

「先端生殖補助医療技術に関する研究」

加齢に伴う性腺機能低下に対する生殖補助医療の応用に関する基礎的検討（案）

1 加齢に伴う性腺機能低下に対する所謂「卵子若返り法」とは。

近年、生殖補助医療(ART)の進歩により、多くの不妊夫婦に対して恩恵を授けられるようになった。しかし、高齢不妊患者の場合には加齢による機能低下卵子(dysfunctional gamete)の問題が発生する。加齢卵(aged oocyte)は発育能の低下と着床率の低下が認められることから ART における重要な今後の課題である。

これらの問題を解決する手段として卵子若返り法が多くの研究者の手により研究が続けられている。このうち加齢卵子の機能を改善させるための最も容易かつ効果的と考えられる方法は理論的に健全と思われる若年女性のドナー卵子の卵細胞質を加齢卵子に注入する方法(Cytoplasmic transplantation ; CT)であろう。実際これらの方法を開発した Cohen や Barritt らによれば 100 回以上の流産歴を有する 27 症例の不妊患者にドナーの細胞質を移植した結果、43%の臨床的妊娠率を得たと報告している。しかし、Opsahl らは最近、高 FSH レベルの高齢婦人の加齢卵に対して凍結保存ドナー卵から得た細胞質を注入したが妊娠率は不良であったと報告した。これらの結果を相対的に比較してみるとこの方法のさまざまな問題点が明らかになる。第1にはこの方法が効果的と考えられる高齢患者の選定基準は何か。そして第2には CT により加齢卵子に誘導される若返り効果因子は何か、ということであろう。

前者の卵子若返り法に対する患者の選定基準の設定は非常に困難な問題である。なぜなら、われわれは未だ vital な状態での老化卵子の判定基準を確率していないことや胚発達、着床障害が起きる生物学的欠失理由を基礎的に解明していない点があげられる。

胚の異数性(aneuploidy)と加齢(ageing)の関連性が議論されているが、これの改善方法として CT は効果的ではないという報告もある。減数分裂における染色体不分離(nondisjunction)現象はほとんどが減数分裂時に起きることが知られているが、加齢と異数性の関連性は未だ良く分かっていないのが現状である。第2に CT により加齢卵子に誘導される若返り誘導因子は何かということであるが、確かに成熟卵子の細胞質が核内に影響を与えることは事実であるが、減数分裂時の染色体不分離に対してごく微量の細胞質置換がはたして機能的に障

害された卵子の活性化(augmentation)に十分な活性化因子となり得るのであるか。最近、Munne らは受精後、分割期における特殊な形式の胚異数性(mosaicism)が存在し、これは母体の加齢と関係がある現象であることを報告した。このような後期の染色体不分離は CT が有効であると考えられている。もしこの CT の目的が細胞質内に含まれるなんらかの若返り効果因子をドナーから移植することが目的であるとすれば、どのような細胞質を移植するかが最もこの方法の成功率を左右する因子となる。凍結卵細胞質の移植が従来行われていたが、この方法ではドナーとレシピエントとの細胞周期性同調を除外して行われている。従ってこれらの卵子の質は不明であるが、凍結保存卵は移植の際にすでに効果因子を変性させてしまっているかもしれないし、細胞質構成成分を変化させているかもしれない。従って、凍結保存卵子による CT がうまくいかないのは核あるいは細胞質もしくは核と細胞質の両者の変質の結果なのかもしれないのである。しかしこれらの相違点を凍結保存された単一細胞で鑑別することは非常に困難であるが、マウスによる研究では凍結による細胞質の障害の方が karyoplast の障害よりも重大であった。しかし、凍結卵子の生存率の違いによって、CT にも差が認められることから、凍結保存卵子が CT に用いられるかどうかは未だ詳細な研究結果を待つ必要がある。いずれにしろ細胞質は同じ固体から採取されても、決して同一と看做すことは出来ないであろうことは明らかであることから、CT のドナー卵子の条件としては可及的に健全で適切なドナー卵子から採取されることが基本的原則となるのである。

① 卵子若返り法の必要性和問題点

卵子には平均 100,000 個のミトコンドリアを有し、それぞれのミトコンドリアが 1~数コピーのミトコンドリア遺伝子(mtDNA)を有している。mtDNA は環状構造であり、16.6Kb の DNA が電子伝達系(ETC)に関与する 13 のポリペプチドをコードし酸化的リン酸化径路を通して ATP 産生に関与する¹⁾。ミトコンドリアは多くの機能を有しているが、その中でも ATP の形でエネルギーを産生する機能は細胞の生存性に重要な役割を果している。そしてまたこの機能を発現させるミトコンドリア遺伝子の転写と複製には、核内遺伝子によってコードされている転写、複製因子の合成、ミトコンドリアへの移送によって成り立っている。したがって mt DNA の点突然変異や欠失が起きればミトコンドリア機能にとって重大な機能障害となり、その細胞は致死的な状態となるであら

う。最近、ART の成否すなわち、受精率あるいは着床率は卵子内に存在するミトコンドリアの mtDNA コピー数に依存するという報告がなされた²⁾。また高齢婦人の場合、卵子の中に正常で変異のない mtDNA が少なくなってくる事が知られている³⁾。これらは加齢とともに変異 mtDNA を有する卵子が増加する可能性と、これらの質の悪い卵子を淘汰する摂理によって支えられていると考えられる。この結果、不十分なミトコンドリア数によって受精後にもエネルギー産生の低下により分割速度が抑えられ、胚発生が最終的に阻止される。また、個々の割球にも ATP 産生抑制によりアポトーシスを誘導し断片化(fragmentation)を生じさせる。このため加齢ともなう劣化卵子に正常ミトコンドリアを含む細胞質を補填することは議論の余地はあるものの科学的根拠を有している。しかし CT は単にドナー卵のミトコンドリアのみを移植するだけではなく、mRNA やある種の蛋白質成分などの不明因子を含む細胞質をも受容卵に注入することになる。したがって、CT によって特定の加齢不妊患者を救う可能性は否定出来ないが、同時に CT により予期せぬ異常を引き起こすことも予測される。それらは生物学的、社会的、倫理的問題を含んでいるが、未だヒトに対して CT の臨床応用されている症例数が世界的に極く限られているために結論は出されていない。

② 生殖年齢と妊孕能低下に関する考察、

③ 卵子若返り法の問題点

第1の問題点である3親性遺伝子の混在の可能性に関して、初期の CT に関する研究⁴⁾ではドナーmtDNA は子孫に伝播されないであろうと予測されたが、最近の研究^{5) 6)}ではあきらかにドナーmtDNA は子供に伝播されていることが証明されている。これにより mtDNA は自然界の受精では例外を除き絶対的に母系遺伝であるが、CT によってこの自然界の法則は崩される可能性がある。

すなわち CT による3親性の遺伝子の混在である；両親の核 DNA と母親由来の mtDNA およびドナー由来 mtDNA の伝播(heteroplasmy)が生じる可能性がある。

第2は未だミトコンドリアーミトコンドリア間およびミトコンドリアー核間の相互関係の詳細が不明な点である。ドナー細胞質の CT は epigenetically に前核あるいは分割球の核に悪影響を及ぼす可能性が動物実験により証明されてい

る。すなわち、DDK マウスの卵細胞質あるいは卵子 RNA を non-DDK マウスの卵子に注入すると、その卵子は受精後 DDK 系マウスの形質を示すようになり、胚発育は停止して致死的になることが報告されている⁷⁾。また、卵細胞質因子と受精後発現する細胞質因子は協調的に置換遺伝子機能に影響を与える⁸⁾。また DBA/2 マウスの karyoplast を C57BL/6 系マウスの接合子期受精卵に移植すると細胞質は系特異的に雄性前核を修飾することが報告されている⁹⁾。これらの epigenetic な DNA におよぼす影響はヒト卵子の CT では未だ明らかにされていない。

第3は加齢卵子のうち受精、発生に関与する機能低下卵を生きた状態でどのように選別、証明出来るかである。

第4にドナー卵子となり得る健常卵子のスクリーニングの問題であろう。

④ 各国における卵子若返り法の現状

CTに含まれるミトコンドリアは自己増殖する母親由来の細胞内小器官であり、すべてのエネルギーを必要とする細胞活動に対して、酸化的磷酸化径路により ATP を供給している。胚の発育能力の減少は正常な染色体分裂を行うのに十分な ATP の産生能力が無くなることに関連することが示唆されている。そこで、正常なドナー卵由来の卵細胞質を移植することにより、卵細胞質に欠陥のある卵の正常発生能の回復が期待されている。今の所、CT により生まれた子供に異常があることは報告されていないが、機能的に未知で相同ではない mtDNA を移植することによる heteroplasmy に対する人類の将来に対する危惧が考えられる。

そこで法律を以て CT あるいは NT による卵子若返り法を禁止している国はオーストラリア、オーストリア、中国、フランス、オランダ、ノルウェイ、スイス、イギリスであり、香港、アイルランドでは NT は不可であるが、CT は許可されている。ガイドラインによって規制されている国には日本およびイスラエルがある。法律もガイドラインも無い国ではフィンランドでは行われていないようであり、カナダは国レベルでの報告がない。また、イタリアでは基礎研究は行われているが、臨床応用はされていないようである¹⁰⁾。米国では FDA が臨床応用に関する危惧を指摘し、動物実験の結果が集積されるまではモラトリアム勧告が出されている。

⑤ ミトコンドリア遺伝病へのアプローチ

mtDNA は細胞内で唯一の核外 DNA である。しかし、この核外遺伝子はヒストンを欠き、 O_2 radical に曝されるため mt DNA は変異しやすく、点突然変異や欠失、置換などの異常によるミトコンドリア遺伝病の原因として注目されつつある。ミトコンドリア病をはじめて報告したのは Luft R.(1962)¹¹⁾である。彼は患者の筋肉からミトコンドリアを分離し、そのミトコンドリアの性質を詳しく調べた。その結果、ミトコンドリアの電気エネルギーが効率良く ATP に変換されず、熱に変化してしまうので、筋力が低下したり、神経症状が表れたりすることを発見した。ミトコンドリアのエネルギー需要は脳神経と骨格筋で特に高い事が知られているが、このためミトコンドリアの異常はそれらの部位に症状が表れ易いためミトコンドリア脳筋症と呼ばれる。その後、1988 年に最初の mtDNA の変異が発見されて以来、100 以上の点変異、200 以上の欠失、挿入、置換が今までに報告されている。点変異の 60% はミトコンドリア tRNAs の異常、35% は呼吸鎖のポリペプチド subunit の障害、そして 5% はミトコンドリアの rRNA を障害すると言われている¹²⁾。ミトコンドリアの tRNA の異常は MELAS, MERRF, Leigh 症候群、CPEO, 聾、糖尿病、鉄赤芽球性貧血、ミオクローヌス、骨格筋症、心筋症、尿管アチドーシスなどを含む臨床的に酸化リン酸化異常の多彩な症状を引き起こす。これらのミトコンドリア病に対する臨床的治療法は現在のところミトコンドリアのエネルギー合成反応を補助するためのビタミン類やチトクロム製剤あるいは抗痙攣剤などの対症療法であって、有効な治療手段は見つかっていない。ミトコンドリア病が核 DNA の変異と比べて格段に検査や治療が困難な点は、核内遺伝子では性染色体を除けば変異遺伝子は 1 個 (変異 50%) か 2 個 (変異 100%) のどちらかである、しかしミトコンドリアの場合、臓器により異なるが 1 個の体細胞内に 100-200 個あり、そのミトコンドリア内にも 1~数個 mtDNA が存在する。このため変異 mtDNA と正常 mtDNA が混在しており、その比率や症状発現は臓器や患者それぞれに異なっていることである。

このような現状を打開する手段として細胞 hybridization 法による cybrid を応用する biological な手段と mtDNA を直接遺伝子銃(gene gun)を用いてミトコンドリアに打ち込む理学的な方法¹³⁾が研究されている。前者は正常な mtDNA を有する細胞を脱核し cytoplasm を作製し、これを ethidium bromide により患者 mtDNA のみを選択的に除去した細胞(p^0)に 電気癒合法あるいは vectors

を用いて癒合させた hybrid 細胞(cybrid)を作製する方法であり、後者は tRNA 分子や mtDNA を直接ミトコンドリア内に選択的に打ち込むことで得られた遺伝子改変細胞を培養増殖させて、患者組織に注入する遺伝子治療が試みられているが、まだ研究段階であり以下の問題点を解決しなければならない¹⁴⁾。

- ① 細胞活動に応じて導入 mtDNA の機能発現が可能であること。
- ② 導入 mtDNA が細胞分裂周期において安定して伝播されること。
- ③ 組織における非分裂細胞(ex, myoblast)に応用が可能かどうか。
- ④ 用いる vector などの発癌因子またはビールス感染などのリスク。

ミトコンドリア遺伝病は臓器特異的に程度の差はあるが、全身の細胞内ミトコンドリアが野生型と変異型の混在する状態になっているのに対して、これらの cybrid や gene gun 法では限局した臓器、組織への移植治療手段としてしか期待される効果は考えられない。このため全身的な遺伝子治療手段を考えることが必要である。これに対する効果的治療手段として考えられているのは、ミトコンドリア遺伝子は例外を除きそのほとんどが母系遺伝であるので、患者あるいは保因者である女性の卵子のミトコンドリアを CT により健常者のミトコンドリアで置換することで改善しようとする試みは、科学的根拠に基づいた期待される研究対象となってきた。最近、マウス卵子のミトコンドリア顕微注入実験により mt 遺伝子転換マウスが作製され、全身 mt 遺伝子治療の可能性が示唆されている、すなわち、ミトコンドリア ATP 合成酵素の遺伝子を受精卵に注入し、受容雌に移植したところ、その新生仔のすべての器官から注入 DNA 分画が発現していることが認められた¹⁵⁾。また MELAS ミトコンドリアをマウス接合子期胚に顕微注入した結果、胚はこの MELAS-mtDNA を排除することなく発育することが認められた¹⁶⁾。これらの実験から自然受精の際には精子 mtDNA は胚発生初期に排除されるが、顕微注入された外因性 mtDNA は排除されないことが明らかになった¹⁷⁾。Inoki et al も 5~6 週齢 C3H/HeJ マウスを過排卵処理して交配させて得た受精卵に蛍光色素マーカー(PKH26)をラベルしたマウス肝ミトコンドリアをピエゾで顕微注入し蛍光を共焦点顕微鏡で観察したところ、精子由来ミトコンドリアは受精後直ぐに排除されたが、導入ミトコンドリアは 1 細胞期には核周囲に認められ、2 細胞期には細胞質内に分散していることが認められた。また全てのミトコンドリアを Rhodamine123 で染色したところ、導入、内在ミトコンドリアの両者とも 4-,8-細胞期まで共存していることを確認した。また、ミトコンドリア代用粒子を含んだ liposome を

顕微注入すると4細胞期までは内因性ミトコンドリアと同位置に局在していることを認めた¹⁸⁾。これは liposome と内因性ミトコンドリアを結合させるなんらかの因子が存在することを意味する。したがって、これらの基礎実験結果から卵への mtDNA, mtDNA 分画あるいは tRNA 顕微注入法はミトコンドリア遺伝子治療の可能性を示唆するものである。

⑥ 細胞質置換と核置換の比較

II semi-cloning 法による人工卵子技術

さまざまな病的状態による卵巣機能低下あるいは卵巣そのものが欠如している女性にとっては遺伝的に繋がった卵子、受精卵を望む事は出来ない。そこで近年のクローン技術を応用して、除核ドナー卵子に本人の体細胞から取った核を人工的に1倍体化(haploidized)して NT することで、本人の遺伝子を持った新しい卵子を作製しようという試みがなされている。この技術がクローン個体と異なる点はクローン胚はそれ自体で発生し、受容雌生殖道内移植によりクローン個体となるが、この人工卵子は夫の精子によって受精しなければ胚として発生しないということである¹⁹⁾²⁰⁾。

人工卵子の技術的問題点

この手法による胚は一方の親の配偶子ゲノムともう一方の親の体細胞ゲノムから得られた遺伝子の混合によって形成されるので、以下に述べるごとく、通常のクローン個体と同様な問題が危惧される。

- ① 体細胞核の染色体分離の信頼性
- ② 遺伝子再配列
- ③ テロメアの長さ
- ④ Genomic imprinting の状態
- ⑤ 中心体と紡錘体機能

人工卵子の倫理的問題点

やみくもなクローン技術応用の危険性

III Oocyte donation

加齢によって女性の妊孕性は低下する。この原因として加齢により卵子の質が

低下するのか、あるいは子宮内膜の着床能の機能低下なのかあるいはその両者なのか検討する必要がある。加齢による妊娠率への影響を40歳以上(44.3±3.1, range 40 - 52)の不妊患者で同時期にARTを自己卵子使用群と35歳以下のドナー卵子使用群に分けて検討すると着床率(14.7 vs 3.3%)、妊娠率(56 vs 5.3%)あるいは生児獲得率(30 vs 3.3%)のすべてにおいてドナー卵子使用群の方が優れていた。また、egg share programにおける、若年の不妊患者の卵子を分与された高齢不妊患者の妊娠率および生児獲得率はそれぞれ33 vs 23%, 40 vs 30%であり、有意差を認めなかった²¹⁾。若年女性のドナー卵子を用いたARTによって得られた受精卵を高齢婦人の子宮内に移植することによって妊娠を維持することが出来る。これらのことから加齢による妊孕性の低下は卵子の質の低下によるものであり、ドナー卵子を用いることでこれを補填することが可能である。したがって、加齢による性腺の機能低下に対する最終的選択はOocyte donationであろう。

文献

- 1) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijin MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F et al (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-465
- 2) Reynier P, May-Panloup P, Chretien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barriere P, and Malthiery Y.(2001) Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol.Human Reprod.*,7, 425-429
- 3) St John JC, and Barratt CLR. (1997) Use of anucleate donor oocyte cytoplasm in recipient egg. *Lancet*, 350, 961-962
- 4) Brenner C. (1997) Use of anucleate donor oocyte cytoplasm in recipient egg. *Lancet* 350, 962
- 5) Brenner CA, Barritt JA, Willadsen S, Cohen J (2000) Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic transplantation. *Fertil Steril.*, 74, 573-578
- 6) Barritt JA, Brenner CA, Malter HE, Cohen J (2001) Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Human*

Reprod., 16, 513-516

- 7) Renard JP, Baldacci P, Richoux-Duranthon V, Pournin S, Babinet C, (1994) A maternal factor affecting mouse blastocyst formation. *Development*, 120, 797-802
- 8) Pickard B, Dean W, Engemann S, Bergmann K, Fuermann M, Jung M, Reis A, Allen N, Reik W, Walter J, (2001) Epigenetic targeting in the mouse zygote marks DNA for later methylation: a mechanism for maternal effects in development. *Mech Dev*, 103, 35-47
- 9) Latham KE, Solter D, (1991) Effect of egg composition on the developmental capacity of androgenetic mouse embryos. *Development*, 113, 561-568
- 10) IFFS Surveillance 01: eds ; HW Jones Jr & Cohen J, *Fertil Steril* 76 suppl 2, 2001
- 11) Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962) A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control; a correlated clinical biochemical and morphological study. *J Clin Invest* 41, 1776-1804
- 12) Naviaux RK (2000) Mitochondrial DNA disorders, *Eur J Pediatr.*, 159 (Suppl 3) S219-226
- 13) Oshikawa K, Ishii Y, Hamamoto Y, Sugiyama S, Kitamura Y, Kagawa Y, (1999) Particle-mediated gene transfer of murine interleukin-12 cDNA suppress the growth of Lewis lung carcinoma, *In vivo* 13, 397-402
- 14) Kagawa Y, Inoki Y, Endo H, (2001) Gene therapy by mitochondrial transfer. *Adv Drug Del Rev* 49, 107-119
- 15) Ichida M, Hakamata M, Hayakawa E, Ueno U, Ikeda K, Shimada T, Hamamoto Y, Kagawa Y, Endo H, (2000) Differential regulation of exogenic regulatory elements for muscle-specific alternative splicing during myogenesis and cardiogenesis. *J Biol Chem*, 275, 15992-16001
- 16) Rinaudo P, Niven-Fairchild T, Buradagunta S, Massobrio M, Revelli A, Keefe DL, (1999) Microinjection of mitochondrial DNA during preimplantation development , *Fertil Steril*, 71, 912-918
- 17) Marchington DR, Barlow D, Poulton J, (1999) Transmitochondrial mice

carrying resistance to chloramphenicol on mitochondrial DNA: developing the first mouse model of mitochondrial DNA disease, *Nat Med.* 5, 957-960

- 18) Inoki Y, Hakamata Y, Hamamoto T, Yamazaki S, Endo H, Kagawa Y, (2000) Introduction of mitochondria into mouse fertilized egg. *Jpn Soc Gene Ther*, 6, 38
- 19) Tsai MC, Takeuchi J, Bedford JM, Reis MM, Rosenwaks Z, Palermo GD (2000) Alternative sources of gametes: reality or science fiction? *Human Reprod*, 15, 988-998
- 20) Tesarik J, Nagy ZP, Sousa M, Mendoza C, Abdelmassih R (2001) Fertilizable oocytes reconstructed from patient's somatic cell nuclei and donor ooplasts. *Reprod Biomed Online* 2, 160-164 (webpaper 2001/063)
- 21) Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Grunfeld L (1991) Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* 337, 319-320