

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

發展精準醫學進行老化及粒線體異常之不孕症治療-發展精準醫學進行老化及粒線體異常之不孕症治療

計畫類別：整合型計畫  
計畫編號：MOST 106-3114-B-040-001-  
執行期間：106年05月01日至107年04月30日  
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：李茂盛  
共同主持人：李宗賢、蘇鴻麟、李月君、劉俊吉  
計畫參與人員：碩士級-專任助理：蔡漢霓  
碩士級-專任助理：柯蕙茹  
博士後研究-博士後研究：鄭恩惠  
博士後研究-博士後研究：陳建宏

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 107 年 07 月 30 日

中文摘要：粒線體功能不全是導致高齡婦女不孕的主要原因之一。雖然藉由移植健康卵母細胞的粒線體於改善老化卵母細胞的發育，在英國已是合法的治療方式，但是此方式仍然有“三親”的倫理疑慮以及異體移植的相容性問題。針對這些問題，我們的最終目標是由自體幹細胞分離出健康的粒線體，再移植至卵母細胞中以替代有缺陷的粒線體，重建老化卵母細胞的粒線體功能。本計畫針對不同年齡不孕症患者，分析受試者之血液細胞、顆粒細胞與胚胎篩檢後的剩餘檢體，以分析細胞中的粒線體活性，粒線體基因突變、或粒線體基因的多型性與數目，並將之比較分析，建立粒線體異常與不孕症關連之資料庫。藉由分析此粒線體基因數據庫的資料，本計畫希望可藉由特定細胞的粒線體基因分析，作為因粒線體老化導致不孕症之臨床輔助診斷指標。此外，我們以年輕和高齡的老鼠進行粒線體功能的測試，藉由粒線體膜電位、去氧核糖核甘三磷酸及著床前騎胚胎或細胞的耗氧量來評估粒線體功能。我們的結果指出，粒線體含量在染色體套數異常的人類胚胎高於正常的胚胎，且高齡婦女的胚胎粒線體含量亦較高；而染色體套數正常的胚胎，其中品質較好的胚胎粒線體含量較低。針對不孕症婦女進行血液及卵子周邊的顆粒細胞進行端粒長度及粒線體含量測定並定序，發現婦女的實際年齡和端粒測出的生物年齡結果相似，而粒線體含量及定序結果在高齡婦女表現量亦較高。而在動物實驗進行的粒線體功能測試，亦顯現年齡較高的老鼠胚胎粒線體功能較差。

為選擇適合作為粒線體移植的細胞，我們分離間葉幹細胞，如脂肪幹細胞等的粒線體，這些細胞的培養與粒線體分離將依人體細胞組織優良操作規範建立的標準流程進行，且粒線體功能測試由具財團法人全國認證基金會認證合格之台灣粒線體公司合作進行，可以獲得高產量及高功能性的線粒體，這項研究對評估自體線粒體轉移對治療人類衰老相關性不育的影響至關重要。這些結果提供開發針對線粒體異常患者的新治療提供了策略。

中文關鍵詞：粒線體、不孕症、老化

英文摘要：Mitochondrial contents in mammalian cells ranges from several hundred to thousand copy numbers, determined by the cell morphology and energy needs. Mitochondrial functions appear to be critical for embryo development during the pre-implantation stages. Dysfunctional mitochondria are a major cause of the infertility in aging women. Although allogenic mitochondrial transfer is legally permitted to rescue the mitochondrial activity of aging oocytes in the UK, ethical concerns of three parents and the compatibility of exogenous mitochondria have been challenged. We propose to provide intact autologous mitochondria from somatic stem cells of recipients to repopulate them in the oocytes for rescuing the mitochondrial defects. Patients will be first genetically examined for excluding the chromosome abnormalities. The animal study tested the mitochondria function in different age groups of mice by mitochondrial membrane potential, ATP levels, and oxygen consumption

measurement. In our results, that the amount of mtDNA are associated with women age, embryo morphology, and the pregnancy rate in this study. The mtDNA content may offer as a valuable tool to select the blastocysts for single embryo transfer. A statistically significant increase of mtDNA copy numbers in euploid blastocysts from the younger women was clearly revealed. Furthermore, in euploid blastocysts derived from younger women, comparing mtDNA contents between the examined morphological criteria showed significant difference between good and poor quality embryos. Our results of showed that the biological age was similar with the actual age. By comparison with older and younger women, the mitochondrial quantity in PBMC and granulose cells was the same. In this study, we found that infertility was associated with age related mitochondrial abnormalities, mainly due to the number of mitochondria or sequence problems. The data of animal tests showed that the mitochondrial function in older embryos was lower than those in younger mice. To providing intact autologous mitochondria, we cultured mesenchymal stem cells (MSCs). The cell cultures and isolation procedures have been established with GTP compatible protocols and the mitochondria functional analysis has been warranted with TAF approval, assisted by the full supports from Taimito Company. The high yield of harvested mitochondria, intact integrity of mitochondria and functionalities of mitochondrial respiration are the main criteria for selecting the candidate cell types in this study. This study will be critical for the evaluation of the impact of autologous mitochondrial transfer for treating aging-related infertility in humans. The results provide strategy for the development of new treatment for patients with mitochondrial abnormalities.

英文關鍵詞： mitochondria, infertility, aging

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

## 「建立以婦幼醫學為主軸的精準醫療專案計畫」

發展精準醫學進行老化及粒線體異常之不孕症治療

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 106-3114-B-040-001 -

執行期間：106 年 05 月 01 日至 107 年 04 月 30

執行機構及系所：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：李茂盛

共同主持人：蘇鴻麟 教授 [中興大學生命科學系(所)]

劉俊吉 副教授 [基因體暨生物資訊學研究所]

李宗賢 副教授 [中山醫學大學醫學研究所]

李月君 教授 [中山醫學大學生物醫學科學學系(所)]

計畫參與人員：蔡漢霓 (碩士級助理)

柯蕙茹 (碩士級助理)

鄭恩惠 (博士後研究員, 協同研究人員)

陳建宏 (博士後研究員, 協同研究人員)

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

## I. 中英文摘要

### 摘要:

粒線體功能不全是導致高齡婦女不孕的主要原因之一。雖然藉由移植健康卵母細胞的粒線體於改善老化卵母細胞的發育，在英國已是合法的治療方式，但是此方式仍然有”三親”的倫理疑慮以及異體移植的相容性問題。針對這些問題，我們的最終目標是由自體幹細胞分離出健康的粒線體，再移植至卵母細胞中以替代有缺陷的粒線體，重建老化卵母細胞的粒線體功能。本計畫針對不同年齡不孕症患者，分析受試者之血液細胞、顆粒細胞與胚胎篩檢後的剩餘檢體，以分析細胞中的粒線體活性，粒線體基因突變、或粒線體基因的多型性與數目，並將之比較分析，建立粒線體異常與不孕症關連之資料庫。藉由分析此粒線體基因數據庫的資料，本計畫希望可藉由特定細胞的粒線體基因分析，作為因粒線體老化導致不孕症之臨床輔助診斷指標。此外，我們以年輕和高齡的老鼠進行粒線體功能的測試，藉由粒線體膜電位、去氧核糖核甘三磷酸及著床前騎胚胎或細胞的耗氧量來評估粒線體功能。我們的結果指出，粒線體含量在染色體套數異常的人類胚胎高於正常的胚胎，且高齡婦女的胚胎粒線體含量亦較高；而染色體套數正常的胚胎，其中品質較好的胚胎粒線體含量較低。針對不孕症婦女進行血液及卵子周邊的顆粒細胞進行端粒長度及粒線體含量測定並定序，發現婦女的實際年齡和端粒測出的生物年齡結果相似，而粒線體含量及定序結果在高齡婦女表現量亦較高。而在動物實驗進行的粒線體功能測試，亦顯現年齡較高的老鼠胚胎粒線體功能較差。

為選擇適合作為粒線體移植的細胞，我們分離間葉幹細胞，如脂肪幹細胞等的粒線體，這些細胞的培養與粒線體分離將依人體細胞組織優良操作規範建立的標準流程進行，且粒線體功能測試由具財團法人全國認證基金會認證合格之台灣粒線體公司合作進行，可以獲得高產量及高功能性的線粒體，這項研究對評估自體線粒體轉移對治療人類衰老相關性不育的影響至關重要。這些結果提供開發針對線粒體異常患者的新治療提供了策略。

## Abstract

Mitochondrial contents in mammalian cells ranges from several hundred to thousand copy numbers, determined by the cell morphology and energy needs. Mitochondrial functions appear to be critical for embryo development during the pre-implantation stages. Dysfunctional mitochondria are a major cause of the infertility in aging women. Although allogenic mitochondrial transfer is legally permitted to rescue the mitochondrial activity of aging oocytes in the UK, ethical concerns of three parents and the compatibility of exogenous mitochondria have been challenged. We propose to provide intact autologous mitochondria from somatic stem cells of recipients to repopulate them in the oocytes for rescuing the mitochondrial defects. Patients will be first genetically examined for excluding the chromosome abnormalities. The animal study tested the mitochondria function in different age groups of mice by mitochondrial membrane potential, ATP levels, and oxygen consumption measurement. In our results, that the amount of mtDNA are associated with women age, embryo morphology, and the pregnancy rate in this study. The mtDNA content may offer as a valuable tool to select the blastocysts for single embryo transfer. A statistically significant increase of mtDNA copy numbers in euploid blastocysts from the younger women was clearly revealed. Furthermore, in euploid blastocysts derived from younger women, comparing mtDNA contents between the examined morphological criteria showed significant difference between good and poor quality embryos. Our results of showed that the biological age was similar with the actual age. By comparison with older and younger women, the mitochondrial quantity in PBMC and granulose cells was the same. In this study, we found that infertility was associated with age related mitochondrial abnormalities, mainly due to the number of mitochondria or sequence problems. The data of animal tests showed that the mitochondrial function in older embryos was lower than those in younger mice. To providing intact autologous mitochondria, we cultured mesenchymal stem cells (MSCs). The cell cultures and isolation procedures have been established with GTP compatible protocols and the mitochondria functional analysis has been warranted with TAF approval, assisted by the full supports from Taimito Company. The high yield of harvested mitochondria, intact integrity of mitochondria and functionalities of mitochondrial respiration are the main criteria for selecting the candidate cell types in this study. This study will be critical for the evaluation of the impact of autologous mitochondrial transfer for treating aging-related infertility in humans. The results provide strategy for the development of new treatment for patients with mitochondrial abnormalities.

## II. 關鍵字: 粒線體、不孕症、老化

keywords: mitochondria, infertility, aging

## 一、前言

粒線體最主要的功能是生成ATP。粒線體產生ATP時，也會同時釋放活性氧 (ROS)，當ROS產生太多時，會對粒線體DNA (mtDNA) 造成氧化性損傷，並導致基因突變和粒線體DNA的缺失 (Herbert et al., 2015)。由於缺乏修復酶的粒線體DNA，其對ROS的損傷更為敏感，與細胞核DNA相較，粒線體DNA可高出10~20倍突變率。突變的粒線體DNA的累積會使ATP的生產降低，並造成正常的染色體於細胞分裂過程中，染色體分離的不正常 (Hudson and Chinnery, 2006)。目前已知，年長女性的卵母細胞常會伴隨著粒線體功能下降，粒線體內外膜的電位差降低，以及ATP產率的降低 (Duran et al., 2011; Koyama et al., 2014; Rebolledo-Jaramillo et al., 2014)。卵母細胞粒線體的功能受損，與隨後其胚胎發育及胚胎生存能力的下降，呈現正相關 (Rambags et al., 2014)。人類年長女性卵母細胞中所觀察到的粒線體功能異常與氧化壓力增加，也中發現於其他動物的生殖障礙，為年長動物生殖問題的一普遍現象 (Simsek-Duran et al., 2013)。目前藉由胚胎著床前基因診斷與篩檢可以得知胚胎是否可能有遺傳疾病以及可能的染色體異常，但是對於粒線體基因的分析則較無定論。尤其對於接近高齡或高齡婦女而言，如何提早得知本身卵母細胞的粒線體正常與否，而可以提早凍卵或做進一步的檢查與治療，目前並無一標準診斷方法或早期診斷的指標。少子化與人口快速老化已成為台灣的重要議題。藉由粒線體DNA的遺傳分析，探討粒線體基因變異與老化不孕症的關係。本研究經粒線體基因檢測及動物試驗的成果得知粒線體移植成效，並透過配合廠商台灣粒線體公司提供符合GTP規範之細胞與純化之粒線體，未來可改善卵子粒線體功能與增加胚胎發育，著床，及高懷孕率與出生率。

## 二、研究目的

本計畫針對粒線體基因異常或變異與高齡不孕症的關連性進行研究，藉由不孕症婦女之血液、顆粒細胞及胚胎篩檢後剩餘檢體DNA檢體，進行粒線體序列及含量分析並比對臨床結果，期望可以建立一粒線體檢驗程序與評估標準，幫助患者於進行人工生殖手術前，可先篩選出基因組及粒線體皆正常的胚胎，提高受孕率。另外，以細胞株及動物試驗分析粒線體在年輕及高齡小鼠功能的差異，以評估何種細胞之粒線體，可能成為最適合的粒線體移植來源，而合作廠商台灣粒線體公司則研發提供符合GTP規範之細胞與純化之粒線體。

## 三、文獻探討

人的粒線體基因組 (共有16569bb) 表達13個多肽，這些蛋白質是參與在粒線體的能量產生過程電子傳遞鏈的蛋白複合體中所需的基因，粒線體DNA上包含22個tRNA及12S、16S rRNA，因此粒線體基因的缺陷或是基因組數量異常會造成能量 (ATP) 產生異常。其中D-loop區域屬於高度變異的區域，該區域的高度變異可用於比對粒線體的來源之異常疾病。

粒線體基因的缺陷除會造成粒線體的DNA異常的家族性遺傳疾病外，具有粒線體缺陷與不孕是有關聯的，其可能使得某些具代謝性疾病如糖尿病及肥胖症的不孕症婦女，會產生如同卵子老化造成的胚胎發育不佳現象 (Miao et al., 2009; Wang et al., 2009; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2013)。初始生殖細胞 (primordial germ cell) 會因為粒線體功能缺失而影響卵子生成 (oogenesis)，導致下一代健康受損 (Fowden et al., 2006)，由於卵子細胞質粒線體效能與促進卵子成熟有相關性，因此粒線體在各種哺乳類卵子內的數量及功能則會直接影響卵子受精及發育的效果 (El Shourbagy et al., 2006; Michaels et al., 1982; Reynier et al., 2001)。

人類卵子的粒線體有數十萬個之多，精子則只有數百個，一旦精子與卵子結合為受精卵，精

子的頭部區域會進入卵子內進行細胞核融合並產生染色體互換，保留在受精卵外中段區域的特化粒線體會全數銷毀殆盡。如果精子或卵子中的粒線體數量不足、突變或高齡都會造成卵子、精子品質下降或受精率降低 (Matthews and Hamilton, 2009; Tilly and Sinclair, 2013)，將導致胚胎發育氧化還原狀態的失衡，損害胎盤和胚胎生長 (Hyslop et al., 1988)。胎盤發育、激素的合成 (Tuckey, 2005)和滋養細胞氧的傳遞 (De Marco and Caniggia, 2002) 均需有功能的粒線體來維護 (Martinez et al., 2002)。尤其卵子老化與粒線體功能缺失有極強的關聯性 (Chappel, 2013; Eichenlaub-Ritter et al., 2011; Miao et al., 2009; Wang et al., 2011)，許多研究報導指出卵子老化會伴隨著受損的粒線體數目增加，導致粒線體基因表現量改變，粒線體膜電為降低，造成粒線體ATP 不足。並且因無法處理多餘的活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS)，ROS 過多導致持續攻擊基因體DNA 或粒線體DNA而影響電子傳遞鏈的效能。粒線體DNA 發生突變的機率是染色體DNA 的十倍至二十倍 (Larsson, 2010; Lee and Wei, 2007; Taylor et al., 2003)，其中又以粒線體8470 至13459 位點發生4977 bp 的缺失最為常見 (May-Panloup et al., 2005)。有報導認為該段缺失可以做為卵子老化的標記 (Cortopassi and Arnheim, 1990; Cortopassi et al., 1992; Jacobs et al., 2007)。

粒線體疾病為母源性遺傳，原核移植 (Craven et al., 2010; Hyslop et al., 2016; Zhang et al., 2016b)與紡錘體/染色體移植 (Paull et al., 2013; Tachibana et al., 2013)技術為近年來為根除遺傳性粒線體疾病所建立之技術，基本上均是利用顯微操作技術將換患者的基因遺傳物質置換至健康卵子細胞質中，藉此剔除異常之粒線體以降低其於胚細胞中所佔比例，兩種技術均具高技術挑戰性 (Wolf et al., 2015)，最主要之差別為原核移植可利用無效之多精入卵胚細胞質作為移植來源，而紡錘體/染色體移植則需要所費不貲之新鮮正常成熟卵子進行移植，但相對而言原核移植過程又較紡錘體/染色體移植更為繁瑣。

在動物試驗方面，本實驗主要先測試初代纖維母細胞與間葉幹細胞，是否可成為粒線體移植的來源。由於幹細胞具有自我複製的優點，可以體外不斷繼代，並且幹細胞內的粒線體，一般而言較分化後的體細胞的活性低，產生較少的ROS，其粒線體DNA可保持較高的完整性，受到氧化壓力的傷害也較低。目前類似的方法，以Ovascience 公司利用自體生殖系統粒線體能量轉移方法 Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer (AUGMENT) 最為人所熟知 (Woods and Tilly, 2015)。此方法經由取出卵母幹細胞，分離此自體幹細胞內的粒線體，再移植入卵母細胞中，以增加不孕症婦女的IVF 成功率。

然而目前對於Ovasciences 公司所取出的卵母幹細胞的細胞特性，分離率以及粒線體的品質控管等等，仍有疑慮。目前幹細胞領域中，以間葉幹細胞的培養最為單純。其中包括脂肪幹細胞 (adipose-derived stem cells, ADSC)、去分化脂肪幹細胞 (dedifferentiated fat cells, DFATcells)(Lessard et al., 2015; Watson et al., 2014) 以及多能幹細胞 (multilineage differentiating stress enduring cells, Muse cells) (Dezawa, 2016)，或許是可以應用於生殖系統的良好粒線體來源。

近期隨著英國立法(<http://www.hfea.gov.uk/9931.html?fldSearchFor=mitochondria>) 開放粒線體捐贈與置換用於治療粒線體遺傳性疾病，2016 年華裔科學家John Zhang 團隊報導以紡錘體/染色體移植之細胞質置換技術替具粒線體遺傳疾病 (Leigh syndrome) 女性產下一名健康男嬰 (Zhang et al., 2016a)。相同團隊亦於同年發表利用原核移植技術置換受精卵細胞質，改善不孕症患者胚胎之早期發育停滯，並在胚移植後成功建立懷孕 (Zhang et al., 2016b)。自此，以粒線體移植治療具粒線體缺陷胚胎作為臨床治療之方式再度吸引眾人注目。另一方面，早前研究發現於出生後小鼠卵巢皮質層中，可利用VASA 抗體分離具有絲分裂能力之細胞，將其移植至卵巢後可進行分化形成具功能性之卵細胞，推測於出生後卵巢中可能具有卵子幹細胞 (ovarian stem cells, OSC) (Johnson et al., 2004)。猶有甚者，利用相同方法亦可於年紀較大之女性卵巢中分離出具相似特性之細胞 (White et al., 2012)。



基於OSC 的發現，目前已自此衍生出不同之臨床治療方法，其中一項AUGMENTS M 療程即利用自體粒線體移植之概念，將OSC 自不孕症患者卵巢中回收並取出粒線體後，再移植回該患者之受精卵中，目前全球已有數個醫療中心開始進行該臨床試驗，亦有少數文獻報導 AUGMENTS M 可增加不孕症患者懷孕之機率 (Fakih et al., 2015; Oktay et al., 2015)。然而，以OSC 進行臨床治療仍極具爭議，諸如相關動物試驗報導相當匱乏、OSC 存在與否仍為未定之數且目前所累積之臨床數據並無法提供AUGMENTS M 具確切功效之結論 (Grieve et al., 2015; Hanna and Hennebold, 2014; Zhang et al., 2012)，即便OSC 確實存在且AUGMENTS M 可達到預期效果，亦需慎重考慮此侵入式、獲取粒線體過程繁複且預期細胞量稀少的方式是否可有效率地達到臨床治療之目的。

## 四、研究方法

### (一) 粒線體基因異常與高齡不孕症的關連性

#### 4.1.1 萃取細胞DNA

首先將顆粒細胞以 PBS 緩衝溶液清洗二次，之後根據 QIAamp DNA blood mini kit 萃取流程進行細胞 DNA 的萃取，加入 400  $\mu$ l lysis bufferr 加入 20  $\mu$ l Proteinase K (40 mg/ml)，放置 56°C，10 分鐘，加入 400  $\mu$ l 100% ethanol 混合完全，通過 column，離心 (8000 rpm，1 分鐘) 後，將用 buffer1 wash 一次(8000 rpm,1 分鐘)，接著用 buffer 2 wash 二次(12000 rpm,3 分鐘)後，用 TE buffer 靜置 1 分鐘，溶解吸附在 column 上的 DNA，離心 8000 rpm，1 分鐘，測量其吸光值換算已得到 DNA 濃度。

#### 4.1.2 以時定量PCR 測定端粒長度

端粒為真核細胞內線性染色體末端一段特殊結構，由端粒DNA 和端粒結合蛋白 (telomere binding protein) 構成，其DNA 為簡單的TTAGGG 重複序列，在人類長度約5~15kb，不具有編碼任何蛋白質功能，其功能是解決末端複製問題，以防止染色體末端融合、丟失，維持染色體穩定，並確保染色體在減數分裂中順利分離，1990 年Harley 等首先提出細胞衰老的端粒假說，即端粒隨著細胞的分裂增值而逐漸縮短，當端粒短到一定程度而不足以維持其功能時則細胞不再分裂，陸續有學者証實端粒長度可以表現出細胞或組織器官的複製潛能與增殖能力。研究發現端粒具有組織特異性，同一個體不同細胞的長度差別也很大，而以往我們只單純的用年齡來判定進行試管嬰兒療程婦女的劑量，是不夠客觀的。因此本研究我們應用比較科學且客觀的方式分析生殖系統的細胞的衰老現象，對於評估生殖細胞甚至胚胎的品質，據以作為老化的參考，應可達到較精準的判定老化程度。以電泳方法分析端粒長度比較之差異不明顯，故改以Cawthon 於2002 年發表以時定量PCR 測定端粒長度相對於36B4 基因之方法測定端粒的長度，測定端粒的序列組如下 GGT TTT TGA GGGTGA GGG TGA GGG TGA GGG TGA GGG T，TCC CGA CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCCCTA，而36B4 基因在體內只有一套複製體 (one copy) 故可用於作為評估端粒重複數樣之依據其偵測序列為TCCCTACAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC ，CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA，取1  $\mu$ l (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) DNA加入14.9  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O混合，primer 為5'CCCTAA3' 及 5',TTAGGG3'，再加入2.5 $\mu$ l dNTP (10 mM)以及2.5  $\mu$ l 10 $\times$  PCR buffer (10 mM Tris-HCl，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，50 mM KCl 和0.1%Triton X-100)，和0.1  $\mu$ l Taq DNA polymeras 及 PfuDNA polymeras (Super-Therm，5U/ $\mu$ l)於即時聚合酶連鎖反應儀前處理50°C，2分鐘後再95°C 10分鐘進入後進入第1 個循環處理95°C 1 分鐘，54°C 2分鐘，進行40個循環次數，4°C保存，每一組基因之表現量經三次重複測定。將測定之Ct值帶入 $2^{-\Delta\Delta ct}$  統計。

#### 4.1.3 血液粒線體序列分析 (Zhang et al., 2016)

以次世代定序方法測定粒線體序列，所有粒線體DNA及genomic DNA 以TaKaRa PCR試劑組

進行長片段9289bp hmtF1 569 (5'-AACCAAACCCCAAAGACACC-3') 及hmtR1 9819(5'-GCCAATAATGACGTGAAGTCC-3')及7626bp htmF2 9611 (5'-TCCCCTCCTAAACACATCC-3')及hmtR2 626 (5'-TTTATGGGGTGATGTGAGCC-3') *Taq* DNA polymerase (Tang et al., 2010) 進行兩段重複片段放大，以0.7%瓊脂電泳膠來確定片段大小，接著根據Illumina TruSeq NGS protocol的試劑進行粒線體DNA的 library配置，再以Qubit (LifeTechnologies) 儀器進行DNA定量，最後以Illumina Genome Analyzer II 平台進行粒線體序列分析。根據Illumina mtDNA Variant Analyzer BaseSpace App分析，觀察變異位點影響的基因，可以推斷出有變異的基因位點，連結到臨床的結果統計分析作為後續調整醫療策略的參考。

#### 4.1.4 血液及顆粒細胞粒線體套數含量測試

利用Real-time PCR : TaqMan probe assay系統，偵測兩個粒線體上的較不易變異的基因 RNR2 及ND4，並使用Alu sequence作為internal control，定量PCR的反應物組成如下：1 X SYBR® GreenPCR Master Mix (購自ABI, Foster City, USA)，100 nM引子，反應總體積為25 ul。所使用定量PCR的機型為 ABI PRISM® StepOne plus Detection System。每一個樣品須做三重複，以確保實驗的再現性。

#### 4.1.5. 胚胎植入前篩選後剩餘DNA 之粒線體序列測試

針對胚胎植入前篩選後之剩餘DNA 檢體進行粒線體含量及序列分析並對照其常規療程的臨床治療的結果包括胚胎著床率, time-lapse 影像培養紀錄, 染色體套數等臨床數值加以歸類分析。胚胎植入前篩檢的DNA 剩餘檢體是經過QIAGEN REPLI-g<sup>®</sup> Mitochondrial DNA kit進行粒線體基因放大，反應條件為75°C 5分鐘後，加入1 µl REPLI-g Midi DNA polymerase 接著33°C 8小時，65°C 3分鐘，儲存4°C。接著將粒線體基因序列分成5段分別進行PCR，引子分別為 1F(5'-CTATCACCTATTAACCACTCACGG-3')、1R(5'-CGCTTTGTGAAGTAGGCCTTATTTTC-3')、2F(5'-ATCCCGATGGTGCAGCCGCTAT-3')、2R(5'-ACTATAGCAGATGCGAGCAGGAGTA-3')、3F(5'-AGTAATACCCATCATAATCGGAGGC-3')、3R(5'-GCTTCGAAGCCAAAGTGATGTTT-3')、4F(5'-TACAATTTTACTGGGTCTCTATTTTACCC-3')、4R(5'-TAAATCATGCTAAGGCGAGGATG-3')、5F(5'-TAATCTTAGTTACCGCTAACAACTATTCC-3')、5R(5'-TGAGGCAGGAATCAAAGACAGATACT -3')，再將PCR產物，接著以Illuminar Miseq system 進行序列分析，我們利用Illumina mtDNA Variant Analyzer BaseSpace App分析，觀察變異位點影響的基因統計分析粒線體序列及含量，臨床結果比對項目及統計方法經取得受試者同意後，摘錄他們的年齡臨床胚胎植入前篩選的染色體結果、胚胎著床率、懷孕率。並以SPSS 軟體進行 Chi-square 及 *student t* test 進行統計分析。由於胚胎植入前篩檢的DNA 剩餘檢體是經過 SurePlex Extraction cocktail master mix 進行全基因體放大，所裁切的DNA 序列片段可能未必完全可依本計畫設計的應用的軟體可分析的出來，因此可能要調整laboratory 的試劑或請生資團隊嘗試用不同的軟體分析。

## (二) 粒線體移植之小鼠動物模式及人類粒線體異常胚胎之粒線體移植

### 4.2.1 母鼠超級排卵處理與配種

挑選處於合適發情週期之母鼠進行超級排卵處理，腹腔注射 10 I.U. 孕馬血清激性腺素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)，於 48 小時後腹腔注射 10 I.U. 人類絨毛膜激性腺素 (human chorionic gonadotropin, hCG)，隨即將母鼠置入公鼠籠內令其交配 (隔夜)，隔日檢查母

鼠有無陰道栓 (vaginal plug)。

#### 4.2.2 鼠胚之收集

hCG 注射後 24 小時，挑選具陰道栓之母鼠犧牲取出輸卵管 (oviduct)，以經磨鈍之 30G 針頭於解剖顯微鏡下以回溫之 HTF 溶液沖洗輸卵管將鼠胚沖出。原核期胚之外圍常具有卵丘細胞包覆，因此收集原核胚後，將其置於玻尿酸酶中 2~3 分鐘，並同時以玻璃管反覆吸放直到完全去除因酵素作用而呈現鬆散之卵丘細胞。將胚移回 HTF 中清洗 3 次，隨後將清洗乾淨之鼠胚，移入蓋有礦物油 (Paraffin Oil) 之 HTF medium 液滴中，於 37°C 培養箱中培養至實驗所需時期。

#### 4.2.3 JC-1 染色及 FCCP 處理

胚胎發育至欲觀察時期後，將胚胎置入含有 10 $\mu$ M 之 JC-1 溶液中，於 37°C 培養箱中培養 30 分鐘；FCCP 處理之組別則置於含有 10  $\mu$ M 之 JC-1 及 2 Mm 之 FCCP 溶液中，於 37°C 培養箱中培養 30 分鐘。經 30 分鐘反應後，以 HTF medium 清洗 2 次後置入 HTF 液滴中，以螢光顯微鏡進行拍照觀察。細胞部分則以相同 JC-1 及 FCCP 濃度之培養液處理後，以 PBS 清洗 2 次後，以螢光顯微鏡進行拍照觀察。螢光量分析使用 Image J 影像分析軟體。

#### 4.2.4 ATP 含量檢測

胚胎發育至欲觀察時期後，將胚胎取出並將其以 lysis buffer 分解釋出 ATP。加入冷光反應藥劑 (Luminescent ATP substrate) 5 分鐘後以冷光儀偵測其冷光量並計算其 ATP 含量。

#### 4.2.5 海馬儀粒線體壓力檢測

不同細胞種類於上機前先測試最適細胞濃度，須達到單層細胞 9 成 5 底面積覆蓋量。找到最適濃度後，前一天將海馬儀探針浸泡於激活液中，並以 37°C 無二氧化碳注入之培養箱中培養 12 小時以上。試驗當天細胞以 PBS 清洗一次後，換為海馬儀專用上機培養液於 37°C 無二氧化碳注入之培養箱中培養 30 分鐘後上機。於上述培養期間，需先將 10 倍濃度之 oligomycin、FCCP 以及 rotenone/ atimycin A 放入注藥槽內，並連同激活液後探針於海馬儀內校正溫度及酸鹼值。

## 五、結果與討論

針對粒線體含量與婦女年齡及正常胚胎發育的關聯性，本研究團隊利用胚胎植入前篩選之 DNA 檢體進行粒線體含量及序列分析。先導試驗中以次世代定序(next generation sequencing, NGS) 分析 20 個胚胎篩檢檢體，其中 4 個檢體未發現粒線體，因此我們改由胚胎篩檢後的全基因體放大檢體，利用 Real-time PCR: TaqMan probe assay 系統，來偵測兩個粒線體上的較不易變異的基因 RNR2 及 ND4，並使用 Alu sequence 作為 internal control，以降低全基因體放大後所產生的誤差並減少 allele dropout，並利用 Normalize 消除胚胎切片所取得細胞數量的差異。本研究發現年齡與粒線體 DNA 含量的關係從統計圖看來，小於 38 歲不孕症患者的粒線體 DNA 含量顯著高於 38 歲者，且 ND4 及 RNR2 這兩個基因均有同樣的趨勢。依年紀分成大於 38 歲與小於 38 歲兩組，胚胎品質較差的粒線體含量較高，ND4 與 RNR2 這兩個基因有相同的結果 (fig 1)。本計畫先導試驗中亦利用胚胎培養影像即時監控系統 (Time-Lapse Culture System) 進一步依據胚胎品質與型態動力學優劣加以分組，並觀察其與胚胎粒線體含量之相關聯性。結果發現品質優良且型態動力學最佳之胚胎相較

於品質與型態動力學較差之胚胎有稍高的粒線體含量，惟未達統計上之意義，以上結果已於2017年台灣生殖醫學會(施 等人; 2017)及Reproductive Genetic Diagnostics ( Cheng et al., 2017, Cambridge, MA)，國際會議中發表。

根據本計畫所擬定的標準，收集並分析高齡及年輕婦女的血液粒線體序列、粒線體含量及端粒長度，於核定的時間內，收案人數50人，高齡婦女26人，年輕婦女24人；大於38歲高齡的婦女，血液及顆粒細胞檢體的端粒長度相較於年輕婦女明顯較短(fig2)。偵測粒線體含量的方法改採細胞核上基因B2M (Beta-2-Microglobulin)當做internal control，因原本使用的Alu 基因個體間變異較大 故改變internal control gene，並利用兩個粒線體上的較不易變異的基因 RNR1及ND3，分析血液及顆粒細胞中粒線體的含量，發現顆粒細胞的粒線體含量明顯高於血液檢體，而年輕及高齡婦女之間血液及顆粒細胞中的粒線體含量並無太明顯的差異 (fig 3)，由於目前收案數還是偏少，需招募更多受試者分析後再進行全面的分析比較。在粒線體序列分析部分已成功利用NGS方法完成血液、顆粒細胞及胚胎檢體的序列分析完成，年輕婦女有11人，平均年齡34歲，而高齡婦女有13人，平均年齡41歲，分析血液和顆粒細胞檢體粒線體序列相似性很高，只有粒線體基因上的D-loop區域突變的位點數及異質性變異在高齡婦女組有稍高的趨勢 (fig 4A) 高齡的檢體相較於年輕的檢體異質性變異較明顯，與之前發表過的年齡越大粒線體D-loop區域變異性越大相類似(Yuichi et al.1999)，由於目前檢體數仍偏少需再累積更多，以進行分析。在我們分析的族群中年輕婦女11人其中有胚胎檢體6人，高齡婦女13人其中有胚胎檢體10人，進一步分析血液、顆粒細胞及胚胎檢體粒線體序列，發現三者序列很相似但若以顆粒細胞的序列當做標準，D-loop區域位點變異性，年輕與高齡的婦女，胚胎檢體部分(90.94% vs95.2%) 相較於血液檢體(100% vs 99.24%)變化較多；此外，粒線體序列的異質性比較，年輕與高齡的婦女，胚胎檢體部分(93% vs95.89%) 相較於血液檢體(100% vs 97.7%)也是有變化較多的趨勢(fig 4B)。以顆粒細胞的序列來分析年輕及高齡婦女粒線體上具功能性的區域，是否有差異性，發現粒線體上具功能性區域的序列變異與年齡沒有太大的相關性(fig 5)。

子計畫二作為臨床計畫的先導及安全性評估，首先要瞭解粒線體萃取方式及選定一種有效率之萃取方法，本試驗選定三種常用之萃取方式，分別為粗萃取(Differential centrifugation, DC)、蔗糖梯度離心(Density-gradient centrifugation, GC)以及免疫沉澱磁珠(Anti TOM22 magnetic beads)萃取，並以相同之細胞量( $4 \times 10^9$ )進行萃取並分析三種萃取方式所需時間、效率、純度、所需樣本數量及價格之差異。詳細比較如 Table 1,其中免疫沉澱磁珠萃取方式因磁珠無法完全自萃取粒線體上完全清除，為避免後續實驗干擾因此不考慮此法。本試驗後期欲應用至人體，並與台灣粒線體公司合作，該公司之萃取方式為蔗糖梯度離心，為統一實驗規格，後續實驗皆以蔗糖梯度離心方式萃取粒線體。

以 JC-1 染色以檢測卵子及胚胎內粒線體膜電位，進行超級排卵，觀察 8~ 12 週之 B6D2F1 小鼠於合子、桑葚胚及囊胚時期我們皆可觀察到紅螢光的表現量較綠螢光來的高(fig 6)，並以影像軟體(Igarashi *et al.*, 2016)計算螢光表現量後進行分析比較。JC-1 於大部分研究中皆是以紅螢光表示粒線體之膜電位差高，為健康且作用良好之粒線體；而綠螢光則表示粒線體脂膜電位差低下，其可能較不健康或功能不佳。但於本試驗中，考慮到動物生殖細胞於胎兒時期就已進行分化並停留於減數分裂，粒線體則是大部分皆停留在休止期，形狀偏向圓形且脊膜較少 (Motta *et al.*, 2000)；受精之後胚胎開始發育進而能量需求量上升，自四細胞期粒線體型態開始改變；至八細胞期以後，絕大多數粒線體才轉為長橢圓型，內膜摺皺增加，產能功能提升。且依據 Sukumar *et al.* 於 2016 年發表於 Cell Metabolism 之文獻，並不以膜電位高低作為判別粒線體健康與否之指

標，而是以粒線體膜電位高低作為 T 細胞可能之分化依據。依據上述文獻(Sukumar et al., 2016)，可推測胚胎於 8 細胞時期以前，其粒線體停於休止期，膜電位低下，因此其 JC-1 染色紅螢光之比例相對不高；而 8 細胞期之後粒線體開始活化，膜電位上升以利呼吸作用及 ATP 之產生，因此 JC-1 染色後紅螢光之比例提升。

本計畫另使用 2  $\mu$ M FCCP 處理胚胎，以檢測不同細胞期之後 JC-1 紅螢光量增加是否為粒線體功能上升所造成( fig 6, fig 7)。FCCP 為一 proton ionophore，可強制將粒線體上之質子孔道打開之藥物，使得內外膜電位差變小，因此 JC-1 染色後紅螢光量會下降。MII、2- cell 及 4- cell 時期可能由於粒線體大部分仍處於休止態，因此 FCCP 對其作用並不明顯；於 morula 及 blastocyst 時期，由於粒線體轉變為高產能型態使得活性相較於前期來得高，因此 FCCP 作用後可觀察到粒線體之紅螢光表現明顯下降。而原核期 (pronuclei)之胚胎其 JC-1 染色紅螢光比例增加，可能是由於精子入卵後造成鈣離子變化而導致。當鈣離子梯度產生變化會帶動粒線體上膜電位之變化，而並非由於粒線體活性增加之結果。本試驗比較年輕及高齡族群卵子或胚胎內粒線體，因此以退役之 B6 母鼠作為高齡試驗組。退役母鼠由於排卵數降低、產仔數少，因此卵子及胚胎取得不易，仍需繼續累積樣本數。

可發現高齡母鼠其紅螢光表現量較高，表示其粒線體與年輕族群相比有較多進入有活性之產能狀態。依據 Chason 等人於 2011 之研究顯示，胚胎之耗氧量於八細胞期之後才会有顯著提升，在此之前多依賴葡萄糖之糖解作用產生能量。高齡鼠可能由於自糖解途徑之能量供應不足而導致提前使粒線體進入活化態，以彌補能量供應上的不足，但後續仍需更深入研究才能詳細了解其詳細作用機轉。本試驗另以粒線體功能缺陷鼠進行比較，發現若粒線體功能異常，其 JC-1 染色後紅螢光之比例相對較低。惟因基因鼠之胚胎取得不易，後續仍需累積樣本數(fig 8)。JC-1 染色以檢測細胞內粒線體膜電位。

本計畫後其預計以正常之細胞萃取其粒線體並轉移至粒線體功能異常之胚胎中，以提升其授精及胚胎著床發育之能力，因此我們選定不同之細胞種類做比較，分別為胚胎幹細胞 (embryonic stem cell, ESC)、誘導性多能幹細胞 ( induced pluripotent stem cell, iPSC)以及脂肪幹細胞 (adipose-derived stem cell, ADSC)。其中由於 iPSC 細胞株為綠螢光細胞株，故無法以 JC-1 染色做比較。而 ESC 及 ADSC 經 JC-1 染色或處理 2  $\mu$ M FCCP 後，結果顯示如 fig 9。兩者之 JC-1 紅綠螢光比例數值皆較卵及胚胎來得高，但 FCCP 處理後無明顯下降。此結果可能顯示此兩種細胞並不似胚胎初期主要以糖解作用作為主要能量來源；雖然粒線體活性較胚胎高，但其對於 FCCP 之反應與胚胎八細胞期以前相似且不似囊胚期胚胎 JC-1 紅綠螢光比值會因 FCCP 的處理而明顯下降，推測幹細胞之粒線體活化比例可能介於分化細胞及胚胎之間。

檢測卵子及胚胎內之 ATP 含量則以 20 顆卵子或胚胎經藥物反應後偵測其冷光可發現，隨胚胎發育之進行能量需求增加，而此時粒線體活性尚未發展完全使得其胚胎內 ATP 消耗量明顯上升 (fig 10)。於原核期所增加之 ATP 量為精子入卵所造成(Campbell and Swann, 2006; Dumollard *et al.*, 2008)。測試以海馬檢測細胞粒線體耗氧量位比較不同幹細胞種類之粒線體精確之耗氧量，以推算粒線體功能，我們將上述三種細胞以海馬儀 (Aligent Seahorse)檢測於不同之藥物處理狀況下之反應。粒線體壓力測試 (mito stress test) 於測試期間分別加入寡霉素 (oligomycin)、FCCP 以及魚藤酮 (rotenone/ antimycin A)。Oligomycin 之作用為抑制粒線體上 ATP 合成酶之作用，而 rotenone/ antimycin A 作用阻斷電子傳遞鍊。Fig 11 中顯示與較接近胚胎之 ESC 比較，iPSC 之粒

線體作用仍是較高的；但再與 ADSC 相比(fig 12) 雖然兩者之趨勢相當，但檢測之細胞量於 ADSC 為  $9.5 \times 10^3$  個細胞，iPSC 為  $4 \times 10^4$  個細胞。因此，推測 ADSC 為較依賴粒線體產能(粒線體活性較高) 之細胞種類，而 ESC 為粒線體活性相對最低之細胞，iPSC 則介於兩者之間。

測試以海馬檢測胚胎粒線體耗氧量所需條件，小鼠進行超級排卵後，分別收集粒線體活性較低之二細胞期胚胎及活性較高之桑葚胚期和囊胚期之胚胎，依據不同數量進行測試。由於海馬儀之藥物添加為氣壓式並且其探針會以上下移動之方式進行混和，故胚胎並無法固定於探針下，導致訊號不穩定(fig 13)。而其中二細胞期需要到 60 可胚胎才能夠偵測到穩定訊號，而囊胚期之胚胎則需要 30 顆，顯示發育後期之胚胎其粒線體活性較前期高(fig14)。

關於原預定進行之人類粒線體異常胚胎之粒線體移植部分，台灣粒線體公司目前的粒線體製程與目前製程規劃，經穿透式電子顯微鏡觀察，確定已可純化出九成的粒線體，其中八成以上完整之粒線體(fig 15)。再以海馬能量儀分析活性並將分離出的粒線體以 FLOW 分析，接著以 NAO 進行染色分析，內容物 98% 是粒線體，再藉由 TMRE 染色，確認其中 85% 是高活性(高膜電位)的粒線體(fig16)。

經過多種粒線體凍存配方測試，並配合以海馬能量儀測試凍存的結果以 FMB2 為主的配方效果最好(Table 2, fig 17)。目前符合 GTP MSC 粒線體製程已完成，多批次驗證、冷凍解凍、細胞存活率、病原菌汙染檢測、細胞運送等均亦已完成測試，待子計畫二確認最適合卵子或早期胚胎使用的粒線體即可進行後續的產程作業。

Table 1. 進行萃取並分析三種萃取粒線體方式所需時間、效率、純度、所需樣本數量及價格之差異

	粗萃取 Differential centrifugation (DC)	蔗糖梯度離心 Density-gradient centrifugation (GC)	免疫沉澱磁珠 AntiTOM22 magnetic beads
所需時間	約一小時	約 4 小時	約 2 小時
萃取效率(以粗萃取為基準之比例)	1	1/4	1/8
純度	低	中	高
所需樣本數量	少	多	極多
花費	低	低 (需超高速離心機)	高

Table 2. 多種粒線體凍存配方測試

Buffer	凍存後海馬上機結果討論		
	凍存1~2週	凍存1個月	凍存3個月
FMB-1	1週時各組無顯著差異，2週時FMB-2有比較好的趨勢	BASAL值 FMB-2最好	BASAL值 FMB-2最好
FMB-2			
FMB-3			

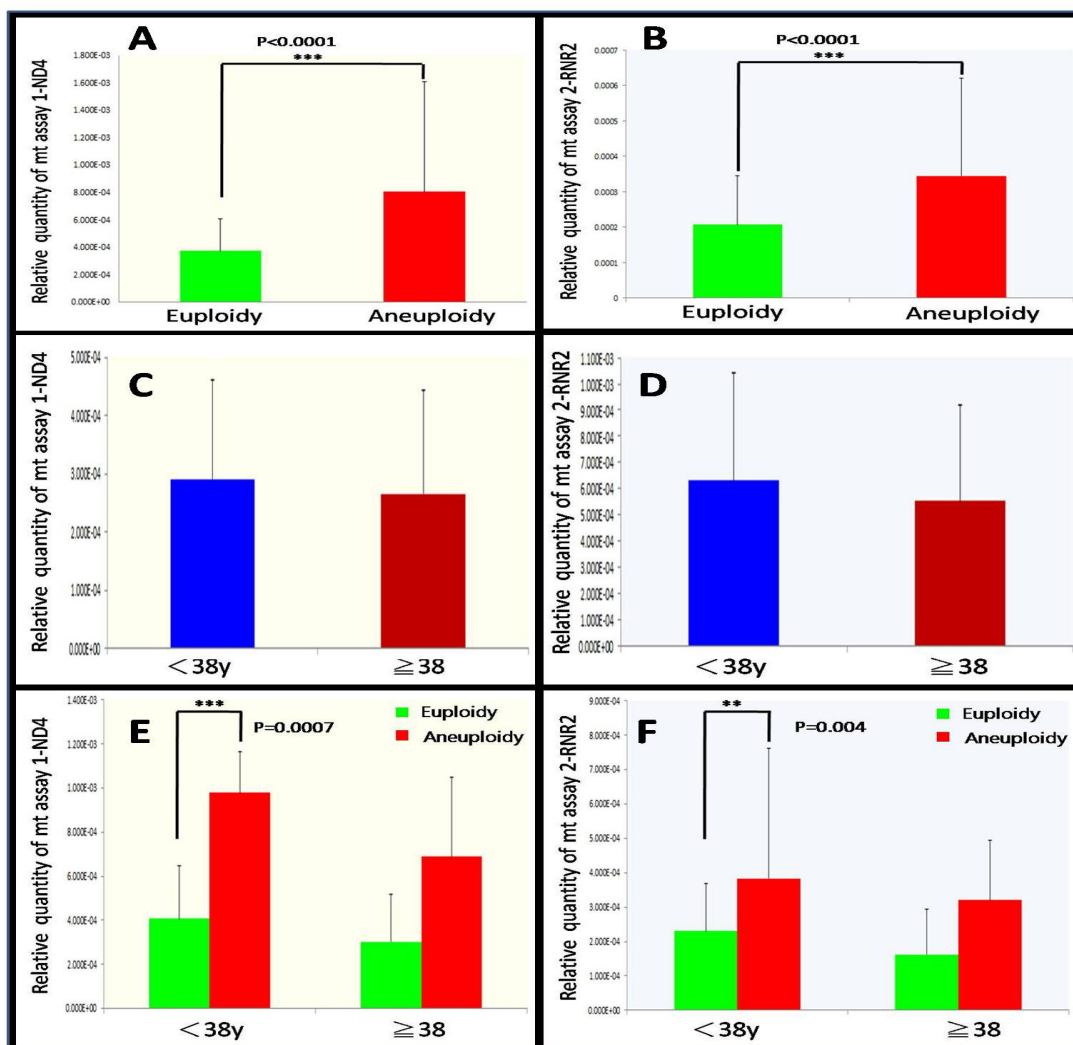


Figure. 1. Comparison of mtDNA quantities between different chromosomal contents and age groups by analyzing the ND4 gene or the RNR2 gene. (A, B) Significant differences of mitochondrial quantities were shown between euploid and aneuploid blastocysts. (C, D) No significant differences of mitochondrial quantities were shown in blastocysts derived from the women  $\geq 38$  or  $< 38$  years of age. (E, F) Distinct differences of mitochondrial quantities were observed between euploid and aneuploid blastocysts derived from women  $< 38$  years of age.

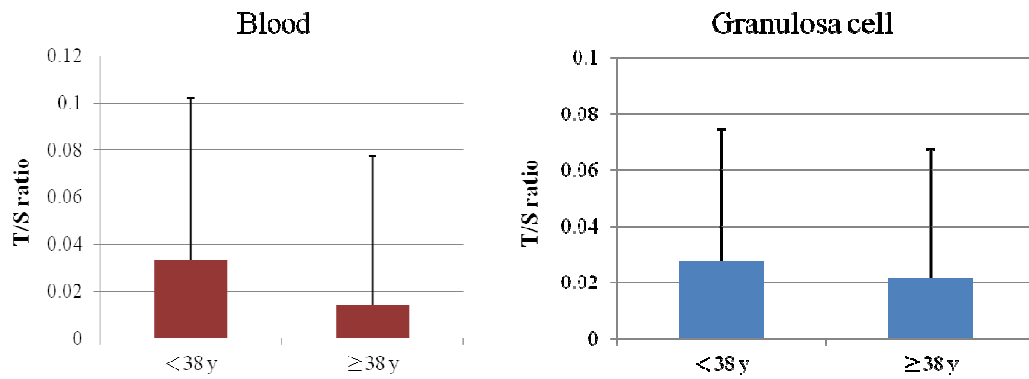


Figure 2: Comparison of telomere length between young and old age women in Blood and Granulosa cell samples

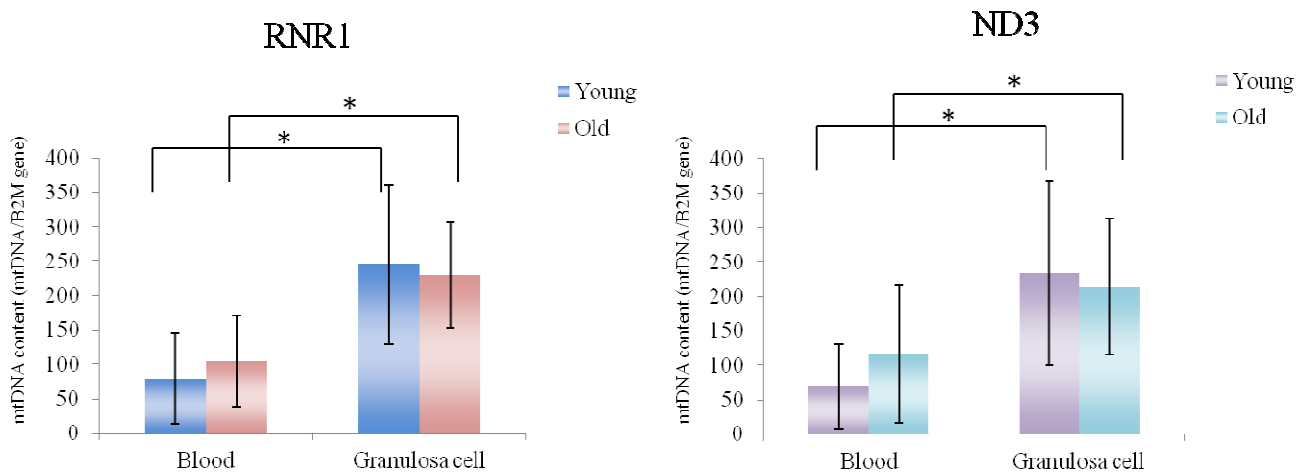


Figure 3. Comparison of mtDNA content between young and old age women in Blood and Granulosa cell samples.\*p<0.001



(A)

<b>Sample</b>	<b>Age</b>	<b>No</b>	<b>D-loop mutation number (mean)</b>	<b>Heteroplasmic mutation rate (%)</b>
<b>Granulosa cell</b>	<b>Young</b>	<b>11</b>	<b>11.73</b>	<b>37.56</b>
	<b>old</b>	<b>13</b>	<b>13.23</b>	<b>37.87</b>
<b>Blood</b>	<b>Young</b>	<b>11</b>	<b>11.9</b>	<b>37.45</b>
	<b>old</b>	<b>13</b>	<b>13.4</b>	<b>38.93</b>

(B)

<b>Age</b>	<b>No</b>	<b>Sample</b>	<b>D-loop mutation number (mean)</b>	<b>Heteroplasmic mutation rate (%)</b>
<b>Young</b>	<b>6</b>	<b>Granulosa cell</b>	<b>11.33</b>	<b>33.26</b>
		<b>Blood</b>	<b>11.33</b>	<b>33.26</b>
		<b>Embryos</b>	<b>12.36</b>	<b>30.93</b>
<b>Old</b>	<b>10</b>	<b>Granulosa cell</b>	<b>13.2</b>	<b>39.75</b>
		<b>Blood</b>	<b>13.1</b>	<b>40.688</b>
		<b>Embryos</b>	<b>12.57</b>	<b>38.118</b>

**Fig4:** Comparison of mtDNA D-loop region mutation numbers and heteroplasmic mutation rate between young and old age women in Blood and Granulosa cell (A) or Embryo samples.(B) Mitochondrial sequence analysis results by Illumina Genome Analyzer II.

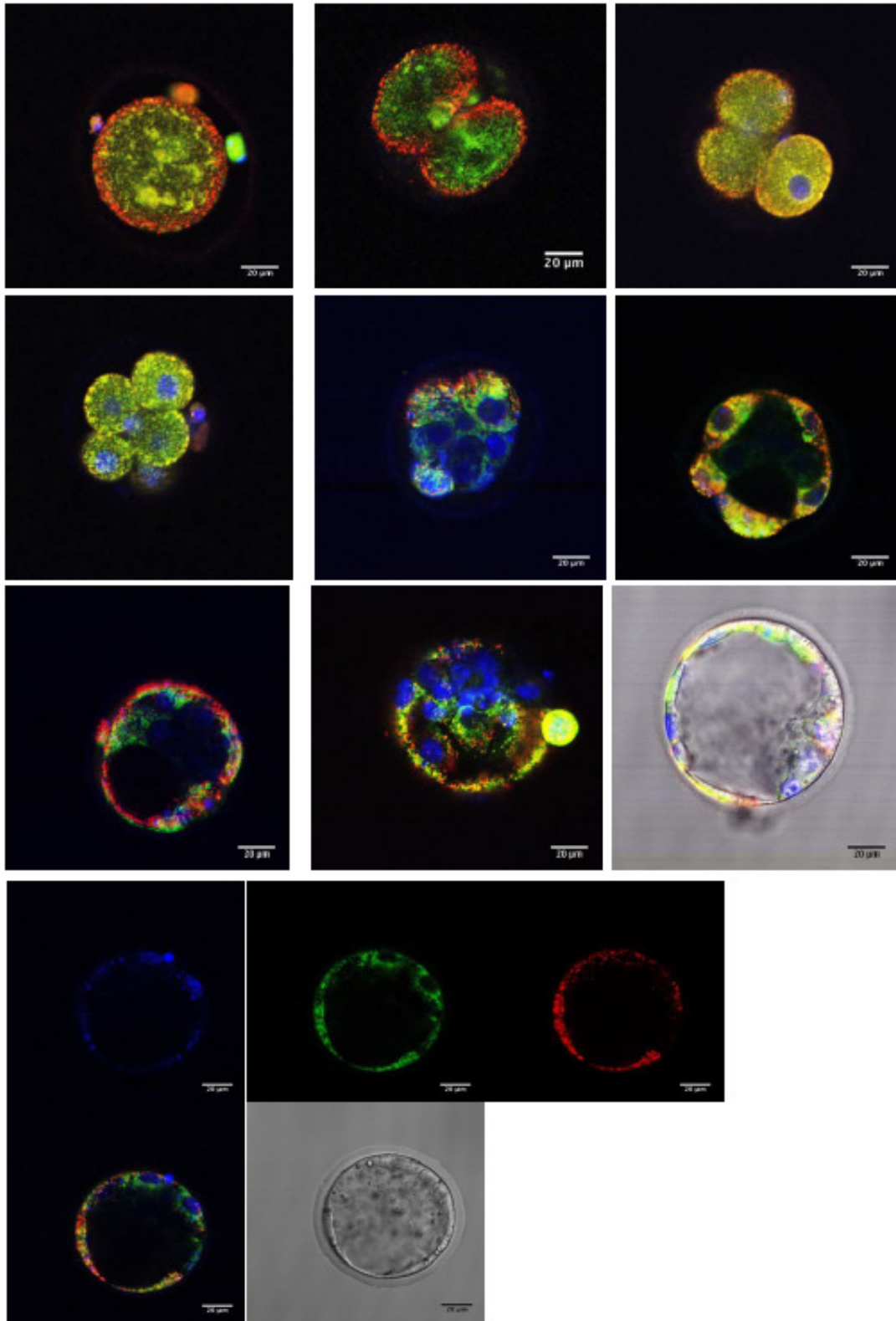
(A)

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Average
age	32	35	30	35	32	34	34	36	35	37	35	34.1
Single Nucleotide Variants	39	32	19	33	36	26	41	26	47	33	38	33.6
Insertions	2	2	3	2	2	1	2	2	2	2	2	2
Deletions	3	4	11	1	1	4	2	13	2	1	2	4
Oocyte number	17	13	30	16	5	1	29	4	19	17	14	15
Good Blastocyst	6	7	3	4	0	0	2	2	1	3	3	2.8
RNR1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.1
RNR2	1	0	0	1	2	0	0	0	0	1	1	0.5
ND1	1	2	0	1	0	1	2	0	2	1	0	0.9
ND2	1	0	2	2	2	0	1	2	1	3	1	1.4
ND3	2	1	0	2	2	1	3	0	2	2	2	1.5
ND4	2	1	0	2	1	1	1	0	2	2	2	1.3
ND5	1	4	1	1	3	4	2	0	3	1	2	2
ND6	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0.45
CO1	2	3	0	0	0	2	2	2	4	0	2	1.54
CO2	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0.27
CO3	1	1	0	2	1	0	1	1	2	2	1	1.09
CYB	4	0	1	3	4	0	6	1	6	3	6	3.09
ATP6	3	1	0	1	1	1	3	1	3	1	4	1.73
ATP8	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0.36

(B)

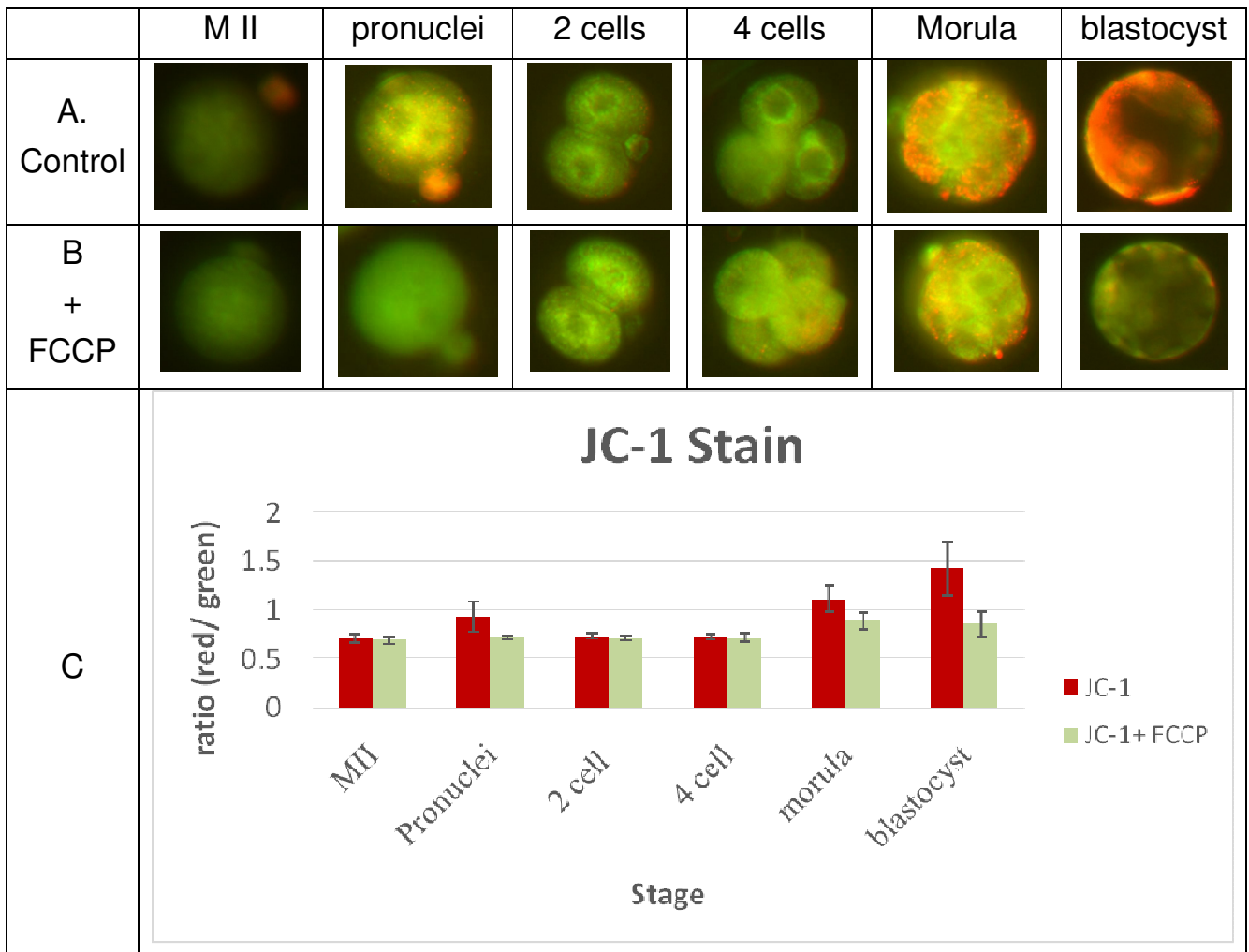
Sample	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Average
age	40	44	42	40	39	42	41	43	41	42	39	41	43	39	41.14
Single Nucleotide Variants	39	29	25	48	34	24	36	43	38	22	32	26	41	32	33.5
Insertions	3	2	0	4	1	1	1	2	2	4	2	5	1	6	2.43
Deletions	12	5	14	1	3	13	1	1	3	12	12	1	2	11	6.5
Oocyte number	19	15	19	10	7	12	4	8	15	7	5	14	25	18	12.71
Good Blastocyst	5	2	1	5	2	4	2	0	5	1	1	4	2	2	2.57
RNR1	2	0	1	1	0	0	0	2	0	0	2	0	2	2	0.86
RNR2	0	0	2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0.5
ND1	1	1	0	4	2	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0.86
ND2	1	2	2	2	0	2	4	2	3	2	0	2	3	1	1.86
ND3	1	1	0	2	1	0	2	2	2	0	1	0	3	0	1.07
ND4	1	2	0	2	2	0	2	4	3	0	1	0	3	0	1.43
ND5	1	4	0	3	5	1	1	3	3	2	0	3	2	1	2.07
ND6	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0.28
CO1	1	3	0	4	2	0	0	1	2	0	1	0	2	3	1.36
CO2	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0.43
CO3	1	1	0	3	0	1	1	2	2	0	1	0	1	0	0.93
CYB	5	1	1	4	1	1	5	3	3	0	2	0	3	1	2.14
ATP6	2	1	1	1	0	0	1	3	1	0	1	1	2	0	1
ATP8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.07

**Fig5: Mitochondrial sequence analysis results by Illumina Genome Analyzer II. (A) Comparison of mtDNA sequence between young age(A) and old age(B) women in Granulosa cell samples.**

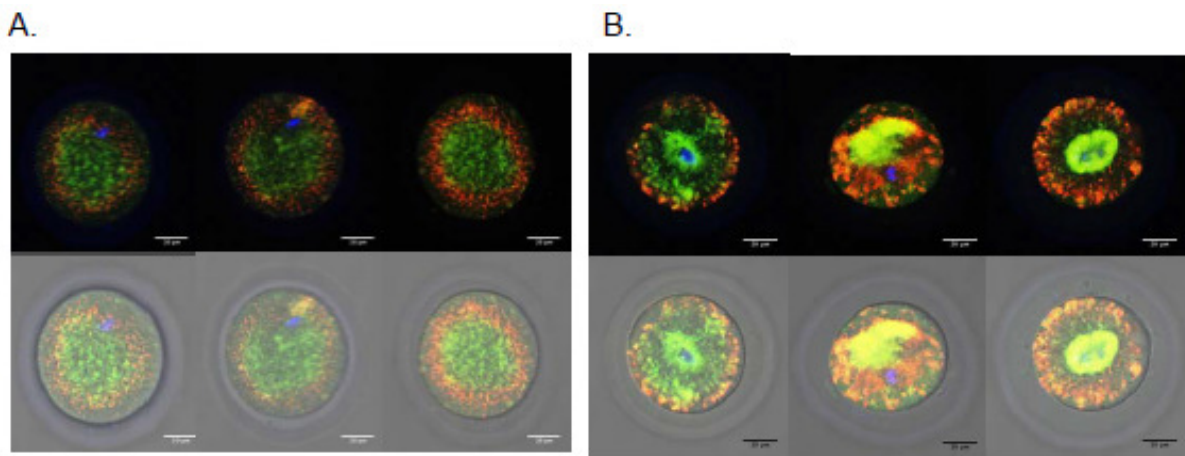


**Figure 6. Results of JC-1stain in different stage of pre-implantation mouse embryos.**

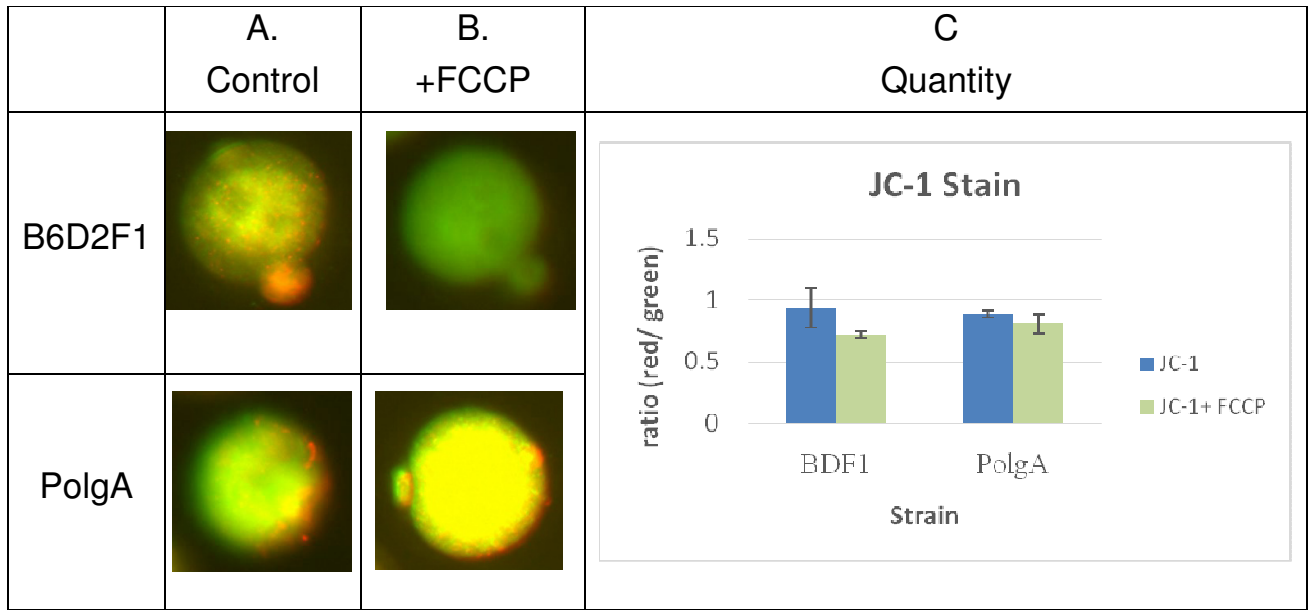
A. red fluorescence; B. green fluorescence; C merge red and green fluorescence .D, Quantity of JC-1 express by ratio of red to green fluorescence.



**Figure 7. Results of JC-1stain or FCCP supply in different stage of pre-implantation mouse embryos.**  
A. Control groups, B FCCP supply groups, C Quantity of JC-1 express by ratio of red to green fluorescence.

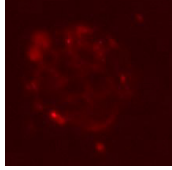
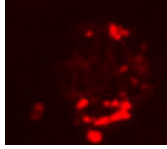
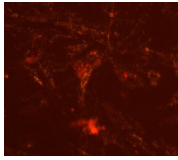
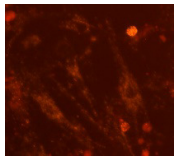
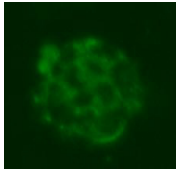
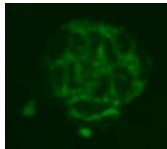
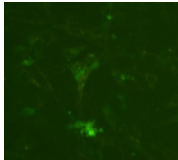
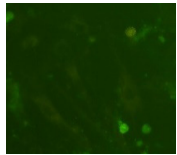
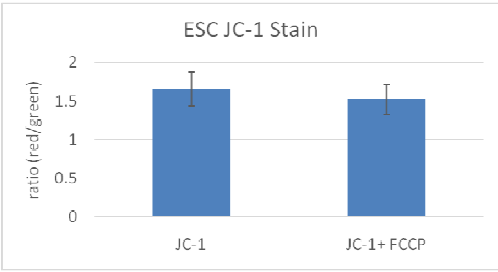
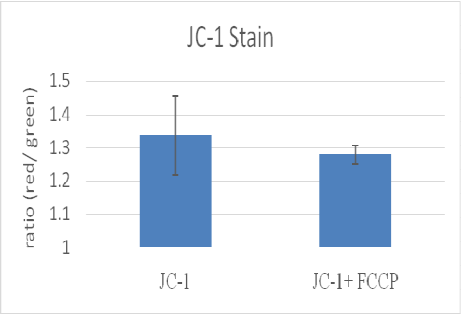


**Figure 8. Results of JC-1stain in MI stage of pre-implantation mouse embryos from 8-12 week old and old (more than 32 weeks old) mice.** A. Young group, B old group.

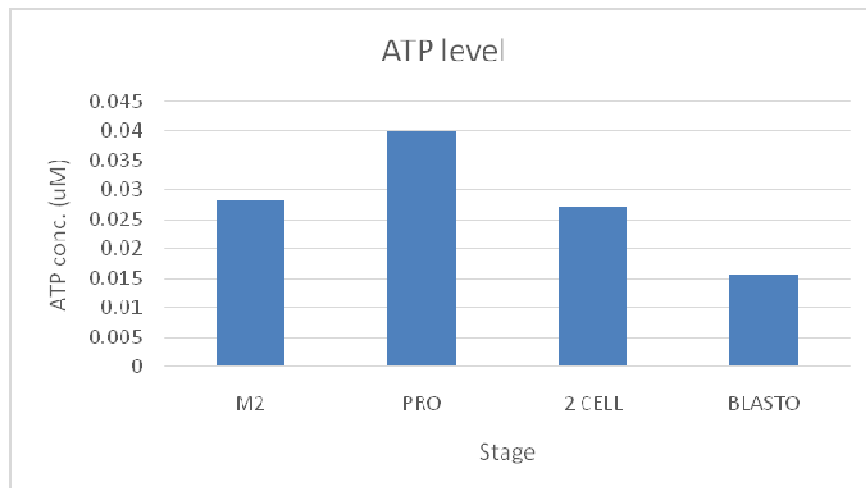


**Figure 9. Comparison JC-1stain between B6D2F1 and plogA strain of in MII oocytes.**

A. Control groups, B FCCP supply groups, C Quantity of JC-1 express by ratio of red to green fluorescence.

cells	embryonic stem cell		adipose-derived stem cell,	
Group	control	+FCCP	Control	+FCCP
A. red				
B. green				
C. quantity				

**Figure 10. Comparison JC-1stain between mouse embryonic stem cells and and adipose-derived stem cell with or without FCCP. A. red fluorescence, B green fluorescence, C Quantity of JC-1 express by ratio of red to green fluorescence**



**Figure 11. Quantity of ATP in oocyte and different embryo stage.**

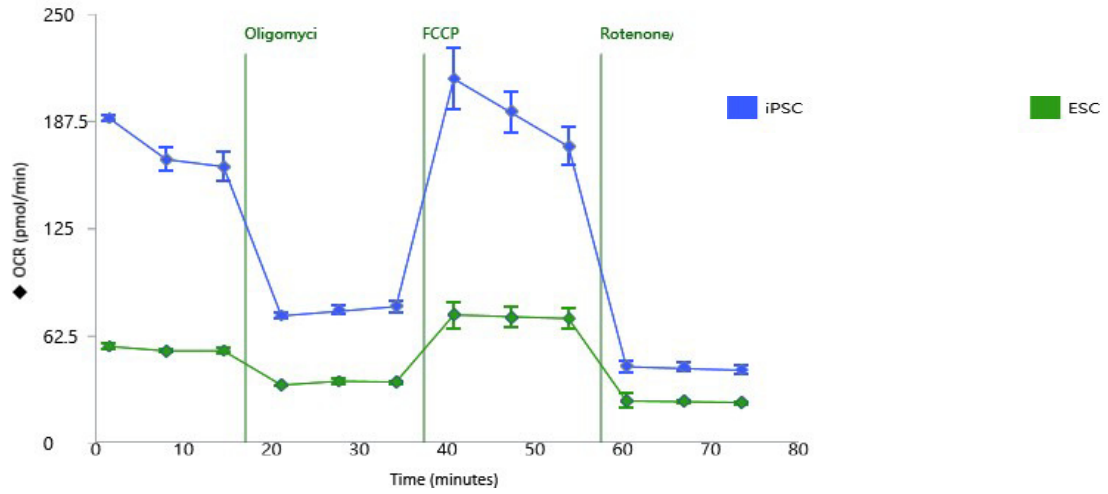


Figure 12、ESC 及 iPSC 粒線體耗氧量比較。

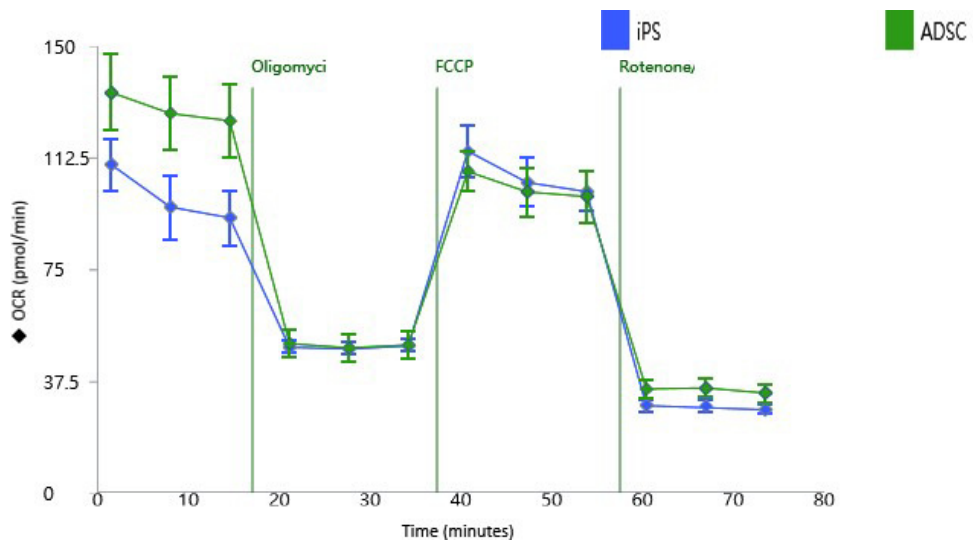


Figure 13、iPSC 及 ADSC 粒線體耗氧量比較。

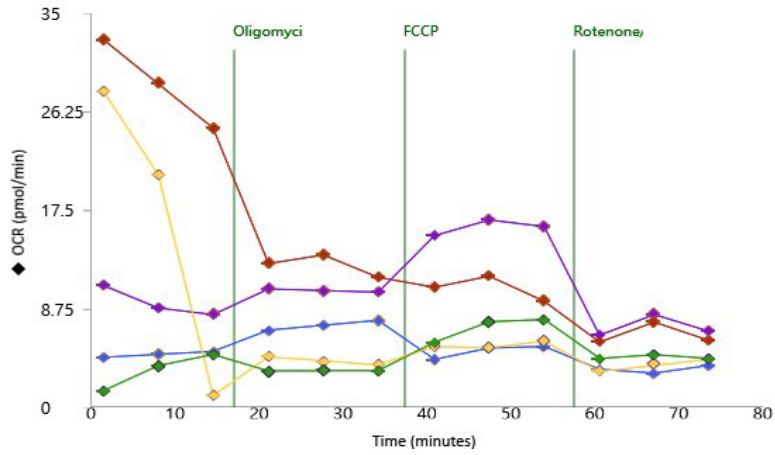
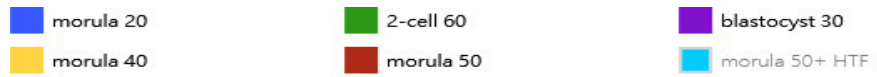


Figure 14、不同時期及數量胚胎耗氧量之比較。

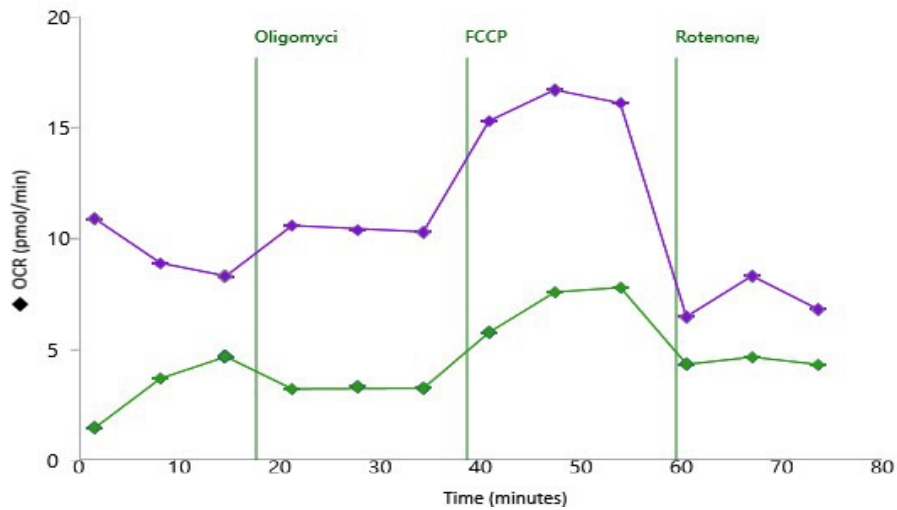
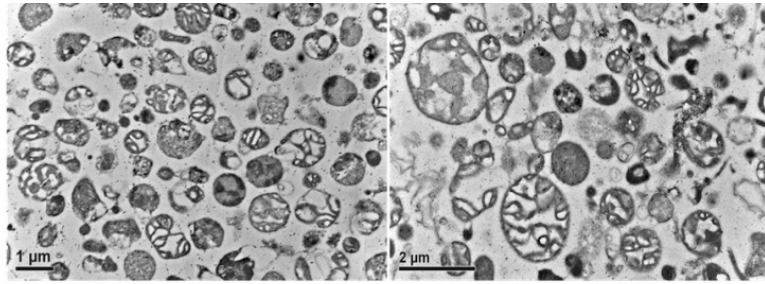


Figure 15、不同時期胚胎耗氧量之比較。

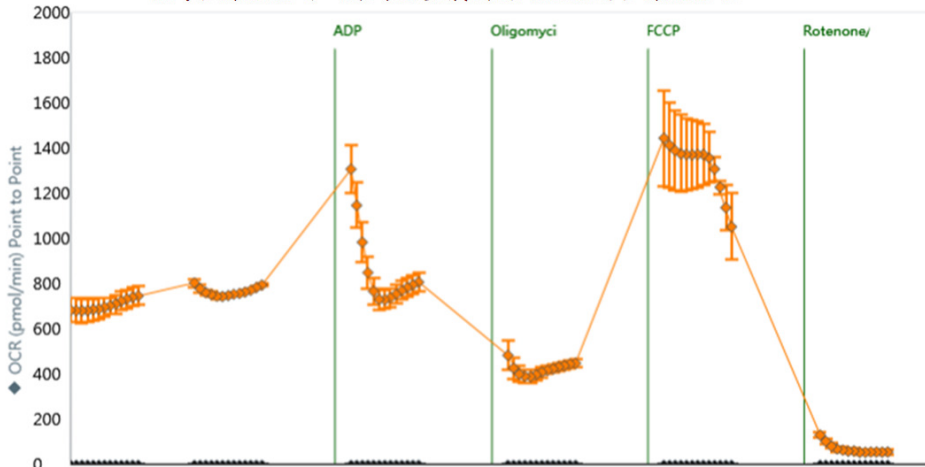




九成以上是粒線體，八成粒線體結構完整

Figure 16. 經穿透式電子顯微鏡觀察，確定已可純化出九成的粒線體，其中八成以上完整之粒線體。

台灣粒線體公司以海馬能量儀測定純化出的粒線體活性



35

Mitochondria isolation- Flow分析

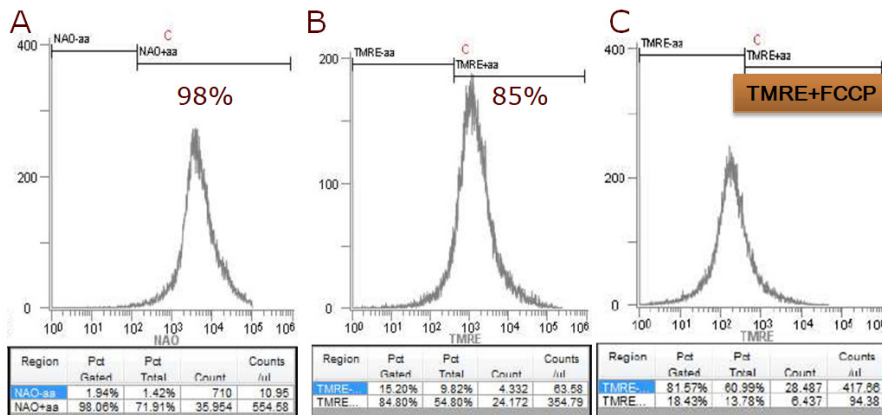


Figure 17. 以海馬能量儀分析活性並將分離出的粒線體以FLOW分析，接著以NAO進行染色分析，內容物98%是粒線體，再藉由TMRE染色，確認其中85%是高活性(高膜電位)的粒線體。

## 六、參考文獻

- 施惠馨 白依萍 陳怡君 鄭恩惠 林羿萍 陳建宏 黃俊嘉 李宗賢 李茂盛 (2017, Aug). Mitochondrial gene MT-RNR2 quantitation predict pregnancy rate in PGS-SET cycle. 台灣生殖醫學會 2017 年會.
- Campbell K. and Swann K. (2006). Ca<sup>2+</sup> oscillations stimulate an ATP increase during fertilization of mouse eggs. *Dev Biol.* 298(1):225-33.
- Chason R. J., Csokmay J., Segars J. H., DeCherney A. H. Armant D. R. (2011). Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends Endocrinol Metab.* 22(10):412-420.
- Chappel, S. (2013). The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstetrics and gynecology international 2013*, 183024.
- Cheng EH, Chen CH Shih HH; Pai YP, Chen YC, Lin YP, Huang CC, Lee TH, Lee MS, (2017) Quantitation of Mitochondrial DNA associates with blastocyst quality and pregnancy rates in PGS-SET cycles. Reproductive Genetic Diagnostics, Hyatt Regency Cambridge, MA, USA.
- Cortopassi, G.A., and Arnheim, N. (1990). Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 18, 6927-6933.
- Cortopassi, G.A., Shibata, D., Soong, N.W., and Arnheim, N. (1992). A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7370-7374.
- Craven, L., Tuppen, H.A., Greggains, G.D., Harbottle, S.J., Murphy, J.L., Cree, L.M., Murdoch, A.P., Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Lightowlers, R.N., *et al.* (2010). Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* 465, 82-85.
- De Marco, C.S., and Caniggia, I. (2002). Mechanisms of oxygen sensing in human trophoblast cells. *Placenta* 23 Suppl A, S58-68.
- Dezawa, M. (2016). Muse Cells Provide the Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells: Direct Contribution of Muse Cells to Tissue Regeneration. *Cell Transplant* 25, 849-861.
- Duran, H.E., Simsek-Duran, F., Oehninger, S.C., Jones, H.W., Jr., and Castora, F.J. (2011). The association of reproductive senescence with mitochondrial quantity, function, and DNA integrity in human oocytes at different stages of maturation. *Fertility and sterility* 96, 384-388.
- Dumollard R., Campbell K., Halet G., Carroll J., Swann K. (2008). Regulation of cytosolic and mitochondrial ATP levels in mouse eggs and zygotes. *Dev Biol.* 316(2):431-40.
- Eichenlaub-Ritter, U., Wiczorek, M., Luke, S., and Seidel, T. (2011). Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion* 11, 783-796.
- El Shourbagy, S.H., Spikings, E.C., Freitas, M., and St John, J.C. (2006). Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction (Cambridge, England)* 131, 233-245.
- Fakih, M., Shmoury, M., Szeptycki, J., Cruz, D., Lux, C., Verjee, S., Burgess, C., Cohn, G., and R., C. (2015). The AUGMENTS Treatment: Physician Reported Outcomes of the Initial Global Patient Experience. *JFIV Reprod Med Genet* 3, 1000154.
- Fowden, A.L., Giussani, D.A., and Forhead, A.J. (2006). Intrauterine programming of physiological

- systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* 21, 29-37.
- Grieve, K.M., McLaughlin, M., Dunlop, C.E., Telfer, E.E., and Anderson, R.A. (2015). The controversial existence and functional potential of oogonial stem cells. *Maturitas* 82, 278-281.
- Hanna, C.B., and Hennebold, J.D. (2014). Ovarian germline stem cells: an unlimited source of oocytes? *Fertil Steril* 101, 20-30.
- Herbert, M., Kalleas, D., Cooney, D., Lamb, M., and Lister, L. (2015). Meiosis and maternal aging: insights from aneuploid oocytes and trisomy births. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7, a017970.
- Hudson, G., and Chinnery, P.F. (2006). Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Human molecular genetics* 15 Spec No 2, R244-252.
- Hyslop, L.A., Blakeley, P., Craven, L., Richardson, J., Fogarty, N.M., Fragouli, E., Lamb, M., Wamaitha, S.E., Prathalingam, N., Zhang, Q., *et al.* (2016). Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature* 534, 383-386.
- Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B., Halsey, W.A., Jr., Schraufstatter, I.U., Sauerheber, R.D., Spragg, R.G., Jackson, J.H., and Cochrane, C.G. (1988). Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry* 263, 1665-1675.
- Igarashi H., Takahashi T., Abe H., Nakano H., Nakajima O., Nagase S. (2016) Poor embryo development in post-ovulatory in vivo-aged mouse oocytes is associated with mitochondrial dysfunction, but mitochondrial transfer from somatic cells is not sufficient for rejuvenation. *Hum Reprod* 31(10):2331-8.
- Jacobs, L., Gerards, M., Chinnery, P., Dumoulin, J., de Coo, I., Geraedts, J., and Smeets, H. (2007). mtDNA point mutations are present at various levels of heteroplasmy in human oocytes. *Molecular human reproduction* 13, 149-154.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., and Tilly, J.L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428, 145-150.
- Koyama, K., Kang, S.S., Huang, W., Yanagawa, Y., Takahashi, Y., and Nagano, M. (2014). Aging-related changes in in vitro-matured bovine oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. *The Journal of reproduction and development* 60, 136-142.
- Larsson, N.G. (2010). Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem* 79, 683-706.
- Lee, H.C., and Wei, Y.H. (2007). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 592-606.
- Lessard, J., Pelletier, M., Biertho, L., Biron, S., Marceau, S., Hould, F.S., Lebel, S., Moustarah, F., Lescelleur, O., Marceau, P., *et al.* (2015). Characterization of dedifferentiating human mature adipocytes from the visceral and subcutaneous fat compartments: fibroblast-activation protein alpha and dipeptidyl peptidase 4 as major components of matrix remodeling. *PloS one* 10, e0122065.
- Martinez, F., Uribe, A., Espinosa-Garcia, M.T., Flores-Herrera, O., Garcia-Perez, C., and Milan, R. (2002). Calcium modulates the ATP and ADP hydrolysis in human placental mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 992-1003.
- Matthews, T.J., and Hamilton, B.E. (2009). Delayed childbearing: more women are having their first child later in life. *NCHS Data Brief*, 1-8.
- May-Panloup, P., Chretien, M.F., Jacques, C., Vasseur, C., Malthiery, Y., and Reynier, P. (2005). Low

- oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Human reproduction* 20, 593-597.
- Miao, Y.L., Kikuchi, K., Sun, Q.Y., and Schatten, H. (2009). Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human reproduction update* 15, 573-585.
- Michaels, G.S., Hauswirth, W.W., and Laipis, P.J. (1982). Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Developmental biology* 94, 246-251.
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G.(1999) Aging-Dependent Large Accumulation of Point Mutations in the Human mtDNA Control Region for Replication Science 286; 774-779
- Motta P. M., Nottola S. A., Makabe S., Heyn R. (2000) Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod* 15 Suppl 2:129-47.
- Oktay, K., Baltaci, V., Sonmezer, M., Turan, V., Unsal, E., Baltaci, A., Aktuna, S., and Moy, F. (2015). Oogonial Precursor Cell-Derived Autologous Mitochondria Injection to Improve Outcomes in Women With Multiple IVF Failures Due to Low Oocyte Quality: A Clinical Translation. *Reprod Sci* 22, 1612-1617.
- Phillips NR, Sprouse ML, Roby RK 2014 Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio:A multiplex real-time PCR assay. *Sci Rep* 27(4) 3887
- Paull, D., Emmanuele, V., Weiss, K.A., Treff, N., Stewart, L., Hua, H., Zimmer, M., Kahler, D.J., Goland, R.S., Noggle, S.A., *et al.* (2013). Nuclear genome transfer in human oocytes eliminates mitochondrial DNA variants. *Nature* 493, 632-637.
- Reynier, P., May-Panloup, P., Chretien, M.F., Morgan, C.J., Jean, M., Savagner, F., Barriere, P., and Malthiery, Y. (2001). Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Molecular human reproduction* 7, 425-429.
- Rebolledo-Jaramillo, B., Su, M.S., Stoler, N., McElhoe, J.A., Dickins, B., Blankenberg, D., Korneliussen, T.S., Chiaromonte, F., Nielsen, R., Holland, M.M., *et al.* (2014). Maternal age effect and severe germ-line bottleneck in the inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 15474-15479.
- Simsek-Duran, F., Li, F., Ford, W., Swanson, R.J., Jones, H.W., Jr., and Castora, F.J. (2013). Age-associated metabolic and morphologic changes in mitochondria of individual mouse and hamster oocytes. *PloS one* 8, e64955.
- Sukumar M., Liu J., Mehta G U.,Patel S. J.,Roychoudhuri R.,Crompton J. G, Klebanoff C. A., Ji Y., Li P., Yu Z., Whitehill G. D., Clever D., Eil R. L., Palmer D. C., Mitra S., Rao M., Keyvanfar K., Schrupp D. S., Wang E., Marincola F. M., Gattinoni L., Leonard W. J., Muranski P., Finkel T., Restifo N. P.(2016). Mitochondrial Membrane Potential Identifies Cells with Enhanced Stemness for Cellular Therapy.*Cell Metab.* 12;23(1):63-76.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Woodward, J., Sanchis, D.M., Ma, H., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Kang, E., Lee, H.S., *et al.* (2013). Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* 493, 627-631.
- Taylor, R.W., Barron, M.J., Borthwick, G.M., Gospel, A., Chinnery, P.F., Samuels, D.C., Taylor, G.A., Plusa, S.M., Needham, S.J., Greaves, L.C., *et al.* (2003). Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J Clin Invest* 112, 1351-1360.
- Tilly, J.L., and Sinclair, D.A. (2013). Germline energetics, aging, and female infertility. *Cell Metab* 17, 838-850.
- Tuckey, R.C. (2005). Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26, 273-281.

- Wang, Q., Ratchford, A.M., Chi, M.M., Schoeller, E., Frolova, A., Schedl, T., and Moley, K.H. (2009). Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. *Mol Endocrinol* 23, 1603-1612.
- Wang, Z.B., Schatten, H., and Sun, Q.Y. (2011). Why is chromosome segregation error in oocytes increased with maternal aging? *Physiology (Bethesda)* 26, 314-325.
- Watson, J.E., Patel, N.A., Carter, G., Moor, A., Patel, R., Ghansah, T., Mathur, A., Murr, M.M., Bickford, P., Gould, L.J., *et al.* (2014). Comparison of Markers and Functional Attributes of Human Adipose-Derived Stem Cells and Dedifferentiated Adipocyte Cells from Subcutaneous Fat of an Obese Diabetic Donor. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3, 219-228.
- White, Y.A., Woods, D.C., Takai, Y., Ishihara, O., Seki, H., and Tilly, J.L. (2012). Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 18, 413-421.
- Wolf, D.P., Mitalipov, N., and Mitalipov, S. (2015). Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends Mol Med* 21, 68-76.
- Woods, D.C., and Tilly, J.L. (2015). Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer (AUGMENT) in Human Assisted Reproduction. *Seminars in reproductive medicine* 33, 410-421.
- Yuichi Michikawa, Franca Mazzucchelli, Nereo Bresolin, Guglielmo Scarlato, Giuseppe Attardi  
Aging-Dependent Large Accumulation of Point Mutations in the Human mtDNA Control Region for Replication (1999) *Science* 286.; 774-779
- Zhang, C.H., Qian, W.P., Qi, S.T., Ge, Z.J., Min, L.J., Zhu, X.L., Huang, X., Liu, J.P., Ouyang, Y.C., Hou, Y., *et al.* (2013). Maternal diabetes causes abnormal dynamic changes of endoplasmic reticulum during mouse oocyte maturation and early embryo development. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 11, 31.
- Zhang, H., Zheng, W., Shen, Y., Adhikari, D., Ueno, H., and Liu, K. (2012). Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12580-12585.
- Zhang, J., Liu, H., Luo, S., Chavez-Badiola, A., Liu, Z., Yang, M., Munne, S., Konstantinidis, M., Wells, D., and Huang, T. (2016a). First live birth using human oocytes reconstituted by spindle nuclear transfer for mitochondrial DNA mutation causing Leigh syndrome. *Fertil Steril* 106, e375–e376.
- Zhang, J., Zhuang, G., Zeng, Y., Grifo, J., Acosta, C., Shu, Y., and Liu, H. (2016b). Pregnancy derived from human zygote pronuclear transfer in a patient who had arrested embryos after IVF. *Reprod Biomed Online* 33, 529-533.

## 七、計畫成果自評

本計畫原設計三年期三個子計畫，而計畫時程縮減為一年依比例分配目前皆已完成既定之進度，以建立分析血液及胚胎細胞粒線體之定量及定序之方法，可以提供粒線體序列異常之診斷，以評估下一代可母系粒線體異常之遺傳疾病，目前已就胚胎粒線體含量及與試管嬰兒結果進行比較，發表 2 篇研討會論文。而動物實驗部分亦已完成粒線體功能性的測試，也由台灣粒線體公司之提供了穩定及高品質高功能的粒線體萃取及保存的方法，本計畫以提供粒線體序列異常患者一個新的診斷方式，並透過與台灣粒線體公司之合作未來可提供此粒線體異常及高齡不孕症能的治療新策略。

## 八、106 年度 Milestone & 計畫整體 End-point 達成情形

106 年度 Milestone	End-point	目前達成情形
子計畫一 1. 進行招募受試者 2. 完成建立人類粒線體定量方法 3. 完成建立人類端粒長度測定方法 4. 完成建立人類粒線體定序分析方法	完成分析比較年輕及年老婦女血液及胚胎篩 DNA 檢體粒線體含量、序列分析及端粒長度測定	1. 由於原設定三年計畫徵求 160 位受試者，目前計畫時間縮減為三分之一，截至二月底，已招募 50 名，目前已完成分析。 2. 已以 qPCR 建立人類檢體粒線體定量方法 3. 端粒長度測試方法已建立完成 4. 已完成建立人類粒線體定序方法及分析
子計畫二 1. 粒線體萃取方法確定 2. 粒線體功能測試，包括膜電位、耗氧量之測試 3. 不同細胞粒線體功能型態測試	完成粒線體移植之小鼠動物模式	1. 粒線體測試方法已確定 2. 小鼠卵子與著床前胚胎的各期粒線體功能測試，包括膜電位、耗氧量之測試已完成 3. 不同來源之細胞已可以穩定培養，並進行粒線體功能及型態測試。 4. 粒線體移植之小鼠動物模式，於一般老化小鼠可以完成。由於高齡小鼠飼育需較長時間，由於原設定三年計畫，而目前縮減為一年，故動物飼養時間不夠，因而對於兩種特殊小鼠，SAMP8 及 polgA 小鼠，無法在本年度完成。然而本子計畫已在有限之時間完成階段性目標
子計畫三 1. 配合子計畫一及二完成 MSC 符合 GTP 製程 2. 粒線體異常胚胎之粒線體移植	配合子計畫一及二完成 MSC 符合 GTP 製程，人類粒線體異常胚胎之粒線體移植	1. 台灣粒線體公司目前的粒線體製程與初步成果目前製程規劃與初步實驗結果目前 MSC 符合 GTP 製程已完成，多批次驗證、冷凍解凍、細胞存活率、病原菌汙染檢測、細胞運送等均已測試完成 2. 初步粒線體移植之小鼠動物模式，於一般老化

		<p>小鼠可以完成。但由於子計畫一及子計畫二尚有部分未完成，尤其是由於高齡小鼠飼育需較長時間，故部份粒線體移植之小鼠動物模式，無法在本年度完成。待 107 年計畫核可的計畫可繼續完成。本子計畫已在有限之時間完成階段性目標</p>
--	--	--

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果在學術期刊發表或申請專利情形、研究成果之學術/應用價值或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形(請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊)

論文：已發表未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得申請中 無

技轉：已技轉洽談中

無

其他：(以 200 字為限)

目前已就胚胎粒線體含量及與試管嬰兒結果進行比較，發表 2 篇研討會論文

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以 500 字為限）。

本計畫的目的為，藉由病人之粒線體DNA的遺傳分析探討粒線體基因變異與老化不孕症的關係，並利用此結果篩選適合粒線體移植的病人(子計畫一)。而動物試驗的成果可以得知何種細胞由來之粒線體，最適成為粒線體移植來源與需要移植的粒線體數目(子計畫二)。此外，台灣粒線體公司(合作廠商)可提供符合GTP規範之細胞與純化之粒線體，以期可改善卵子粒線體功能與增加胚胎發育、著床以及提高懷孕率與出生率(子計畫三)。



## 可供推廣之研發成果資料表

 可申請專利 可技術移轉

日期：\_\_年\_\_月\_\_日

<b>補助計畫</b>	計畫名稱： 計畫主持人： 計畫編號：學門領域：
<b>技術/創作名稱</b>	
<b>發明人/創作人</b>	
<b>技術說明</b>	中文：  (100~500 字)
	英文：
<b>可利用之產業 及 可開發之產品</b>	
<b>技術特點</b>	
<b>推廣及運用的價值</b>	

※ 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

## 計畫主要績效指標表

	績效指標	初級產出量化值	效益說明	重大突破
學術成就(科技基礎研究)	A 論文	國內/國外期刊論文：0 國內/國外研討會論文：2 (國內：1. 國外 1) 專書：0 專書論文：0 技術報告：0 其他： (註：各項數據，請依國內/國外分列)	論文發表在國際上重要研討會：1 篇 (Reproductive Genetic Diagnostics; 2017, MA, USA) 論文發表在國內上重要研討會 1 篇 (台灣生殖醫學會 2017 年會)	定量胚胎之粒線體含量，做為評估胚胎品質及是否著床的標記
	B 研究團隊養成	系內、校內跨領域、跨校或跨組織合作團隊數目	形成研究中心或實驗室數目：1	成立中部唯一精準醫學粒線體序列及功能分析與臨床前期試驗安全評估團隊
	C 博碩士培育	大專生：0 (國內?人/國外?人) 碩士生：0 博士生：0 專任助理：2 博士後研究員：0 (註：各項數據，請依國內/國外分列)	研究生畢業後從事之相關行業人數	1.提供兩名助理工作機會，培育生殖精準醫學的重要人才 2.共提供約 113 萬元薪資

	績效指標	初級產出量化值	效益說明	重大突破
	D 研究報告	(數量) 篇：國內/國外研討會論文：2 國內口頭報告：1. 國外海報報告：1)	<p>1.施惠馨 白依萍 陳怡君 鄭恩惠 林羿萍 陳建宏 黃俊嘉 李宗賢 李茂盛 (2017, Aug). Mitochondrial gene MT-RNR2 quantitation predict pregnancy rate in PGS-SET cycle. 台灣生殖醫學會 2017 年會</p> <p>2. Cheng EH, Chen CH Shih HH; Pai YP, Chen YC, Lin YP, Huang CC, Lee TH, Lee MS, (2017)Quantitation of Mitochondrial DNA associates with blastocyst quality and pregnancy rates in PGS-SET cycles. Reproductive Genetic Diagnostics, Hyatt Regency Cambridge, MA, USA.</p>	定量胚胎之粒線體含量，做為評估胚胎品質及是否著床的標記

	績效指標	初級產出量化值	效益說明	重大突破
	E 辦理或參加學術活動	<p>辦理或參加國內、雙邊或國際之研討會 workshop、學術會議 symposium、學術研討會 conference、論壇 forum 次數。出版論文集數目 (註：各項數據，請依國內/國外分列)</p> <p>國際之研討會 workshop: 1 國際學術研討會 conference: 3 國內學術研討會 conference: 1</p>	<p>1. 國際之研討會 workshop: <b>9th Annual ART World Congress</b> which will be held in New York, NY, October 25-26, 2017.</p> <p>2. 國際學術研討會 conference (1) American Society for Reproductiv Medicine (ASRM) October 28-November 1st, 2017. (2) Reproductive Genetic Diagnostics November 30th-1st Dec., 2017 (3) Advances in Prenatal Molecular Diagnostics November 28th-29th, 2017</p> <p>3. 國內學術研討會 conference (1)台灣生殖醫學會 2017 年會</p>	<p>1.與世界接軌，學習最新粒線體移植技術 2.進行國際交流與國際相關研究學者學習及討論粒線體研究最新趨勢。 3.讓國際學界及生技產業知道台灣研究的狀況，以謀求進一步國際合作的可能。</p>
	F 形成教材	製作教材或自由軟體授權釋出教材 (件數)	0	0
	其他	0	0	0
技術創新(科技整合創新)	G 專利	申請、獲得國內或國外之專利 (件數) (註：各項數據，請依國內/國外分列)	應用、引用、移轉 (授權金、權利金)	產值(形成產業)
	H 技術報告	數量	授權使用 (授權金)	授權金
	I 技術活動	發表於國內或國外研討會 (場次) (註：各項數據，請依國內/國外分列)	發表於主要之國際研討會 (場次)	
	J 技術移轉	可移轉技術 (件數)、先期技轉 (項數、家數、金額)、釋出軟體執行檔、自由軟體授權 (項數、家數)、引進技術 (件數)	技術移轉 (移轉金、授權金、權利金)、應用、引用、技術獲得國際認證數	產值(形成產業)
	S 技術服務	技術服務 (項數、家數、金額)、委託案及工業服務次數	金額	
	其他			

	績效指標	初級產出量化值	效益說明	重大突破
經濟效益 (產業經濟發展)	L 促成廠商或產業團體投資	促進鴻雁細胞科技公司與台灣粒線體公司投入研發與投資	可能進行技術授權	
	M 創新產業或模式建立	可能成立一新創公司，針對早期人類卵子的粒線體品質，開發一新穎的粒線體功能性染劑	本計畫可能產生一新衍生公司，針對粒線體的卵子功能性檢測，開發一新穎染劑	
	T 促成與學界或產業團體合作研究	鴻雁細胞科技公司與台灣粒線體公司考慮投入經費進行進一步的研發與投資	技轉與投入金額評估中	
	其他			
(社會影響 民生社會發展)	P 創業育成	家數: 1 (台灣粒線體公司與鴻雁生物科技有限公司)	目前有兩家廠商進行研發投資	
	其他			

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：107 年 5 月 21 日

計畫編號	MOST 106-3114-B-040-001-		
計畫名稱	發展精準醫學進行老化及粒線體異常之不孕症治療 Development of Precision Medicine for Aging and Mitochondrial Abnormality related Infertility		
出國人員姓名	鄭恩惠	服務機構及職稱	茂盛醫院基因遺傳診斷實驗室 /主任
會議時間	106 年 11 月 28 日至 106 年 12 月 1 日	會議地點	美國 Cambridge
會議名稱	(中文) 產前分子診斷進展及生殖遺傳診斷會議 (2017 年) (英文) Advances in Prenatal Molecular Diagnostics and Reproductive Genetic Diagnostics conference (2017)		
發表題目	(中文) 粒線體 DNA 含量與囊胚品質及懷孕率與著床前期胚胎篩檢合併執行單一胚胎植入之關聯性 (英文) Quantitation of Mitochondrial DNA Associates with Blastocyst Quality and Pregnancy Rates in PGS-SET Cycle		

一、參加會議經過

此次參加由 Cambridge Healthtech Institute 於美國 Cambridge Hyatt Regency 一樓會議廳舉辦的會議，會議時間為 2017 年 11 月 28~29 日先舉辦第 5 屆 Advances in Prenatal Molecular Diagnostics，接著於 2017 年 11 月 30~12 月 1 日舉辦第 3 屆 Reproductive Genetic Diagnostics conference，總會議時間一共 4 天，本研究團隊亦參與海報的報告，在每個主題的休息空檔皆是海報時間，提供與會人員充分的討論時間，四天會議的內容涵蓋以下主題，邀集世界各國學者討論

以下主題

第 1~4 項針對產前診斷精準醫學檢測進行報導

### **1. Fetal whole exome sequencing**

傳統上胎兒的產前檢查僅能透過超音波及相關的胎兒影像，胎兒的全基因組 (whole genome) 和外顯子組 (exome) 測序技術，已經在國內外部分醫學中心執行並提供臨床治療的參考，但還沒有成為常規醫療的檢測項目。這一部分的主題針對開發這項技術，根據外顯子組測序可用於確定潛在的分子病因，對妊娠異常的胎兒檢體進行核型分析及基因檢測，並配合部分家族的遺傳疾病病史高風險家庭進行的檢測，然而目前有效的實施的胎兒診斷外顯子組測序進入產前檢查是非常複雜的，對於基因多型性的影響及檢測須遵守的道德因素也需有相對的了解。此外仍需配合遺傳諮詢以解釋檢測出的複雜結果。針對母親細胞污染可能對產前胎兒檢體定序測試可能造成誤診的影響，也是發展這項技術需要克服的部分。

### **2. Cell free DNA screening**

透過絨毛膜絨毛取樣或羊膜穿刺術兩項侵入性檢查之一，可能導致孕婦的不安及一定侵入性取樣的風險，而游離 DNA 篩檢是一種非侵入性，且可提供染色體核型及多基因測序的檢查，有學者提供檢測影響骨骼病變及心臟和神經系統的單基因檢測方法。亦有報導此一技術針對高齡產婦檢體進行檢測，此技術亦被建議應用於超音波檢測胎兒異常的時確認基因變異的影響，評估懷孕過程的中風增加風險，在高齡父親可能對懷孕中胎兒的影響也被應用於此研究中，台灣彰基的陳明博士亦在會中提出自行設計的設計的 cfDNA 測試（算法稱為“GWNS”）以供與會學者參考。

### **3. Isolation and Analysis of fetal cells from maternal blood**

針對母親血液中極少量的胎兒細胞進行測試一直是產前基因檢測。這種方法至少有三種形式的測試是可以應用的；在檢測遺傳孟德爾疾病、在全基因組範圍內檢

測拷貝數異常盡可能提高分辨率，以及檢測全基因組突變，這一部分的討論有學者提出他們的經驗來提高分離胎兒細胞量的方法。

#### **4. Biomarkers for preeclampsia**

發展子癩症檢測的標記蛋白及先兆子癩的預後生物標誌物，以及鑑定的手段對於預防此類高危險妊娠是相當重要的，報告的學者針對孕婦的血液、尿液及糞便進行RNA及蛋白質整合多種的生物標誌物的檢測，根據孕婦是否發病進行分析並先兆子癩內分泌改變及分子、蛋白質的改變作分析，以提供醫師參考。

#### **第5~8項 第二部分的胚胎植入前基因診斷討論**

#### **5. PGD for mosaicism**

首先由哈佛大學的Sunney Xie博士針對單一細胞全基因組擴增技術與染色體的異常分析進行報告，他們開發了一種無創性染色體篩查（NICS）方法基於對分泌到培養物中的基因組DNA進行測序來自人類胚胎的培養基，NICS方法提供了潛力更寬的染色體測試平台。

由滋養外胚層胚胎檢測的檢體中發現部分檢替呈現鑲嵌型的胚胎狀態。與會學者充分討論人類胚胎滋養外胚層和內細胞團核苷酸間核型是否具一致性，發現滋養外胚層和內細胞團之間存在一部分不一致性的現象，針對低比例的鑲嵌核型，在臨床上的發病率和懷孕影響的臨床意義仍不清楚，但是已有鑲嵌型胚胎植入而產下健康胎兒的臨床案例，然而也有一些鑲嵌型胚胎，可能被診斷為非整倍體，但是可能被丟棄的胚胎，健康及活產的潛力不明。關於診斷胚胎嵌合體的臨床意義的討論及臨床解釋與遺傳諮詢還需要更進一步的深入研究。而我們何時可以植入鑲嵌胚胎的討論方面，何時和為什麼我們會考慮進行這種轉移？需要考慮什麼？母親年齡，財務考慮，技術或其他方面如何？與會的專家分別提出正反的見解及辯論提供聽眾



極大的思考空間。

## **6. Current and Future considerations for PGS and PGD**

植入前基因診斷測試可以解決越來越多的夫婦被可能面臨著的一個或更多的數百種，沒有家族史的情況下更隱性的疾病，遺傳的風險。因此有實驗室發展診斷性外顯子組測序的方法，以診斷更罕見的疾病診斷以及報告，此外大阪大學Keiichiro Suzuki博士也提出基因體及粒線體重新編輯的技術已進行子代合子遺傳疾病的治療，但目前仍限於動物實驗。但是，可以將單基因植入前遺傳學診斷與單核苷酸多態性結合起來進行胚胎非整倍體篩選，以優化臨床結果編輯線粒體和核基因組DNA的技術。

## **7. Biomarkers for infertility and implantation failure**

Zouves生育中心的Manuel Viotti博士胚胎中線粒體DNA的數量已被部分的學者提出為植入的生物標誌物，量化線粒體DNA來預測植入：神話還是神話？目前依然沒有一致的說法，與會的學者也呈現分歧的看法，這一部分仍待更多的臨床證據來解釋。而開發和採用了廣泛的免疫測試和治療免疫系統，以創造更有利於植入的吉著床的子宮環境，也是免疫檢測和治療的重要研究方向。哈佛大學的學者Samantha Schilit在男性細胞遺傳學和分子病因學探討，發現少精症患者SYCP2基因為異常狀態。

## **8. Diagnostic potential of sperm epigenetics**

Tim Jenkins 博士以表觀遺傳學研究生育力的潛在診斷效用，發現精子表觀遺傳模式可能為精子生成異常及對於生殖潛能和後代健康標記及其在不孕症，胚胎發生甚至後代疾病中的作用提供重要訊息。Stephen Krawetz 博士亦利用表觀遺傳學研究及診斷男性不育症，預測著未來胎兒發育的狀態。

## 二、與會心得

配合李茂盛教授團隊精準醫學的研究主題「發展精準醫學進行老化及粒線體異常之不孕症治療」，參加這次會議，我們學習到產前診斷、生殖醫學相關基因、胚胎診斷檢測方法及精準醫學相關的平台，也得到目前國際在者一方面最新的研究訊息。我們也張貼海報，分享我們團隊的研究成果，本團隊的海報主題為「Quantitation of Mitochondrial DNA Associates with Blastocyst Quality and Pregnancy Rates in PGS-SET Cycles」，針對粒線體在著床前期胚胎發育及著床影響，發表我們觀察到的臨床結果，有學者表現高度的興趣並與我們討論檢測方法的準確度及臨床結果的可應用性，在互動的討論中，我們也發現我們研究方法仍有須改進的地方，這些珍貴的經驗讓我們的團隊在精準醫學的研究上又向前邁進了一步。

## 三、發表論文全文或摘要

Quantitation of Mitochondrial DNA Associates with Blastocyst Quality and Pregnancy Rates in PGS-SET Cycles

En-Hui Cheng[1]; Chien-Hong Chen[1]; Hui-Hsin Shih[1]; Yi-Ping Pai[1]; Yi-Chun Chen[1]; Yi-Ping Lin[1]; Chun-Chia Huang[1]; Tsung-Hsien Lee[2,3]; Maw-Sheng Lee[1,2,3]

Lee Women's Hospital, Genetic Diagnosis Laboratory, No. 30-6, Section 1, Changping Road, Beitun District, Taichung, 40652 Taiwan

[1] Lee Women's Hospital, Genetic Diagnosis Laboratory, Taichung, Taiwan; [2] Chung-Shan Medical

University, Institute of Medicine, Taichung, Taiwan; [3] Chung-Shan Medical University Hospital, Department of Obstetrics and Gynecology, Taichung, Taiwan

The content of mitochondrial in mammalian cells ranges from several hundred to thousands, determined by the morphology of cells and energy needs. Mitochondrial functions are critical during the pre-implantation stage embryos. The purpose of this study is to investigate the relationships between the content of mtDNA and and PGS-SET outcomes. Trophoctoderm (TE) biopsies (n=244) were collected from January 2017 to

August 2017 to determine mitochondrial DNA (mtDNA) copy numbers in blastocysts with different morphological quality, chromosomal contents, morphokinetic scores, and maternal age before euploid single embryo transfers (SETs). The amount of mtDNA in euploid (n=118) and aneuploid (n=126) blastocysts were assessed by the TaqMan probe assay. Embryonic morphokinetics monitored by the time-lapse photography was evaluated by the embedded software, the KIDScoreTMD5 model. DNA from biopsied TE samples was amplified and then subjected to euploidy analysis using next generation sequencing. Two separate custom-designed TaqMan assays targeting on distinct mtDNA sites (mt-RNR2 and mt-ND4 genes) were used to increase the assay accuracy. The mtDNA levels of euploidy blastocysts derived from patients with different maternal age (younger age group <38y, n=77; older age group  $\geq$ 38y, n=41) were analyzed. A

statistically significant increase of mtDNA copy numbers in euploid blastocysts from the younger women was clearly revealed. Furthermore, in euploid blastocysts derived from younger women, comparing mtDNA contents between the examined morphological criteria showed significant difference between good and poor quality embryos. However, there was no significant difference between euploid embryos with different morphokinetic scores. Assessment of the implantation efficiency after euploid SETs revealed that blastocysts containing lower mtDNA copy numbers have a higher implantation rate. Our results demonstrate that the amount of mtDNA are associated with maternal age, morphological quality, and implantation rates, suggesting detection of mtDNA contents may be valuable tool to select the blastocyst for euploid SET.

#### 四、建議

很感謝科技部給本團隊這次出國學習的機會，但是比較可惜的是整個計畫時間很緊湊，而出國參加會議的決定也很倉促，如果有更充裕的時間，本團隊應可參加更多的會議學習更多的新觀念。

#### 五、攜回資料名稱及內容

部分的演講者願意提其期報告的投影片內容，而對本研究最相關最有助益的為 Manuel Viotti 博士的報告 PFD 檔

資料名稱: Quantifying Mitochondrial DNA to Predict Implantation: Myth or Reality

內容: 針對檢測胚胎的粒線體含量已發表的論文及各生技公司的研究進行分析，探討是否應進行粒線體鑑測及其是否可以用於預測胚胎著床，結論是胚胎

形態越好的粒線體含量越少，著床的狀態的粒線體含量則大部分與胚胎品質呈現正相關，但亦有極少數的例外，即粒線體含量很高的胚胎亦著床，因此他認為仍需更大量的臨床數據來支持這個理論，因此他鼓勵我們盡快完成臨床大量的檢測，以提供生殖醫學界參考。

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：李茂盛			計畫編號：106-3114-B-040-001-				
計畫名稱：發展精準醫學進行老化及粒線體異常之不孕症治療							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	撰寫中 1. 施惠馨 白依萍 陳怡君 鄭恩惠 林羿萍 陳建宏 黃俊嘉 李宗賢 李茂盛 (2017, Aug). Mitochondrial gene MT-RNR2 quantitation predict pregnancy rate in PGS-SET cycle. 台灣生殖醫學會2017年會	
		研討會論文		1			
		專書		0			本
		專書論文		0			章
		技術報告		0			篇
		其他		0			篇
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	0
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇	Cheng EH, Chen CH Shih HH; Pai YP, Chen YC, Lin YP, Huang CC, Lee TH, Lee MS, (2017)Quantitation of Mitochondrial DNA associates with blastocyst quality and pregnancy rates in PGS-SET cycles. Reproductive Genetic Diagnostics, Hyatt Regency Cambridge, MA, USA.
			研討會論文		1		
			專書		0		
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他		0	篇				

智慧財產權 及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
			已獲得	0		
		新型/設計專利		0		
	商標權		0			
	營業秘密		0			
	積體電路電路布局權		0			
	著作權		0			
	品種權		0			
	其他		0			
	技術移轉	件數		0		件
收入		0	千元			
參與計畫 人力	本國籍	大專生		0	人次	
		碩士生		2		1. 分別聘任蔡漢霓及柯懿如兩位碩士級研究助理, 進行人類檢體及動物實驗 2. 共提供約113萬元薪資
		博士生		0		
		博士後研究員		2		計畫協同研究人鄭恩惠博士及陳建建宏博士協助本計畫進行
		專任助理		0		
	非本國籍	大專生		0		
		碩士生		0		
		博士生		0		
		博士後研究員		0		
		專任助理		0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等, 請以文字敘述填列。)				1. 研究團隊養成: 系內、成立一組中部校內跨領域、跨校或跨組織合作團隊進行精準醫學粒線體序列及功能分析與臨床前期試驗安全評估 2. 與世界接軌, 學習最新粒線體移植技術, 參加與本研究相關之國際workshop: (1)9th Annual ART World Congress which will be held in New York, NY, October 25-26, 2017. 3. 參加與本研究相關之國際學術研討會conference, 進行國際交流與國際相關研究學者學習及討論粒線體研究最新趨勢, 讓國際學界及生技產業知道台灣研究的狀況, 以謀求進一步國際合作的可能。 (1) American Society for Reproductive Medicine (ASRM) October 28- November 1st, 2017. (2) Reproductive Genetic Diagnostics November 30th-1st Dec., 2017 (3) Advances in Prenatal Molecular Diagnostics November 28th-29th, 2017		

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以200字為限）

目前已就胚胎粒線體含量及與試管嬰兒結果進行比較，發表2篇研討會論文

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

本計畫的目的為，藉由病人之粒線體DNA的遺傳分析探討粒線體基因變異與老化不孕症的關係，並利用此結果篩選適合粒線體移植的病人(子計畫一)。而動物試驗的成果可以得知何種細胞由來之粒線體，最適成為粒線體移植來源與需要移植的粒線體數目(子計畫二)。此外，台灣粒線體公司（合作廠商）可提供符合GTP規範之細胞與純化之粒線體，以期可改善卵子粒線體功能與增加胚胎發育、著床以及提高懷孕率與出生率(子計畫三)。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否  是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否  是

說明：（以150字為限）