が可能であった。63% に染色体数的異常が検出される結果を得た。移植可能胚は生検胚中の 17% 程度であった。移植不可能と判断された割合は, 生検胚あたり 83% に達した。aCGH 解析による新たな PGD 技術の導入による単一細胞の染色体コピー数解析は実用のレベルにあることを示唆する結果を得た。

単一細胞由来稀少テンプレート DNA の増幅には, 対立アリルの一方が増幅されないアリルドロップアウト現象 (ADO) の問題があり, 着床前診断 (PGD) における誤診断の原因とな

る。WGA による coverage の程度および増幅バイアスの評価を行うために, WGA 産物の複数遺伝子座における増幅効率の検討を行った。これは高精度 PGD システム構築と実施のために, 変異と連鎖する複数の遺伝子多型を同時解析し, 胚がそれぞれの片親から引き継ぐ遺伝子型の組み合わせ診断 (着床前ハプロタイプング: PGH) を可能とする効果をもたらした。また解析に先立つ理想的 WGA 法の選択のために, 同一の原理を持つ, 異なる 2 つの commercial kit (Repli-G: qiagen および GenomiPhi: GE healthcare) 間における増幅効率・ADO 率および amplification failure (AF) の率についての比較検討を行った結果, 増幅効率・ADO 率・AF 率はそれぞれ 90%・40%・8% 程度であり, いずれの試薬を用いても有意な差異は認められないことが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume MURAKOSHI YUKITAKA, SUEOKA KOU, TAKAHASHI KAORI, SATO SUGURU, SAKURAI TOMOYOSHI, TAJIMA HIROTO, YOSHIMURA YASUNORI Journal of Assisted Reproduction and Genetics Springer 30/ 10, 1367-1375 DOI 10.1007/s10815-013-0062-6 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 佐藤 卓, 末岡 浩, 佐藤健二, 中林 章, 泉 陽子, 水口雄貴, 高橋香織, 磯部まり子, 大澤淑子, 吉村泰典 遺伝子ハプロタイプ解析を併用した着床前遺伝子診断による福山型筋ジストロフィーの世界初の妊娠報告と有用性の検証 日本人類遺伝学会 第 58 回大会 2013 年 11 月 23 日, 江陽グランドホテル (仙台市)

2. 佐藤 卓, 末岡 浩, 佐藤健二, 中林 章, 泉 陽子, 水口雄貴, 高橋香織, 磯部まり子, 大澤淑子, 吉村泰典 脊髄性筋萎縮症の着床前遺伝子診断において全ゲノム増幅法がもたらす遺伝子ハプロタイプングの効果の検討 日本人類遺伝学会 第 58 回大会 2013 年 11 月 21 日 江陽グランドホテル(仙台市)

3. 佐藤 卓, 末岡 浩, 佐藤健二, 中林 章, 泉 陽子, 水口雄貴, 高橋香織, 磯部まり子, 吉村泰典 複合ヘテロ接合体変異で発症する福山型筋ジストロフィーの着床前遺伝子ハプロタイプ併用診断による世界初の妊娠報

告と有効性の検証 第 58 回日本生殖医学会学術講演会・総会 平成 25 年 11 月 16 日 神戸ポートピアホテル (神戸市)

4. 佐藤卓, 末岡 浩, 中林 章, 佐藤健二, 泉 陽子, 水口雄貴, 高橋香織, 谷垣礼子, 大澤淑子, 吉村泰典 複合ヘテロ接合体変異で発症する福山型筋ジストロフィーを対象疾患とした初の着床前診断の実施と着床前ハプロタイプング併用のもたらす効果 第 31 回日本受精着床学会総会・学術講演会 2013 年 8 月 9 日 別府国際コンベンションセンター・B-Con Plaza (別府市)

5. 佐藤卓, 末岡 浩, 佐藤健二, 中林 章, 水口雄貴, 高橋香織, 磯部まり子, 泉 陽子, 大澤淑子, 青木大輔, 吉村泰典 全ゲノム増幅法を用いた遺伝子ハプロタイプングを基盤とする新たな着床前診断の開発研究 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 2013 年 5 月 10 日 ロイトン札幌, ホテルさっぽろ芸文館(旧北海道厚生年金会館), 札幌プリンスホテル (札幌市)

6. 高橋啓悟, 末岡 浩, 佐藤卓, 中林 章, 佐藤健二, 泉 陽子, 水口雄貴, 吉村泰典 シンポジウム 出生前診断・着床前診断技術の最前線 Whole genome amplification 法を用いた着床前遺伝子ハプロタイプング法の開発 第 16 回胎児遺伝子診断研究会 2013 年 2 月 2 日 東京慈恵会医科大学(港区)

7. 塚本早貴, 末岡 浩, 佐藤卓, 中林 章, 佐藤健二, 泉 陽子, 水口雄貴, 吉村泰典 シンポジウム 出生前診断・着床前診断技術の最前線 ミトコンドリア遺伝子病に対する簡便かつ実用的な着床前遺伝子診断法の開発 第 16 回胎児遺伝子診断研究会 2013 年 2 月 2 日 東京慈恵会医科大学(港区)

8. 佐藤卓, 末岡 浩, 中林 章, 佐藤健二, 泉 陽子, 高橋香織, 櫻井友義, 大澤淑子, 水口雄貴, 吉村泰典 全ゲノム増幅法を用いた福山型筋ジストロフィーを対象とする着床前創始者ハプロタイプ解析 日本人類遺伝学会 第 57 回大会 2012 年 10 月 25 日 京王プラザホテル(新宿区)

9. 佐藤卓, 末岡 浩, 中林 章, 佐藤健二, 泉 陽子, 高橋香織, 櫻井友義, 大澤淑子, 水口雄貴, 吉村泰典 全ゲノム増幅技術がもたらす多様な着床前遺伝子診断ストラテジーと診断精度の検討 第 57 回日本生殖医学会学術講演会・総会 2012 年 10 月 8 日 長崎ブリックホール(長崎市)

10. 佐藤卓, 末岡 浩, 中林 章, 高橋香織, 櫻井友義, 佐藤健二, 大澤淑子, 泉 陽子, 吉村泰典 着床前診断における全ゲノム増幅の選択は, 遺伝子解析効率を決定づけ

る 第 30 回日本受精着床学会・総会学術集会 2012 年 8 月 31 日 大阪国際会議場(大阪市)

11. 佐藤卓, 末岡 浩, 吉村泰典 ワークショップ 臨床(2) 「全ゲノム増幅法から展開する着床前遺伝子診断のパラダイム・シフト」 第 30 回日本受精着床学会・総会学術集会 2012 年 8 月 30 日 大阪国際会議場(大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤卓(SATO SUGURU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 40383898