

令和 元年 6 月 19 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09626

研究課題名(和文)ミトコンドリア病に対する新規遺伝子治療にむけた基礎的研究

研究課題名(英文)Fundamental study for new gene targeted molecular therapy for mitochondrial disease

研究代表者

中山 智博(NAKAYAMA, TOMOHIRO)

茨城県立医療大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：70307528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア遺伝子疾患は遺伝子治療が困難である。その一つである乳酸アシドーシスおよび脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症(MELAS)に対し、化学化合物(DNA結合化合物PIポリアミド)による新規遺伝子治療を確立することを目標とした。

患者皮膚線維芽細胞にPIポリアミドを添加し、1ヶ月培養をし、DNAを抽出した。その後ミトコンドリア遺伝子変異率に対する効果があるかPCR法を用い検討したが、効果は認められなかった。しかしながら細胞代謝に対する効果はある可能性があり、マススペクト解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア遺伝子疾患は従来の手法を用いた遺伝子治療が困難であり、新たな手法が望まれる。このためPIポリアミドを用いた治療を計画したが、効果は認められなかった。

しかしながら、PIポリアミドの治療を完全に否定するものではない。検討により、今回のPIポリアミドでは、ミトコンドリア遺伝子への志向性が低かったこと、ミトコンドリア2重膜構造を通過しにくかったことが考えられた。これらを改良する方法を組み合わせることにより、治療効果を期待できる可能性は残存している。今後の応用が望まれる。

研究成果の概要(英文)：The mitochondrial disease has difficulty in gene therapy. For mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS), We aimed to establish the new gene targeted therapy using the chemical compound (DNA-binding compound PI polyamide).

PI polyamide were added to patient skin fibroblasts and cultured for one month and extracted DNA. And the effect of PI polyamide to mitochondrial DNA point mutation rate were evaluated by the PCR method, but the effect was not recognized. However, there might be the effect on cell metabolism and performed Gas Chromatography / Mass spectrometry analysis.

研究分野：小児神経学

キーワード：ミトコンドリア遺伝子疾患 新規遺伝子治療 化学化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳酸アシドーシス及び脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症 (MELAS) は、発症後に痙攣、卒中様発作を繰り返し、知的退行を呈し、10 数年の経過で致死に至る難治性疾患である。患者数は推計 480-640 人で、そのうちミトコンドリア DNA の 3243A G 点変異は 80% を占める主要な変異である。この点変異は成人型糖尿病 (2 型糖尿病) の約 0.5 ~ 1.0% に認められ、MELAS と共に難聴や心筋症、神経障害、尿細管障害などさまざまな合併症と関係する。その患者数は推計 1.4-2.7 万人であり、合計 1.4-2.8 万人 (全人口あたり 0.023%、人口 10 万人あたり 23.3 人であり、筋疾患のうち最も多いといわれるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (人口 10 万人当たり 2~3 人) と比して約 10 倍の患者) がミトコンドリア DNA の 3243A G 点変異を持つと推計されている。MELAS は希少疾患ではあるが、主要な遺伝子変異 3243A G 変異は広く成人病と関係しており、この変異に対する適切な治療法を見つけることは急務である。

近年 L-アルギニン療法 (古賀靖敏 臨床神経, 48: 1010 1012, 2008) ピルビン酸療法 (田中雅嗣 疾患メタボロミクスセミナー 2013.6.13) 等の治療法が開発されたが、これらは発現した症状を改善する薬 (対症療法) でしかなく、根本治療である遺伝子治療が望まれる。しかし、ミトコンドリア DNA はミトコンドリア 2 重膜の中に存在するため、ウィルスベクターによる治療は困難である。このため、新たな方法による遺伝子治療が渴望される。

そこでウィルスベクターを利用しない化学化合物 (DNA 結合化合物 PI ポリアミド、国際特許出願番号: PCT/JP2012/058957、発明者: 矢野隆光 (研究協力者)) による新規遺伝子治療を確立することを計画した。この DNA 結合化合物 PI ポリアミドは、新規の遺伝子治療に用いることが可能と思われる水溶性の人工合成化合物であり、ミトコンドリア 2 重膜を通過し、正常ミトコンドリア DNA の 3243A G 点変異の部分に特異的に結合する。この部分はミトコンドリア転写終結因子 (mTERF) 結合部位にあたり、mTERF の結合を阻害することにより、正常 DNA の複製を促進する。この結果ミトコンドリア DNA 変異率を低下させる。ミトコンドリア DNA 点変異病は、ミトコンドリアの中で正常ミトコンドリア DNA と異常ミトコンドリア DNA が混在 (この状態をヘテロプラスミーという) している。通常異常ミトコンドリア DNA の方が複製速度は速く、これがミトコンドリア変異率の上昇をもたらす、ある一定の値を超えた時に症状の発現に至ると考えられている (閾値効果)。このポリアミドはミトコンドリア DNA 変異率を症状発現の閾値以下に低下させ症状発現を抑制する、つまり遺伝子治療をすることが出来るといえる。この効果は患者サイブリッド細胞 (癌細胞に患者ミトコンドリアを細胞融合させた細胞) で既に確認されていた (Yano Takamitsu, UMD 2011, 矢野隆光 東京大学大学院博士論文 甲第 26516 号)。また、サイブリッド細胞を用いた毒性実験では、細胞機能に影響を及ぼさないことがわかっていった。

2. 研究の目的

目的は、患者皮膚線維芽細胞を用いて DNA 結合化合物 PI ポリアミドの効果を培養条件下で確かめることである。この効果が確認された場合、まず患者皮膚線維芽細胞より分化誘導した人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)、並びに人工筋管細胞を用いて効果を確認し、その後臨床治験をすることを予定した。

3. 研究の方法

患者皮膚線維芽細胞培養系を樹立し、その後 PI ポリアミドを添加し長期培養を行う。ミトコンドリア遺伝子変異率に対する効果を、PCR 法を用いて検討する。また、ミトコンドリア機能に対する効果をポーラログラフィー解析にて、また細胞代謝機能への効果をマススペクト解析にて検討する。

4. 研究成果

平成 27 年度には、MELAS 患者及び患者対照から皮膚片を採取し、皮膚線維芽細胞培養系を樹立した。皮膚片採取の際には茨城県立医療大学倫理委員会の規定に従い、患者の同意を得た上で患者の不利益にならないよう皮膚採取時の疼痛および感染対策、その後の情報漏洩対策を行った。皮膚線維芽細胞を 3 か月継代培養し、患者皮膚線維芽細胞培養系を樹立した。

その後、PI ポリアミド添加培養液を用いた培養を 3 種類の濃度別に行い、培養の際は適宜トリプシン処理をした後に継代培養をし、細胞密度が 70-80% 程度を保つようにすることにした。そして初期 3 か月は 2 週間毎に、その後 6 か月間は 1 か月毎に、継代培養をする際のトリプシン処理をした細胞の一部を、DNA 抽出キットを用いて処理し DNA を抽出しその後保存し、次年度に PCR を行う際の鋳型とすることとした。また、ミトコンドリア機能に対する効果を検討するため、皮膚線維芽細胞を用いたポーラログラフィーによるミトコンドリア機能測定の予備実験を行い、測定系の条件を確立した。しかしながら研究協力者の健康上の理由により実験が中断され、PI ポリアミドを添加した細胞培養に至らなかった。

平成 28 年度には新たな研究教職者に依頼し、3 種類の異なる濃度の PI ポリアミドを添加した細胞培養を 1 か月間、2 回行った。継代培養の際、1 週間毎にトリプシン処理をした細胞の一部から DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した。そして PCR を行い、PI ポリアミドの効果を検討した。その結果患者皮膚線維芽細胞では PI ポリアミドはミトコンドリア遺伝子変異率に対して効果がないことが確認された。ミトコンドリア遺伝子変異率に効果がなかったことからミト

コンドリア機能への効果はないと考えられ、ポラログラフィー解析は中止した。また細胞代謝機能への効果を確認するためのマススペクト解析を行うため、細胞培養上清を凍結保存した。

平成 29 年度にはマススペクト解析の予備実験を行い、測定系の条件を確立した。

平成 30 年度には予備実験にて確立した測定条件を用い、実際の患者細胞培養上清のマススペクト解析を行った。今後学会等にて発表を行う予定とした。

5 . 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 件)

なし

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 岩崎 信明

ローマ字氏名 : IWASAKI NOBUAKI

所属研究機関名 : 茨城県立医療大学

部局名 : 保健医療学部

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 70251006

研究分担者氏名 : 石井 一弘

ローマ字氏名 : ISHII KAZUHIRO

所属研究機関名 : 筑波大学

部局名 : 医療医学系

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 70323293

研究分担者氏名：中村 勇

ローマ字氏名：NAKAMURA ISAMU

所属研究機関名：茨城県立医療大学

部局名：保健医療学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：20549505

(2)研究協力者

研究協力者氏名：矢野隆光

ローマ字氏名：YANO YAKAMITSU

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。