

Perspectives of Reproductive Science

vol.

2



編集会議

編集委員長 吉村やすのり^{いのち}生命の環境研究所 吉村 恭典 先生

編集委員 山口大学 大学院医学系研究科 産科婦人科学講座 教授 杉野 法広 先生
群馬大学 大学院医学系研究科 産科婦人科学 教授 岩瀬 明 先生

特集論文

- **ナイーブ型ES細胞から完全なヒト14日胚モデルの作製**
Complete human day 14 post-implantation embryo models from naive ES cells
- **流産症例における母体血中胎児 cell-free DNA を用いた染色体評価：
コペンハーゲン流産研究グループの前向きコホート研究**
Cell-free fetal DNA for genetic evaluation in Copenhagen Pregnancy Loss Study (COPL): a prospective cohort study
- **反復着床不全における出生に対するプレドニゾンの効果-無作為化比較試験**
Prednisone vs Placebo and Live Birth in Patients With Recurrent Implantation Failure Undergoing In Vitro Fertilization :
A Randomized Clinical Trial

編集委員長



Yasunori Yoshimura

吉村やすのり
いのち
生命の環境研究所
吉村 泰典 先生

編集委員



Norihiro Sugino

山口大学 大学院医学系研究科
産科婦人科学講座 教授
杉野 法広 先生

編集委員



Akira Iwase

群馬大学 大学院医学系研究科
産科婦人科学 教授
岩瀬 明 先生

ナイーブ型ES細胞から完全なヒト14日胚モデルの作成

吉村(司会) ヒト受精卵には胚を受精後14日以降、または原始線条の形成以降、培養しないとすするルールがあり、日本を含め、多くの国がこのルールを採用しています。2021年5月末、国際幹細胞学会がガイドラインを改訂し、ヒト胚の受精後14日以降の体外培養が禁止項目から除外されたことが議論を呼んでいます。このような経緯から、近年、ヒト発生を理解する新たな研究方法として、ヒト由来の幹細胞をもとに、ヒトの初期胚の構造を再現した細胞培養モデルを開発する研究が注目されています。今回は最初に、ヒト14日胚モデルの作成に関する論文を取り上げてみました。

杉野先生、まずイスラエルの研究グループのヒト14日胚モデルの作成のためのナイーブ型ES細胞の分化誘導について、説明していただけませんか。

杉野 本研究チームはこれまでに、マウスを使って、ナイーブ型胚性幹細胞(ES細胞)から着床後8日胚モデルを作製しています。この研究では、ナイーブ型ES細胞から胚体外の組織となる原始内胚葉に分化させた細胞、胎盤になる栄養外胚葉に分化させた細胞を作製し、ナイーブ型ES細胞と共に3者を混合培養することにより胚モデルの作製に成功しています。今回のヒト胚モデルの作製においても、この経験に基づいて行われています。そのため、まず、ヒトナイーブ型ES細胞から3つの細胞集団に分化させ、その後、混合培養しています。ひとつは将来、体のすべての組織を構築する細胞である胚盤葉上層(エピプラスト)で、これは、ナイーブ型ES細胞を“HENSM”という培養液で培養し多能性を維持させています。2つ目は、胚体外の組織である羊膜や卵黄嚢を形成する原始内胚葉になる内胚葉細胞と胚外中胚葉細胞で、これは、ナイーブ型ES細胞を“RCL”という培養液で培養して作製しています。3つ目は、将来、胎盤となる栄養外胚葉になる栄養膜細胞ですが、ナイーブ型ES細胞を“BAP(J)”という培養液で培養して作製しています。

吉村 ヒト胚モデル作成には、エピプラスト、内胚葉細胞/胚外中胚葉細胞、栄養膜細胞が必要となりますが、どのように混合すれば良いのでしょうか。

杉野 上述した方法で、ナイーブ型ES細胞から、エピプラスト、内胚葉細胞/胚外中胚葉細胞、栄養膜細胞の系統に分化誘導した細胞を1:1:3の比で120個程度の細胞数で混合培養することが、ヒト胚モデルの作製の最適条件としています。ちなみに、ヒト胚盤胞を構成する細胞は200個程度ですので、細胞数もこれに近い数に調整していると言えます。

この3種類の細胞を混合培養することで、最終的に、エピプラスト、胚盤葉下層、胚外中胚葉、栄養膜細胞からなる着床後ヒト胚のほぼすべての細胞系統および組織区画を再現した球状構造の胚モデルが形成されました。さらに、着床後14日に相当するまでのキーとなる構造変化が経時的に確認されたことから、ナイーブ型ES細胞から完全なヒト14日胚モデルの作製に成功したと結論づけています。

吉村 これまでの幹細胞を用いた胚モデルの作製の報告と、今回はどのような点が異なっているのでしょうか。

岩瀬 本研究では、エピプラスト様細胞、胚盤葉下層様細胞、栄養膜様細胞から、胚外中胚葉細胞、卵黄嚢腔、絨毛膜腔、二層性胚盤それぞれに類似した細胞または構造が確認されています。さらに、これらの細胞・構造は、*in vivo*でのヒト着床胚に類似した配置を呈しています。他の報告では、これらの細胞、構造の一部については再現されていません。また本報告では、BLIMP1陽性の始原生殖細胞様細胞も確認されていますが、類似の細胞を確認していない報告もあります。

吉村 栄養膜様細胞は、どのような役割をしているのでしょうか。

岩瀬 栄養膜細胞系列を除いて混合培養した場合、卵黄嚢様の区画は形成されず、2層性胚盤構造の組織化も認められませんでした。栄養膜細胞は、着床胚の構造形成に必要な要素であると考えられます。

吉村 今回のモデルでは、着床後から胚層形成に至るまでの過程を*in vitro*で再現することができたのですが、どのような臨床的意義があるのでしょうか。杉野先生いかがですか。

杉野 これまで、ARTの成功率は向上してきましたが、未だ十分に満足のものではありません。その原因のひとつとして、胚発育の異常が考えられます。結果として着床不全や早期流産となります。ARTを行っても、すべての胚が胚盤胞まで発育す

るとは限りません。胚盤胞までの发育メカニズム、例えば胚体だけでなく支持細胞の役割など、初期の胚発生メカニズムを解明することで、体外受精や胚培養の方法などが改善され成功率が高くなる可能性があります。

早期流産の中には、胚发育の過程に何らかの原因があると考えられる先天性欠損症などの先天性疾患がありますが、その原因やリスク因子は十分解明されていません。胚発生や发育過程に関する知識がさらに深まれば、それらの原因やリスク因子の解明につながり、新しい治療法や予防法が得られる可能性があります。

吉村 このような胚モデルを作製することにより、将来ヒト多能性幹細胞から組織や臓器を分化誘導させることは可能になるのでしょうか。岩瀬先生いかがですか。

岩瀬 iPS細胞を用いた再生医療としては、網膜色素上皮や心筋細胞といった均一な細胞集団を移植する治療が臨床応用されています。近年では、より複雑な系として、構造的・機能的に生体内器官に類似したオルガノイドを*in vitro*で幹細胞から再構成する研究が盛んに行われています。ヒト多能性幹細胞による胚モデル作製がさらに進歩すると、組織や臓器の分化誘導過程およびその障害による先天性疾病発生機序の解明に役立つことが期待されます。

吉村 これまでは14日ルールでヒト胚の分化には一定の規制があったのですが、多能性幹細胞からの胚モデルの作成ということになると、別の倫理規制も必要になるかと思えます。杉野先生いかがですか。

杉野 現在のところ、Blastoidのような、これまで報告されている胚様構造体(胚モデル)は、胚盤胞と機能的に同等であると言えるだけの根拠はありませんし、今回報告された胚モデルは、培養を続けたとしても胎児にはなりえないとされています。各国の規制に目を向けると、オーストラリアでは、Blastoidを「胚」と同じ仕方で研究規制すると決定しているのに対して、日本、イギリス、アメリカでは、少なくとも現時点で胚モデルを胚と同等と見なしていません。日本は、胚モデルを胎内に戻したとしても個体発生するという科学的知見が現時点でないこと(発生能力の欠如)を根拠に、胚モデルは胚と異なるという立場を取っています。しかし、胚モデル研究の進歩は速く、さらに本物に近づく可能性も考えられ、臓器形成が可能になるかもしれません。そうなると、胚モデルを科学的、倫理的にどう位置づけたらいいのか。研究のルールの見直しが必要になるかもしれません。

吉村 2021年にES細胞やiPS細胞から胚盤胞様構造をもったBlastoidが作製されました。それから2年でヒト胚14日モデルが作成されています。2023年12月にも、京都大学の研究グループも、ナイーブ型ヒト多能性幹細胞を用いて、原始内胚葉へ誘導し、着床前後の胚を再現したモデルを作製したことを報告しています。素晴らしい進歩です。こうした幹細胞由来の胚モデルを用いることより、ヒト胚では解析が困難であったヒト発生の詳細なメカニズムの理解が深まることが大いに期待されます。

胎児 cell-free DNA 検査の有用性

吉村 胎児染色体の数的異常は流産の最大の原因となることはよく知られています。出生前遺伝学的検査においては、妊娠10週以降に母体血を用いて胎児の cell-free DNA (cfDNA) が調べられています。2番目に取り上げた論文は、この胎児の cfDNA が、流産児の染色体異常を判定する上で有効かどうか検討したものです。杉野先生、まずプロトコールを説明していただけませんか。

杉野 試験デザインは前向きコホート研究です。対象患者は18歳以上で、超音波検査で子宮内妊娠が確認され、在胎22週(154日)より早期に流産した女性1,000名を対象としています。このうち333名から子宮内の妊娠組織が採取されました。組織を用いた染色体核型の診断はダイレクトシーケンスで決定されました。母体血液は、子宮内妊娠組織の除去治療が実施される前、あるいは妊娠組織の排出から24時間以内に採取されました。母体血中の胎児 cfDNA を用いた染色体検査は、通常の新規出生前診断 (NIPT) と同様に行われました。評価は、胎児 cfDNA 染色体検査による流産児の異数性検出の感度と特異度のほか、妊娠組織排出後に母体血中の胎児 cfDNA がどの程度存在するか、母体血中の胎児 cfDNA の割合と妊娠週数との関係などが検討されています。

吉村 結果はどのようでしたか。

杉野 対象患者の妊娠週数は、妊娠5~21週で、実際は7~14週が大多数を占めており、平均週数は10週でした。母体血中における胎児 cfDNA から流産児の異数性を検出する感度は85%で特異度は93%と高く、実質的に母体血中の胎児 cfDNA から流産児の異数性を検出することが可能であるという結果でした。

吉村 流産との関係で、妊娠組織排出後どれくらいまでに採血すれば良いのですか。



杉野 血中の胎児cfDNAは出産後に急速に減少することが知られています。本研究では、妊娠組織の排出後24時間以内に採取された血液を解析しています。検査の結果、判定不可の頻度は妊娠組織の排出から6時間以内であれば13%、6~12時間であれば40%、12~24時間であれば35%でした。したがって、流産して妊娠組織が排出されたとしても、24時間以内なら約60%は判定が可能です。6時間以内に血液を採取すれば、さらに高い確率で判定が可能と考えられます。

吉村 妊娠期間はどのくらいから有効ですか。

杉野 今回の検討では、妊娠5~21週の血液が採取されています。検査の結果、判定不可の頻度は妊娠7週までが約50%で、その後は安定して10%でしたので、妊娠7週以降であれば、高い確率で判定可能と考えられます。また、妊娠7週前でも50%は判定可能ということになります。なお、母体血中における全cfDNAのうち胎児cfDNAの占める割合は、妊娠週数で大きな差はありませんし、流産した女性と妊娠継続した女性との間にも差はありません。

吉村 臨床的意義はどのようにお考えですか。

杉野 流産は臨床的に認められた妊娠の15~20%と高頻度に発生する疾患です。初期流産の原因としては、胎児の染色体異常が50~60%を占めています。流産の原因が胎児染色体異常であることが分かれば、母体に原因があると考えられる正常染色体の流産と比較して、次の妊娠は生児を得られる可能性が高いことから、流産組織の染色体異常の有無を検査することは重要です。しかしながら、流産組織を用いた染色体検査の成功率は53%と高くはありません。これは、主に生細胞の培養の失敗が32%と母体細胞の混入が15%と言われています。また、流産した女性の中には、妊娠組織が排出されてしまい、組織が採取できない場合もあります。本研究でも3分の1の症例が組織を採取できませんでした。そのため、母体血中の胎児cfDNAから流産児の染色体異常を判定することができれば、大変有用な検査法となります。

現在、母体血中の胎児cfDNAを用いた胎児異数性の検査(NIPT)は、正常妊娠の女性に行われていますが、今回の研究から流産患者にも有意義な検査となることが示されました。たとえ妊娠初期であっても、流産した女性に対し、高い確率で母体血から胎児の異数性を診断できることが明らかとなりました。これは、偶発的に起こった流産の原因についての説明や、次回の妊娠についてのカウンセリングに有用な情報を提供するものです。

反復着床不全におけるプレドニゾンの効果

吉村 プレドニゾンは、反復着床不全の患者に対し、着床率や妊娠率を向上させるために実地臨床で使用されています。最後に取り上げる論文は、反復流産を経験した女性に対するプレドニゾンの効果を検証した研究です。岩瀬先生、まずプロトコルから説明していただけますか。

岩瀬 本研究は、中国の8施設で行われた多機関共同研究になります。対象患者は、反復着床不全症例ですが、本研究では

2回以上の良好胚移植不成功例と定義されています。また38歳未満に限定され症例がエントリーされています。本研究はプラセボ対照無作為化二重盲検比較試験であり、715例が、プレドニゾン群またはプラセボ群に割り付けられています。

ホルモン補充による凍結融解胚移植周期において、内膜調整開始時からプレドニゾン10mgまたはプラセボが投与され、妊娠症例については12週まで継続されました。主要評価項目は妊娠28週以降の生児の出生率になります。

吉村 出生率や流産率に及ぼす影響はどのようでしたか。

岩瀬 Intention-to-treat (ITT) 解析における出生率は、プレドニゾン群で37.8%、プラセボ群で38.8%であり両群で有意差は認められませんでした。また着床率、臨床妊娠率にも有意差は認められませんでした。

流産率についても全体では両群間に有意差は認められませんが、生化学的流産に限定すると、プレドニゾン群で17.3%、プラセボ群で9.9%であり、プレドニゾン群で高い傾向を認めました。

吉村 早産率がプレドニゾン投与群で高かったことは、どのようなことが考えられますか。

岩瀬 今回の検討では、双胎妊娠がプレドニゾン群で4.2%とプラセボ群の1.7%と比較し、高い傾向が認められました。これはプレドニゾン群の高い早産率と関係する要因のひとつと考えられます。反復流産や喘息等に対し、妊娠初期にプレドニゾンが投与された症例における早産リスクについて報告した論文がこれまでも複数あり、プレドニゾンの作用そのものが影響している可能性もあります。

吉村 この論文から、体外受精における反復着床不全に対するプレドニゾンの効果が否定的であることが示されました。プレドニゾンによるその他の周産期合併症はありませんか。

岩瀬 今回評価された妊娠糖尿病、妊娠高血圧症候群、胎盤位置異常、産後異常出血等には両群間で有意差は認められませんでした。妊娠悪阻については、プレドニゾン群で有意に少ないという結果が得られています。また出生児についても両群間で有意差が認められた指標はありませんでした。

吉村 本日はお忙しいところ御二人の先生方にお集まりいただき、貴重なご意見を伺うことができました。ありがとうございました。



ナイーブ型ES細胞から完全なヒト14日胚モデルの作製

Complete human day 14 post-implantation embryo models from naive ES cells
Oldak B et al. Nature. 2023; 622(7983): 562-573.

Point ナイーブ型ES細胞を出発材料に、13~14日胚に相当するヒト胚モデル (SEM) の作製に成功した。

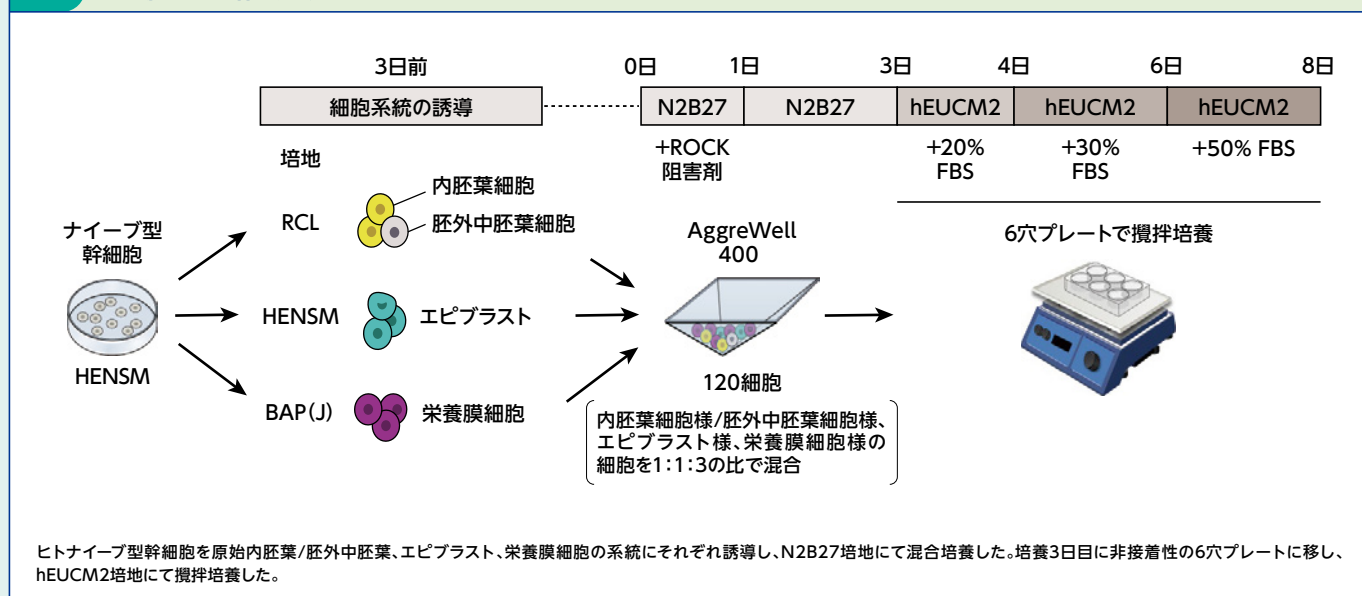
遺伝子組換えのないヒトナイーブ型幹細胞 (ES細胞) から、胚盤葉上層 (エピプラスト)、胚盤葉下層、胚外中胚葉 (ExEM)、栄養膜細胞からなる着床後ヒト胚のほぼすべての細胞系統および区画を再現した胚モデルを開発した。13~14日 (カーネギー発生段階6a) に相当するまでの発生イベントが観察され、胚盤および二層胚盤の形成、前胚盤腔形成、極性をもつ羊膜形成、前後対称性の破綻、始原生殖細胞 (PGC)、臓側および壁側内胚葉形成を伴う極性をもつ卵黄嚢、絨毛膜腔および付着基で定義される胚外胚盤拡張、栄養膜層を取り囲む細胞群における合胞体 (複数の核をもつ細胞) や小腔の存在が確認された。

学術的背景

ジェイコブ・ハンナ教授らの研究チームは2022年、マウスのナイーブ型幹細胞を出発材料に、3次元の組織構築を示す原腸陥入後の段階までの胚モデルを作製することに成功している。この胚モデルは、ナイーブ型幹細胞と、原始内胚葉 (PrE) 系統およ

び栄養外胚葉 (TE) 系統に分化誘導 (プライミング) させた細胞の混合培養により作製し、神経および体節の形成、卵黄嚢や尿嚢まで備えた、ほぼ完全な8.5日胚に相当する発生が再現された。

図1 ヒト胚モデル作製の流れ



結果

● 分化誘導の培養条件の検討
マウス胚モデル作製での経験に基づき、ヒト胚モデルの構築を試みた。マウスでは、胚性および胚外性区画からなる胚モデルを得るには、最適な培養条件と原始内胚葉系統および栄養外

胚葉系統への迅速な誘導が必要であり、それぞれGata4およびCdx2の一時的な発現により達成された。また、ヒト胚はマウス胚とは異なり、着床初期に胚外中胚葉も必要となる。そこで、ヒト胚モデルにおいてもGATA4遺伝子の一時的な発現を通じて、

ナイーブ型幹細胞から原始内胚葉および胚外中胚葉の系統へと迅速かつ効率的に誘導する条件を検討した。しかし、最も効果的に分化誘導できる条件では、GATA4遺伝子を強制的に発現する必要がないことが明らかとなった。

栄養外胚葉への誘導条件についても同様に検討され、最適な培養条件ではCDX2遺伝子の強制的な発現は必要ないことが確認された。これらの結果により、以後の検討ではGATA4遺伝子やCDX2遺伝子が組み込まれていない、ナイーブ型幹細胞が用いられることとなった。

● ES細胞からヒト14日胚までの発生モデル ……………

ナイーブ型幹細胞を出発材料とし、細胞数、細胞混合物内の比率、各培養段階の培地組成といった凝集塊形成のための条件が検討された。エピプラスト、内胚葉細胞/胚外中胚葉細胞、栄養膜細胞の系統に分化誘導した細胞を1:1:3の比で混合することが、最適条件であることが確認された(図1)。

8日間の培養により、凝集塊は全体的に成長し、明確な組織区画、自己組織化、および内腔形成を伴う球状構造が確認された。このヒト胚モデルは、各系統マーカーの発現に加え、ヒト着床胚と共通する構造を認め、適切な細胞配置が観察された(図2A)。培養6日目にヒト着床胚と同様の胚を形成する割合は、2種類のES細胞(WIBR3およびWIBR1)でそれぞれ1.64%および1.09%と見積もられた(図2B)。

● 二層様構造の形成 ……………

ナイーブ型幹細胞マーカー(DNMT3およびSTELLA)の発現が消失し、培養3日目にはプライム型幹細胞マーカー(OTX2)の発現上昇を認めた。培養4日目までにSEM内に明確なエピプラスト様の組織を形成し、その後大幅に成長した。エピプラスト様の区画には、培養6日目から細胞の極性化および内腔の形成を認め、内腔に向けて整列するエピプラスト様の細胞が観察された。また、初期の羊膜嚢様の構造パターンがみられた。

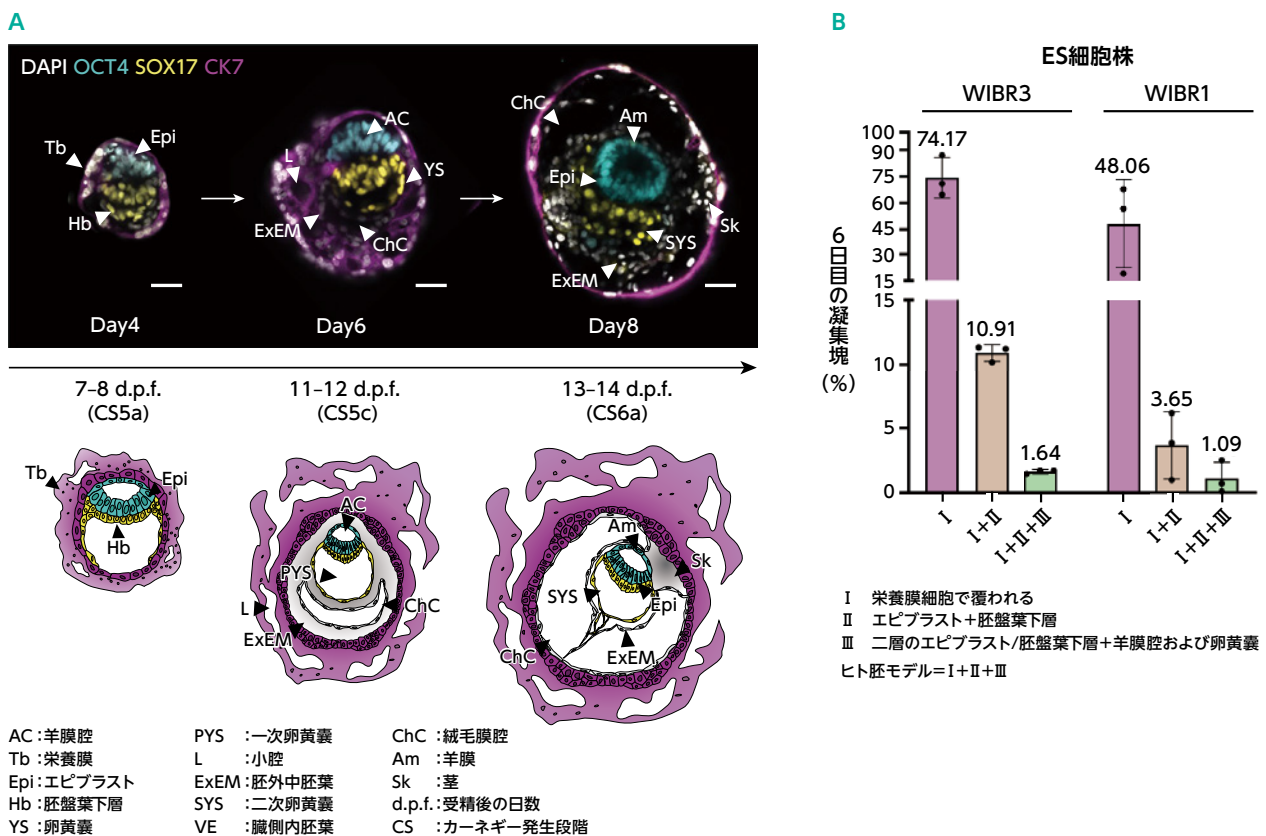
培養8日目になると、エピプラスト様の構造は明確な円盤形状を取得し、巨大化した羊膜様の小腔が観察された。さらには、一部のSEMではあるが、初期の始原生殖細胞様の細胞の存在も確認された。

● 卵黄嚢および絨毛膜腔に相当する内部構造の形成 ……………

ヒト胚の場合、カーネギー発生段階がCS4からCS5の間に卵黄嚢の形成が始まる。本研究のヒト胚モデルでは卵黄嚢の空洞のような構造が頻繁に見られ、培養6日目にはより顕著となった。培養6~8日目に胚外中胚葉様の細胞の内部空間が絨毛膜腔様の構造であることが観察された。さらに、二層胚盤を栄養外胚葉に接続する胚外中胚葉様の細胞集団が観察され、付着茎に似た構造が確認された。

栄養膜様細胞を加えずに混合培養を実施した場合、胚モデルには卵黄嚢様区画の形成されないことが示され、エピプラスト様および卵黄嚢様区画、および腔の形成に栄養膜様細胞が影響することが示された。

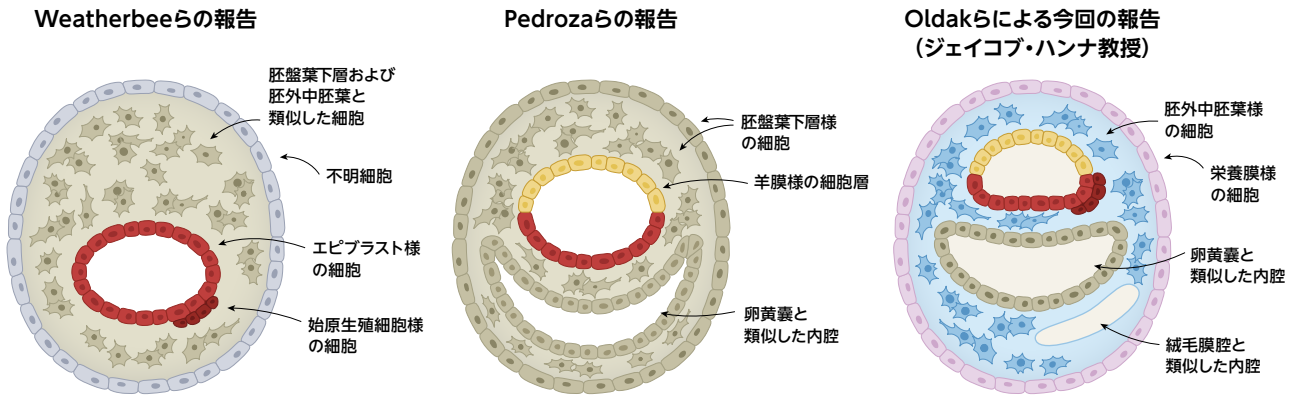
図2 ナイーブ型幹細胞からヒト胚モデルの自己組織化



(A) 培養4~8日目におけるヒト胚モデルの免疫染色像(上)および図解(下)。d.p.f.は概算値を示す。

(B) WIBR3(46XX)およびWIBR1(46XY)ES細胞株を用いた場合の凝集塊の形成率。3回の実験における平均±標準偏差を示す。

図3 幹細胞を用いたヒト移植後胚モデル (Moris N. Nature. 2023; 622(7983): 469-470.)



ナイーブ型幹細胞を用いたヒト胚モデルに関する報告が、Nature誌に同時掲載された。これらのモデルでは正しい培養条件下で自己組織化し、13~14日胚の特徴に似た特徴を持つ構造を認めた。いずれのモデルにもエピプラストに似た細胞層が含まれており、WeatherbeeらのモデルとOldakらのモデル(本研究)では、始原生殖細胞(精子または卵子を形成)に似た細胞が確認された。3つのモデルには、羊膜(羊膜嚢を形成)、胚盤葉下層、胚外中胚葉(後に成長期の胚を囲む絨毛膜腔を形成)、栄養膜(胎盤の一部を形成)などが確認されているが、モデル間で異なる。

● **栄養膜様細胞の成熟**

48~74%の凝集塊が栄養膜様の細胞で取り囲まれており、GATA3、CK7、SDC1といった栄養膜マーカーの発現が確認された。栄養膜様の細胞に覆われた凝集塊の約90%には合胞体様の層内にさまざまなサイズの小腔が観察された。ヒト絨毛性ゴナドトロピンβの免疫染色により、合胞体様の細胞にはホルモンタンパク質が豊富に存在し、細胞内小胞にも濃縮されていることが示された。

● **scRNA-seq解析による検証**

本研究のヒト胚モデルでは、13の異なる細胞クラスターが特定され、それぞれの特徴が、ヒト胚の転写プロファイルおよび細胞の構成に似ていることが検証された。細胞クラスターの中には、早期の血液前駆細胞に相当する希少な細胞集団も検出された。

まとめ

今回示したヒト胚モデルは受精卵や子宮を一切利用せずに作製可能であり、これまで不可能であった着床後から胚層形成に至るまでのヒト胚の研究に新たな道を開く可能性が期待される。

Keyword

SEM ; stem-cell-based embryo model

sEmbryos、合成胚、幹細胞由来胚モデルまたはstembroidsとも呼ばれている。

胚盤葉上層 (エピプラスト)

体のすべての組織を構築する未分化な細胞集団、胚そのものを形成し、後に胎児を形成する。

胚盤葉下層

卵黄嚢ともよばれ、胎盤が完成するまでの間、胎児に栄養を供給する胚の成長をサポートする。

カーネギー発生段階 (Carnegie stage ; CS)

胚の発生段階を提供するために使用される23段階(受精後8週)の標準化システム。

PDGFRA

受容体チロシンキナーゼであり、血小板由来増殖因子(PDGF)をリガンドとして活性化する。骨髄間葉系幹細胞のマーカータンパクであり、原始内胚葉/胚外中胚葉系統のマーカーとなる。

栄養膜細胞

細胞性栄養膜細胞、合胞体性栄養膜細胞、絨毛外性栄養膜細胞の3種類に大別され、細胞性栄養膜細胞は未分化な細胞で、絨毛外性栄養膜細胞および合胞体性栄養膜細胞へと分化する能力をもつ。合胞体性栄養膜細胞は細胞性栄養膜細胞の融合によりつくられる多核の細胞であり、母体と胎児の間の栄養およびガスの交換を仲介すると共に、さまざまなホルモンを産生することで妊娠の維持に重要な役割を担う。絨毛外性栄養膜細胞は子宮内膜組織に浸潤し、母体血の流れを制御する。

流産症例における母体血中胎児 cell-free DNA を用いた染色体評価： コペンハーゲン流産研究グループの前向きコホート研究

Cell-free fetal DNA for genetic evaluation in Copenhagen Pregnancy Loss Study (COPL): a prospective cohort study
Schlaikjær Hartwig T et al. Lancet. 2023; 401(10378): 762-771.

Point

妊娠期間が短い女性であっても、流産時のcell-free DNA (cfDNA)を用いた胎児の染色体状態の評価が流産の原因調査に有用であることが示された。

流産の原因調査を目的とするコペンハーゲン流産研究 (COPL) の一環として、18歳以上で在胎22週 (154日) より早期に流産した女性1,000名を対象に、無細胞胎児DNA (胎児cfDNA) による検査の有用性について検討された。胎児の在胎期間は35~149日 (平均70.5日) であった。胎児cfDNAによる異数性検査は、妊娠組織を用いて検査した場合に対する検出感度が85% (95%CI 79~90)、特異度が93% (95%CI 88~96) であった。胎児cfDNAによる検査では、446件 (45%) が正倍数性、405件 (41%) が異数性、37件 (4%) が複数の異数性を有し、112件 (11%) が判定不可であった。最初に検討された333名のうち105名 (32%) が妊娠組織を収集できなかったか、母体由来の可能性が高い組織が採取されていた。

学術的背景

流産に対する正確な予測モデルや治療法は、今現在確立されていない。胎児染色体異数性による流産は、母体の基礎疾患を原因とする流産と比較し、次の妊娠は成功する可能性が高い。したがって、流産の予測に異数性検査が有効と考えられるが、妊娠組織の収集が必要となる。

現在、21、18、および13トリソミーの出生前スクリーニングを目的に、母体血漿中に循環する胎児cfDNAの検査が妊娠10週以降に実施されている。胎児cfDNAは出産後、母体の血液から急速に除去されるが、妊娠組織が残存する場合は、母体の血液に残ると予想され、妊娠組織が入手できなくても異数性検査が可

COPL研究

試験デザイン	前向きコホート研究
対象患者	18歳以上で、超音波検査で子宮内妊娠が確認され (胎嚢がない場合を含む)、在胎22週 (154日) より早期に流産した女性1,000名
プロトコール	外科的処置により妊娠組織を除去する場合、真空システムにより妊娠組織が回収された。薬剤 (ミフェプリストンとミソプロストール) による排出または自然排出の場合、自宅で採取した妊娠組織が病院に持ち込まれた。第2期での流産の場合、病院にて誘発および出産が行われ、胎児の足から組織が採取された。妊娠組織は母体由来のDNA混入について確認するために、ショートタンデムリピート解析が実施された。血液サンプルは、妊娠組織の除去治療が実施される前、あるいは妊娠組織の排出から24時間以内に採取された。胎児cfDNAの解析は、妊娠継続女性に対するゲノムワイドNIPTと同様の手順で実施し、母体血中における胎児由来のcfDNAの割合はSeqFFにより推定された。胎児染色体由来のcfDNAの割合が2.5%未満、あるいはcfDNAの割合が1.5~2.5%かつ平均許容偏差が8.0を超えるサンプルは、常染色体のZスコアがしきい値を超える場合を除き、“判定不可”と報告された。
評価項目	胎児cfDNA検査の感度と特異度、妊娠継続中の母体血中における胎児cfDNAの割合、妊娠組織排出後における母体血中の胎児cfDNAの割合
統計解析	妊娠組織の解析結果を参照情報とし、Fisher正確検定による2×2分割表にて結果が比較された。胎児cfDNAによる検査結果と妊娠組織の直接配列決定との間の一致は、“コーエンのκ係数”として報告された。

能と期待されている。最近実施された小規模コホートによる調査では、妊娠組織を用いた細胞遺伝学的検査に対して、感度が57~82%、特異性が90%であったと報告されている。

結果

● **患者背景**

2020年11月12日から2022年5月1日の期間に、流産と診断された女性1,000名が募集された。

最初の333名は、胎児cfDNAを用いた検査の感度と特異度について検討され、残りの667名は、胎児cfDNAの検査成績と合計1,000名のコホートにおける評価に含まれた。1,000名における胎児の在胎期間は35~149日(平均70.5日)であった。

● **妊娠組織と胎児cfDNAの比較**

333名のうち19名(6%)は、妊娠組織の採取ができなかった。残りの314名のうち228名(73%)の検体が胎児由来の組織であり、86名(27%)の検体が母体由来の組織である可能性が高い組織であった。これらの組織についてショートタンデムリピート解析を実施したところ、44検体中31検体(70%)が実際に母体由来の組織であることが判明した。

胎児cfDNAによる検査は、妊娠組織の直接配列決定と比較して、異数性検出の感度が85%(95%CI 79~90)、特異度が93%(95%CI 88~96)であった。コーエンの κ 係数は0.78であり、実質的な一致が示された。

● **胎児cfDNAベースの異数性検査**

1,000件の胎児cfDNAによる検査結果のうち、446件(45%)が正倍数性、405件(41%)が異数性、37件(4%)が複数の異数性を示し、112件(11%)が判定不可であった。

● **妊娠期間と母体血中の胎児cfDNA**

母体血中のcfDNAのうち、胎児由来のcfDNAが占める割合は平均5.1%であったが、妊娠継続女性に対して日常診療で実施

されたNIPTでは平均6.3%であった(図A)。この違いは血液サンプルが採取された際の在胎期間の違いに起因すると考えられた(平均在胎期間:約10週間 vs 13週0日)。しかし在胎期間別に母体血中の胎児cfDNAの割合を比較したが、実際、両者に差は認められなかった(図B)。

● **判定不可の頻度と在胎週数との関連性**

判定不可の頻度は、妊娠7週までが約50%で、以後は安定して約10%であった。ただし、妊娠7週までの判定不可の頻度は、16例に基づく結果であった。

● **妊娠組織排出後における母体血中の胎児cfDNA**

妊娠組織の排出後12~24時間で採取された血液サンプルは、6時間以内に採取された血液サンプルよりも胎児cfDNAの割合が有意に低下していた($p=0.008$, Wilcoxon検定)。判定不可の割合は、妊娠組織の排出から6時間未満で13%、6~12時間で40%、12~24時間で35%であった。

まとめ

胎児cfDNAによる検査は、流産における胎児染色体の異常を鑑定するために有効かつ適用可能なツールと考えられ、妊娠期間が短い場合であっても臨床マネジメントや流産に関する研究への利用が期待できる。

Keyword

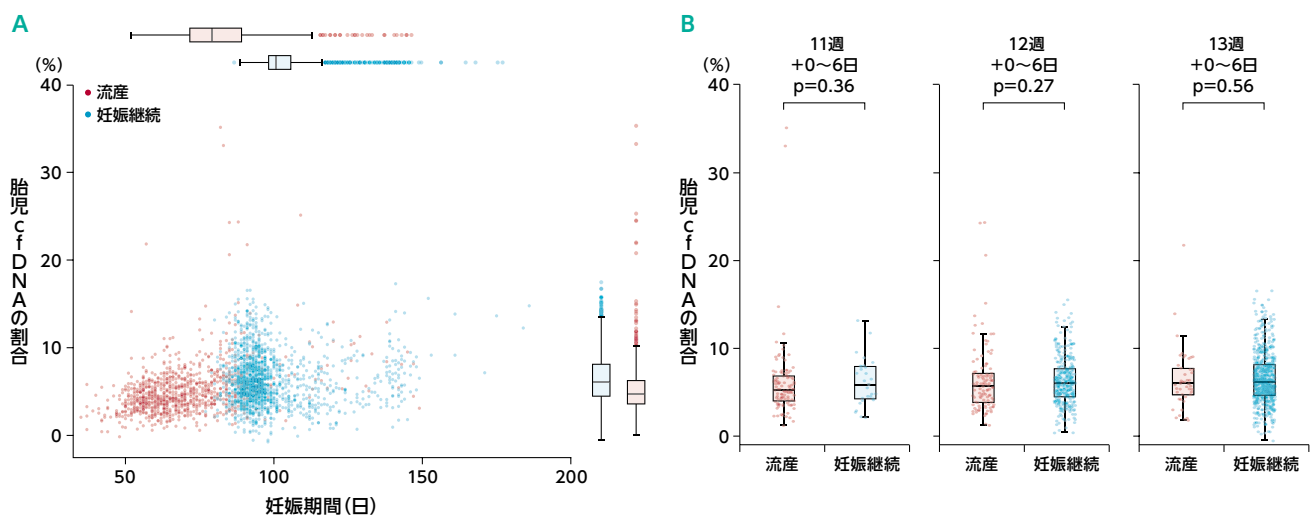
ゲノムワイドNIPT

母体血胎児染色体検査(non-invasive prenatal testing; NIPT)のひとつで、染色体数的異常のみならず7Mbレベルでの欠失/重複を検出するように設計された検査(国内未承認)。

SeqFF

NIPTにおいて胎児フラクションの推定に広く使用されているソフトウェア。

図 母体血中における胎児cfDNAの割合



(A) 妊娠期間と胎児cfDNAの割合、(B) 在胎期間別で比較した胎児cfDNAの割合

反復着床不全における出生に対するプレドニゾンの効果-無作為化比較試験

Prednisone vs Placebo and Live Birth in Patients With Recurrent Implantation Failure Undergoing In Vitro Fertilization: A Randomized Clinical Trial
Sun Y et al. JAMA. 2023; 329(17): 1460-1468.

Point プレドニゾン10mgの使用は、出生率を改善せず、早産などのリスクを増大させる可能性がある。

着床障害は体外受精においてしばしば遭遇する課題である。免疫調節剤としてのプレドニゾンは、着床率と妊娠率を改善するために欧米等で広く使用されているが、有効性の根拠は不十分であった。本試験は、反復着床不全女性の体外受精成績におけるプレドニゾン10mg連日投与の有効性を評価したプラセボ対照無作為化二重盲検比較試験である。その結果、プレドニゾン群はプラセボ群に対して出生率を改善せず、プレドニゾンの使用が早産と生化学的流産のリスクを増加させる可能性を示唆した。

学術的背景

生殖補助医療の進歩にもかかわらず、いまだ体外受精 (IVF) 周期の50%~60%は着床に至らない。反復着床不全 (RIF) は臨床で一般に遭遇する事象であり、患者と臨床医の双方を大きく落胆させる。

着床と妊娠の確立には複雑な免疫均衡が必要とされる。これまでの報告では、良質な胚にもかかわらず着床が失敗する要因として、細胞接着分子の不規則性、サイトカインネットワークの不均衡、子宮内膜のナチュラルキラー細胞 (子宮NK細胞) の過剰活性などが挙げられている。

プレドニゾンは本邦では未承認であるが、プレドニゾンと同じ力価をもち、安価で使い易い免疫調節剤として欧米等で広く使用

されている。プレドニゾンは、栄養膜細胞の増殖と浸潤を促進し、サイトカイン発現と子宮NK細胞の活性を正常化し、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の分泌を刺激することが報告されており、胚の着床を改善し流産を防ぐ目的で古くから使用されてきた。

プレドニゾンは着床率および臨床妊娠率改善に有効と考えられているが、これらのエビデンスは、アスピリンまたは低分子量ヘパリン併用レジメンによるものや、サンプルサイズの少ない試験や非無作為化試験による結果のみであった。

本試験は、RIFにおけるプレドニゾンの投与が出生率を上昇させるかどうかを評価した、初めての大規模無作為化プラセボ対照試験である。

結果

1,027例の女性をスクリーニングし、38歳未満かつ2回以上の良好胚移植不成功既往を有する715例の女性を、プレドニゾン群 (357例) またはプラセボ群 (358例) のいずれかに無作為に割り付けた。凍結融解胚移植周期においてホルモン剤による内膜調整開始時からプレドニゾン10mgまたはプラセボ内服を開始し、妊娠成立周期においては妊娠12週まで継続した。患者背景は両群で類似しており、胚移植手順も概ね同様であった (表1)。

Intention-to-treat (ITT) 解析における出生率は、プレドニゾン群で37.8%、プラセボ群で38.8%であり両群で有意差を認めなかった (表2)。Per-protocol (PP) 解析 (プロトコルに逸脱した症例を除く集団) においても、同様に両群に有意差を認めなかった [プレドニゾン群40.7%、プラセボ群40.4%、絶対差0.3% (95%CI: -7.4, 8.1)、相対比 (RR) 1.01 (95%CI: 0.83, 1.22)、 $p=0.93$]。ロジスティック回帰分析の結果、プレドニゾン使用と出生に有意な関連は認めなかった [調整オッズ比 (OR)、0.95

(95%CI: 0.69, 1.31)、 $p=0.75$]。臨床的妊娠率および着床率についても、両群で有意差を認めなかった (表2)。

表1 患者背景および胚移植成績

	プレドニゾン群 (357例)	プラセボ群 (358例)
年齢中央値 (IQR)	32歳 (30-35)	32歳 (30-35)
FSH基礎値平均値 (SD)	6.7IU/L (±2.4)	6.7IU/L (±2.0)
子宮内膜厚平均値 (SD)	9.1mm (±1.7)	8.9mm (±1.6)
移植胚数平均値 (SD)	1.3 (±0.4)	1.3 (±0.4)
単一胚移植、% (例数)	73.0 (241)	74.0 (250)
2胚移植、% (例数)	27.0 (89)	26.0 (88)
正倍數性胚盤胞移植、% (例数)	7.9 (26)	5.9 (20)

一方で生化学的流産率はプレドニゾン群で17.3%、プラセボ群で9.9%、早産率はプレドニゾン群で11.8%、プラセボ群で5.5%であり、いずれもプレドニゾン群で有意に高かった ($p=0.04$ 、表2)。妊娠悪阻率はプラセボ群に対してプレドニゾン群

で低かった (表2)。その他の母体および胎児の安全性については両群で差を認めなかった。なお、PP解析では、生化学的流産率および早産率のいずれも両群で有意差を認めなかった。

まとめ

着床周辺期から妊娠初期にプレドニゾン10mgを連日投与しても、RIF女性の出生率は改善しないことが示唆された。臨床的流産率は両群で同程度であったが、生化学的流産のリスクはプレドニゾン群で増加した。これは、プレドニゾンが着床を改善しなかったにもかかわらず、hCGの分泌を刺激し、臨床的妊娠前の流産のリスクを高めたためと考えられた。

本研究では10mgの用量のみ検討を行った。早産および生化学的流産のリスク増大の可能性を考えると、RIF治療に10mgのプレドニゾンをルーチンに使用することは支持されない。

Keyword

RIF (recurrent implantation failure : 反復着床不全)

良好胚を繰り返し移植しても着床が成立しないことを指す。明確な定義はないが、カナダの着床不全ガイドラインやヨーロッパ生殖医学会の報告では、3回程度の良好胚移植によっても妊娠が成立しない場合や3~4個以上の良好胚移植によっても妊娠が成立しない場合をRIFとしている。

表2 臨床アウトカムの結果 (ITT解析)

	プレドニゾン群 (357例)、% (例数)	プラセボ群 (358例)、% (例数)	絶対差 (95%CI)	RR (95%CI)	p値
出生率	37.8 (135)	38.8 (139)	-1.0 (-8.1, 6.1)	0.97 (0.81, 1.17)	0.78
生化学的妊娠率	54.9 (196)	50.8 (182)	4.1 (-3.3, 11.4)	1.08 (0.94, 1.24)	0.28
着床率 (子宮内胎数/移植胚数)	42.5 (178/419)	40.0 (172/426)	2.1 (-4.5, 8.8)	1.05 (0.90, 1.24)	0.53
臨床的妊娠率	45.1 (161)	45.5 (163)	-0.4 (-7.7, 6.9)	0.99 (0.84, 1.16)	0.91
流産率	31.1 (61/196)	23.1 (42/182)	8.0 (-0.9, 17.0)	1.35 (0.96, 1.89)	0.08
生化学的流産率	17.3 (34/196)	9.9 (18/182)	7.5 (0.6, 14.3)	1.75 (1.03, 2.99)	0.04
臨床的流産率	16.2 (26/161)	14.1 (23/163)	2.0 (-5.8, 9.8)	1.14 (0.68, 1.92)	0.61
早産率	11.8 (19/161)	5.5 (9/163)	6.3 (0.2, 12.4)	2.14 (1.00, 4.58)	0.04
妊娠悪阻率	0.6 (1/161)	4.9 (8/163)	-4.3 (-7.8, -0.8)	0.13 (0.02, 1.00)	0.04

試験概要

試験デザイン	多施設共同二重盲検無作為化プラセボ対照試験
対象期間	2018年11月~2020年8月 (最終フォローアップ2021年8月)
対象患者	中国の不妊治療8施設で凍結融解胚移植を受ける予定で、少なくとも1個以上の良質な胚盤胞または2個の良質な初期胚を有する38歳未満の715例
プロトコール	対象患者はプレドニゾン10mg群とプラセボ群に1対1の割合で無作為に割り付けられ、凍結融解胚移植のための子宮内膜調整剤開始時から試験薬が投与開始された。妊娠が確認された場合、試験薬投与は妊娠12週まで継続された。子宮内膜調整剤として、経口エストラジオール製剤2~8mg/日が月経周期2~5日目から、またはGnRHアゴニストによる抑制開始後28~35日目から投与開始された。子宮内膜の厚さが十分であることを確認後、黄体補充のため経膈プロゲステロン製剤90mg/日と、経口ジドロゲステロン製剤10mg/回、1日2回の投与を開始した。プロゲステロン投与開始3日または5日後に、良質な胚盤胞1個または良質な初期胚2個を患者に移植した。妊娠後はエストラジオールを漸減し、妊娠8週から12週まで黄体補充を継続した。
臨床アウトカム	【主要】凍結融解胚移植後の出生 (妊娠28週以上の生存徴候を示す新生児の出生) 【副次】生化学的妊娠、臨床的妊娠、着床、流産、妊娠および周産期合併症およびその他の有害事象など
統計解析	カテゴリ変数について、群間差をPearsonカイ二乗検定とFisher正確検定で評価した。RRと95%CIを算出した。連続変数について、正規分布の場合はt検定、非正規分布の場合はWilcoxon順位和検定を用いた。年齢、BMI、胚移植不成功周期数、胚移植期および実施施設で調整したロジスティック回帰モデルが出生の群間比較に用いられた。ORおよび95%CIを算出した。

