

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08497

研究課題名（和文）非侵襲的検体を用いた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 novel non-invasive diagnostic methods for mitochondrial cardiomyopathy

研究代表者

岡崎 敦子（今井敦子）（OKAZAKI, ATSUKO）

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70761691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア心筋症の診断が困難な一因として、変異ミトコンドリアDNAは主に心筋に存在するため診断には心筋組織が必要であることが挙げられる。本研究では、新規開発した変異ミトコンドリアDNA定量化システムを遺伝子同定済のミトコンドリア心筋症例に適用し、心筋症に最適化した変異定量化システム開発を行った。具体的には、心筋症に最適化した変異定量化システムを用いて、同一患者における各臓器間での変異ミトコンドリアDNA率の比較に成功した。解析対象とするミトコンドリアDNA変異種の拡大および変異ミトコンドリアDNA率と心筋症重症度・予後との相関のエビデンス構築を進め、論文発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

確立した診断法が存在しないミトコンドリア心筋症の診断率の向上は長年の課題であった。申請者らの開発した変異ミトコンドリアDNA定量化システムは、非侵襲的に入手可能な尿検体を用いてミトコンドリア心筋症の診断が可能となる手法であり、心筋生検という侵襲を必要としないという利点を有する。さらに現在定量化手法の存在しないミトコンドリアDNA欠失変異に対しても、欠失部位によらず定量化が可能である。本システムは臨床現場で活用できるミトコンドリア心筋症の診断ツールとしての有用性を持つ。さらに変異ミトコンドリアDNA率と心筋症重症度、予後との相関はミトコンドリア心筋症に対する心臓移植適応のエビデンス構築に役立つ。

研究成果の概要（英文）：We successfully established novel non-invasive diagnostic methods for mitochondrial cardiomyopathy. Firstly we completed dataset where we compared heteroplasmy in urine with that in heart tissue in several mitochondrial cardiomyopathy patients. Secondly, by using those dataset, we developed novel diagnostic systems for quantifying mitochondrial DNA heteroplasmy rate in urine using droplet digital PCR. In addition, we published our evidence on relation between genetic background including mitochondrial DNA heteroplasmy rate and prognosis in mitochondrial cardiomyopathy patients.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：ミトコンドリア病 心筋症 ミトコンドリア心筋症 ヘテロプラスミー

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア心筋症の診断が困難な一因として、変異ミトコンドリア DNA は主に心筋に存在するため**診断には心筋組織が必要**であることが挙げられる。

ミトコンドリア心筋症の原因となる変異ミトコンドリア DNA は心筋に多く存在するため、心筋症発症後に心筋生検を行い変異ミトコンドリア DNA を検出し診断に至るのが一般的である。しかし上記の現状では心筋症が顕性化し心筋生検に至る前段階での診断は困難であり、また心筋生検を施行しない症例では診断が行えないという問題が残る。申請者らは変異ミトコンドリア DNA 率が各臓器間で異なることを実証し (Int J Cardiol. 2019) 、さらに尿中の変異ミトコンドリア DNA 率が心筋での割合を最もよく反映することを発見した (下表)。

症例	ミトコンドリア DNA 変異	心筋での変異率	血液での変異率	尿での変異率
34 才 HCM	m.3243A>G	88%	25%	72%
43 才 HCM	m.3243A>G	84%	31%	79%
59 才 HCM	m.3243A>G	73%	15%	68%

さらにミトコンドリア心筋症診断の限界の 2 点目として、変異コピー数が少ない、欠失変異の場合定量法が存在しないことが挙げられる。

ミトコンドリア心筋症の原因となるミトコンドリア DNA 点変異の定量化はリアルタイム PCR を用いて行われるのが一般的であるが、変異ミトコンドリア DNA コピー数が少ない場合は正確な検出が困難であり、また欠失変異の場合は症例毎に欠失部位が異なるため、汎用的な定量化手法が存在しないという問題が存在する。

申請者らは上記の課題に対して、これまでに全エクソーム解析もしくはパネル解析を行った 891 例のミトコンドリア病患者 (図 1) のミトコンドリア DNA のバリエーション情報を分析し汎用性の高い欠失変異定量法を開発し、さらにデジタル PCR の核 DNA コピー数に対する絶対定量法をミトコンドリア DNA コピー数の定量化測定に応用することで、現在定量法の存在しない少量コピー数、欠失変異に対する新規定量法を開発した。

2. 研究の目的

本研究計画では現在までの成果を踏まえ、原因変異同定済みのミトコンドリア心筋症 45 症例のデータを用いて、開発した変異ミトコンドリア DNA 定量化手法を基盤として心筋症に最適化した変異ミトコンドリア DNA 定量化手法を開発し、非侵襲的に入手可能な尿検体を用いたミトコンドリア心筋症の診断率向上を目指す (図 1)。

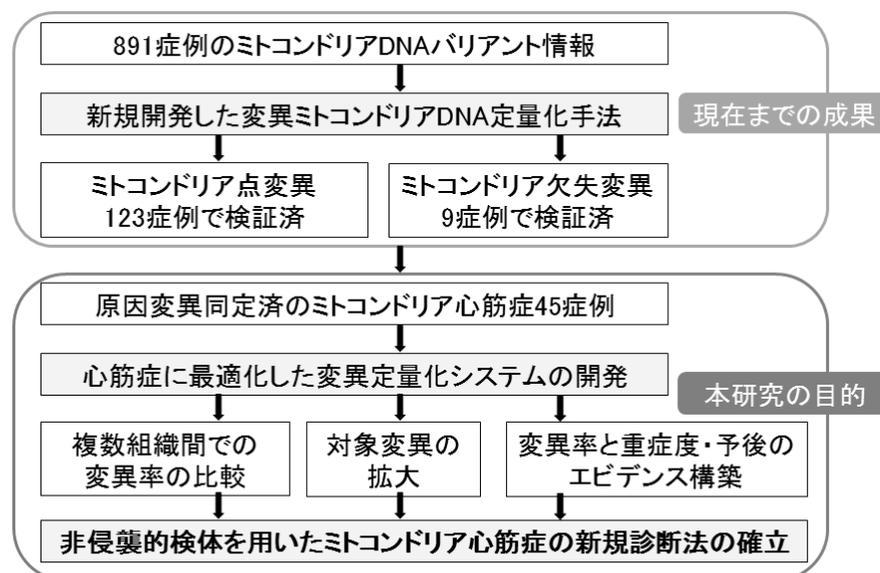


図 1:ミトコンドリア心筋症の診断率向上に向けた現在までの成果と本研究の目的

3. 研究の方法

計画(1)心筋症に最適化した変異ミトコンドリア DNA 定量化システムの開発

申請者らはこれまでにを行ったデジタル PCR を用いた条件検討により、核 DNA 上の変異検出には 20ng/ul の DNA 濃度が必要であるのに対して、コピー数が核 DNA より多いミトコンドリア DNA 上の変異検出には、血液検体では 90pg/ul、尿検体では 100pg/ul の濃度が最適である事実を同定した。45 症例のミトコンドリア心筋症例の心筋サンプルを用いて、ミトコンドリア DNA コピー数が血液、尿よりも多い心筋における最適なサンプル濃度を決定し、心筋症に最適化した変異ミトコンドリア DNA 定量化システムを開発する。

計画(2)複数組織間での変異ミトコンドリア DNA 率の比較

申請者らはこれまでにミトコンドリア病患者において変異ミトコンドリア DNA 率が各臓器間で異なることを実証している。ミトコンドリア心筋症 45 症例に対して、上記で開発した心筋症に最適化した変異定量化システムを用いて各臓器間での変異ミトコンドリア DNA 率を比較する。特に心筋、血液、尿検体間での変異率を比較し、非侵襲的に入手可能な尿検体における変異ミトコンドリア DNA の検出精度を検証する。

計画(3)解析対象とするミトコンドリア DNA 変異種の拡大

ミトコンドリア心筋症の原因となる主要なミトコンドリア DNA 変異 (m.3243A>G/MT-TL1, m.8528T>C/MT-ATP6/8, m.13513G>A/MT-ND5) に関しては自験例の 891 症例のミトコンドリア DNA バリエーション情報を元にデジタル PCR を用いた変異検出に最適なプライマー・プローブセットを設計しデジタル PCR を用いて検証済みである。上記以外にミトコンドリア心筋症の原因となる m.14453G>A (ND-6) 等、解析対象となる変異種を拡大する。

計画(4)変異ミトコンドリア DNA 率と心筋症重症度・予後との相関のエビデンス構築

申請者らはこれまで遺伝子解析を施行したミトコンドリア病患者 891 症例において 226 例で原因変異を同定し、ミトコンドリア心筋症例 (n=45) は心筋症非合併ミトコンドリア病症例 (n=181) と比較して有意に予後が悪いことを明らかにしている (Imai-Okazaki et al, *Int J Cardiol* 2019)。ミトコンドリア心筋症 45 症例において、変異率と心筋症重症度・予後との相関に関する検討を行い、ミトコンドリア心筋症に対する移植適応のエビデンス構築を目指す。

4. 研究成果

上記 4 計画の実行により、心筋、尿、その他の臓器における変異率を比較することで非侵襲的に入手可能な尿検体を用いたミトコンドリア心筋症の新規診断法の確立という目的を遂行できた。

(1)心筋症に最適化した変異ミトコンドリア DNA 定量化システムの開発

45 症例のミトコンドリア心筋症例の心筋サンプルを用いて、ミトコンドリア DNA コピー数が血液、尿よりも多い心筋における最適なサンプル濃度を決定することができた。濃度がばらつく原因についても精査を行い、最適なレンジを決定し得た。

(2)上記で開発した心筋症に最適化した変異定量化システムを用いて、同一患者における各臓器間での変異ミトコンドリア DNA 率の比較に成功した。尿検体から抽出した DNA の質が個人によってばらつきがある事実に対して、ミトコンドリア病患者から得た尿中の cell free DNA と沈渣 DNA における変異率の分布の差異を比較した。

(3)解析対象とするミトコンドリア DNA 変異種の拡大および変異ミトコンドリア DNA 率と心筋症重症度・予後との相関のエビデンス構築を進めた。具体的には、ミトコンドリアモデルマウスが有する 1 変異を新たに解析対象として追加し、digital PCR による変異率の測定系を確立し、さらにマウス心筋・尿・その他の臓器における変異率と表現型の相関に関する検討に成功した。

(4)さらに得られた変異率とミトコンドリア心筋症患者における重症度・予後との相関に関して論文化を行いプレスリリースも行った (Imai-Okazaki et al, *Int J Cardiol*, 2021)。本研究では、2004 年から 2019 年の研究期間において、生化学・臨床診断で基準を満たした 18 歳未満の小児ミトコンドリア病疑い患者 666 患者のうちを対象に遺伝子解析を行ったところ、223 例に対してミトコンドリア病の原因遺伝子の同定に成功した。そして、その全症例において心筋症の詳細病型を含む臨床的特徴、長期生命予後を調査した。遺伝的基盤の同定については、患者の血液、皮膚、罹患臓器サンプルから抽出した DNA を抽出し、核遺伝子およびミトコンドリア DNA の網羅的解析により行った。その結果、114 例の核遺伝子異常、89 例のミトコンドリア DNA 点変異、11 例のミトコンドリア DNA 単一大欠失、9 例の染色体構造異常を認めた。臨床的特徴については、心筋症は全体の 22%である 46 症例に認めた。心筋症の内訳は、全体の 76%にあたる 35 例が肥大型心筋症で、拡張型心筋症は 6 例に、左室緻密化障害は 5 例に認めた。長期生命予後に関しては、中央値 36 週 (12-77 週) のフォローアップ期間中に、全体の 38%である 85 例の死亡を認められた。心筋症症例の死亡率は、心筋症を有さない症例と比較して有意に高い結果となった (図 2)。

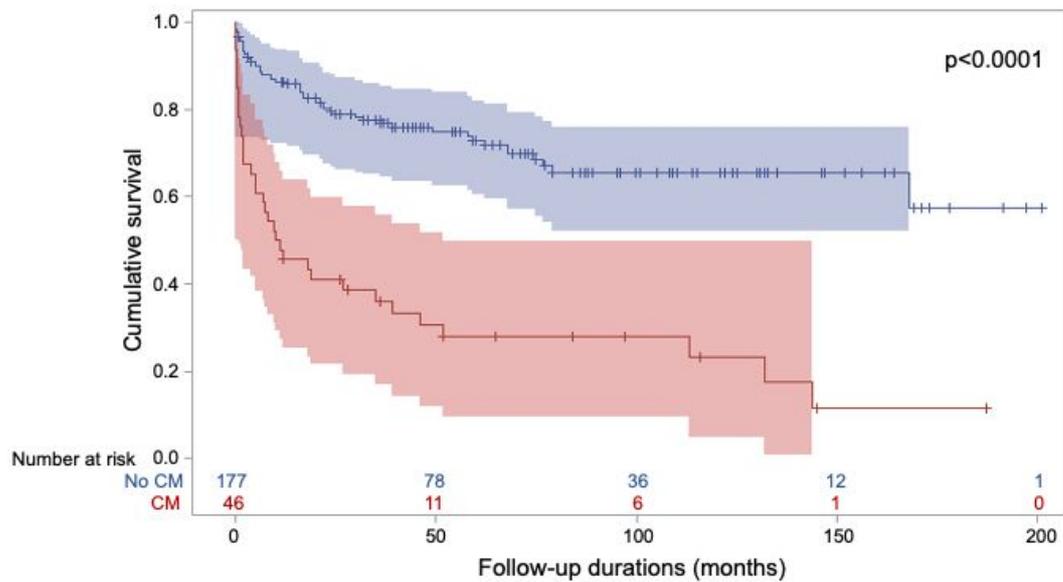


図2： 心筋症症例と非心筋症症例の生存曲線

心筋症症例（46 症例：赤）の予後は、心筋症を有さない症例（177 症例：青）と比較して有意に悪かった。

それぞれの結果を用いて多変量解析を行ったところ、左室肥大(ハザード比 4.6)、新生児発症(ハザード比 2.9)、染色体構造異常(ハザード比 2.9)が全死亡に対する独立したリスク因子であった。左室肥大を認める患者のうち新生児発症/染色体構造異常を合併する 21 症例の死亡率は 100%であり、新生児発症/染色体構造異常を合併しない 14 症例の死亡率(71%)より高い結果となった(図3)。以上の結果から、心筋症を合併する症例は約 20%に上り、非合併例より予後が悪いことが明らかになった。中でも新生児発症・染色体構造異常*2 を伴う左室肥大は極めて予後が悪いことがわかった。

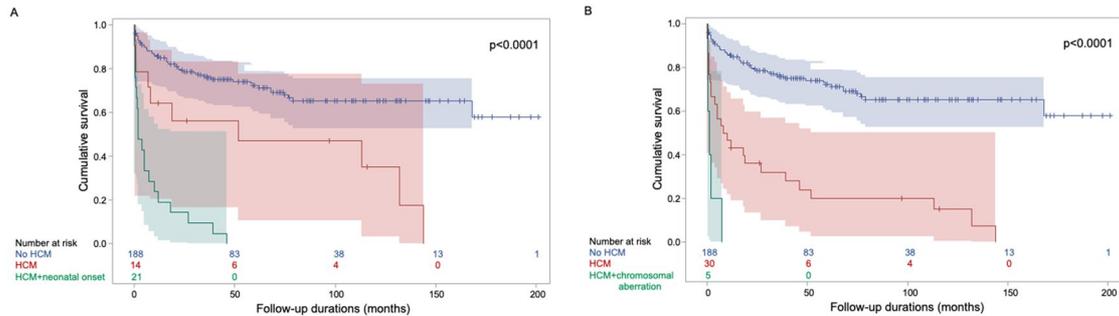


図3： 左室肥大に新生児発症/染色体構造異常を合併した症例の生存曲線

左室肥大に新生児発症を合併した症例（緑）は左室肥大単独例よりも予後が悪く（左図）、左室肥大に染色体構造異常を合併した症例（緑）は左室肥大単独例よりも予後が悪かった（右図）。青は左室肥大を認めない症例。

本研究の成果は、ミトコンドリア病の中で頻度が高いにも関わらず、これまで診断がつかない例もあった小児ミトコンドリア心筋症を、正確かつ迅速に診療する際に正確な情報源として臨床現場において活用されると考えられる。さらに、ミトコンドリア心筋症の新たな病態解明と病因遺伝子に基づく治療開発、さらに心臓移植に関するエビデンス構築や本邦で展開されている創薬研究などにも貢献できることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imai-Okazaki Atsuko, Matsunaga Ayako, Yatsuka Yukiko, Nitta Kazuhiro R., Kishita Yoshihito, Sugiura Ayumu, Sugiyama Yohei, Fushimi Takuya, Shimura Masaru, Ichimoto Keiko, Tajika Makiko, Ogawa-Tominaga Minako, Ebihara Tomohiro, Matsunaga Tetsuro, Tsuruoka Tomoko, Kohda Masakazu, Hirata Tomoko, Harashima Hiroko et al.	4. 巻 341
2. 論文標題 Long-term prognosis and genetic background of cardiomyopathy in 223 pediatric mitochondrial disease patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 48 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2021.06.042	査読の有無 無
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 Atsuko, Yagi Nobuyasu, Nitta Kazuhiro R., Murayama Kei, Ohtake Akira, Okazaki Yasushi	4. 巻 59
2. 論文標題 Clinical heterogeneity in patients with m.4412G>A MT-TM mutation and different heteroplasmy levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 214 ~ 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mito.2021.06.001	査読の有無 無
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 Ebihara Tomohiro, Nagatomo Taro, Sugiyama Yohei, Tsuruoka Tomoko, Osone Yoshiteru, Shimura Masaru, Tajika Makiko, Matsunaga Tetsuro, Ichimoto Keiko, Matsunaga Ayako, Akiyama Nana, Ogawa-Tominaga Minako, Yatsuka Yukiko, Nitta Kazuhiro R, Kishita Yoshihito, Fushimi Takuya, Imai-Okazaki Atsuko et al.	4. 巻 In press
2. 論文標題 Neonatal-onset mitochondrial disease: clinical features, molecular diagnosis and prognosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/archdischild-2021-321633	査読の有無 無
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 Shimura Masaru, Onuki Takanori, Sugiyama Yohei, Matsunaga Tetsuro, Ebihara Tomohiro, Fushimi Takuya, Tajika Makiko, Ichimoto Keiko, Matsunaga Ayako, Tsuruoka Tomoko, Nitta Kazuhiro R, Imai-Okazaki Atsuko, Yatsuka Yukiko, Kishita Yoshihito, Ohtake Akira, Okazaki Yasushi, Murayama Kei	4. 巻 63
2. 論文標題 Development of Leigh syndrome with a high probability of cardiac manifestations in infantile-onset patients with m.14453G>A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mito.2021.12.005	査読の有無 無
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 Kashiki Tomoko, Kido Jun, Momosaki Ken, Kusunoki Shouichirou, Ozasa Shiro, Nomura Keiko, Imai-Okazaki Atsuko, Tsuruoka Tomoko, Murayama Kei, Koga Yasutoshi, Nakamura Kimitoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Mitochondrial DNA depletion syndrome with a mutation in SLC25A4 developing epileptic encephalopathy: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 56 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2021.08.005	査読の有無 無
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 Okazaki Atsuko, Horpaopan Sukanya, Zhang Qingrun, Randesi Matthew, Ott Jurg	4. 巻 12
2. 論文標題 Genotype Pattern Mining for Pairs of Interacting Variants Underlying Digenic Traits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1160 ~ 1160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12081160	査読の有無 無
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 A Okazaki, S Yamazaki, I Inoue, J Ott	4. 巻 140
2. 論文標題 Population genetics: past, present, and future	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Genet	6. 最初と最後の頁 231-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-020-02208-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡崎敦子
2. 発表標題 小児ミトコンドリア病223症例における心筋症の遺伝的基盤および長期予後に関する検討
3. 学会等名 第30回日本小児心筋疾患学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuko Okazaki
2. 発表標題 Long-term prognosis and genetic background in 223 children with mitochondrial disease
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuko Okazaki
2. 発表標題 Prognosis and Genetic Background of Mitochondrial Cardiomyopathy in 223 Mitochondrial Disease Patients
3. 学会等名 84th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 肥大型心筋症治療剤	発明者 順天堂大学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021 - 009754	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	山崎 悟 (YAMAZAKI SATORU) (70348796)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	

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
---------	---------