

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09999

研究課題名(和文)呼吸鎖複合体の量的・質的評価による未診断ミトコンドリア病患者の病因解明

研究課題名(英文)Elucidation of the causes of undiagnosed mitochondrial disease by quantitative and qualitative evaluation of respiratory chain complexes

研究代表者

三牧 正和 (Mimaki, Masakazu)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：40392419

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)：ミトコンドリア病が疑われながら未診断であった患者の病因特定、病態解析を目指し、ミトコンドリア病の主たる原因となる呼吸鎖酵素異常の評価を行った。患者由来の皮膚線維芽細胞、筋芽細胞、生検筋から抽出したミトコンドリアを用い、巨大分子である呼吸鎖酵素複合体の評価が可能なBlue-Native電気泳動(BN-PAGE)や呼吸鎖酵素活性測定等の生化学的検査と遺伝子解析を行い、多くの患者の診断と病態解明を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア病の約半数の病因が不明な状況下で、未診断患者の呼吸鎖複合体の量的・質的解析により、新規の病因遺伝子や、未報告の変異を見出すことができた。ミトコンドリア病診断においては、次世代シーケンサーの利用により診断率が上がっているが、遺伝子解析と機能解析を組み合わせることにより診断率をさらに向上させることが可能であることが示された。診断の確定は疾患への対応法や予後に関する情報を患者やその家族に提供することを可能とした。また、遺伝子変異が与える呼吸鎖酵素への影響を明らかにしたことは、病態解析と病因に応じた治療法開発にも寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To identify the causes of suspected but undiagnosed mitochondrial disorders, we evaluated respiratory chain (RC) complexes using mitochondria extracted from biopsy specimens. Through gene and biochemical analyses, including blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), to evaluate huge RC complexes, we were able to establish diagnoses in numerous patients. For example, we identified the first patient in Japan who had an abnormality in the protein NDUFAF3, which is involved in the assembly process of complex ; BN-PAGE demonstrated marked reduction of complex in this patient. Moreover, we discovered mutations in the novel causative gene COX6A2 in two undiagnosed cases; BN-PAGE with muscle biopsy specimens revealed quantitative reductions of complex and its abnormal assembly in these cases. Thus, this study demonstrates the usefulness of evaluating the amount and assembly process of RC complexes in the diagnosis and pathological analysis of mitochondrial disorders.

研究分野：小児科学

キーワード：ミトコンドリア病 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 遺伝子診断 生化学診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病は先天代謝異常症のなかで頻度の高い疾患群で、新生児を含む小児の患者が多い難病の一つである。診断においてミトコンドリア DNA (mtDNA) 検査が役立ってきたが、mtDNA の異常が見出されて確定診断される患者は4分の1程度に留まり、残りは核遺伝子異常に起因すると考えられている。次世代シーケンサーの利用で遺伝子診断に至る症例が増加しているものの、依然としてミトコンドリア病の約半数で病因診断がなされていない。一方、ミトコンドリア病の原因治療法開発のためには、酵素診断によるミトコンドリア機能異常の証明のみならず、正確な遺伝子診断に基づいた個々の患者の病因解明が不可欠である。そこで、以下の課題を認識して本研究を開始した。

(1) 従来ミトコンドリア病への関与が想定されていなかった原因遺伝子が発見され、疾患概念自体が拡大しつつある。そのため、表現型が多彩なミトコンドリア病を疑うこと自体がますます難しくなっており、効率的なスクリーニング法が必要とされる。

(2) ミトコンドリア病の遺伝子検査は、呼吸鎖酵素活性が低下している患者を中心に行われている。しかし、臨床的にミトコンドリア病を強く疑われながら酵素活性低下が検出できない患者も多く、他の検査系を用いたより多角的な評価が必要とされる。

(3) ミトコンドリア呼吸鎖複合体は多くのタンパクに構成されているが、成熟した複合体が完成する集合過程は複雑で、集合を助ける因子 (アセンブリー因子) が必要なことが知られている。呼吸鎖の全構成タンパクの遺伝子配列を決定しても診断に至らない患者が多いが、その一部はアセンブリー因子の異常であると考えられ、未診断症例においては、呼吸鎖複合体の量的・質的評価が非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア病が強く疑われながら診断未確定の患者につき、ミトコンドリア機能異常を証明し、さらにその原因を解明することを目的とする。ミトコンドリア機能の中核を担う呼吸鎖複合体の量や集合過程を評価し、異常を認めた患者については、複合体の構成タンパクや集合に関連する因子の遺伝子検索による確定診断を目指す。呼吸鎖複合体の集合過程の解明にも寄与し、患者診断や治療法開発のための基盤研究となると期待される。

3. 研究の方法

未診断のミトコンドリア病患者の病因解明のため、本研究では以下の研究を行った。

(1) ミトコンドリア病が疑われる患者につき、呼吸鎖複合体のタンパク量と分子量を評価し、量的・質的異常を検出した。

(2) 他検査 (呼吸鎖酵素活性、ATP 産生能、酸素消費量測定等) を加え、多角的にミトコンドリア機能異常を証明し、複合体の量的・質的異常が及ぼす生化学的变化や臨床的影響を検討した。

(3) ミトコンドリア機能異常が検出された症例については、mtDNA および核 DNA の変異検索による遺伝子診断を目指した。特に、呼吸鎖複合体の量的・質的異常が見出された症例については、複合体の集合に関与する因子などの核遺伝子の異常の検索を行った。

4. 研究成果

ミトコンドリア病が疑われながら未診断であった患者の病因特定、病態解析を目指し、全国から寄せられた患者検体を用い、ミトコンドリア病の主たる原因となる呼吸鎖酵素異常の評価を行った。皮膚線維芽細胞、筋芽細胞、生検筋から抽出したミトコンドリアを用い、巨大分子である

呼吸鎖酵素複合体を評価できる Blue-Native 電気泳動 (BN-PAGE) や呼吸鎖酵素活性測定等の生化学的検査と遺伝子解析を行い、多数の患者の診断に至ることができた。

(1) 新生児期、あるいは幼少期から筋緊張低下、筋力低下などの症状を認めた病因不明だった患者2例において、新たな疾患原因としてCOX6A2遺伝子変異を発見した。COX6A2はミトコンドリア呼吸鎖複合体 のチトクロームc酸化酵素 (COX) の構成タンパクの一つで、今回の2症例では、横紋筋 (骨格筋と心筋) に限定されたミトコンドリア異常を認めた。複合体 欠損症は、難病であるミトコンドリア病の一つで、多くの場合多臓器が障害される。今回、臨床的に筋症状のみを呈した乳幼児患者2名に全エクソーム解析を行い、COX6A2遺伝子に両アレル性のミスセンス変異を見出した。さらに、骨格筋では複合体 活性の低下と複合体 のアセンブリー (集合) 障害もみとめた。COX6A2遺伝子が骨格筋と心筋のみに発現しているため、症状が骨格筋と心筋に限定されていることが判明した。従来ミトコンドリア病の複合体 欠損症とは異なる、横紋筋特異的な症状がある新たな疾患の発見であった。今後、COX6A2遺伝子変異を持つ患者の診断と治療法の開発が進むことが期待され、ミトコンドリア病の更なる研究・臨床開発に新しい知見をもたらすものと考えられる。また、皮膚線維芽細胞など横紋筋以外の細胞では異常が検出されないため、診断と病理性証明に筋生検が必要な症例であり、ミトコンドリア病診断において多角的な評価が重要であることが示された。

(2) 小児期発症のミトコンドリア病の代表的病型である Leigh 脳症と臨床診断されたものの、病因が不明だった患児に対し、呼吸鎖複合体 のアセンブリー因子 NDUFAF3 の異常を有する本邦初の患者を見出し、BN-PAGE や二次元電気泳動法等により集合異常を証明して報告した (引用文献)。同患者由来の培養細胞にて、NDUFAF3 が呼吸鎖複合体 の集合過程の初期段階に必須の因子であることが示唆された。また、同じく Leigh 脳症患者において ECHS1 遺伝子の新規変異を見出し、同遺伝子がコードする enoyl-CoA hydratase の活性やタンパク量の低下を示し、詳細な臨床情報とともに報告した (引用文献)。これら病因不明だった患者の診断の確定は疾患への対応法や予後に関する情報を患者家族に提供することを可能とした。また、これらの遺伝子異常が及ぼすミトコンドリア関連酵素への影響を明らかにしたことは、病態解析と病因に応じた治療法開発にも寄与するものとする。

(3) ミトコンドリア病患者診断システムにおいて重要な呼吸鎖酵素活性についても測定系を立ち上げたが、従来他施設でも行われている呼吸鎖複合体 、 、 の評価に加え、複合体 V の機能評価も可能な体制を整えた。ミトコンドリア内膜構造の保持が必要な ATP 合成の *in vitro* での測定は困難であるが、逆反応をみることで複合体 V の活性を評価することを試みた。あわせて、BN-PAGE による複合体 の量的変化、質的变化 (分子量変化) の評価を行った。ミトコンドリア DNA 上の複合体 の構成タンパクをコードする遺伝子の変異が検出された複数の患者で、複合体 の集合異常が検出され、BN-PAGE の有用性が示された。一方、酵素活性測定で異常を検出することは困難であった。本研究にて、ミトコンドリア機能の中核を担う呼吸鎖について、全ての複合体の量や集合過程の評価を行い、診断や病態解析における有用性を示すことができた。今後、さらなる未診断例の病因確定や、患者診断システムの改善に寄与するものと思われる。

<引用文献>

Inoue M, Uchino S, Iida A, Noguchi S, Hayashi S, Takahashi T, Fujii K, Komaki H, Takeshita E, Nonaka I, Okada Y, Yoshizawa T, Van Lommel L, Schuit F, Goto YI*, Mimaki M*, Nishino I*. COX6A2 variants cause a muscle-specific cytochrome c oxidase

deficiency. *Ann Neurol* 2019 86:193-202. *These authors equally contributed.

Ishiyama A, Muramatsu K, Uchino S, Sakai C, Matsushima Y, Makioka N, Ogata T, Suzuki E, Komaki H, Sasaki M, Mimaki M, et al. NDUF3 variants that disrupt mitochondrial complex I assembly may associate with cavitating leukoencephalopathy. *Clin Genet* 2018;93:1103-1106

Uchino S, Iida A, Sato A, Ishikawa K, Mimaki M, et al. A novel compound heterozygous variant of *ECHS1* identified in a Japanese patient with Leigh syndrome. *Hum Genome Var* 2019;6:19

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 2件）

1. 著者名 Ishiyama A, Muramatsu K, Uchino S, Sakai C, Matsushima Y, Makioka N, Ogata T, Suzuki E, Komaki H, Sasaki M, Mimaki M, Goto YI, Nishino I.	4. 巻 93
2. 論文標題 1. NDUF3 Variants that Disrupt Mitochondrial Complex I Assembly may associate with Cavitating Leukoencephalopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Genet.	6. 最初と最後の頁 1103-1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.1321	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 三牧正和	4. 巻 50
2. 論文標題 小児神経科医が知っておくべきミトコンドリア病の多様性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 脳と発達	6. 最初と最後の頁 7-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Uchino Shumpei, Iida Aritoshi, Sato Atsushi, Ishikawa Keiko, Mimaki Masakazu, Nishino Ichizo, Goto Yu-ichi	4. 巻 6
2. 論文標題 A novel compound heterozygous variant of ECHS1 identified in a Japanese patient with Leigh syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 19-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-019-0050-1	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 -
1. 著者名 Inoue Michio, Uchino Shumpei, Iida Aritoshi, Noguchi Satoru, Hayashi Shinichiro, Takahashi Tsutomu, Fujii Katsunori, Komaki Hirofumi, Takeshita Eri, Nonaka Ikuya, Okada Yukinori, Yoshizawa Takuya, Van Lommel Leentje, Schuit Frans, Goto Yu ichi, Mimaki Masakazu, Nishino Ichizo	4. 巻 86
2. 論文標題 COX6A2 variants cause a muscle specific cytochrome c oxidase deficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 193 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25517	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三牧正和
2. 発表標題 ミトコンドリア病診断のピットフォール
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Uchino S, Mimaki M, Takeshita E, Goto Yu-ichi
2. 発表標題 Biochemical assessment of respiratory chain complex V deficiency with MT-ATP6 and MT-ATP8 mutations
3. 学会等名 AussieMit 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三牧正和
2. 発表標題 先天代謝異常症の視点からみた発達障害
3. 学会等名 第48回日本臨床神経生理学会学術大会 小児脳機能研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三牧正和
2. 発表標題 Leigh症候群の多様性
3. 学会等名 第59回日本先天代謝異常学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三牧正和
2. 発表標題 小児科医が知っておくべきミトコンドリア病の基礎と臨床
3. 学会等名 第144回日本小児科学会静岡地方会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三牧正和
2. 発表標題 ミトコンドリア病診療の基礎
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三牧正和
2. 発表標題 ミトコンドリア病の多様性を理解する
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 三牧正和	4. 発行年 2018年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 192
3. 書名 臨床遺伝学テキストノート ミトコンドリア遺伝	

1. 著者名 三牧正和	4. 発行年 2017年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 407(76-79)
3. 書名 小児科ケースカンファランス 先天代謝異常症(ミトコンドリア病)	

1. 著者名 三牧正和	4. 発行年 2018年
2. 出版社 最新医学社	5. 総ページ数 212(139-146)
3. 書名 最新医学別冊 診断と治療のABC 130 発達障害. 先天代謝異常と発達障害	

1. 著者名 三牧正和	4. 発行年 2016年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 4126(108)
3. 書名 小児科診療増刊号 小児の症候群MELAS症候群	

1. 著者名 三牧正和	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 127(49-54)
3. 書名 医学のあゆみ 第1土曜特集 ミトコンドリア研究UPDATE.	

〔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
連携 研究者	村山 圭 (Murayama Kei) (50316741)	千葉県がんセンター(研究所)・研究所・主任医長 (82504)	