

# 細胞質置換を用いたミトコンドリア遺伝病の遺伝子治療確立と難治性不妊克服への挑戦

東北大学病院 総合周産期母子医療センター 准教授 立花 眞仁

## 要約

エストロゲン受容体陽性のルミナル型乳がんの再発は患者の予後を決める上で重要な因子であり、克服すべき大きな臨床上的問題である。術後の最初の5年以内のホルモン内分泌療法は再発リスクを有意に減少させるが、治療後10～20年経過した後に突然再発する腫瘍もある。最近の基礎研究において、長鎖非コードRNA（以下、lncRNAと略す）が腫瘍の発生、進行、転移など様々な過程において関連していることが明らかになってきている。lncRNAの中には、腫瘍の組織や細胞に特異的に機能するものも一定数あることから、申請者は未知のlncRNAの機能を解明することで、腫瘍の再発に関する新たな知見が得られるのではないかと仮定した。本研究課題では、遠隔転移を起こした患者と再発の兆候のない患者から得られた原発腫瘍24例の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、腫瘍の再発に関連して発現するlncRNA群を同定した。それらのlncRNAの中で、特に、NR2F1-AS1（Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 1 Antisense RNA 1）が、エストロゲン受容体陽性のルミナル型乳がん細胞におけるホルモン受容体（エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体）の発現との間に相関関係があることを見出した。さらに、NR2F1-AS1の発現亢進は、休眠誘導因子や多能性マーカーの発現亢進により、がん細胞を休止状態に誘導し、転移に関連する遺伝子経路を活性化することが示唆された。本研究で得られた結果は、エストロゲン受容体陽性乳がんの再発過程におけるNR2F1-AS1の動態を明らかにし、治療法としての可能性を持つ新たなバイオマーカーを示すものであり、臨床への応用が期待される。

## はじめに

全ての真核生物はミトコンドリアを有し、各ミトコンドリアは数コピーの固有の遺伝子（mtDNA:ミトコンドリア遺伝子）を有する。ミトコンドリア遺伝子がコードする遺伝子は37と核遺伝子に比して少ないが、細胞活動に重要なエネルギー adenosine triphosphate（ATP）の産生や細胞死（apoptosis）に関与する。ミトコンドリア遺伝子の突然変異の頻度は核遺伝子の約10倍の頻度で起こると考えられ、おそらく高濃度のフリーラジカルの蓄積やヒストン等の蛋白を欠如した構造に起因するDNA治療機転の欠如が原因ではないかと考えられる。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、十分に長く生きるとミトコンドリア病と同様なミトコンドリア機能不全を呈し、細胞活動が停止する[1]。

ミトコンドリアの遺伝子継承は核遺伝子とは異なっており、母系遺伝である。よって、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、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、さらに次世代への伝搬を防止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[2]、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。本邦におけるミトコンドリア病の正確な患者数は把握されていないが、全国におよそ数万人いると推定されている。文献的には約3500-6000人に一人の割合でミト

コンドリア病に罹患しているか、ミトコンドリア異常に起因する疾患のリスクを持つとされている[3]。多くのミトコンドリア遺伝病罹患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。疾患が臨床上表現型として現れるには、変異体の割合（つまりHeteroplasmyの割合）が関与し、Mutant load（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域値を超えた場合に臨床像が明白になる（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の顕在化し、90%ではより重篤な症状を呈するといったもの）。ヘテロプラスミーの割合は母子間、及び同胞間で変化しうることが知られている。現在考えられている機序の代表的なものにはgenetic bottleneck効果がある。Bottleneckは変異体の急速な排除、もしくは疾患の発症に繋がる変異体の蓄積を生じる[4]。また、初期胚の発生においては、核遺伝子が個々の割球へ等分に複製されていくのに対し、複製を伴わないミトコンドリアの分配において不均等分布を指摘する報告もある。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、組織特異的及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疾患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。

つまり、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、前述のようにこれらの障害の多数がmtDNAの変異体の割合（Heteroplasmy）や閾値効果と結びついており、更に組織間で変異体の割合（Heteroplasmy）の差を生じることから、移植前もしくは出生前の遺伝子診断に基づく正確なカウンセリングの提供を困難なものとしている。つまり一部の検体が固体全ての結果（表現系）を反映しない可能性がある。分割期の着床前診断を例にとると、変異体の割合の低い割合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、発生初期のミトコンドリア遺伝子の継承を分子生物学的に明らかにすることや、母子間での変異mtDNAの伝搬を完全に防止することができる新たな治療法の開発が望まれている。

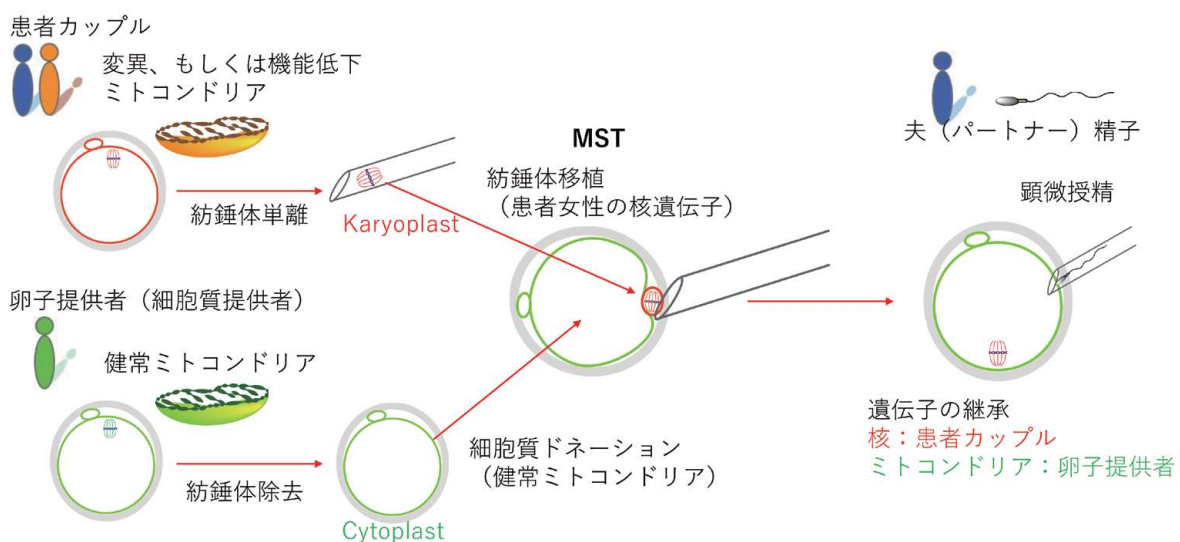


図1. 成熟卵紡錘体置換 (Maternal spindle transfer: MST) 法

我々の提唱する臨床応用モデルを示す。細胞質ドナー卵子（ドナー卵子を想定）からは核遺伝子が除去、廃棄され、健康なmtDNAを含む細胞質（Cytoplasm）のみが提供される。紡錘体ドナー卵子（患者卵子を想定）からは核遺伝子を含む紡錘体-染色体複合体（Karyoplast）のみが単離され、提供者の細胞質（Cytoplasm）へ移植、融合される。本法により再構築された卵子は夫（パートナー）の精子による受精にて、核遺伝子は患者カップルのものを継承し、ミトコンドリア（ミトコンドリア遺伝子）は卵子提供者（細胞質提供者）に由来する。（Tachibana et al., Nature 2009より改変）

## 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 (MST法) の開発

そこで、我々は成熟卵 (MII期) で細胞質を置換することにより、変異ミトコンドリアの伝搬を排除する成熟期卵紡錘体置換 (MST) 法が有用と考えた(図1)[5]。これまで動物モデルを中心として、種々のART技術が変異mtDNAの伝搬防止のために提唱されてきているが、成熟卵子 (MII期) を用いた治療モデルの開発は種々のアドバンテージを持つ。第一に、MII期卵子は現在行われているART治療において汎用されており、卵核胞 (GV) 期卵子を用いたgerminal vesicle transfer (GVT) のような体外成熟培養を要しない。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倫理的な問題を回避できる可能性がある。第三に、成熟卵子は第二減数分裂中期で停止しているが、霊長類卵子を用いた検討からその分裂紡錘体にはミトコンドリアの集積が認められないため、患者卵子から紡錘体-染色体複合体を分離する際に異常なミトコンドリアの持ち込みを最小限にとどめることができる。我々は、MII期の紡錘体置換において大きな障壁であった、1) 核膜を持たない分裂中期紡錘体の可視化と単離、2) 染色体 - 紡錘体の感受性により操作の間に早期活性化 (premature oocyte activation) の克服のため、非侵襲的な紡錘体の可視化システムであるOosight™ (CRi inc)、レーザーシステム (XYClone Red-i laser objective, HAMILTON THORNE)、そして細胞融合に不活化センダイウイルスエンベロープ (HVJ-E; GenomeONE-CF, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd) を用いた[5]。我々はこれらを組み合わせる事によって上記の問題を克服し、遺伝背景の異なるアカゲザル卵子間において紡錘体-染色体複合体 (Karyoplast) を置換、つまり細胞質を効率的に置換することに成功した。なお、すべての実験はオレゴン健康科学大学 (OHSU) /オレゴン国立霊長類研究所 (ONPRC) のInstitutional Animal Care and Use Committee (AICUC) の承認を得て行った。MST法により再構築された卵子の胚盤胞発生率 (61%) はICSI胚 (60%) と遜色なかった。MST胚をレシピエント

移植した結果3匹が妊娠 (妊娠率33%) 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産仔が誕生した。また、MST胚より3つの胚性幹 (ES) 細胞を樹立したが、この樹立効率 (33%) も対照群と同等であった。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、いずれの産子やES細胞も核遺伝子は紡錘体-染色体複合体のドナー (spindle donor) に、mtDNAは細胞質ドナー (cytoplast donor) に由来していた[5]。

MST法により置換後に紡錘体ドナー由来のミトコンドリア遺伝子キャリアオーバーを、サブクロニング法、PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法とreal-time PCRの3つの方法を用いて検出を試みた。それぞれの検出感度は3%、5%、3%であったが、いずれの検討においてもSpindle donor由来 (患者を想定) のmtDNAは検出されなかった。つまりMST法により、Cytoplast (健全な細胞質ドナーを想定) 由来mtDNAにほぼ完全に置換できることを証明した。本法においてはHVJ-EをKaryoplast-cytoplast融合に用いたが、RT-PCRを用いた検討では産子の胎盤、および樹立したES細胞からHVJ-Eウイルスゲノムの増幅は認めなかった[5]。

この結果、MST法は細胞質をほぼ完全にドナー細胞質に置換する信頼性の高い技術として、ミトコンドリア遺伝病の伝搬防止へ向けた配偶子系列遺伝子治療として考慮された。そこで、本法の臨床応用に向けたさらなる検討として、まずMST産仔のフォローアップとして30ヶ月間の成長と血液生化学検査、生後のヘテロプラスミーの変化を検討した。MST産仔はONPRCのコロニーにおいて飼育されているアカゲザルと同様な成長を示しており、血液生化学データも異常を認めなかった。また、生後の紡錘体ドナー由来ミトコンドリア遺伝子の有意な増加も認めなかった[6]。

次に、臨床応用を見据えた課題として、同期した排卵誘発の回避が考えられた。MST法は、施行当日に患者卵子と健全なドナー卵子 (少なくとも患者卵子と同数) を必要とする。この同期した排卵誘発の問題解決には、凍結融解卵の使用が有用と考えられる。そこで、アカゲザル卵子を用いた凍結融解卵と新鮮卵で細胞質 (紡錘体) を置換するMST法を行って、そのIn Vitroでの胚発育の検討や胚性幹細

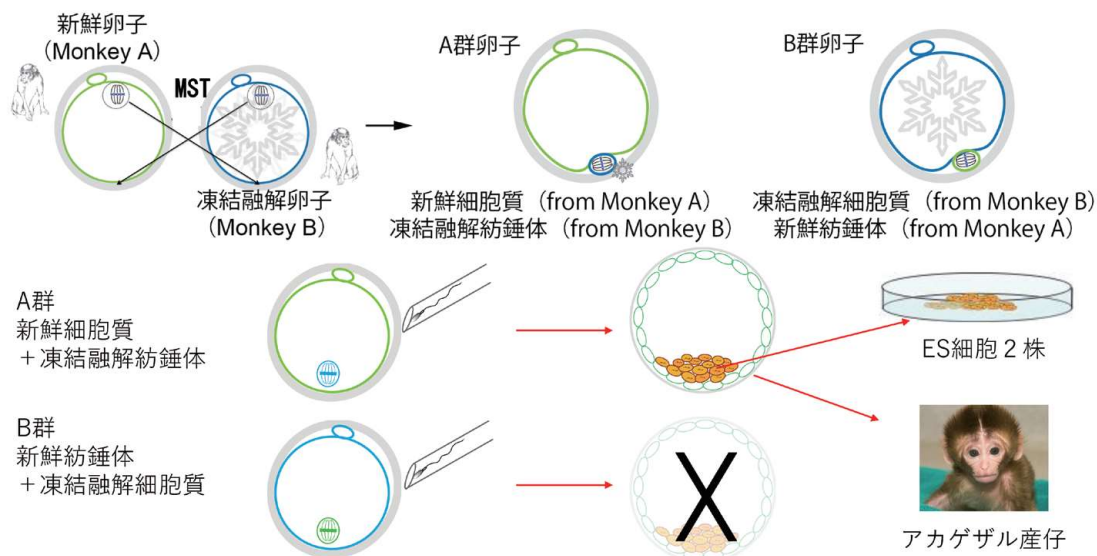


図2. 凍結融解卵と新鮮卵でのMSTを用いた細胞質置換

サルにおける凍結融解卵を用いたSTの結果を示す。2匹のアカゲザルより採取された卵子は、一方が凍結融解操作を受けた後にSTに寄与された。すなわち、新鮮な細胞質に凍結融解を受けた紡錘体（染色体）が導入された群（A群）と凍結融解を受けた細胞質に新鮮な紡錘体が導入された群（B群）が生じる。凍結融解紡錘体+新鮮細胞質（A群）の胚盤胞からは、正常核型を有する2つの胚性幹細胞株を樹立可能であり、移植により健康な雌のアカゲザル産仔を得た。一方、新鮮紡錘体+凍結融解細胞質（B群）は胚盤胞への発生を認めなかった。（Tachibana et al., Nature 2013より改変）

胞樹立、および産仔の回収を試みた。胚盤胞到達率は、対象（ICSI群:57%）、凍結融解紡錘体+新鮮細胞質（A群:68%）、および新鮮紡錘体+凍結融解細胞質（B群:0%）であった（図2）[6]。つまり、凍結融解操作におけるダメージは卵細胞質に生じ、凍結融解を行った紡錘体は新鮮卵細胞質への移植によりICSI胚と遜色の無い胚発育を示した。凍結融解紡錘体+新鮮細胞質（A群）の胚盤胞からは、正常核型を有する2つの胚性幹細胞株を樹立可能であり、移植により健康な雌のアカゲザル産仔を得た。つまり、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、健康な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、同期した排卵誘発の問題解決が可能と考えられた。また、MSTは細胞質に生じたダメージをレスキューすることから、細胞質因子による不妊や凍結未受精卵を用いたARTの成績を改善しうる可能性も示唆された。

最後にヒト卵子における実現可能性を検証するため、OHSU/ONPRCのAICUCとOHSU Embryonic Stem Cell Research Oversight Committee、及びIRBの認証を受けて実験を行なった[6]。ヒト卵を用いたMSTにおいては、約半数が3前核などの異常受精を示したが、これはヒト卵子特有の高感受性による早

期活性化と考えられた。しかしながら、正常受精したMST胚（62%）が胚盤胞へと発育し、対照群のICSI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（38%）と対照群（56%）で同等であった。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、より鋭敏な定量PCRであるARMS（Amplification Refractory Mutation System）-qPCRによる紡錘体ドナー由来のミトコンドリア遺伝子のキャリアオーバーは0.01～1.7%であり、アカゲザルの実験同様にほぼ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。異常受精の原因検索としてヒトMST再構築卵の免疫組織化学的検討を行ったところ、一部のMST卵子は減数分裂の再開によりICSI時には分裂後期へと進展していた事を明らかとした。これは、ヒト成熟卵特有の過敏性からMST操作、特に高濃度のHVJ-E暴露により早期活性化が生じていたと考えられ、後にHVJ-E濃度の調整によって解決済みである[7]。

2015年、本法を含むミトコンドリア置換は英国で世界初の配偶子系列遺伝子治療として議会を通過した。この過程においては、英国ヒト受精・胚研究規制庁（Human Fertilization & Embryology Authority: HFEA）が政府の依頼を受けての長期間

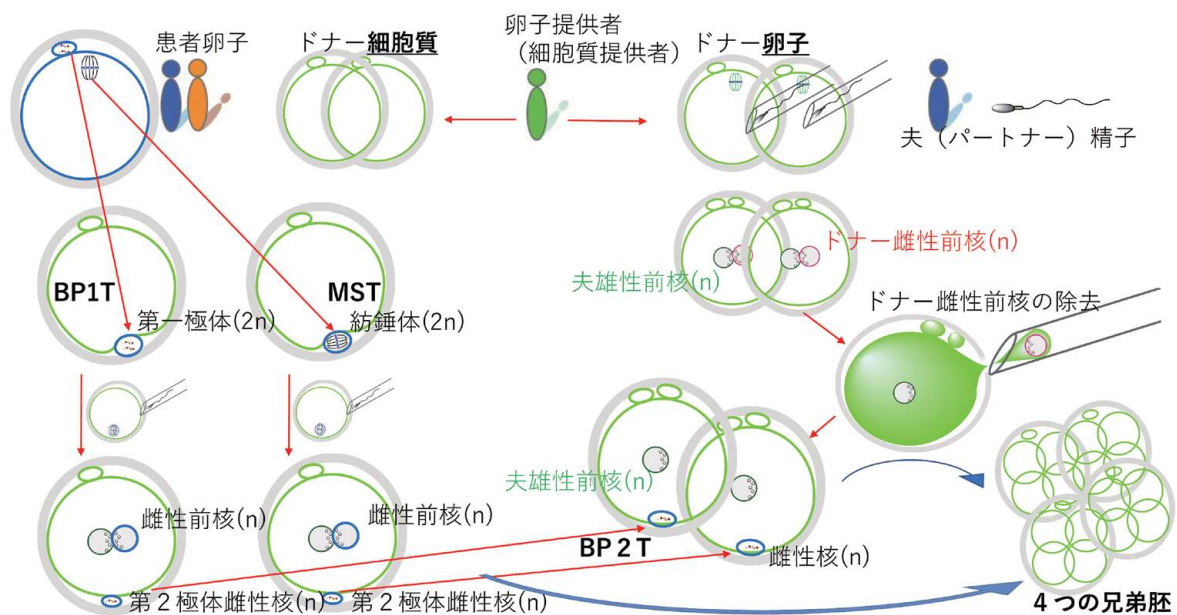


図3. 種々のMRTを用いた兄弟胚作成

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（Cytoplasm）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による受精によりは2つの兄弟胚が作成される。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胞腔へ放出する。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、更に2つの兄弟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つの兄弟胚を作成することが可能である。（Tachibana et al., Reprod Med Biol 2018より改変）

の科学的審議や広範な世論聴取が行われた。また、生命倫理を統括するNuffield Council Bioethicsの見解では、この技術の結果について更なる知見が得られるよう、その子供と家族が適切なカウンセリングを受け、長期フォローが確約される必要があるとしている。更に、この目的をサポートするため、英国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と進言されている。これに従い、英国ではHFEAの管理下にライセンスと登録を行っての臨床試験に入り、患者家族は長期間のフォローを受けることになる。MST法が、有効な治療法がないミトコンドリア遺伝病の配偶子系列遺伝子治療として、適切なカウンセリング、情報提供、サポートが行われている状況で罹患患者家族に対して行われる場合には倫理的であると考えられる一方、予想されない未知の影響など、今後も検証すべき課題はある。

### 細胞質移植/置換の不妊治療への応用の可能性

近年の晩婚化から、低品質卵による反復IVF不成功例が大きな問題となっており、打開策の開発が急

務である。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4977bp欠失の蓄積が知られている[8]。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する可能性を秘めている[9]。実際、現在ギリシャにおいて行われているMST法の臨床試験において、これまでに5名の生児が誕生している。

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3つ分の細胞質を犠牲にし、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、エネルギー基質などを蓄えている。極体として囲卵腔へ放出される極体の核遺伝子も、細胞質の供与があれば、MRTの一つであるPolarbody transfer (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[10]。つまり、MRT技術組み合わせによって、通常生命に寄与しない極体の核遺伝子をドナー細胞質へ移植することで4つの兄弟胚を作成することが可能となる(図3) [9]。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、高齢不妊女性における低採卵数の克服や、がん生殖の医療の医学的適応による卵子凍結において凍結卵数に限定された治療機会を増やしつつ細胞質機能を補う有用な手段となる可能性を秘めている。

## まとめ

MST法は、ミトコンドリア病発症と伝搬にリスクを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事により、純粋な細胞質機能の比較評価を可能とし、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。また、一般不妊治療においても、卵子提供に代わり、自身の遺伝子を継承した児を得る不妊症治療のブレイクスルーとなる可能性がある。更に、種々のMRTの応用により、細胞質の供与があれば通常生命に寄与しない極体の核遺伝子も利用した生殖の機会を広げる可能性を秘めている。しかしながら、MRTは前述のように配偶子系の改変にあたり、第三者のMtDNAと核遺伝子の協調やHeteroplasmyの問題、倫理的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、更なるエビデンスの蓄積と安全性の検証が望まれる。

## 参考文献

1. Westly, E., When powerhouses fail. *Nature Medicine*, 2010. 16: p. 625-627.
2. Wallace, D.C., G. Singh, M.T. Lott, et al., Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 1988. 242(4884): p. 1427-30.
3. Taylor, R.W. and D.M. Turnbull, Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, 2005. 6(5): p. 389-402.
4. Cree, L.M., D.C. Samuels, S.C. de Sousa Lopes, et al., A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet*, 2008. 40(2): p. 249-54.
5. Tachibana, M., M. Sparman, H. Sritanadomchai, et al., Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, 2009. 461(7262): p. 367-72.
6. Tachibana, M., P. Amato, M. Sparman, et al., Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature*, 2013. 493(7434): p. 627-31.
7. Kang, E., J. Wu, N.M. Gutierrez, et al., Mitochondrial replacement in human oocytes carrying pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Nature*, 2016. 540(7632): p. 270-275.
8. Keefe, D.L., T. Niven-Fairchild, S. Powell, et al., Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil Steril*, 1995. 64(3): p. 577-83.
9. Tachibana, M., T. Kuno, and N. Yaegashi, Mitochondrial replacement therapy and assisted reproductive technology: A paradigm shift toward treatment of genetic diseases in gametes or in early embryos. *Reprod Med Biol*, 2018. 17(4): p. 421-433.
10. Ma, H., R.C. O'Neil, N. Marti Gutierrez, et al., Functional Human Oocytes Generated by Transfer of Polar Body Genomes. *Cell Stem Cell*, 2017. 20(1): p. 112-119.