

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

卵子におけるミトコンドリア DNA の解析とミトコンドリア病に対する生殖医療サポート

分担研究者 末岡 浩 慶應義塾大学医学部産婦人科学 准教授

研究要旨 ミトコンドリア病の遺伝的伝搬による発生に関し、生殖医療における予防的医療の方法論の確立を目標に技術的検討を行った。ミトコンドリア病に対する着床前遺伝子診断 (preimplantation genetic diagnosis: PGD) を Leigh 脳症に対して、倫理承認を得て実施した。安全な変異比率を有する卵子を得る効率が課題と考えられた。PGD の他の方法として卵細胞質移植と核移植の方法が考えられ、提供卵子の取り扱い、安全性を含め倫理的議論および法の解釈について検討が求められる。また、ヒト卵子におけるミトコンドリア遺伝子の基礎的評価を行った。ヒト卵子には約 6×10^5 copy の mtDNA が存在し、mtDNA copy と細胞質体積は正の相関性があり、加齢群で mtDNA copy 数の減少を認めた。生殖医療面からミトコンドリア病の遺伝に関する疾患予防と卵子の妊孕性機能の双方から卵子 mtDNA の評価を行う意義が示唆された。

A. 研究目的

ミトコンドリア病が、卵子を介して遺伝的に伝搬し、発生する機構に対して生殖医療における予防的医療の方法論の確立のために技術的検討を行った。

B. 研究方法

1. 着床前遺伝子診断 (preimplantation genetic diagnosis: PGD) の技術開発

わが国においてミトコンドリア病に対する PGD は、重篤な遺伝性疾患に関する PGD が対象となる倫理上の基準から、これまでに 3 例の Leigh 脳症 (8993 T>G) の倫理申請を行った。ミトコンドリア病に対する PGD の対象、診断技術、効果について検討し、課題を抽出した。

2. 他の生殖医療によるミトコンドリア病の遺伝的発症予防の技術的・倫理的検討の調査

PGD 以外の生殖補助医療を用いた発症予防に関する

方法論として考えられる技術とその応用に関する倫理的背景について調査検討した。

倫理面への配慮：PGD に関しては、日本産科婦人科学会 “着床前診断に関する見解” に基づき実施することが定められている。十分な遺伝カウンセリング（第三者機関を含む）のうえで、実施施設の倫理委員会の審議のうえ、日本産科婦人科学会倫理委員会の審議を経て、実施承認を得た事例について対象とした。

3. 卵子機能としてのミトコンドリア遺伝子の基礎的評価

加齢などの要因により、胚発生・妊娠率低下の原因として、卵子のミトコンドリア (mt) DNA の質的・量的変化の示唆がなされているが、多くは解明されていない。疾患発生に関わる mtDNA の変化と胚発生に必要な mtDNA の質的・量的条件について解明が必要であり、ヒト廃棄卵子、胚における mtDNA を解析し、ミトコンドリア病に対する生殖

医療サポートの基礎データとして検討を行った。

C. 研究結果

1. PGD の技術開発と効果

新たな mtDNA 変異によって生じるミトコンドリア病に対する PGD の最適な適応として、ホモプラスミーで発症する Leigh 脳症 (8993T>G) が考えられ、我々は、日本産科婦人科学会の倫理承認を得たうえで実施に至った。生検については顕微授精後の初期胚から胚細胞および検体を吸引採取し、mtDNA のヘテロプラスミー変異率を測定し、疾患が発症するヘテロプラスミーの threshold 以下である胚を選択して胚移植に供した。実施事例は、45%の変異比率を有する女性保因者に対し実施し、生検胚のなかで低い変異比率を示す移植可能胚が存在せず、さらにその前後に成立した 3 回の妊娠においても変異比率は、全て 95%以上を示した。従って、PGD の根拠となるボトルネック効果によって分配される重篤なミトコンドリア遺伝子病を発症しない変異遺伝子の比率を有する卵子を得る効率面での課題が示された。

PGD の技術開発に関して、新たな手法のアプローチとして、これまでに開発した蛍光プローブを用いた定量 multiplex PCR に基づく比較定量分析法をさらに簡便化、共有化することをめざして、新たに multiple displacement amplification (MDA) による全ゲノム増幅法と RFLP 法を用いて、幅広いミトコンドリア病に適応できる汎用性診断技術の検討を行った。mtDNA の 8993T>G 変異型 Leigh 脳症保因者のリンパ球単一細胞を MDA で遺伝子増幅後、PCR 増幅を行い 169bp の増幅産物を得た。PCR 産物が制限酵素により、正常コントロール由来では 2 断片 (163, 6bp)、保因者由来では 3 断片 (93, 70, 6bp) に分離切断した。電気泳動の各バンドとして算出した。従来法に比較し、低いヘテロプラ

スミー比率を示したが、従来法と同等の診断効率を示し、更に低コストの利点も得られた。個々の変異遺伝子型によらず、多様なミトコンドリア病に対応することが可能な汎用性のある新たな方法となることが示唆された。

2. 他の生殖医療によるミトコンドリア病の遺伝的発症予防の技術的・倫理的検討の調査

生殖過程に伝播するミトコンドリア遺伝病の予防対策として考えられる生殖医療からの手法には、出生前診断、PGD、卵細胞質移植、核移植、健全な第三者からの卵子提供、の 5 種に分類され、各法についても倫理的、法的な観点からの課題について議論がなされてきた。PGD の効率面での課題から諸外国では、より確実に効率のよい、児の発症を防ぐ具体的な方法として、健全な第三者の提供卵子を用いることが考えられている。また、提供卵子そのものを用いる方法以外に卵細胞質移植と核移植の方法が考えられている。いずれも mtDNA の変異比率の高い保因者の女性の卵子に存在するヘテロプラスミー比率を低下させることを目的としている。これらの第三者の卵子またはその一部を用いる生殖補助医療に関して、英国の Human Fertilization and Embryology Authority (HFEA) による前核を用いた核移植についての研究が承認に至っている。しかし、わが国では、なお、現実的な議論が行われていない。

3. 卵子機能としてのミトコンドリア遺伝子の基礎的評価

卵子の細胞質体積は年齢、胚発生速度、形態学的評価の各々と関連することが示され、また、妊娠成立効果に関連していることが示唆された。ヒト卵子には約 6×10^5 copy の mtDNA が存在し、mtDNA copy と細胞質体積は正の相関性があり、加齢群で mtDNA copy 数の減少を認めることから、妊孕能は

胚の mtDNA copy 数の量的減少が影響していることが示唆された。

卵子・胚の定性的・定量的 mtDNA 解析によってミトコンドリア病保因者に対して疾患の発生を予測する可能性につながる意義が示され、疾患発症と卵子の妊孕性機能の双方から卵子 mtDNA の評価を行う意義が示された。

D. 考察

ミトコンドリア病の遺伝的発症を生殖医療技術を用いる予防法のなかで PGD は、法的・倫理的には最も合理的と考えられる手法である。しかし、比較定量化による診断技術は煩雑であり、mutant load の cut off の設定に議論があること、さらに発症を防止できる移植可能胚が得られる効率が不明であることなどが課題として挙げられる。これに対して、卵子提供、卵細胞質移植、核移植などの他の選択肢は、安定的な成果が期待できる効率的な方法である。その一方で、共に第三者の卵細胞を使用する点で議論がある。医学的なミトコンドリア遺伝病の伝搬を防止する効果とそのリスクについて解明されていない点が多く、また、倫理的および法的な視点で明確でない面を多く含んでいる。わが国においては卵子提供が制度化されておらず、匿名の卵子提供者を見つけることは非常に困難である。また、ミトコンドリア病の場合に第一度近親者間での提供を受ける場合にはクライアント妻の姉妹は疾患遺伝子の保因者である可能性があり、一方、クライアント夫の姉妹から提供を受けると血族間の生殖となり、実施が不適である。わが国において研究を前提としたトライアルを検討する可能性を含め、ミトコンドリア遺伝病の発症を防止する目的での生殖補助技術について、法律・倫理・医学の各局面から十分な議論のうえ研究が進められることが求められる。

E. 結論

生殖過程に伝播するミトコンドリア遺伝病の予防対策の観点から PGD および細胞質移植、核移植など他の生殖補助医療技術の選択肢について、生殖医療技術を用いる治療法の検討が必要である。また、効果と安全性の技術的検証や倫理的・法的な観点からの現実的な議論が求められる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yukitaka Murakoshi, Kou Sueoka, Kaori Takahashi, Suguru Sato, Tomoyoshi Sakurai, Hiroto Tajima, Yasunori Yoshimura: Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. J Assist Reprod Genet 30:1367-1375, 2013

2. 学会発表

1) 水口雄貴, 末岡 浩, 泉 陽子, 五十畑 葵, 高橋香織, 佐藤 卓, 櫻井友義, 村越行高, 佐藤健二, 中林 章, 青木大輔, 吉村泰典: ミトコンドリア遺伝子のヘテロプラスミーに対する新たな着床前遺伝子診断法の構築 (高得点演題). “公益社団法人日本産科婦人科学会 第 65 回学術講演会”. (2013.5.10 - 12)

2) 水口雄貴, 末岡 浩, 佐藤 卓, 泉 陽子, 五十畑 葵, 高橋香織, 櫻井友義, 村越行高, 佐藤健二, 中林 章, 谷垣礼子, 大澤淑子, 吉村泰典: ミトコンドリア遺伝病に対する全ゲノム増幅 RFLP を原理とした新たな汎用性着床前 遺伝子診断法の基礎的検討 (世界体外受精会議記念賞候補). “第 31 回日本受精着床学

会学術講演会”。（2013 . 8.8 - 9）

3)村越行高， **末岡 浩**， 五十畑 葵，
泉 陽子， 高橋香織， 佐藤 卓， 櫻井友義，
佐藤健二， 中林 章， 吉村泰典:卵子容積とミ
トコンドリア遺伝子の加齢による変化. “第31回
日本受精着床学会学術講演会”。（2013 .8.8 - 9）

4)**末岡 浩**: ミトコンドリアと女性の病気.
“厚生労働科学研究費難治性疾患等克服研究事業
市民公開講座 ミトコンドリア 健康長寿から病
気まで”. 福井市地域交流プラザ AOSSA (福井
県福井市) (2013年9月16日)

5)村越行高， **末岡 浩**， 五十畑 葵，
泉 陽子， 高橋香織， 佐藤 卓， 櫻井友義，
佐藤健二， 中林 章， 吉村泰典:ミトコンドリ
ア DNA copy 数と卵子容積が胚発達へ及ぼす影響.
“第58回日本生殖医学会”。（2013 .11.15 - 16）

ポスター

6)水口雄貴， **末岡 浩**， 佐藤 卓，
泉 陽子， 高橋香織， 櫻井友義，
村越行高， 佐藤健二， 中林 章， 吉村泰典:
Multiple displacement amplification (MDA) を
用いたミトコンドリア病に対する新たな汎用性着
床前遺伝子診断法の確立. “第58回日本生殖医
学会”。（2013 . 11.15 - 16）ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1 . 特許取得
なし

2 . 実用新案登録
なし

3 . その他
なし