次世代への遺伝伝播を防ぐための
ミトコンドリア病の治療のオプション

1) ミトコンドリア病のスクリーニング

- Preimplantation genetic testing for monogenic/single-gene defects (PGT-M)

2) 核置換技術：変異ミトコンドリアの置換

- 紡錘体置換（Spindle Transfer: ST）法
- 極体核置換（Polar Body Transfer: PBT）法
- 前核期核置換（Pronuclear Transfer: PNT）法

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4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
Wu et al., *Cell Res* 2017

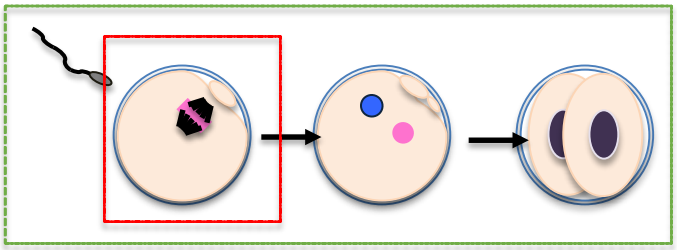
受精後
3. 第二極体核置換法 (PB2T法)

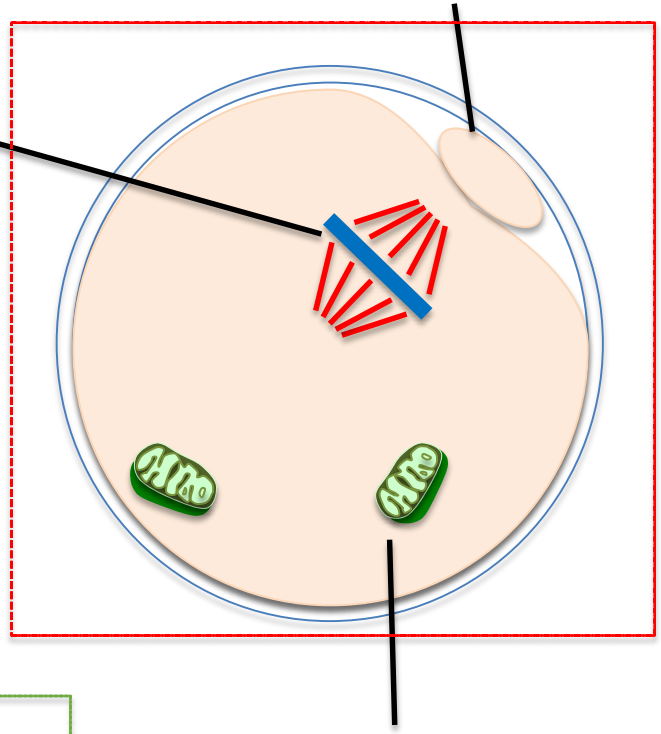
Wang et al., *Cell* 2014
Wu et al., *Cell Res* 2017

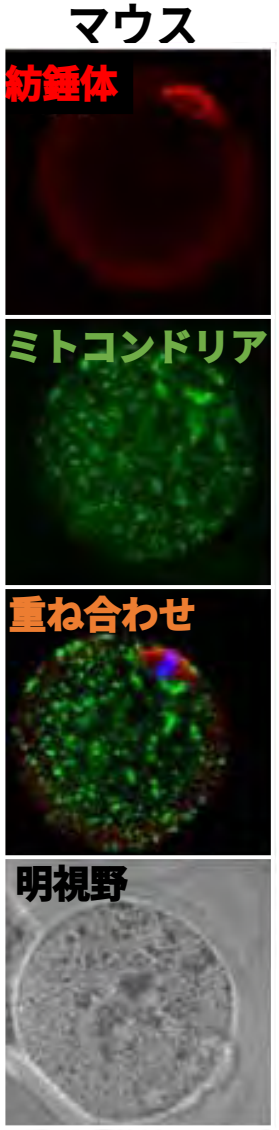
受精後
4. 前核期核置換法 (PNT法)

Craven, Herbert et al., *Nature* 2010
Hyslop, Herbert et al., *Nature* 2016

受精直前の未受精卵は第二減数分裂で停止

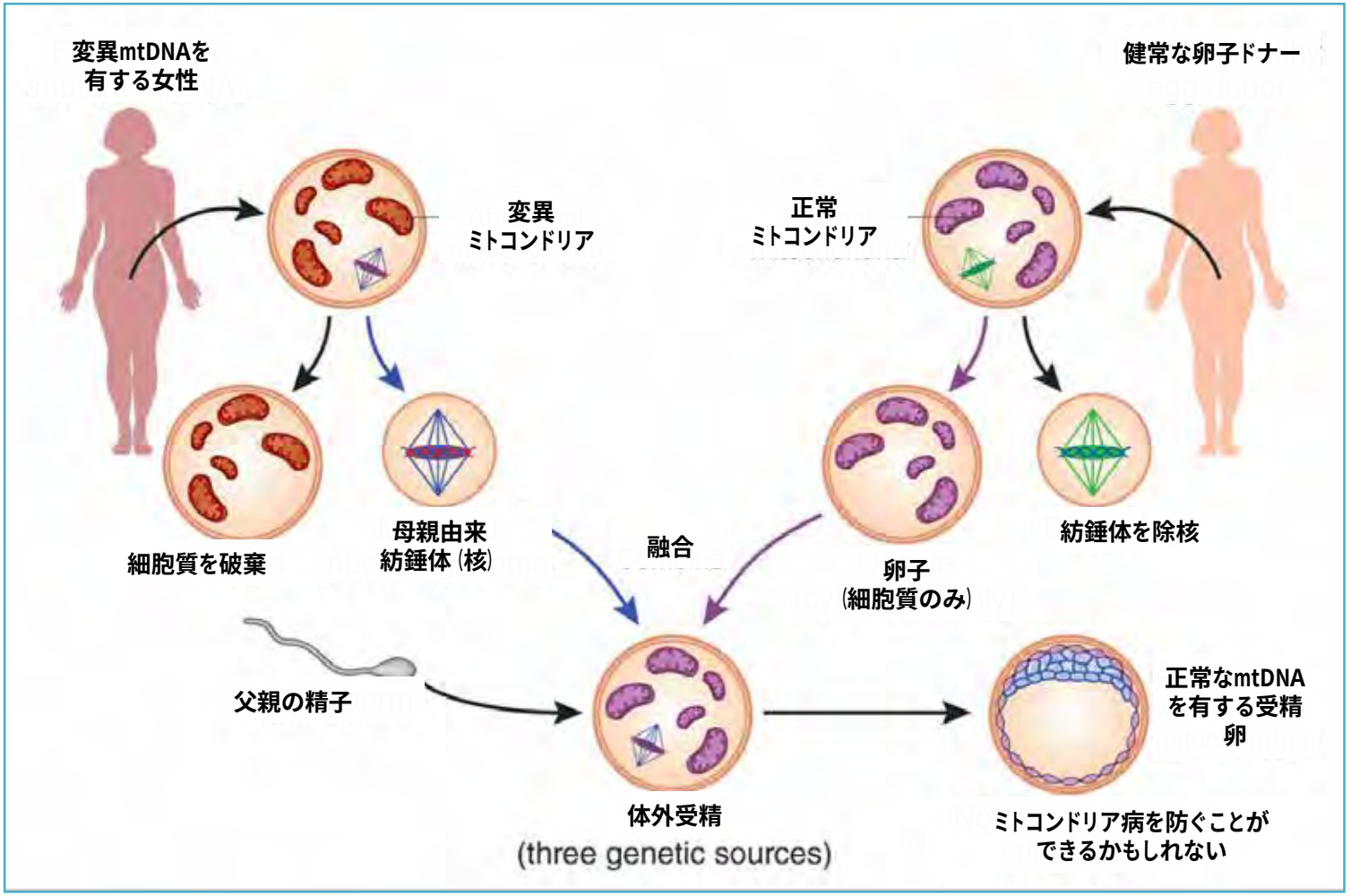






Dalton et al., *Journal of Cell Science* 2011 一部改変

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

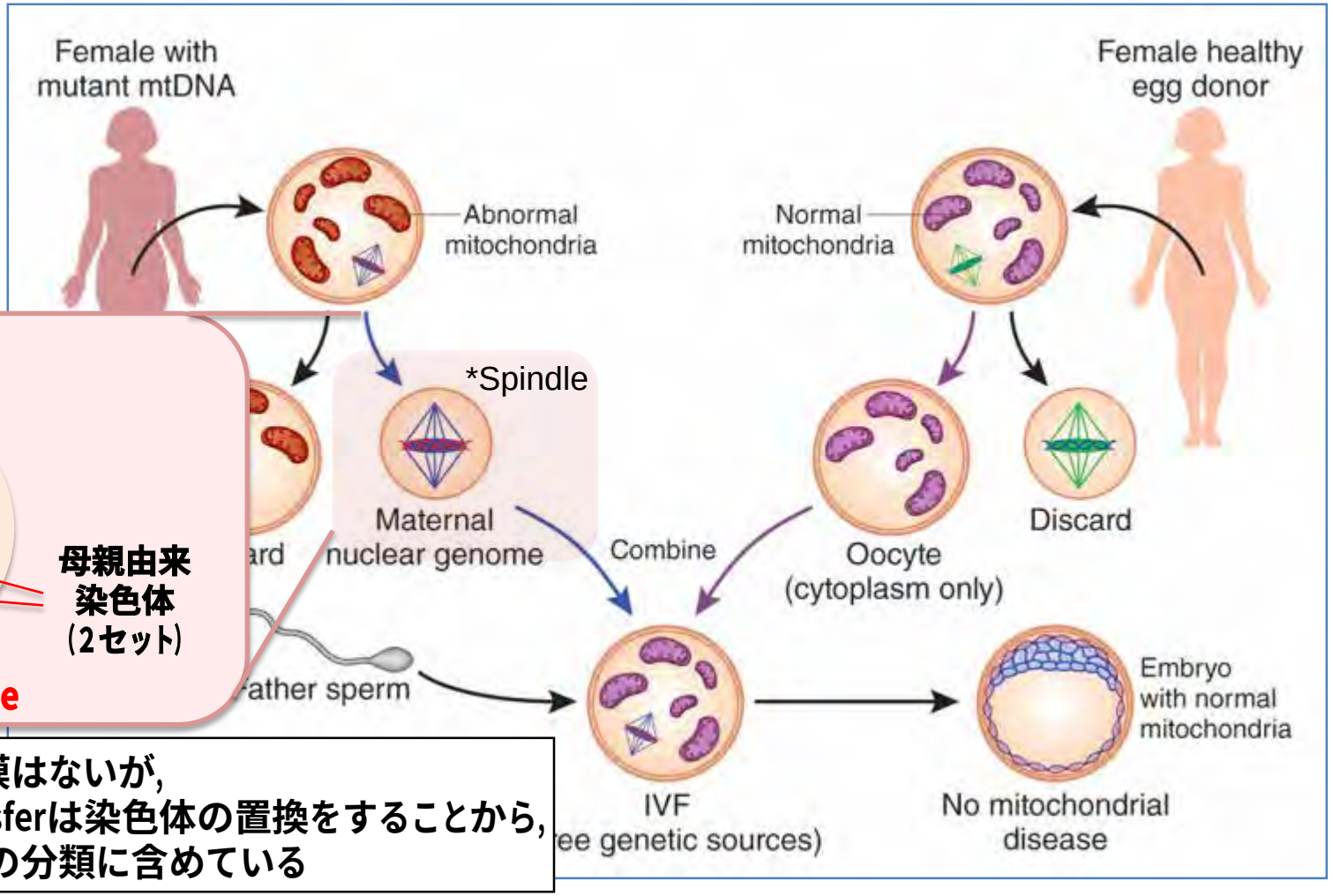


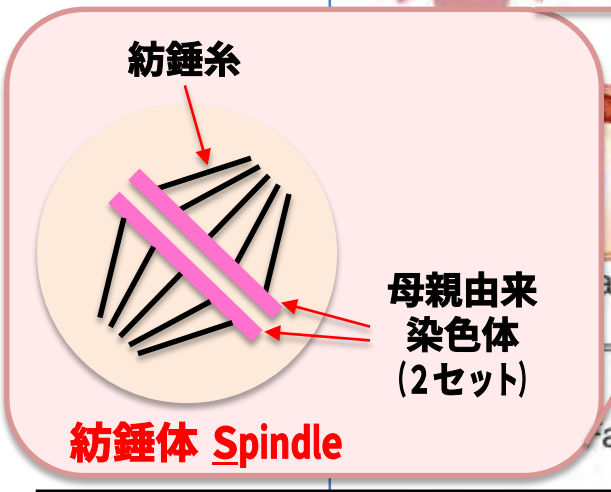
Tanaka et al., *Nat Med* 2013**一部改変**

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





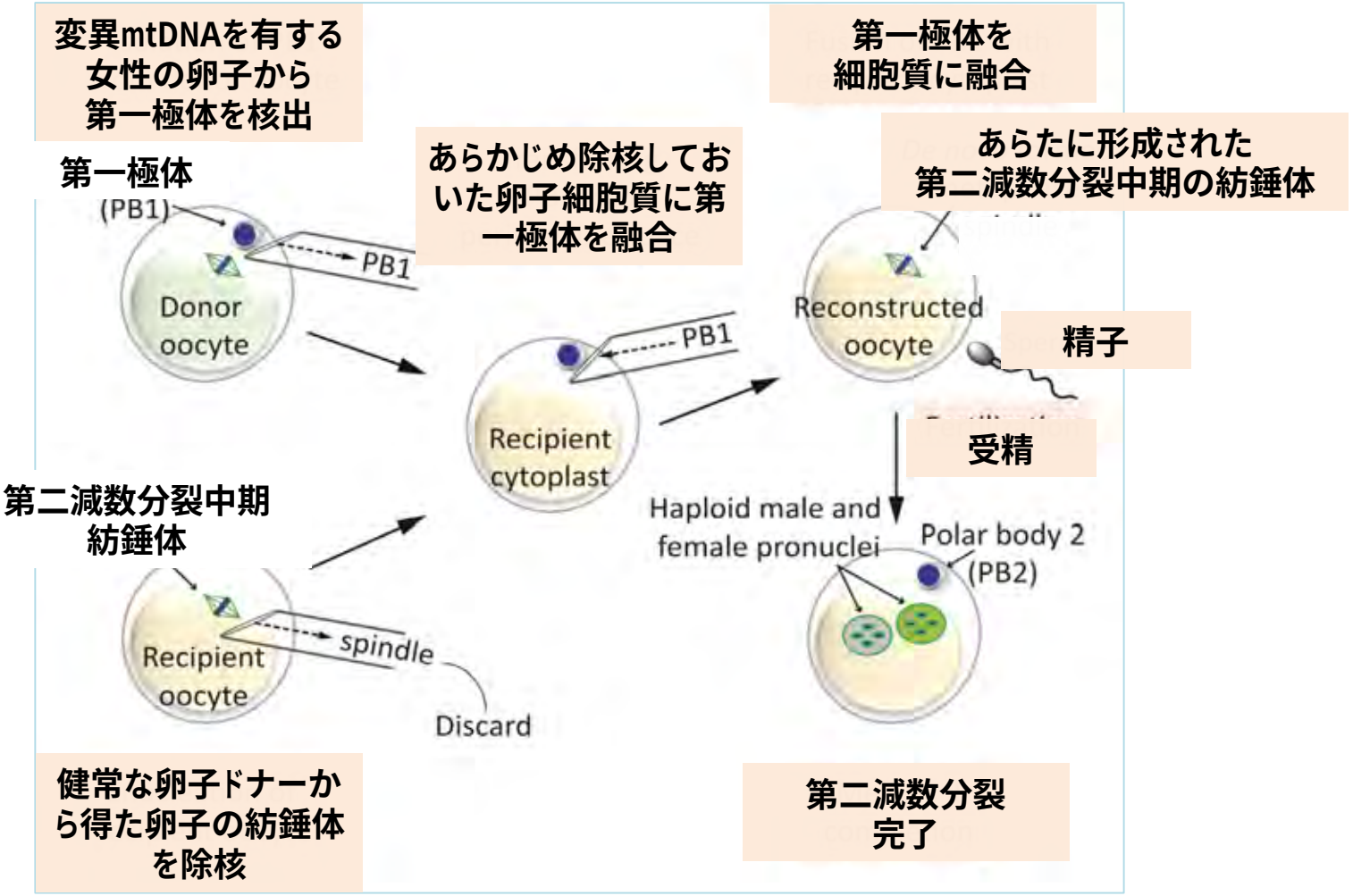
* 紡錘体に核膜はないが,
Spindle　transferは染色体の置換をすることから,
便宜上核置換の分類に含めている

Tanaka et al., *Nat Med* 2013

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

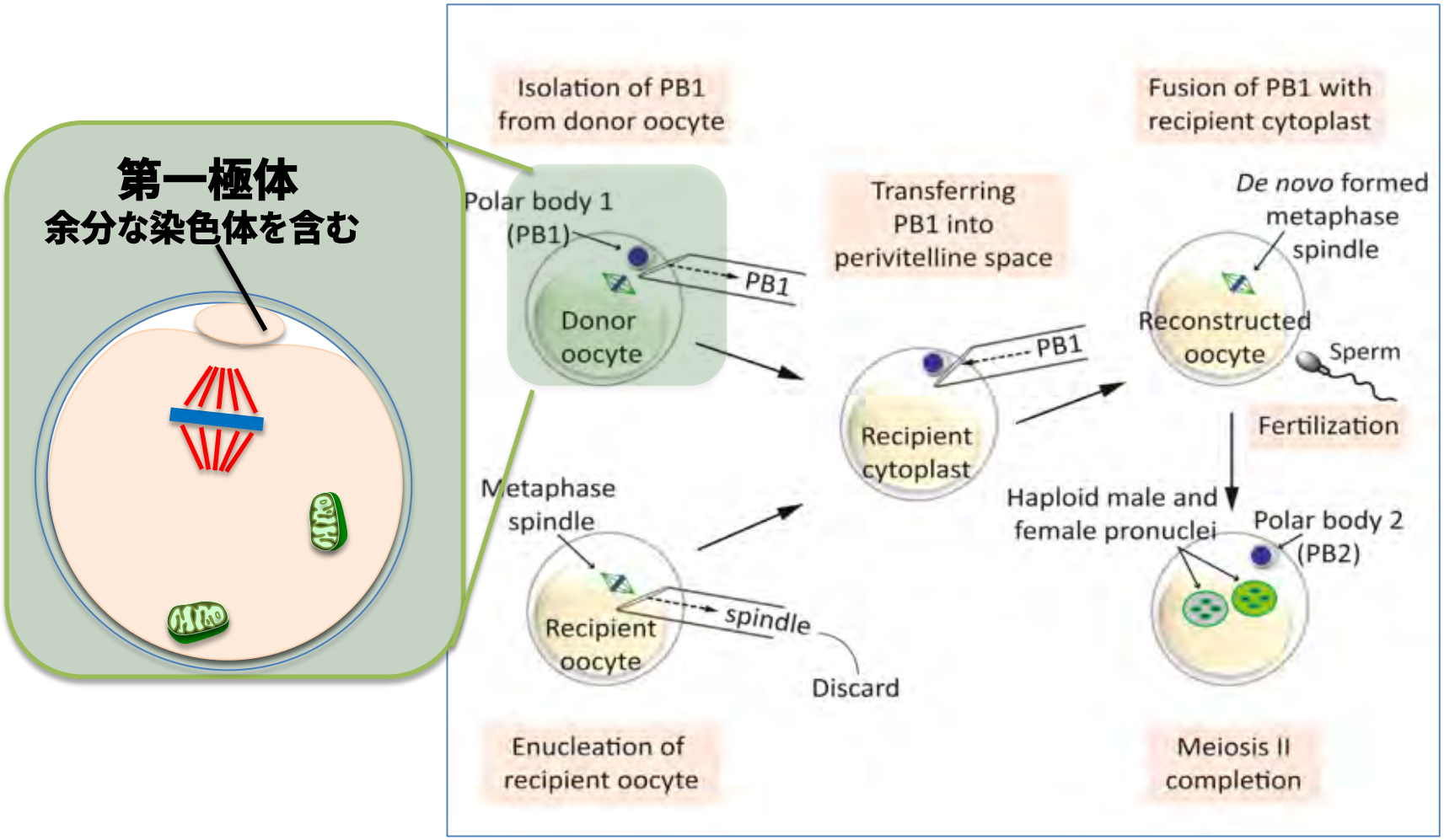


Ma et al., *Cell Stem Cell* 2017**一部改変**

受精前

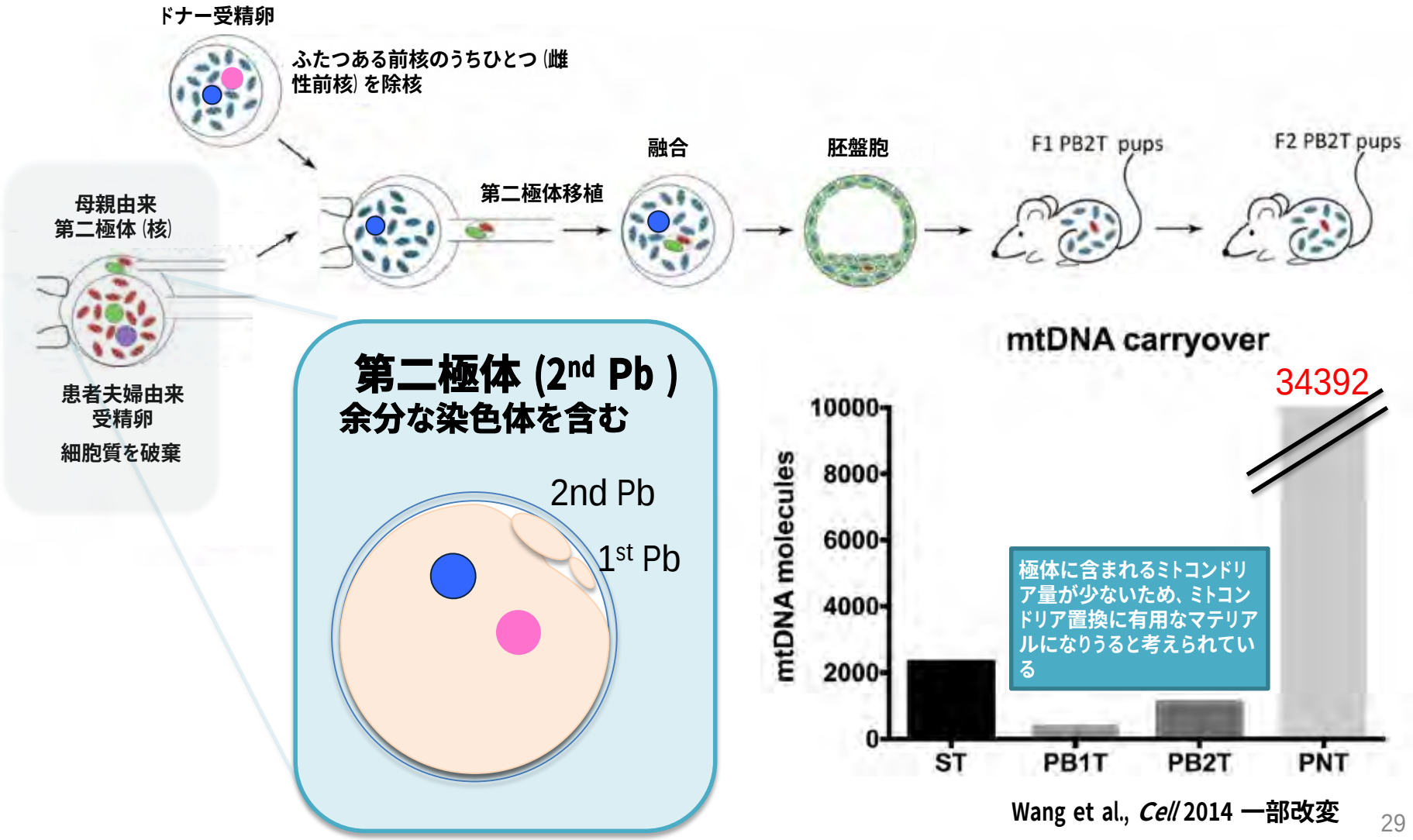
第一極体核置換法 (1st Polar body transfer: PB1T)

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



Ma et al., *Cell Stem Cell* 2017

受精後
第二極体核置換法 (2nd Polar body 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

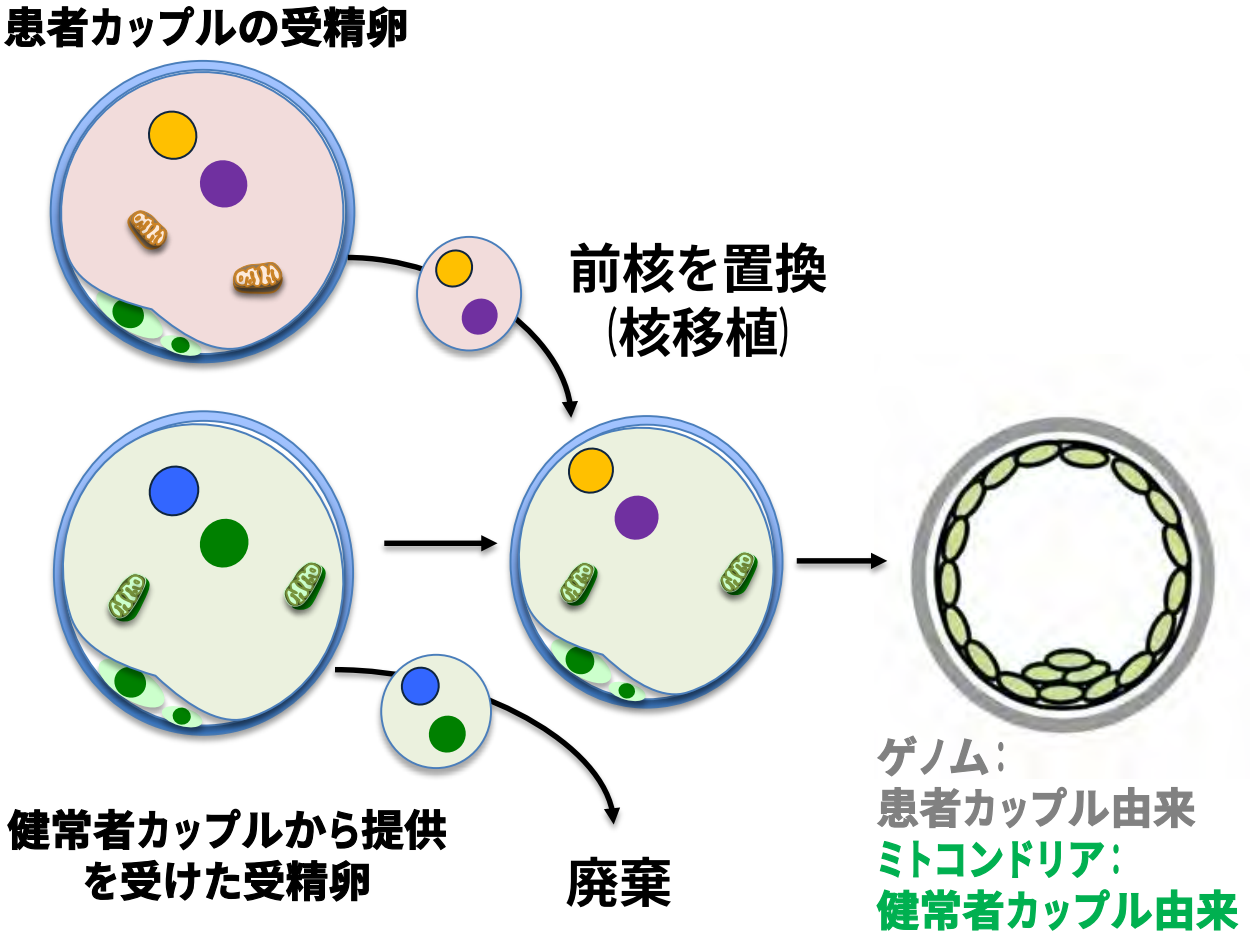


Wang et al., *Cell* 2014 一部改変

受精後

前核期核置換法 (Pronuclear transfer: PNT)

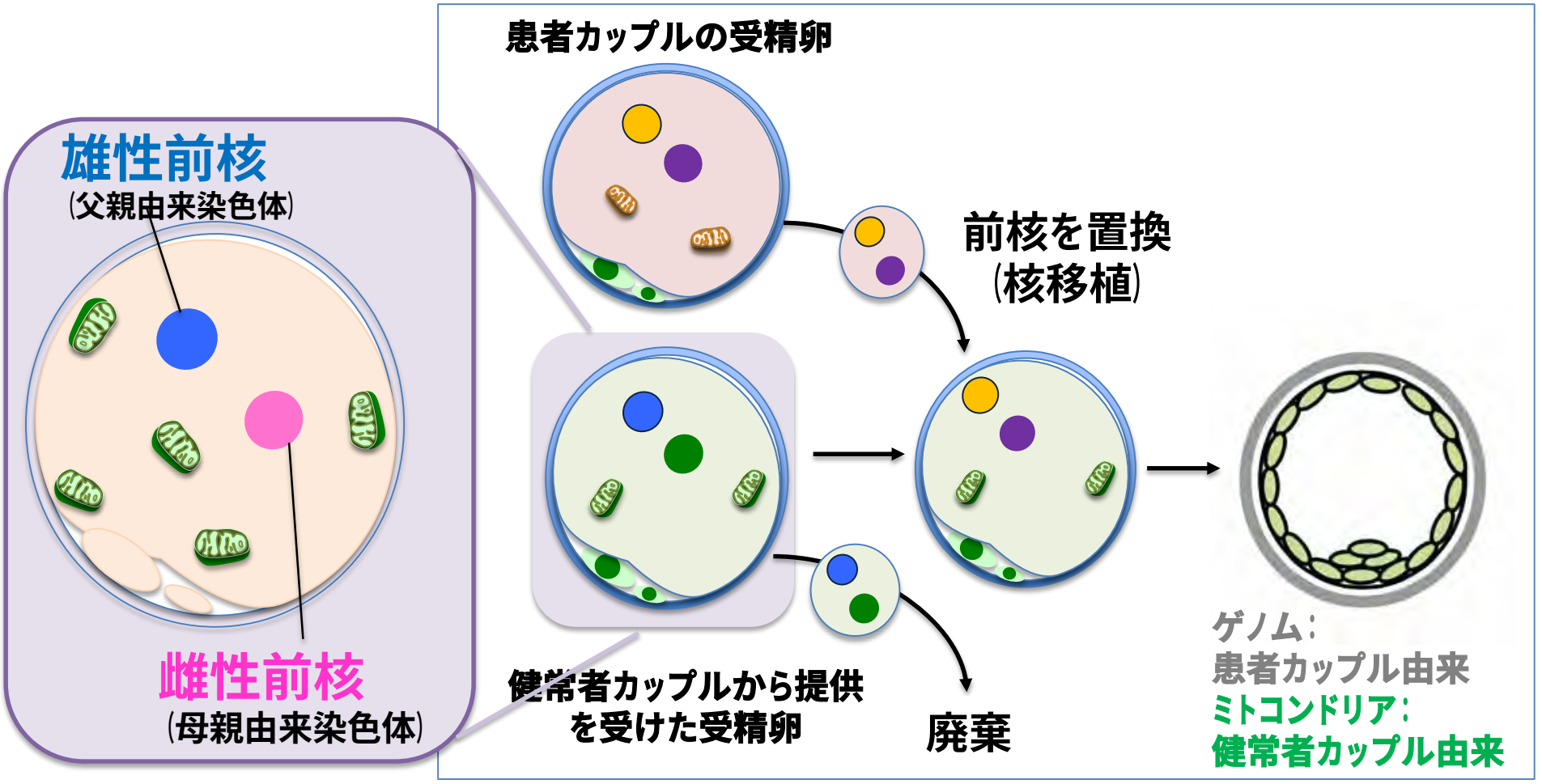
前核期の受精卵の間で核置換 (核移植) を行うことで
ミトコンドリアを置換する



受精後

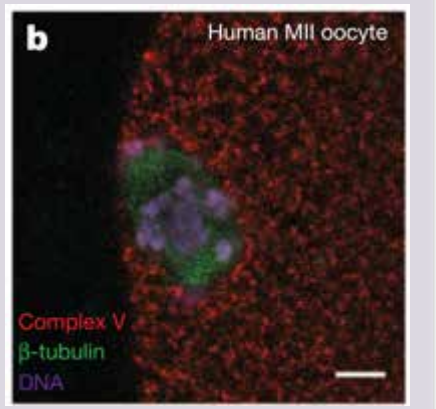
前核期核置換法 (Pronuclear transfer: PNT)

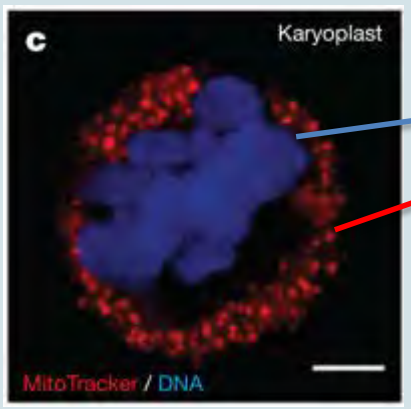
前核期の受精卵の間で核置換 (核移植) を行うことで
ミトコンドリアを置換する



核置換の課題：ミトコンドリアの持ち込み

ヒト卵子の免疫染色

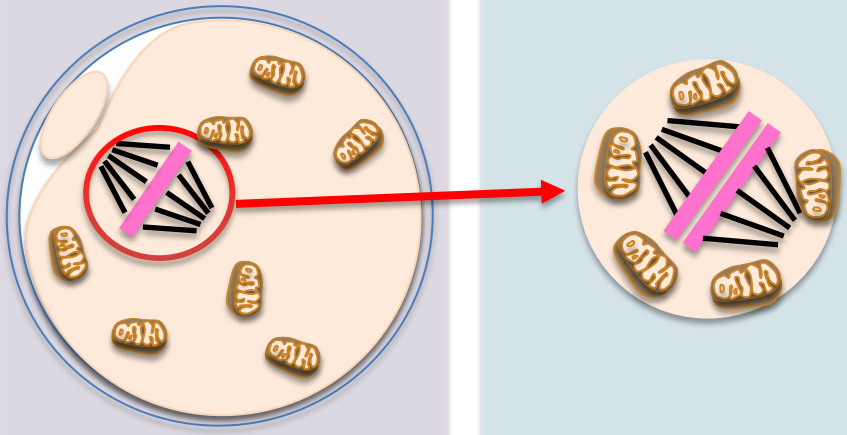




青：DNA（染色体）
赤：ミトコンドリア

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 (PBT), 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)	患者由来卵子	健常な女性由来の卵子	< 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)	患者由来卵子 or 受精卵	健常な女性由来の卵子 or 健常な夫婦由来の受精卵	< 0.5	
第二極体核置換 (PB2T)	患者夫婦由来の受精卵		< 2? (マウス)	
前核期核置換(PNT)	患者夫婦由来の受精卵	健常な夫婦由来の受精卵	2	

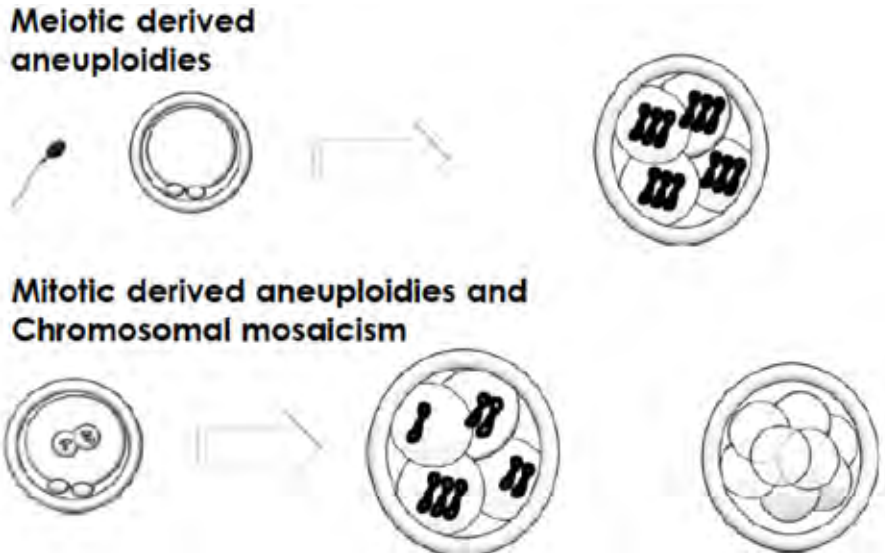
*患者視点で考えたとき：核がホスト、細胞質がドナー

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. 卵子間核置換研究の科学的合理性

卵子から初期胚発生を観察する科学的合理性

1. Mosaic胚を避ける方法



減数分裂期エラー

受精卵のすべての割球が均一に染色体異常となる

体細胞分裂期エラー

2-3の細胞遺伝学的に異なる細胞 (mosaic)

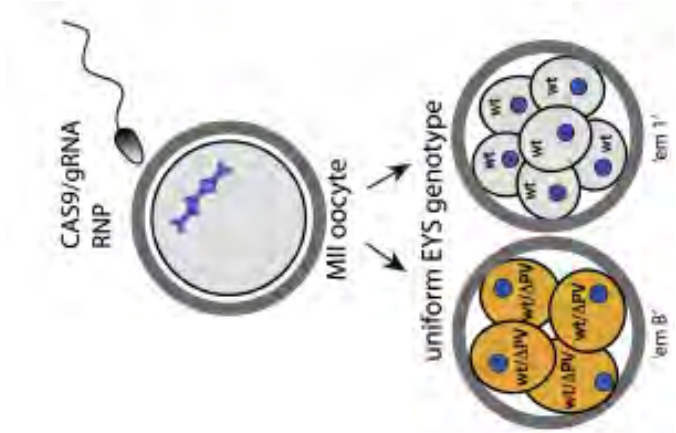
PRE-CONGRESS COURSE 12. The current status of. PGD and PGS. Special Interest Group Reproductive Genetics. Munich - Germany, 29 June 2014

Mosaicは胚生検から胎児の遺伝子型を推測する妨げとなる

卵子から初期胚発生を観察する科学的合理性

1. Mosaic胚を避ける方法

研究事例 I



ヒトMII期でのゲノム編集

インデル (n = 3) 、またはEYSwt対立遺伝子のみ (n = 4) のいずれかの均一な胚 (n = 7) をもたらしたが、2細胞期での注入は、常に3つまでの遺伝子型を持つモザイク胚 (n = 13) をもたらした。

ヒト2細胞期でのゲノム編集

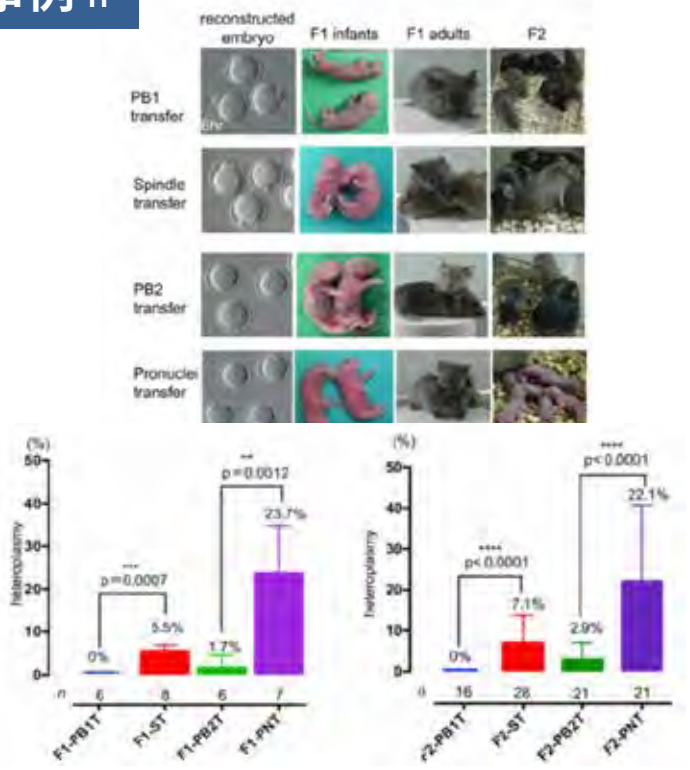
常に3つまでの遺伝子型を持つモザイク胚 (n = 13) をもたらした。

Zuccaro, Egli et al., *Cell* 2020

分割期胚でのゲノム編集や核置換での効果は限定的となる可能性

卵子から初期胚発生を観察する科学的合理性
2. 核置換後のmtDNAの持ち込みを減らす方法

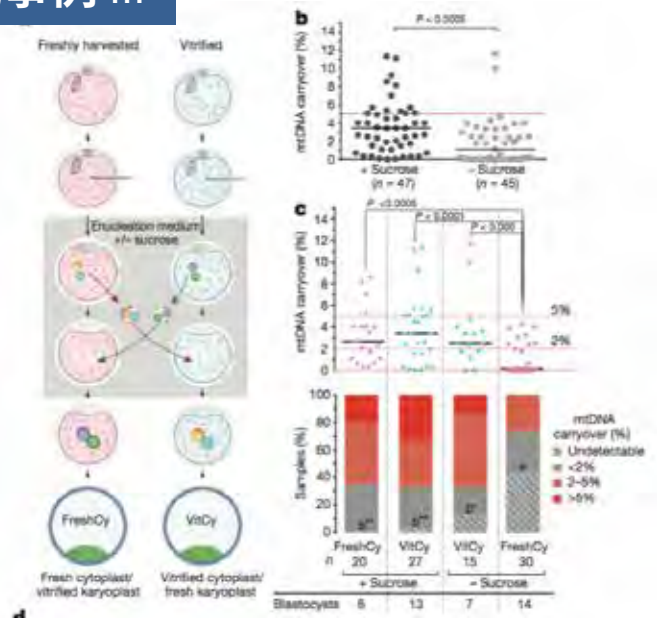
研究事例 II



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 III



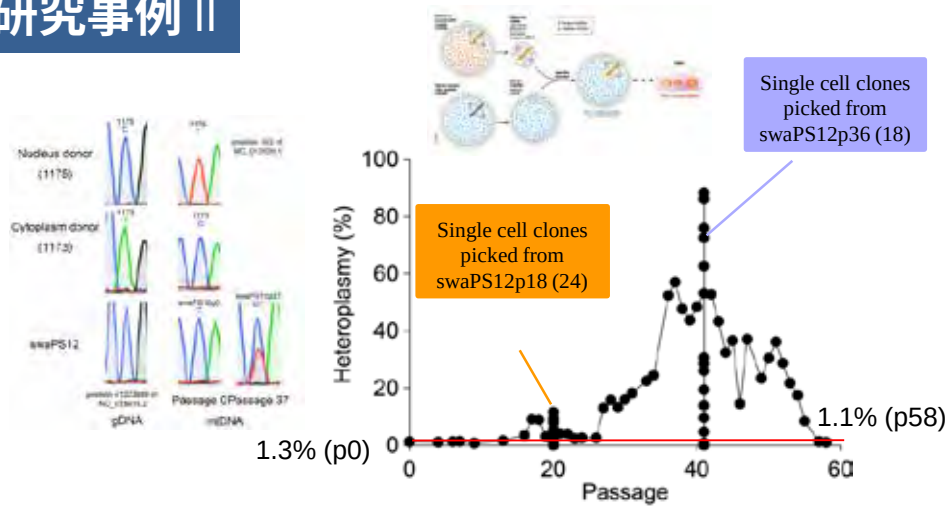
Hyslop, Herbert et al., *Nature* 2016

a. **受精後早い時期の前核期核置換**
b. **除核作業の際にスクロースを除く**
c. **センダイウイルスを希釈**
d. **前核の除核作業の際にスクロースを除く**
e. **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%

卵子から初期胚発生を観察する科学的合理性
3. ミトコンドリアDNA遺伝的浮動

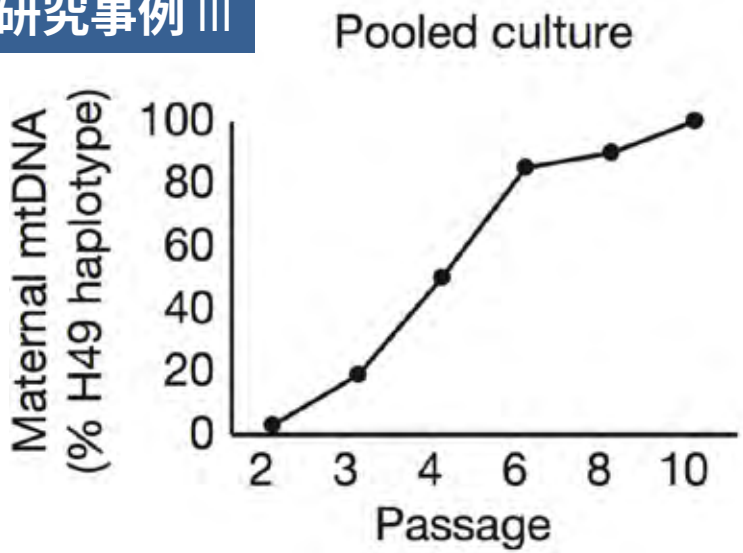
研究事例 II



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 III



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

卵子から初期胚発生を観察する科学的合理性
3. ミトコンドリアDNA遺伝的浮動

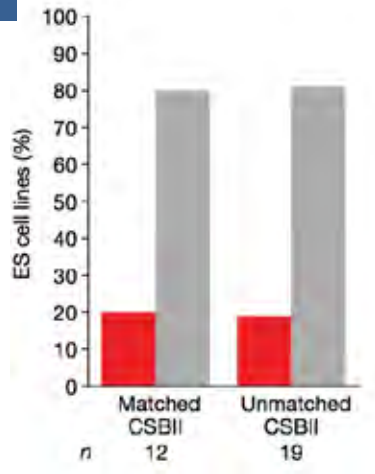
研究事例 IV

Stem cell lines	mtDNA haplotype Nucleus:Cytoplasm	mtDNA heteroplasmy
ST-ES5	H1b:U5a	no mtDNA shift
ST-ES6	H1b:U5a	no mtDNA shift
ST-ES7	U5a:H1b	mtDNA shift
ST-ES8	U5a:H1b	mtDNA shift
36PNT	H:H	mtDNA shift
MR-PS11	L3:HV	no mtDNA shift
MR-PS12	HV:L3	mtDNA shift
NT5	K:L0	no mtDNA shift
NT6	K:L0	mtDNA shift
NT8	K:L0	mtDNA shift

mtDNA haplotypeの組み合わせによるmtDNA複製の優位性に関するevidenceは示されていない

Yamada, et al., *IJMS* 2020**改変**

研究事例 V



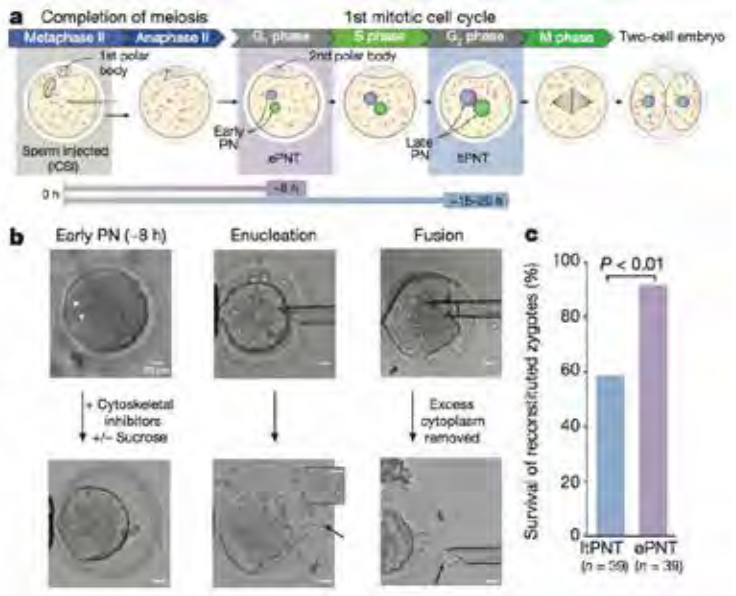
mtDNA複製開始点CSBIIのhaplotypeの組み合わせによるmtDNA複製の優位性に関するevidenceは示されていない

Hudson, Herbert, et al., *Nature* 2019

ミトコンドリアDNA（mtDNA）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

卵子から初期胚発生を観察する科学的合理性
4. 核移植を行うタイミングと胚発生率

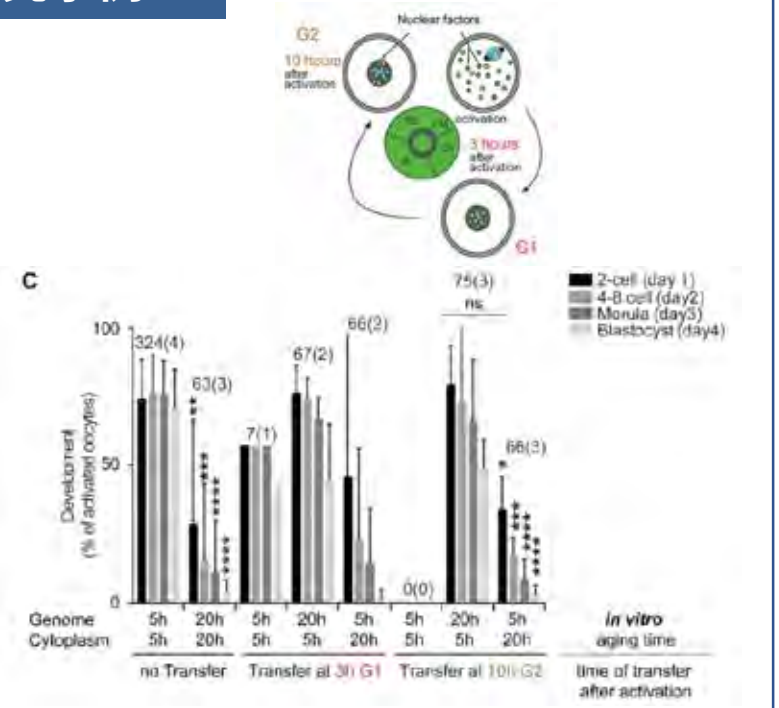
研究事例VI



受精後早いタイミングの前核期での核置換後のヒト胚発生率は良好

Hyslop, Herbert et al., *Nature* 2016

研究事例VII



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しうる

社会的合理性
疾患の病態解明や治療法開発への期待

胚移植を禁止とするための根拠

- 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

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

- ミトコンドリアの動態を介した疾患の病態解明につながる可能性
- ミトコンドリア病に対する根本的な治療法はなく、核置換は患者と家族にとって一つの選択肢となる可能性