

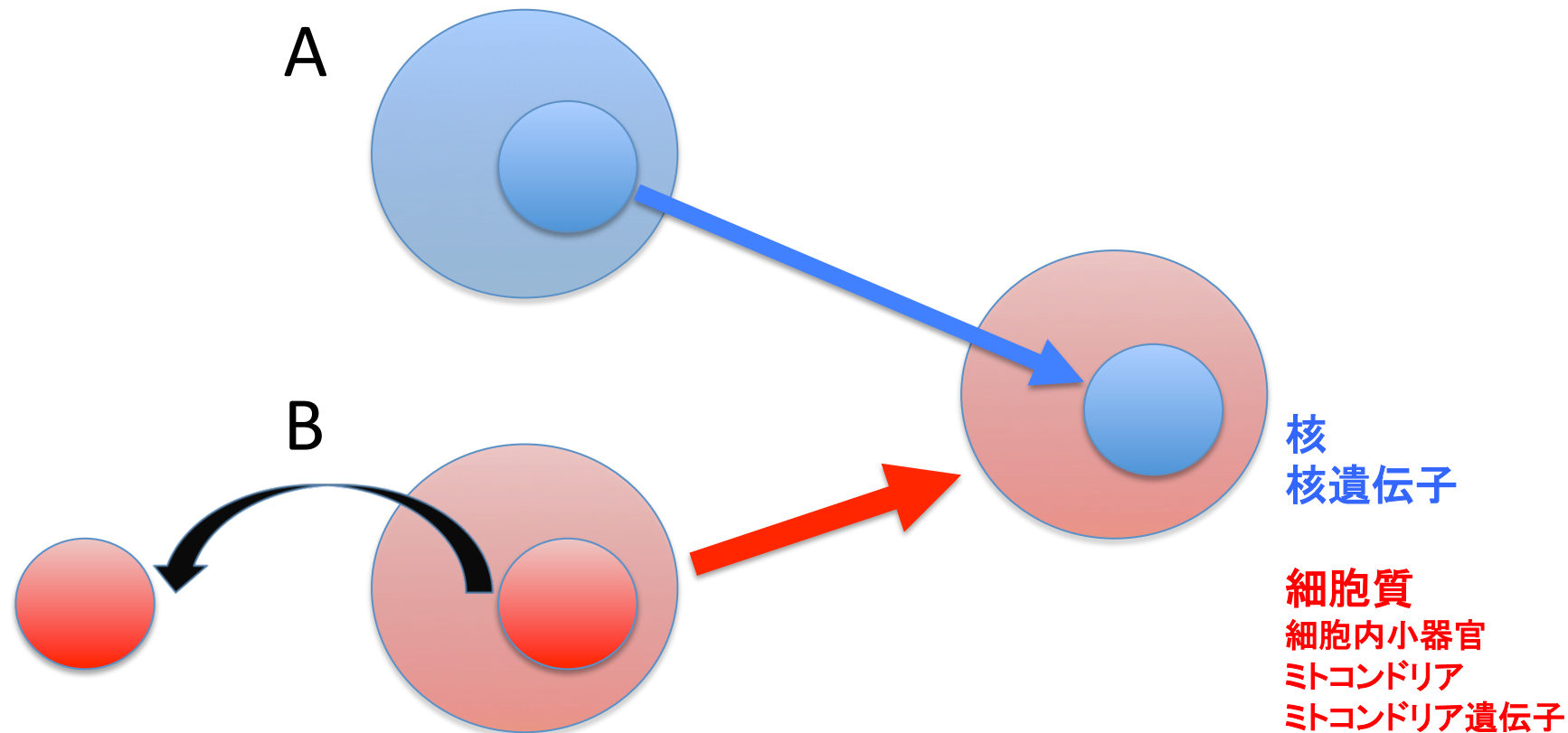
第2回ミトコンドリア病研究
患者公開フォーラム
ミトコンドリア病を取り巻く状況2017

生殖医療を取り巻く状況

- ・母系遺伝ミトコンドリア病の核移植

東北大学産婦人科
立花 眞仁

核移植



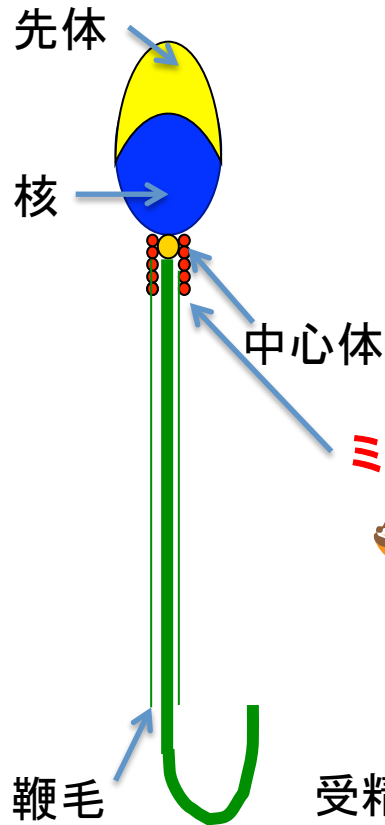
Cytoplasmic transfer/replacement
(細胞質移植/置換)

MRT (Mitochondrial replacement therapy) ミトコンドリア置換

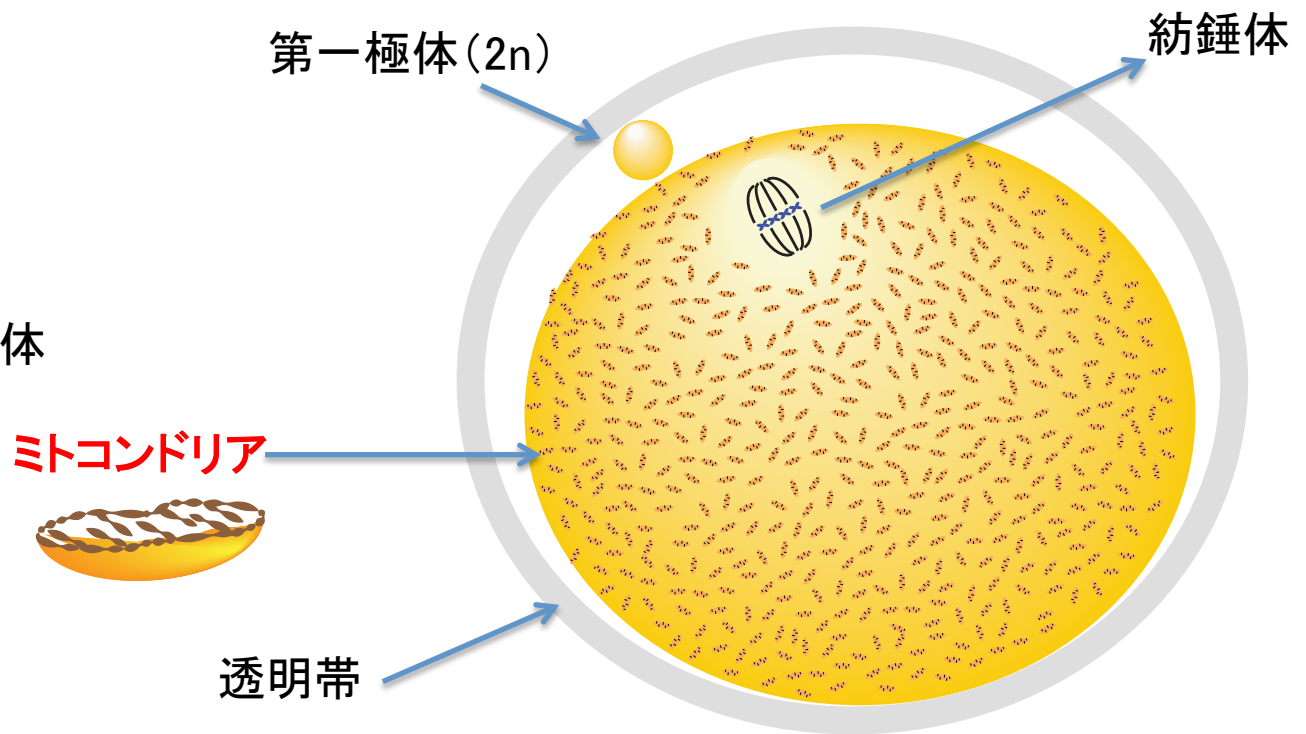
ミトコンドリアとミトコンドリア遺伝子について

- ✓ ATP(細胞のエネルギー通貨)を産生する細胞内小器官である
- ✓ ミトコンドリアは核遺伝子とは独立した固有の遺伝子(ミトコンドリア遺伝子)をもつ
- ✓ 各ミトコンドリアは2-10コピーのミトコンドリア遺伝子を保有する
- ✓ ミトコンドリア遺伝子は16.6KBの環状2本鎖遺伝子で37の遺伝子をコードする
- ✓ 卵子は体細胞に比して膨大なミトコンドリア及びミトコンドリア遺伝子を有する
 - ミトコンドリア遺伝子コピー数
 - 体細胞: $10^3 \sim 10^4$,
 - サルやヒト卵子: $10^5 \sim 10^6$
- ✓ 母系遺伝で相同組替えなし

精子



成熟卵子



受精において精子が卵に持ち込むもの

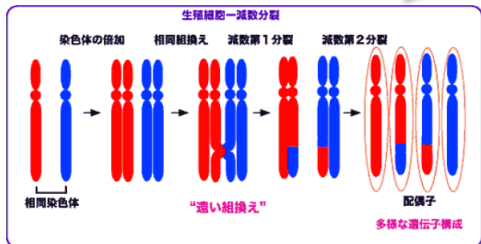
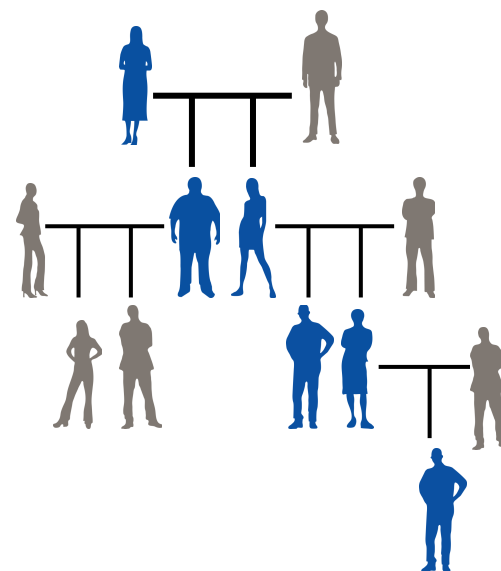
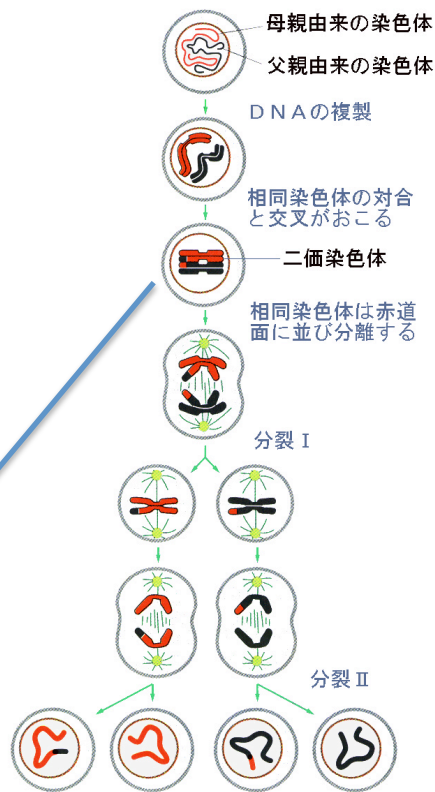
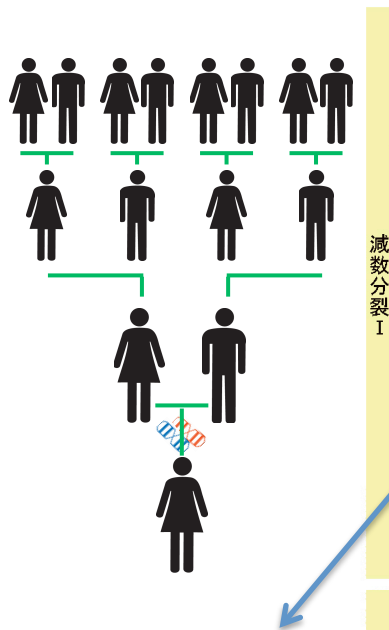
- ✓ 雄性遺伝子
- ✓ 卵活性化物質
- ✓ 精子中心体
- ✓ ミトコンドリア (約50-100個のミトコンドリアを持ち込む)

精子のミトコンドリアは初期胚発生において選択的な破壊、不活化、もしくは単純に膨大な卵子のミトコンドリアによって希釈される

遺伝子の継承

Nuclear DNA inheritance
(核遺伝子の継承)

mtDNA inheritance
(ミトコンドリア遺伝子の継承; 母系遺伝)



相同組み換え

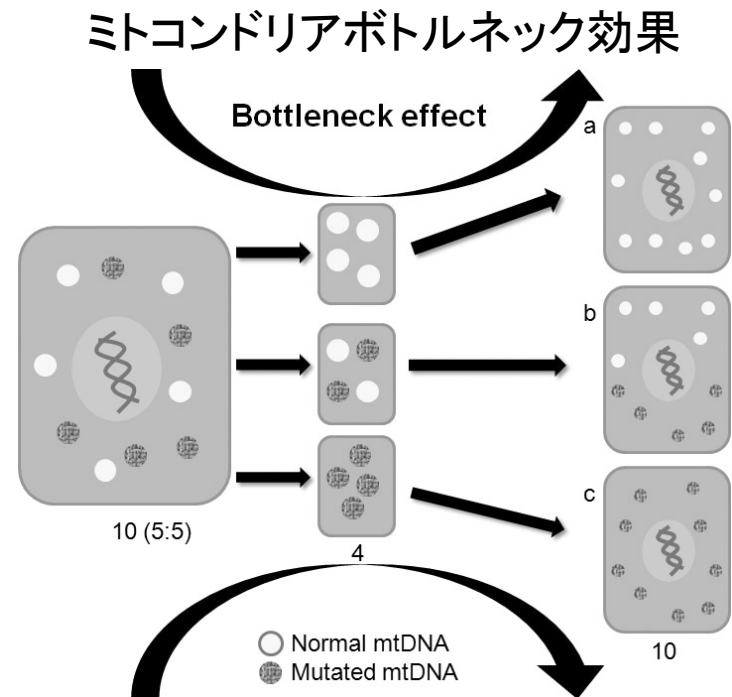
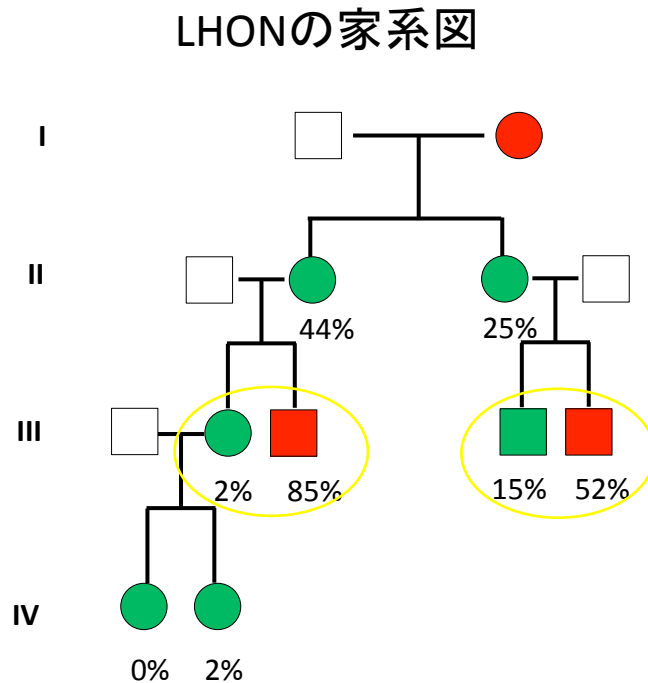
個々の配偶子(精子、卵子)の核遺伝子はユニーク(同胞がクローンではない理由)。対して、ミトコンドリア遺伝子は母から子へ同じものの継承され(同胞は母親と全く相同なミトコンドリア遺伝子を持つ)、母系遺伝である。

ミトコンドリア遺伝子異常に起因するミトコンドリア病

- ✓ ミトコンドリア遺伝子の異常はヒトにおける重度な疾患と関連し、様々な臓器へ影響を及ぼす。
- ✓ これまで700を超えるミトコンドリア遺伝子変異と様々な執権との関連が報告されている。(mitomap.org)
- ✓ アメリカでは約1000人～4000人の子供がミトコンドリア病のリスクを持って生まれてくる。
- ✓ ミトコンドリア病の多くは変異体と正常ミトコンドリア遺伝子を有するヘテロプラスミーの状態である。
- ✓ ミトコンドリア病の発病は閾値効果と関連があり、症状や重症度は変異体の割合と相関する。

ミトコンドリア遺伝子継承の複雑性

- ❖ ヘテロプラスミーによってキャリアの母親は健常児も病児も出産しうる。
- ❖ その予測は不能である。



Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)

*In the case of LHON, >60% mutant mtDNA load is required before the disease phenotype presents.

サマリー 1

- ✓ ミトコンドリア遺伝子の変異はヒトにける重篤な疾患や病態と関連がある。
- ✓ ミトコンドリア遺伝子の変異は卵子を介して次世代へ受け継がれる（母系遺伝である）。
- ✓ ミトコンドリア遺伝病の遺伝カウンセリングは困難である。

Today's topics **(本日のお話の内容)**

- ✓ ミトコンドリア遺伝病に対する着床前遺伝子診断(PGD)の検証
- ✓ ミトコンドリア遺伝病伝搬防止を目的とした新規の治療方法の開発
- ✓ ミトコンドリア置換法の位置付けと国内外の動向

現在どんな生殖オプションが利用可能か？

1. Adoption
(養子)

2. IVF with healthy donor egg
(健常者からの卵子提供によるIVF)

3. Testing embryos during IVF :this may not result in a disease-free baby, but lowers the chance of passing on the disease. However it is not an option for some forms of mitochondrial disease
(着床前診断による異常胚の選別)

4. Testing of the fetus during pregnancy (with the option of termination)
(着床後遺伝子診断による異常胎児の選別)



Resulted baby is genetically unrelated
(生まれてくる子供は遺伝的に継がなりがない)

PGDの適応(日本産科婦人科学会)

(表 1) 承認されている着床前診断対象と遺伝子型

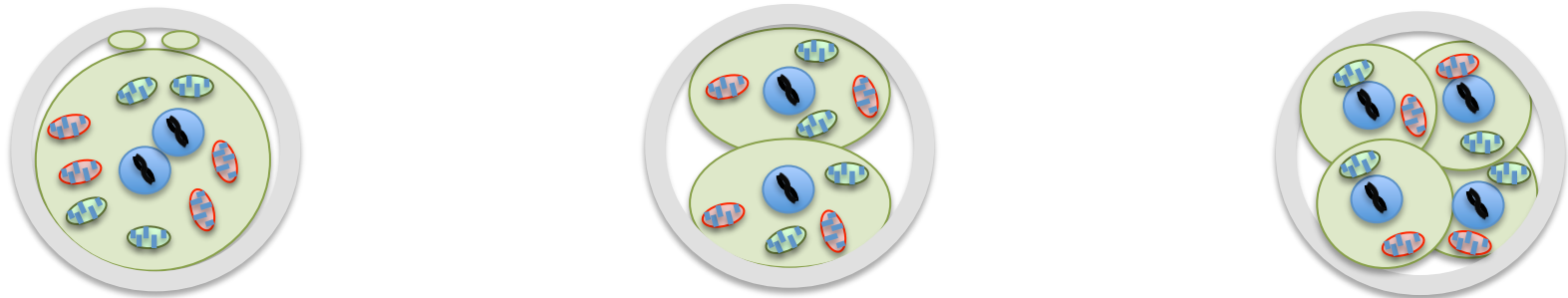
1. デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) : X 連鎖性
— 欠失型・微小変異型
2. 筋強直性ジストロフィー : 常染色体優性
— 反復配列の異常伸長
3. Leigh 脳症 : ミトコンドリア病
— ミトコンドリア DNA の点変異型
4. 副腎白質ジストロフィー : X 連鎖性
— 点変異型
5. オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 : X 連鎖性
— 点変異型
6. 均衡型転座保因者の習慣流産

着床前診断が行える条件

1. ヘテロプラスミーと疾患発症、重症度に相関がある
2. 分割期胚での割球間における変異ミトコンドリアの均等な配分
3. ヘテロプラスミーが胎生期、出生後も変化しない

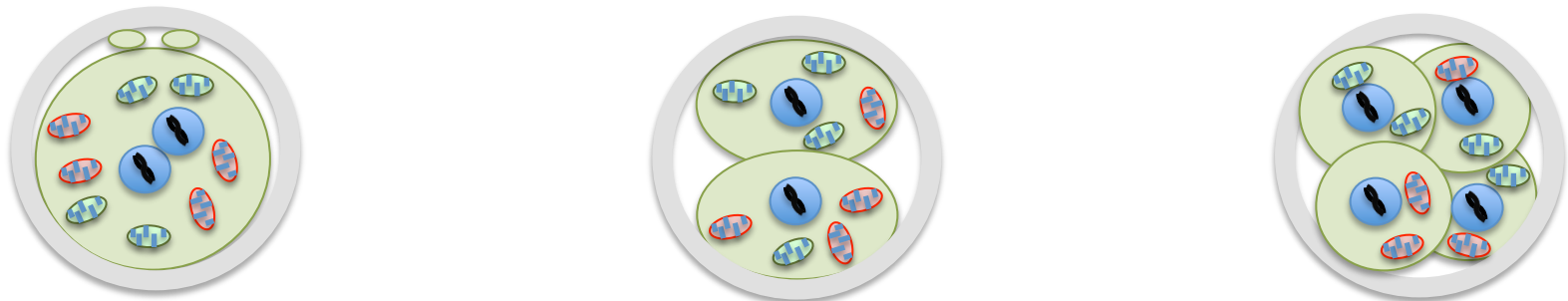
PGDが成り立つためには

細胞分裂に際してミトコンドリア遺伝子の均等に分配(量もヘテロプラスミーの割合も)され、胎生期も出生後も変わらない



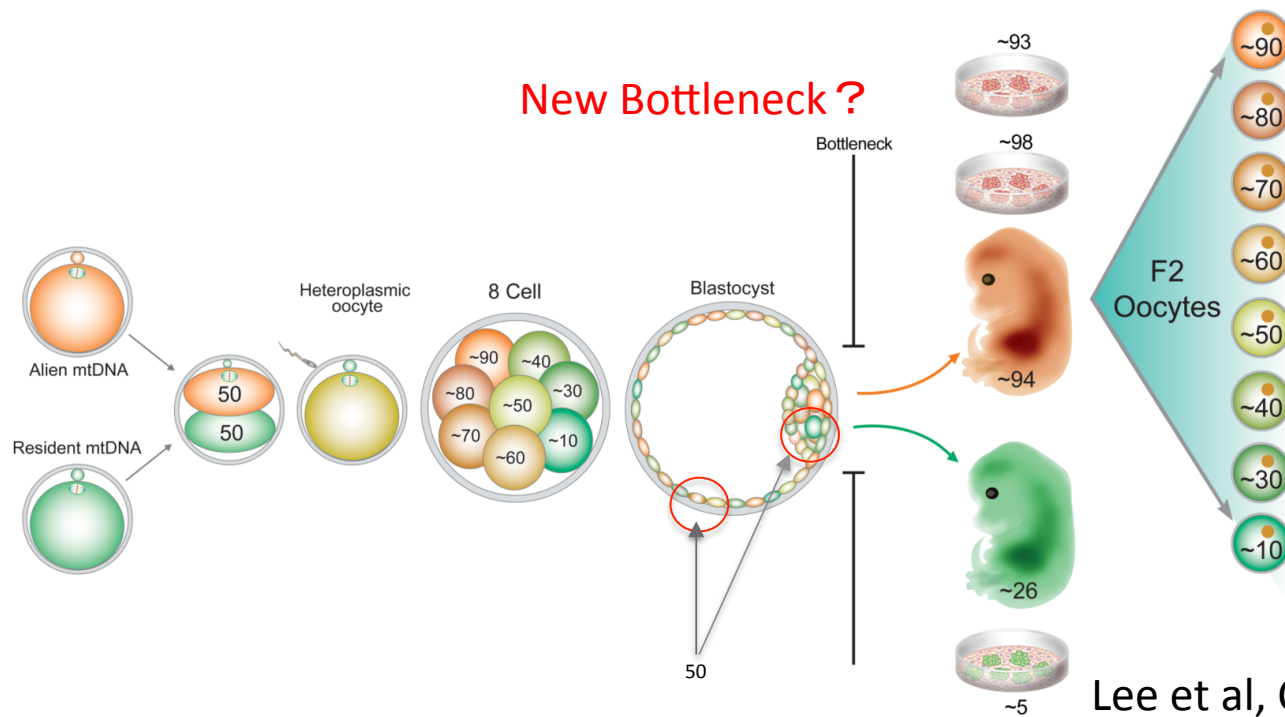
胚発生発生

もし、不均等分配が起こったら?



サマリー 2

- ✓ 霊長類初期胚におけるミトコンドリア遺伝子のダイナミックな分配を確認した。
- ✓ 遺伝的浮動により、世代を介さずともヘテロプラスミーの個体がホモプラスミーとなりうる可能性を示唆。
- ✓ 広範なヘテロプラスミーの変化は、霊長類の卵子形成においても認められた。
- ✓ PGDは児の正確なヘテロプラスミーの評価には適さない可能性が示唆された。



Today's topics **(本日のお話の内容)**

- ✓ ミトコンドリア遺伝病に対する着床前遺伝子診断(PGD)の検証
- ✓ ミトコンドリア遺伝病伝搬防止を目的とした新規の治療方法の開発
- ✓ ミトコンドリア置換法の位置付けと国内外の動向

ミトコンドリア遺伝病患者家族にとって他の生殖オプションは？

キーワード

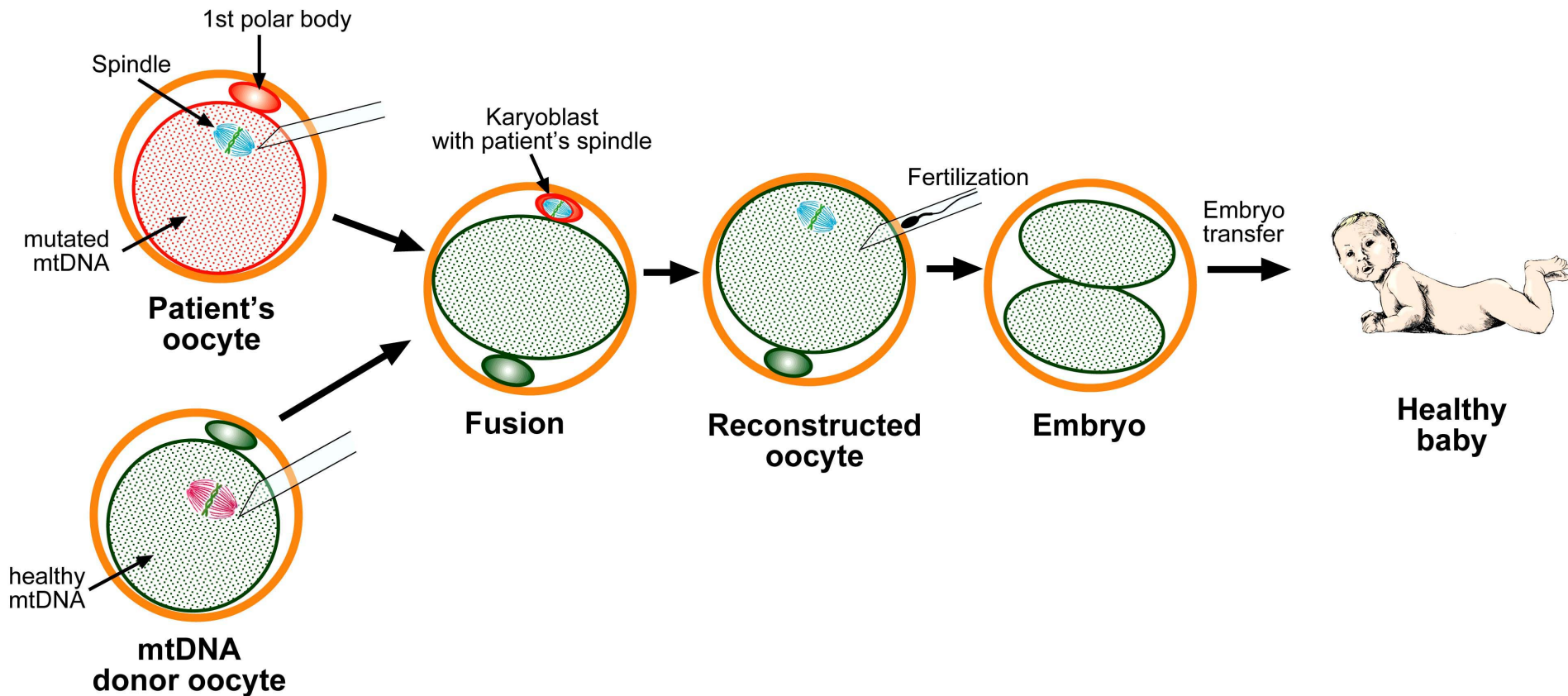
ミトコンドリア遺伝子異常は卵子を介して次世代へ伝搬する(母系遺伝)。

細胞質を効率的で安全に置換する方法があれば伝搬を防止できる。

Exp2. ミトコンドリア遺伝病伝搬防止を目的とした新規の治療方法の開発

(Maternal) Spindle-chromosomal Complexes Transfer: MST

成熟卵紡錘體置換法



ARTICLES

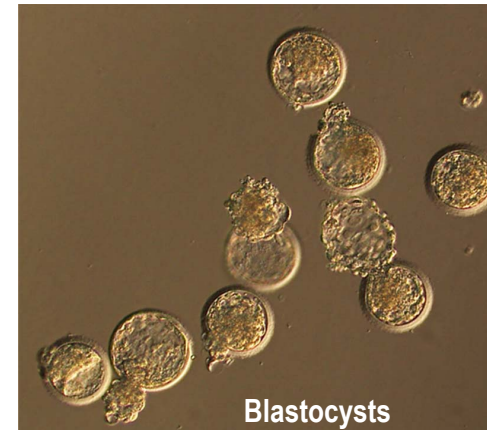
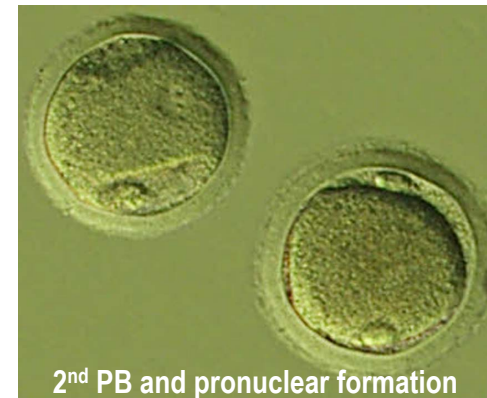
Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells

Masahito Tachibana¹, Michelle Sparman¹, Hathaitip Sritanaudomchai¹, Hong Ma¹, Lisa Clepper¹, Joy Woodward¹, Ying Li¹, Cathy Ramsey¹, Olena Kolotushkina¹ & Shoukhrat Mitalipov^{1,2,3}

Chromosome Transfer in Mature Oocytes

A fluorescence microscopy image of a mature oocyte. The nucleus is stained red, and the chromatin is stained blue. The text "Chromosome Transfer in Mature Oocytes" is overlaid on the image.

MST卵子の受精能と胚発生能



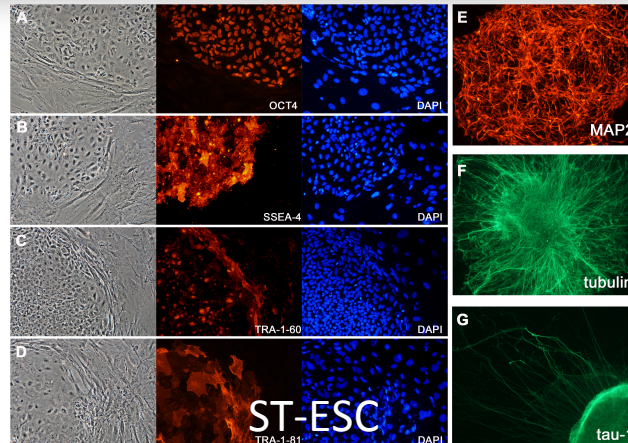
通常の顕微授精胚とMST卵子由来胚の体外発生の比較

	N	Fusion	Fertilization	8-cell	Morulae	Blastocysts
Spindle Transfer	82	74 (90%)	69 (93%)	69 (93%)	54 (78%)	41 (59%)
Control	73	NA	67 (92%)	57 (85%)	50 (75%)	41 (61%)

ARTICLES

Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells

Masahito Tachibana¹, Michelle Sparman¹, Hathaitip Sritanadomchai¹, Hong Ma¹, Lisa Clepper¹, Joy Woodward¹, Ying Li¹, Cathy Ramsey¹, Olena Kolotushkina¹ & Shoukhrat Mitalipov^{1,2,3}



- ✓ サル未受精卵で効率的にミトコンドリア置換に成功
- ✓ 3匹が妊娠(4匹の健康な産仔)、3つのES樹立
- ✓ 産仔、ES細胞ともに正常核型で細胞質ドナー由来のホモプラスミー

遺伝性の難病「ミトコンドリア病」の原因となる異常ミトコンドリアDNAを、卵子の段階で遺伝しないよう置き換える技術を、米オレゴン健康科学大などの研究チームが開発、その技術を使ってアカゲザルの子どもを誕生させることに成功した。約5000人に1人と言われる同疾患の防止につながる可能性があるという。26日、英科学誌「ネイチャー」(電子版)に発表した。

生物の遺伝情報が書き込まれたDNAは、染色体と

「ミトコンドリア病」防止に道

して細胞の核の中に存在している。一方、核外の細胞質にある小器官「ミトコンドリア」にもDNAがあり、この異常が心臓や脳などの機能障害を引き起こす。

チームは、ミトコンドリア

て子宮に移植した結果、4月に双子が誕生、その後2匹が生まれた。4匹とも健康で、元のメスのミトコンドリアDNAは受け継いでいなかった。

同大オレゴン霊長類研究所の立花真仁研究員は「人に応用するには、第三者からの卵子提供が必要になるなど課題があるが、将来、ミトコンドリア病の遺伝を防止する一つの選択肢となる可能性がある」と話す。

【永山悦子】

サマリー 3

- ✓ 我々は霊長類成熟卵において効率的で安全なミトコンドリア遺伝子の置換が可能である事を示した。
- ✓ 再構築した卵子は、排他的に細胞質ドナー由来のミトコンドリア遺伝子に置換されていた。
- ✓ 確立した技術により、授精可能で、正常なESの樹立や健常な産仔を得られる卵子の作成が可能である。
- ✓ その生物学的類似性よりMSTはヒト卵子へ応用できる可能性がある。

Today's topics **(本日のお話の内容)**

- ✓ ミトコンドリア遺伝病に対する着床前遺伝子診断(PGD)の検証
- ✓ ミトコンドリア遺伝病伝搬防止を目的とした新規の治療方法の開発
- ✓ ミトコンドリア置換法の位置付けと国内外の動向

UK sets sights on gene therapy in eggs

- The UK is conducting reviews and public consultations on these procedures as a first step towards making genetic modification of human embryo legal
イギリスではヒト胚における遺伝子改変を容認するための第一ステップとして、専門家による学術委員会を招集してミトコンドリア置換を科学的、倫理的に検討。
- Spindle Transfer (ST) or alternative pronuclear transfer (PNT) are considered as potential approaches to prevent transmission of mtDNA mutations
STもしくはPNTはミトコンドリア遺伝病の伝搬防止に向けた潜在的なアプローチとして考えられる。
- no evidence which suggested that mitochondrial replacement is unsafe” (<http://www.hfea.gov.uk/8807.html>)
ミトコンドリア置換が危険であるというエビデンスはなかった。

*イギリスにおいて1990年にヒト受精・胚研究法(the Human Fertilization and Embryology Act: HFE Act)を制定し、同法に基づき、ヒト受精・胚研究機関(Human Fertilization and Embryology Authority; HFEA)がヒト胚の取扱いについて規制を行っている。研究のためのヒト受精胚の作成又は保存・使用については、目的を限定した許可制とされ、①不妊治療の進展、②先天性疾患の原因究明、③流産の原因究明、④より効果的な避妊法の開発、⑤母体移植前の胚の染色体、遺伝子異常の検出方法の開発、の各目的の範囲内で認められている。



Summary of report

Novel techniques for the prevention of mitochondrial DNA disorders: an ethical review

Published 12 June 2012

- Nuffield Council on Bioethics concluded that if the techniques are safe and effective, and an appropriate level of information and support is offered, **it is ethical** for families to use these techniques as treatment
(これらの新規の技術は十分に治療として容認できる安全性と有効性が証明されている場合、患者が望み、適切な情報とサポートが行われるならば、これらの技術を使用することは**倫理的である**だろう。)

Regulation: follow-up : この技術の結果について更なる知見が得られるよう、その子供と家族を長期フォローが確約される必要がある。この目的をサポートするため、UKで行われるこのような技術が政府の資金による登録制とし、研究者が数十年にわたってアクセスできるよう整備が勧められる。

Parentage of the child : ワーキンググループの知見ではミトコンドリアドネーションによる児は、生物学的にも法的にも“第三の親”もしくは“第二の母”を持つとは定義しない。

Regulation: status of the mitochondrial donor : ミトコンドリア置換におけるドナーは、体外受精における卵子提供者とは異なり、ドナーが彼らの寄付より生まれた大人から識別できる必要がない(出自)。

Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases

Masahito Tachibana¹, Paula Amato², Michelle Sparman¹, Joy Woodward¹, Dario Melguizo Sanchis¹, Hong Ma¹, Nuria Marti Gutierrez¹, Rebecca Tippner-Hedges¹, Eunju Kang¹, Hyo-Sang Lee¹, Cathy Ramsey¹, Keith Masterson², David Battaglia², David Lee², Diana Wu², Jeffrey Jensen^{1,3}, Phillip Patton², Sumita Gokhale⁴, Richard Stouffer^{1,2} & Shoukhrat Mitalipov^{1,2}

- ✓ 霊長類モデルの産仔は正常の発達を示している。
- ✓ 凍結融解卵子を用いてもミトコンドリア置換は可能であり、新鮮な細胞質使用が成功の鍵であった。
- ✓ 異常受精のリスク増加はあるが、ヒト卵子に置いてもミトコンドリアは効率的に置換可能。

2012 月 6 月 ナフィールド生命倫理審議会により、報告書が提出されてからのイギリスにおけるミトコンドリア置換技術の臨床応用に向けたマイルストーン

2013 年 5 月 HFEA から政府への勧告書が公表される(“Mitochondria replacement consultation: advice to government ”)

2013年6月 政府がミトコンドリア提供を容認する修正案の作成を決議

2014年2月 ミトコンドリア提供についての法案が公表される
(2014 月 5 月まで、法案に関する HFEA のコンサルテーションが 12 週間続けられた)

2014 年 6 月 HFEA による専門家コンサルテーションで、危険性があるとはいえない(‘not unsafe’)と結論づけられた報告書が保健省へ提出される

2015年1月 下院で可決(賛成382 対 反対128)

2015年2月 上院で可決(賛成280 対 反対48)

2015 年 10 月 法律が施行される

もうすぐ世界初の配偶子系列遺伝子治療による児が生まれる？

しかしながら、世界中の研究者は慎重な態度をとっており、研究を続けている。
(HFEAは臨床試験開始にはゴーサインを出していない様子)

LETTER

doi:10.1038/nature18303

Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease

Louise A. Hyslop^{1,2}, Paul Blakeley³, Lyndsey Craven⁴, Jessica Richardson¹, Norah M. E. Fogarty³, Elpida Fragouli⁵, Mahdi Lamb¹, Sissy E. Wamaitha³, Nilendran Prathalingam^{1,2}, Qi Zhang^{1†}, Hannah O'Keefe¹, Yuko Takeda¹, Lucia Arizzi^{1,2}, Samer Alfarawati⁵, Helen A. Tuppen⁴, Laura Irving^{1†}, Dimitrios Kalleas^{1†}, Meenakshi Choudhary², Dagan Wells⁶, Alison P. Murdoch², Douglass M. Turnbull⁴, Kathy K. Niakan³ & Mary Herbert^{1,2}

ミトコンドリア置換を行うニューカッスルのグループも未だ、安全な手技の確立を目指した検討を続けている。