

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09610

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能障害を標的とするHIBCH欠損症の治療戦略

研究課題名(英文) The treatment strategy for HIBCH deficiency targeting mitochondrial dysfunction

研究代表者

山田 憲一郎 (Yamada, Kenichiro)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部・主任研究員

研究者番号：30291173

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)：HIBCH欠損症では、ミトコンドリアにバリン代謝の中間産物であるmethacrylyl-CoAが蓄積する。これがグルタチオンやミトコンドリアの電子伝達系のタンパク質と結合することで、ミトコンドリアのATP産生機能に障害が生じ、病気が発症する。患者由来リンパ芽球を低グルコース培地で培養すると、継時的に生存率が低下する。本研究では、この培地に治療候補薬剤を添加して培養し、リンパ芽球の生存率が維持されることを治療効果として、HIBCH欠損症に対する治療候補薬剤の評価を行った。その結果、細胞内のグルタチオン量を増やす薬剤が、最も患者リンパ芽球の生存率を回復することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In HIBCH deficiency, methacrylyl-CoA, an intermediate product of valine metabolism, accumulates in mitochondria of multiple tissues. Methacrylyl-CoA reacts with thiol compounds (e.g., cysteamine, cysteine and reduced glutathione (GSH)) and essential cysteine residues of mitochondrial enzymes, including multiple respiratory chain enzymes and pyruvate dehydrogenase complex, and reduces their activities. This leads to cell damage, especially in the basal ganglia, by dramatically decreasing the cellular reduction state and reducing ATP production. In this study, we analyzed patient's lymphoblasts, and found that the survival rate of patient's lymphoblasts decreased during culture with a low glucose medium. Using this condition, we evaluated the therapeutic effect (maintaining of the survival rate) of candidate drugs for HIBCH deficiency. We found that one candidate drug that increases intracellular GSH levels restored the survival rate of patient lymphoblasts.

研究分野：先天性代謝疾患

キーワード：HIBCH欠損症 ミトコンドリア バリン代謝 グルタチオン

## 1. 研究開始当初の背景

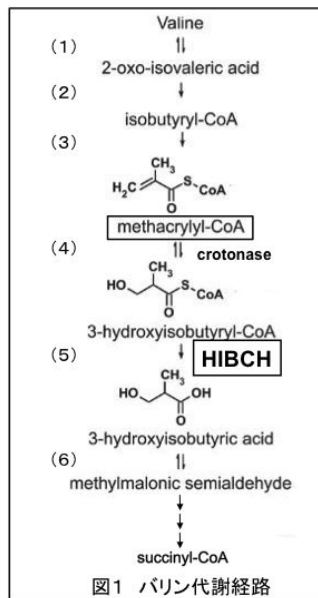
HIBCH 欠損症は常染色体劣性遺伝の疾患であり、研究開始当初に申請者らが同定した姉妹例を含め6例しか報告がない稀少疾患であった。主症状は出生時の筋緊張低下、発達遅滞、感染などの急性期に髄液中の乳酸・ピルビン酸値の上昇を伴わない両側基底核病変(非典型Leigh脳症)と著しいケトアシドーシスである。我々は、先行研究として、同定されていた全てのHIBCH欠損症の変異を含むHIBCH発現ベクターを作製し、HEK293細胞に導入後、酵素活性を測定した。その結果、酵素活性の低下と症例の重症度が関連することを初めて明らかにした (Yamada K et al., Mol. Metab. Rep. 2014)。HIBCHはミトコンドリアのマトリックスに局在し、基質の3-hydroxyisobutyryl-CoA を加水分解し、3-hydroxyisobutyric acid と CoA を産生する反応を行っている (第5反応、図1)。

3-hydroxyisobutyryl-CoA は、crotonase により methacrylyl-CoA から産生される (第4反応下向き矢印、図1) が、本酵素反応は可逆的であり、生体内では3-hydroxyisobutyryl-CoA から methacrylyl-CoA への反応 (第4反応上向き矢印、図1) が主反応である。そのため、HIBCHの欠損症では、バリン代謝経路の上流にある中間体である methacrylyl-CoA がミトコンドリアに蓄積する。methacrylyl-CoA は還元型グルタチオン (GSH) などの化合物のチオール (SH) 基

やミトコンドリアにあるタンパク質のSH基と結合し安定な化合物を形成する。従って、HIBCH欠損症の患者ではミトコンドリア内に methacrylyl-CoA が蓄積することで、ミトコンドリア内のGSHなどのSH化合物の減少による還元状態の悪化と電子伝達系

酵素の活性低下によるATP産生の低下などが出現し、脳神経細胞に重篤な機能障害が生じると考えられる。

HIBCH欠損症の患者へ処置として、アミノ酸分解 (バリンを含む) を抑えるため、炭水化物の豊富な食事が推奨されていた。しかし、我々の妹例の治療にも用いたが、感染時などのバリン代謝が亢進することによる急性増悪を防止できなかった。従って、食事療法以



外にも、薬剤等による新たな治療法の開発が望まれていた。

## 2. 研究の目的

HIBCH 欠損症ではミトコンドリアに methacrylyl-CoA が蓄積し、SH化合物やタンパク質のSH基と結合し、細胞に重篤な機能障害が生じる。本研究では、まず、患者由来のリンパ芽球細胞株やHibchノックアウトマウスを作製し、HIBCH欠損症の治療薬を評価するためのモデル系を構築する。次に、その系を用いて、methacrylyl-CoAがSH基と結合するという化学的性質に注目し、ミトコンドリアで減少するGSHを増加させる化合物と脳神経のエネルギー産生を亢進させる化合物を、構築したモデル系で評価し、本欠損症の治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬剤の治療効果を評価する実験系の構築

本症例由来のリンパ芽球細胞株を作製する。得られた患者由来リンパ芽球をグルコース濃度や含有するアミノ酸の種類を変えた培地や、培養温度など様々な培養条件で培養し、細胞死 (生存率) 細胞内のGSH量とミトコンドリアの機能異常 (ミトコンドリア膜電位、細胞内ATP含有量、電子伝達系酵素の活性)などを解析し、患者リンパ芽球で異常が見られる培養条件を決定する。この培養条件下で培養した患者リンパ芽球に治療候補薬剤を投与することで、上記の異常が改善されることを指標として本症への治療効果を判定する。

### (2) HIBCH欠損症のモデルマウスの作製

山形大学との共同研究で、HIBCH欠損症のモデルマウス (Hibchノックアウトマウス) を作製した。CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いて、Hibchのエクソン4に小さな欠失、挿入などの異常を導入した。

## 4. 研究成果

### (1) 患者リンパ芽球の分枝鎖アミノ酸感受性

HIBCH欠損症のモデルとして、患者由来のリンパ芽球を用いる。まず、患者リンパ芽球がHIBCH欠損症の病態を反映できているのかを確認するために、グルコース、脂質、アミノ酸などのエネルギー源となる物質を含まない塩濃度のみを調整した飢餓培地を用いて培養した。飢餓培地中では、グルコースがないため、エネルギーを産生する代謝経路がグルコース代謝から切り替わり、アミノ酸の代謝経路も活性化される。飢餓培地では、健康人由来 (Control) と患者由来のリンパ芽球 (Patient) は、両方ともに経時的に生存率

が低下した。この飢餓培地に、分枝鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）以外の必須アミノ酸(6種)を培地に添加すると、生存率が回復するが（図2、+6 aa）、健常人のリンパ芽球は、さらに分枝鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）を添加すると、生存率の回復が顕著であった（図2、+9 aa）。しかし患者のリンパ芽球では分枝鎖アミノ酸を添加しても、必須アミノ酸を添加した場合と生存率に差は見られなかった（図2、+9 aa）。以上から、患者のリンパ芽球は、バリンをエネルギーにすることができないことが明らかとなり、本培養系はHIBCH欠損症の病態の重要な部分を再現できていると考えられた。

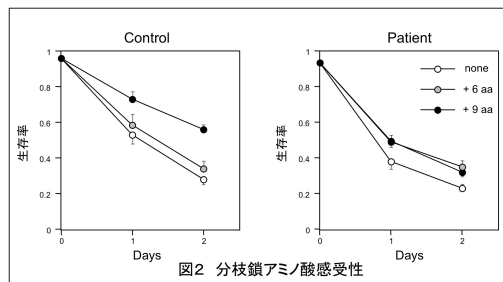


図2 分枝鎖アミノ酸感受性

### (2) 患者リンパ芽球を用いた薬剤の治療効果を評価する実験系の構築

HIBCH欠損症の急性増悪時のモデルとして、発熱時に血中のグルコースが消費された状態、すなわち高温(39℃)と低グルコースとの条件を検討した。患者リンパ芽球を通常培地で高温(39℃)処理すると、急速に生存率が低下した。健常人のリンパ芽球でも急速に生存率が低下し、なおかつ生存率の変化は、実験ごとに大きなばらつきが見られた。一方、通常2.0g/Lであるグルコース濃度を1.0, 0.5, 0.2g/Lにした低グルコース培地(他のアミノ酸などは通常の濃度で含む)で培養し、経時的に生存率を測定した。その結果、0.2g/Lの低グルコース培地で培養すると、培養期間中の細胞増殖が抑えられ、最も測定誤差が少なかった。以降の実験では、0.2g/Lの低グルコース培地に薬剤を添加して、治療効果の評価を行うことになった。

### (3) 薬剤の治療効果の評価

低グルコース培地に薬剤を添加して患者リンパ芽球を培養し、経時的に生存率を測定した。用いた治療候補薬剤は、1) 障害を受けたミトコンドリア電子伝達系から副次的に産生される活性酸素を無毒化する抗酸化剤(アスコルビン酸)、2) ミトコンドリア電子伝達系の酵素活性発現に必要なヘムの原料である5-アミノレブリン酸+鉄イオン、3) 細胞内のGSH量を増加する薬剤、を用いた。

その結果、アスコルビン酸は、10μMにしても生存率を回復できなかった(図3)。

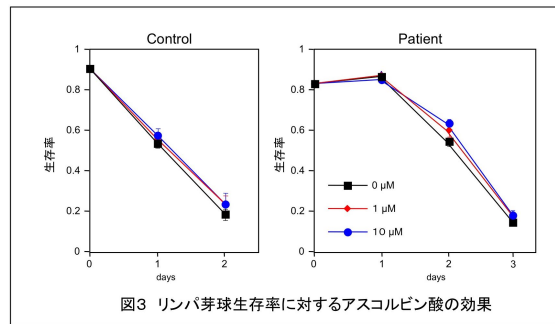


図3 リンパ芽球生存率に対するアスコルビン酸の効果

5-アミノレブリン酸+鉄イオンは、アスコルビン酸と同様に生存率を回復できなかった。さらに100μMでは、逆に生存率を低下させた(図4)。

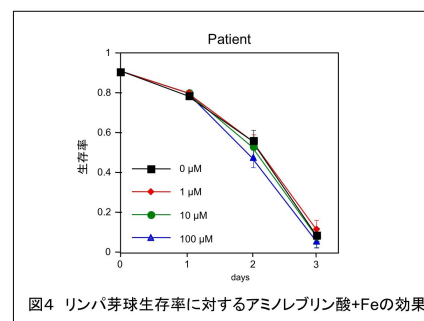


図4 リンパ芽球生存率に対するアミノレブリン酸+Feの効果

一方、細胞内のGSH量を増加する薬剤は、患者リンパ芽球の生存率を、濃度依存的に回復した(図5)。

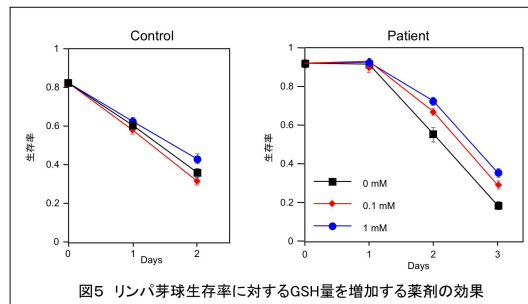
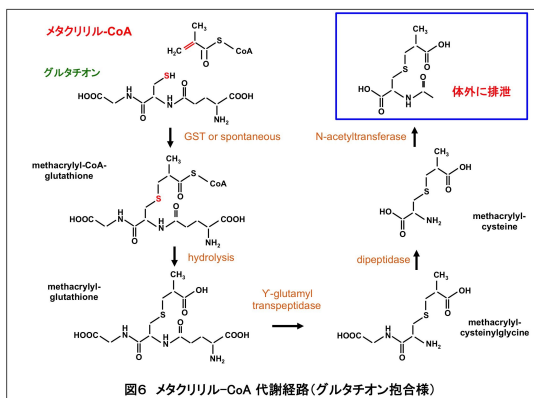


図5 リンパ芽球生存率に対するGSH量を増加する薬剤の効果

細胞内に最も多く存在するSH化合物は、GSHである。またGSHは、体内に入ってきた薬物を無毒化(修飾)して、体外に放出する薬物代謝経路の一つであるグルタチオン抱合の基質である。HIBCH欠損症の患者でミトコンドリア内に蓄積するmethacrylyl-CoAが、GSHと結合する化学反応は、このグルタチオン抱合の反応と全く同じである。グルタチオン抱合を受けたmethacrylyl-CoA(メタクリリルグルタチオン)は、さらにグルタチオン抱合の代謝経路によって無毒化されて、体外に放出されると考えられる(図6)。

本研究で得られた結果から、細胞内のGSH量を増加することで、methacrylyl-CoAの電

子伝達系酵素に対する攻撃を抑制することができたと考えられた。すなわち、本薬剤は、HIBCH 欠損症の治療薬の有力な候補であると考えられる。



#### (4) HIBCH 欠損症のモデルマウス

山形大学との共同研究により、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、Hibch ノックアウトマウスの作製を試み、マウス Hibch 遺伝子のエクソン 4 に 14bp の欠失をもつマウスを得た。本欠失により酵素活性をもつ Hibch タンパク質が産生されなくなるため、本ノックアウトマウスは HIBCH 欠損症のモデルと考えられた。

2 本ある染色体の一方の Hibch 遺伝子に欠失をもつヘテロ欠失マウスは、野生型のマウスと同様に正常に成長し、顕著な異常は見られず、繁殖も可能であった。HIBCH 欠損症患者の両親にも症状は見られない。一方、雌雄のヘテロ欠失マウスを交配し、ホモ欠失マウスを得ようと試みたが、得られた仔獣には、ホモ欠失マウスは認められなかった。すなわち、ホモ欠失マウスは、胎生致死であると考えられた。そこで、雌雄のヘテロ欠失マウスを交配し、胎児を観察したところ、ホモ欠失マウス胎児は、野生型及びヘテロ欠失マウス胎児に比較して、1) 吸収体になっている胎児が多い、2) 非常に小さい、3) 臓器の発達も遅れている、4) 妊娠 14 日頃までに死亡していることが明らかとなった。すなわち、Hibch は、マウス胎児の発達に必須な遺伝子であることが明らかとなった。現在までに報告されている HIBCH 欠損症患者では、変異により HIBCH 酵素活性が顕著に減少しているが、完全に欠失している症例はないため、ヒトの HIBCH 酵素活性完全欠失の症例は、本モデルマウスと同様に胎生致死になっていると考えられた。

#### 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 5 件)

(1) Suzuki K, Yamada K, Fukuhara Y, Tsuji Y, Shibata K, Wakamatsu N. High-dose thiamine prevents brain lesions and prolongs survival of *Slc19a3*-deficient mice. *PLoS One* 12:e0180279, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0180279. 査読有

(2) Suzuki Y, Enokido Y, Yamada K, Inaba M, Kuwata K, Hanada N, Morishita T, Mizuno S, Wakamatsu N. The effect of rapamycin, NVP-BE235, aspirin, and metformin on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway of *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS). *Oncotarget* 8: 45470-45483, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.17566. 査読有

(3) Fukushi D, Kurosawa K, Suzuki Y, Suzuki K, Yamada K, Watanabe S, Yokochi K, Wakamatsu N. Clinical and molecular genetic characterization of two siblings with trisomy 2p24.3-pter and monosomy 5p14.3-pter. *Am J Med Genet A* 173A: 2201-2209, 2017. doi: 10.1002/ajmg.a.38313. 査読有

(4) Baba S, Saito T, Yamada Y, Takeshita E, Nomura N, Yamada K, Wakamatsu N, Sasaki M. Novel mutation in *HPRT1* causing a splicing error with multiple variations. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 36:1-6, 2017. doi: 10.1080/15257770.2016.1163381. 査読有

(5) Yamada K, Aiba K, Kitaura Y, Kondo Y, Nomura N, Nakamura Y, Fukushi D, Murayama K, Shimomura Y, Pitt J, Yamaguchi S, Yokochi K, Wakamatsu N. Clinical, biochemical and metabolic characterisation of a mild form of human short-chain enoyl-CoA hydratase deficiency: significance of increased N-acetyl-S-(2-carboxypropyl)cysteine excretion. *J Med Genet* 52:691-698, 2015. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103231. 査読有

[学会発表](計 24 件)

1 山田憲一郎, 鈴木 香, 福原弥生, 辻愛, 柴田克己, 若松延昭: モデルマウスを用いた SLC19A3 欠損症の病態解明とチアミン治療の検証. 2017 年度 生命化学系学会合同年次大会 ConBio2017 (神戸) 2017.12.6.

2 山田憲一郎: バリン代謝異常症の病態解明と治療へのアプローチ. 発達障害研究所公開セミナー2017(春日井)2017.12.26.

なし ( )

研究者番号:

3 山田憲一郎, 村上智美, 榊原崇文, 鈴木香, 山口清次, 渡邊誠司, 若松延昭: 新規 SLC19A3 欠損症の同定と変異 SLC19A3 のチアミントランスポーター活性. 第 58 回日本先天代謝異常学会総会(東京)2016.10.27.

(3)連携研究者  
なし ( )

研究者番号:

4 山田憲一郎, 相場佳織, 北浦靖之, 近藤雄介, 野村紀子, 中村勇治, 福土大輔, 村山圭, 下村吉治, James Pitt, 山口清次, 横地健治, 若松延昭: ヒト ECHS1 の生化学的解析と軽症型 ECHS1 欠損症の病態解明. BMB2015・第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会(神戸)2015.12.3.

(4)研究協力者  
なし ( )

5 山田憲一郎: バリン代謝異常症の病態解明と診断及び治療戦略. 日本薬学会 東海支部 特別講演会(名古屋)2016.1.15.

〔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:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山田憲一郎 (YAMADA KENICHIRO)  
愛知県心身障害者コロニー発達障害  
研究所・遺伝学部・主任研究員  
研究者番号: 30291173

### (2)研究分担者