

Abnormally fertilized oocytes can result in healthy live births: improved genetic technologies for preimplantation genetic testing can be used to rescue viable embryos in in vitro fertilization cycles

Antonio Capalbo, Ph.D.,^{a,b} Nathan Treff, Ph.D.,^c Danilo Cimadomo, M.Sc.,^{a,d} Xin Tao, Ph.D.,^c Susanna Ferrero, M.D.,^a Alberto Vaiarelli, M.D.,^a Silvia Colamaria, M.D.,^a Roberta Maggiulli, Ph.D.,^a Giovanna Orlando, M.Sc.,^a Catello Scarica, Ph.D.,^a Richard Scott, M.D.,^c Filippo Maria Ubaldi, M.D.,^{a,b} and Laura Rienzi, M.Sc.^{a,b}

^a Genera, Centers for Reproductive Medicine, Clinica Valle Giulia, Rome, Italy; ^b Genetyx, Molecular Genetics Laboratory, Marostica, Italy; ^c Reproductive Medicine Associates of New Jersey, Basking Ridge, New Jersey; and ^d Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico Legali e dell'Apparato Locomotore, Università degli Studi di Roma "Sapienza," Rome, Italy

異常な受精卵から健康な児を得ることができる

着床前遺伝子検査技術の向上により、体外受精で生存可能な胚を救出する

要約

【目的】

異常受精卵（AFO）由来の胚盤胞が二倍体か、そして臨床で使用することが可能かを検討する。

【デザイン/対象】

2015年1月から2016年9月にかけて、着床前胚染色体異数性検査（PGT-A）を実施した体外受精周期（556名719周期）を対象とした縦断的コホート研究。1PN または 2.1PN 由来の胚盤胞が得られた場合は、次世代シーケンサーを用いた SNPs 解析にて倍数性の評価を行い、euploid であった 1PN および 2.1PN 由来の胚盤胞は、2PN 由来の移植可能胚がない場合に移植した。

【結果】

5,026 個の MII 卵に対して ICSI を実施。そのうち 1PN、2.1PN がそれぞれ 5.2%、0.7% で存在し、これらの AFO 由来では、胚発育が不良であった。AFO から計 27 個の胚盤胞が得られ、解析したところ、1PN 由来の胚盤胞は、二倍体が 69.2% (n=9/13)、一倍体が 23.1% (n=3/13)、三倍体が 7.7% (n=1/13) であった。2.1PN 由来の胚盤胞もほとんどが二倍体で 85.7% (n=12/14)、残りは三倍体であった。AFO 由来の胚盤胞が得られた周期は 3.6% (n=26/719) であり、AFO 由来の胚盤胞からのみ移植可能な胚が得られた周期は 0.3% (n=3/719) であった。最終的に AFO 由来の胚盤胞から 8 個の移植可能な胚が得られ、そのうち 3 例 (1PN から 1 例、2.1PN から 2 例) が出産に至った。

【結論】

信憑性の高い倍数性評価を取り入れた PGT-A は、AFO 由来の胚盤胞を救出し移植するために効果的なツールである。

○はじめに○

受精卵の約 10%が異常受精し、そこから得られた胚は、倍数体異常の遺伝的リスクをモニターする信頼性の高いアプローチがないため、通常廃棄される。本研究では、その廃棄されるはずの AFO 由来胚を救済することを目的としている。

○方法と材料○

デザイン/対象

2015 年 1 月から 2016 年 9 月の期間に PGT-A 周期を行った患者 678 名。PGT-A は、妻年齢が 35 歳以上、または 2 回以上の ART 反復不成功、2 回以上の胚盤胞移植における反復流産既往の患者に対して行われた。2015 年 1 月より、同意の得られた患者 (556 名、81.9%) に対して、1PN または 2.1PN 由来の胚盤胞が得られた場合に、異数性と倍数性の複合解析を提供した。方針として、移植は 2PN 由来の euploid 胚が最初に選択され、それらの胚がない場合に、1PN または 2.1PN 由来の euploid 胚が選択された。

受精確認

hCG 投与から 36-38 時間後に MII 卵に対して ICSI を行い、インキュベーターもしくはタイムラプスにて個別培養を行った。ICSI から 16~18 時間後に受精確認を行った。2 前核 2 極体 (2PN 2 PB) を示したものを正常受精とみなし、培養を続けた。1PN は、インキュベーターで培養したものについては、最初のチェックから 4 時間以内に再評価を行い、そこで 2PN が確認できた場合は、正常受精とした。2 個の均等大きさの PN と 1 個の小さい PN (正常の 3 分の 1 の大きさ) を示す受精卵を 2.1PN と定義し、胚盤胞まで培養を続けた。3 個の均等大きさの PN を示す受精卵は、それ以上培養せず廃棄した。

染色体解析

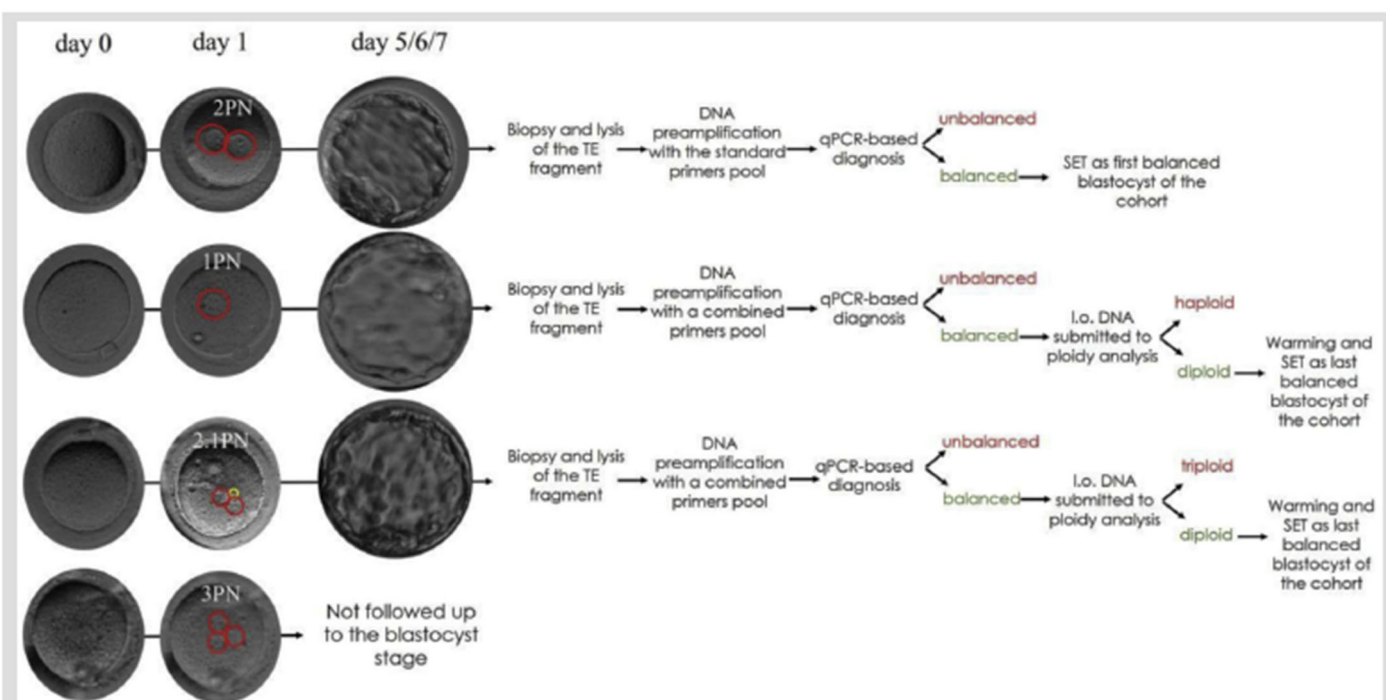
すべての胚生検において、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)ベースの全染色体コピー数解析を行った。

次世代シーケンサーによる倍数性評価

染色体コピー数のバランスが取れていると診断された AFO 由来の胚盤胞は、残された胚 DNA を使用し、次世代シーケンサー(NGS)ベースの対立遺伝子を用いた倍数性評価を行った。

アウトカム評価

qPCR による一次解析の結果、正常 (性染色体も含む) であった胚をバランス胚、余分な染色体または欠落した染色体が検出された胚をアンバランス胚と定義した。二次解析では、二倍体、一倍体、三倍体それぞれに染色体異常がない場合は、バランス二倍体、バランス一倍体、バランス三倍体、染色体異常がある場合は、アンバランス二倍体、アンバランス一倍体、アンバランス三倍体に分類した。PGT-A 周期の臨床成績は、妊娠 20 週以降に心臓の動きがある胎児を継続妊娠、出産を生児出産と定義した。

FIGURE 1

Clinical study design. In all consecutive cycles with preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A), the fertilization check was performed on day 1 (16–18 hours) after insemination or in a time-lapse system. Normally fertilized oocytes showing two evenly sized pronuclei (PN) were grown to the blastocyst stage and submitted to quantitative polymerase chain reaction (qPCR)-based aneuploidy testing as a standard procedure. The abnormally fertilized oocytes (AFOs) showing three evenly sized PN (3PN) were not followed further. The AFOs showing either 1PN or 2.1PN, the latter defined as the presence of 2 well defined PN (outlined in red in the figure) and an additional smaller PN (not larger than one-third the size of normal; outlined in yellow in the figure), were kept in culture up to the blastocyst stage. If they developed as blastocysts, they underwent trophoctoderm (TE) biopsy and qPCR-based chromosome copy number analysis (first-line PGT-A assessment). In embryos diagnosed as balanced for chromosome copy number, the left-over (l.o.) embryonic DNA was submitted for additional ploidy analysis. In the absence of any other normally fertilized-derived transferable blastocyst, AFO-derived balanced-diploid embryos were warmed and transferred in a single-embryo transfer (SET) policy.

Capalbo. Ploidy analysis after abnormal fertilization. *Fertil Steril* 2017.

○結果○

胚発生学的データ

5,026 個の MII 卵に ICSI を実施し、そのうち 75.3% (n=3785/5026) が研究に含まれた。1PN および 2.1PN 胚では、胚発生が著しく損なわれ、1-2 細胞分裂の段階で発生停止する確率が有意に高かった(図 2)。分割しなかった胚の割合が正常受精では 1.8% (n=66/3558) であったのに対して、1PN と 2.1PN はそれぞれ 60.0% (n=120/200)、25.9% (n=7/27) であった。胚盤胞形成率は、1PN 胚のみ有意に減少し、2.1PN に比べ胚盤胞形成率が低いことがわかった。研究期間中、異常受精胚から計 27 個 (1PN 13 個、2.1PN 14 個) の拡張胚盤胞が得られた。

遺伝学的データ

染色体解析は、常染色体および性染色体の異数性を評価することで行われた。染色体コピー数のバランスが取れていると診断された AFO 由来の胚盤胞は、NGS に基づいた SNP 解析により、その倍数体構成を評価した。図 3 に示すように、1PN 由来の胚盤胞のほとんどは二倍体であり (n=9/13、69.2%)、3 つは一倍体であった (n=3/13、23.1%)。驚くべきことに、1PN 由来の 1 個の胚盤胞は、三倍体と診断された (n=1/13、7.7%)。2.1PN 由来胚もほとんどが二倍体 (n=12/14、85.7%) で、残りは三倍体 (n=2/14、14.3%) であった。

臨床データ

719 周期のうち 181 周期 (25.2%) で、少なくとも 1 個の異常受精卵が得られ、計 227 個の異常受精卵が得られた。26 周期で、異常受精由来の胚から少なくとも 1 個の胚盤胞が得られた (n=26/719、3.6%)。全体として、6 周期から 8 個の移植可能な euploid 胚が得られた (n=6/719、0.8%)。1PN 由来の euploid 胚が 2 個移植され、うち 1 件は出産に至った。2.1PN 由来の euploid 胚は 3 個移植され、うち 2 件が出産に至った。残りの 3 個は、執筆時点ではまだ移植されていない。すべての生児に異常は認められなかった。

TABLE 1

Embryologic, genetic, and clinical data of the blastocysts derived from abnormally fertilized oocytes.

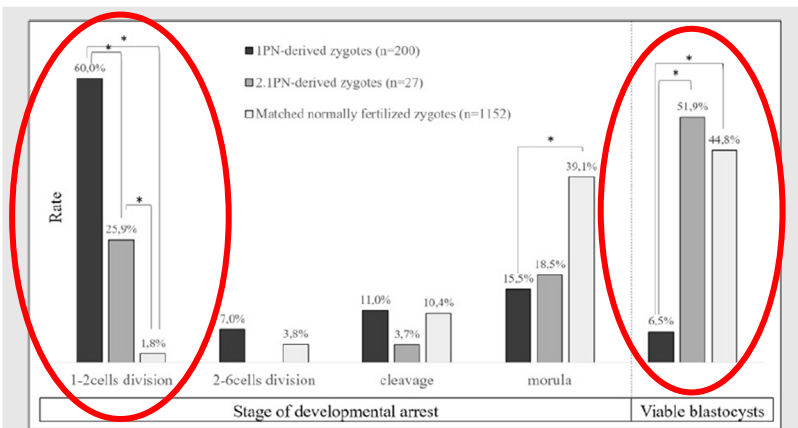
Sample ID	Female age (y)	Indication for PGT-A	PGT-A cycle	Total no. of 2PN blastocysts biopsied (balanced)	Fertilization abnormality	Blastocyst morphology	Day of biopsy	qPCR diagnosis	Ploidy analysis (40 SNPs)	Ploidy analysis (targeted NGS)	Culture system	Clinical outcome
10343_7 ^a	38	AMA	2	3 (1)	2.1PN	C11	5	Balanced female	Diploid	-	S	Delivery
11680_1 ^a	38	AMA	1	6 (4)	2.1PN	C11	6	Balanced female	Diploid	-	S	/
11793_8 ^a	42	AMA	1	5 (0)	2.1PN	C22	6	Balanced female	Diploid	-	S	Delivery
13037_2 ^a	35	AMA	1	3 (1)	2.1PN	C33	7	Balanced male	Diploid	-	TLM	Implantation failure
13675_6.1 ^a	42	AMA	1	8 (1)	2.1PN	B11	6	Balanced male	Diploid	-	TLM	-
13421_2bis ^a	42	AMA, RIF	1 (LPS)	0	1PN	B11	6	Balanced male	Diploid	Diploid	S	Delivery
13264_6 ^a	34	RIF	1	2 (2)	1PN	C22	6	Balanced female	Diploid	-	TLM	Implantation failure
13814_4.3 ^a	40	AMA	2	3 (0)	1PN	C11	6	Balanced female	Diploid	-	S	-
11680_7	38	AMA	1	6 (4)	2.1PN	C12	6	Balanced female	Triploid	Triploid	S	-
13379_9	39	AMA	1	5 (2)	2.1PN	C22	5	Unbalanced, XXY	Triploid	Triploid	S	-
9949_5	41	AMA	2	1 (1)	2.1PN	C33	7	Unbalanced male, -1	NA	Diploid	S	-
12673_4	43	AMA	2	3 (0)	2.1PN	C33	6	Unbalanced male, +15, -21	ND	Diploid	S	-
14461_2.2	43	AMA	1	1 (0)	2.1PN	C33	6	Unbalanced female, -16	Diploid	-	S	-
9414_1bis	39	AMA	1 (LPS)	3 (3)	2.1PN	C11	5	Unbalanced female, +15, +18	-	Diploid	S	-
11795_8	39	AMA	2	2 (2)	2.1PN	C33	7	Unbalanced male, +7	-	Diploid	S	-
12830_9	41	AMA	1	9 (3)	2.1PN	C33	7	Unbalanced male, -4, -16	-	Diploid	TLM	-
13540_3	44	AMA	1 (FPS)	0	2.1PN	C33	6	Unbalanced male, -15, +16	-	Diploid	S	-
13184_1	36	AMA	1	4 (4)	1PN	C11	5	Unbalanced male, +13	Diploid	ND	S	-
9924_1	36	AMA, RIF, RPL	4	3 (0)	1PN	C11	6	Balanced female	Haploid	Haploid	S	-
5100_6	36	AMA	1	3 (2)	1PN	C11	5	Unbalanced female, +15	Diploid	Diploid	TLM	-
12713_12bis	38	AMA	1 (LPS)	6 (3)	1PN	C33	6	Unbalanced female, +8	Diploid	Diploid	TLM	-
12684_8	34	RIF	1	7 (4)	1PN	C22	7	Balanced female	Haploid	Haploid	S	-
13076_3.7	34	RIF	1	3 (2)	1PN	C11	5	Balanced female	Haploid	Haploid	TLM	-
11488_4	44	AMA	1	1 (0)	1PN	C22	6	Unbalanced male, +15, +20, -21	-	Diploid	S	-
9321_5	35	AMA, RIF	1	7 (6)	1PN	C22	6	Unbalanced female, -X	-	Diploid	S	-
12884_2	38	AMA	1	1 (0)	1PN	D11	6	Unbalanced female, +22	-	Triploid	S	-
13591_9	42	AMA	1	3 (0)	1PN	C33	6	Unbalanced female, -18	-	Diploid	TLM	-

Note: AMA, advanced maternal age; FPS, follicular phase stimulation; LPS, luteal phase stimulation; NA, not amplified; ND, not determined; NGS, next-generation sequencing; PN, pronuclei; PGT-A, preimplantation genetic testing for aneuploidies; RIF, recurrent implantation failure; RPL, recurrent pregnancy loss; S, standard; SNPs, single-nucleotide polymorphisms; TLM, time-lapse microscopy.

^a Transferable blastocysts.

Capalbo. Ploidy analysis after abnormal fertilization. Fertil Steril 2017.

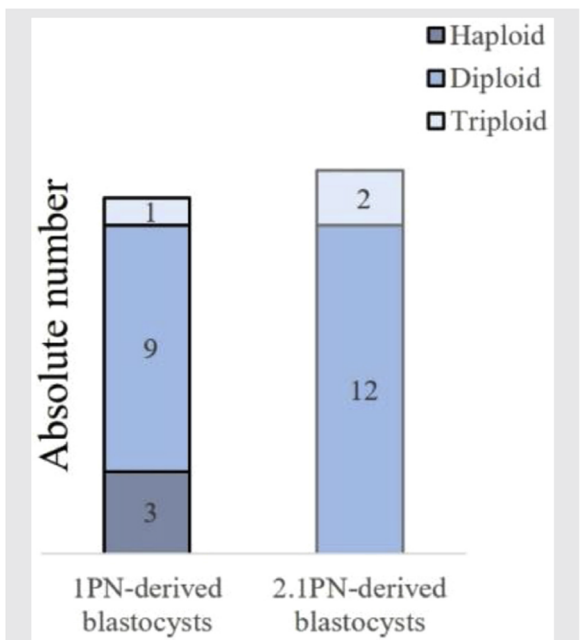
FIGURE 2



Embryo developmental arrest per stage of preimplantation development and viable blastocyst rates for 1PN, 2.1PN, and matched normally fertilized zygotes. Only the matched normally fertilized zygotes from the 181 PGT-A cycles where at least one 1PN- and/or 2.1PN-derived zygote was obtained were used for comparison of viable blastocyst rates. PN = Pronuclei. *Statistically significant difference.

Capalbo. Ploidy analysis after abnormal fertilization. Fertil Steril 2017.

FIGURE 3



Overall results of ploidy analysis in blastocysts derived from either 1PN or 2.1PN zygotes. PN = pronuclei.

Capalbo. Ploidy analysis after abnormal fertilization. Fertil Steril 2017.

○考察○

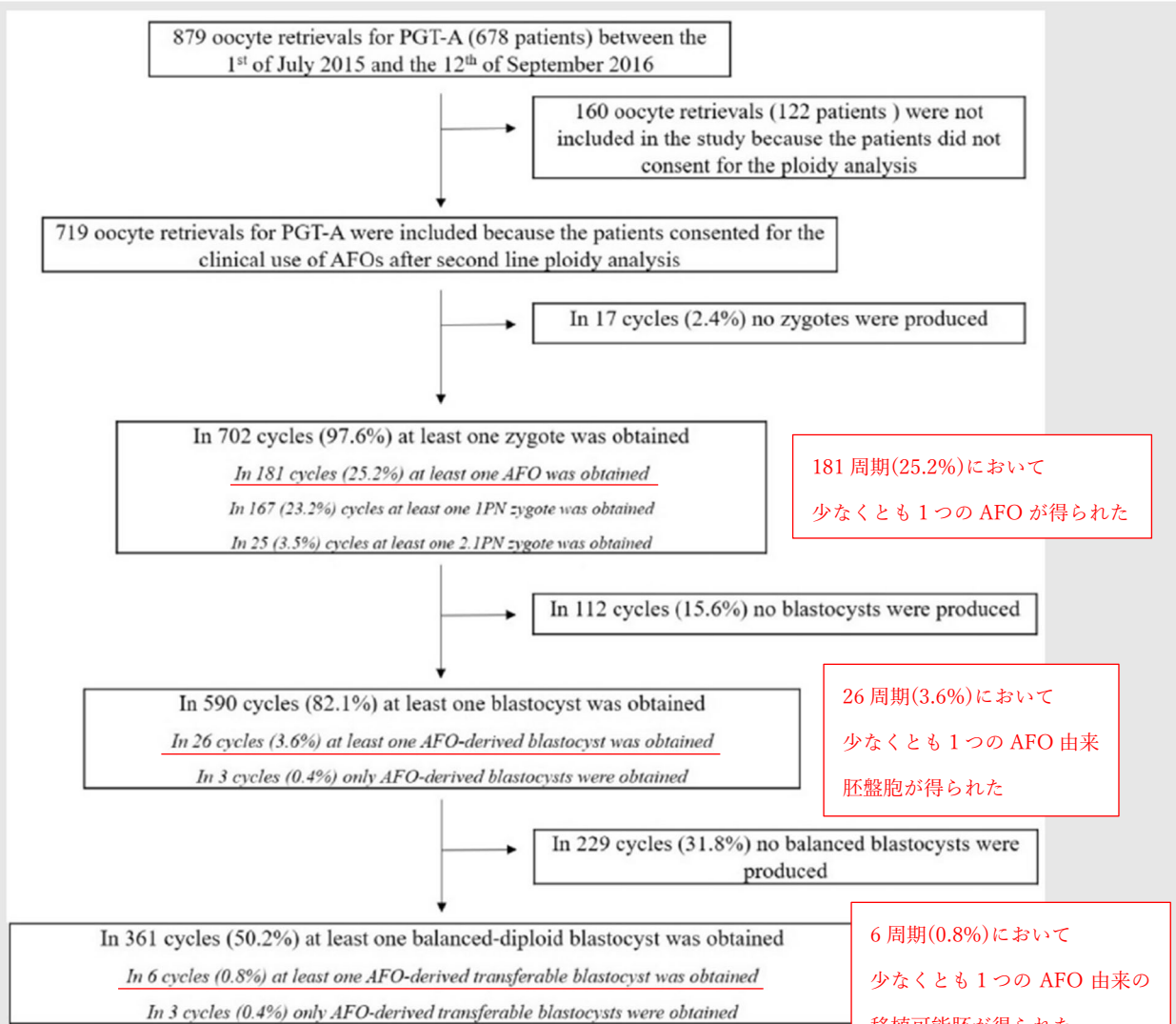
AFO 由来胚のかかなりの割合が二倍体であることは、これまで様々な研究で示されており、すでにいくつかの報告では、生殖目的での利用の可能性が強調されている。最近の報告では、1PN 由来胚から生まれた健康な赤ちゃんが何人か報告されている。

今回の臨床研究で分析されたほとんどの AFO 由来胚は、二倍体を示した。体外受精で 1PN および 2.1PN 由来から得られた 27 個の胚盤胞のうち、77.8% (n=21/27) は二倍体であった。さらに、1PN 由来の胚盤胞は、1 例では三倍体であることも判明した。1PN 由来の胚盤胞が三倍体にもなりうるという知見は、遺伝的に未検査の 1PN 胚をその倍数性をモニターせずに生殖目的で臨床使用する場合、さらなる注意が必要であることを示している。

今回の臨床応用では、6 人の患者 (0.8%) が、本来なら廃棄されるはずの euploid 胚を 1 個得ることができた。特に、3 周期では、唯一の euploid 胚が異常受精卵に由来するものであった。異常受精卵から得られた 5 個の euploid 胚が移植され、このコホート研究の患者から 3 人の生児が得られた。さらに執筆時点ではまだ 3 個が凍結保存されている。3 人の生児のうち、1 人は 1PN 由来の胚盤胞から得られたもので、採卵後に得られた唯一の胚盤胞であった。

1PN および 2.1PN 由来胚を臨床用に取り込むことにより、185 回の採卵につき 1 回の追加生児が得られると結論づけることができる。本研究では件数が少なかったため、この結果に適切に対処するためには、今後のさらなる研究が必要である。

SUPPLEMENTAL FIGURE 3



Flow chart of the clinical implementation study. AFO, abnormally fertilized oocyte; PGT-A, preimplantation genetic testing for aneuploidies; PN, pronuclei.

Capalbo. Ploidy analysis after abnormal fertilization. Fertil Steril 2017.

Supplemental Table 3 - Basal data of the patients' population included in the study. *OAT, Oligoasthenotheatozoospermic; AMA, Advanced Maternal Age; RIF, Recurrent Implantation Failure; RPL, Recurrent Pregnancy Loss; PGT-A, Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies*

Number of patients included in the study	556
Age Mean±SD (min-max) - years	39.2±3.2 (27.0-44.0)
Duration of infertility Mean±SD (min-max)	3.3±1.9 (1-11)
FSH Mean±SD (min-max) - (mIU/ml)	8.9±4.8 (2.1-39.0)
LH Mean±SD (min-max) - (mIU/ml)	6.1±3.2 (0.9-20.0)
AMH Mean±SD (min-max) - (ng/ml)	2.6±2.5 (0.3-6.7)
Previous miscarriages Mean±SD (min-max)	0.4±0.9 (0-7)
Previous IVF failures Mean±SD (min-max)	0.8±1.5 (0-11)
Number of patients with primary infertility (<i>Rate of patients included in the study</i>)	333/556 (59.9%)
Number of patients with secondary infertility (<i>Rate of patients included in the study</i>)	223/556 (40.1%)
Sperm analysis	
Normozoospermic (<i>Rate of patients included in the study</i>)	268/556 (48.2%)
1-2 defects (<i>Rate of patients included in the study</i>)	183/556 (32.9%)
OAT (<i>Rate of patients included in the study</i>)	88/556 (15.8%)
Surgical (<i>Rate of patients included in the study</i>)	17/556 (3.1%)
Indication to PGT-A	
AMA (<i>Rate of patients included in the study</i>)	426/556 (76.6%)
RIF (<i>Rate of patients included in the study</i>)	55/556 (9.9%)
RPL (<i>Rate of patients included in the study</i>)	2/556 (0.4%)
AMA+RIF (<i>Rate of patients included in the study</i>)	57/556 (10.3%)
AMA+RPL (<i>Rate of patients included in the study</i>)	15/556 (2.8%)
AMA+RIF+RPL (<i>Rate of patients included in the study</i>)	1/556 (0.2%)