

日本医療研究開発機構 成育疾患克服等総合研究事業 事後評価報告書

公開

I. 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 胚培養液を用いた非侵襲的着床前胚染色体異数体検査法の開発
(英語) Non-invasive pre-implantation testing for aneuploidy using spent culture medium

研究開発実施期間: 令和5年4月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 倉橋浩樹
(英語) Hiroki Kurahashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 藤田医科大学・医科学研究センター・分子遺伝学研究部門・教授
(英語) Professor, Division of Molecular Genetics, Center for Medical Science, Fujita Health University

II. 研究開発の概要

(和文) 2 ページ以上

1. 研究開発の概要

(目的) 不妊や流産には胚（受精卵）の染色体異数性の関わりが大きく、胚の細胞の一部を生検し NGS 等を用いて解析する着床前胚染色体異数性検査（PGT-A）が移植あたりの妊娠率の向上と流産率低下に寄与することが示されている。日本産科婦人科学会の特別臨床研究においてその有用性が示され、同技術の臨床利用が進む一方で、正倍数性胚移植においても妊娠率は 60-70%、流産率は 10%に止まること、また、ART 施設間でこれらの数字が大きくばらつくことなどから、胚生検による技術的な問題、すなわち生検による侵襲が不利益をもたらしている可能性が否定できず、より低侵襲でかつ手技的に安定した検査手法の確立が求められている。我々を含めた先行研究においては、胚培養液中の cell-free DNA (cfDNA) を利用して、胚生検による PGT-A と同じシステムにより胚異数体検査を行う non-invasive PGT-A (niPGT-A) が試みられている。しかし、母体体細胞由来のゲノム DNA の混入のため検査精度、すなわち胚生検のデータとの一致度が高くないことが問題となっている。精度を上げるには受精後 6-7 日目までの培養期間が必要となり、通常の胚培養のプロトコルを逸脱するため、いまだに普及していない。本研究において我々は、胚培養液中の cell-free RNA (cfRNA) を網羅的に解析、機械学習による判定アルゴリズムを構築することで、母体体細胞由来の混入物の影響を受けない、新規胚染色体異数性判定システムを構築することを目的としている。

(方法) 廃棄胚盤胞（5-6 日胚）100 検体を母体の混入の防止目的で透明帯を除去した。30 μ l の培養液で 24 時間培養し、その胚培養液と胚をペアでサンプルとして収集した。胚は通常の胚生検（TE 生検）による PGT-A を行い、残りの胚と胚培養液から全 RNA を採取した。PGT-A の結果から、胚は正倍数性胚（日産婦：A 判定胚）、異数体胚（C 判定胚）、そしてモザイク胚（B 判定胚）に分類した。A 判定胚と B 判定胚を合わせて移植可能胚と定義した。全 RNA からの cDNA 合成は、NSR（Not so random）プライマー法を用いた RamDa-seq キットを用いて行なった。ライブラリーを作成し、両エンド 150bp の RNAseq をおこない、100 万リード以上のデータが得られたサンプルを解析した。

(結果) (1) RNAseq のデータから、異数体胚の胚培養液の cfRNA には、特異的に lncRNA の頻度が高いことが判明した。NSR（Not so random）プライマー法を用いた RamDa-seq キットを用いることにより lncRNA をはじめとした従来検出困難であった ncRNA が網羅的に解析可能となったことがその理由だと思われた。異数体胚の胚培養液中で特異的に頻度の高い 133 種類の lncRNA を同定できたので、それを特許出願した（特願 2022-128829、PC-38463）。

(2) 胚培養液中の cfRNA のトランスクリプトーム解析をおこなった。正倍数性胚であるか異数体胚であるかは関係なく、胚は胚同士、培地は培地同士で共通した性質を保っていた。正倍数性胚ではとくに培養液中の cfRNA は小胞輸送、オートファジー、RNA 結合タンパク質といった経路を含む制御されたプロセスを反映していた。一方、異数体胚では、全体的な転写の破綻が反映され、ナンセンス介在性 mRNA 分解や p53 を介したアポトーシスといったストレス経路が活性化されていた。また、RNA の輸出や分解経路に富んだ lncRNA-mRNA モジュールも同定された。これらの結果より、cfRNA は細胞損傷による細胞外への漏出という受動的な結果ではなく、能動的かつ制御された機序で培養液中へ放出されていることが示唆された。

(3) 胚培養液中の lncRNA プロファイルから、機械学習を用いた移植可能胚判定アルゴリズムの構築を試みた。予備検討の結果から異数体胚の cfRNA で特徴的な発現をした lncRNA 群を利用した、移植可能胚判定の機械学習モデル構築を行った。10-fold 交差検証を用いた最適判定アルゴリズムを構築する予備検討においては、100%に近い的中率の判定システムを構築できた。一方で、サンプル数を増やし、とくにモザイク胚に関するデータを増加したところ、判定がばらついた。そこで、判定モデルに用いる特徴量としての lncRNA の絞り込みによる過学習の抑制、ならびに機械学習アルゴリズムの最適化を実施したところ、ごく少数の lncRNA がモデルの判定における重要性が極めて高いことが判明した。これらの lncRNA のみを用いたモデル構築にお

いて最も高精度を示したモデルでは感度・特異度の高い判定モデルが構築できた。

(4) 胚培養液中の cfRNA を用いた臨床検査としての移植可能胚判定システムの構築を試みた。臨床現場から得た cfRNA の安定検出系の構築を目的に、保存方法、データ取得量、検出手法の最適化を検討した。培養液を RNA 保護剤入りチューブで凍結保存することで安定性が確保できた。臨床検査としての使用を想定し、RNAseq のデータ量を減らすことを試みたが、判定モデルの精度が低下した。そこで、RNAseq から AmpliSeq への移行を検討し、候補 lncRNA 遺伝子の NGS パネルの設計を実施し、臨床実装を可能とする測定系を構築することができた。

2. 顕著な成果

(1) 医療の分野の進展に資する成果

概要：ヒト胚培養液中の cell-free RNA (cfRNA) の由来は、いまだ十分には解明されていない。本研究における胚培養液中の cfRNA のトランスクリプトーム解析より、培養液中の cfRNA は細胞損傷による受動的な結果ではなく、制御された機序で能動的に培養液中へ放出されていることが示唆された。これは生命科学として重要な知見であり、現在、論文投稿準備中である。

(2) 新技術の創出に資する成果

概要：異数体胚の cfRNA で特徴的な発現をした lncRNA 群を利用して、移植可能胚判定の機械学習モデル構築を行ったところ、少数の lncRNA のみを用いた、高感度、高特異度の判定モデルが構築できた。国際的には胚培養液中の cfDNA が標準的な非侵襲的サンプルと考えられており、胚培養液中の cfRNA に注目した点、そして、cfRNA と機械学習の融合による移植可能胚判定診断システムの構築は、新技術の創出といえよう。

(3) 社会的ニーズに対応する成果

概要：臨床での使用を想定して AmpliSeq での測定系がほぼ再構築できた。これに加えて、少数の lncRNA による新判定システムを用いることにより、低侵襲でかつ精度の高い移植可能胚判定診断システムの低コスト化が実現すれば、企業への導出も現実的なものとなり、臨床実装への第一歩となると思われた。本研究成果が不妊治療の現場に届くことで、本研究の目的である、ART におけるさらなる妊娠率の向上、流産率の低下、胚培養士のストレスの軽減等、ART の質の包括的な向上を通して成育医療への貢献につながることを期待できる。

Objective:

Chromosomal aneuploidy in embryos is a major contributing factor to infertility and miscarriage. Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A), which involves the biopsy of a few embryonic cells followed by analysis using next-generation sequencing (NGS), has been shown to improve implantation rates and reduce miscarriage rates. However, even among euploid embryos, implantation and miscarriage rates remain at 60–70% and 10%, respectively, and these outcomes vary widely across assisted reproductive technology (ART) facilities. This raises concerns that the invasive nature of embryo biopsy may negatively affect clinical outcomes.

Recent efforts, including our own, have explored non-invasive PGT-A (niPGT-A) using cell-free DNA (cfDNA) collected from spent embryo culture media. While promising, niPGT-A has not yet achieved widespread adoption due to low concordance with biopsy-based PGT-A results, primarily because of contamination with maternal somatic DNA. To overcome this limitation, the present study aims to develop a novel aneuploidy detection system by comprehensively analyzing cell-free RNA (cfRNA) in spent culture media and applying machine learning-based classification algorithms.

Methods:

A total of 100 discarded human blastocysts (day 5–6) were used. To minimize contamination from maternal somatic cells, the zona pellucida was removed prior to culture. Each blastocyst was cultured in 30 μ L of fresh medium for 24 hours, after which both the embryo and its corresponding culture medium were collected as paired samples. PGT-A was performed using standard biopsy techniques. Total RNA was extracted from both the embryos and the culture media. Embryos were classified based on PGT-A results into euploid, aneuploid, and mosaic groups. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA using the NSR (Not-So-Random) priming method. Sequencing libraries were prepared, and paired-end 150 bp RNA-seq was performed. Only samples with ≥ 1 million reads were included in the final analysis.

Findings and Implications:

The origin of cell-free RNA (cfRNA) in human embryo culture media remains largely unexplored. Transcriptomic analysis of cfRNA in this study revealed that its presence in the culture medium is not merely a passive consequence of cellular damage but rather reflects a regulated and active secretion process. This observation represents a significant insight in the field of life sciences.

Using a subset of long non-coding RNAs (lncRNAs) that showed distinct expression patterns in aneuploid embryos, we developed a machine learning model for identifying transferable embryos. The integration of cfRNA profiling with machine learning to construct a diagnostic system for assessing embryo viability can be considered a pioneering technological innovation. Furthermore, we were able to reconstruct a measurement platform that holds promise for reducing assay costs and facilitating clinical implementation. If this low-invasive and technically robust diagnostic method can be established for clinical use, it may pave the way for future commercialization and real-world application in infertility treatment. Ultimately, by minimizing the invasiveness of embryo biopsy, this approach may enhance pregnancy rates, reduce miscarriage rates, and alleviate the burden on embryologists.