

モザイク胚の移植に関する見解-PGDIS2019に参加して

田村 結城（日本リプロジェネティクス株式会社）

PGDIS（Preimplantation Genetic Diagnosis International Society）は、世界の着床前診断の研究、技術開発、社会・倫理的問題の議論をリードしてきた機関です。PGDIS では毎年国際会議を開催しており、モザイク胚の移植に関する見解や、PGT への用語の統一など、この分野における重要な議論が行われてきました。18 回目を迎える今年は、スイスのジュネーブで開催されましたので、演題の中から興味深いものをいくつかご紹介します。

タイムラプスモニタリングと PGT-A の関連性について

胚の染色体異数性は、体外受精後の着床不全や流産の主原因の 1 つである。実際、生殖年齢の女性の 1 胚あたりの平均異数性率は約 50% と推定されているが、出生時の異数性の発生率はわずか約 0.3% である。タイムラプスモニタリングと PGT-A は、どちらも胚選択に使用した場合の臨床妊娠率を向上させるが、問題は移植胚を正確に選択するためにそれらをどのように併用するかである。Kahraman らは、1500 以上の胚において、胚盤胞の TE 生検と PGT-A を行ない、正倍数体と異数体で、最初の卵割と胚盤胞化のタイミングを比較した。モザイク胚を除く全て異数体において、これらの両パラメータの有意な遅延を認めた。しかし胚間の変動が大きく、異数胚をタイムラプスモニタリングのみで正確に同定することはできなかった。一方、どの胚を PGT-A で検査するかを優先し、患者のコスト削減につなげられる可能性が示唆された。

モザイク胚移植の臨床成績について

モザイク胚移植は、着床不全、流産、遺伝性疾患につながる可能性があり、正倍数胚が存在しない時に初めて検討すべきである。Cram らは 500 回以上のモザイク胚移植の結果から、モザイク胚移植によって健康な児を獲得しうるが、移植当たりの成功率は低いことを示した。PGDIS によって確立された基準に従ってモザイクを判定し、モザイク率は約 6% と特定した。この結果はヒトの生物学的知見と一致しており、TE および ICM の解析で得られた研究結果とも類似していた。今回のモザイクに関する発表では、正倍数胚が優先されるべきであるということに加えて、特に低頻度のモザイク胚は妊娠の可能性があることが強調された。また検査結果の解釈だけでなく、研究結果を正確に理解するためにも、正倍数体またはモザイク胚の明確な基準を設け、標準化することの必要性も指摘された。さらに微小欠失や重複の検出について議論され、今回の研究ではこれらの検出が、アーティファクトではなく確かに微小変化を検出しているということ、そしてその結果が、TE や ICM の再検で確認されることを示した。

より非侵襲的な niPGT-A (non-invasive preimplantation genetic testing) について

Rubio らは、培養液を用いて胚の染色体異常の検出を試み、6/7 日目の培養液から胚由来の遊離 DNA (cell free DNA) を回収し、従来の PGT-A と高い一致率 (84%) を示した。さらに従来の PGT-A の結果が正常だったにもかかわらず、niPGT-A で異常が見られた症例で流産が見られたことから、胚培養液の niPGT-A は従来の PGT-A よりも多くの情報を与える可能性を示唆しており、今後の研究の発展が期待される。一方 Handyside らによって、現在の胚生検よりも侵襲性の低い、極体を用いた PGT-A の長所と短所が紹介されたが、現時点では結果の一致率は低いとのことだった。また Gianaroli らは、同じく低侵襲性の材料を提示することを目的として、胞胚腔液を使用した染色体分析の可能性を報告したが、結果の一致率や全ゲノム増幅の成功率、着床率が低く、今後の発展が待たれる。

バイオプシーにおける精子混入の影響について

Lynch らは、PGT-A における ICSI の必要性について発表した。ESHRE や PGDIS では精子 DNA の混入を避ける目的で ICSI 由来胚で検査することを推奨しており、実際 c-IVF 由来胚の検査は全検査の 1% 以下である。精子を人為的に混入させて PGT-A を行なっても、精子の DNA は容易に増幅されないため結果に影響がないことから、c-IVF 由来の胚でも検査対象として問題ないことを示した。

さらに今年の会議や最新の知見を受け、PGDIS が 2016 年に公開していた見解に加え、モザイク胚の移植に関する最新の情報を確認し、モザイクの分類や移植胚の選択基準について、推奨される事項が更新されましたので、以下にその概要を紹介します*。

*PGDIS position statement on the transfer of mosaic embryos in preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A).
PGDIS Newsletter, May 27, 2019

背景

着床前遺伝子検査 (PGT-A) の主な目的は、異数性胚を選別し、体外受精の成績を改善することである。異数性胚を同定し正倍数胚を移植することで、移植あたりの着床率、妊娠・出産率が向上し、流産が防止されることが証明されている。現在多くのラボでは、胚を胚盤胞まで培養し、良好胚から生検した少量の栄養外胚葉細胞 (TE) を検査に用いている。モザイクは単一サンプル中に、染色体数が異なる 2 つ以上の細胞が存在することと定義され、これは胚発生の過程を通して一般に観察される。高感度にコピー数を分析できる技術を用いれば、均一な異数性 (全細胞の異常) と、モザイクを区別でき、コピー数変化を定量できる。より高解像度の NGS 法を使用すれば、部分的なモザイクや微小な染色体の欠失や重複 (> 10Mbp) が識別できる。

新たに得られた知見

1. モザイクの発生率

胚盤胞期のモザイクの発生率は、クリニック間でばらつきがあるものの、おおむね 5~10% であると報告されている。一部のクリニックでモザイク発生率が高いのは、治療方法、胚培養環境、解析手法に起因することもあれば、患者背景に起因することもある。PGT-A を外部の検査機関に委託しているクリニックは、自施設のモザイク発生率を測るために、モザイクの発生率とカットオフ値 (モザイクと定義するコピー数の範囲) の開示を求めるべきである。

2. モザイク胚の移植成績

正倍数胚と比較して、モザイク胚、または部分モザイク胚の移植は、正常な妊娠をし得るが、着床率の減少および流産率の上昇と関連している可能性がある。一般に、40%未滿のモザイク胚移植で成績が良好だったのに対し、40~80%のモザイク胚では妊娠率が低く、複数のモザイクを持つ胚ではさらに成績が悪い。モザイク胚移植のデータはまだ 500 個程度だが、多くのモザイク胚はある程度の発生能を有すると期待されている。また羊水を使った出生前診断の結果は正常な正倍数性の胎児であったことから、PGT-A で見られたモザイクは、限られた培養環境でのみ見られる現象である可能性を示唆している。今日までに報告されたモザイク胚移植後の出生は、すべて染色体異常を持たない健康な児であり、モザイク胚移植後の予後は、モザイクになっている染色体の種類とは無関係であることが明らかになっている。

3. モザイク胚の遺伝学的解析

PGT-A で異数性と診断された廃棄胚を再分析した研究によると、元の検出された異常と、ICM、及び TE を含む他の領域と、一貫した高い一致率 (>95%) を示した。またモザイク頻度が高い (>40~80%) 場合、TE や ICM との一致率が高い傾向にあり、モザイク頻度が低い (<40%) 場合、TE や ICM との一致率が低く、多くの胚は一樣に正倍数体であったと報告されている。

4. 技術的な問題

NGS を使用した PGT-A では、検査の一連の過程の中で、さまざまな技術的問題により、誤ってモザイクと判定される可能性がある。

(i) 方法：生検した細胞数が少なすぎることによる細胞の損傷、DNA のロスが、細胞の染色体プロファイルに影響を与える。

(ii) 分析：染色体マッピングを正規化するために使用されるアルゴリズムは、染色体プロファイルに影響を与える。

さらに粗悪なテンプレート DNA からの全ゲノム増幅は、モザイクや部分モザイクの検出につながる可能性があり、NGS 法を使用している NIPT でも同様のエラーが生じる可能性がある。

これらの知見は臨床でのPGT-Aにどう影響するか？

ほとんどの (>90%) TE 生検の結果は、一様な正倍数性、または1つ以上の染色体の完全な異数性だが、一部の胚は中間のコピー数を示すモザイク胚の可能性がある。臨床ではこれらモザイク胚が、移植に利用できる唯一の胚であることが起こり得る。モザイク胚は妊娠に至る可能性があり、移植前に代替案を含めた患者への適切なカウンセリングが必要である。

ラボへの提言

1. クリニックでは、生検技術がその後の分析に影響を与える可能性がある。安定したバランスの良い全ゲノム増幅のために、5個以上の細胞を生検することが望ましく、細胞が5個未満の場合、ノイズやモザイクの検出に影響を及ぼす可能性がある。残りの胚発生への影響を最小限に抑えるために、生検する細胞は10個以下にすることが望ましい。生検にレーザーを使用する場合、照射点を最小にし、細胞接合部に当てることを望ましい。モザイクの発生率が一貫して高いクリニックでは、根本的な原因を特定するために、胚の発生とPGT-Aの両方の過程を調査するべきである。
2. 検査のプラットフォームが異なれば、モザイク（ノイズも含む）の検出/定量化能力も異なるため、コピー数を再現よく測定可能なプラットフォームのみを使用する。モザイクの検出限界および定量限界は、細胞混合実験で確認できる。コピー数が設定された下限値を下回る胚は正倍数体として報告し、上限値を上回る胚は異数体として報告する。公表されている典型的な下限値は20%、上限値は80%である。これらのカットオフ値は、検査会社から委託元に報告する必要がある。PGT-Aを検査会社に依頼しているクリニックは、適切なモザイクの報告と患者へのカウンセリングのために、これらのカットオフ値の開示を求めることを強く勧める。
3. モザイクの発生と増殖を生物学的に考察すると、モザイクとして分析された細胞片は周囲のTE、または胚の残りの細胞の結果を正確に反映していない可能性がある。モザイク頻度として報告された数値は、実際には幅広いデータの平均値であり、モザイク胚の移植（または廃棄）を考慮するカップルにとって、判断の基準点としてのみ考えるべきである。モザイクスペクトルは、20%の比較的低リスクのモザイクから80%の比較的高リスクなモザイクまでの範囲の、連続的なリスク勾配として考える。しかしクリニックは、リスクとその影響に関して、独自の判断に基づいて、報告およびカウンセリングに使用すべきである。
4. 検査報告書の書式は、モザイクの報告、モザイク判定のカットオフ値、および同定された染色体異常の種類を含むように更新すべきである。

臨床家への提言

1. 着床前の胚から少数の細胞を生検して行なう遺伝子検査は、技術的、および生物学的要因（モザイクを含む）上、100%正確ではない点を患者に引き続き伝えるべきである。
2. 患者への資料および同意書には、モザイクの可能性と移植した際の潜在的なリスクに関して追記し、PGT-Aを推薦する人（医師や遺伝カウンセラー）から患者に説明する必要がある。
3. 移植胚はモザイク胚よりも正常胚を優先する。
4. モザイク胚移植を検討する場合、以下の選択肢についても患者と話し合うべきである：
 - (i) 移植可能な正常胚を得るため、さらなるPGT-Aサイクルの開始
 - (ii) 適切なカウンセリング後の、低レベルモザイク胚の移植

PGT後に妊娠した場合、胎児や胎盤の出生前診断が推奨されるが、特にモザイク胚移植後は重要である。現在14週目以降の羊水検査は、胎児の遺伝学的検査の最も代表的なものである。初期の（10週目以降）胎盤の検査では、24染色体すべての胎盤コピー数を分析するNIPT法も適用可能だが、単純な5染色体（21、18、13 XおよびY）のNIPT検査は適切ではない。超音波検査も胎児の異常を見つけるのに有用であり、さらにPAPP-Aスクリーニングやドブラー超音波は、胎盤の機能不全を識別するのに役立つ。

移植するモザイク胚の優先順位決定に関する提言

1. 低レベル（低リスク）のモザイク胚は、高レベル（高リスク）のモザイク胚よりも優先される。モザイク頻度は、染色体の種類よりも良い予測因子であると考えられる。特定の症候群に関連する染色体の場合は、ケースに応じたカウンセリングを行ない、高リスクのモザイク胚移植は慎重かつ適切な遺伝カウンセリングの後にのみ行われる。
2. 移植する単一の染色体のモザイク胚の選別は、個々の染色体が関連する疾患に関する知見と、モザイク頻度の両方に基づくべきである。モザイク頻度のレベルが似ている2つのモザイク胚の間で選択する場合は、片親性ダイソミーに伴う疾患、重度の子宮内発育遅延、または出生する染色体異常（13、18、21、性染色体）に關与する染色体のモザイク胚は優先順位を下げる。さらにどの染色体が何の疾患と関連するかを決定する際には、Gratiらによる総説を参照することができる。また最近のASRMの見解では、モザイク胚の移植に関連したカウンセリングの問題について言及されている。

まとめ

PGTのゲノム解析技術の発展により、一細胞または少数の細胞レベルで、さまざまな種類の遺伝的異常を検出できるようになり、感度や分解能の向上により、モザイクや微小変化等、より広範な染色体異常を検出可能になったが、未だその知識や成績は発展途上である。体外受精は、自然妊娠と比較して染色体異常のリスクが高いわけではなく、PGT-Aのデータからモザイク胚移植は、カップルにとって比較的 안전한選択肢であると考えられる。しかしそれでもモザイク胚移植は、専門家の助言と適切な遺伝カウンセリングの後にのみ考慮されるべきである。モザイク胚移植で起こり得るリスクや、妊娠の可能性を患者に伝える際は、全ての染色体の異数性を調べるNIPT検査や羊水検査等によってフォローアップすることを伝えるべきである。

モザイク胚移植の臨床成績をよりよく理解し、モザイク胚移植を検討している患者に対する適切な遺伝カウンセリングのために、臨床医によるすべてモザイク胚移植の長期追跡調査を奨励する。胎児の異数性検査のためのNIPTは、希少なトリソミーを含む多くの胎児モザイクを検出可能であることが示されており、モザイク胚移植後の追跡調査に適している。さらに可能であれば出生時の胎盤組織の収集は、モザイク胚移植の安全性を理解するのに有用である。研究レベルでは、PGT-Aを行なっているモザイク廃棄胚を用い、残りの胚盤胞のNGS解析をすることは、最初の生検測定的重要性を明らかにし、モザイク胚の遺伝子型に関する情報を提供する。

本見解は、PGT-Aが一般に認められていない本邦においては、現状にそぐわない点が多いと思います。しかし世界ではモザイクがどのように理解され、どのように考えられているかを知ることが、今後PGT-Aが臨床に導入されることになった際には、大変重要になってくると思いますのでご紹介させて頂きました。
