

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2006 ~ 2008  
 課題番号： 18790227  
 研究課題名 (和文) 家族性筋萎縮性側索硬化症におけるミトコンドリア異常の病態解明と新規治療法の開発  
 研究課題名 (英文) Analysis of mitochondrial dysfunction on Familial Amyotrophic lateral Sclerosis and The development of new cure.  
 研究代表者  
 吉良 幸美 (KIRA YUKIMI)  
 大阪市立大学・医学部・技術職員  
 研究者番号： 90420728

## 研究成果の概要：

神経系や骨格筋のようなミトコンドリア依存性の高い組織では、正常なミトコンドリア機能の維持がきわめて重要である。研究代表者はミトコンドリアに注目した解析により、FALS の病態発症のメカニズムと新規治療法の開発に取り組み、研究期間内に以下のことを明らかにした。

- ① 細胞質局在だと言われていた SOD1 (Cu/Zn-SOD1) はミトコンドリアに可逆的に結合局在し、ミトコンドリアの機能とその局在に相関関係がある。
- ② 家族性筋萎縮性側索硬化症モデルマウス (FALS Tg) を用いた解析の結果、FALS では病態の発症及び進行にミトコンドリアの機能障害が関与している。
- ③ ミトコンドリア保護作用のあるカルニチンは FALS Tg の病態発症遅延効果と延命効果がある。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症, ミトコンドリア, カルニチン, 酸化障害, 治療

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis) は中年期以降に発症し、運動神経が選択的に障害される神経変性疾患である。発症率は 10 万人に 2-3 人である。進行は個々によって異なるが、平均 3-5 年

で呼吸不全に陥る。現在までのところ、発症メカニズムが明らかでなく、有効な治療法もない難病である。全 ALS 患者中数 % に SOD1 (Cu/Zn-SOD1) の点変異を有する家族性 ALS (FALS) 患者が存在する。

SOD1 はスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を不均

化する酵素で、従来細胞質局在であるとされていたが、本研究者は、これまでの研究により活性酸素産生の主座であるミトコンドリアや同じく活性酸素産生場であるペルオキシソームに結合局在していることを見いだし、活性酸素産生局所での効率的な消去が細胞内の酸化障害を防ぐ上で重要であることを見いだした。

## 2. 研究の目的

FALS やミトコンドリア脳筋症などの先天的に遺伝子変異が存在し、加齢が発症の引き金となる疾患は神経系や骨格筋をその病態の主座とするものが多い。これらの両興奮性組織はミトコンドリア依存性エネルギー代謝に多量の酸素を消費するという共通した特性を有する。活性酸素産生の主座であるミトコンドリアは、細胞当たり数百個も存在するにもかかわらずミトコンドリアDNA(mtDNA)が核DNA(nDNA)の約10倍以上の速度で変異するため、各々が数十コピーものmtDNAを所有することにより危機管理をしている。しかし、加齢に伴う酸化的DNA修飾により徐々に変異が蓄積して変異mtDNAの割合がある閾値を超えると、神経系や骨格筋のエネルギー代謝病態が症状として顕在化するものと考えられる。したがって、これらの疾患の予防治療には、神経系や骨格筋をはじめとするエネルギー消費量の高い組織での正常なミトコンドリア機能の維持が極めて重要である。本研究者は、FALSでは変異SOD1の細胞内局在が変化し、これがミトコンドリア依存性の高い運動神経系と骨格筋を病巣として遅発性に病態が発症するメカニズムであるとの仮説を提唱している。本仮説を証明するために以下のことを目的とした。

(1) 正常およびFALS患者のSOD1細胞内局在を解析し、FALS発症機構におけるSOD1局在変化と活性酸素代謝動態との関係を明らかにする。

(2) 変異SOD1の存在によりmtDNAの変異が著しく加速する現象のメカニズムを解明する。変異SOD1遺伝子を導入した培養細胞とFALS-Tgを用い、ミトコンドリア機能変化とmtDNA変異の進行および細胞機能障害との関係を経時的に解析する。

(3) これまでの研究より、酸化ストレス下の細胞では細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇などにより膜成分から切り出された長鎖遊離脂肪酸の有する界面活性剤作用によりミトコンドリア機能障害を引き起こされることがわかった。本事実に基づいて解析した結果、遊離脂肪酸をβ酸化することによりATPに変換する作用を持つカルニチンがミトコンドリア機能障害を抑制することがわかった。そこで、カルニチンを用いてミトコンドリアをターゲットにしたFALSの新規治療法の確立を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 変異SOD1蛋白質と分離ミトコンドリアの*in vitro* binding assayを行い、ミトコンドリア膜への結合性を検討した。また、遺伝子組み換えにより患者で報告されている変異SOD1を神経細胞に導入しその局在を検討する。また、FALS-Tgより繊維芽細胞を分離培養し、種々の酸化ストレス下におけるSOD1の局在変化を解析した。

(2) FALS-Tgを用いて病態進行とミトコンドリア機能障害の関係を検討した。また、mtDNAの変異に関してPCR-Direct Sequence法により解析した。mt-DNAの変異に関してはヒトALS患者との比較も行った。

(3) カルニチンによる治療効果を検討するため発症前及び発症後のFALS Tgへカルニチンを摂取させ、延命および病態進行抑制効果を検討した。病態進行の判定には運動機能の判定のためロタロッドテストと独自に開発した棒歩行テストを用いた。

## 4. 研究成果

(1) 正常SOD1はミトコンドリア機能に依存してミトコンドリア局在が変化することがわかった。変異SOD1蛋白質と単離ミトコンドリアとの結合実験の結果、変異SOD1は変異部位に関わらずミトコンドリアとの結合力が低下していることが明らかになったが、本現象がSOD1蛋白質の不安定さによるものか、ミトコンドリアとの結合に必要な未知の因子によるのかは不明であり、今後さらなる検討が必要である。

(2) FALS-Tgのミトコンドリア機能障害は発症前にはすでに起きており、発症後はミトコ

ンドリア機能の著しい低下及びミトコンドリアからの活性酸素産生の亢進が見られ、ミトコンドリア機能障害と病態発症、進行に密接な関係があることが示唆された。

また、mt-DNA 変異に関しても mt-DNA 全領域で亢進していることが明らかになった。

(3) カルニチンを発症前の FALS-Tg に断続的経口摂取させ発症時期および病態進行を検討した結果、発症時期が大幅に遅延することが分かった。病態発症後の FALS Tg に皮下にカルニチンを投与した結果、約 2 週間程度の延命効果があった。

以上より FALS 病態発症および進行においてミトコンドリアを保護することは有効な治療法になりうることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kira Y, Nishikawa., The identification and Characterization of a new GTP-binding protein (Gbp45) involved in cell proliferation and death related to mitochondrial function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 13, 570-580, 2008. 査読：有.
- ② Nakata N, Kira Y, Yabunaka Y, Takaoka K. J Orthop., Prevention of venous thrombosis by preoperative glycyrrhizin infusion in a rat model. *Journal of orthopaedic science*, 13, 456-462, 2008. 査読：有..
- ③ Imada I, Sato EF, Kira Y, Inoue M., Effect of CoQ homologues on reactive oxygen generation by mitochondria. *Biofactors*, 32, 41-48, 2008. 査読：有.
- ④ Nishikawa M, Kira Y, Yabunaka Y, Inoue M., Identification and characterization of endoplasmic reticulum-associated protein, ERp43. *Gene*, 386, 42-51, 2007. 査読：有.
- ⑤ Nishiuchi Y, Maekura R, Kitada S, Tamaru A, Taguri T, Kira Y, Hiraga T, Hirotani A, Yoshimura K, Miki M, Ito M., The recovery of Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC) from the residential bathrooms of patients

with pulmonary MAC. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 347-351, 2007. 査読：有.

⑥ ElBeltagy K, Honda K, Ozaki K, Misugi T, Tokuyama O, Kimura M, Kira Y, Ishiko O., In vitro effect of dehydroepiandrosterone sulfate on steroid receptors, aromatase, cyclooxygenase-2 expression, and steroid hormone production in preovulatory human granulose cells. *Fertility and sterility*, 88, 1135-1142, 2007. 査読：有.

⑦ Li Q, Sato EF, Kira Y, Nishikawa M, Utsumi K, Inoue M. A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 40, 173-181, 2006. 査読：有.

⑧ Hong J Y, Sato EF, Kira Y, Nishikawa M, Shimada K, Inoue M., Curcuma Aromatica inhibits diabetic nephropathy in the rat. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 71, S626-632, 2006. 査読：有.

⑨ Kira Y, Nishikawa M, Ochi A, Sato E, Inoue M. L-carnitine suppresses the onset of neuromuscular degeneration and increases the life span of mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research*, 1070, 206-214, 2006. 査読：有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Yukimi Kira, Manabu Nishikawa., Identification and Characterization of a GTP-binding protein with molecular weight of 45 kD: Gbp45. Biochemistry and Molecular Biology 2008, 2008.12.9~12.11. KOBE.
- ② Kira Y, Nishikawa M, Inoue M., Identification and Characterization of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein, ERp43. Biochemistry and Molecular Biology 2007, 2007.12.12~12.15, YOKOHAMA.
- ③ Yukimi Kira, Manabu Nishikawa, Yoriko Yabunaka, Eisuke Sato, Akemi Ochi, Masayasu Inoue., L-Carnitine suppresses the onset of neuromuscular degeneration and increases the lifespan of mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. 17<sup>th</sup> International SYMPOSIUM ON ALS/MND, 2006.11.30~12.2, YOKOHAMA.

④ Hosomi N, Fukai K, Oiso N, Kira Y,  
Ohshimo T, Ishii M. Analysis of methylation  
status in the promoter of interferon regulatory  
factor-2 in patients with late-onset psoriasis. THE  
AMERICAN SOCIETY OF HUMAN  
GENETICS 57<sup>th</sup> ANNUAL MEETING,  
2007.10.25, San Diego, California. USA

⑤ Yukimi Kira, Manabu Nishikawa, Yoriko  
Yabunaka, Eisuke Sato, Akemi Ochi, Masayasu  
Inoue., L-Carnitine suppresses the onset of  
neuromuscular degeneration and increases the  
lifespan of mice with familial amyotrophic lateral  
sclerosis. 第20回国際分子生物・生化学会議  
(IUBMB) , 2006.6.20~6.22. 京都国際会館.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉良 幸美 (KIRA YUKIMI)  
大阪市立大学・医学部・技術職員  
研究者番号：90420728

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし