







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ① 課・論	第 664 号	氏 名	井 上 尚 実
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	波多野 豊	
	副査氏名	久保田 敏昭	
	副査氏名	黒川 竜紀	
<p>論文題目 GC-MS/MS analysis of metabolites derived from a single human blastocyst (単一ヒト胚盤胞における代謝産物の GC MS/MS 分析)</p> <p>論文掲載雑誌名 Metabolomics</p> <p>論文要旨</p> <p>着床前診断としての胚の評価には、現在のところ、形態学的評価が主として用いられている。一方、非侵襲的な胚評価法を検討した研究は近年増加してきている。本研究は、胚が吸収あるいは分泌した一次代謝産物(有機酸、脂肪酸)などを利用した質的評価を用いて、受精卵を培養していた培養液を網羅的に解析することにより、新たな胚の客観的な評価方法を確立しようとするものである。</p> <p>2018年1月～2018年12月の期間に大分大学医学部産科婦人科学講座で体外受精を行い、施行翌日に正常受精が確認でき、長期培養を行った胚を対象とした。正常受精確認後(day1)のヒト胚を最長7日目(day7)まで培養し、培養終了後の培養液を分析に用いた。胚の評価はエンブリオロジストによる顕微鏡下形態学的評価にて行った。Day 5 時点で Gardner 分類 3BB 以上の胚を良好胚盤胞群、それ以下の胚を不良胚盤胞群、初期胚で発育停止した胚を発育停止群とした。また、同条件下で胚を入れていない培養液をコントロール群とした。凍結サンプルを融解後、Bligh & Dyer 法で処理し、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS/MS-TQ8040, SHIMADZU 社)により一次代謝産物を測定し、多変量解析ソフト (SIMCA, Umetrics 社) を用いて統計処理を行った。</p> <p>メタボローム解析で解析可能物質 469 有機酸代謝物中 187 代謝物 (39.8%) が同定された。Partial Least Squares (部分的最小二乗回帰) 判別分析法で 4 群は明確に識別可能であった。コントロール群と比較して、良好胚盤胞群、不良胚盤胞群、発育停止群のいずれでも分布は明確に分かれていた。良好胚盤胞群と不良胚盤胞群の S plot 分析において、不良胚盤胞群では良好胚盤胞群に比べ、13 代謝物が増加し、11 代謝物が減少していた。Metaboanalyst を用いて代謝経路の変化について検討したところ、不良胚盤胞群と良好胚盤胞群ではミトコンドリア代謝とアミノ酸代謝に関わる経路が変化していた。</p> <p>この研究結果から、不良胚盤胞ではより必須アミノ酸の代謝が亢進していると考えられた。これは発育不良な胚では代謝が亢進しているという先に報告された結果に一致した。必須アミノ酸代謝の亢進により TCA サイクルも活性化していると考えられ、また、ミトコンドリア代謝も亢進していたことから、不良胚盤胞群では細胞の維持に必要なエネルギーを過剰に産生していると推測された。これらのことから GC-MS/MS を用いた単一胚細胞の培養液の解析が胚の評価に有用である可能性が示唆された。これらの結果から、胚を凍結している間にこの解析を加えることで、生存率の高い胚を選択できる可能性がある。</p> <p>検体数が少なく、実際の着床率の向上に繋がるかの検証も必要であるが、本研究は、より生存率の高い胚の選択が可能となる新たな手法の可能性を提示している。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 (課)・論	第 664 号	氏名	井上尚実
審査委員会委員		主査氏名	シタ多野 豊 
		副査氏名	久保田敏昭 
		副査氏名	黒川 竜紀 
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 初期胚と胚盤胞のどちらを人工授精に使用するかを定める基準は。 2. Poor-quality embryoと定める基準は。ガードナー分類でクラス4以上であっても、内細胞塊と栄養外胚葉の評価がCであれば、poor-qualityとの評価になるのか。 3. 本研究は、実臨床の過程で行った研究で、体外受精の過程を妨げることはなかったか。 4. 顕微鏡で胚を形態学的に評価するのは侵襲的な検査になるか。 5. バリン、イソロイシンは代謝産物も動きが無いようにFigureでは見えるが、poor-quality embryoでTCAサイクルが亢進していると言えるのか。 6. GC-MS/MS解析の機器は大学では備えているが、一般病院には無いでしょう。自費診療の体外受精では費用も問題も発生してくる。本研究の結果を臨床で広く使ってもらえるようにするためのビジョンはあるか。 7. 具体的に他の非侵襲的方法とはどのような方法なのか？ 8. 形態学的評価と着床率・妊娠・分娩にどのような関係があるのか？ 9. MetaboAnalystを使った代謝経路解析 (Fig. 2a) では、バリン・ロイシン・イソロイシンの分解が上位なのに、Fig. 2bではバリン・ロイシン・イソロイシンの合成と分解の両方が候補に挙がっているのはなぜか？ 10. 状態が悪い方の胚のエネルギー代謝が活発なのはなぜか？ 11. 今後も胚評価方法としてメタボローム解析をするのか？それとも、今回同定したアミノ酸代謝のみを評価するのか？ 12. 着想率に影響を与える因子にはどのようなものがあるか。 13. 本研究で用いられた解析手法の限界点について教えて下さい。 14. 更なるバイオマーカーの探索について、何か考えはあるか。 15. 本研究の手法を用いて、Good群の中でもより良い胚を選択するという方向性で進展する可能性はあるか。 16. 新鮮胚移植よりも凍結胚移植の方が妊娠率が高いのは何故か。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 井上 尚実

論 文 題 目

GC-MS/MS analysis of metabolites derived from a single human blastocyst

(単一ヒト胚盤胞における代謝産物の GC MS/MS 分析)

要 旨

【緒言】1978年に世界初の体外受精児が誕生して以降、生殖補助医療の技術は進化し、その恩恵を受けて誕生する生命は増加の一途をたどっている。体外受精の方法は種々に進化しており、また、着床前診断として胚そのものの評価を行う手段も進化してきている。現在のところ、胚の評価には周知のとおり形態学的評価(Weekらの分類、Gardner分類)が主として用いられている。しかし、胚の形態学的評価はそれぞれの施設や観察者の主観的評価による面があり、胚の形態が必ずしもその胚の発生能や着床能を反映するわけではない。非侵襲的な胚評価法を検討した研究は近年増加してきている。我々は胚が吸収あるいは分泌した一次代謝産物(有機酸、脂肪酸など)を利用した質的評価を行うため、受精卵を培養していた培養液を網羅的に解析することにより、新たな胚の客観的な評価方法として活用できるのではないかと仮説を立てた。

【方法】2018年1月～2018年12月の期間に大分大学医学部産科婦人科学講座で体外受精を行い、施行翌日に正常受精が確認でき、長期培養を行った胚を対象とした。正常受精確認後(day1)のヒト胚を最長7日目(day7)まで培養し、培養終了後の培養液を分析に用いた。胚の評価はエンブリオロジストによる顕

微鏡下形態学的評価を行った。Day 5 時点で Gardner 分類 3BB 以上の胚を良好胚 good 群、それ以下の胚を不良胚 poor 群、初期胚で発育停止した胚を death 群とした。また、同条件下で胚を入れていない培養液をコントロール群とした。凍結サンプルを融解後、Bligh & Dyer 法(生体材料からの脂質抽出法)で処理し、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS/MS-TQ8040, SHIMADZU 社)により一次代謝産物を測定し、多変量解析ソフト(SIMCA, Umetrics 社)を用いて統計処理を行った。

【結果】メタボローム解析で解析可能物質 469 有機酸代謝物中 187 代謝物 (39.8%)が同定された。Partial Least Squares(部分的最小二乗回帰)判別分析法で 4 群は明確に識別可能であった。コントロール群と比較して、良好胚盤胞 (good)群、不良胚盤胞 (poor)群、発育停止 (death)群のいずれでも分布は明確に分かれており、胚による代謝産物が測定されていると考えられた。良好胚盤胞群と不良胚盤胞群の 2 群で比較を行ったところ、分布は明確に識別できた。良好胚盤胞群と不良胚盤胞群の S plot 分析において、不良胚盤胞群では良好胚盤胞群に比べ、13 代謝物が増加し、11 代謝物が減少していた。Metaboanalyst を用いて代謝経路の変化について検討したところ、不良胚盤胞群と良好胚盤胞群ではミトコンドリア代謝とアミノ酸代謝に関わる経路が変化していた。

【考察】この研究結果では胚の形態学的評価はアミノ酸代謝と関連しており、不良胚盤胞ではより必須アミノ酸の代謝が亢進していると考えられた。これは発育不良な胚では代謝が亢進しているという先に報告された結果に一致した。必須アミノ酸代謝の亢進により TCA サイクルも活性化していると考えられ、また、ミトコンドリア代謝も亢進していたことから、不良胚盤胞群では細胞の維持に必要なエネルギーを過剰に産生していると推測された。これらのことから GC-MS/MS を用いた単一胚細胞の培養液の解析が胚の評価に有用である可能性が示唆された。

【結語】今回我々が行った研究において、胚の評価法として、代謝産物の変化は形態学的評価と相関関係にあると考えられた。胚を凍結している間にこの解析を加えることで、生存率の高い胚を選択できる可能性がある。