

令和元年6月20日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02463

研究課題名(和文) マウスmtDNAと未知細胞質因子起因のミトコンドリア・老化関連疾患発症機構解明

研究課題名(英文) Investigation of age-associated mitochondrial disorders caused by mtDNA or unknown cytoplasmic genetic elements found in mouse strains

研究代表者

林 純一 (HAYASHI, Jun-ichi)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・名誉教授、生存ダイナミクス研究センター長

研究者番号：60142113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：(A) mtDNA突然変異が原因のミトコンドリア病とがん転移：ミトコンドリア病の一つであるMELASの病原性突然変異を持つマウスmtDNAを導入したMELASモデルマウス樹立に成功。さらに申請者の仮説である「ヒトがん転移mtDNA原因説」の普遍性の検証にも成功し計画完了。
(B) 核遺伝子の可逆的発現抑制が誘発するヒトの老化：ヒト老化の原因の一部が二つの核遺伝子(SHMT2とGCAT)の可逆的発現抑制によるミトコンドリア呼吸欠損と細胞分裂遅延にあることと、Shmt2破壊マウスが胚致死となる原因が呼吸欠損と細胞分裂遅延により胎児肝内の赤血球減少が誘発されて生じる貧血であることを解明し計画完了。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(A) mtDNA突然変異が原因のミトコンドリア病とがん転移：(1)ミトコンドリア病の一つであるMELASの病原性突然変異を持つMELASモデルマウスの樹立に成功したことから、ヒトのミトコンドリア病発症機構の解明や治療法の確立に活用できる。(2)ヒトがん転移の原因の一つが活性酸素を漏出させるmtDNA突然変異であることを証明できたことで、がん患者さんの治療法の確立や予後の診断に役立つ。
(B) 核遺伝子の可逆的発現抑制が誘発するヒトの老化：ヒト老化の原因の一部がSHMT2, GCATという二つの核遺伝子の可逆的発現抑制であることを突き止めたことで、ヒト長寿研究に活用できる。

研究成果の概要(英文)：(A) Examination of the roles of human mtDNA mutations in mitochondrial diseases and tumor metastasis: We generated MELAS model mice by introduction of mouse mtDNA with a mutation orthologous to that found in patients with MELAS diseases. Moreover, our hypothesis proposing that ROS-generating mtDNA mutations are responsible for tumor metastasis could be generalized by providing the evidence that human mtDNA from metastatic tumors possess high frequency of mutations that possibly induce ROS overproduction.
(B) Examination of the roles of epigenetic regulations of nuclear-coded genes in human aging: We have proposed that human aging and age-associated mitochondrial respiration defects are caused not by mtDNA mutations but by epigenetic down-regulation of at least two nuclear-coded genes (SHMT2 and GCAT). Moreover, disruption of mouse Shmt2 induces embryonic lethality due to anaemia caused by mitochondrial respiration defects and growth retardation in fetal liver.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：mtDNA突然変異 ヒトがん転移 ミトコンドリア病 ヒト老化の可逆的制御 Shmt2遺伝子破壊マウス 胚致死 1炭素代謝系

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

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我国にとって、老化や老化関連疾患の仕組の解明と対処法の確立は急務である。この研究領域の定説「**老化ミトコンドリア原因説 (図1)**」によると、呼吸欠損を誘発する mtDNA 突然変異はミトコンドリア病だけでなく全人類の宿命である老化や老化関連疾患にも関与するという。すなわち「加齢に伴う mtDNA 突然変異蓄積」「呼吸欠損進行」「活性酸素 (ROS) 漏出量増大」の三者の悪循環が老化や老化関連疾患発症の原因となる (Science 1999)。この仮説はその後、mtDNA 複製酵素の校正機能破壊マウス (早期老化モデルマウス) が、高頻度の mtDNA 突然変異を蓄積しヒト早期老化表現型を発現したこと (Nature 2004; Science 2005) により確固たる定説として、現在でもこの分野の研究者に広く支持されている。

2. 研究の目的

この老化ミトコンドリア原因説 (図1) に対し、応募者は最近この定説を大幅に修正する新仮説 (図2) を提出した。本申請の研究目的は下記4課題を遂行し、この新仮説を検証することにある (図3)。

(1) **図3A1 (MELAS モデルマウス作製)**: 応募者はミトコンドリア病3大病型のうち、CPEO (Nat Genet 2000) と MERRF (PNAS 2014) モデルマウス作製に世界で初めて成功し、mtDNA 突然変異はミトコンドリア病の原因になるという直接証拠を提出した。今回は残りの MELAS モデルマウス作製が目的で、これにより3大病型モデル間の病態比較を実現する。

(2) **図3A2 (がん転移 mtDNA 原因説の普遍性検証)**: mtDNA 突然変異に起因する呼吸欠損ががん化を引き起こすという定説に対し、応募者はがん化ではなくがんの悪性化 (転移性獲得) に関与するという新仮説を提出した (Science 2008; PNAS 2012) が、今回はこの新仮説の普遍性の検証が目的である。

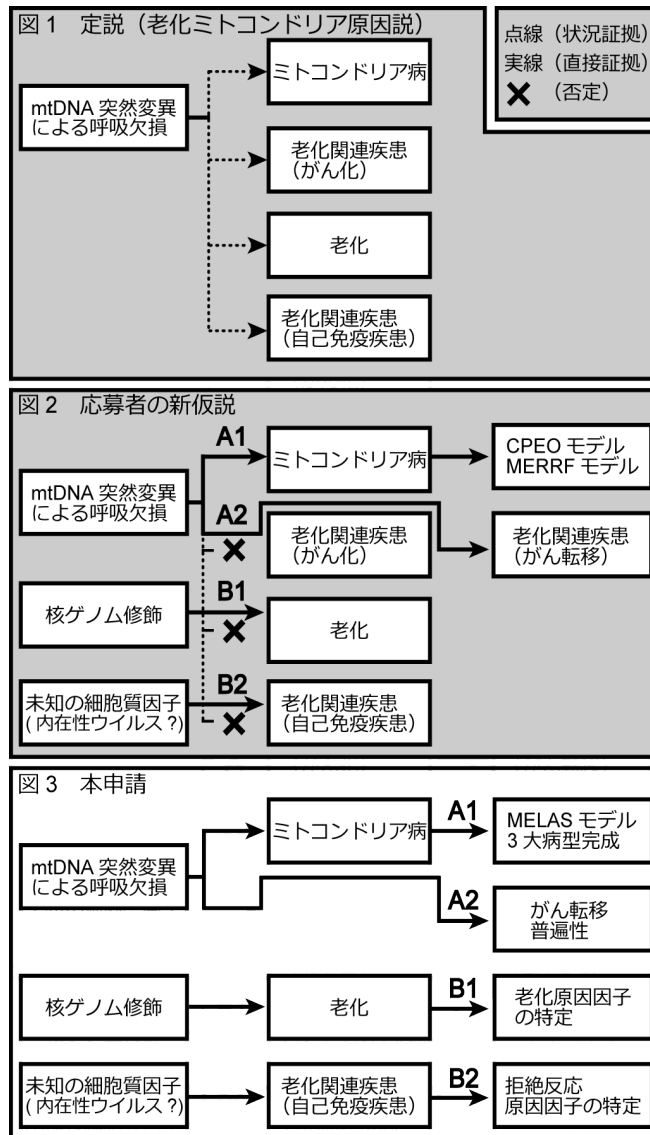
(3) **図3B1 (老化原因因子の特定)**: 応募者は老化細胞が iPS 細胞化 (初期化) により若返ることから、老化の原因は突然変異ではなく核のゲノム修飾であるという新仮説を提出した (Sci Rep 2015)。今回は関連する核遺伝子破壊マウス作製によりこの新仮説を検証することが目的である。

(4) **図3B2 (拒絶反応原因因子の特定)**: 応募者は mtDNA 移植により特殊なマウス系統 (NZB, SAMP) 由来の mtDNA 産物が B6 系統マウスの自然免疫系により認識・拒絶されることを報告 (JEM 2010) したが、実はこの原因が mtDNA 以外の細胞質遺伝因子である可能性が出てきた。今回はこの因子の実態を解明することが目的である。

3. 研究の方法

(1) **A1 (MELAS モデルマウス作製)**: ミトコンドリア病の3大病型一つである MELAS の患者さんが共通に持つ mtDNA 突然変異と相同な突然変異を持つマウス mtDNA をマウスがん細胞株からのスクリーニングで特定し濃縮する。これをマウス ES 細胞に導入してキメラマウスを作成し、雌の生殖細胞にこの mtDNA 突然変異を導入させることで MELAS モデルマウス作製を達成する。

(2) **A2 (がん転移 mtDNA 原因説の普遍性検証)**: 千葉県がんセンター研究所との共同研究により、転移したがん組織の mtDNA 突然変異の場所と頻度を調べることでがん転移 mtDNA 原因説の普遍性を検証する。



(3) **B1** (老化原因因子の特定): ヒトの老化に伴い発現が低下する 1 炭素代謝系の遺伝子 (SHMT2, GCAT) を破壊したマウス (Shmt2KO, GcatKO マウス) を作製し早期老化表現型発現の有無を調べる。

(4) **B2**(拒絶反応原因因子の特定): B6 系統のがん細胞株に NZB や SAMP 系統由来の mtDNA を導入すると、その細胞は B6 系統マウスの自然免疫系に異物として認識される。そこで RNA-Seq や次世代プロテオーム解析を行いその原因因子を明らかにする。

4 . 研究成果

(1) **A1** (MELAS モデルマウス作製): MELAS の患者さんが共通に持つ mtDNA 突然変異と相同な突然変異を持つマウス mtDNA を発見し、これをマウス ES 細胞に導入してキメラマウスを作出した。さらにこの雌のキメラマウスの子孫から生殖細胞にこの mtDNA 突然変異が導入されているマウスをスクリーニングし、MELAS モデルマウスの樹立に成功した(論文準備中)。今後はこのマウスを用いて病態発祥機構の解明と治療法の確立に活用していきたい。

(2) **A2**(がん転移 mtDNA 原因説の普遍性検証): 千葉県がんセンター研究所との共同研究により、転移したがん組織の mtDNA 突然変異の場所と頻度を調べた結果、「がん転移 mtDNA 原因説」の普遍性を証明することができた (4 Koshikawa et al. Sci Rep 2017)。ヒトがん転移の原因の一つが ROS を漏出させる mtDNA 突然変異であることを証明できたことで、該当するがん患者さんの治療法の確立や予後の診断に活用できる。

(3) **B1** (老化原因因子の特定): ヒト老化原因因子の一部に核ゲノムにある二つの遺伝子 (SHMT2 と GCAT) の可逆的発現抑制が含まれること、そして Shmt2 破壊マウスは胚致死になるだけでなく、致死になる前に樹立した mouse embryonic fibroblasts (MEFs) はミトコンドリア呼吸欠損と細胞分裂遅延が生じることが明らかになった。これらのことから少なくとも老化に伴う SHMT2 遺伝子の発現抑制は老化に伴って発現するミトコンドリア呼吸欠損と細胞分裂遅延の原因であることが立証された (5 Tani et al. Sci Rep 2018)。その後さらに、Shmt2 破壊マウスが胚致死となる原因が「胎児肝特異的な 1 炭素代謝系異常と胎児肝内の赤血球分化・細胞分裂異常により誘発される貧血であること」を明らかにした (論文準備中)。

(4) **B2**(拒絶反応原因因子の特定): B6 系統のがん細胞株に NZB や SAMP 系統由来の mtDNA を導入すると、B6 系統マウスの自然免疫系に異物として認識される。問題は異物として認識されるのが mtDNA に存在する遺伝子産物かどうかであるが、NZB や SAMP 系統由来の mtDNA を完全に除去しても異物は存在し続けたことから mtDNA の遺伝子産物ではないことが明らかになった (3 Shimizu et al. BBRC 2017)。そこで RNA-Seq やプロテオーム解析を行ったが該当する物質は検出できなかったから、この謎の物質 (mtDNA 以外の細胞質遺伝子で自然免疫系により認識される物質) の正体は不明のままである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

査読付き英文原著論文

1 Takayuki Mito, Haruna Tani, Michiko Suzuki, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Jun-Ichi Hayashi (2018) Mito-mice Δ and mitochondrial DNA mutator mice as models of human osteoporosis caused not by aging but by hyperparathyroidism. Exp. Anim. 67: 509-516.

2 Chisato Sumi, Akihisa Okamoto, Hiromasa Tanaka, Kenichiro Nishi, Munenori Kusunoki, Tomohiro Shoji, Takeo Uba, Yoshiyuki Matsuo, Takehiko Adachi, Jun-Ichi Hayashi, Keizo Takenaga, Kiichi Hirota (2018) Propofol induces a metabolic switch to glycolysis and cell death in a mitochondrial electron transport chain-dependent manner. PLoS ONE 13: e0192796. doi.org/10.1371/journal.pone.

3 Haruna Tani, Sakiko Oonishi, Hiroshi Shitara, Takayuki Mito, Midori Yamaguchi, Hiromichi Yonekawa, Osamu Hashizume, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Jun-Ichi Hayashi (2018) Mice deficient in the *Shmt2* gene have mitochondrial respiration defects and are embryonic lethal. Sci. Rep. 8: 425. doi:10.1038/s41598-017-18828-3.

4 Nobuko Koshikawa, Miho Akimoto, Jun-Ichi Hayashi, Hiroki Nagase, Keizo Takenaga (2017) Association of predicted pathogenic mutations in mitochondrial *ND* genes with distant metastasis in NSCLC and colon cancer. Sci. Rep. 7: 15535. doi:10.1038/s41598-017-15592-2

5 Akinori Shimizu, Haruna Tani, Gaku Takibuchi, Kaori Ishikawa, Ryota Sakurazawa, Takafumi Inoue, Tetsuo Hashimoto, Kazuto Nakada, Keizo Takenaga, and Jun-Ichi Hayashi (2017) Cytoplasmic transfer of heritable elements other than mtDNA from SAMP1 mice into mouse tumor cells suppresses their ability to form tumors in C57BL6 mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 493: 252-257.

- 6 Nurun Nahar Borna, Yoshihito Kishita, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Jun-Ichi Hayashi, Yoshimi Tokuzawa, Masakazu Kohda, Hiromi Nyuzuki, Yzumi Yamashita-Sugahara, Takashi Nasu, Atsuhito Takeda, Kei Murayama, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki (2017) A novel mutation in *TAZ* causes mitochondrial respiratory chain disorder without cardiomyopathy. *J. Hum. Genet.* 62: 539-547. doi: 10.1038/jhg.2016.165
- 7 Akimoto M, Hayashi J-I, Nakae S, Saito H, Takenaga K (2016) Interleukin-33 enhances programmed oncogenesis of ST2L-positive low-metastatic cells in the tumour microenvironment of lung cancer. *Cell Death Disease* 7: e2057. doi: 10.1038/cddis.2015.418

総説

- 8 林 純一 (2016) 哺乳類ミトコンドリアゲノムの突然変異ががん化と老化に与える影響 基礎老化研究, 40: 9-15.
- 9 Jun-Ichi Hayashi, Osamu Hashizume, Kaori Ishikawa, Akinori Shimizu (2016) Mutations in mitochondrial DNA regulate mitochondrial diseases and metastasis but do not regulate aging. *Current Opinion in Genetics & Development* 38: 63-67.

〔学会発表〕(計4件)

(招待講演 1件)

- 1 第69回 日本産科婦人科学会核術集会 ランチョンセミナー24
母性遺伝するミトコンドリアゲノムと老化関連疾患～ミトコンドリアと子宮内膜症の関連～
2017.4.15. リーガロイヤルホテル広島 (広島市)

(一般講演 3件)

- 2 第40回 日本分子生物学会年会
ヒトの老化を誘発する遺伝子の破壊によるミトコンドリア老化モデルマウスの作製および解析
2017.12.6.
- 3 第64回 日本実験動物学会総会
mtDNA に病原性突然変異を有するミトコンドリア病モデルマウスの作出及び解析 2017.5.1.
- 4 第39回 日本分子生物学会年会
mtDNA に病原性突然変異を有する新規ミトコンドリア病モデルマウスの作出 2016.11.30.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)
取得状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 米川 博通
ローマ字氏名: YONEKAWA, Hiromichi
所属研究機関名: 公益財団法人東京都医学総合研究所
部局名: 基盤技術研究センター
職名: 特任研究員
研究者番号 (8桁): 30142110

研究分担者氏名: 高橋 智
ローマ字氏名: TAKAHASHI, Satoru
所属研究機関名: 筑波大学
部局名: 医学医療系
職名: 教授
研究者番号 (8桁): 50271896

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 竹永 啓三
ローマ字氏名: TAKENAGA, Keizo

研究協力者氏名: 三好 浩之
ローマ字氏名: MIYOSHI, Hiroyuki

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。