

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591220

研究課題名（和文）ミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断と分子病理に関する研究
：小児高乳酸血症の病因解明

研究課題名（英文）Diagnoses and molecular bases of mitochondrial respiratory chain disorders.

研究代表者

大竹 明（OHTAKE AKIRA）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00203810

研究成果の概要（和文）：

依頼患者 267 名において解析が終了し 110 名を呼吸鎖異常症と診断した（診断率 110/267=41.2%）。その内訳は、単独酵素異常症 65 例（特に呼吸鎖 I 異常症が 44 例）、複合型酵素異常症 42 例で、臨床症状は非常に多岐にわたっていた。mtDNA 枯渇症候群（MDS）を 15 家系 17 症例に認め、うち肝型 MDS 4 家系 6 症例で遺伝子異常を同定できた。日本人にも MDS と呼吸鎖 I 単独酵素異常症の頻度が高いことが確認された。

研究成果の概要（英文）：

BACKGROUND: Congenital and primary lactic acidosis is one of the most frequent inborn errors of metabolism, of whom only 30% have had its precise cause identified. Our aim is to make a prompt and correct diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders (MRCD), using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) combined with conventional enzyme assay. METHODS: Activities of the individual respiratory chain complexes and the mitochondrial matrix marker enzyme citrate synthase were measured in liver, heart and muscle homogenates and mitochondrial fractions isolated from cultured fibroblasts. Tissue homogenates or mitochondria isolated from skin fibroblasts were solubilised in n-dodecyl-maltoside and subjected to 4-13% BN-PAGE and western blotting using monoclonal antibodies specific for Complex I to IV subunits. Mitochondrial DNA and nuclear DNA copy numbers within tissues were determined by quantitative polymerase chain reaction. RESULTS: One hundred and ten patients were diagnosed to have MRCD out of 267 candidate patients. Most frequent was complex I deficiency, of whom many patients had tissue-specific type deficiency. Twenty patients out of 110 had mitochondrial DNA pathogenic mutations, which meant the majority of childhood-onset MRCD was nuclear origin. Patients with mtDNA mutations had milder symptoms than those suspected to have nuclear mutation. MtDNA depletion syndrome (MDS) was a prevalent cause of multiple MRCD. Twelve patients in 10 families were diagnosed to have hepatic MDS, and 5 patients were diagnosed to have myopathic MDS. Out of 12 hepatic MDS, we discovered nuclear genes mutations of *DGUOK*, *POLG* and *MPV17* in 6 patients from 4 families. CONCLUSION: We must have a suspicion that almost every disease may be a MRCD. BN-PAGE is a useful guide to prompt and correct diagnosis, and future molecular analysis for categorizing respiratory chain disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝・先天異常学、ミトコンドリア病、先天性高乳酸血症

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性高乳酸血症は小児科・新生児科領域における難病の一つで最も頻度の高い先天代謝異常症であるが、現在でもその約6割は病因診断がなされていない。正確な診断とそれに基づく的確なカウンセリングや治療法の開発が望まれる所以である。診断が困難な最大の理由は先天性高乳酸血症の最大の原因と考えられるミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症の診断が困難なためである。私達はこの研究で酵素活性測定と Blue Native 電気泳動 (BN-PAGE) 法によるタンパク質レベルの解析を組み合わせ、ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症をまず迅速で正確に診断するシステムを確立したい。

(2) さらにミトコンドリア異常症の特性として、ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の二重支配を受けるために病因遺伝子の探索が極めて難しいことが挙げられる。本研究では BN-PAGE 法 の特性を生かして異常症をまずタンパクレベルで効率的に分類し、その後ミトコンドリア遺伝子は2段階 PCR 法を応用した全周シーケンス法で、核遺伝子はまずミトコンドリア DNA 枯渴症候群(MDS)の原因遺伝子に絞って病因遺伝子を明らかにしたい。

(3) 呼吸鎖複合体 異常症の一部については、そのアセンブリー機構異常を遺伝子レベル・分子レベルで明らかにし、呼吸鎖複合体 、さらにはミトコンドリアそのもののバイオゲネシス機構の解明にも寄与したいと考える。

2. 研究の目的

(1) 呼吸鎖はミトコンドリア内膜に局在する大分子複合体でありそのタンパク質複合体を活性保持した大分子状態のまま解析する方法がないことが問題であった。これを解決する方法が BN-PAGE 法である。この泳動法は主に膜局在型の大分子タンパク質複合体解析のために最近開発された方法で、サンプルに色素を加えて抽出するという簡単な方法で活性を持った大分子複合体のままの解析が可能となる。即ち泳動後抗体を用いたイムノプロット解析で複合体の大きさや量が一目瞭然となる他、ゲルに対して活性染色

を行うことにより酵素活性のスクリーニングも可能である。

(2) ミトコンドリア呼吸鎖複合体酵素活性については世界的に見ても信頼できるアッセイ法を確立している施設は数えるほどで、残念ながら本邦には信頼できる値を臨床に提供できる施設はほとんどない。酵素活性測定に BN-PAGE 法による解析を加えて酵素活性レベルのみならず複合体タンパク質レベルで正確な情報が得られれば、一般臨床および患者さん達への福音は計り知れない。さらに研究代表者が予備的に発見している呼吸鎖複合体 のアセンブリー異常症の遺伝子レベル・分子レベルでの解析が進めば、呼吸鎖複合体 、さらにはミトコンドリアそのもののバイオゲネシス機構の解明にも繋がると考えられる。即ち本研究は臨床へのフィードバックが非常に大きいのに加えて、生化学的・基礎医学的にもその貢献は大であると考ええる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性先天性高乳酸血症症例の選択：高乳酸血症の原因はミトコンドリア呼吸鎖異常症を始めとする遺伝性先天性酵素異常症以外にも心不全など多岐にわたる。症例についてはまず血液・尿のアミノ酸分析、GC/MS 分析、カルニチン分析等で他の2次的原因疾患を除外し、Bernier らの診断基準の possible 以上の基準を満たす症例を対象とした。十分なインフォームドコンセントを得て後に皮膚または臓器生検(または剖検)を行い、臓器は直接に、皮膚については線維芽細胞を培養し検索材料とした。

(2) 酵素診断：4つのミトコンドリア呼吸鎖複合体活性については、単離ミトコンドリアをサンプルとして分光高度計を用いて測定した。内部コントロールとしてクエン酸合成酵素(CS)活性を同時に測定し、CS との比で表した。

(3) BN-PAGE と活性染色・ウエスタンブロット：線維芽細胞や臓器より単離したミトコンドリアを界面活性剤と Coomassie Brilliant Blue G を含んだ緩衝液で可溶化し、4-13%の勾配ポリアクリルアミド電気泳動にかけた。タンパク質は BN-PAGE で展開してもその活

性は保持されるので、ゲルに対して直接酵素活性染色を行うことにより酵素異常症のスクリーニングができる。また正常とは異なる大きさの複合体が検出された場合は、それが活性を持つかどうかの検討も容易である。こうして得られた像を実際の *in vitro* 測定の活性値と比較検討した。さらにゲル分画パターンを陽性荷電したナイロン膜に転写し、各種のモノクローナル抗体を用いたイムノブロット解析で求める酵素の複合体としての大きさと量を検定した。

(4) ミトコンドリア遺伝子の解析：Single cell からでも検討可能な 2 段階 PCR 法を用いたミトコンドリア遺伝子全周シーケンス法と PCR-RFLP 法を用いて、迅速・正確にミトコンドリア遺伝子異常の検出を行った。

(5) ミトコンドリアと核 DNA 量の比較定量 (mtDNA/nDNA)：ミトコンドリア (呼吸鎖 I-ND1 サブユニット) と核 (臍のう胞性線維症遺伝子エクソン 24) の DNA を real time PCR (qPCR) で増幅しその量比を検討した。実験は 4 回繰り返して行い、その平均と標準偏差を測定した。

(6) ミトコンドリア DNA 枯渇症候群の責任遺伝子解析：すでに病因として報告のある 8 種類の遺伝子 (*DGUOK*, *MPV17*, *PEO1*, *POLG*, *RRM2B*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *TK2*) とその関連遺伝子 2 種 (*POLG2*, *ANT1*) 合計 10 種類の遺伝子を、各エクソン毎に PCR 増幅しその塩基配列を直接決定した。

(7) 先天性高乳酸血症の臨床像の集計とまとめ：確定診断のついた各呼吸鎖複合体異常症の臨床データを集計し、その特徴を検討した。今後、先天性高乳酸血症に占める各異常症の割合を推測し臨床へフィードバックすると共に、各症例の遺伝カウンセリングや将来的にはその根本治療へ繋がりたいと考えている。

4. 研究成果

(1) 合計 292 家系 298 症例から 432 検体 (皮膚線維芽細胞 194 検体、肝臓 102 検体、筋肉 94 検体、心臓 27 検体、腎臓 7 検体、脾臓 2 検体など) のご提供を頂いた。261 家系 267 名において BN-PAGE を用いたイムノブロットと活性染色、および *in vitro* 酵素アッセイを用いた蛋白レベルの解析が終了し 103 家系 110 名を呼吸鎖異常症と診断した (診断率 110/267=41.2%)。その内訳は、単独酵素異常症 65 例 (特に呼吸鎖 I 異常症が 44 例)、複合型酵素異常症 42 例等である。酵素診断と臨床診断の関係を図 1 に示すが、臨床症状が非常に多岐にわたっている事が分かる。

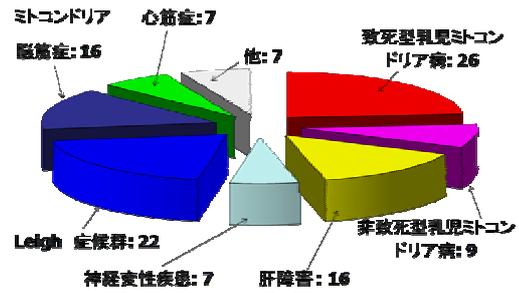


図 1. 酵素診断された患者の臨床診断。

(2) 複合型酵素異常症を中心に MDS を 15 家系 17 症例に認め、うち肝型 MDS 中 4 家系 6 症例で遺伝子異常を発見できた。内訳は *MPV17* (451insC/S170F) 2 例 (兄弟例), *POLG* (I1185T/A957V)+*SUCLG1* (P173A/--) 1 例, *DGUOK* c.143-308_169del1335 homo 2 例 (姉妹例), *DGUOK* (L248P/c.143-308_169del1335) 1 例である。特に *DGUOK* c.143-308_169del1335 変異は日本人のコモン変異の可能性がある。

(3) ミトコンドリア遺伝子異常としても既知、未知含めて 20 症例に変異を発見した。結論：BN-PAGE はミトコンドリア呼吸鎖異常症をはじめとする高乳酸血症の鑑別・スクリーニングに大変有用であると思われる、解析の結果日本人にも mtDNA 枯渇症候群と呼吸鎖 I 単独酵素異常症の頻度が高いことが確認された。

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 19 件)

Ohtake A, Aoki Y, Saito Y, Niihori T, Shibuya A, Kobayashi T, Kure S, Matsubara Y: Non-Hodgkin lymphoma in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 査読有, 32, 2010, in press

Sadakata R, Kodama K, Kaga A, Yamaguchi T, Soma T, Usui Y, Nagata M, Hagiwara K, Kanazawa M, Ohtake A, Hatamochi A: A case of Ehlers-Danlos syndrome type IV, vascular type, demonstrated a newly recognized point mutation in the COL3A1 gene. *Inter Med* 査読有, 49, 2010, in press.

Komaki H, Nishigaki Y, Fuku N, Hosoya H, Murayama K, Ohtake A, Goto YI, Wakamoto H, Koga Y, Tanaka M: Pyruvate therapy for Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase

deficiency. *Biochim Biophys Acta (General Subjects)* 査読有, 1800(3): 313-315, 2010

Kaji S, Murayama K, Nagata I, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohtake A, Iwasa H, Nishiyama M, Okazaki Y, Harashima H, Eitoku T, Yamamoto M, Matsushita H, Kitamoto K, Sakata S, Katayama A, Sugimoto S, Fujimoto Y, Murakami J, Kanzaki S, Shiraki K: Fluctuating liver functions in siblings with MPV17 mutations and possible improvement associated with dietary and pharmaceutical treatments targeting respiratory chain complex II. *Mol Genet Metab* 査読有, 97(4): 292-296, 2009

内藤幸恵、村山 圭、相澤まどか、大竹明：ミトコンドリア呼吸鎖の酵素活性により診断された新生児ミトコンドリア心筋症。日本未熟児新生児学会雑誌 査読有, 21(1):51-55, 2009

Tajima T, Ohtake A (T. T and O. A equally contribute to this work.), Hoshino M, Amemiya S, Sasaki N, Ishizu K, Fujieda K: *OTX2* loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 査読有, 94(1): 314-319, 2009

Murayama K, Nagasaka H, Tsuruoka T, Omata Y, Horie H, Tregoning S, Thorburn DR, Takayanagi M, Ohtake A: Intractable secretory diarrhea in a Japanese boy with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Eur J Pediatr* 査読有, 168(3): 297-302, 2009

Yasuno T, Kaneoka H, Tokuyasu T, Aoki J, Yoshida S, Takayanagi M, Ohtake A, Kanazawa M, Ogawa A, Tojo K, Saito T: Mutations of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) in Japanese patients with CPT II deficiency. *Clin Genet* 査読有, 73(5): 496-501, 2008

Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, Thorburn DR and Ryan MT: Analysis of the assembly profiles for mitochondrial and nuclear encoded subunits into Complex I. *Mol Cell Biol* 査読有, 27(12): 4228-4237, 2007

〔学会発表〕(計 68 件)

Ohtake A et al: Diagnoses and molecular bases of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan. The 1st Asian Congress

for Inherited Metabolic Diseases. 2010 年 3 月 7 日 ~ 10 日 (Fukuoka, Japan)

Ohtake A: Diagnoses and molecular bases of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan. China-Japan in inborn error metabolism 2009 招待講演 2009 年 10 月 22 日 ~ 10 月 24 日 (首都医科大学附属北京儿童医院, Beijing, China)

Ohtake A et al: Diagnoses and molecular bases of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism 2009 年 8 月 29 日 ~ 9 月 2 日 (San Diego, California, USA)

大竹 明：ミトコンドリア異常症の新しい展開 - 日本の現状も含めて - . 第 136 回日本小児科学会埼玉地方会特別講演 2009 年 5 月 24 日 (さいたま市)

大竹 明：オルガネラ病 - 内海に浮かぶ個性豊かな島々の反乱。日本生化学会関東支部教育シンポジウム「細胞内オルガネラとその病気 - 内海に浮かぶ個性豊かな島々とその反乱」 2009 年 2 月 28 日 (文京区)

大竹 明：ミトコンドリア DNA 枯渇症候群。第 50 回日本先天代謝異常学会総会教育講演 2008 年 11 月 6 日 ~ 8 日 (米子市)

〔図書〕(計 8 件)

大竹 明：診断と治療社、症例から学ぶ先天代謝異常症 ~ 日常診療からのアプローチ ~、2009、11-13, 132-135, 140-147

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大竹 明 (OHTAKE AKIRA)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00203810

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし