

令和元年6月24日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09973

研究課題名(和文) ミトコンドリア病における新たなミトコンドリア機能破綻機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular pathogenesis of mitochondrial disease

研究代表者

木下 善仁 (Kishita, Yoshihito)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20634398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア病は、ミトコンドリアの機能異常により生じる疾患であり、その病態や病因遺伝子は極めて多様である。小児科領域では特にミトコンドリア病の発症原因や罹患臓器は多岐に渡り、原因遺伝子等によっても病態発症機構が異なると考えられる。ミトコンドリア病の新規の疾患発症機構を明らかにするため、発症機構の分子基盤の解明と新規原因遺伝子の解析を行った。過去の全エクソーム解析から同定されたfilamin遺伝子を解析したところ、アクチン機能異常を介したミトコンドリア病発症が示唆された。また、新規原因遺伝子として、C1QBPやTOP3Aを国際共同研究として報告することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア病は先天代謝異常症のなかで最も患者数の多い疾患であるが、現在までにミトコンドリア病の有効な治療法が確立されておらず、また発症原因やその分子メカニズムも十分に明らかになっていない。基盤的な分子メカニズムの理解は創薬や治療法開発に不可欠な要素であるが、本研究では新たな疾患発症メカニズムの一端を明らかにすることができた。疾患の基盤的な分子メカニズムの理解が今後、創薬や治療の分子標的を見出す研究へと展開されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial diseases are inherited metabolic diseases that occur when mitochondria fail to produce enough energy. In the field of pediatrics, causes of mitochondrial diseases and affected organs are particularly diverse, and the mechanism of pathogenesis may differ depending on the causative gene. To elucidate the pathogenic mechanism of mitochondrial diseases, I analyzed the molecular basis of mitochondrial diseases and searched for novel disease-causing genes. I focused on filamin genes that have been identified by previous whole exome sequencing. I have seen the abnormality of actin organization in filamin deficient cells. I have reported C1QBP and TOP3A as novel disease-causing genes.

研究分野：遺伝・先天異常学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリア病 疾患原因遺伝子 遺伝性疾患

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

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病は出生 5000 人に一人の割合で発症し、ミトコンドリア機能異常を呈する難治性疾患である。また、厚生労働省の定める指定難病にもなっている。一般的なミトコンドリア病では進行性の筋力低下、中枢神経症状、発達障害・退行などを主たる臨床症状とするが、ミトコンドリアの機能の広範さゆえにいかなる臓器、いかなる時期、いかなる症状、いかなる遺伝形成でも発病しうるのがこの疾患の特徴である。ミトコンドリア機能に必要なタンパク質はミトコンドリアゲノムだけでなく、核ゲノムにもコードされているため、どちらの遺伝子異常によっても疾患が発症しうる。小児領域で発症するミトコンドリア病の 25% はミトコンドリア DNA に原因があるとされているが、残りは核遺伝子に原因があると考えられている。疾患の病態や病因は多岐に渡っており、病因となる核遺伝子は既に 250 (現在は 300 以上) ほど見つかっている。しかし、ミトコンドリア関連遺伝子は少なくとも 1000 ほど存在するため、いまだに同定されていない核遺伝子異常が多数残っていると考えられる。また、原因が多岐に渡るため、病態の発生メカニズムも十分に理解されていないのが現状である。

研究開始当初、我々の研究グループでは 430 名超 (現在 1000 名超) のミトコンドリア病患者の確定診断を行い、およそ 200 人 (現在 600 名超) の患者を対象に全エクソーム解析を実施し、原因遺伝子探索を行っていた。実際に、ミトコンドリア機能に関わる *GTPBP3*, *SLC25A26*, *MRPS23*, *QRS1*, *PNPLA4* などの新規遺伝子を同定し、論文報告してきた (Kishita et al, Am J Hum Genet, 2015; Kohda and Kishita et al, PLOS Genet, 2016)。一方で、全エクソーム解析ではミトコンドリア関連遺伝子の他に、ミオパチーや神経変性疾患、心筋症などを引き起こす複数の既知疾患遺伝子が見つかってきていた。これらの疾患遺伝子とミトコンドリア機能異常の関連はこれまでに明らかにされておらず、本研究ではこれらの関連を分子レベルで明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア病における新たなミトコンドリア機能破綻機序および疾患発症メカニズムの解明を目的とした。興味深いことにエクソーム解析により同定されてきた原因候補遺伝子には、他の疾患の原因遺伝子が多数含まれていた。心疾患、神経疾患、筋疾患、腸疾患、血液疾患などさまざまな原因遺伝子が同定された。その一例としてミトコンドリア病の患者の中に *MECP2* 遺伝子の変異を同定している (Kohda and Kishita et al, PLOS Genet, 2016)。*MECP2* は、女兒に多く見られる神経系の異常を主とする発達障害であるレット症候群の原因遺伝子として知られている。一方で、*MECP2* 機能欠損がミトコンドリア機能異常に関連することが報告されていた (Heilstedt et al, Am J Med Genet, 2002)。実際に男児のレット症候群とミトコンドリア病では多くの臨床上の共通点が見つかる。臨床の現場では診断の切り分けは非常に難しく、また疾患発症の共通項が存在していると考えられる。ノックアウトマウスの研究では、*Mecp2* がミトコンドリア呼吸鎖の遺伝子である *Uqcrc1* の遺伝子発現制御を介して、ミトコンドリア機能異常を引き起こすことも報告されている (Kriaucionis et al, Mol Cell Biol, 2006)。レット症候群以外にもミトコンドリア病と非常に臨床像が類似し、臨床的切り分けの難しい疾患が潜在的に存在していると考えられる。

上述のように主に臨床また発症メカニズムの点でミトコンドリア病との共通項が示唆される疾患遺伝子に着目し、ミトコンドリア機能破綻のメカニズムの解明を目指した。研究開始当初に原因候補として同定されていた *FLNA*, *FLNC*, *TOR1AIP1* などの遺伝子に焦点をあて、遺伝子とミトコンドリア機能異常の関連を解析した。研究期間中にも多数の全エクソーム解析を実施してきたため、上記以外の疾患遺伝子が同定され、複数の遺伝子を研究対象とした。

3. 研究の方法

エクソーム解析によって同定された原因候補遺伝子が真にミトコンドリア病の原因となっていること、またこれらの遺伝子がミトコンドリア機能異常をもたらす分子メカニズムを明らかにするため、以下のことを実施した。

1) エクソーム解析によって同定した潜性 (劣性) 遺伝形式の疾患遺伝子の多くは両親から異なる変異を一つずつ受け継いでいると考えられるため、両親のゲノムから遺伝子型を調べる。2) 患者由来細胞や組織における原因候補遺伝子の発現変化を解析する。3) 株化細胞を用い、CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子欠損を行う。4) 患者細胞や遺伝子欠損株化細胞を用いて、病態発症メカニズムおよびミトコンドリア機能異常が生じる機序を明らかにする。

4. 研究成果

(1) filamin 遺伝子の解析

過去の全エクソーム解析から、*FLNA* と *FLNC* 遺伝子に原因候補バリエーションを同定した。*FLNA* と *FLNC* は、共に filamin という F アクチンを架橋するタンパクをコードしており、アクチン動態に関わることが知られている。*FLNA* は X 染色体の遺伝子で、*FLNA* が原因候補となっている患者の両親のサンガーシーケンスを行ったところ、母親がヘテロ変異を持つことを明らかにした。遺伝性 *FLNC* が候補となっている患者については 2 つの異なるバリエーションが同定されたが、両親の検体が得られなかったため、両親の遺伝子型を明らかにすることはできなかった。しかし、本人において、別の染色体上に 2 つのバリエーションが存在することを明らかにした。次に、患者

線維芽細胞を用いて、FLNAとFLNCの発現変化をSDS-PAGE/ウエスタンブロットにより解析した。しかしながら、線維芽細胞では対象となるタンパク質の発現量が低かったため、患者で対象タンパク質の発現量が低下しているかどうかをはっきりと示すことはできなかった。そこで、次にFLNAとFLNCの遺伝子発現が十分に確認できるHEK293細胞を用いて、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を行った。各遺伝子に対するgRNAを設計し、デザインしたgRNAとCas9を発現するベクターを細胞に導入した。細胞のセレクトーションの後、各細胞の対象領域のDNA配列を確認し、多種にわたるDNA挿入欠失が見られるノックアウトクローンを取得した。実際に、タンパク質発現を消失する遺伝子欠損細胞を得ることができた(図1)。TOR1AIP1についても同様にして、遺伝子欠損細胞を得ることに成功している。

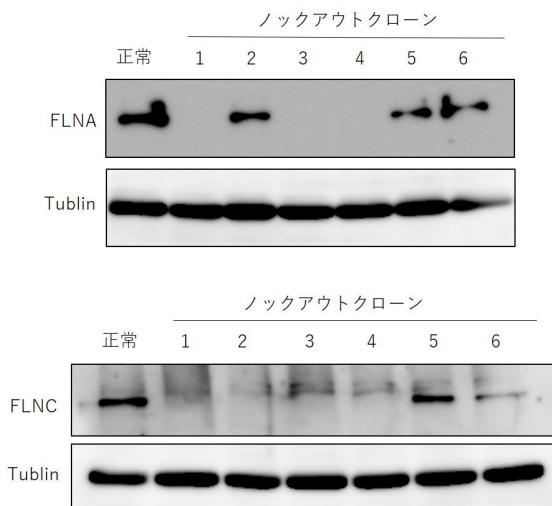


図1. CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集を行い、SDS-PAGE/ウエスタンブロットで対象となる遺伝子産物の発現を確認した。FLNAとFLNCともに複数の細胞で標的タンパク質の消失が観察された。

また、アクチン可視化プローブであるLifeActを用いて、アクチン動態を観察した。正常細胞に比較するとFLNAおよびFLNCの欠損細胞では、アクチンが細胞内に凝集している様子が観察された(図2)。FLNAに関しては最近、ミトコンドリアの分裂に関わるDrp1と相互作用し、ミトコンドリア融合制御に関わることが報告された(Nishimura et al, Sci Signal, 2018)。Drp1はミトコンドリアの分裂面でアクチンフィラメントを合成する作用を持つため、Drp1と共にfilaminがこの作用を持つことが示唆された。一方で、FLNAとFLNCの欠損細胞では、ミトコンドリア呼吸鎖異常はそれほど顕著ではなかった。本研究内では、ミトコンドリアに関するメカニズムは示すことができていないため、この点を詳細に明らかにすることが今後の課題となる。特に、ミトコンドリア分裂融合の側面でFLNAおよびFLNCが重要な役割を果たす可能性が示唆されることから、それらの観点からミトコンドリアの変化を明らかにしていきたい。



図2. FLNAおよびFLNCのノックアウト細胞でミトコンドリア(赤)とアクチン(緑)の観察を行った。FLNAおよびFLNCのノックアウト細胞ではアクチンの凝集が観察された。

(2) 新規発現遺伝子の発見

ミトコンドリア病の新規の原因遺伝子として、C1QBPとTOP3Aを新たに同定した。C1QBPはノックアウトマウスの解析から、ミトコンドリア翻訳やミトコンドリア融合分裂等に関わることが報告されていた。実際に、患者線維芽細胞の解析を行ったところ、C1QBPのタンパク質発現低下や呼吸鎖複合体の異常を明らかにすることができた。海外でも同じ遺伝子の変異をもつ症例が見つかったため、国際共同研究として論文発表した。また、TOP3Aは、核ゲノムの姉妹染色分体の分配に関わることも知られていたが、ミトコンドリアゲノム分配にも関与することが報告されていた。患者でコンパウンドヘテロ変異が同定されたことから、両親のサンガーシー

ケースで両親が各変異をヘテロで持つことを明らかにした。また、TOP3A は姉妹染色体の分配に関わっていることから、患者線維芽細胞で TOP3A の異常が姉妹染色体の分配の異常をもたらすことを明らかにした。この遺伝子の研究でも、海外で同じ遺伝子の変異をもつ症例が見つかったため、国際共同研究として論文発表した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- 1 . Borna NN, Kishita Y, Kohda M, Lim SC, Shimura M, Wu Y, Mogushi K, Yatsuka Y, Harashima H, Hisatomi Y, Fushimi T, Ichimoto K, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Mitochondrial ribosomal protein PTCD3 mutations cause oxidative phosphorylation defects with Leigh syndrome. *Neurogenetics*. 2019 20(1):9-25. doi: 10.1007/s10048-018-0561-9.
- 2 . Martin CA, Sarlós K, Logan CV, Thakur RS, Parry DA, Bizard AH, Leitch A, Cleal L, Ali NS, Al-Owain MA, Allen W, Altmüller J, Aza-Carmona M, Barakat BAY, Barraza-García J, Begtrup A, Bogliolo M, Cho MT, Cruz-Rojo J, Dhahrabi HAM, Elcioglu NH; GOSgene, Gorman GS, Jobling R, Kesterton I, Kishita Y, Kohda M, Le Quesne Stabej P, Malallah AJ, Nürnberg P, Ohtake A, Okazaki Y, Pujol R, Ramirez MJ, Revah-Politi A, Shimura M, Stevens P, Taylor RW, Turner L, Williams H, Wilson C, Yigit G, Zahavich L, Alkuraya FS, Surrallés J, Iglesias A, Murayama K, Wollnik B, Dattani M, Heath KE, Hickson ID, Jackson AP. Mutations in TOP3A Cause a Bloom Syndrome-like Disorder. *Am J Hum Genet*. 2018 103(2):221-231. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.07.001.
- 3 . Feichtinger RG, Oláhová M, Kishita Y, Garone C, Kremer LS, Yagi M, Uchiumi T, Jourdain AA, Thompson K, D'Souza AR, Kopajtich R, Alston CL, Koch J, Sperl W, Mastantuono E, Strom TM, Wortmann SB, Meitinger T, Pierre G, Chinnery PF, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Moggio M, Sciacco M, Comi GP, Ronchi D, Murayama K, Ohtake A, Rebelo-Guiomar P, Kohda M, Kang D, Mayr JA, Taylor RW, Okazaki Y, Minczuk M, Prokisch H. Biallelic C1QBP Mutations Cause Severe Neonatal-, Childhood-, or Later-Onset Cardiomyopathy Associated with Combined Respiratory-Chain Deficiencies. *Am J Hum Genet*. 2017 101(4):525-538. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.08.015.
- 4 . Ogawa E, Shimura M, Fushimi T, Tajika M, Ichimoto K, Matsunaga A, Tsuruoka T, Ishige M, Fuchigami T, Yamazaki T, Mori M, Kohda M, Kishita Y, Okazaki Y, Takahashi S, Ohtake A, Murayama K. Clinical validity of biochemical and molecular analysis in diagnosing Leigh syndrome: a study of 106 Japanese patients. *J Inherit Metab Dis*. 2017 40(5):685-693. doi: 10.1007/s10545-017-0042-6.
- 5 . Borna NN, Kishita Y, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI, Tokuzawa Y, Kohda M, Nyuzuki H, Yamashita-Sugahara Y, Nasu T, Takeda A, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A novel mutation in TAZ causes mitochondrial respiratory chain disorder without cardiomyopathy. *J Hum Genet*. 2017 62(5):539-547. doi: 10.1038/jhg.2016.165.

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1 . Kishita Y, Kohda M, Fushimi T, Yatsuka Y, Lim SC, Borna NN, Hirata T, Imai-Okazaki A, Matsunaga A, Shimura M, Tajika M, Kuranobu N, Ichimoto K, Harashima H, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Association between mutations in genes encoding non-mitochondrial proteins and pathogenesis of mitochondrial diseases. AussieMit2018 (国際学会), 2018年11月
- 2 . Kishita Y, Kohda M, Akita M, Mizuno Y, Yatsuka Y, Hirata T, Harashima H, Shimura M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Homozygous mutation in MIC13 impairs cristae structure and causes mitochondrial DNA depletion syndrome. Keystone symposia -Mitochondrial biology (Z1) (国際学会), 2018年4月
- 3 . Kishita Y, Kohda M, Mizuno Y, Yatsuka Y, Hirata T, Harashima H, Shimura M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Identification of novel disease-causing genes associated with mitochondrial dynamics in mitochondrial disorders. 1st International Mitochondria Meeting for Young Scientists (国際学会), 2018年4月
- 4 . Kishita Y, Kohda M, Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Borna NN, Harashima H, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Genetic background of Japanese patients with mitochondrial disorders. EUROMIT2017 (国際学会), 2017年6月
- 5 . Kishita Y, Kohda M, Akita M, Mizuno Y, Yatsuka Y, Hirata T, Harashima H, Yamazaki T, Shimura M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Mitochondrial DNA depletion syndrome caused by homozygous mutation in MIC13. The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] (国際学会), 2016年10月

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡崎 康司

ローマ字氏名：OKAZAKI, Yasushi

研究協力者氏名：大竹 明

ローマ字氏名：OHTAKE, Akira

研究協力者氏名：村山 圭

ローマ字氏名：MURAYAMA, Kei

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。