

ミトコンドリア置換研究について

文部科学省 科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会

第112回 特定胚等研究専門委員会

2019.9.12

山田 満穂

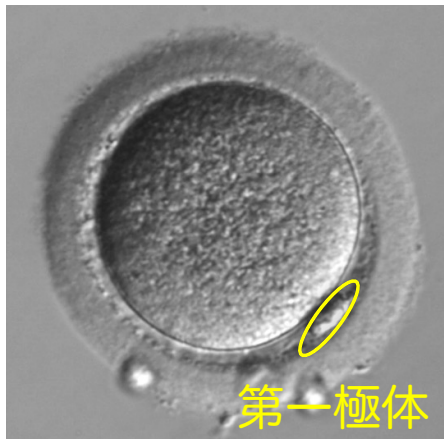
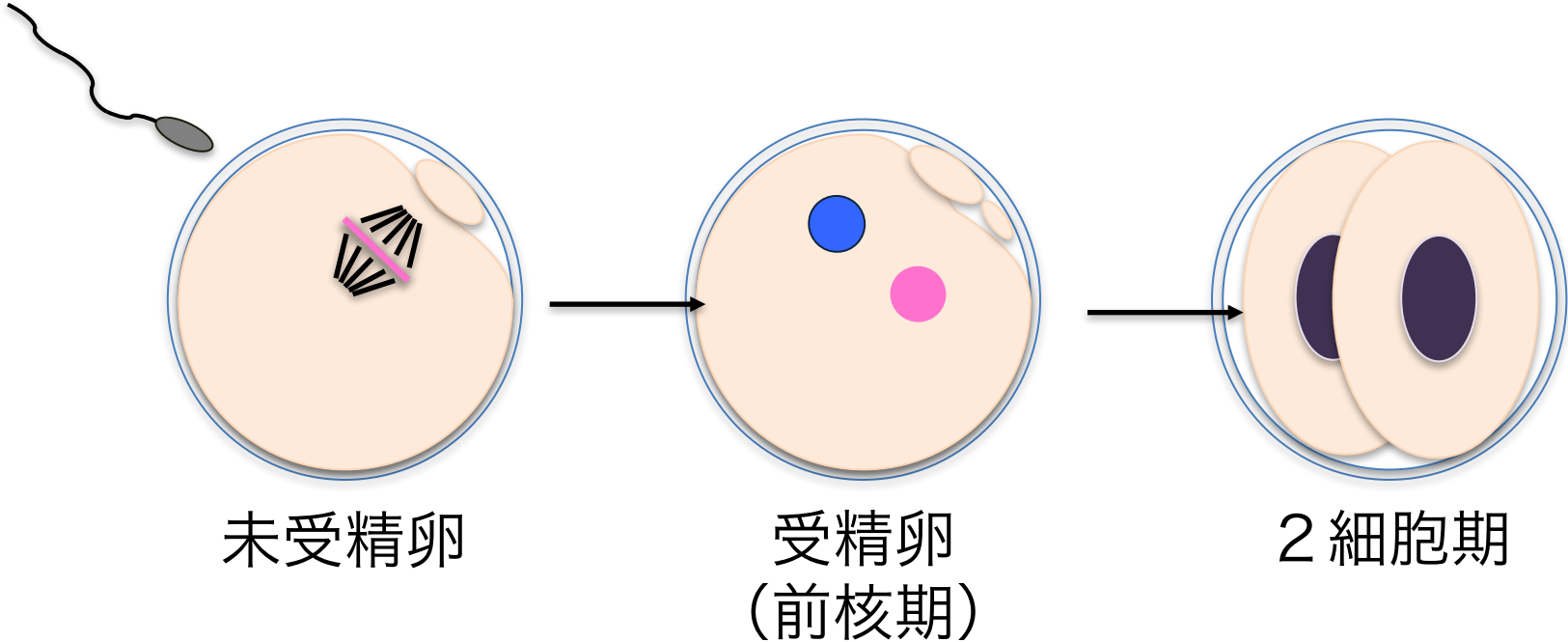
慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

Agenda

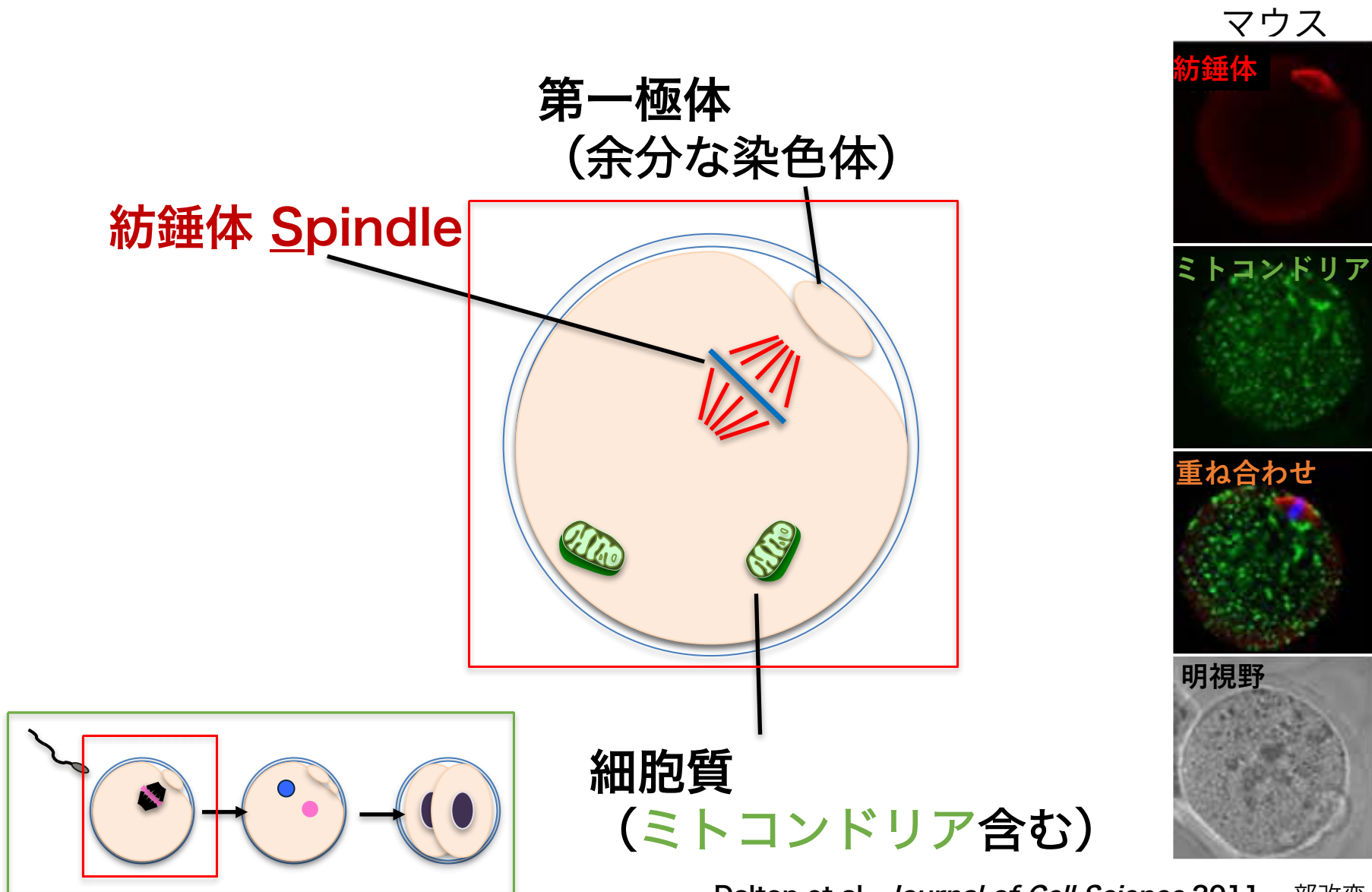
1. 卵子・受精卵の構造とミトコンドリア
2. ミトコンドリア病
3. ミトコンドリア病を防ぐための手段・課題
4. 特定胚指針の見直しに関する検討事項

正常な胚発生について

～未受精卵および、受精後の受精卵（胚）発生～



受精直前の未受精卵は第二減数分裂で停止



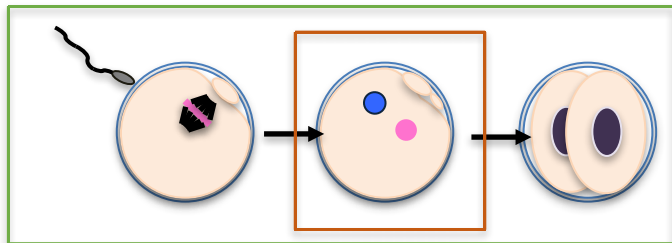
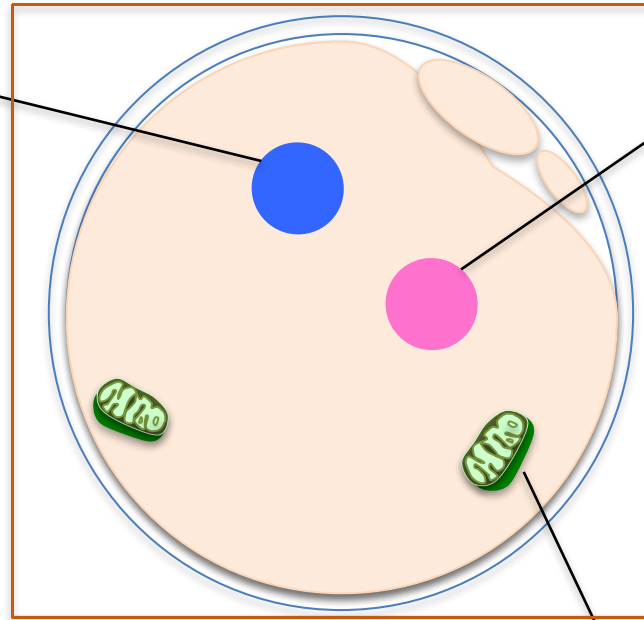
受精後, 受精卵は両親由来の染色体の入った
ふたつの前核 (Pronucleus) を有する

雄性前核

(父親由来染色体)

雌性前核

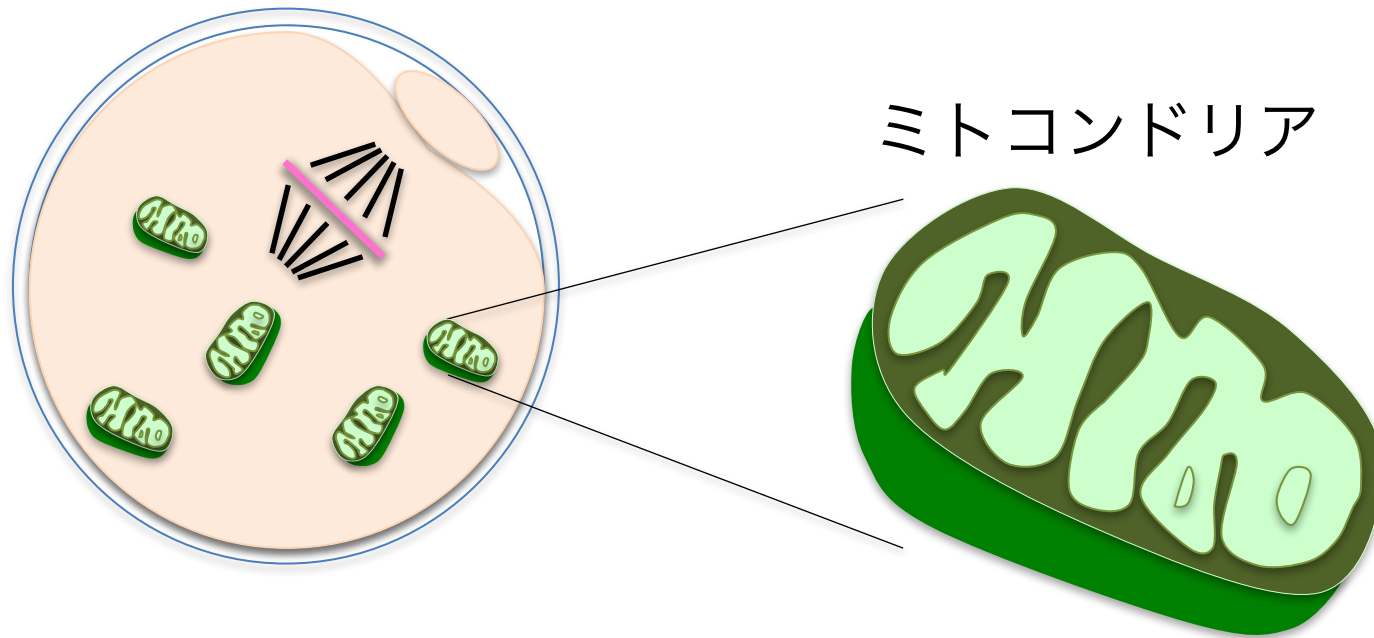
(母親由来染色体)



細胞質

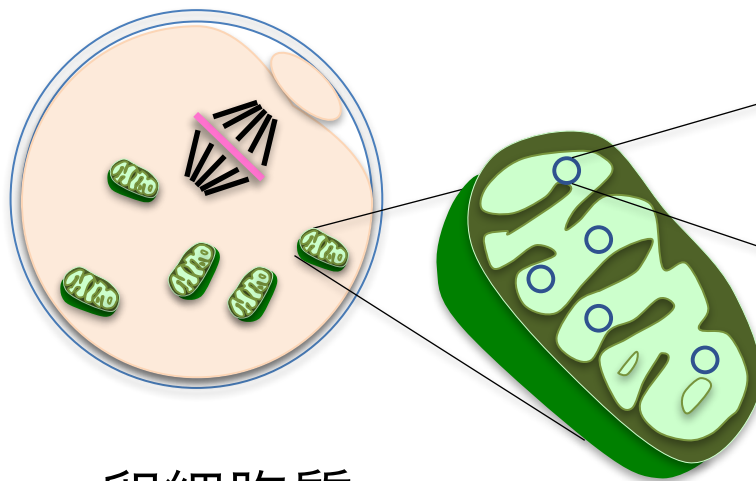
(ミトコンドリア含む)

未受精卵・受精卵の細胞質には ミトコンドリアが含まれる

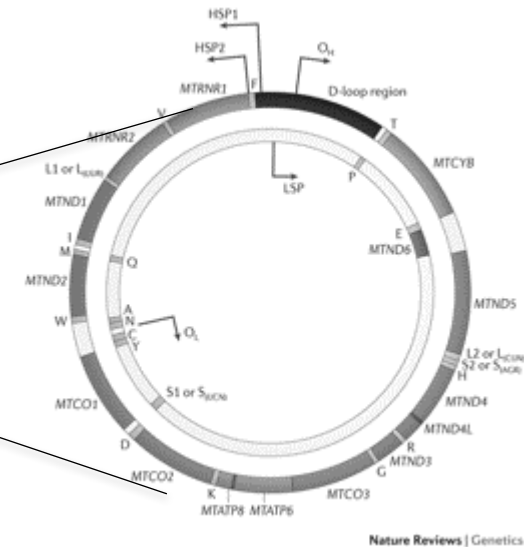


- エネルギーを生産する細胞内小器官
- 母親から遺伝する（母系遺伝）
- 核とは独立したDNA（mtDNA）を有する

卵子は10万個以上の ミトコンドリアDNA (mtDNA) を有する (体細胞の100倍の量)



卵細胞質



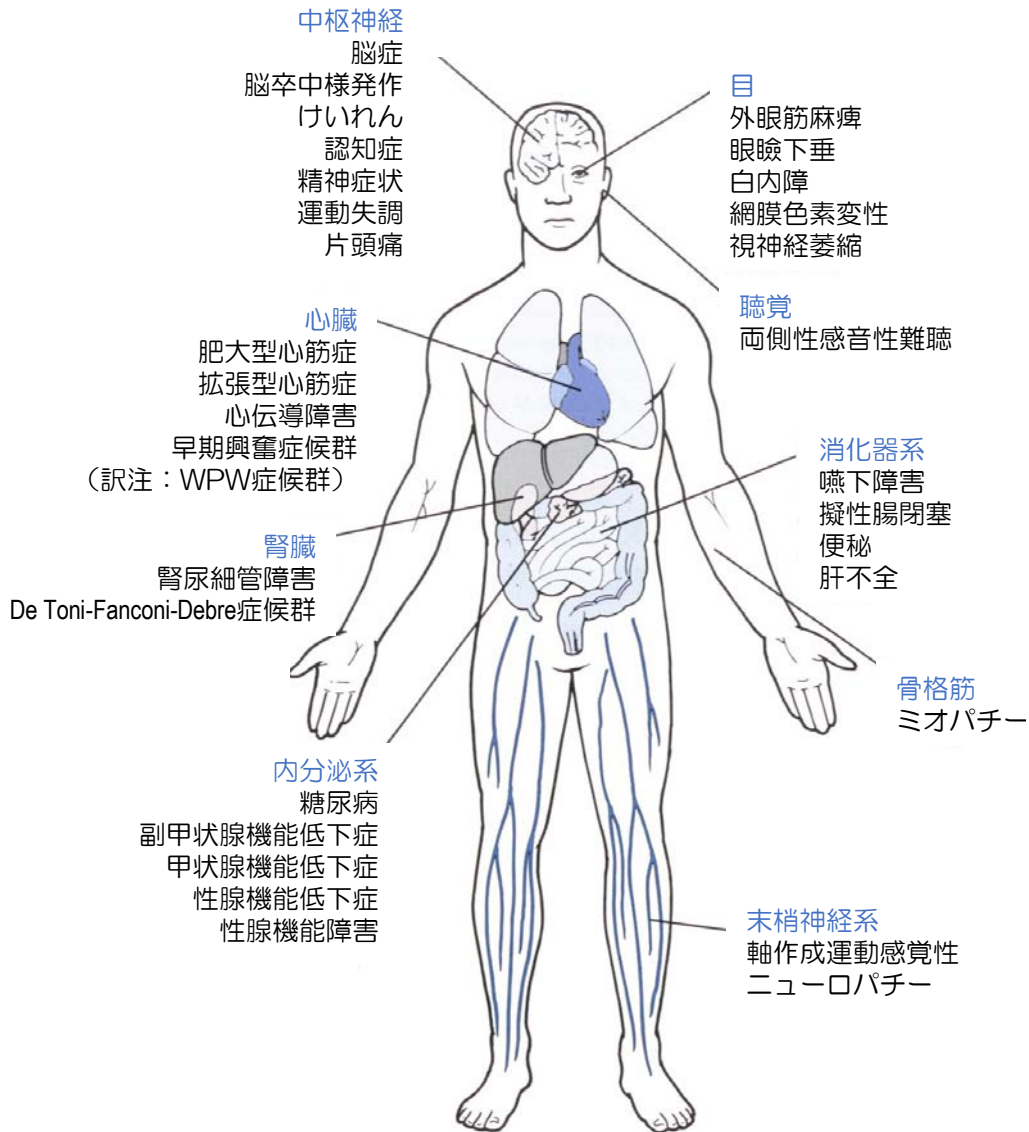
mtDNA
(1 個と数える)

さらに各ミトコンドリアは5-10個の
ミトコンドリアDNA (mtDNA) を有する

Agenda

1. 卵子・受精卵の構造とミトコンドリア
2. ミトコンドリア病
3. ミトコンドリア病を防ぐための手段・課題
4. 特定胚指針の見直しに関する検討事項

ミトコンドリア病は多彩な症状を呈する



- ミトコンドリアの働きが低下することが原因でおこる病気の総称
- 代謝疾患, 神経疾患, 流産, 死産など様々な症状を呈する
- 200種類程度の核DNA又はミトコンドリアDNA遺伝子の変化がミトコンドリア病に関係する。
- 症状の程度は、各組織における変異ミトコンドリアの量に依存
- 対症療法で対応するのが実情
 - 根本的な治療は存在しない

ミトコンドリア病の頻度



正常ミトコンドリア



変異ミトコンドリア

- 出生する児のうち1:250が変異ミトコンドリアを有する
- 世界中の1:4,000, 米国では1:20,000の割合でミトコンドリア病を有する
- 1:10,000が臨床症状を有するといわれる

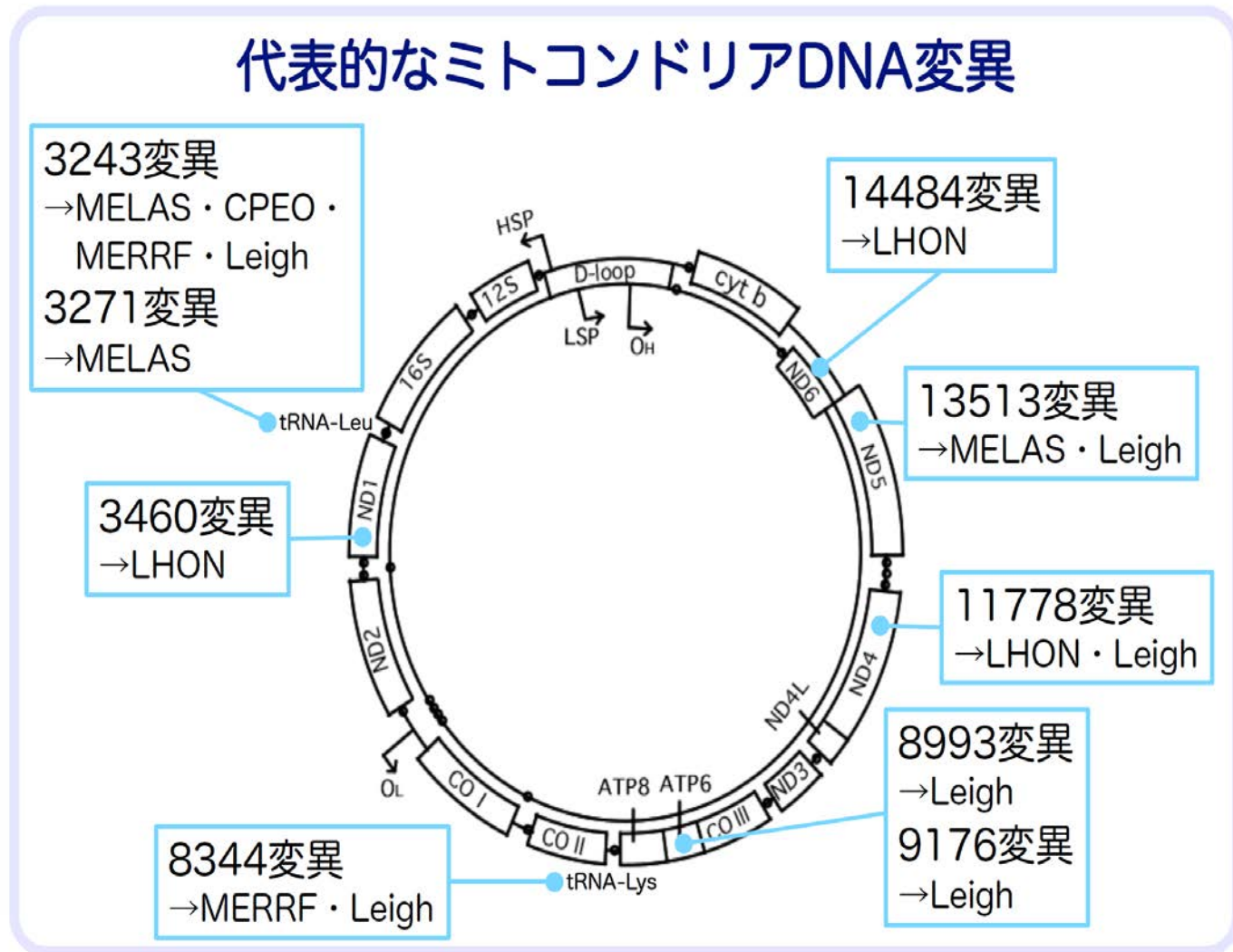
(難病情報センターより抜粋)

この病気の患者さんはどのくらいいるのですか？

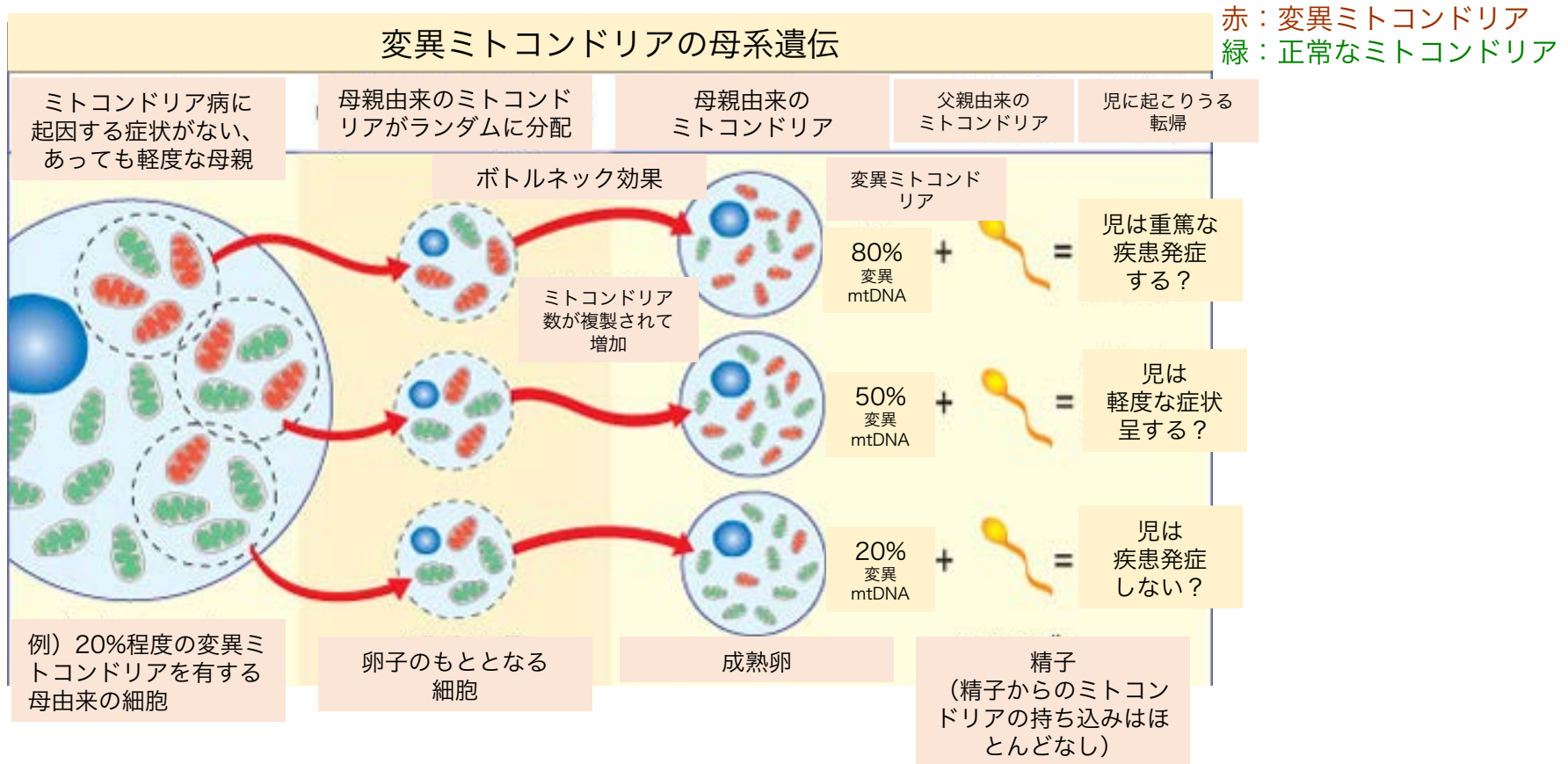
イギリスやフィンランドの統計では、10万人に9～16人という報告があります。しかしミトコンドリア病は症状が多彩で、軽い症状の方もたくさんいると予想され、すべての患者さんがきちんと診断されている状況ではありません。これらの数字よりもっと多い可能性があり、全体像がまだ見えていないと言ってもいいかもしれません。

ミトコンドリアDNAには変異が生じやすい (変異ミトコンドリア)

代表的なミトコンドリアDNA変異



ミトコンドリア病の特徴的な遺伝形式

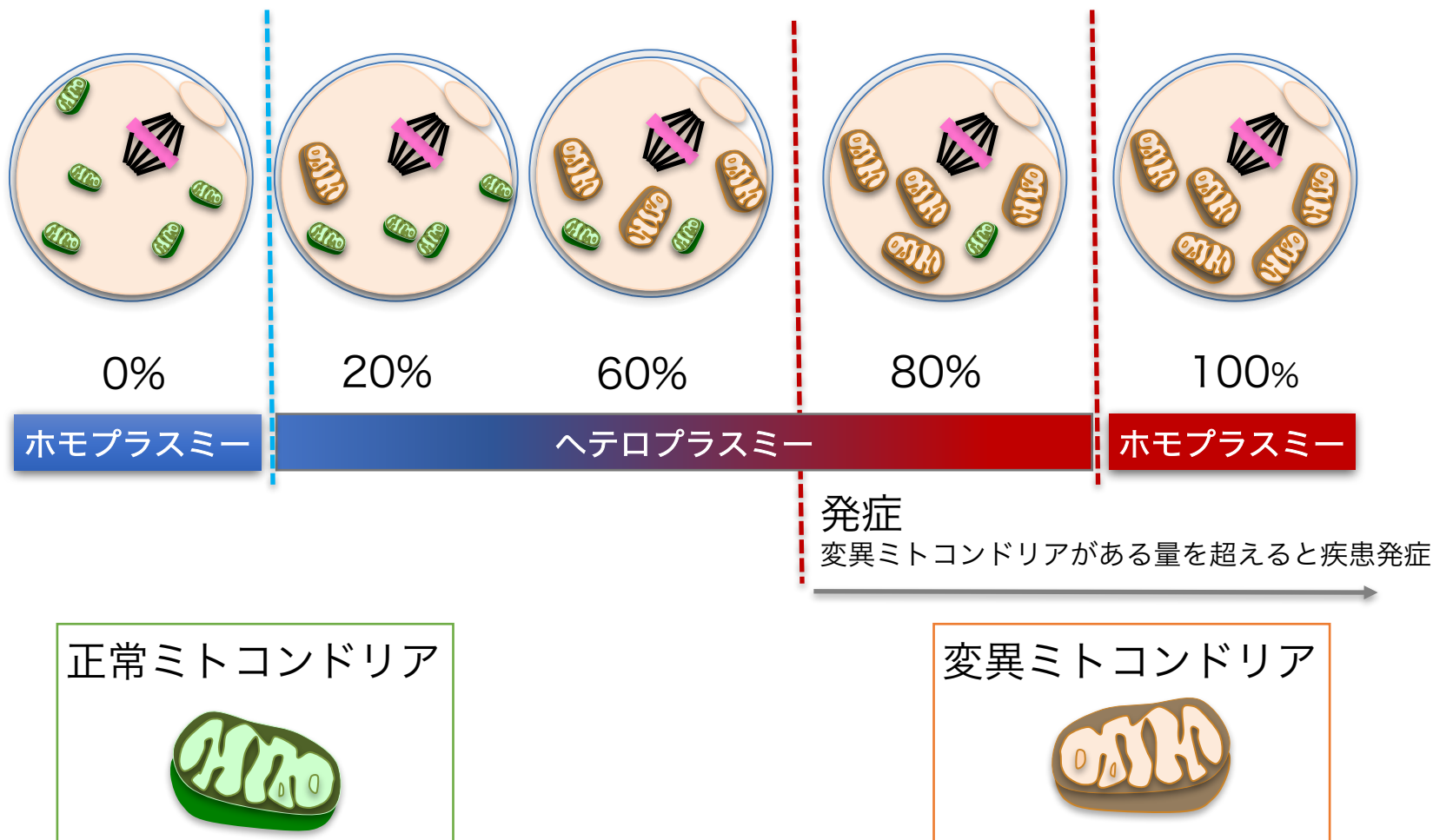


1. 母系遺伝
2. 複製分離（複製された変異mtDNAは細胞分裂の際にランダムに分配される）

ヘテロプラスミーとホモプラスミー

多くのミトコンドリア病は閾値発症の特徴を有する

変異比率
(= 変異ミトコンドリア / ミトコンドリア全体)



ヘテロプラスミー：一つの細胞のなかで、正常なミトコンドリアDNAと一緒に存在している状態
ホモプラスミー：細胞の中のミトコンドリアDNAが一種類である時（正常の場合も変異の場合もある）

Agenda

1. 卵子・受精卵の構造とミトコンドリア
2. ミトコンドリア病
3. ミトコンドリア病を防ぐための手段・課題
4. 特定胚指針の見直しに関する検討事項

ミトコンドリア病の次世代への遺伝を 予防するために考えられている核置換による 3つのアプローチ

受精前

1. 卵子間核置換法 (ST法)

Paull, Egli et al., *Nature* 2012

受精前

2. 第一極体核置換法 (PB1T法)

Yamada, Egli et al., *Cell Stem Cell* 2016

Ma et al., *Cell Stem Cell* 2017

受精後

3. 第二極体核置換法 (PB2T法)

Wang et al., *Cell* 2014

受精後

4. 前核期核置換法 (PNT法)

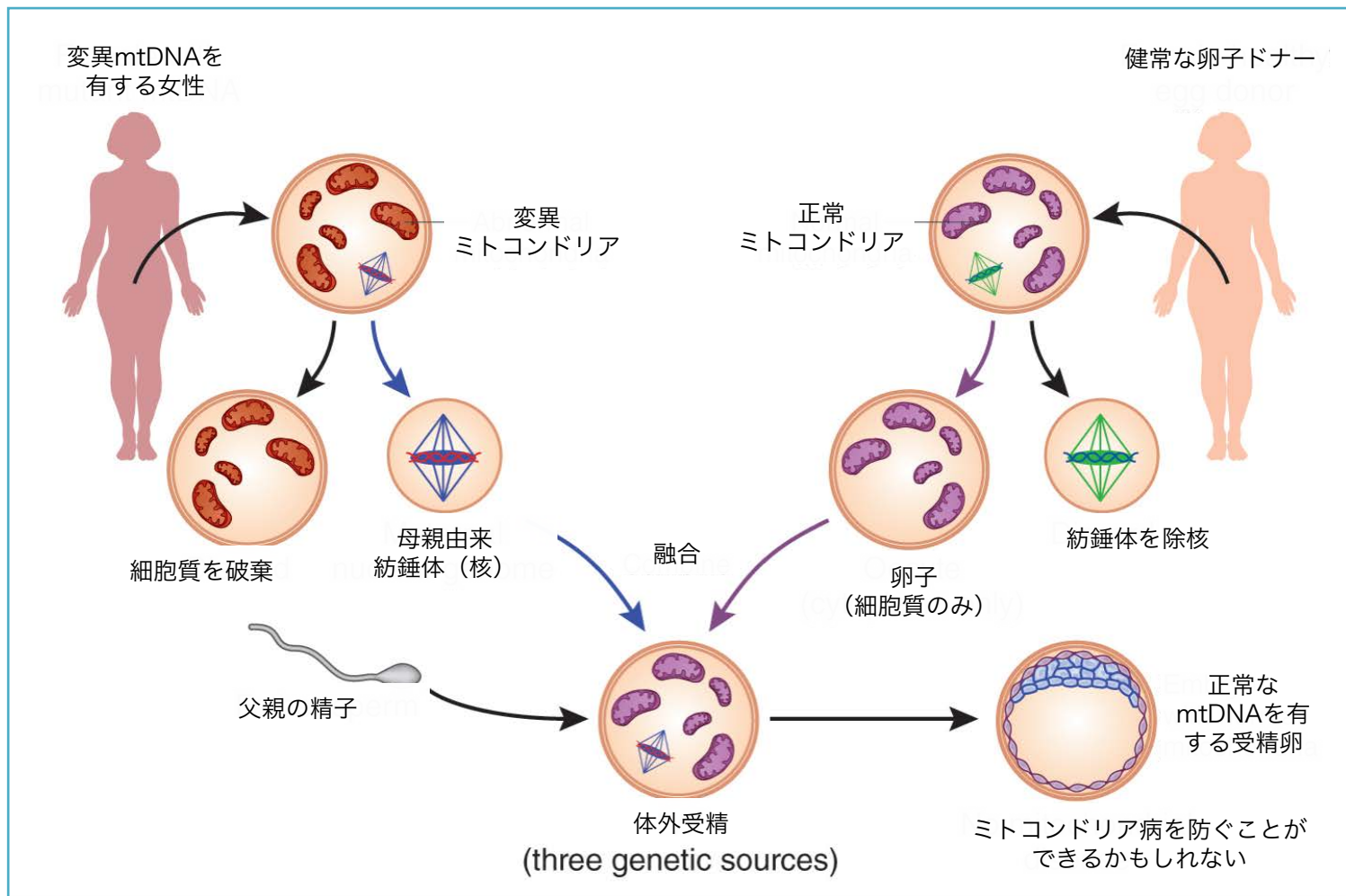
Craven, Herbert et al., *Nature* 2010

Hyslop, Herbert et al., *Nature* 2016

受精前

卵子間核置換法 (Spindle transfer: ST)

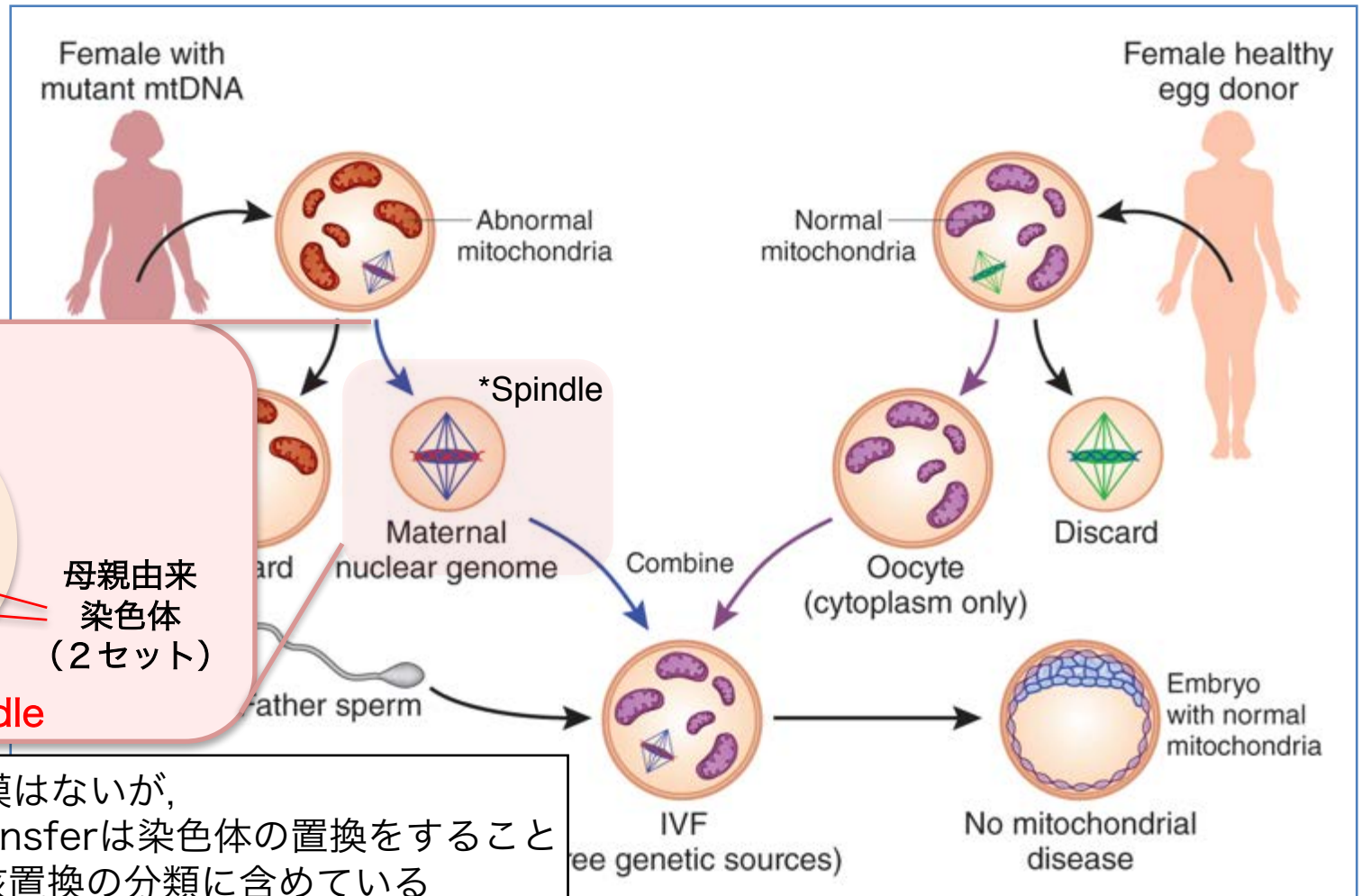
卵子間で核置換を行うことでミトコンドリアを置換する



受精前

卵子間核置換法 (Spindle transfer: ST)

卵子間で核置換を行うことでミトコンドリアを置換する

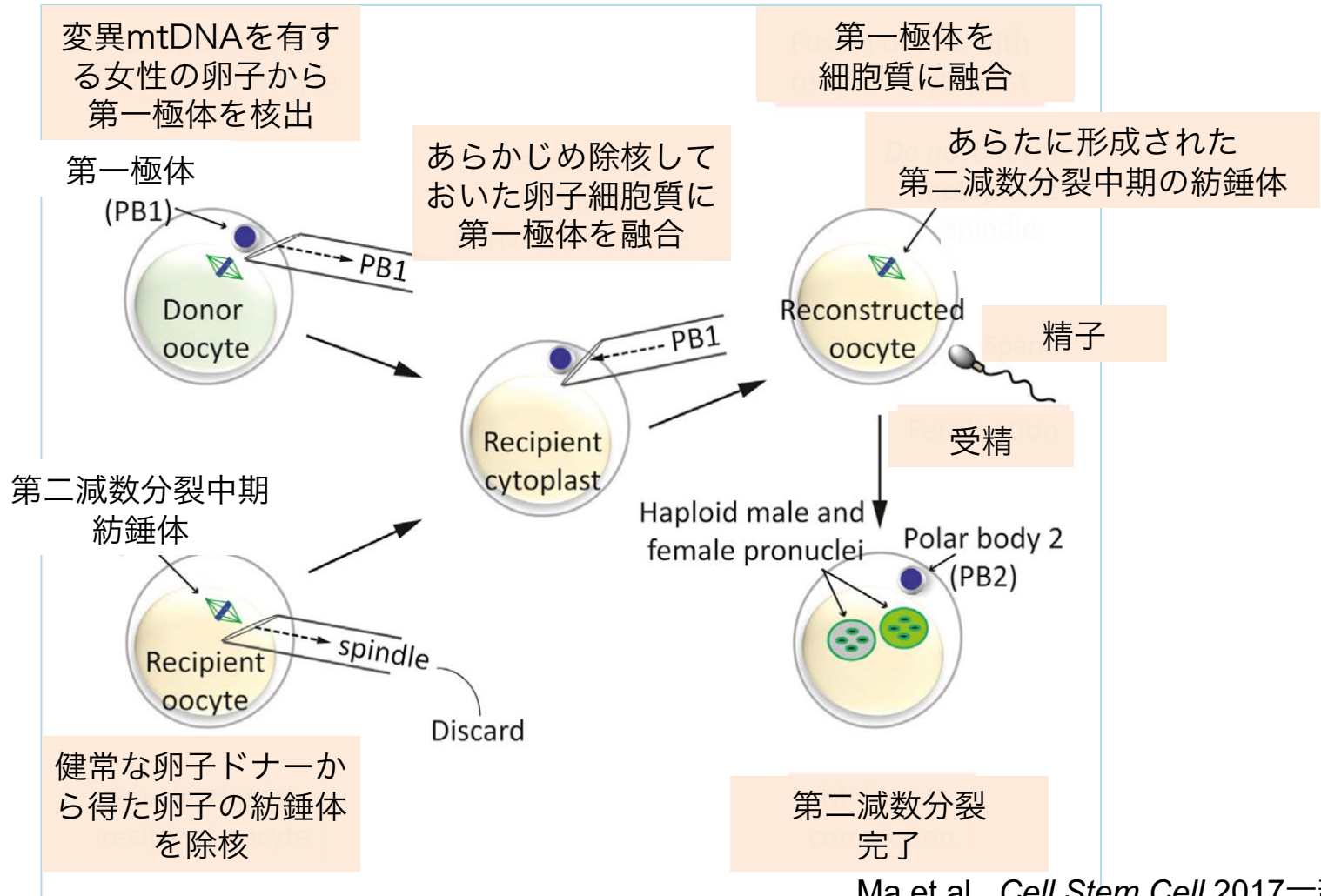


* 紡錘体に核膜はないが、
Spindle transferは染色体の置換をすること
から、便宜上核置換の分類に含めている

受精前

第一極体核置換法 (1st Polar body nuclear transfer: PB1T)

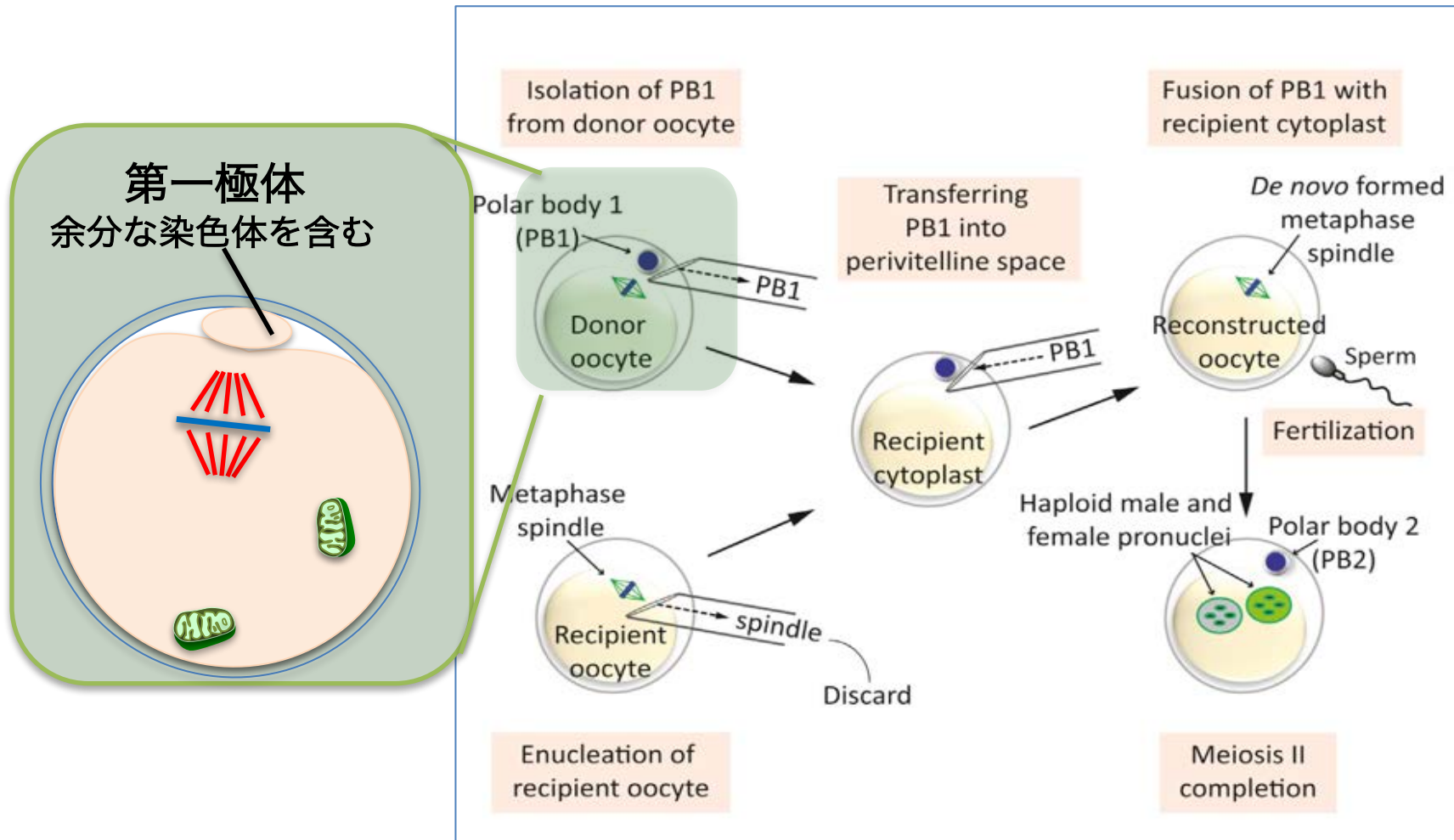
卵子間で核置換を行うことで
ミトコンドリアの置換をすることができる



受精前

第一極体核置換法 (1st Polar body nuclear transfer: PB1T)

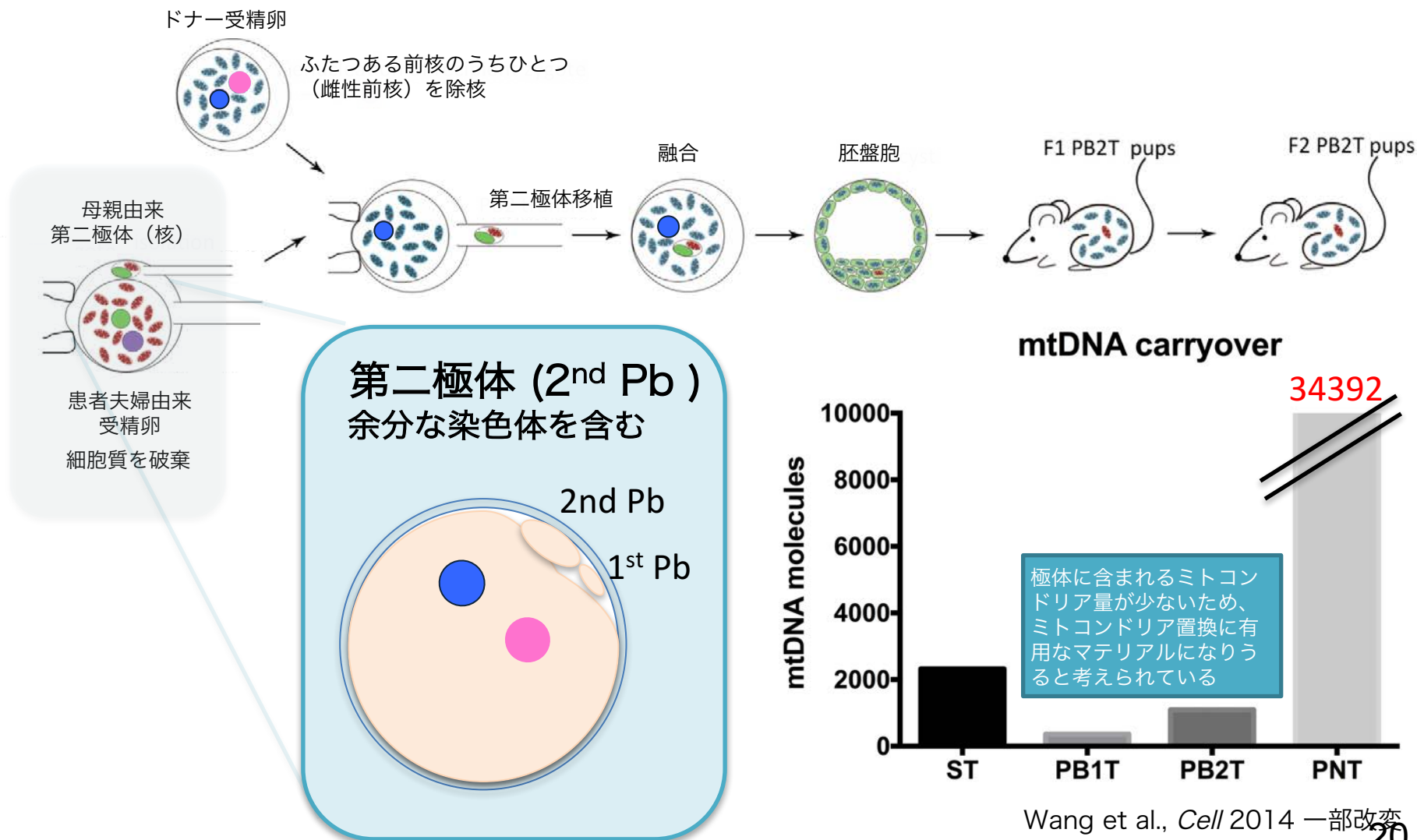
卵子間で極体核置換を行うことでミトコンドリアを置換する



受精後

第二極体核置換法 (2nd Polar body nuclear transfer: PB2T)

前核期の受精卵間で極体核置換を行うことでミトコンドリアを置換する

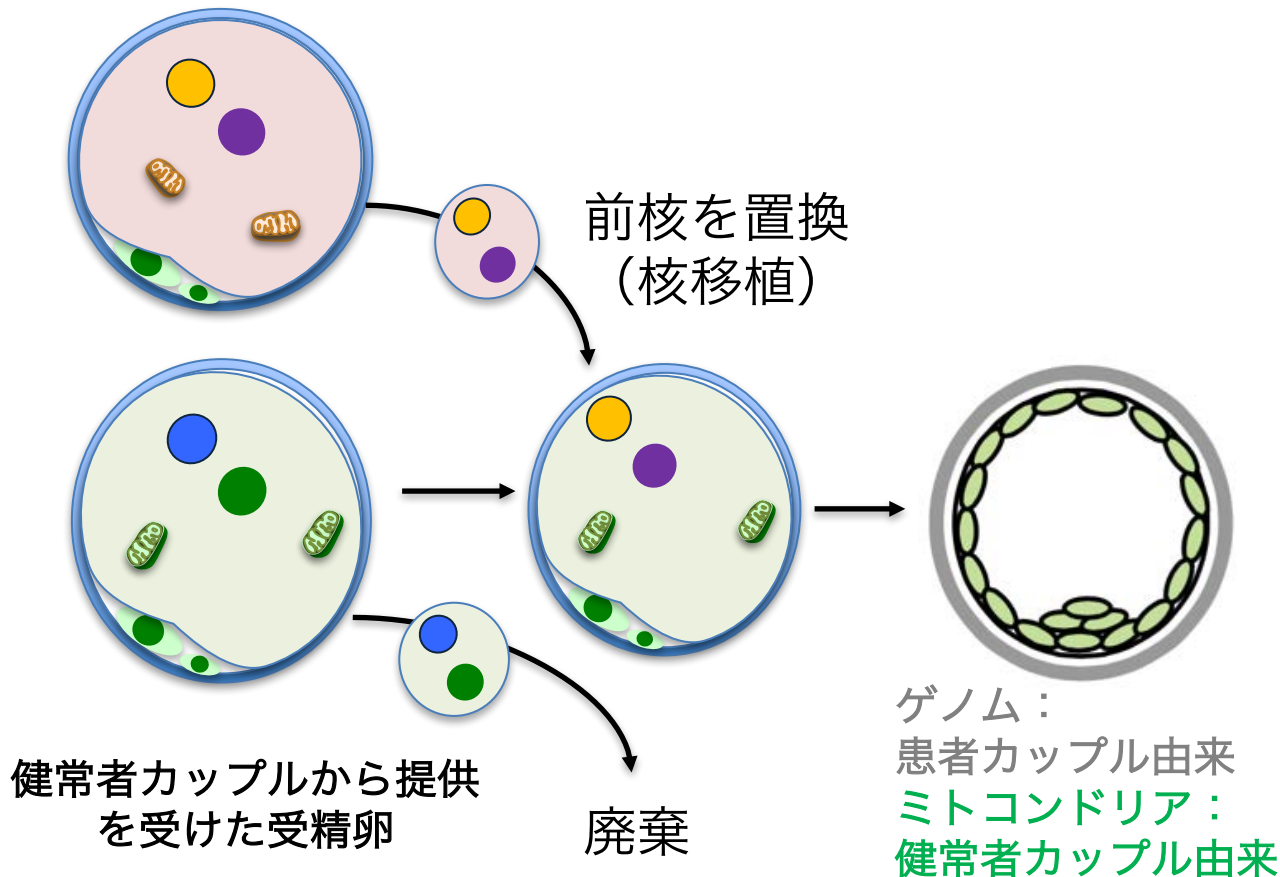


受精後

前核期核置換法 (Pronuclear transfer: PNT)

前核期の受精卵の間で核置換（核移植）を行うことで
ミトコンドリアを置換する

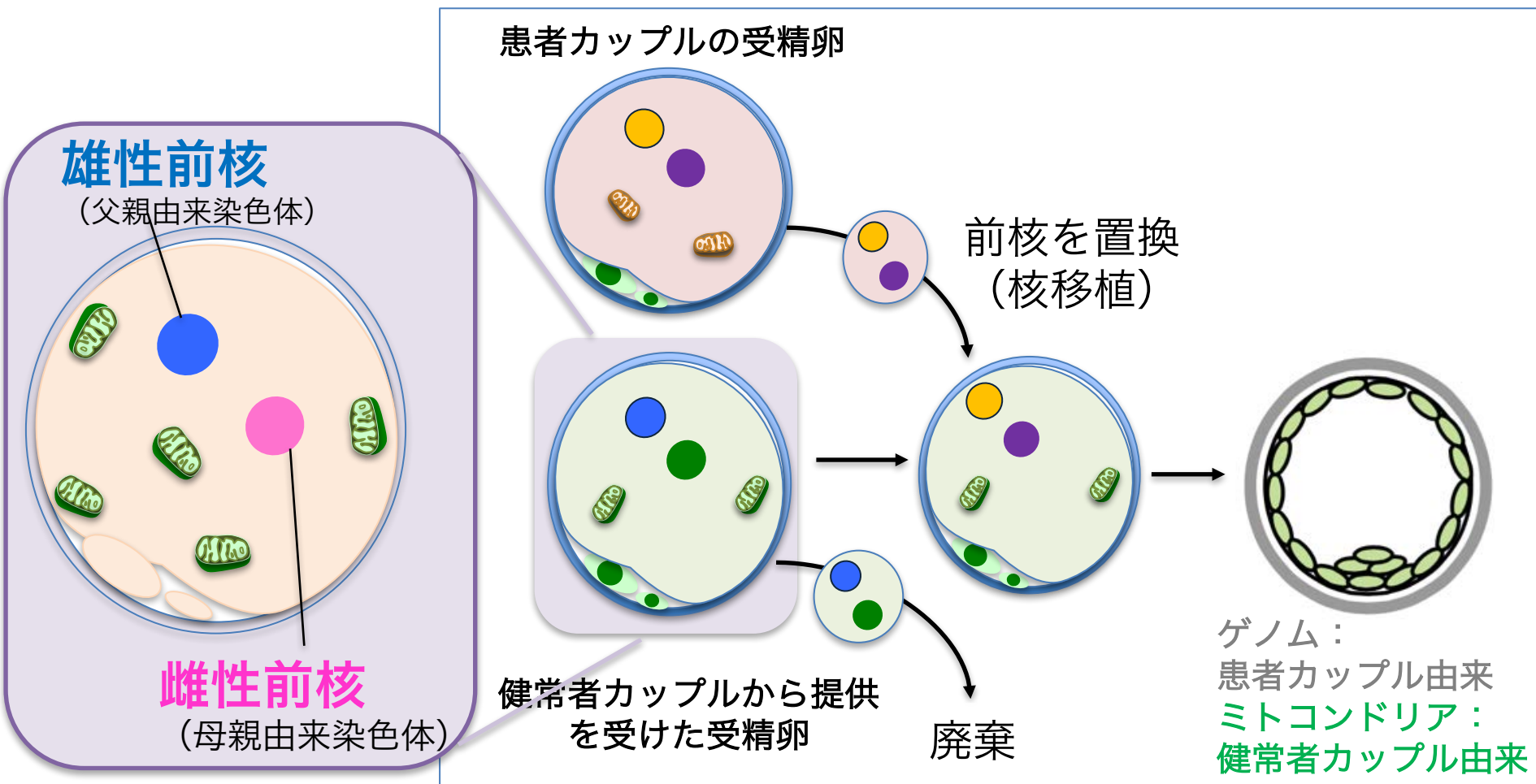
患者カップルの受精卵



受精後

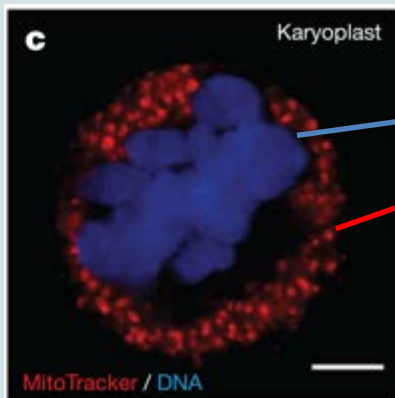
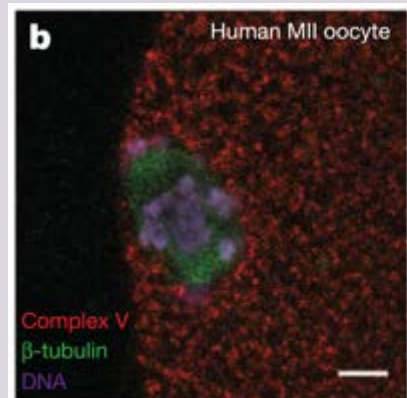
前核期核置換法 (Pronuclear transfer: PNT)

前核期の受精卵の間に核置換（核移植）を行うことで
ミトコンドリアを置換する



核置換の課題：① ミトコンドリアの持ち込み

ヒト卵子の
免疫染色

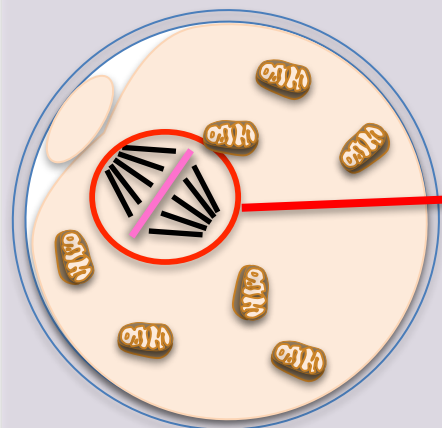


青： DNA（染色体）

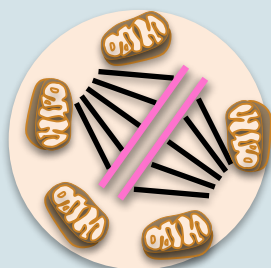
赤： ミトコンドリア

Paull, Egli et al., *Nature* 2012

上図の模式図



未受精卵
(患者卵子)



取り出した核
(紡錘体)

患者由来未受精卵（卵子）から核（紡錘体）を取り出す際、**少数ミトコンドリアの持ち込み**（mtDNAキャリーオーバー）がある

→少量の持ち込み変異mtDNAが増加する懸念
(増加する機序は不明)

卵子間核置換（ST）、極体核置換（PBNT）、 前核期核置換（PNT）の共通点と違い

核置換技術	ホスト* （核）	ドナー* （細胞質）	mtDNA の 持ち込み （%）	臨床への 有用性
卵子間核置換(ST)	患者由来 <u>卵子</u>	健常な女性 由来の <u>卵子</u>	< 0.5	次世代へ のミトコ ンドリア 病の遺伝 を防ぐ
第一極体核置換 (PB1T)	患者由来 <u>卵子</u> (<u>受精卵</u>)	健常な女性 由来の <u>卵子</u> (<u>受精卵</u>)	< 0.5	
第二極体核置換 (PB2T)	患者夫婦由 来の <u>受精卵</u>	健常な夫婦 由来の <u>受精</u> <u>卵</u>	< 2? (マウス)	
前核期核置換(PNT)	患者夫婦由 来の <u>受精卵</u>	健常な夫婦 由来の <u>受精</u> <u>卵</u>	2	

*患者視点で考えたとき：核がホスト、細胞質がドナー

Agenda

1. 卵子・受精卵の構造とミトコンドリア
2. ミトコンドリア病
3. ミトコンドリア病を防ぐための手段・課題
4. 特定胚指針の見直しに関する検討事項：

卵子・受精卵を用いたMRTの課題

これを解決するうえで参考となりうる基礎研究の紹介

課題(1) 作成できる胚の種類

課題(2) 作成したヒト胚核移植胚の取扱期間

課題(3) 作成者の要件（実績等）

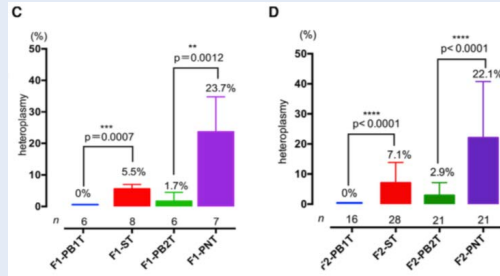
課題(4) 禁止事項

課題(5) 研究目的

特定胚指針の見直しに関する検討事項 課題(1) 作成できる胚の種類

移植する核の由来となる胚の発生段階はどこまで研究意義を有するか？

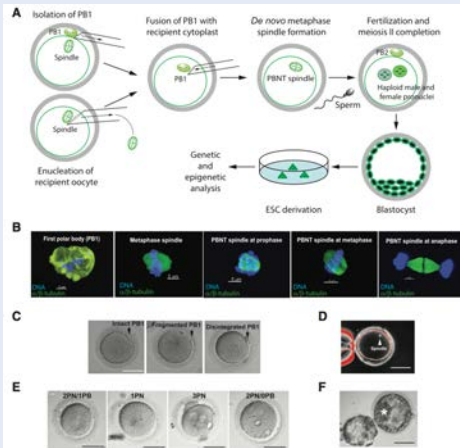
ヒト胚核移植胚の定義のうち、「一の細胞であるヒト受精胚であって核を有するものがヒト除核卵（卵子・受精卵）と融合することにより生ずる胚」であることから、作成できる胚の種類の範囲について検討することが考えられる



Host: マウス極体DNA
Donor: マウス卵子細胞質

核移植胚から産出された個体のmtDNAヘテロプラスミー比率はPBNTが最も少なかった

Wang et al., *Cell* 2014

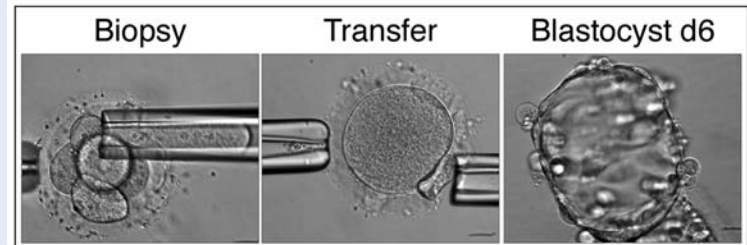


Host: ヒト極体DNA
Donor: ヒト卵子細胞質

ヒトPBNT核移植胚からES細胞の樹立に成功

Ma et al., *Cell Stem Cell* 2017

移植される核の由来となる胚の発生段階により核置換後の発生能が左右されるか？



Supplementary Figure 3 | Transfer of blastomere nuclei and development to the blastocyst stage. Transfer of blastomere nuclei was done by aspirating blastomeres

核置換を用いた検証実験

Host: ヒト8細胞期の割球DNA
Donor: ヒト卵子細胞質

Noggle, Egli et al., *Nature* 2011

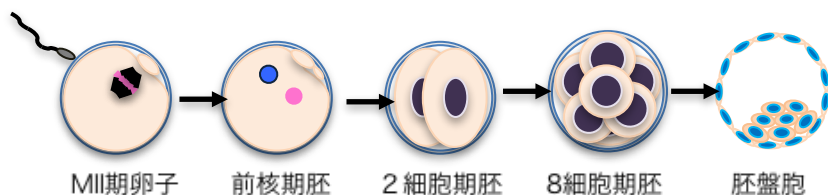
細胞核側Hostに関する提案：

1. 第一極体・第二極体を未受精卵や受精胚に核移植
2. 1-32細胞期の胚性細胞を未受精卵や受精胚に核移植

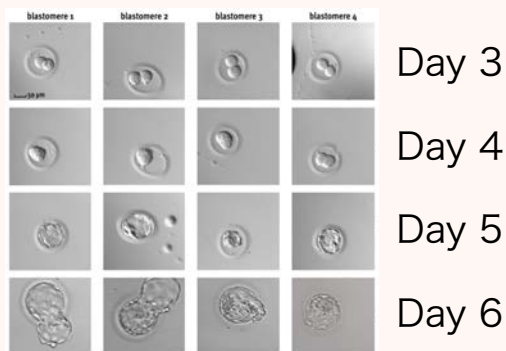
特定胚指針の見直しに関する検討事項

課題(1) 作成できる胚の種類

核の移植先の細胞質は何細胞期の胚まで有用か？（核置換後の発生能は？）

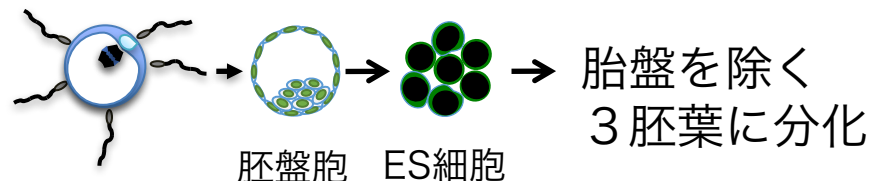


ヒト受精卵の割球ひとつで、
胚盤胞まで発生することができる？

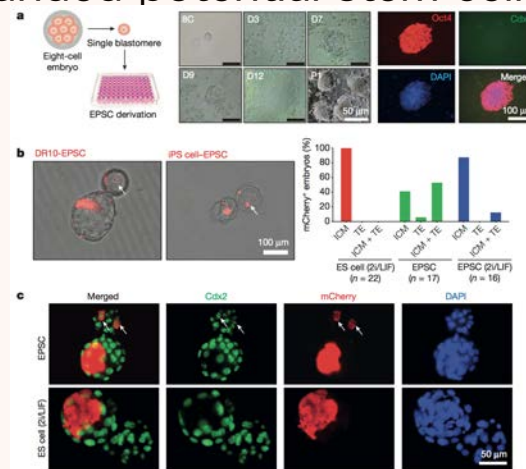


ヒト 4 細胞期胚を分割した割球は
それぞれすべて胚盤胞に発生した

Van de Verde et al., *Hum Reprod* 2008



8 細胞期胚から全能性を有する幹細胞
(Expanded potential stem cells) の樹立



マウス 8 細胞期胚から樹立した幹細胞は、内部細胞塊のみならず、栄養外胚葉にも分化した Yang et al., *Nature* 2017

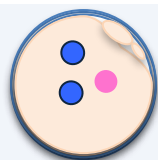
核移植の細胞質提供元となる胚に関する提案：
未受精卵から 8 細胞期までを細胞質ドナーとして想定可能？

課題(8) 受精胚の入手、インフォームド・コンセント

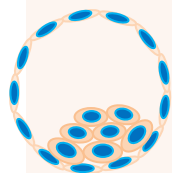
受精胚核置換における核の”ホスト”、細胞質の”ドナー”の双方に関して、余剰胚の提供について想定されるケースについて検討することが考えられる。

実現可能性を考慮した提供されうるドナー胚（細胞質側）の想定リスト

比較的容易



1. 3前核胚（をはじめとした異常受精胚）

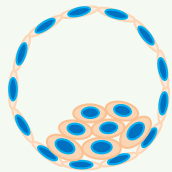
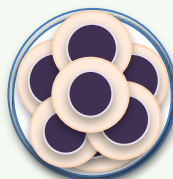


2. 凍結胚：胚盤胞

3. 凍結胚：8細胞期胚

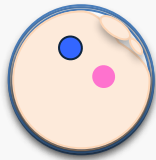
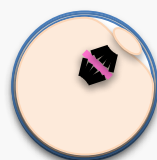
4. 凍結胚：2-4細胞期胚

余剰胚



5. 着床前診断の結果、廃棄される胚

困難



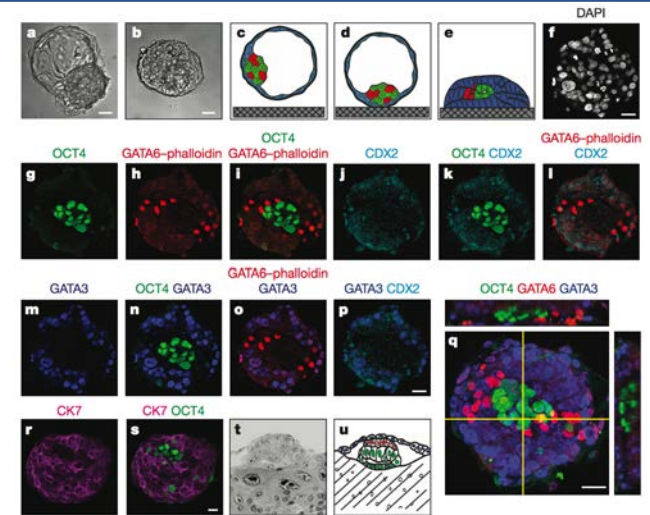
未受精卵、前核期胚（1細胞期）の提供を受けることは現実的に難しいかもしれない

課題(2)作成したヒト胚核移植胚の取扱期間

ヒト胚核移植胚は母胎内に移植すれば人になる可能性を有するため、「人の生命の萌芽」としてヒト受精卵と同様に位置付けられる。そのため、取り扱い期間は原始線条が出現するまで（又はヒト胚核移植胚の作成後14日まで）とすることが考えられる。

培養における技術的壁と技術の革新

- これまで *in vitro*（シャーレ上）でヒト胚を発生7日目（ヒト胚が通常子宮内に着床する時期）までの培養維持は困難だった
- Zernicka-Goetzたちが開発したマウス胚の培養法により、最長で発生10～13日目に起こる現象について報告
- 14日までの培養で胚盤胞の形成から着床後期にかけて、細胞分化や組織構築に関する知見が得られる可能性



Brivanlou et al., *Nature* 2016

Zernicka-Goetz et al., *Nat Cell Biol* 2016

提案1. 取り扱い期間は原始線条が出現するまで（又はヒト胚核移植胚の作成後14日まで）

提案2. ES細胞を樹立し、有効性・安全性に関する検証実験の許容（海外研究においてはスタンダード）

提案3. 臨床利用は提案 1,2で十分なエビデンスが得られた段階で改めて検討（課題(4)へ）

課題(3)作成者の要件

- ・研究責任者は産婦人科医や難病疾患研究者で十分な実績を有する者が想定される。
- ・海外の核置換研究は動物実験の実績があり、次の段階としてヒト胚を用いた研究を行なっている例が多い。
- ・研究責任者の指導下で実際に実験を行う研究者は、胚培養士であることも想定される。必ずしも動物を用いた核移植実験の経験があるとは限らない。

(参考)

英国で承認された臨床応用の施設認定要件

- ・ 2016 年 Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) が限定された症例に限りミトコンドリア病予防のための核置換を臨床的に行うことを承認
- ・ 2017年3月 Newcastle fertility centerに施設認定を行なった際、以下に挙げる厳しい条件をクリアすることを求めている。

- ① 技術のある胚培養士が行うこと
- ② 適切な遺伝カウンセリングをミトコンドリア病の患者女性と卵子ドナーに対して行うこと
- ③ 生まれてくる子どもを長期的に経過観察すること

Greenfield A et al., *Nat Biotechnol* 2017

提案：動物またはヒト卵子・胚を用いて核移植実験を行った研究経験・実績がある研究者

課題(4)禁止事項

ゲノム編集技術を用いたヒト受精胚の取り扱いと同様に、作成したヒト胚核移植胚の人または動物への胎内移植を禁止事項とすることが考えられる

胚移植を禁止するための根拠

- ミトコンドリア置換後の問題点の抽出はまだ不十分？
- Three parents baby となることで、長期的な予後や家族関係が複雑になることへの懸念？



Congress is preventing people with mitochondrial diseases from having healthy babies

BY DR. ZEY WILLIAMS, OPINION CONTRIBUTOR — 01/25/16 03:30 PM EDT
THE VIEWS EXPRESSED BY CONTRIBUTORS ARE THEIR OWN AND NOT THE VIEW OF THE HILL

27 COMMENTS

Irrational rejection of the life-changing possibilities provided by MRT has led the U.S. Congress to prevent people like Kristelle and Evan from having healthy children. MRT has, in fact, been successfully performed internationally, and we at [Columbia University's Fertility Center](#) have produced embryos using MRT following approved research protocols. However, because of Congress's action, we have been unable to transfer these healthy embryos to the uteruses of hopeful mothers. It is not a technical or scientific hurdle that stands in our way, but rather Congressional action.

<https://thehill.com/opinion/healthcare/398793-congress-is-preventing-people-with-mitochondrial-diseases-from-having>

- ニューヨーク州では、ミトコンドリア置換後のヒト核移植卵子からES細胞を樹立することを以前から許可していた
- 新たにヒト未受精卵を用いたミトコンドリア置換後の受精操作まで許可
- 胚移植はいまだ禁止

提案：当面は禁止（保留）とし、将来的に基礎的研究で十分な科学的な知見が得られたらあらためて検討

課題(5)研究目的

研究目的の規定のあり方

(参考)

第二次報告の記載：「ミトコンドリア病研究を目的」

特定胚指針諮問案の記載：「ヒトのミトコンドリアDNAの障害に由来する疾病
その他の未受精卵の細胞質に由来する疾病の予防に関する研究」

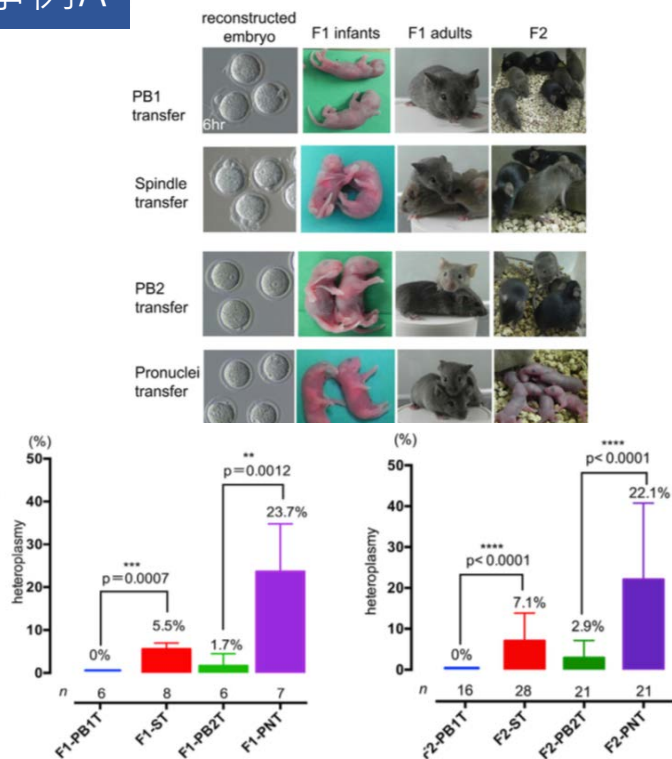
- i. 核置換後の問題点を抽出し、解決に導く研究
- ii. 胚発生におけるミトコンドリアの動態に関する研究
- iii. ミトコンドリア病の疾患発症の原因を明らかにするような研究
- iv. 核置換技術を応用したミトコンドリアに関する研究

特定胚指針の見直しに関する検討事項

課題(5)-i. 核置換後の問題点を抽出し、解決に導く研究

核置換後のミトコンドリアDNAの持ち込みを減らす方法

研究事例A



Wang et al., Cell 2014

マウスF2世代のmtDNAヘテロプラスミー比率

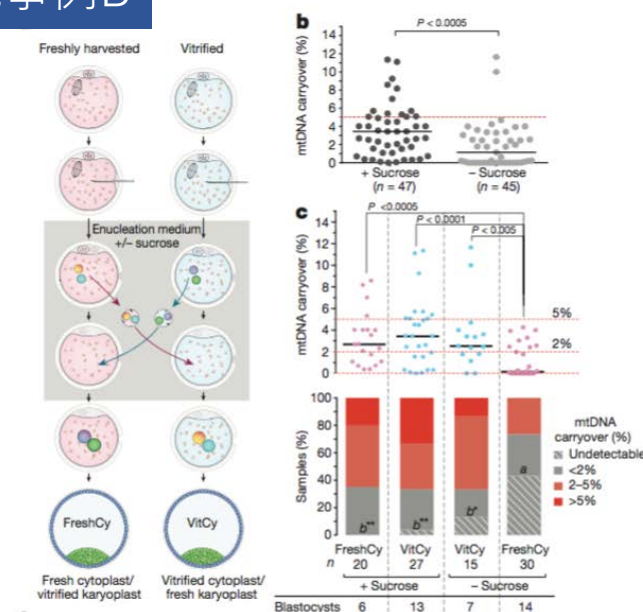
第一極体核置換 (PB1T) 0%

紡錘体核置換 (ST) 7.1%

第二極体核置換 (PB2T) 2.9%

前核期核置換 (PBT) 22.1%

研究事例B



Hyslop, Herbert et al., Nature 2016

- 受精後早い時期の前核期核置換
- 除核作業の際にスクロースを除く
- センダイウイルスを希釈
- 前核の除核作業の際にスクロースを除く
- 患者側卵子をあらかじめ凍結しておく

mtDNAヘテロプラスミー比率

核置換 (PNT) 後に発生した胚盤胞 <2%

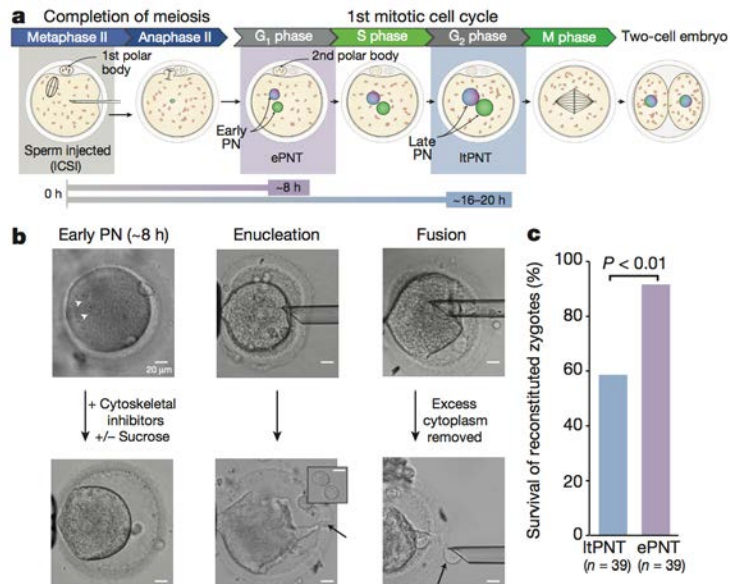
核置換ヒトES細胞 4%

特定胚指針の見直しに関する検討事項

課題(5)-i. 核置換後の問題点を抽出し、解決に導く研究

核移植を行うタイミングと胚発生率に関する研究

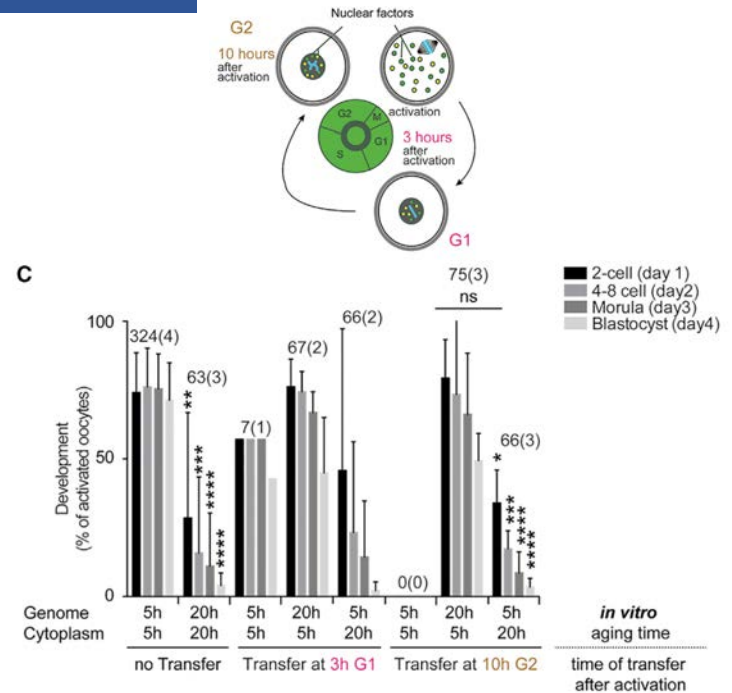
研究事例C



受精後早いタイミングの前核期での核置換後の胚発生率は良好

Hyslop, Herbert et al., *Nature* 2016

研究事例D



マウス排卵後加齢卵子を用いた検討では、発生率はDNA合成のタイミングによらない
Yamada, Egli., *Stem Cell Rep* 2017

ヒト核置換において、DNA合成は発生率を左右する

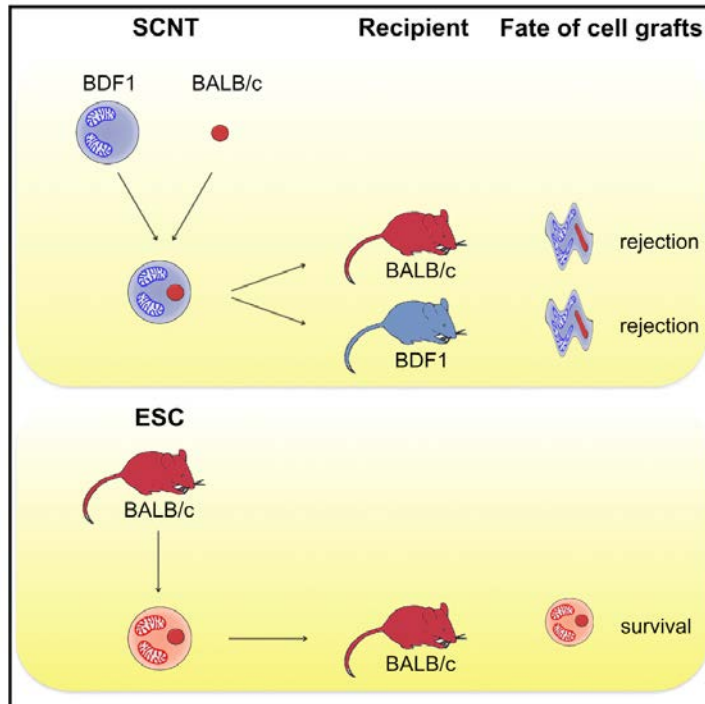
特定胚指針の見直しに関する検討事項

課題(5)-ii. 胚発生におけるミトコンドリアDNAの動態に関する研究

ミトコンドリアDNAと核DNAの適合性に関する研究(1)

研究事例E

mtDNAは免疫原性を持つ



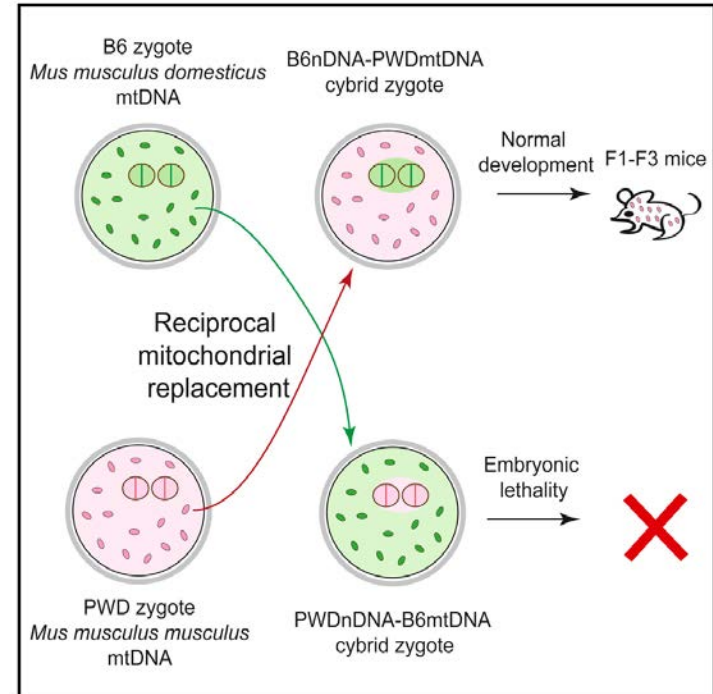
核DNA : BALB/c系統マウス由来
細胞質mtDNA : BDF-1系統マウス由来

- 体細胞クローン胚由来ES細胞は同じ核DNAを持つ系統でも免疫拒絶された

Deuse et al., *Cell Stem Cell* 2014

研究事例F

mtDNAは発生に関与する



核DNA : B6系統マウス由来
細胞質mtDNA : PWD系統マウス由来

- 上記組み合わせは個体に発生するが、逆の組み合わせでは胎性致死

Ma, Mitalipov et al., *Cell Metabolism* 2016

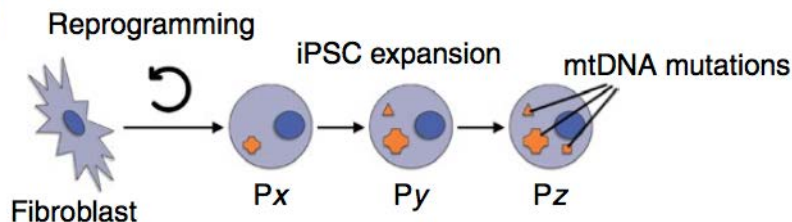
特定胚指針の見直しに関する検討事項

課題(5)-ii.胚発生におけるミトコンドリアDNAの動態に関する研究

ミトコンドリアDNAと核DNAの適合性に関する研究(2)

研究事例G

同一個人から樹立したiPS細胞であっても、mtDNAに変異が生じることで、免疫拒絶されうる

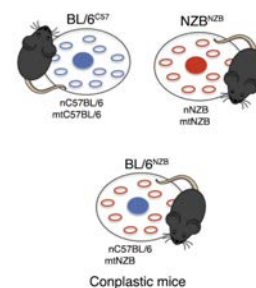


iPS細胞へのリプログラミング過程および目的の細胞への分化に向けた長期培養によりmtDNAに変異が生じ、免疫拒絶されうる。

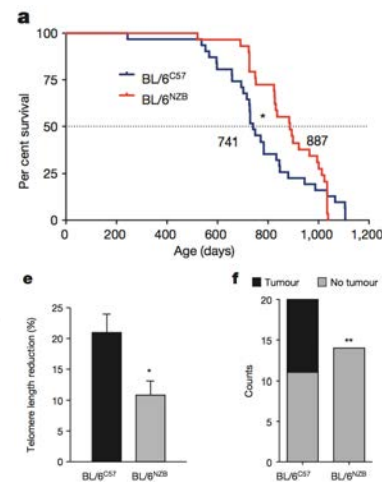
Deuse et al., *Nat Biotech* 2019

研究事例H

mtDNAは発生に関与する



核DNA (ntDNA) BL/6
細胞質mtDNA NZB



BL/6^{NZB}はBL/6^{C57}と比較して、16%寿命が延長する. telomere長が短縮しにくい, 腫瘍が形成されにくいなどの違いが観察された。

Pellicer et al., *Nature* 2016

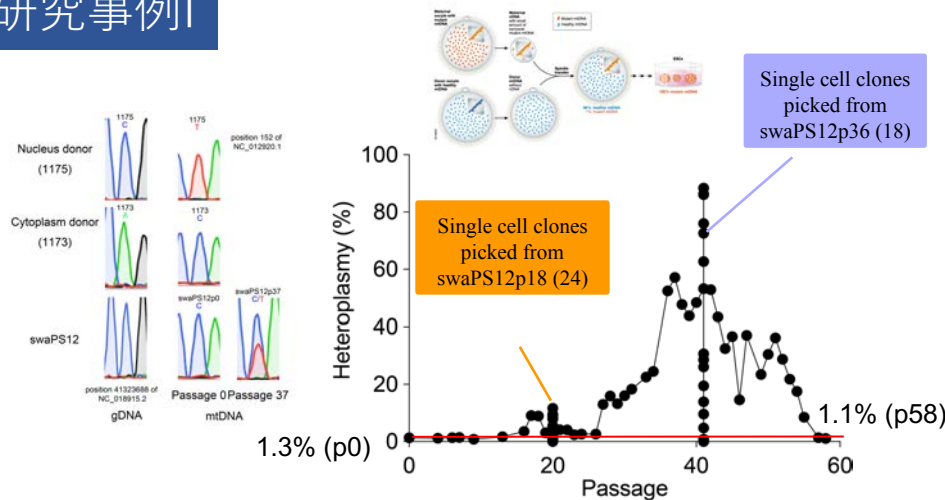
- mtDNAは免疫拒絶の原因になりうる
- mtDNAは発生にポジティブにもネガティブにも働きうる

特定胚指針の見直しに関する検討事項

課題(5)-ii.胚発生におけるミトコンドリアDNAの動態に関する研究

ミトコンドリアDNA複製分配に関する研究

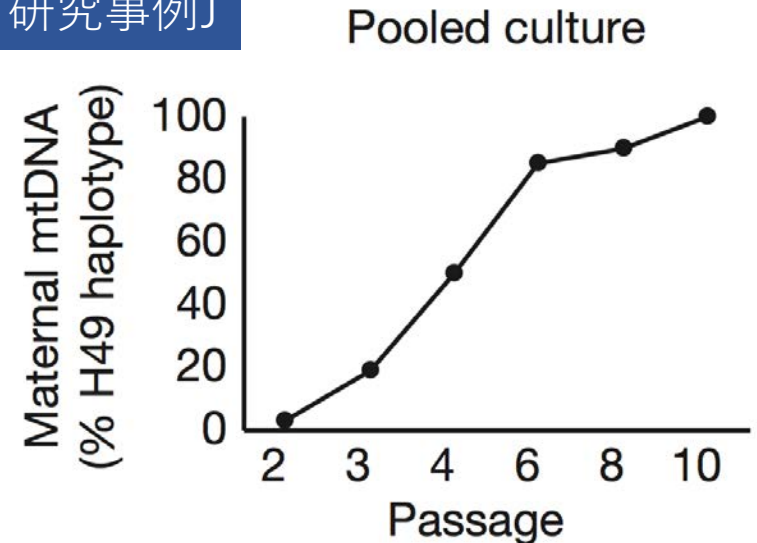
研究事例I



ヒト卵子間核置換後に樹立したES細胞において、核由来ミトコンドリアDNAが増加（ミトコンドリアDNAの遺伝的浮動）

Yamada, Egli et al., *Cell Stem Cell* 2016

研究事例J



ミトコンドリア病保因者母体由来のミトコンドリアDNA (H49 haplotype) は増加

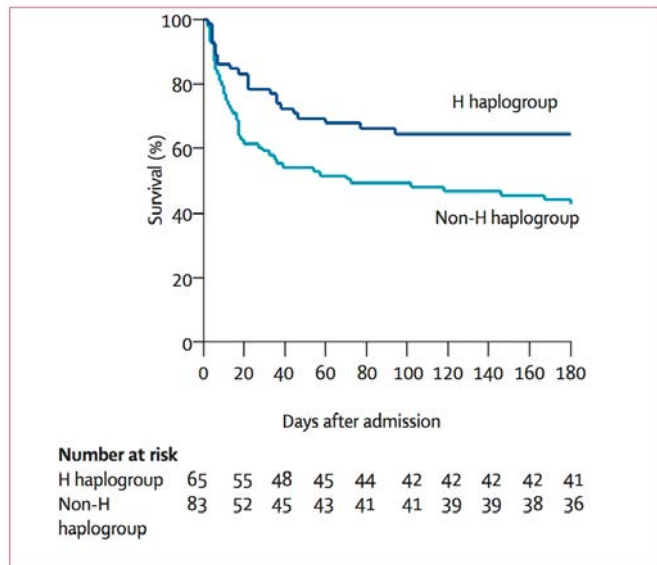
Kang, Mitalipov et al., *Nature* 2016

ミトコンドリアDNAの複製分配に関するメカニズムはいまだ十分に明らかではない

特定胚指針の見直しに関する検討事項

課題(5)-iii. ミトコンドリア病の疾患発症の原因を明らかにする研究

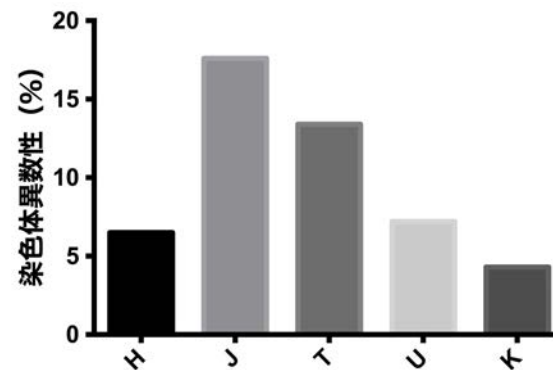
研究事例K



敗血症で入院した患者のうち、Haplogroup HはほかのHaplogroup Hと比較して、集中治療室に入院後180日目の生命予後は2.12倍良い。

Baudouin et al., *Lancet* 2005

研究事例L

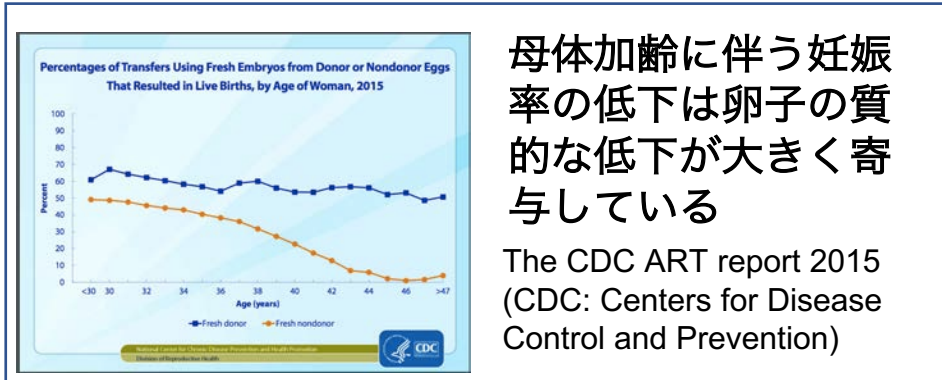


Haplogroup J/TはHaplogroup Hと比較すると、卵子減数分裂過程における染色体異常が有意に多い。

Gianaroli et al., *Mol Hum Reprod* 21(1):46-57, 2015

ミトコンドリアDNA Haplogroupが老化や疾患発症に関与するとの報告は以前からなされているが、分子生物学的なメカニズムは明らかになっていない

特定胚指針の見直しに関する検討事項 課題(5)-iv. 核置換技術を応用したミトコンドリアに関する研究 胚の発生とミトコンドリアに関する研究



研究事例M

Table 1 Effects of microinjecting mitochondria derived from somatic (liver) cells on fertilization and embryo development rates in fresh and aged mouse oocytes.

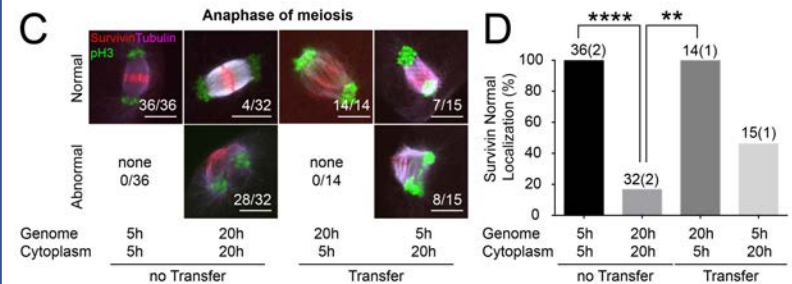
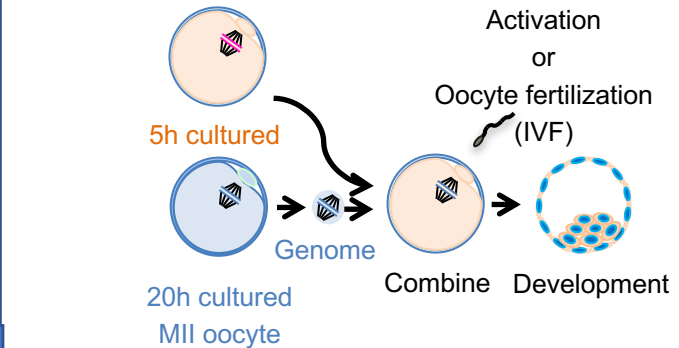
Treatment group	Two-cell embryos/total tested oocytes (%)	Morula/two-cell embryos (%)	Blastocyst/two-cell embryos (%)	Fragmented embryos/two-cell embryos (%)
Fresh	131/143 (92) ^a	108/131 (82) ^a	100/131 (76) ^a	0/131 (0) ^a
Aged	107/217 (49) ^b	47/107 (44) ^b	40/107 (37) ^b	14/107 (13) ^b
Fresh (buffer injected)	86/98 (88) ^a	78/86 (91) ^a	64/86 (74) ^a	0/86 (0) ^a
Fresh (mitochondria injected)	84/98 (86) ^a	76/84 (90) ^a	62/84 (74) ^a	0/84 (0) ^a
Aged (buffer injected)	72/178 (40) ^b	33/72 (46) ^b	22/72 (31) ^b	10/72 (14) ^b
Aged (mitochondria injected)	79/172 (46) ^b	44/79 (56) ^b	28/79 (35) ^b	6/79 (8) ^b

Values with different superscript letters within the same column are significantly different; $P < 0.05$. The percentages were compared using the chi-square test.

マウス卵子を用いた自家ミトコンドリア移植は胚盤胞発生率を改善させない

Igarashi et al., *Hum Reprod* 2016

研究事例N



マウス排卵後加齢卵子と新鮮卵とで核置換すると、染色体分配の異常の頻度が減少した Yamada, Egli., *Stem Cell Rep* 2017