慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	The development of novel quantification assay for mitochondrial DNA heteroplasmy aimed at preimplantation genetic diagnosis of Leigh encephalopathy
Sub Title	ミトコンドリア病のヘテロプラスミー解析による着床前遺伝子診断法の開発 : Leigh脳症の新たな変異比率解析
Author	田島, 博人
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.4 (2007. 12) ,p.13-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20071202-0013

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

The development of novel quantification assay for mitochondrial DNA heteroplasmy aimed at preimplantation genetic diagnosis of Leigh encephalopathy

（ミトコンドリア病のヘテロプラスミー解析による着床前遺伝子診断法の開発 ～Leigh脳症の新たな変異比率解析）

田　島　　博　人

内容の要旨

ミトコンドリアDNA（mtDNA）は一細胞あたり10～20万コピーが存在するが、mtDNAのT8993G点変異型Leigh脳症では正常型と変異型のmtDNAが共存（ヘテロプラスミー）して遺伝し、一定の変異比率を超えると発症する。mtDNA変異保因者母体では、ボトルネック現象によりヘテロプラスミー比率が極端に変化した卵子が生じて児に疾患が発症するとされるが、これまで本疾患に対する着床前遺伝子診断（PGD）は実施に至っていない。本研究はこのPGDの実施にあたり、単一細胞からの単回PCRによる正確なヘテロプラスミー比率測定系を確立し、mtDNAの分配に関しても新たな知見を得ることを目的とした。

mtDNA点変異T8993Gを標的にリアルタイムPCRの設計を行い、割球毎のmtDNA量の相違に対応するため、蛍光量比を計算して変異率とした。正常および変異の配列を持つ２種類のプラスミドDNAを作成し各比率を測定することで標準曲線を得たのち、それを用いて以下の測定を行った。まず既知の変異検体として４種類のDNA（28, 46, 62, 98%）。次に体細胞分裂に伴う細胞毎のヘテロプラスミー比率の分配変化を確認するために、リンパ球抽出DNAが46％の変異率を示す保因者のリンパ球単一細胞。さらに体外受精移植不適切初期分割胚の単一割球を測定し、変異の有無および変異の割球毎の分配に関して検討した。

正常VIC蛍光および変異FAM蛍光の相関係数が0.9697/0.9745を示す標準曲線が得られ、各測定値は極めて低い標準偏差を示した（≦0.05）。４種類の変異DNAの測定値は－５％～＋６％の誤差範囲に全て集約した。46％保因者のリンパ球単一細胞の測定値は11～70％の広範囲に分布したが、その平均値は44.3％と46％に近似した。20個の初期分割胚のうち５個にそれぞれ異なる変異比率のT8993G点変異が検出された（４～22％）。同一胚由来の割球はすべて２～11％の限られた分散範囲内の変異比率に集約した。また同一人物由来であっても、胚ごとにヘテロプラスミーの程度は異なることが示された。

末梢血リンパ球では、体細胞分裂に伴いヘテロプラスミー比率が大きく変動していることが示された。割球には一部にT8993G点変異が存在することが判明し、その解析によって胚発生過程でのボトルネック現象の存在と、単一割球の変異率が胚全体の変異率を示していることを支持する結果が得られた。またLeigh脳症のPGDを実施する際には、測定誤差、検体毎のmtDNA量の相違、細胞分裂に伴う変化などの要素を考慮してカットオフ値を保因者母体の変異率から10～15％差し引いて設定することが実用的であると考えられる。

本手法は、Leigh脳症に対する現在最も優れたPGDの手法と考えられ、今後の臨床実施につながる技術と結論される。

論文審査の要旨

本研究では、リアルタイムPCR法のallelic discrimination assayにより単一割球のmtDNAからヘテロプラスミーの変異率を測定することで、Leigh脳症のpreimplantation genetic diagnosisを可能とする新たな技術を確立した。T8993G点変異については、体細胞分裂に伴う平均変異率や分布の変化がないことが示され、一つの割球の変異率はその胚全体の変異率を示すことが明らかとなり、これらの事実はLeigh脳症に対するPGDの信頼性を裏付ける結果となった。更に胚発生過程では変異率の増加が認められ、卵子形成時のボトルネック現象（もしくは何らかの変異を増大させる機構の存在）を支持する結果を得た。

審査ではまず、表現型正常の保因者女性から極めて高い変異率の患児が続けて出生する事実がボトルネック理論のみで説明され得るかに関して質問があった。これまで報告されてきたLeigh脳症家系の検討でも、世代を経る毎に変異が集積する傾向が認められているが、広く知られるボトルネック現象以外にその傾向を説明できる理論は現在のところないこと、また保因者の胚について本変異を調べた唯一の報告でも極端に変異率が分かれることが示されていることを回答した。

次に変異率とLeigh脳症の発症の関連についての確認があった。90～95％以上でLeigh脳症、80％以上で緩徐進行型Leigh脳症、60％以上でLeigh脳症の軽症型であるNARPを発症することが一般的に知られており、今回は極めて重篤なLeigh脳症を対象とするPGDの研究であることを確認した。

得られた標準曲線の直線回帰性のズレについて指摘があった。特に10％未満と90％超で直線回帰から外れる傾向が認められたが、蛍光強度を計算して変異率に変換していること、本測定のように使用した場合はリアルタイムPCR機器の特性として生じうること、実用域では相関係数0.98の検量線が得られており、測定自体に問題は生じないことを回答した。

また、実際のPGDを行う際の問題点として一部に変異を認める胚の扱いについて質問があった。様々な誤差を引き起こす要素を考慮して10～15％差し引いた値にカットオフ値を設定する（例えば保因者が46％であれば30～35％以下の胚を戻す）ことを示した。結果として次世代に保因者を生み出す可能性は存在するが、PGDは保因者の診断はせず、それらの胚を差別しないことを原則としていること、クライアント夫妻への胚の情報提供は施行し十分なインフォームドコンセントを得た上で最終的に胚移植するかの決定は両親に帰することを回答した。また核DNA変異の疾患とは大きく異なる疾患を対象としているため従来の保因者の概念が単純には成立しないことも述べた。

以上、本研究は今後実際のPGDの施行に伴い、判明してくる保因者の胚や新生児の変異率、長期的な追跡調査など今後も慎重に検討を重ね、それらの情報を発表・提供していくべき重要な研究であり、世に先駆けてミトコンドリア病のPGDを実施するという有意義な臨床研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　産婦人科学　吉村　泰典
内科学　鈴木　則宏　　産婦人科学　青木　大輔
小児科学　高橋　孝雄
学力確認担当者：池田　康夫
審査委員長：鈴木　則宏

試問日：平成19年 8月14日