

ミトコンドリア病と着床前診断

慶應義塾大学医学部産婦人科
末岡 浩

着床前診断

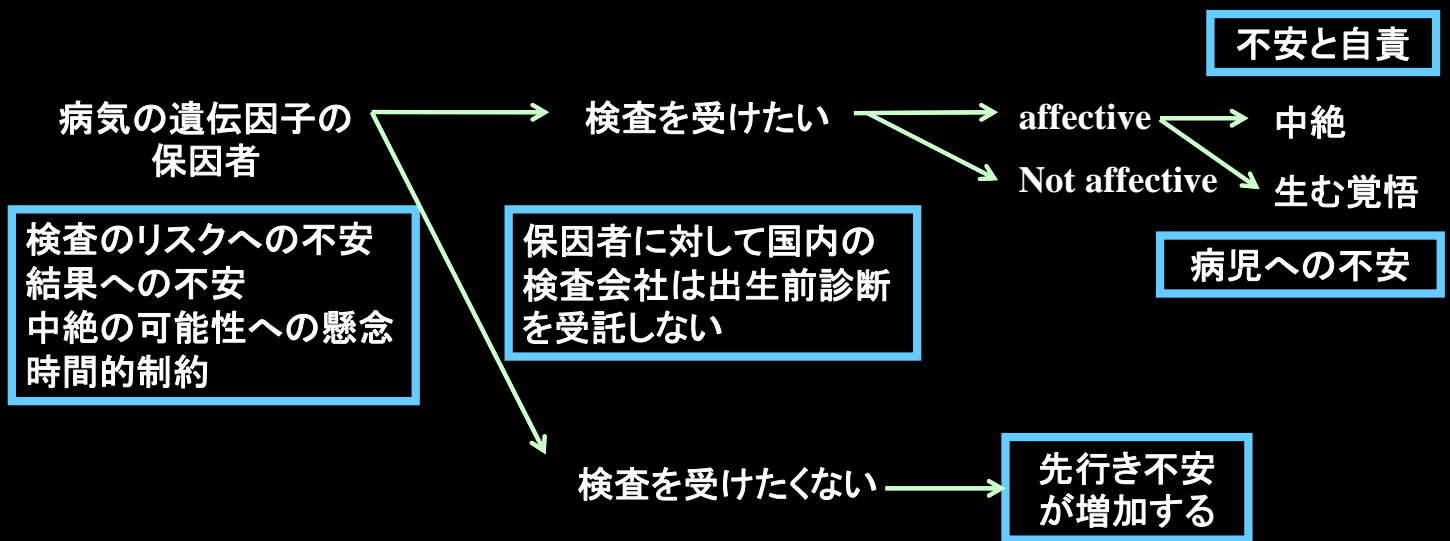
preimplantation genetic diagnosis : PGD

体外受精後 4~8 細胞期胚から 1~2 細胞をとり,
遺伝子診断をし, 正常な胚を子宮内に移植する.



- ・ 世界ではデュシェンヌ型筋ジストロフィーなど単一遺伝性疾患を中心に行われているが日本では2004年7月に着床前診断症例が初めて学会によって承認され実施されつつある状況である.
- ・ mtDNA異常で発症するミトコンドリア病の着床前診断に関しては, 世界的にも多くは行われていない.

妊娠中の出生前診断(遺伝病の保因者)



着床前診断が開発された意図

着床前受精卵の遺伝子診断は、従来の出生前診断(絨毛生検、羊水穿刺)と、それにひき続く疾患児の妊娠中絶に代わる方法として開発された

A.H. HANDYSIDE (U.K.)
Lancet 1989(1): 347 ~ 349

4. 適応と審査対象および実施要件

- 1) 適応の可否は本会において申請された事例ごとに審査される。本法は原則として重篤な遺伝性疾患児を出産する可能性のある遺伝子変異ならびに染色体異常を保因する場合に限り適用される。但し、重篤な遺伝性疾患に加え、均衡型染色体構造異常に起因すると考えられる習慣流産(反復流産を含む)も対象とする。
- 2) 本法の実施にあたっては、所定の様式に従って本会に申請し、許可を得なければならない。なお、申請にあたっては、会員が所属する医療機関の倫理委員会にて許可されていることを前提とする。
- 3) 本法の実施は、強い希望がありかつ夫婦間で合意が得られた場合に限り認めるものとする。本法の実施にあたっては、実施者は実施前に当該夫婦に対して、本法の原理、手法、予想される成績、安全性、従来のお出生前診断との異同、などを文書にて説明の上、患者の自己決定権を尊重し、文書にて同意(インフォームドコンセント)を得、これを保管する。また、被実施者夫婦およびその出生児のプライバシーを厳重に守ることとする。

PGD/PGSを実施するうえでの留意点

1. PGD/PGSは臨床研究である

その中で軽微ではない侵襲を伴う介入研究である

人の医学系研究に関する倫理指針

2. 遺伝学的情報を取り扱う医療である

情報管理および細胞・遺伝子の保管管理が求められる

ヒトゲノム解析研究に関する倫理指針

慶應義塾大学における着床前遺伝子診断の取り扱い疾患（承認）

X連鎖性疾患

Duchenne型筋ジストロフィー
副腎白質ジストロフィー
オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症
耳口蓋指症候群
先天性ミオパチー
Pelizaeus-Merzbacher病

常染色体優性遺伝疾患

筋強直性ジストロフィー
脊髄小脳変性症
骨形成不全症（型）

常染色体劣性遺伝疾患

福山型筋ジストロフィー
先天性表皮水疱症
脊髄性筋萎縮症
ムコ多糖症（型）
MTHFR欠損症
ピルビン酸脱水素酵素欠損症
成熟遅延骨異形成症
拘束性皮膚障害

ミトコンドリア遺伝病

Leigh脳症

染色体異常症

相互転座
ロバートソン転座
同腕染色体モザイク

不承認事例の実際の転帰

- 1) 妊娠を断念
- 2) 出生前診断の選択肢
- 3) 海外で実施
- 4) 倫理未申請施設で実施
- 5) 不明

PGDに用いられる診断技術のステップ

A. 遺伝子増幅

B. 遺伝子解析

PGDの診断法

Mutation	Patient/carrier	PGD
1. Deletion	Southern blot PCR MLPA	Multiplex-nested PCR TaqMan-multiplex PCR WGA*-PCR
2. Point-mutation	PCR-Sequencing	Nested PCR-sequencing PCR-TaqMan PCR WGA*-PCR-sequencing WGA*-TaqMan PCR
3. Duplication	Southern blot MLPA	Multiplex PCR-gene scan
4. Triplet repeats	Southern blot PCR-sequencing PCR-Gene scan	Nested PCR-sequencing Nested PCR-Gene scan
5. mtDNA mutation	RFLP	TaqMan PCR
6. Chromosomal anomaly	Karyotyping	FISH WGA*-CGH WGA*-SNP

* Whole genome amplification

私たち医療人がしなくてはならないこと

- 1 医学の進歩を推進
- 2 障害者の自立支援
- 3 クライアントへのサポート

ミトコンドリア遺伝子

核DNA と mtDNA

核DNA

mtDNA

細胞あたりのコピー数

2コピー

卵子:60万コピー以上

精子:10コピー前後

複製と分配

厳格

ランダムで確率的

変異と疾患発症の関連

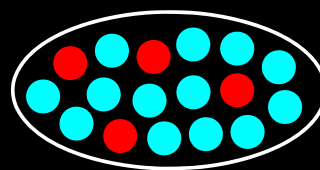
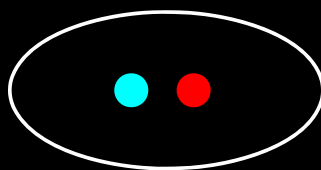
明確

変異比率などによる

変異のイメージ

● : 正常型

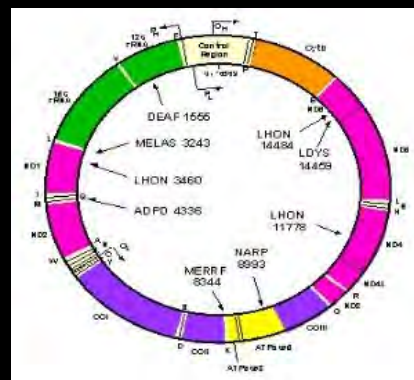
● : 変異型



この正常型と変異型の混在した状態を、ヘテロプラスミーという

ミトコンドリアDNA(mtDNA)の特徴

- ヒトでは約16.5kbpの環状二本鎖DNA
(S.Anderson et al., 1981)
- 1つのミトコンドリアあたり数コピー存在し、
1細胞あたり数千コピー存在する
(R.E.Giles et al., 1980)
- 4つの電子伝達系酵素複合体をコードしており、細胞のエネルギー産生に深く関与している
(Attardi and Scatz, 1988)
- ヒストンのような蛋白が存在せず、ミトコンドリア内で発生する活性酸素によって障害を受けやすく、修復機構も不十分なため、変異が永続的になりやすい。そのため、mtDNAの変異は核DNAの10倍程度変異を起こしやすい



(N.Howell et al., 1999)

ミトコンドリア遺伝病の特徴

1. ミトコンドリア病は母親から伝わる

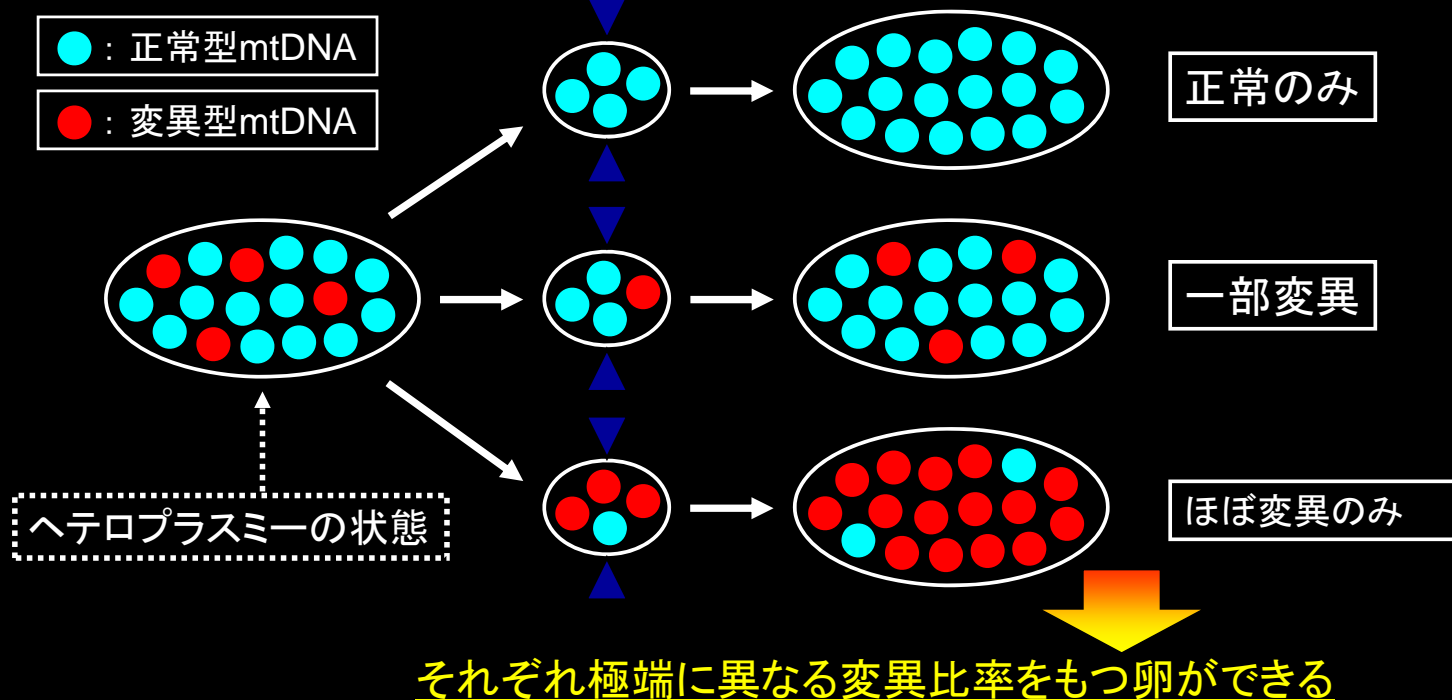
卵子のミトコンドリア遺伝子 >> 精子のミトコンドリア遺伝子
卵子の中で精子のミトコンドリアは消失する

2. 卵子によってミトコンドリア遺伝子の変異比率は異なる

一定の割合を超えると病気が現れる

卵子形成時のボトルネック現象

ボトルネック現象



生殖医療におけるミトコンドリア

遺伝医療におけるテーマ 疾患の防止

生殖医療におけるテーマ
妊娠率の向上

実験科学的なテーマ
研究トライアルと課題

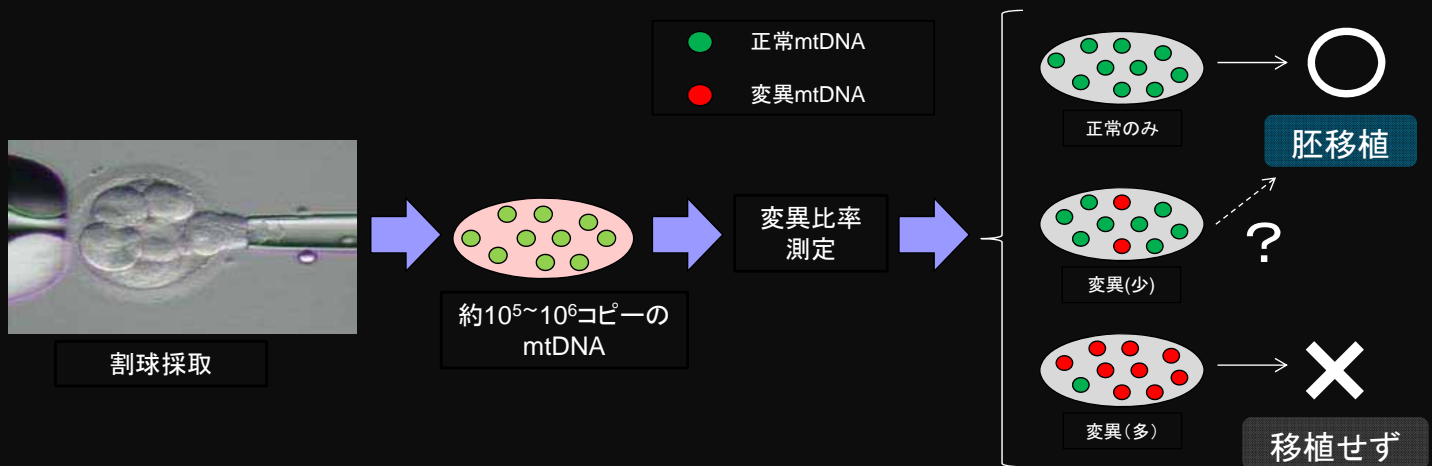
ミトコンドリア遺伝子病の予防法の選択

1. 出生前診断 (Prenatal diagnosis: PND)
2. 着床前診断 (Preimplantation genetic diagnosis: PGD)
3. 核移植 (Nuclear transfer *)
4. 細胞質移植 (Cytoplasmic transfer *)
5. 卵子提供 (Oocyte donation * *)
6. 胚提供 (Embryo donation * *)

* 遺伝的にはキメラ形成を生じる

* * 生物学的には異なる母親の遺伝子を有する

ミトコンドリア病の着床前遺伝子診断 (PGD)



mtDNAの変異比率を測定し、正常のみや変異がカットオフ値以下の少ないものについて胚移植を行う。

ミトコンドリア病の着床前診断は難しいとされる

1. 変異比率と臨床症状の重症度に幅があるため、安全域の特定が難しい (何%以下なら安全か?)
2. 時間経過とともに変異比率が変化する可能性 (細胞分裂に伴うランダム分配)
3. 割球の変異比率が将来の胎児臓器内の比率と異なる可能性 (組織特異性があるため)

1個の割球から得られた変異率が胚全体および将来の個体全体の 変異率と一致するか？ 文献的考察①

- 1割球または1極体のmtDNA変異率が残りの胚全体のmtDNA変異率と一致しているかをマウスモデルで検証した論文”Prospect of preimplantation genetic diagnosis for heritable mitochondrial DNA diseases.[Dean NL et al. Mol Hum Reprod. 2003 Oct;9(10):631-8.]”があり、完全な一致が見られたことからミトコンドリア病の着床前診断は可能であるとの結論が導かれている。
- 2つの報告において数家系の解析結果が報告されている。1つは”Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993.[White SL et al. Am J Hum Genet. 1999 Aug;65(2):474-82]”であり、出生前診断を行うことで遺伝子型(mtDNA8993点変異比率)と表現型の重症度が相関していることが示されている。

1個の割球から得られた変異率が胚全体および将来の個体全体の 変異率と一致するか？ 文献的考察②

- もう1つの論文”Mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993 show a lack of tissue- or age-related variation.[White SL et al. J Inherit Metab Dis. 1999 Dec;22(8):899-914]”では8993変異をもつ13家系の分析で、組織間および年月の経過による変異比率の変化がないことが示されている。
- 2006年の論文”Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis” [Steffann J et al. J Med Genet 2006;43:244-247]では実際8993変異のNARPの着床前診断を行い、3個の胚のうち1個は100%変異で残りは0%変異であったため(卵子形成時のボトルネック現象によって実際には極端に変異比率の異なる卵子が出来るとされています…中間の変異比率の卵子は少ない)、その2個を胚移植し単胎妊娠となり、羊水穿刺による出生前診断によっても0%変異を確認し、38週で健康な男児が出生し臍帯血にも変異が存在しなかったと報告されております。

アカゲザルを用いて胚発育に伴うヘテロプラスミーの変化を観察

mt DNA 50% 置換の胚を作製

1. 初期胚では、胚の発育に伴って割球間のヘテロプラスミーの差は増大
2. 栄養外胚葉は、胎児を形成する内細胞塊のヘテロプラスミーおよび元の卵子におけるヘテロプラスミーを反映

引用: Lee H-S, et al (2012) Cell Rep 2012, 1(5):506-515

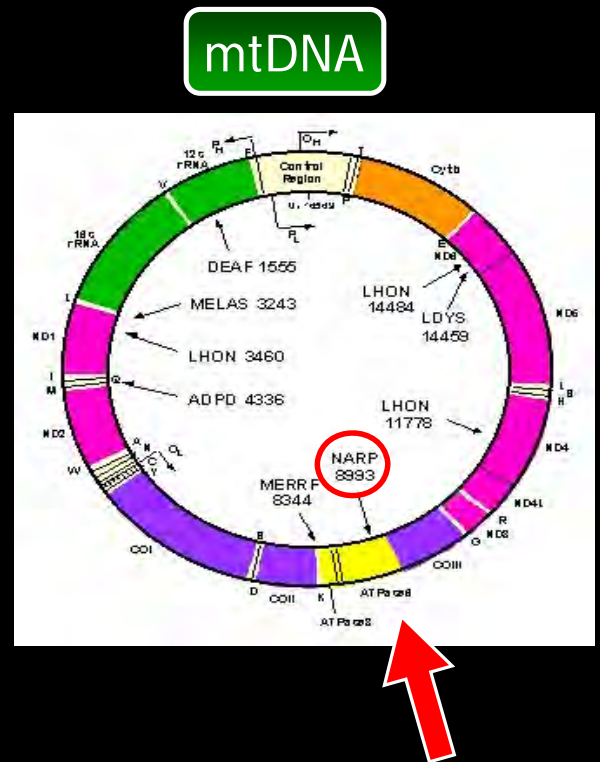
課題

mt DNA mutationによる検証ではない

- 実際には胚発生過程における疾患発症への状況は不明

T8993G点変異

- mtDNA8993は電子伝達系の複合体を構成するATPase6領域をコードしている
- ミトコンドリア病のNARPやLeigh脳症の疾患原因遺伝子として知られている
- ホモプラスミー(変異比率90%以上)で疾患が発症することから着床前診断の適応として有効である可能性が高い



ミトコンドリア病に対する有効なPGDの条件

1. PGDの対象はホモプラスミーで発症する疾患に対して有効
2. PGDの生検時期の選択として、胚盤胞期の栄養外胚葉trophectoderm (TE)がmutant loadの診断のうえで安定している可能性がある

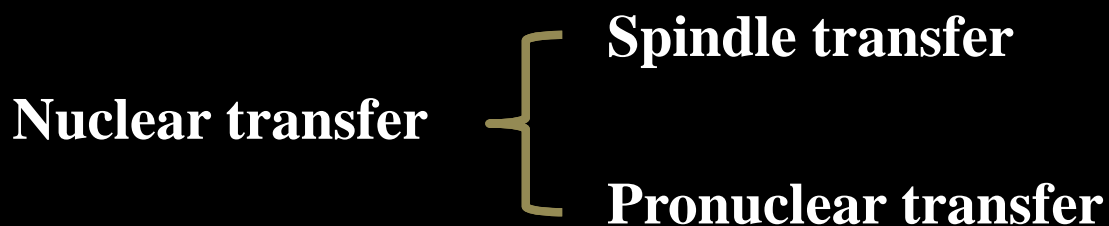
→ ミトコンドリア病に対する生殖医療における治療として他の選択肢の模索も有益

卵子核移植の承認 “3人の遺伝子を持つ子ども”

英	下院	2015.2. 3	可決
英	上院	2015.2.24	可決

核移植の2法

Swapping mitochondria



生殖医療におけるミトコンドリア

遺伝医療におけるテーマ
疾患の防止

生殖医療におけるテーマ 妊娠率の向上

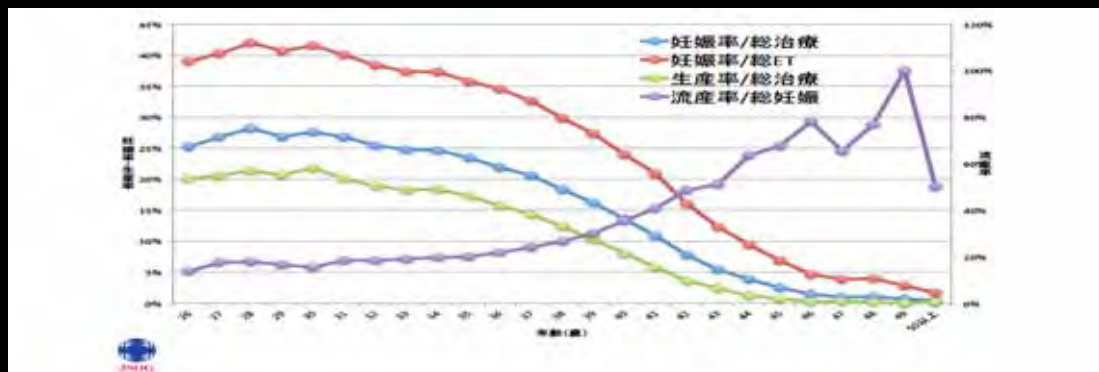
実験科学的なテーマ
研究トライアルと課題

わが国のART 妊娠率・生産率・流産率 2012年

日本においてassisted reproductive technology:ARTにより年間約3万2千人
(総出生数の3.0%)の児が出生している。

多くのART治療が行われているにも関わらず少子化が進んでいる。

→ 女性の晩婚化と育児希望年齢の高齢化が主要な原因の一つと考えられる。



(日本産科婦人科学会
ARTデータブック)