

—総説—

特集：卵子学会トピックス 2018

## ミトコンドリア置換法による配偶子系列遺伝子治療と 生殖補助医療への応用の可能性

### Mitochondrial replacement therapy for germline gene therapy and its potential application in ART

立花 眞仁

Masahito Tachibana

東北大学病院産婦人科 〒980-8574 仙台市

*Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University Hospital, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8574, Japan*

**要旨：**核移植技術は、見方を変えれば細胞質を置換する技術でもあり、ミトコンドリア置換 (MRT: Mitochondrial replacement therapy) の技術とみなすことができる。卵細胞質には膨大なミトコンドリア、およびミトコンドリア固有の遺伝子 (ミトコンドリアDNA: mtDNA) が存在し、初期胚における胚発育をサポートしている。母系遺伝で相同組み替えのないmtDNAは、卵子や初期胚において核のみを効率的に移植する技術があれば、ドナーの細胞質と置換することが可能となる。そのため、MRT法は、現在mtDNA異常に起因するミトコンドリア病の伝搬防止を目的とした配偶子系列遺伝子治療として考慮され、英国では臨床試験が開始されている。この項では、配偶子系列遺伝子治療としてのMRT法を概説し、派生する生殖補助医療への応用の可能性を紹介する。

**キーワード：**ミトコンドリア、ミトコンドリア遺伝病、卵細胞質、遺伝子治療

**Abstract:** Transferring nuclear material between oocytes from unrelated females offers the opportunity to exchange not only nuclear genetic materials but also their cytoplasm. Cytoplasm of the mammalian oocyte contains large amounts of mitochondria/mitochondrial DNA (mtDNA) that is maternally inherited and only passes down from mother to child through the egg. For this unique feature of mitochondrial inheritance, it would be feasible to replace mitochondria/mtDNA with donor cytoplasm if there was a reliable technology to allow efficient transfer of only nuclear material in eggs or in early embryos, which is called Mitochondrial Replacement Therapy (MRT). In this regard, several MRT techniques are now considered to be germline gene therapy for inherited mitochondrial diseases in the U.K., and the world's first clinical trial is underway. In this article, we described utilization of MRT as for germline gene therapy for inherited mitochondrial diseases and also discuss its potential applications in standard ART practice.

**Key words:** Mitochondria, Mitochondrial disease, Cytoplasm, Gene therapy

#### はじめに

真核生物の細胞質にはミトコンドリアが存在し、ミトコンドリアは固有のミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) を有する。ミトコンドリアは細胞活動のエネルギーであるアデノ

シン三リン酸 (ATP) を産生する重要な細胞内小器官であり、ミトコンドリアの機能異常はエネルギー需要に応じて、ミオパシー、神経変性疾患、糖尿病、癌、および不妊症を含む様々な疾患や障害を呈する。一方、老化による生体機能の障害はミトコンドリア病と類似しており、歳をとれば誰もがミトコンドリア遺伝子に変異が蓄積し、ヒトとしての寿命を越えるとすべからくミトコンドリア病を発症する可能性がある<sup>1)</sup>。

母系遺伝であるミトコンドリア (およびmtDNA) は、卵子を介してのみ次世代へと受け継がれるため、上記の病原性、

(受付 2019年6月19日 / 受理 2019年8月15日)

別刷請求先：〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1

東北大学病院 産婦人科

e-mail: masahito.tachibana.c1@tohoku.ac.jp

もしくは加齢性の変異mtDNAは、卵子や初期胚における細胞質置換（ミトコンドリア置換：MRT）を行うことによって健常者のミトコンドリア（およびmtDNA）に置き換えることが可能である。つまり、MRTはミトコンドリア遺伝子異常を治療し、その機能を改善する可能性を秘めている。

### ミトコンドリアの異常と疾患

ミトコンドリア遺伝子異常に起因する疾患は1988年に初めて報告され<sup>2,3)</sup>、これまでに150を超える（100の欠損と50を超える点突然変異を含む）変異がヒトの疾患と関連して報告されている<sup>4)</sup>。多くのミトコンドリア遺伝病患者は、通常ヘテロプラスミー（Heteroplasmy）と呼ばれる正常と変異体の混在した状態を有し、その割合は組織によって異なる。疾患が臨床表現型として現れるのには、変異体の割合（つまりHeteroplasmyの程度）が関与し、Mutant load（変異負荷、すなわち、変異体対正常ミトコンドリアDNAの比率）が組織と個々に特定の閾値を超えた場合に臨床像が顕在化する（例えば、変異体の割合が30%程度では発症せず、70%以上の変異体により臨床症状が顕在化し、90%ではより重篤な症状を呈するといったもの）。ミトコンドリアの機能異常は細胞のATP需要を満たせなくなることに起因して、各組織や臓器の機能障害を来すことから、先天性から老年期のいずれの時期にも発症し、組織特異的および多発性のシステミックな障害を含む多様なヒトの臨床症候を呈することは容易に想像できる。実際、ミトコンドリア遺伝子の異常はAlzheimer病、Parkinson病やHuntington病、肥満、糖尿病や癌などの社会的にも広範囲に認知されている疾患への関連性が報告されている<sup>5-9)</sup>。

ミトコンドリアの機能異常は多岐にわたり、種々のヒトの疾患と関連しているが現在有効な治療法は存在しない。また、①障害の多くがmtDNAの変異体の割合（Heteroplasmy）や閾値効果と結びついていること、②卵子形成過程におけるbottleneck効果（始原生殖細胞の形成期にミトコンドリアとミトコンドリア遺伝子の急速な減少とその後の卵子形成過程における急速な増加）など、未解明の機序により急速な遺伝的浮動（genetic drift）が生じ得ること、③さらに、細胞分裂にともなうミトコンドリアの不均等分配など、組織間で変異体の割合（Heteroplasmy）の差を生じることから、一部の検体が固体全ての結果（表現型）を反映しない可能性があるため、移植前（着床前診断：PGD, pre-implantation genetic diagnosis）、もしくは出生前の遺伝子診断や正確なカウンセリングの提供が困難である。分割期のPGDを例にとると、変異体の割合の低い割球が診断に選択された場合には、偽陰性が生じ、その逆も然りである。そこで、母子間での変異mtDNAの伝搬を確実に防止することができる新規治療法の開発が望まれている。

### 配偶子系列遺伝子治療としてのMRT法

母系遺伝であるミトコンドリア（およびmtDNA）を卵子や初期胚において健常者のミトコンドリア（およびmtDNA）

に置き換えることができれば、変異ミトコンドリアを排除しミトコンドリア遺伝病の発症を防止できると考えられる。これまで種々の生殖補助技術がMRTとして提唱されており、卵核胞（GV）期卵子を用いたgerminal vesicle transfer（GVT）、受精後の胚を用いたpronuclear transfer（PNT）やblastomere nuclear transfer（BNT）、極体を利用したpolar body transfer（PBT）が報告されている。各MRTの詳細は他の総説を参照いただきたい<sup>10,11)</sup>。

上記に対して我々は、成熟卵子（第二減数分裂中期：MII期）は治療モデルの開発において種々のアドバンテージを持つと考えた。第一に、MII期卵子は現在行われているART（Assisted reproductive technology）治療において汎用されており、第二に、MII期卵子の使用において、欧米諸国では卵子のdonation programがすでに一般化しており、受精後の胚を用いたpronuclear transfer（PNT）やblastomere nuclear transfer（BNT）など、ドナー胚（受精後の生命）の破壊やreproductive cloningに通じるといったより重大な道徳的かつ倫理的問題を回避できる可能性がある。第三に、霊長類のM期紡錘体周囲にはミトコンドリアの集積がないことから、変異ミトコンドリアの持込を最小限にできると考えられる（図1A）。しかしながら、成熟卵はM期であり、他の間期の核と異なり可視化と単離が困難であった。また、高濃度のMPF（maturation promoting factor）によりM期で停止している紡錘体は、顕微操作などの刺激に感受性が高く、早期活性化（premature oocyte activation）が生じ得た。我々は、Oosight<sup>®</sup>（HAMILTON THORNE, MA, USA）を用いることにより、非侵襲的にMII期紡錘体を可視化し（図1B）、さらにレーザー（XYClone Red-i laser objective, HAMILTON THORNE）を用いた透明帯穿孔によって、より確実かつ容易にMII期紡錘体を最小限の細胞質を伴ったkaryoplast（全細胞質の約1.5%の容積）として単離することを可能とした（図1C）。また、従来細胞融合に用いられていた電気融合法に変わり、不活化センダイウィルスエンベロープ（HVJ-E; GenomeONE-CF, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd., Osaka, Japan）を導入したことによって、早期活性化を起こすことなく安定したMII期紡錘体のドナー細胞質への導入に成功し、Maternal Spindle Transfer（MST）もしくは、Spindle Transfer（ST）と命名した<sup>12,13)</sup>。MSTによって再構築した卵子は対照群のICSI胚と同等の胚発生能を有し（表1）、胚移植によって3匹のレシピエントが妊娠し、うち1匹が双胎であったため、4匹の健康なアカゲザルの産仔が誕生した。妊娠率と着床率はそれぞれ33%（3/9）と27%（4/15）であり、これも以前に報告したアカゲザルのARTによる成績と同等、もしくはより高率であった。また、MST胚盤胞より3つのES細胞株を樹立したが、その樹立効率は33.3%と対照群と同等であった。そして、Short tandem repeat（STR）microsatellite parentage analysisやmtDNAの塩基配列解析などの細胞遺伝学的な分析からは、いずれの産仔やES細胞も核遺伝子は紡錘体ドナーに、mtDNAは細胞質ドナーに由来していた。このことから、胚の正常性を損なわず

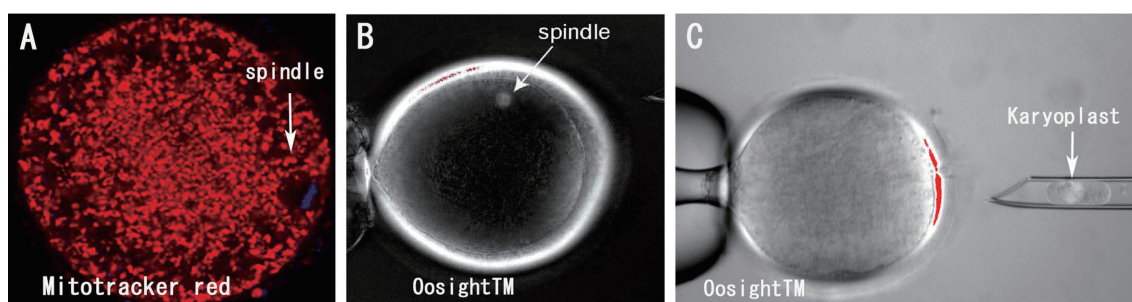


図1 アカゲザル成熟卵のミトコンドリア分布, MII期紡錘体, および, Karyoplast  
 A: ミトコンドリアは卵細胞質内に均一に存在するが, 紡錘体-染色体複合体部分への集積は認められない. B: Oosight™によって可視化されたMII期紡錘体. C: Oosight™とXYClone Red-i laserを用いて最小限の細胞質とともに単離されたMII期紡錘体を含むKaryoplast (Tachibana et al., Nature 2009より一部改変).

表1 Maternal Spindle Transfer (MST) 胚の胚発生

	n	融合(率)	受精(率)	8細胞(率)	胚盤胞(率)
MST群	87	78 (95)	74 (95)	69 (93)	45 (61)
対照群	72	なし	68 (94)	57 (84)	41 (60)

(Tachibana et al., Nature 2009より改変)

表2 凍結融解卵子を用いたMST法の検証

	n	実験数	MST後生存卵子(率)	ICSI後生存卵子(率)	受精(率)	胚盤胞(率)
対象群 新鮮卵ICSI	34	5	NA	33/34 (97)	30/33 (91) <sup>†</sup>	17/30 (57) <sup>†</sup>
新鮮細胞質に凍結融解紡錘体*	36	6	34/36 (94)	32/34 (94)	28/32 (88) <sup>†</sup>	19/28 (68) <sup>†</sup>
凍結融解細胞質に新鮮紡錘体**	35	6	35/35 (100)	34/35 (97)	17/34 (50) <sup>‡</sup>	0/17 (0) <sup>‡</sup>

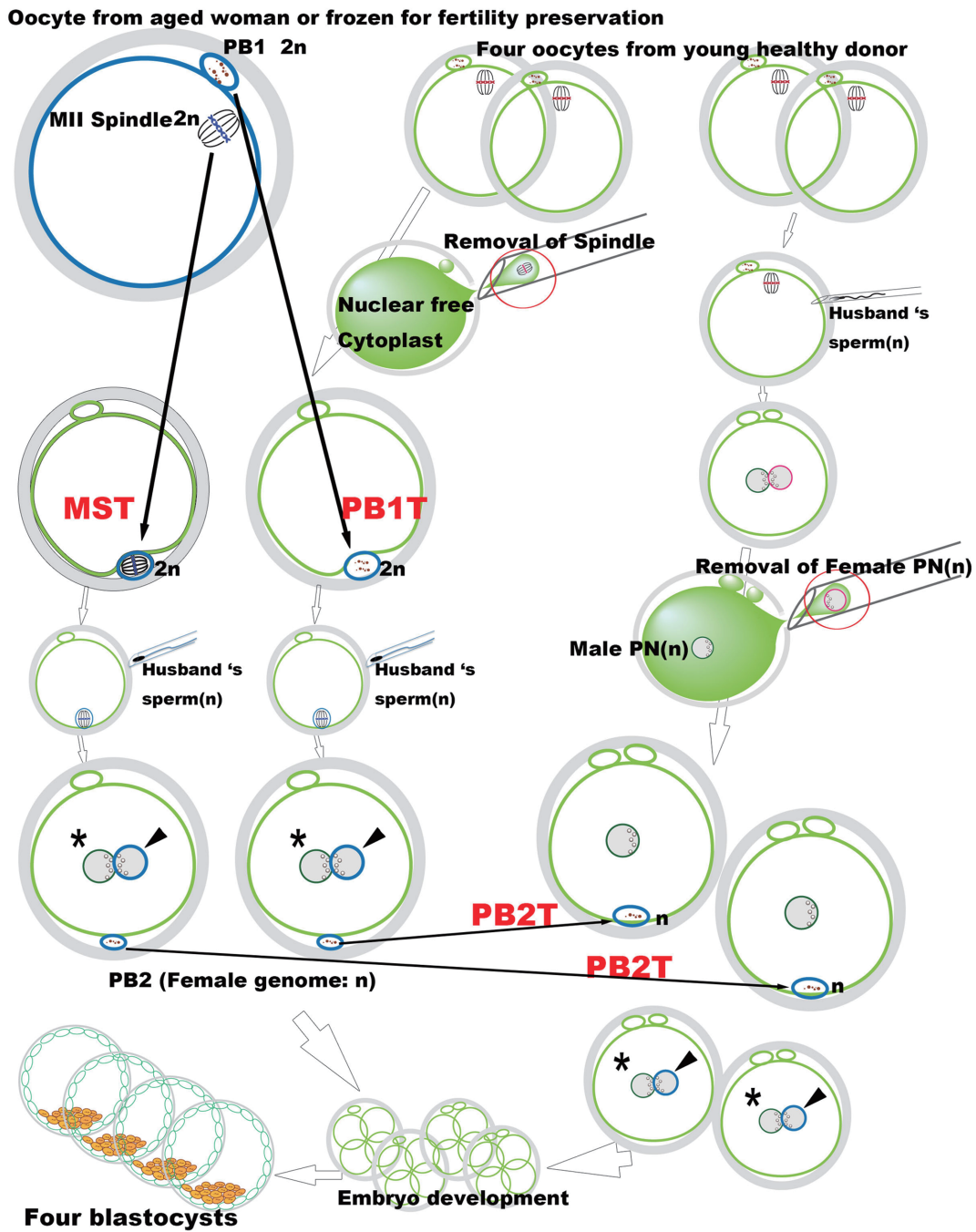
同列の異なる上付き文字 (†, ‡) は統計学的に優位差あり ( $P < 0.05$ ). \*凍結融解卵と新鮮卵の間におけるMST法による細胞質(紡錘体)の置換により, 新鮮卵の細胞質に凍結融解卵の紡錘体を移植した卵子. \*\*凍結融解卵と新鮮卵の間におけるMST法による細胞質(紡錘体)の置換により, 凍結融解卵の細胞質に新鮮卵の紡錘体を移植した卵子 (Tachibana et al., Nature 2013より改変).

に, ミトコンドリアの置換が可能であることを示された<sup>12)</sup>.

後の検討では, MST産仔は正常な発育と発達を示し, 成長にともなう紡錘体ドナー由来のmtDNA Heteroplasmyの増加は認めていない<sup>14)</sup>. また, 紡錘体ドナーと細胞質ドナーの排卵誘発の同期と卵子数の乖離を克服するため, 凍結融解卵子を用いた検討も行った. 卵子凍結融解操作のダメージは核や紡錘体には生じず, 卵細胞質を傷害することが明らかとなり, また, 新鮮な細胞質への凍結融解を行った紡錘体の移植においては, 新鮮卵のICSIと同等の胚発育が認められた(表2)<sup>14)</sup>. このことから, 実際の臨床応用においては, 患者卵子はMST法に先立って凍結保存しておき, 健常者からのドナー卵子細胞質はMST法施行当日に新鮮卵より供することで, 排卵誘発を同期させないといけない問題を解決することが可能と考えられた. 最後に, 7人の研究目的卵子ドナー(年齢21-32歳)より得られたヒト卵子(n=106)を用いて, MST(n=65: MST群)とICSI(n=33: 対照群)を施行した(残り8個は免疫組織化学等に供与)<sup>14)</sup>. MST

群では, 65個中64個の卵子でMSTに成功し(98%), うち60個(94%)がICSI後も生存していた. 受精卵は44個(73%)であったが, 約半数の23個(52%)が前核や極体の異常を呈した. 対照群のICSI胚は, 33個中32個(97%)が生存し, 24個(75%)が受精し, 21個(88%)が正常受精であった. 正常受精したMST胚21個(48%)のうち, 13個(62%)が胚盤胞へと発育した. これは, 対照群のICSI正常受精胚の胚盤胞発生率76%(16/21)と遜色がなかった. また, 胚性幹細胞樹立率もMST群と対照群で, それぞれ5/13(38%)と9/16(56%)で有意差をみとめなかった. 正常受精MST胚より樹立した5つの胚性幹細胞株は全て正常核型を有し, amplification refractory mutation system quantitative PCR (ARMS-qPCR)による紡錘体ドナー由来mtDNA carryoverは0.01~1.7%であり, アカゲザルの実験同様に, ほぼ細胞質ドナー由来mtDNAに置換されていた<sup>14)</sup>.

こうしたエビデンスの蓄積により, MSTはミトコンドリア病の伝播を回避する配偶子系列遺伝子治療法として考慮



\*All sibling embryos are derived by serial MST techniques with maintaining nuclear inheritance from single oocyte

図2 Mitochondrial replacement therapy (MRT) による単一卵子の全ての核遺伝子 (4n) を使用した4つの兄弟・姉妹胚の作成  
 青色の卵子は高齢者の卵子、もしくは、医学的適応で凍結された卵子を想定。成熟卵は2つの2nの遺伝子セットをMII紡錘体と第一極体に有する。2つのドナー卵子(緑：中央上)はMII紡錘体の除核により、細胞質体(Cytoplast)ドナーとして供され、2nの核遺伝子であるMII紡錘体と第一極体をそれぞれMST法とPB1T法にて移植され、ICSIによる受精により2つの兄弟・姉妹胚が作成される。この際、それぞれハプロイドゲノム(青卵子由来の雌性n)を第二極体として卵卵腔へ放出する。別途2つの卵子(緑：右上)は、パートナーの精子にて受精させ、前核形成期に雌性前核のみを除核する。雄性前核(n)のみを有する前核期卵へ、先の第二極体(青卵子由来の雌性n)を移植するPB2T法によって、さらに2つの兄弟・姉妹胚が作成可能である。これらMRTの組み合わせで極体として通常は受精や発生に寄与しない3n分の核遺伝子を利用することが可能であれば、単一の卵子から4つのドナー卵子を用いて理論的には4つの兄弟・姉妹胚を作成することが可能である(Tachibana et al., *Reprod. Med. Biol.* 2018より一部改変)。

され (<http://www.hfea.gov.uk>)<sup>15)</sup>, 2015年英国では上下院で法改正がなされ, 2017年より世界初の配偶子系列遺伝子治療として臨床試験に入っている。

### MRTの応用

実臨床においては, 高齢不妊の低品質卵による反復IVF不成功例が大きな問題となっている。この低品質卵子の細胞質因子として, ミトコンドリアの機能異常との関連が示唆されている。卵子成熟や受精においても, mtDNA変異の蓄積はATP産生に影響を及ぼし, 減数分裂における染色体分離に影響しうると考えられ, ヒト卵子においても加齢による4,977 bp欠失の蓄積が知られている<sup>16, 17)</sup>。そこで, MRTを用いた健全なミトコンドリアを含む若い卵子の細胞質の添加や完全な細胞質置換は, 細胞質因子に起因する不妊を克服すると考えられる。つまり, これまで高齢の反復IVF不成功例に欧米で一般的に行われている卵子提供に代わり, 細胞質提供(細胞質ドネーション)という新しいスタイルの, 第三者が介入する生殖補助医療を提供できる可能性を秘めている<sup>10, 11)</sup>。

一方, 卵子の成熟過程においては, 精子とは異なり, 3つのハプロイドゲノムを極体として放出する(第一極体2n, 第二極体n)ことによって, 一つの巨大な細胞質に初期発生をサポートするに十分なミトコンドリアや雌雄ゲノムの初期化に寄与する母性mRNAを蓄えている。極体として卵卵腔へ放出される極体の核遺伝子(3n)も, 細胞質の供与があれば, MRTの1つであるPBTを用いることによって利用可能であることが示されている<sup>18, 19)</sup>。つまり, PBTなどのMRT技術を応用することによって, 理論的には一つの卵子から4つの兄弟・姉妹胚を作成することが可能である(図2)<sup>11)</sup>。つまり, MRTには細胞質機能のレスキューのみならず, 卵子の数的問題をも解決する可能性を秘めている。これは, 卵巣予備能の低下した高齢不妊女性における限られた採卵数の問題や, 近年がんサバイバーのQOLの問題として注目を集める若年女性がん患者での医学的適応による卵子凍結など数に限りがある患者にとっては, 非常に有用な手段と考えられる。しかしながら, 一つの卵子からの4つの兄弟・姉妹胚作成の実現可能性は示されておらず, 今後の検証が待たれる。

### 最後に

この項では, 卵子や初期胚における細胞質置換がもたらす治療の可能性を概説した。我々が開発したMST法は, これまで困難であった成熟期MII卵子での細胞質置換を可能とし, ミトコンドリア遺伝病という難病を抱える患者と家族にとって, ミトコンドリア病発症と伝播のリスクを最小限に抑えつつ, 遺伝的つながりをもった児を得る可能性を提供する。また, 本法は紡錘体と細胞質を分離することにより, 純粋な細胞質機能の比較評価を可能とすることによって, 未だ結論の出ない加齢における低品質卵の本質を細胞質機能の面から検討する有用なツールになると考える。し

かしながら, MRTは前述のように, 配偶子系列遺伝子治療にあたり, 第三者のmtDNAと核遺伝子の協調やHeteroplasmyの問題など, 未だ完全に解決に至ってはいない問題がある。今後の臨床応用や適応拡大についても, 現在進行中である英国での臨床試験の結果が待たれる。

### 文献

- 1) Westly, E. (2010): When powerhouses fail. *Nature Medicine*, 16, 625–627.
- 2) Holt, I.J., Harding, A.E. and Morgan-Hughes, J.A. (1988): Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 331, 717–719.
- 3) Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J.2nd. and Nikoskelainen, E.K. (1988): Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242, 1427–1430.
- 4) Solano, A., Playan, A., Lopez-Perez, M.J. and Montoya, J. (2001): Genetic diseases of the mitochondrial DNA in humans). *Salud Publica Mex.*, 43, 151–161.
- 5) Brandon, M., Baldi, P. and Wallace, D.C. (2006): Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 25, 4647–4662.
- 6) Keating, D.J. (2008): Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.*, 104, 298–305.
- 7) Lin, M.T. and Beal, M.F. (2006): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787–795.
- 8) Reeve, A.K., Krishnan, K.J. and Turnbull, D. (2008): Mitochondrial DNA mutations in disease, aging, and neurodegeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1147, 21–29.
- 9) Trushina, E. and McMurray, C.T. (2007): Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience*, 145, 1233–1248.
- 10) Shiga, N., Tachibana, M., Yaegashi, N. (2016): Challenges towards establishing of the germline gene therapy for inherited mitochondrial diseases. *J. Mam. Ova Res.*, 33, 89–99.
- 11) Tachibana, M., Kuno, T. and Yaegashi, N. (2018): Mitochondrial replacement therapy and assisted reproductive technology: A paradigm shift toward treatment of genetic diseases in gametes or in early embryos. *Reprod. Med. Biol.*, 17, 421–433.
- 12) Tachibana, M., Sparman, M., Sritanandomchai, H., Ma, H., Clepper, L., Woodward, J., Li, Y., Ramsey, C., Kolotushkina, O. and Mitalipov, S. (2009): Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, 461, 367–372.
- 13) Tachibana, M., Sparman, M. and Mitalipov, S. (2010): Chromosome transfer in mature oocytes. *Nat. protoc.*, 5, 1138–1347.
- 14) Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Woodward, J.,

- Sanchis, H. Ma, D.M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Kang, E., Lee, H.S., Ramsey, C., Masterson, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., Gokhale, S., Stouffer, R. and Mitalipov, S. (2013): Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature*, 493, 627–631.
- 15) Callaway, E. (2012): UK sets sights on gene therapy in eggs. *Nature*, 481, 419.
- 16) Chan, C.C., Liu, V.W., Lau, E.Y., Yeung, W.S., Ng, E.H. and Ho, P.C. (2005): Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 11, 843–846.
- 17) Keefe, D.L., Niven-Fairchild, T., Powell, S. and Buradagunta, S. (1995): Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil. Steril.*, 64, 577–583.
- 18) Ma, H., O'Neil, R.C., Marti Gutierrez, N., Hariharan, M., Zhang, Z.Z., He, Y., Cinnioglu, C., Kayali, R., Kang, E., Lee, Y., Hayama, T., Koski, A., Nery, J., Castanon, R., Tippner-Hedges, R., Ahmed, R., Van Dyken, C., Li, Y., Olson, S., Battaglia, D., Lee, D.M., Wu, D.H., Amato, P., Wolf, D.P., Ecker, J.R. and Mitalipov, S. (2017): Functional Human Oocytes Generated by Transfer of Polar Body Genomes. *Cell Stem Cell*, 20, 112–119.
- 19) Wang, T., Sha, H., Ji, D., Zhang, H.L., Chen, D., Cao, Y. and Zhu, J. (2014): Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell*, 157, 1591–1604.