

## 主論文要旨

論文提出者氏名：小澤 南

専攻分野：小児科学

指導教授：清水 直樹

主論文の題目：体外受精マウス胚に使用した培養液中の cell free DNA 量の検討

共著者：右田 王介、清水 直樹

### 緒言

日本において 2020 年に 6 万人近い新生児が生殖補助医療 (assisted reproductive technology、ART) の恩恵をうけて出生している。体外受精した胚の状態を評価する方法として、胚生検による着床前遺伝子検査がすでに臨床応用されている。しかし、その侵襲が胚変性を惹起する可能性が指摘されている。このような受精卵である胚細胞への影響について、遺伝子発現あるいはタンパク量の変化を検出する評価方法として cfRNA (cell-free RNA、cfRNA) が注目されている。ゲノム変化については、RNA やプロテオームの解析は、その投射影をみているにすぎず、真のゲノム変化は DNA を直接収集し解析を行う必要がある。しかし、胚培養液の cfDNA (cell-free DNA、cfDNA) は極微量で、遺伝子型判定等の検討でも再現性が低い。培養液から cfDNA を回収する方法とともに量と

質を評価する必要がある。培養液 cfDNA を活用する解析の基盤確立のため、胚培養液から DNA の回収と、定量を試みた。

#### 方法・対象

マウス卵を体外受精させ、胚盤胞期胚を得るために 5 日間培養した。胚盤胞期胚に発育した胚の培養液の DNA の回収をエタノール沈殿法で実施した。マウス脳組織 DNA をコントロールに用い、回収した cfDNA についてリアルタイム PCR を使用した検量線法による溶液中の DNA 定量を行った。培養液量の差による回収 DNA 量について、それぞれの cfDNA 推定値の t 検定 (有意水準  $\alpha=0.05$ ) を行い検証した。本研究は聖マリアンナ医科大学動物実験委員会により承認をうけ実施した。(承認番号: 2110011)

#### 結果

個別の培養液の DNA の回収に成功した。5 日目の培養液中には平均 900pg 前後の DNA が含まれていると定量した。また、 $10\mu\text{l}$  の培養液と  $30\mu\text{l}$  の培養液から得られる推定 cfDNA 量に有意差は認められなかった ( $P=0.290$ )。1 細胞に含まれるゲノムの重さ 6–7pg をもとにすると、およそ 130–150 細胞 (ターゲット DNA 配列領域 260–300 コピー) に相当する DNA が回収されたと推定された。

#### 考察

これまでの先行研究で培養液中の cfDNA から胚の異数性を示唆できる等、有用性はすでに示されているものの、先行研究でも cfDNA の検出の不成功例について記載されており、培養液の種類や量も報告ごとに異なっている。先行研究では培養液に含まれる cfDNA の定量も出来ていない。DNA は主に細胞の核内やミトコンドリア内に存在している。細胞がアポトーシスを起こすことで生じる cfDNA は断片化しており、胚培養の細胞数は限られているため、培養液中の核ゲノム由来の cfDNA は微量である。断片化された cfDNA は、採取液中で存在する濃度や DNA 鎖のサイズの偏りを生じると考えられ、定量的に検討することは困難である。微量な DNA の検出において、吸光度法による定量は不純物による影響が大きいと考え、real-time PCR を選択し定量を行った。ゲノムの特定部位にある DNA 断片が偶然に多く、あるいは少なく回収されると、部位別のコピー数の変動によりゲノム DNA としての定量性が損なわれる。定量性を目指した検討はこれまでに報告はない。今回我々の検討は受精卵を胚盤胞期胚まで培養した培養液中から cfDNA の回収及び定量に成功した。培養液量を変更しても回収可能な cfDNA のゲノム当量には有意差はな

く同一培養期間に培養胚が培養液中に放出する DNA はおおよそ一定であると推定された。1 細胞に含まれるゲノム DNA の重さから推定すると今回の我々の検討は、対象配列で考えると、1 ウェルあたり数 fg の DNA を検出した計算になる。回収可能な DNA コピー数がごく微量であることが示された。

本研究により細胞の cfDNA の定量が可能なが示された。しかし、培養細胞の健全性の評価には遺伝学的評価だけでなく、生体システムとして形態や増殖能の機能評価が同時に行われなければならない。加えて、cfDNA 情報から胚の状態を継時的に評価するためには、効率的な単一胚の培養が必要となる。本手法がより確立された際には、遺伝学的にモニターでき、タイムラプスの様な単一胚培養手法と合わせて検討することが望まれる。

今回、我々が目指したように DNA の定量を目的とした、サイズ等の偏りがない cfDNA の回収を目指す場合と、NGS 解析のように断片化した DNA のみを対象として定性的な解析を行う場合では培養液からの cfDNA の回収手法は自ずと異なってくる。

## 結論

我々は、胚培養中の検体から培養胚に無侵襲に DNA を回収し定量することに成功した。胚培養液での遊離核酸量は微量であるが、受精後 5 日間の培養液からエタノール沈殿法でも 1 検体あたり 900pg 前後の DNA が回収できると推定した。ゲノム解析を実施するうえで、培養液に存在する DNA の品質とコピー数は非常に重要である。無侵襲で繰り返し実施可能な本手法は将来の細胞培養技術の改善や、臨床にも応用することが期待される。