

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：27401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12900

研究課題名(和文) CoQ10を用いたミトコンドリア異常による免疫不全症の治療法開発

研究課題名(英文) Therapeutic development of immune deficiency with mitochondrial dysfunction using CoQ10

研究代表者

谷村 綾子 (Ayako, Tanimura)

熊本県立大学・環境共生学部・助教

研究者番号：10610199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：患者同様の好中球分化障害を示す細網異形成症モデル細胞株を作製した。好中球分化障害の原因と考えられるエネルギー産生低下・酸化ストレス上昇に対し、フルクトースでのATP産生回復およびミトコンドリア膜透過型CoQ10での酸化ストレス低減による好中球分化の改善を目指した。結果、フルクトース添加により好中球分化が野生株と同程度まで回復した。また、好中球分化障害を起こすメカニズムとして、ATP低下によって小胞体ストレス解消機構UPRの活性が低下し、それにより上昇した小胞体ストレスが分化を抑制することが示され、エネルギー代謝と小胞体ストレス/UPRが好中球分化に重要な役割を担っていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア機能異常による希少難病であり、免疫不全により出生直後から重篤な感染症を引き起こしうる細網異形成症において、発症機序の一端を明らかにし、それを基に乳児での新規治療法につながりうる候補栄養素を見出した。この成果は、栄養素による免疫機能のコントロールやミトコンドリア異常疾患に対する栄養療法の可能性についても強く期待できるものである。また、最も数が多い免疫細胞である好中球において、その分化がエネルギー代謝と小胞体ストレスによって調節されていることを明らかにした。このことは好中球の賦活方法の開発や他の免疫細胞の分化機構解明などの一助になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I established a model cell line of reticular dysgenesis which presents similar phenotypes to promyelocytic cells of patients by mutating causative gene AK2 using genome-editing system. One of symptoms in reticular dysgenesis is differentiation arrest of neutrophil differentiation that is thought to be caused by decreased ATP production and/or increased ROS due to impairment of mitochondrial energy production. I tried to improve the impairment of neutrophil differentiation with fructose or MitoQ, a mitochondria-targeted CoQ10 to increase ATP production or decrease ROS respectively. As a results, neutrophil differentiation rate was improved to similar level of that of WT cells by fructose in a model cell line. In addition, I revealed that lower ATP level suppress unfolded protein response (UPR) and then increasing ER stress inhibited neutrophil differentiation. According to this, it was thought that energy metabolism and ER stress/UPR play a critical role on neutrophil differentiation.

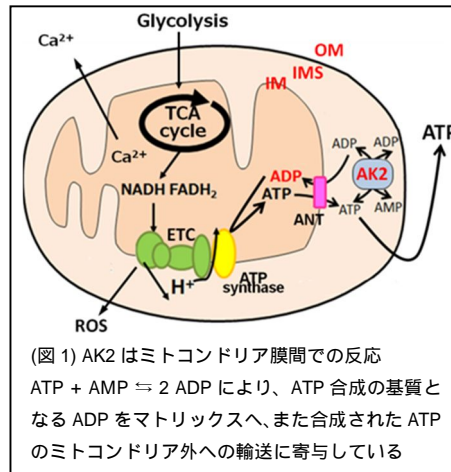
研究分野：栄養学

キーワード：ミトコンドリア エネルギー代謝 細網異型性症 免疫不全 好中球分化 フルクトース CoQ10

1. 研究開始当初の背景

< 研究対象疾患と解決すべき課題 >

細網異形成症は重症複合型免疫不全症の一つであり、原因遺伝子として、ミトコンドリア膜間でエネルギー代謝に関与する酵素であるアデニル酸キナーゼ2 (AK2) が報告されているが、その発症機序は不明である。この疾患では、好中球とT細胞の特異的な欠損のため、生後すぐに重篤な感染症を引き起こし、放置すると生後数日で死に至る。唯一の治療法は骨髄移植であるが、生後すぐには難しく、またドナーが必要なため、限定的と考えられる。そのため、少なくとも骨髄移植まで、できれば根治が可能となるような、生存に繋がる効果的な治療法の開発が待たれている。



そのため今回、

- (1) 細網異形成症の発症機序の解明
- (2) 骨髄移植までのつなぎ、あるいは根治が可能となる治療法の開発を目指した。

< これまでの成果 >

これまでに細網異形成症の発症機序について好中球分化障害に着目し以下の成果を得ている。

- (1) AK2欠損細胞の好中球分化時に酸化ストレス(ROS)が著明に上昇する(PLoS ONE, 2014)
- (2) AK2欠損細胞での好中球分化でミトコンドリア膜電位が一過性に上昇する。
- (3) ミトコンドリアATP合成阻害剤OligomycinによりATP合成を阻害すると、好中球分化時にミトコンドリアでのROS産生量が有意に増加する。

すなわち、細網異形成症では

AK2欠損によるATP合成障害 ミトコンドリア膜電位の異常な上昇 プロトンの漏れによるROSの異常増加 好中球分化障害 が起こると考えられた。

このことからATP産生の回復、あるいはROS上昇の抑制ができれば、好中球・T細胞分化障害の改善が可能ではないかと考え、そこに着目した細網異形成症の治療法開発を思いついた。

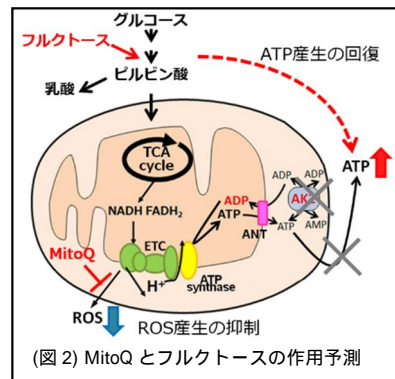
< 治療薬としての候補物質 >

すでに得ていた成果を基にし、ROSを抑制するための抗酸化剤として「MitoQ」、ATP合成増加物質として「フルクトース」を検討することにした。

抗酸化剤による分化改善計画：MitoQ

PLoS ONEでの報告後、他の研究者からグルタチオンやN-アセチルシステインにより好中球の分化異常を部分的に回復できることが報告された。改善効果が部分的である理由は、これらの抗酸化剤が主に細胞質において機能を発揮するものであり、ミトコンドリアに直接作用しないからだと考えられた。

そこで今回はミトコンドリアで直接ROS産生を抑制できる抗酸化剤を検討することとした。ミトコンドリア病の治療では各種ビタミンや栄養素を用いる(ミトコンドリア病ハンドブック, 2012)。その中で抗酸化能を持ち、かつROS産生部位の内膜に届くものとしてCoQ10があり、内膜で電子の補足と輸送に働くため、プロトンの漏れによるROS上昇を抑制できる可能性が考えられた。また、CoQ10は通常、マトリックスで生合成されるがミトコンドリア関連疾患では生合成の障害が指摘されている(Noh YH *et al.* Cell Death Dis 4, 2013)。そこで、CoQ10の補充を検討することにし、ミトコンドリア内まで到達するミトコンドリア膜通過型CoQ10 (MitoQ)を用いることとした。



嫌氣的解糖でのATP産生促進による分化改善：フルクトース

細網異形成症ではミトコンドリアでのATP合成が抑制される。実際、AK2ノックダウン細胞で好中球分化中のATP量がコントロールの40~60%抑制されていた(PLoS ONE, 2014)。完全に抑制されなかったのは嫌氣的解糖によるATP合成のためであると考え、それをヒントに嫌氣的解糖のATP産生を促進し、ミトコンドリアATP産生を代償することによる細胞機能・現象の回復を介した分化の改善を思いついた。

嫌氣的解糖の促進にはフルクトースを用いることとした。これは、フルクトースが代謝されてできるフルクトース1,6-ビスリン酸によるアロステリックな嫌氣的解糖促進効果を見込んだためである。

2. 研究の目的

ミトコンドリアのエネルギー代謝関連酵素 AK2 の異常に伴う細網異形成症において、免疫不全を引き起こす好中球分化障害に対する新たな改善方法の開発が最終的な目的である。

今回は、これまでの成果を基にし、

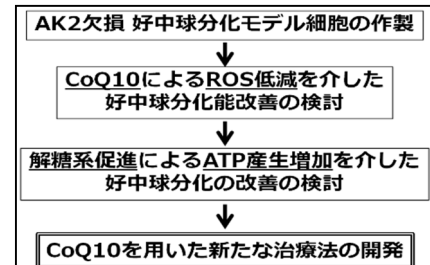
- (1) MitoQ を用いた酸化ストレス(ROS)増加の抑制、
 - (2) フルクトースを用いた嫌氣的解糖促進による細胞内 ATP 量の回復
- によって、好中球の分化を改善させることを今回の目的とした。

3. 研究の方法

以下の実験計画(1)~(4)を立て、次に示す方法 ~ によって行った。

<実験計画>

- (1) AK2 をノックアウトし AK2 欠損 HL-60 細胞を作製する。
- (2) 好中球分化させる際に CoQ10 を添加して、ROS の異常上昇の軽減を検討する。
- (3) (2) と同時に、好中球分化能の改善を検討する。
- (4) 嫌氣的解糖を賦活する化合物(フルクトース)を用い、嫌氣的解糖での代償的 ATP 産生による 好中球分化能の改善を検討する。



<実験方法>

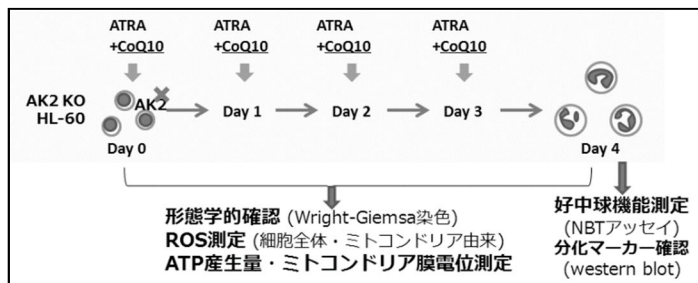
AK2 欠損疾患モデル細胞の樹立

疾患モデル細胞として、AK2 ノックアウト HL-60 細胞の樹立を目指した。た。ノックアウトは CRISPR/Cas (Sigma、Life Technologies) を Nucleofector II (Lonza) で導入し、AK2 遺伝子の切断を計画した。

好中球分化誘導と分化の確認

HL-60 細胞をオールトランスレチノイン酸(ATRA)10 μM で4日処理し、好中球分化を誘導した(右図)。

分化の確認は、分化マーカー、形態、機能活性測定により行った。好中球の分化マーカーとして、CD11b 発現を western blot で確認した。また、形態学的確認として、各分化後の細胞を May-Grünwald Giemsa 染色し、顕微鏡下で形態の変化、すなわち好中球に特有の核分葉が起こっていることを確認した。さらに、好中球機能の確認として NBT アッセイを行い、その陽性細胞をカウントして分化割合を算出した。



ミトコンドリア関連測定

分化誘導中の酸化ストレス(ROS)、ATP 量の変動を調べた。細胞全体の ROS は CellROX Green Reagent (Life Technologies)、ミトコンドリアの ROS は MitoSOX (Life Technologies) で処理後、PBS で2度 wash し、マイクロプレートリーダーで蛍光を測定した。ATP 量は CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用い、ルミノメーターで測定した後、製品説明書に従いタンパク量で補正した。

MitoQ およびフルクトース処理

ミトコンドリアでのプロトンのリークをトラップするためにミトコンドリア膜通過タイプの CoQ (MitoQ) を2種使用した(酸化型 MitoQ; Mitoquinone、還元型 MitoQ; Mitoquinol)。また、解糖系の促進効果を期待して、フルクトースを使用した。これらは分化時に同時に添加した。

また、計画(1)の期間中に、計画がうまくいかなかった時の対応として考えていた、小胞体ストレス/unfolded protein response(UPR)についての検討を行った。ミトコンドリアはアポトーシスや小胞体ストレス/UPR に関わっているため、CoQ10 の添加や解糖系の促進によって、これらが影響を受ける可能性があった。ノックアウト株作製では待ちの時間が長いため、その後の実験を進めていく上で、栄養素がミトコンドリア機能を介して細胞機能へ及ぼす影響のエビデンスを得るために、検討を行うことを考えた。

4. 研究成果

(1) AK2 欠損疾患モデル細胞の樹立

まず、AK2 遺伝子の両アレルに変異を持つ HL-60 細胞株の作製を目指した。Exon 1 の ATG 以降を CRISPR/Cas で切断することを計画し、実施したが、CRISPR/Cas 処理で得られた片アレル変異株にさらに CRISPR/Cas 処理を重ねるなどの対策を行ったものの、完全なノックアウト株を得ることはできなかった。これは AK2 の変異が HL-60 にとって致死的であることが原因ではないかと考えられる。このことは、HL-60 の分化段階に相当する前骨髄球の段階では AK2 が必須であることを示すものと考えられた。AK2 ノックアウト株は得られなかったが、片アレルに変異のあるヘテロノックアウト株を得ることができたため、その株を用いて、評価を行った。

まず、ヘテロノックアウト株では AK2 タンパク質、酵素活性ともに半分となっており、また ATRA で分化誘導を行うと、細網異形成患者由来 iPS 細胞を好中球に分化させた報告 (Oshima *et al.* BBRC, 2018) と同様の分化障害を示した。

(2) ミトコンドリアと ATP 産生、小胞体ストレス/UPR の関係についての発見

好中球分化は小胞体ストレスによってブロックされており、したがって好中球分化と成熟には UPR 活性化が必須であることは前回の科研費で解明した。また、ATP 産生を抑制すると好中球分化が著明に障害されることも明らかにした。今回は、ATP 産生と UPR 活性化の関係に焦点を当てて研究を行った。その結果、ミトコンドリアでの ATP 合成抑制剤 Oligomycin を用いて、ミトコンドリアでの ATP 産生を抑制すると、UPR の活性化が起こらなくなり、好中球分化が障害された。UPR には厳密には 3 つの経路からなるが、そのうちのいくつかの経路は活性化に ATP を要求する。そのため、細胞内 ATP 量が少ない状況では UPR の活性化を起こすことができず、UPR 活性化を必須とする好中球分化がうまくいかなくなるものと考えられた。

(3) AK2 欠損時における MitoQ による好中球分化改善の検証

これまでの成果や今回の結果から、細網異形成症の発症機序には ATP 合成低下と ROS の上昇が関わっていると考えられた。そのため、ROS のトラップに MitoQ を用いて、ROS 低下、ひいては好中球分化の回復を目指した。AK2 ヘテロノックアウト HL-60 株での好中球分化誘導時に MitoQ を添加したところ、細胞死を引き起こすことがわかった。使用濃度を他の細胞株と比べて、かなり低くしても細胞死を起こしやすい傾向があった。好中球誘導 1~4 日目の間、毎日 ATP 量を測定したところ、ATP 量が非常に低下していることがわかった。このことから ROS の低減を目指して MitoQ を検討してみたが、ミトコンドリアでのプロトンのトラップは電子伝達系でのプロトン受け渡しを阻害し、ATP 合成がうまくいかなくなるために、最終的に細胞死を引き起こすものと考えられた。現在はさらに極少量の MitoQ での検討を考えている。

(4) AK2 欠損時におけるフルクトースによる好中球分化改善の検証

AK2 ヘテロノックアウト HL-60 株を用い、好中球分化誘導時にフルクトースを添加し、好中球への分化割合や細胞内 ATP 量への影響について検討した。形態学的に好中球への分化割合を検討したところ、ヘテロノックアウト株において、フルクトース添加により好中球への分化割合が正常株の分化割合と同程度かそれ以上にまで改善することが示された。その際の ATP 産生量について検討したところ、意外なことに正常株とヘテロノックアウト株で大きな差は見られず、またフルクトース添加においても著明な増加は見られなかった。これらのことから、ミトコンドリアでの ATP 産生が障害されている状況下で、フルクトースは細胞質での解糖系の代謝を促進し、それにより産生された ATP をすぐ利用することで好中球分化を改善する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanimura A, Miyoshi K, Horiguchi T, Hagita H, Fujisawa K, Noma T	4. 巻 47
2. 論文標題 Mitochondrial Activity and Unfolded Protein Response are Required for Neutrophil Differentiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Physiol Biochem	6. 最初と最後の頁 1936-1950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000491464.	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 K Oshima, N Saiki, M Tanaka, H Imamura, A Niwa, A Tanimura, A Nagahashi, A Hirayama, K Okita, A Hotta, S Kitayama, M Osawa, S Kaneko, A Watanabe, I Asaka, W Fujibuchi, K Imai, H Yabe, Y Kamachi, J Hara, S Kojima, M Tomita, T Soga, T Noma, S Nonoyama, T Nakahata, K M Saito	4. 巻 Vol.497, No.2
2. 論文標題 Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 719-725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.02.139	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 谷村 綾子、三好 圭子、堀口 大吾、萩田 浩子、野間 隆文、南 久則
2. 発表標題 免疫細胞の分化におけるエネルギー産生の必要性 Importance of energy production for immune cell differentiations
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝内 万里奈、谷村 綾子、南 久則
2. 発表標題 アデニル酸キナーゼ2欠損血球系細胞の分化に対するフルクトースの効果
3. 学会等名 第23回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷村 綾子、溝内 万里奈、三好 圭子、堀口 大吾、野間 隆文、南 久則
2. 発表標題 フルクトースはミトコンドリアのエネルギー産生異常による好中球分化障害を改善するか Can Fructose rescue the impairment of neutrophil differentiation due to failure of mitochondrial energy production?
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayako Tanimura, Keiko Miyoshi, Taigo Horiguchi, Hagita Hiroko, Koichi Fujisawa and Takafumi Noma
2. 発表標題 A role of ER stress and UPR on hematopoietic differentiation
3. 学会等名 51st Miami Winter Symposium, Stem Cells Today's Research Tomorrow's Therapies (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayako Tanimura, Keiko Miyoshi, Taigo Horiguchi, Hagita Hiroko, Koichi Fujisawa and Takafumi Noma
2. 発表標題 Impact of mitochondrial ATP production on neutrophil differentiation
3. 学会等名 Gordon Research Conference(From Molecular Structures and Mechanisms to Cellular Bioenergetics in Health and Disease) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷村 綾子、三好 圭子、堀口 大吾、萩田 浩子、藤澤 浩一、野間 隆文
2. 発表標題 ミトコンドリアがUPR活性をコントロールして免疫細胞分化の方向を決定づける
3. 学会等名 第17回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷村 綾子, 三好 圭子, 堀口 大吾, 藤澤 浩一, 野間 隆文
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたAK2の段階的欠損による細胞代謝への影響
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第2回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ヒトAK2は細胞内エネルギー分子の分配を介して血液前駆細胞の分化運命を制御する http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/finding/180328-110000.html</p>

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