

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15720

研究課題名（和文）末梢血を用いたミトコンドリア病の迅速診断法の確立

研究課題名（英文）Development of rapid diagnosis method for mitochondrial disease using peripheral blood.

研究代表者

宇藤山 麻衣子（Utoyama, Maiko）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80783795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は末梢単核球を用いた細胞外フラックスアナライザーのミトコンドリア機能障害における診断的利用について基礎研究を行なった。健常コントロール7例，ミトコンドリア病疑い症例 5例，ミトコンドリア病確定症例 5例についてOCR：酸素消費速度，/ECAR：細胞外酸性化速度を指標として3群間での比較を行なった。ミトコンドリア病診断群ではOCR/ECARの値が有意に低下していた。細胞外フラックスアナライザーは確定診断に先立ち簡便迅速にミトコンドリア機能障害を同定する有用なツールであることを証明した。OCR/ECARの低下した症例では迅速に治療介入することで症例の予後改善に寄与することが可能となる。

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遺伝子検査、生化学的検査による確定診断まで長期間を要することから急性期の治療方針決定には寄与できず、この点は患者予後を規定する極めて重大な問題である。本研究結果によりミトコンドリア機能障害をわずか末梢血1mlの採取3時間程度で同定することに成功した。急性期のOCR/ECARの低下した症例では迅速に治療介入することで症例の予後改善に寄与することが可能となる。また、同一患者検体の経時的なOCR測定に利用できるため治療効果判定に有用である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted basic research on the diagnostic use of an extracellular flux analyzer allowing sensitive detection of impaired mitochondrial energy production with peripheral blood, for mitochondrial dysfunction. Seven healthy controls, five suspected cases of mitochondrial disease, and five confirmed cases of mitochondrial disease were compared using oxygen consumption rate (OCR)/extracellular acidification rate (ECAR). The OCR/ECAR values were significantly lower in the group diagnosed with mitochondrial disease. In addition, the analysis took about three hours from the time of peripheral blood collection. The extracellular flux analyzer proved to be a useful tool for simple and rapid identification of mitochondrial dysfunction prior to definitive diagnosis. Prompt therapeutic intervention in patients with reduced OCR/ECAR may contribute to improved prognosis.

研究分野：先天代謝異常

キーワード：OCR：酸素消費速度 ECAR：細胞外酸性化速度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞における主要なエネルギー産生器官である。ミトコンドリア病はオルガネラ病の一つで、ミトコンドリア機能が障害され、臨床症状が出現する病態の総称である。ミトコンドリアはエネルギー産生に加えて、活性酸素産生、アポトーシス、カルシウムイオンの貯蔵、感染防御などにも関わっているため、ミトコンドリア病ではこれらの生物学的機能が変化し中枢神経、骨格筋、心臓さらには眼、肝臓、腎臓、血液など多様な臓器障害を呈する。診断には臨床症状や画像検査に加え、骨格筋生検や線維芽細胞を用いて生化学的にエネルギー代謝障害(OCR 測定)、病理学的には細胞内ミトコンドリアの数や大きさの変化、遺伝学的にはミトコンドリア関連遺伝子の変異を証明することが必要である。しかし一方で感染や飢餓ストレスによって急激に症状が増悪する初発症例においては、遺伝子検査、生化学的検査は確定診断まで長期間を要することから急性期の治療方針決定には寄与できず、この点は患者予後を規定する極めて重大な問題である。さらに、骨格筋生検や線維芽細胞の樹立は患者に対する侵襲の面からも実施困難な症例が存在する。

細胞外フラックスアナライザーは細胞の主要なエネルギー代謝経路である解糖系=細胞外酸化速度(ECAR)、ミトコンドリアによる好気呼吸の状態=酸素消費速度(OCR)を高感度に経時的計測が可能な最先端の細胞代謝アナライザーである。細胞や単離ミトコンドリアの酸素濃度(pmol/min)・水素イオン濃度(mPH/min)の変化を、ルミネッセンス法により検知し、OCR:酸素消費速度・ECAR:細胞外酸化速度を算出する。末梢血を用いてミトコンドリアのエネルギー産生障害を高感度に検出できることから、将来的な診断のための機器としての用途も注目されている。

2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリア病の診断あるいはミトコンドリア障害が疑われる患者の末梢血を用いてエネルギー代謝(OCR:酸素消費速度, ECAR:細胞外酸化速度)を測定し、迅速なミトコンドリア障害の診断と治療効果の評価を行うための基盤構築を目指す。具体的な評価系確立のため、(1)末梢血単核球でのミトコンドリア異常検出感度の測定、(2)各測定項目でのミトコンドリア異常症診断基準の確立、(3)治療効果判定の評価系の確立 について研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1)ミトコンドリア機能障害を疑う患者の末梢血 1ml を採取し、Ficoll で単核球を分離する。 2×10^5 個の単核球を測定用ウェルに播種して、細胞外フラックスアナライザーで OCR:酸素消費速度, ECAR:細胞外酸化速度を測定する。

(2)(1)の解析からミトコンドリアの基礎呼吸, ATP 産生, 最大呼吸能, 予備呼吸能, 解糖系活性:ECAR が算出される。最終的な臨床診断結果と統合し、最もミトコンドリア障害の診断に有用なマーカーを同定する。

(3)新規にミトコンドリア病と診断され治療導入がなされた症例について治療開始前後で末梢血リンパ球の OCR と ECAR を測定する。ミトコンドリアレスキュー (フルスチアミン、アスコルビン酸、ピオチン、ユビデカレノン、L カルニチン)の導入によって OCR が上昇し、ECAR が減少した検体については治療反応性が良好であると判定できる。細胞外フラックスアナライザーが治療効果判定に利用可能か検討する。

4. 研究成果

(1) 末梢血単核球でのミトコンドリア異常検出感度の測定

健常コントロール 7 例, ミトコンドリア機能障害疑い症例 10 例について細胞外フラックスアナライザーで OCR:酸素消費速度, ECAR:細胞外酸性化速度の測定を行った。

ミトコンドリア機能障害疑い症例で後にミトコンドリア遺伝子変異が同定されたのは 5 例であった。本研究では健常コントロール 7 例, ミトコンドリア病疑い症例 5 例, ミトコンドリア病確定症例 5 例について各パラメーターを比較検討した。

(2) 各測定項目でのミトコンドリア異常症診断基準の確立

症例の解析からミトコンドリアの基礎呼吸, ATP 産生, 最大呼吸能, 予備呼吸能, 解糖系活性:ECAR を算出した。しかし、基礎呼吸, ATP 産生, 最大呼吸能は細胞数を 2×10^5 に設定しても測定回によるばらつきが大きく診断基準として用いるのは困難であった。

そのため、OCR/ECAR, 最大呼吸活性/基礎呼吸活性を指標として 3 群間での比較を行なった。ミトコンドリア病診断群では OCR/ECAR の値が有に低下していた。すなわち基礎呼吸低下と解糖系活性の上昇: 乳酸産生の亢進を末梢血単核球で同定することに成功した。最大呼吸活性/基礎呼吸活性は確定診断例では低下傾向を認めたものの疑い症例群との間に有意差は認めなかった。解析に要した時間は末梢血採取から 3 時間程度であった。

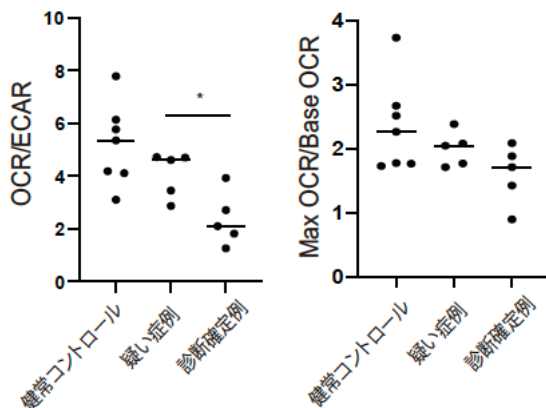


図1. ミトコンドリア病におけるOCR, ECARの診断基準

さらに、ピアソン病の症例では皮膚線維芽細胞では OCR の低下は認めず、末梢血単核球と骨髓細胞における細胞外フラックスアナライザーの診断的有用性が示唆された。ピアソン病の迅速診断で細胞外フラックスアナライザーによる OCR 測定が有用であることを論文報告した。

(Pediatr Int. 2021 Feb;63(2):223-225.)

(3) 治療効果判定の評価系の確立

上記の新規患者(ピアソン病 1 例, Leigh 脳症 1 例)についてミトコンドリアレスキュー開始前後を比較して OCR の改善を証明した。末梢血単核球を用いた細胞外フラックスアナライザーによる OCR 測定は病勢や治療効果判定に有用である可能性が示唆された。

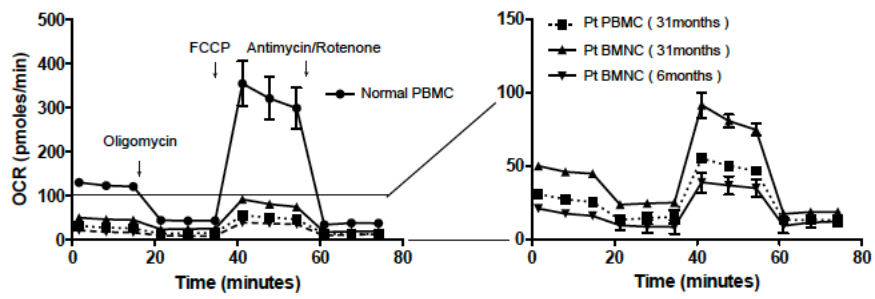


図2. 経過によるOCR推移

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1 . 著者名 Nishimura T, Yamada A, Utoyama M, Saito Y, Moritake H	4 . 巻 63
2 . 論文標題 A useful method to diagnose Pearson syndrome mimicking Diamond-Blackfan anemia.	5 . 発行年 2021年
3 . 雑誌名 Pediatrics International	6 . 最初と最後の頁 223-225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------