

核移植技術とミトコンドリア遺伝病

Oregon National Primate Research Center, Oregon Health & Science University

立花 眞仁, Shoukhrat Mitalipov

はじめに

核移植技術は、遺伝子改変動物の作成や畜産分野で大きく貢献してきた。一般に、核移植技術は核遺伝子の操作を想起させるが、核移植を行うということは同時に細胞質を置換することでもある。細胞質には種々の細胞小器官およびミトコンドリアが存在し、ミトコンドリアにはミトコンドリア固有の遺伝子（ミトコンドリアDNA: mtDNA）が存在する。われわれのグループでは、核移植技術をミトコンドリア置換の技術と位置づけ、さまざまな研究を行っている。事実、近年われわれが報告した紡錘体置換法（Spindle transfer: ST法）[1, 2]は、ミトコンドリア病の伝搬を回避する配偶子系列遺伝子治療法として考慮されている（<http://www.hfea.gov.uk/6372.html>）[3]。この稿では、核移植技術を用いたミトコンドリア置換から派生する基礎研究、臨床応用に向けた検討や今後の展望などを紹介する。

ミトコンドリア遺伝子の遺伝的浮動と配偶子系列遺伝子治療

母系遺伝であるミトコンドリア遺伝子の世代間の伝搬については、未だすべてが解明されている訳ではない。あるミトコンドリア病の家系図の例を図1に示すが、同一の保因者カップルから健児、罹患児が出生することは珍しくなく、また、世代を飛び越えて発症することもある。メンデルの遺伝形式によりある程度頻度を把握できる核遺伝子の遺伝性疾患とは異なり、ミトコンドリア病の出生前の遺伝カウンセリングは困難をきわめている。この理由としては、i) 多くのミトコンドリア病は正常と変異体が混在するヘテロプラスミー（Heteroplasmy）を呈し、変異体の割合が発症と重症度に相関する、ii) 配偶子形成過程におけるボトルネック効果（germline bottleneck）等により、個々の卵子は種々の程度のヘテロプラスミーをもち、かつ、予測不能であるiii) 細胞分裂に伴うミトコンドリア遺伝子の不均衡配分、等が挙げられる[4, 5]。i) ii) に関して具体例を挙げると、30%ヘテロプラスミーの母親からの卵子は非常にワイドレン

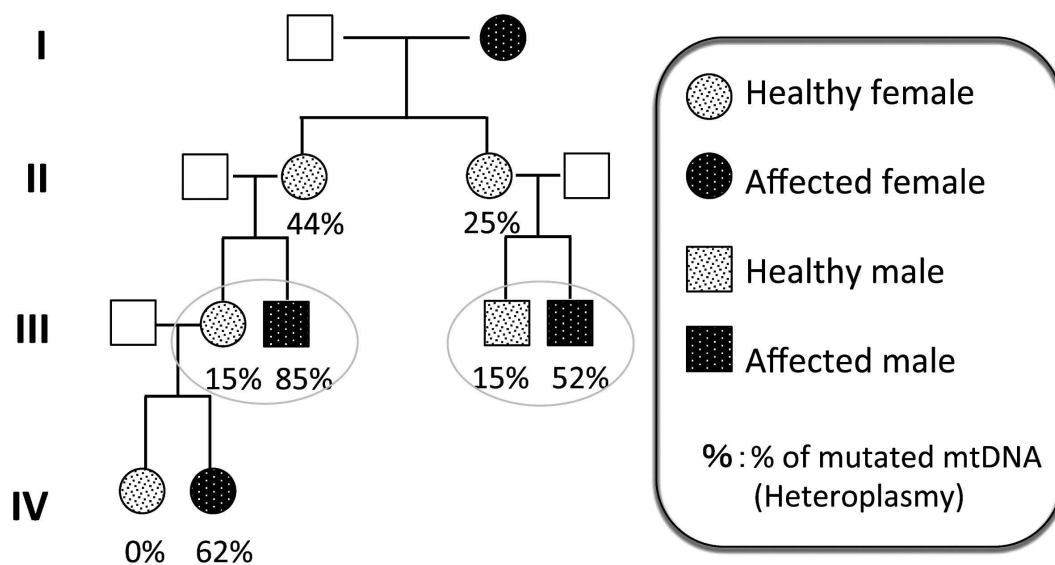


図1 ミトコンドリア病の家系図（例）

あるミトコンドリア病の家系図の1例を示す。世代間、同胞間においてミトコンドリア病の発症はランダムであり、伝搬の予測は非常に困難である。

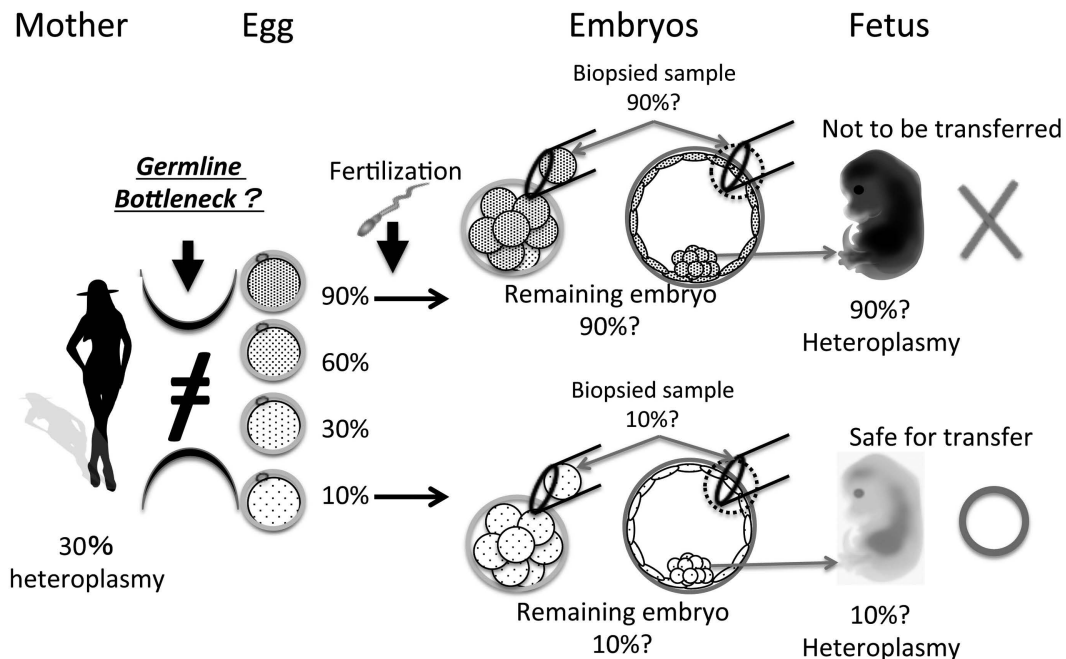


図2 ミトコンドリア病における着床前遺伝子診断

ミトコンドリア病患者に対する着床前遺伝子診断の概要を示す。母親のヘテロプラスミーは個々の卵子のヘテロプラスミーを反映しないため、個々の胚において検査を行うことによって、mutation loadの低い胚を選別することが狙いである。しかし、診断に用いた一部のサンプルが正確に残りの胚、および胎児のヘテロプラスミーを反映することが大前提である。

ジなヘテロプラスミーを示すことが知られる。ヘテロプラスミーの割合がない、または低い卵子が受精に寄与した場合、児は健常児もしくは保因者となるが（男児の場合は次世代へ引き継ぐことはない）、逆に変異体の割合が高率である卵子が受精に寄与した場合には、児はミトコンドリア病に罹患してしまう（図2）。そこで、近年急速に臨床応用が拡大している着床前遺伝子診断（Pre-implantation genetic diagnosis: PGD）が胚の選別に有用であるとの報告がなされている [6, 7]。これは図2に示すように、卵子におけるヘテロプラスミーが胚発生から胎児に至るまで保たれ、かつ、分割期胚の割球であれ、胚盤胞期の栄養外胚葉であれ、診断に用いた一部の細胞が残りの胚のヘテロプラスミーを正確に反映することが前提となっている。しかし、ヒト着床前期胚における検討は非常に限られたサンプルサイズであり [7]、マウスモデルにおいて相反するデータも報告されている [8]。もちろん、患者が変異体のみをもつホモプラスミー（Homoplasmy）である場合には適応外となる。

そこで、われわれは図2における疑問に答えを出すべく、霊長類を用いた検討を行った [9]。ST法は、核ド

ナー（ミトコンドリア病患者の卵子を想定）の mtDNA 持ち込みを最小限にとどめるための技術であるが、逆に大量の細胞質とともに置換することによって意図的にヘテロプラスミー卵子を作成することも可能である。そこで、われわれは遺伝背景の異なるアカゲザル（Indian & Chinese Macaque）を用いてほぼ50%のヘテロプラスミー卵子を作成し、以後の胚発育に伴うヘテロプラスミーの変化を分割期の割球間、胚盤胞期の内細胞塊と栄養外胚葉、胚性幹細胞、胎児および次世代の卵子を検討した。核遺伝子と同じ由来の mtDNA を resident mtDNA とし、導入された細胞質由来の mtDNA を alien mtDNA とし、alien mtDNA の割合の変化を定量的に検討した（図3）。まず50%の細胞質を置換した卵子を定量したところ、ほぼ50%のヘテロプラスミーが確認できた。分割期の胚に関しては、2細胞期、4細胞期、および8細胞期胚の割球をすべて分離し各割球のヘテロプラスミーを個々の胚毎に定量した。興味深いことに、胚の発育に伴って割球間のヘテロプラスミーの差は増大し、8細胞期には同一胚からの割球間においてすでに70%もの差を認める胚が存在した。この結果は、診断に用いられる割球が

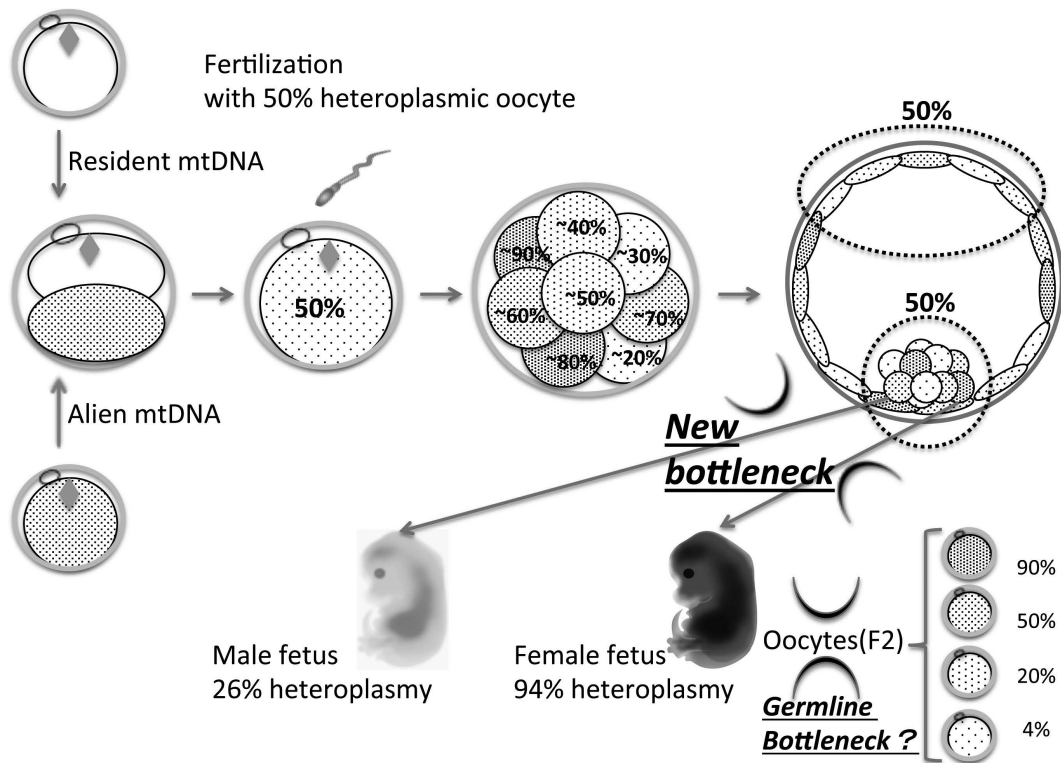


図3 われわれが提唱する New bottleneck
 霊長類モデルにおける50%のヘテロプラスミー卵子を用いた検討から、分割期と胚盤胞期ともに胎児のヘテロプラスミーを反映せず、卵子のもつヘテロプラスミーは次世代（卵子）を介さずともドラマチックにシフトすることが示された。このことから、着床前遺伝子診断では、最終の胎児におけるヘテロプラスミーを正確に把握することは困難であること示唆される。

残りの胚のヘテロプラスミーを反映しないことを示唆した。元来、着床期後までミトコンドリア及び mtDNA の複製は起こらず、卵子形成過程で蓄えられた非常に大量のミトコンドリアが胚分割において分配されつつ初期胚の発生に必要な ATP を産生すると考えられる。しかし、resident か alien mtDNA が選択的に破壊もしくは増幅されている可能性も否定できないため、割球を分離せず、そのままの分割期胚も定量を行ったが、それらは2細胞、4細胞および8細胞期すべてで元の50%を保持していた。つまり、割球間の差は一方の mtDNA の選択的破壊や増幅によるものではなく、不均等配分に起因することが確認できた。次に胚盤胞期胚を用いて、内細胞塊と栄養外胚葉に分離して定量を行ったところ、双方でほぼ50%のヘテロプラスミーを確認できた。つまり、バイオプシーに用いた栄養外胚葉は、胎児を形成する内細胞塊のヘテロプラスミーおよび、元の卵子におけるヘテロプラスミーを反映していた。この結果から、分割期胚を用

いた検討よりも、胚盤胞期の栄養外胚葉を用いた PGD の方が診断に有用であると示唆された。

ところが、50%ヘテロプラスミー胚から胚性幹細胞を樹立したところ、われわれの予想に反してすべての細胞株が resident か alien mtDNA 優位に大きくシフトしていた。さらに、In vivo の検討として胚移植を行い、male と female の胎児を採取しすべての臓器を検討したところ、こちらも予想に反して female 胎児は94%、male 胎児は約26%のヘテロプラスミーを呈していた。しかも、各臓器間で若干の差は認められたものの、分割期胚で認めたような大きな差は認めなかった。In vitro の胚において個々の割球（細胞）は種々の程度のヘテロプラスミーを呈しているが、平均は元の50%を保っていると考えられたため、胎児においてもそれぞれの細胞起源（胚葉由来の違い）によって臓器間にヘテロプラスミーのばらつきが認められても、平均では50%を示すことを予想していたわれわれにとっては非常にショッキングなデータで

あった。この事象を説明できるエビデンスを探したところ、マウスにおける4倍体補完キメラにおける胚性幹細胞由来のマウスを作成する実験系において興味深い報告を認めた [10]。マウスにおいて胎児を形成する起源細胞は通常1個か2個、多くて3個という非常に少ない Founder cell から成っており、この数は顕微注入された胚性幹細胞の数に依存しなかった。つまり、われわれの体を形作る大元の Founder cell が内細胞塊のほんの1、2個の細胞である場合、われわれの結果は合理的であると推察でき、分割期であろうが胚盤胞期であろうが PGD では兄のヘテロプラスミーを予測することが困難と考えられた。われわれはさらに、female 胎児の卵巣から卵子を回収し、個々の卵子（次世代とみなして）も検討したが、平均94%の alien mtDNA をもった female の個体から、実にバラエティ豊かな（4~90%）ヘテロプラスミー卵子が形成されていることが確認でき、やはり germline には卵子形成過程に bottleneck と思われるメカニズムによる劇的なヘテロプラスミーの変化が存在することが霊長類でも確認された。図3にわれわれが提唱するもう1つの Bottleneck を示す。われわれの検討から germline（次世代）を介さずとも、intra-generation でミトコンドリアのドラマチックなシフトが起こりえることが示された。残念ながらサル疾患モデルが存在しないため、今回の検討は遺伝背景の異なる2つの wild type mtDNA を混合することによって行われた。ゆえに、ヒトの胚発育において、変異体の mutation load が保たれるような別のメカニズムの存在も否定はできないが、少なくともこのような検討は臨床応用前に行われていてしかりで、現在行われている PGD に対する再検討が必要であると筆者は考えている。そこで、われわれの開発した ST 法がミトコンドリア病の伝搬防止法として挙げられる。いかに胚発育の過程でミトコンドリアの不均等配分が生じていても ST 法で患者卵子から持ち込まれると考えられる1%以下の変異ミトコンドリアが、通常疾患発症に必要とされる60%以上のヘテロプラスミーに帰着することは物理的に考えにくく、事実、再構築した卵子、胚、胚性幹細胞、および出生したアカゲザルにおいてもキャリアオーバーは1%以下であった。ST法で生まれた産仔の追跡調査では、兄の健康に問題はなく、加齢に伴うヘテロプラスミーの変化も認めていない。ヒト卵子における実現可能性も示された今 [1], ST法がより確実な変異体の排除に有用であると推察する。

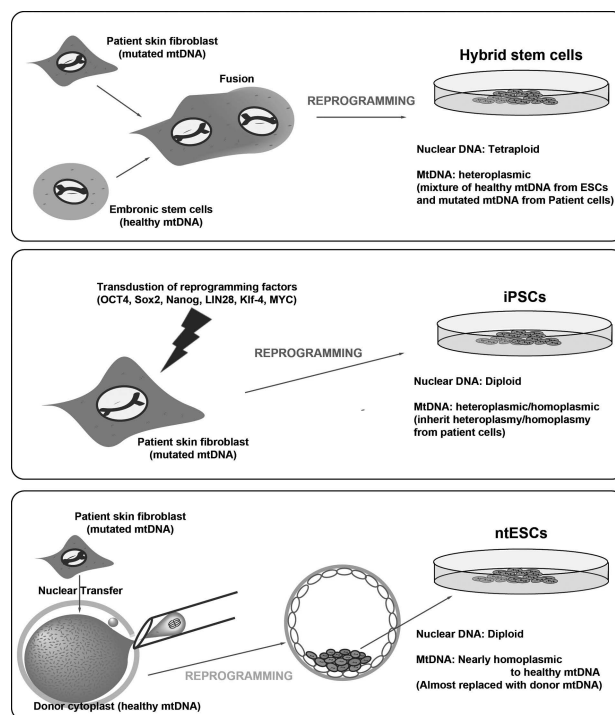


図4 組織適合性胚性幹細胞樹立法と遺伝子継承
上から細胞融合法、Direct reprogramming 法および、核移植法を示す。変異ミトコンドリアを排除した組織適合性胚性幹細胞の樹立は、現在のところ核移植法が最も有力な方法である。

ミトコンドリア病の体細胞遺伝子治療と核移植

前述の ST 法は兄を出生以前に治療する配偶子系列遺伝子治療であり、残念ながら、すでにミトコンドリア病を発症した患者に対するニーズには答えられない。そこで登場するのが組織適合性胚性幹細胞の臨床応用である。ミトコンドリア病の予後不良は周知の事実と思われるが、特に心合併症の併発はミトコンドリア病の予後に大きな影響を与える。ある報告によれば、心合併症を伴うミトコンドリア病患者の16歳時の生存率は18%と非常に低率である [11]。しかるに、変異ミトコンドリアを排除した組織適合性胚性幹細胞を樹立し、心筋細胞への分化誘導、治療応用が可能であれば、患者の予後改善に寄与するのではないかと考えられる。図4に現在可能な組織適合性胚性幹細胞の樹立方法を示した。細胞融合による方法はミトコンドリアの問題以前に、核遺伝子の倍数性の異常が生じるために臨床応用は考慮されない。また、Direct reprogramming による induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) は体細胞のミトコンドリアをそのまま受け継ぐため、変異体の割合が低い細胞をドナーに選別

する術がないかぎり、変異 mtDNA の排除は不可能である。対して、体細胞核移植ではミトコンドリアはドナー卵子によってほぼ置換されることになり、しかも体細胞からのそれとは異なり、加齢や酸化ストレスにより影響を受けたミトコンドリアではなく、卵子由来の Pristine なミトコンドリアである。つまり、体細胞核移植が今のところこのニーズに答える唯一の方法と考えられる。われわれはすでに霊長類モデルにて体細胞核移植から組織適合性胚性幹細胞の樹立に成功している [12]。われわれは以後も検討を続けているが、その分子生物学的類似性からヒト卵子を用いた核移植においてもわれわれの技術が応用可能なのではないかと考えている。

おわりに

昨今、遺伝子治療という言葉を目にする機会が増えてきている。実に1,900を超える臨床試験が、世界中でさまざまな疾患に対して、さまざまな治療法で行われている。上記の体細胞遺伝子治療に関しては、未だ核移植を用いたヒト組織適合性幹細胞が樹立されていないので、技術確立が目下の課題である。これに対し、ST技術は確立されているものの、配偶子系列遺伝子治療自体、未だに認可されたものは存在しない。さらなるエビデンスの蓄積が必要ではあるが、われわれの技術が患者家族に提供されるよう早期のクリニカルトライアルの開始が望まれる。

引用文献

1. Tachibana M, et al (2013) Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* 493, 627-631.
2. Tachibana M, et al (2009) Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 461, 367-372.
3. Callaway E (2012) UK sets sights on gene therapy in eggs. *Nature* 481, 419.
4. Gropman AL (2001) Diagnosis and treatment of childhood mitochondrial diseases. *Curr Neurol Neurosci Report* 1, 185-194.
5. Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA (1996) Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 14, 146-151.
6. Poulton J & Bredenoord AL (2010) 174th ENMC international workshop: Applying pre-implantation genetic diagnosis to mtDNA diseases: implications of scientific advances 19-21 March 2010, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular disorders*. *NMD* 20, 559-563.
7. Steffann J, et al (2006) Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J Med Genet* 43, 244-247.
8. Dean NL, et al (2003) Prospect of preimplantation genetic diagnosis for heritable mitochondrial DNA diseases. *Mol Human Reprod* 9, 631-638.
9. Lee H-S, et al (2012) Rapid Mitochondrial DNA Segregation in Primate Preimplantation Embryos Precedes Somatic and Germline Bottleneck. *Cell Reports* 1, 10.
10. Wang Z & Jaenisch R (2004) At most three ES cells contribute to the somatic lineages of chimeric mice and of mice produced by ES-tetraploid complementation. *Devel Biol* 275, 192-201.
11. Scaglia F, et al (2004) Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics* 114, 925-931.
12. Byrne JA, et al (2007) Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497-502.