

令和元年6月27日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09597

研究課題名(和文) Leigh脳症におけるミトコンドリア選択的オートファジー活性の検討と治療応用

研究課題名(英文) Evaluation of mitophagy activity in patients with Leigh encephalopathy

研究代表者

宮原 弘明 (Miyahara, Hiroaki)

愛知医科大学・付置研究所・講師

研究者番号：00457615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：当初はミトコンドリア病患者の線維芽細胞を用いた実験を計画していたが、細胞の脆弱性のため継代培養自体が困難であった。次善策として所属施設に保存されているミトコンドリア病の病理検体と凍結保存検体を用いて変異ミトコンドリア率やミトコンドリア活性の解析を試みている。その過程で特殊なミトコンドリア病の症例報告を作成しNeuropathologyに掲載された。今後はミトコンドリア病の病理検体と凍結検体を用いた変異ミトコンドリア率やミトコンドリア活性の解析を継続し、研究報告と論文投稿することを目標としている。

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ミトコンドリアの機能異常が原因であると推察されているが、発症メカニズムについては十分に解明されておらず、治療も対症的なものしかない。発症にミトコンドリアDNAの変異率の上昇やミトコンドリアの機能異常が関連していることを明らかにできれば、遺伝子治療などの根本治療への足掛かりになり、将来的にはミトコンドリア病患者の根本的治療に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：At first, we tried to culture fibroblast cells derived from patients with Leigh encephalopathy, but the fibroblasts were too fragile to continue passage culture. Next, we started to assess mutation rate of mitochondrial DNA and activity of mitochondria in patients with MELAS, which was different type of mitochondrial disease. Recently, our report regarding MELAS/MERRF overlap syndrome was accepted in Neuropathology. In the future, we keep evaluating the experiments about MELAS, and submit a research article until 2020.

研究分野：神経病理学

キーワード：ミトコンドリア病 Leigh脳症 ミトファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病とはミトコンドリアの働きが低下することで発生する病気の総称であり、原因遺伝子と臨床像から多くの病型に分類される。ミトコンドリアはエネルギー産生に關与する重要な小器官であることから、多くのエネルギーを要する骨格筋や中枢神経において顕著な症状が出現する。1980年代から注目されている疾患概念であるが、未だに根本治療はない難病である。そのうち乳児期から、発達遅滞、成長障害、筋緊張低下、痙攣などを呈し、基底核と脳幹被蓋部に対称性病変を認めるものを Leigh 脳症と分類する。ミトコンドリア病の中で、高乳酸血症・脳卒中様症状を伴うミトコンドリア病 (MELAS) や赤色ぼろ線維を伴うミオクローヌステんかん (MARRF) とミトコンドリア選択的オートファジー (ミトファジー) との關連を検討した報告はあるが、Leigh 脳症においてミトファジーを検討した報告はない。不良ミトコンドリアを除去することで症状の改善を期待できるという発想から、ミトファジーの制御が Leigh 脳症の根本治療になりうると考えている。

2. 研究の目的

申請者は過去に結節性硬化症の中枢神経病変におけるオートファジー (自食作用) 機能不全の存在を見出した。本研究では Leigh 脳症の患児から得た培養線維芽細胞株を用いて、Leigh 脳症におけるミトファジーの役割を明らかにし、ミトファジーを制御することによる Leigh 脳症の有効治療の確立を目指す。

3. 研究の方法

3 - 1. Leigh 脳症患児と健常人における培養線維芽細胞株の確立

予備実験として、健常人の皮膚組織から得られた線維芽細胞を培養した。継代培養、培養細胞の凍結・融解も問題なく行えることを確認した。また、栄養除去培地で3時間培養 (飢餓負荷) を行った細胞は伸長した突起が弱々しく細胞接着能力も減弱した。予備実験で用いた培養細胞株は凍結保存しており、本研究にて正常対照として用いる予定。

3 - 2. Leigh 脳症におけるミトコンドリア活性の定量とミトコンドリア蛍光染色の検討

3 - 2 - 1. ミトコンドリア活性の定量化

ミトコンドリア単離・活性アッセイキット (BioChain 社) を用いて、チトクローム c オキシダーゼ活性によりミトコンドリア活性を定量的に評価する。また、ミトコンドリア病の増悪期に上昇する乳酸・ピルビン酸 (培養上清) を ELISA 法により測定し、病勢や治療反応の指標とする。

3 - 2 - 2. ミトコンドリア蛍光染色

MitoTracker™ Red 580 (Molecular Probes 社) 含有培地 (250nM in PBS またはフェノールレッドを含まない培地) にて培養線維芽細胞を 10~45 分培養。MitoTracker™ Red 580 を含有しない培地でさらに 10~60 分培養。蛍光顕微鏡またはレーザー顕微鏡で観察。ミトコンドリアが赤色蛍光で観察される。

3 - 3. ウェスタンブロッティングと GFP-LC3 を用いたミトファジー活性の経時的変化の検討

3 - 3 - 1. 培養線維芽細胞を用いたミトファジーに關連する蛋白や遺伝子の解析

培養細胞から蛋白を抽出し、一般的なオートファジー反応に必要な蛋白である LC3 や p62、ミトコンドリア選択性に關与するとされる Uth1、Atg32、NIX、Parkin、PINK1、FUNDC1 などの発現をウェスタンブロッティングで検討する。また、各關連遺伝子の発現をリアルタイム PCR によって検討する。ウェスタンブロッティングとリアルタイム PCR にて得られた結果は定量化し統計学的に關連性を検討する。ウェスタンブロッティングはオートファジー活性を評価する一般的な手法の一つであり、オートファジーが活性化するほど LC3-II のバンドが濃く描出され、p62 はバンドが薄くなっていく。下図は申請者が予備実験として行った長期培養負荷によるオートファジー誘導の結果であり、100%コンフルエントから培養日数を延長するにつれ、LC3-II の発現が増強し、p62 の発現が後半減衰することを確認した。

3 - 3 - 2. GFP-LC3 を用いたミトファジーの経時的観察

GFP-LC3 を transfection した培養細胞のオートファジー観察技術に關しては、申請者が新潟大学脳研究所留学中に指導を受けた青木らの研究論文 (Aoki H et al. Autophagy. 2008;4:467-475.) に基づいて行う。GFP-LC3 はオートファゴゾーム形成過程で膜構成蛋白として働き、ミトファジーが誘導されたときは細胞質にドット状 or リング状の蛍光として可視化される。3 - 2 - 2 の MitoTracker™ との 2 重蛍光染色を行えば相互關係のより詳細な観察が可能となる。

3 - 4. ミトファジーを制御することによる新しい Leigh 脳症治療法の開発

3 - 4 - 1. ミトファジー促進剤を用いた不良ミトコンドリアの除去・分解

エベロリムスやラパマイシンを培養細胞に添加することでミトファジー活性を強制的に誘導し、不良ミトコンドリア除去を促進し細胞内ミトコンドリア機能の回復が得られるか検討する。指標としてミトコンドリア活性・乳酸・ピルビン酸値を用いる。

3 - 4 - 2. mitoTALEN による変異 mtDNA の除去とミトファジーの変化

mitoTALEN (転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ; Carlos Moraes et al. Nature medicine. 2013) による変異 mtDNA の除去によってミトコンドリア機能の回復が得られるか

を上記の手法を用いて評価する。

4．研究成果

当初はミトコンドリア病患者の線維芽細胞を用いた実験を計画していたが、細胞の脆弱性のため継代培養自体が困難であった。次善策として所属施設に保存されているミトコンドリア病の病理検体と凍結保存検体を用いて変異ミトコンドリア率やミトコンドリア活性の解析を試みている。その過程で特殊なミトコンドリア病の症例報告を作成し Neuropathology に掲載された。今後はミトコンドリア病の病理検体と凍結検体を用いた変異ミトコンドリア率やミトコンドリア活性の解析を継続し、研究報告と論文投稿することを目標としている。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Miyahara H, Matsumoto S, Mokuno K, Dei R, Akagi A, Mimuro M, Iwasaki Y, Yoshida M. Autopsied case with MERRF/MELAS overlap syndrome accompanied by stroke-like episodes localized to the precentral gyrus. Neuropathology. 2019;39(3):212-217.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：井原 健二

ローマ字氏名：Ihara Kenji

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8桁): 80294932

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。