様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　(共通)

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：１０１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ０８５２９

研究課題名（和文）ミトコンドリア心筋症の新規診断法の確立

研究課題名（英文）Establishment of the new diagnostic method in mitochondrial cardiomyopathy

研究代表者
武田　充人（Takeda, Atsuhito）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：００３７４４１３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：二次性心筋症の一つであるミトコンドリア心筋症（MCM）は病理、組織生化学、遺伝子検査によって確定診断されるが、心筋病理には明確な基準がない。そこで臨床症状や遺伝子検査、組織生化学検査によって確定診断されたMCMにおいて、電子顕微鏡像におけるミトコンドリア体積密度測定および呼吸鎖酵素抗体を用いた免疫染色を行い、MCM以外の他の心筋症と比較を行った。ミトコンドリア体積密度はMCM群で有意に高く免疫染色ではMCM群にComple ⅠまたはⅣに染色性の低下を認めた。この研究によって電子顕微鏡と免疫染色を用いてMCMの病理診断が可能となり、MCMの病理診断基準にとっても非常に有益な結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ミトコンドリア心筋症の確定診断法について病理学的に確立し、二次性心筋症の鑑別診断に大きく貢献した。特に呼吸鎖酵素抗体による免疫染色法による診断法の開発により、ホルマリン固定のみの検体でも病理診断が可能であることを示した。ミトコンドリア心筋症は乳児発症例の生命予後が不良であり乳幼児突然死症候群の一因としても考えられている。したがって、本診断法はチャイルド・デス。レビューの死因究明にも応用できる。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial cardiomyopathy (MCM), one of the secondary cardiomyopathies, is diagnosed definitively by pathology, tissue biochemistry, and genetic testing, but there are no clear criteria for myocardial pathology. Therefore, we measured mitochondrial volume density in electron microscopy images and performed immunohistochemistry using respiratory chain enzyme antibodies in MCMs diagnosed definitively by clinical symptoms, genetic testing, and tissue biochemistry, and compared them with other cardiomyopathies other than MCM. Mitochondrial volume density was significantly higher in the MCM group, and immunohistochemistry showed decreased staining for Complex I or IV in the MCM group. This study allowed the pathological diagnosis of MCM using electron microscopy and immunohistochemistry, which is very useful for the pathological criteria of MCM.

研究分野：小児科

キーワード：ミトコンドリア心筋症　電子顕微鏡　Stereology　免疫染色法

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

ミトコンドリア心筋症(MCM)は二次性心筋症において鑑別される心筋症の一つであるが、通常は特徴的な随伴症状を伴うことで疑われるが、心筋症単独発症の場合は病理学的な診断基準が確立していないため診断が困難である。本症は心筋組織の電子顕微鏡像で大小不同のミトコンドリア充満像やクリステの異常を認めることで疑われるが、他の心筋症にみられる非特異的なミトコンドリア増加像との鑑別が難しく、心筋細胞におけるミトコンドリア体積密度を定量化することで鑑別可能ではないかと考えた。また、本症は本来は心筋組織の呼吸鎖酵素活性を生化学的に測定することで診断するが、心筋組織を-80℃凍結されている必要があり、実際には保存されていることはほとんどない。そこで、呼吸鎖酵素抗体を用いた免疫染色で代用可能ではないかと考えた。

２．研究の目的

ミトコンドリア心筋症の病理診断法を確立する。

３．研究の方法

MCM の鑑別を要した心筋症で当科において 2011 年から 2019 年までに心筋生検を行った 11 症例を対象とした。心筋の呼吸鎖酵素活性はクエン酸合成酵素および Complex II を内因性コントロールとした。対象をミトコンドリア心筋症群 (MCM 群: 症例 1-4)と非ミトコンドリア心筋症群 (non-MCM 群:症例 5-11)の２群に分けた。

【定量形態学的分析】
電顕による画像解析法を図１に示す。心筋細胞内におけるミトコンドリアおよび筋原線維の体積密度を計測した。

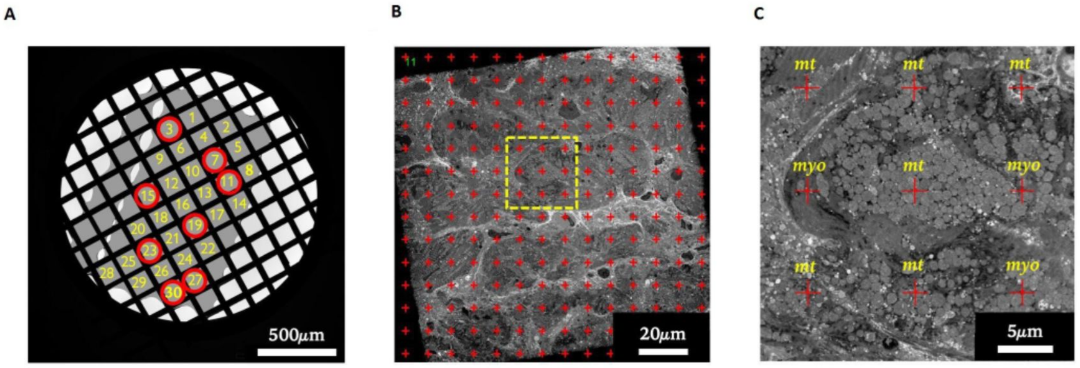

図１　Stereology を用いた心筋細胞の定量解析
A　ランダムサンプリング法による計測視野の抽出、B　定量解析のための視野と体積密度測定用のグリッド、C　B 黄色点線部分の拡大図とオルガネラの同定　（mt：ミトコンドリア、myo:筋原線維）

【免疫染色法による解析】
呼吸鎖酵素複合体の各種サブユニット抗体を用いて免疫染色を行い、発色部分を定量評価し、Comlex II との比で表現した([Complex I/ Complex II] 、[Complex IV/ Complex II])。これらの比は正常心筋における比との対正常比を求めた。
統計解析
データは中央値（範囲）とし、両群の比較は Mann-Whitney Rank-Sum test を使用した。呼吸鎖酵素活性と免疫染色法との整合性を調べるため、kappa 係数を求めた。

４．研究成果

両群におけて、年齢、身長、胸部 X 線像における心胸郭比では有意な差は認めなかった。MCM 群で２例が死亡、non-MCM 群で 2 例が死亡し、心移植例はいなかった。

電子顕微鏡定量解析

ミトコンドリアの体積密度 Vv(mit, CM) は MCM 群において non-MCM 群よりも有意に高かった [MCM 群 39 (39-45)%, non-MCM 群 24 (17-30)%, p=.007]. 筋原線維の体積密度 Vv(myo, CM)は MCM 群において non-MCM 群よりも有意に低かった
[44 (41-48)%, 68 (63-73)%, p=.008] (図 2) 。

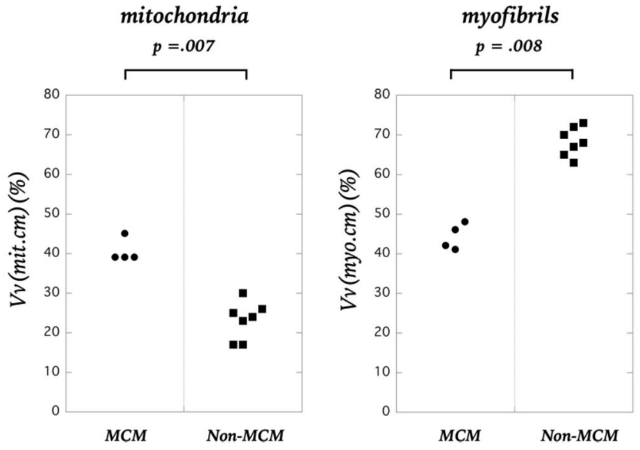

図２　ミトコンドリアおよび筋原線維の体積密度

免疫染色法による解析（図３）

MCM 群４例中３例がミトコンドリア呼吸鎖酵素異常（MRCD）の大基準、1 例が小基準を満たし、呼吸鎖酵素活性と同様の結果であった。一方、non-MCM 群では全例が正常であり MRCD の基準を満たした症例は認められなかった。呼吸鎖酵素活性と免疫染色法の整合性についての Kappa 係数は 0.83 であった。

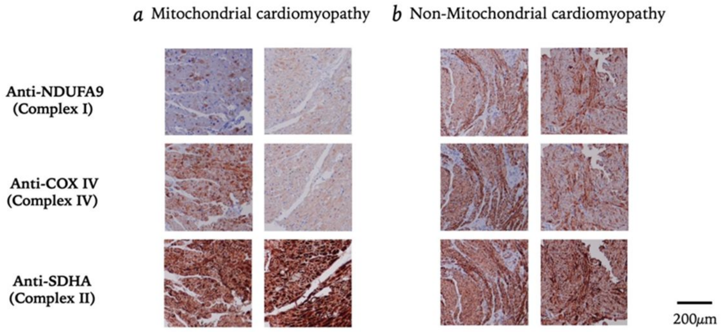

図３　呼吸鎖酵素抗体を用いた免疫染色

我々が施行した免疫染色法は未染標本があれば検査可能で呼吸鎖酵素活性と整合性が高く代用可能なことが示された。電顕像によるミトコンドリア体積密度は non-MCM 群で中央値 23%であり既報と同様であった。また 30%を超える症例は認めなかったが、MCM 群では全例が 30%を超えており、30%を超える場合は MCM を積極的に疑うべきである。以上より、MCM は電顕での定量形態学的手法および免疫染色法による病理診断が可能と考えられた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Takeda A, Murayama K, Okazaki Y, Imai-Okazaki A, Ohtake A, Takakuwa E, Yamazawa H, Izumi G, Abe J, Nagai A, Taniguchi K, Sasaki D, Tsujioka T, John M Basgen	４．巻 -
２．論文標題 Advanced pathological study for definite diagnosis of mitochondrial cardiomyopathy	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Journal of Clinical Pathology	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jclinpath-2020-206801	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 該当する

１．著者名 Maruo Y, Ueda Y, Murayama K, Takeda A	４．巻 -
２．論文標題 A case report of Leigh syndrome diagnosed by endomyocardial biopsy.	５．発行年 2021年
３．雑誌名 European heart journal. Case reports	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ehjcr/ytaa582	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 －

１．著者名 Abe J, Yamaguchi T, Matsuzawa M, Kobayashi I, Takeda A	４．巻 62
２．論文標題 A case undergoing cocktail therapy for cardiac involvement in Barth syndrome.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Pediatrics International	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14342	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 －

１．著者名 Imai-Okazaki A, Kishita Y, Kohda M, Mizuno Y, Fushimi T, Matsunaga A, Yatsuka Y, Hirata T, Harashima H, Takeda A, Nakaya A, Sakata Y, Kogaki S, Ohtake A, Murayama K, Okazaki Y.	４．巻 279
２．論文標題 Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease: Prognosis and genetic background.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Int J Cardiol.	６．最初と最後の頁 115-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijcard.2019.01.017	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4件（うち招待講演　2件／うち国際学会　3件）

１．発表者名 Atsuhito Takeda
２．発表標題 Challenging in diagnosis and treatment of mitochondrial cardiomyopathy
３．学会等名 Japan Circulation Society（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2020年

１．発表者名 Atsuhito Takeda
２．発表標題 Advanced pathologic study for definite diagnosis of mitochondrial cardiomyopathy
３．学会等名 European Society of Cardiology Congress 2020（国際学会）
４．発表年 2020年

１．発表者名 Atsuhito Takeda
２．発表標題 Challenging in diagnosis and management of mitochondrial cardiomyopathy
３．学会等名 JSPCCS-AHA Joint session（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2020年

１．発表者名 武田　充人
２．発表標題 小児心筋症の原因診断における心筋生検の適応と役割
３．学会等名 日本小児循環器学会
４．発表年 2019年

〔図書〕　計3件

1．著者名	4．発行年
武田　充人	2019年
2．出版社 診断と治療社	5．総ページ数 127
3．書名 小児科医に知ってほしいミトコンドリア病UPDATE 小児科診療82巻4号	

1．著者名	4．発行年
武田　充人	2019年
2．出版社 メジカルビュー社	5．総ページ数 169
3．書名 ザ・マニュアル　心不全のセット検査	

1．著者名	4．発行年
武田　充人	2019年
2．出版社 南江堂	5．総ページ数 213
3．書名 実は知らない循環器希少疾患 どう診る？どう対応する？	

〔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
研究分担者	永井　礼子 (Nagai Ayako) (10622160)	北海道大学・大学病院・医員 (10101)	

６．研究組織（つづき）

	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
研究分担者	山田　勇磨 (Yamada Yuma) (60451431)	北海道大学・薬学研究院・准教授 (10101)	

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