

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18535

研究課題名(和文)核 ミトコンドリア間クロストークからのミトコンドリア病発症機構へのアプローチ

研究課題名(英文)An approach from crosstalks of nuclei-mitochondria to disease mechanisms of mitochondrial diseases

研究代表者

石川 香 (Ishikawa, Kaori)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40734827

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DNA(mtDNA)の病原性突然変異と、核DNAにコードされたミトコンドリア関連遺伝子の一つであるミトコンドリア分裂因子Drp1の機能不全を併せ持つモデルマウスを用いて病態解析を行った結果、Drp1の機能不全はmtDNA突然変異によって引き起こされる病態をより重篤化することが明らかとなった。これはDrp1によるミトコンドリア分裂がmtDNAの突然変異の蓄積による病態発症を抑制する作用があることを意味しており、核とミトコンドリアとの間にクロストークが存在することを示している。

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その病態発症機構がほとんど理解されておらず、治療法はおろか正確な診断すらもままならない困難な疾患である。本研究は、ミトコンドリアDNA(mtDNA)に突然変異を有することで病態を発症するマウスに、核DNAにコードされたミトコンドリア関連遺伝子の機能不全を共存させることによって、核DNAのミトコンドリア関連遺伝子とミトコンドリア機能との間にクロストークがあることを見出した。この成果は、ミトコンドリア病の複雑な病態発症機構の一端を明らかにすることにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Disease phenotypes of the model mice with a pathogenic mitochondrial DNA (mtDNA) mutation and dysfunction of Drp1, a mitochondrial fission factor, were analyzed. Drp1 dysfunction made disease phenotypes induced by the mtDNA mutation more severer. These results indicate that Drp1-mediated mitochondrial fission suppresses disease phenotypes induced by the mtDNA mutation, and also suggest that there are important crosstalks between mitochondria and nuclei.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA ミトコンドリア・ダイナミクス Drp1 ミトコンドリア分裂 ミトコンドリア病 病態発症機構

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 DNA (mtDNA) の病原性突然変異は、変異の位置や変異率に応じて多様な病態を引き起こす。しかし、どの変異も一次的にはミトコンドリアの呼吸機能低下を誘発するにもかかわらず、どのようにして最終的に多様な臓器に多様な病態を引き起こすのか、その病態発症メカニズムはほとんどわかっておらず、有効な治療法も開発されていなかった。

2. 研究の目的

mtDNA の突然変異が多様な病態を誘導するプロセスにおいて、核 DNA にコードされたミトコンドリア関連遺伝子の関与があるのではないかと考え、その仮説を証明するために、mtDNA の病原性突然変異と核 DNA にコードされたミトコンドリア関連遺伝子の機能不全を併せ持つモデルマウスを用いて病態の比較解析を行う。これによって mtDNA の病原性突然変異による病態、核 DNA にコードされたミトコンドリア関連遺伝子の機能不全による病態、両方が共存することによって現れる病態を区別し、核とミトコンドリア間に病態形成のクロストークが存在することを示す。

3. 研究の方法

ミトコンドリアの分裂因子 Drp1 を肝臓と血球で特異的にノックアウトできるマウス、Mx1-Cre/Drp1^{fl/fl} マウスの雄と、大規模欠失突然変異型 mtDNA (mtDNA) を有する Mito-mice の雌とを交配し、mtDNA を有し、かつ Drp1 を組織特異的にノックアウトできるマウスを樹立した。このマウスの病態を Drp1 ノックアウト単独のマウス、野生型 Drp1 を有する Mito-mice それぞれと比較し、mtDNA の突然変異による病態と Drp1 ノックアウトによる病態、両者が共存して現れる病態に区別して検証した。

4. 研究成果

(1) 肝臓における病態の検討結果

野生型の Drp1 を有する Mito-mice の場合、肝臓は目立った病態が発現しない臓器であることが先行研究から分かっていた。ところが、Drp1 のノックアウトという要素が加わることで、肝臓におけるミトコンドリアの呼吸活性が mtDNA の蓄積と共に顕著に低下することが明らかとなった。つまり、Drp1 のノックアウトは本来 Mito-mice が発症することのなかった肝臓の呼吸機能低下という新しい病態を誘発させた (図 1)。

この原因を探るために、肝臓組織を電子顕微鏡によって観察したところ、通常は呼吸活性が正常なミトコンドリアと呼吸機能が低下した異常なミトコンドリアが同一細胞内に共存することはないと考えられていたが、Drp1 をノックアウトした Mito-mice においては正常なミトコンドリアと異常なミトコンドリアが同一細胞内で共存している様子が電子顕微鏡によって観察された。これは、Drp1 のノックアウトによって本来は存在していなかった細胞内ミトコンドリアの Heterogeneity が誘導されたことを意味する。さらに、ミトコンドリアの品質管理機構として近年注目を集めているオートファジーの活性を調べたところ、オートファジーの誘導はされているのに実際にオートファジーが起きている頻度の上昇は認められず、ミトコンドリアのクリアランスが正常に機能していないことも示唆された。mtDNA は野生型の mtDNA と比較してゲノムサイズが小さいため、複製が早く完了することから、時間の経過とともに次第に蓄積していく傾向がある。

そこで、野生型 Drp1 を有する Mito-mice と Drp1 がノックアウトされた Mito-mice において一定期間ごとに肝臓組織の一部を Biopsy によって採取し、組織中に含まれる mtDNA の含有量を経時的に定量したところ、Drp1 のノックアウトによって mtDNA の蓄積速度が増加し、より mtDNA が高い割合になりやすくなっていることが明らかとなった。これらの結果から、Drp1 のノックアウトが Mito-mice の肝臓に病態を誘発した理由として、少なくとも 2 つのメカニズムが関与していることが示唆された。

1 つは、ミトコンドリアの分裂が阻害されて肥大化したことにより、オートファジーが正常に進まなくなったということである。オートファジーにおいて細胞内の構造を包み込むオートファゴソームは、大きくても直径数 μm 程度のものしか包み込むことができないが、Drp1 のノックアウトによって肥大化したミトコンドリアはこのサイズを上回るため、オートファゴソームが取り囲んで消化することができないと考えられる。オートファジーが誘導されているに

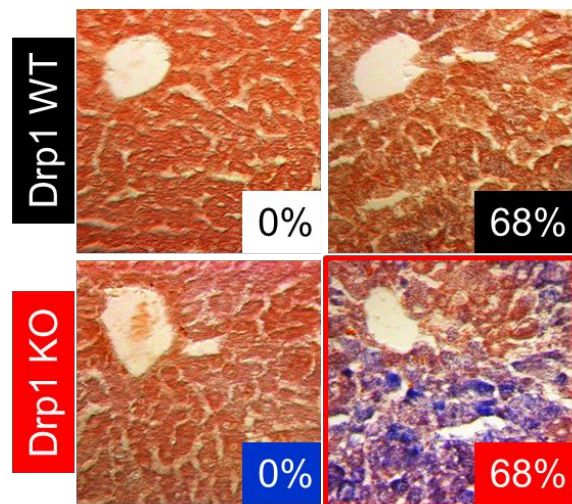


図 1) 肝臓のミトコンドリア呼吸機能を染色によって比較した結果。茶色は正常な呼吸機能を、青は呼吸機能が低下した状態を示す。各数値は解析した個体の mtDNA 含有率。

もかわらず、実際に起きている頻度が上昇していないという一見矛盾した観察結果も、このメカニズムをよく説明している。本来、ダメージを蓄積したミトコンドリアは切り出されて孤立化し、それをオートファゴソームが包んで消化することによって分解されるというクリアランスが機能しているが、Drp1 のノックアウトによってそのクリアランスが進まなくなり、異常な機能・形態のミトコンドリアが細胞内に残存していると考えられる。これにより、細胞内ミトコンドリアの均質性が破壊され、Heterogeneity が誘導されて細胞全体のミトコンドリアの機能も低下したと推測できる。

もう一つは、こうしたクリアランスの低下によって mtDNA がより蓄積しやすくなったということである。mtDNA をより高い割合で蓄積したミトコンドリアは、機能が低下するため、本来優先的にオートファジーによる分解を受けると想定できる。そうすることによって mtDNA はミトコンドリアごと分解され、mtDNA の蓄積速度を遅くすることにも貢献する。ところが、このオートファジーによるクリアランスが正常に遂行されないことで mtDNA を蓄積したミトコンドリアが残存し、mtDNA をミトコンドリアごと除去することができなくなる。結果として mtDNA の蓄積速度が速くなり(図2)、短期間のうちにより重篤な病態が発現することにつながると考えられる。

これらの結果から、Drp1 によるミトコンドリアの分裂は、mtDNA の蓄積による病態を抑制する上で重要な役割を担っていると考えられる。

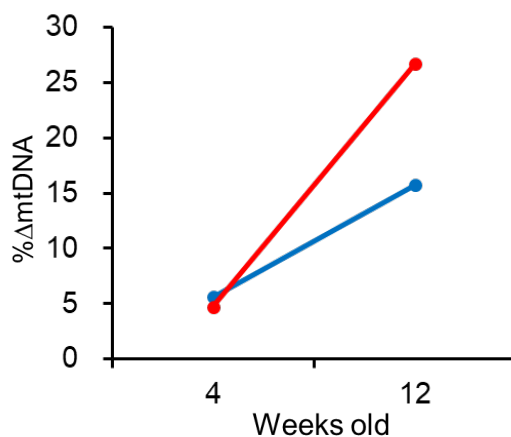


図2) 同一個体から4週齢時と12週齢時に肝臓の組織の一部を取り、 Δ mtDNA の含有量を比較した結果。青は野生型 Drp1 を有するマウス、赤は Drp1 を KO したマウス。

(2) 血液における病態の検討結果

野生型 Drp1 を発現する通常の Mito-mice では、mtDNA が高い割合で蓄積した場合に限り、軽度の貧血が誘導されることが知られていた。そこに Drp1 KO が加わると、貧血が重症化し、野生型 Drp1 を発現している場合よりも低い mtDNA の割合でも貧血症状が現れることが解った(図3)。さらに、赤血球の分化段階をフローサイトメーターによって解析した結果、Drp1 KO で mtDNA 含有量が高い個体では、本来なら末梢血には現れないはずの未分化・未成熟な幼若赤血球が多数末梢血中に漏出していることもわかった。

さらに、赤血球のみではなく白血球においても、分化に異常が生じている可能性が明らかになりつつある。Drp1 を KO することによって白血球における T 細胞、B 細胞、顆粒球とマクロファージの構成比率が変化することが解析によってわかってきた。

詳細については現在も解析を継続している段階であるが、Drp1 によるミトコンドリアの分裂は、血球分化においても重要な役割を担っていることが示唆される。今後、より詳細な血液病態の観察及び機能解析を行う予定である。

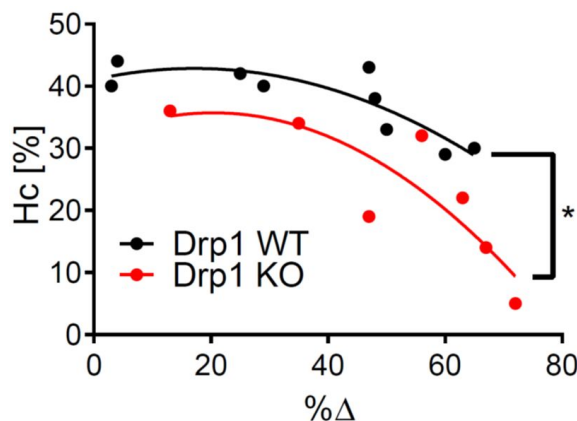


図3) Drp1 の有無による貧血症状の比較。横軸は各個体の mtDNA 含有率を示し、縦軸は赤血球量を示すヘマトクリットである。ヘマトクリットの低下は貧血を意味する。

(3) 結論

肝臓及び血液における解析結果は、いずれも核 DNA にコードされたミトコンドリア分裂因子 Drp1 の機能が mtDNA による病態の発症機構に関与し、その病態を変化させていることを示している。このことは、核 DNA コードのミトコンドリア関連遺伝子とミトコンドリアとの間にクロストークが存在すること、そのクロストークがミトコンドリア病の病態が複雑である理由の一つの原因であることを示唆している。同一の mtDNA 突然変異をもちながら病態が異なる患者が多数報告されている背景には、患者ごとに異なる核遺伝子のはたらきが関係していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Ishikawa K, Kobayashi K, Yamada A, Umehara M, Oka T, Nakada K. Concentration of mitochondrial DNA mutations by cytoplasmic transfer from platelets to cultured mouse cells. *PLoS One*. 2019 Mar 4;14(3):e0213283. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0213283.

Ishikawa K, Yamamoto S, Hattori S, Nishimura N, Tani H, Mito T, Matsumoto H, Miyakawa T, Nakada K. Acquired Expression of Mutant Mitofusin 2 Causes Progressive Neurodegeneration and Abnormal Behavior. *J Neurosci*. 2019 Feb 27;39(9):1588-1604.
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2139-18.2018. 査読有

Mito T, Tani H, Suzuki M, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI. Mito-mice Δ and mitochondrial DNA mutator mice as models of human osteoporosis caused not by aging but by hyperparathyroidism. *Exp Anim*. 2018 Nov 1;67(4):509-516. 査読有
doi: 10.1538/expanim.18-0060.

Ishikawa K, Tanaka A, Kogame A, Watanabe T, Tagawa Y, Matsui H. Usefulness of pharmacokinetic/efficacy analysis of an investigational kisspeptin analog, TAK-448, in quantitatively evaluating anti-tumor growth effect in the rat VCaP androgen-sensitive prostate cancer model. *Eur J Pharmacol*. 2018 Jun 5;828:126-134. 査読有
doi: 10.1016/j.ejphar.2018.03.032.

Tani H, Ohnishi S, Shitara H, Mito T, Yamaguchi M, Yonekawa H, Hashizume O, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI. Mice deficient in the *Shmt2* gene have mitochondrial respiration defects and are embryonic lethal. *Sci Rep*. 2018 Jan 11;8(1):425. 査読有
doi: 10.1038/s41598-017-18828-3.

Shimizu A, Tani H, Takibuchi G, Ishikawa K, Sakurazawa R, Inoue T, Hashimoto T, Nakada K, Takenaga K, Hayashi JI. 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*. 2017 Nov 4;493(1):252-257. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.035.

Yoshizumi T, Imamura H, Taku T, Kuroki T, Kawaguchi A, Ishikawa K, Nakada K, Koshiba T. RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity. *Sci Rep*. 2017 Jul 14;7(1):5379. 査読有
doi: 10.1038/s41598-017-05808-w.

Kanai N, Endo N, Ohkura S, Wakabayashi Y, Matsui H, Matsumoto H, Ishikawa K, Tanaka A, Watanabe T, Okamura H, Tanaka T. An administration of TAK-683 at a minimally effective dose for luteinizing hormone stimulation under the absence of the ovary induces luteinizing hormone surge in ovary-intact goats. *J Reprod Dev*. 2017 Jun 21;63(3):305-310. 査読有
doi: 10.1262/jrd.2016-184.

Borna NN, Kishita Y, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI, Tokuzawa Y, Kohda M, Nyuzuki H, Yamashita-Sugahara Y, Nasu T, Takeda A, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A novel mutation in TAZ causes mitochondrial respiratory chain disorder without cardiomyopathy. *J Hum Genet*. 2017 Apr;62(5):539-547. 査読有
doi: 10.1038/jhg.2016.165.

〔学会発表〕(計15件)

石川香、小林晃平、山田亮仁、梅原萌、岡敏彦、中田和人。マウス培養細胞は組織よりも高い割合のミトコンドリア DNA 突然変異を許容できる。第18回日本ミトコンドリア学会年会、2018/12/7-9、久留米(口頭発表)

谷春菜、石川香、林純一、中田和人。ミトコンドリア tRNA に点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樹立に向けて。第18回日本ミトコンドリア学会年会、2018/12/7-9、久留米(口頭発表)

Kaori Ishikawa, Satoshi Yamamoto, Satoko Hattori, Naoya Nishimura, Takayuki Mito, Hirokazu Matsumoto, Tsuyoshi Miyakawa, Kazuto Nakada. Progressive neurodegeneration and abnormal behavior were caused by acquired expression of mutant Mitofusin 2 in neurons. The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2018/11/28-30. Yokohama,

Kanagawa (Oral)

Kaori Ishikawa. The D210V mutation of Mfn2 in neurons induces different pathologies in severity depends on its expression timing. Keystone Symposia “ Mitochondrial Biology ”, 2018/4/22-26, Kyoto, Japan (Poster)

Kaori Ishikawa, Satoshi Yamamoto, Satoko Hattori, Naoya Nishimura, Takayuki Mito, Hirokazu Matsumoto, Tsuyoshi Miyakawa, Kazuto Nakada. The importance of Mfn2 in neuronal function from juvenile to adult phase. International YoungMito “ The 1st International Mitochondria Meeting for Young Scientists ”, 2018/4/20-22, Kyoto, Japan (Poster)

田村真、石川香、林純一、石原直忠、中田和人．ミトコンドリアゲノム変異の病原性制御におけるミトコンドリア分裂因子 Drp1 の関与．第 40 回日本分子生物学会年会、2017/12/6-9、神戸（ポスター発表）

本間耀、堅田俊、小笠原絵美、石原孝也、三藤崇行、三原勝芳、林純一、石原直忠、中田和人、石川香．ミトコンドリア呼吸機能及びミトコンドリア分裂が血球系細胞分化に与える影響の解析．第 40 回日本分子生物学会年会、2017/12/6-9、神戸（ポスター発表）

石崎光理、小笠原絵美、三藤崇行、石川香、林純一、中田和人．病原性突然変異型 mtDNA 分子種は骨格筋の萎縮ならびに肥大を誘導する．第 40 回日本分子生物学会年会、2017/12/6-9、神戸（ポスター発表）

谷春菜、大西彩紀子、設楽浩志、三藤崇行、橋爪脩、石川香、中田和人、林純一．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．第 40 回日本分子生物学会年会、2017/12/6-9、神戸（ポスター発表）

石川香 神経における Mfn2 の D210V 突然変異は発現時期によって重症度の異なる病態を引き起こす．第 17 回日本ミトコンドリア学会年会、2017/11/22-23、京都（口頭発表）

石川香、堅田俊、小笠原絵美、本間耀、石原孝也、三藤崇行、三原勝芳、林純一、石原直忠、中田和人．ミトコンドリア病の多様な病態発症機構の理解に向けたアプローチ～核-ミトコンドリア間クロストーク～．第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30-12/2．横浜（ポスター発表）

本間耀、堅田俊、小笠原絵美、石原孝也、三藤崇行、三原勝芳、林純一、石原直忠、中田和人、石川香．ミトコンドリア遺伝子疾患の病態発症におけるミトコンドリア分裂の役割．第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30- 12/2．横浜（ポスター発表）

谷春菜、石川香、清水章文、三藤崇行、林純一、中田和人．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．第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30-12/2．横浜（ポスター発表）

高橋宗一郎、小笠原絵美、三藤崇行、林純一、石川香、中田和人．糖尿病を発症する核ゲノム背景と変異型ミトコンドリアゲノムの共存は互いの病原性を変化させる．第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30-12/2．横浜（ポスター発表）

Kaori Ishikawa, Shun Katada, Emi Ogasawara, Yo Homma, Takaya Ishihara, Takayuki Mito, Katsuyoshi Mihara, Jun-Ichi Hayashi, Naotada Ishihara, and Kazuto Nakada. The importance of mitochondrial fission in preventing disease phenotypes induced by a pathogenic mtDNA mutation. The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] and The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine [J-mit]. 2016/10/30-11/1. Tokyo, Japan (Poster).

〔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

研究室 HP：http://www.biol.tsukuba.ac.jp/nakada_ishikawa/index.html

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者 なし

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。