

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790760
 研究課題名(和文)ミトコンドリア機能障害に対する細胞レベルでの新規生化学診断法の構築
 研究課題名(英文) A novel cell-based functional diagnosis for the patients with mitochondrial disorders
 研究代表者
 畠山 英之 (HATAKEYAMA HIDEYUKI)
 国立精神・神経センター・神経研究所疾病研究第二部・流動研究員
 研究者番号：70466225

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア病の一次的病因となりうるミトコンドリア機能傷害を患者組織由来の培養細胞レベルで検出する新規な生化学診断技術の創出を目指した。本研究にて確立された網羅的かつ体系的な機能診断技術は、多様なミトコンドリア機能(エネルギー代謝系、酸化ストレス、各種シグナル伝達、アポトーシスの制御)の全体像を分子・タンパク・オルガネラ・細胞レベルで解析可能とし、未知の変異に対する病原性の同定やミトコンドリア病の病態発生機構の解明などにおいて極めて有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： I established the methodology to characterize the phenotypic differences in the patients with mitochondrial diseases by using a systematic molecular and protein analysis in mitochondrial electron transport components and a comprehensive functional analysis in mitochondria and cells. This methodology would be available not only for investigating the actual molecular pathogenesis in various mitochondrial diseases caused by newly found mutations, but also for applications in evidence-based therapeutics according to the pathogenic features and the clinical symptoms of the patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ミトコンドリア病、患者由来培養細胞、生化学診断

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアには独自の DNA (mtDNA) が存在し、核 DNA (nDNA) と協調しつつ細胞

機能を維持している。近年の研究から、ミトコンドリアは、エネルギー産生・代謝のみならず、酸化ストレスの制御、Ca²⁺イオン

動態の調節、アポトーシスによる細胞死への関与など多岐にわたる役割を担い、非常に重要な細胞小器官のひとつとして認識されつつある。

ミトコンドリア病と称される疾患群は、mtDNAの質的異常(点変異、欠失、重複)または量的異常(欠乏)により誘発されたミトコンドリアの機能傷害を主要な病因とする。ミトコンドリア病は、エネルギーを大量消費する組織・臓器である脳神経系・心臓・骨格筋などで特に強く症状を呈し、全身にわたり多彩な異常所見を認める。現在、ミトコンドリア病患者に対して行われている診断は、病理組織学解析、mtDNA/nDNA塩基配列解析、臨床所見(画像診断を含む)が主流である。しかしながら、ミトコンドリア機能の多様性に対応した生化学的機能解析を導入している施設は、日本のみならず世界中をみても非常に少なく、ミトコンドリア病患者に対する生化学診断の方法論の確立が強く望まれている。

2. 研究の目的

(1) ミトコンドリア病患者より採取した筋肉・皮膚組織由来の培養細胞を用いてミトコンドリア機能傷害を分子・タンパク・オルガネラ・細胞レベルで検出する新規生化学診断技術の構築を目的とした。

(2) 本診断技術の日常診断業務への展開を視野に入れ、解析手法のブラッシュアップ、ルーチン化を検討した。

(3) 従来の病理組織学解析、mtDNA/nDNA塩基配列解析、臨床所見と本診断技術を組み合わせることにより、新規変異に対する病原性の検討や種々のミトコンドリア病の病態発生機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 検体試料

ミトコンドリア病疑いの患者より採取、樹立、凍結保存された筋肉・皮膚組織由来の培養細胞 約500検体(国立精神・神経センターで所有)のうち一部を本研究で使用した。培養細胞および単離ミトコンドリア(生検組織由来、培養細胞由来)を生化学診断に供した。

(2) ミトコンドリア電子伝達系構成因子群の機能・構造解析

分光光度計を使用してミトコンドリア呼吸鎖複合体の酵素活性の経時変化を測定した。Blue native ゲル電気泳動によりミトコンドリア呼吸鎖複合体の高次タンパク構造を検出した。クロマトリック HPLC を使用し

て Coenzyme Q10 の酸化還元状態を検出した。ポーログラフィを使用してミトコンドリア電子伝達系全体の酸素消費速度を経時的に測定した。

(3) 患者由来培養細胞を用いた多様なミトコンドリア機能の解析

ミトコンドリアエネルギー産生・代謝の指標として、rLuciferase/Luciferin 化学発光法に基づきプレートリーダーを使用して培養細胞中の ATP 産生量を測定した。ミトコンドリア酸化ストレスの指標として、培養細胞に蛍光試薬(MitoSOX)を添加し、蛍光顕微鏡および蛍光プレートリーダーを使用して活性酸素種を検出した。ミトコンドリアタンパク輸送能ならびにアポトーシスの指標として、培養細胞に蛍光試薬(JC-1)を添加し、蛍光顕微鏡および蛍光プレートリーダーを使用してミトコンドリア膜電位変化を検出した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア機能傷害を細胞レベルで検出する新規生化学診断技術の構築

HeLa 細胞および HeLa 細胞からの単離ミトコンドリアを使用して生化学診断技術の構築を実施した。標的分子の酸化還元状態に依存した吸光度変化に着目し、解析対象であるミトコンドリア呼吸鎖複合体、クエン酸合成酵素、ピルビン酸脱水素酵素の機能活性を経時的に定量解析可能とした(図1)。同時に、Blue native / SDS ゲル電気泳動によりミトコンドリア呼吸鎖複合体の高次タンパク構造あるいは各複合体の構成サブユニット分子の検出手法を確立した(図2)。さらに、他のミトコンドリア電子伝達系構成因子である Cytochrome c の存在量を SDS ゲル電気泳動で検出、Coenzyme Q10 の酸化還元状態をクロマトリック HPLC で検出(図3)にそれぞれ成功した。

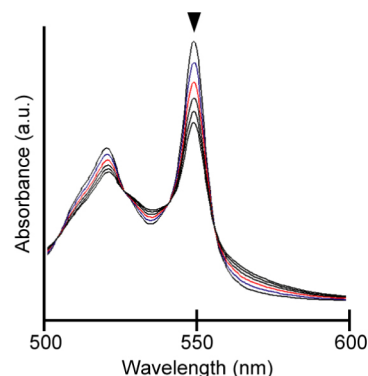


図1. 経時的な吸光度変化に基づくミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV の酵素活性測定。

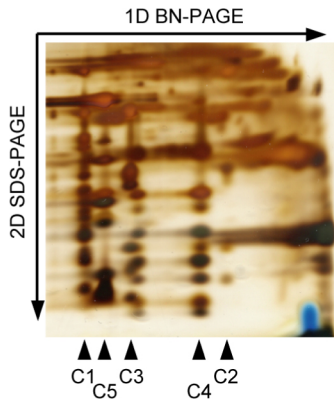


図2. 2次元 Blue native / SDS ゲル電気泳動によるミトコンドリア呼吸鎖複合体 I-V (C1-C5) の構成サブユニット分子の検出。

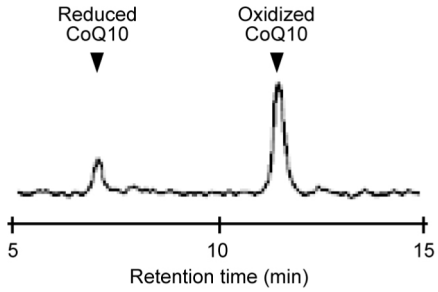


図3. クーロメトリック HPLC を使用した Coenzyme Q10 の酸化還元状態の検出。

ミトコンドリアは、エネルギー産生・代謝のみならず、酸化ストレスの制御、アポトーシスによる細胞死などの役割を担っている。本研究では、培養細胞を使用した多様なミトコンドリア機能の解析手法を併せて検討した。rLuciferase / Luciferin 化学発光法による細胞内 ATP 産生量の検出、蛍光試薬 (MitoSOX) によるミトコンドリア特異的な活性酸素種の検出 (図 4)、蛍光試薬 (JC-1) による経時的なミトコンドリア膜電位変化の検出 (図 5)、活性型 Caspase 3 依存的なアポトーシスによる細胞死の検出にも成功した。

以上の結果から、ミトコンドリア機能の多様性に対応した細胞レベルでの生化学診断技術が構築できた。

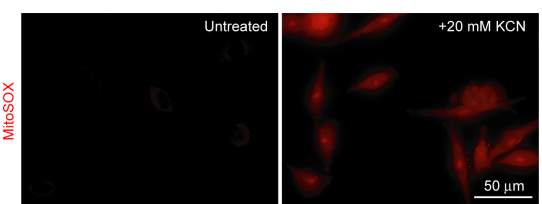


図4. 蛍光試薬 (MitoSOX) によるミトコンドリア特異的な活性酸素種の検出。左は添加剤なし、右はミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV

の阻害剤である KCN (20 mM) で 0.25 時間処理後の蛍光顕微鏡像。KCN 刺激によるミトコンドリア特異的な活性酸素種 (赤色蛍光) の顕著な増加が確認された。

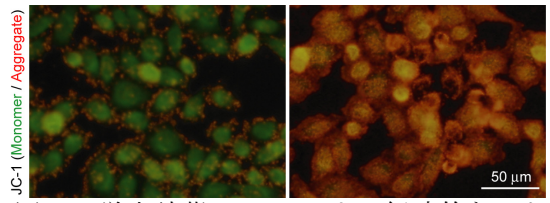


図5. 蛍光試薬 (JC-1) による経時的なミトコンドリア膜電位変化。左は添加後 0.25 時間、右は添加後 1 時間での蛍光顕微鏡像。時間経過に伴い、JC-1 単量体 (緑色蛍光) が次第にミトコンドリア内に蓄積し、JC-1 凝集体 (赤色蛍光) を形成した。

(2) 本診断技術の日常診断業務への展開に向けた環境整備

本診断技術をミトコンドリア病疑いの患者検体に適用するにあたり、解析条件の最適化、プロトコール・ワークフローの整備を実施した。これにより、異なる診断担当者であっても、ある程度一定のクオリティを維持しつつ患者検体の解析が可能となった。

(3) ミトコンドリア病疑いの患者群に対する網羅的・体系的機能診断

これまでの病理組織学解析、mtDNA / nDNA 塩基配列解析のみでは確定診断に至らなかったミトコンドリア病疑いの患者群に対し、生検組織より樹立した筋芽細胞・線維芽細胞を使用して上述の網羅的・体系的機能診断を実施した。いくつかの代表的な結果を以下に示す。

① Cytochrome c oxidase (COX) 欠損症に対する機能診断

筋病理所見により全般性 COX 欠損症と診断された患者 (8 症例) 由来培養筋芽細胞を使用し、COX 欠損症における分子・タンパク・ミトコンドリア・細胞レベルでの病態発症機序を解明することを目的とした。

ミトコンドリア電子伝達系の機能解析を行った結果、全症例で COX 複合体の機能低下を認めた。とりわけ 3 症例では COX 複合体特異的な高次タンパク構造異常に基づく顕著な機能低下 (相対活性<20%) を認め、筋組織および培養筋芽細胞に対する COX 活性染色の結果と相違ない結果であった。他のミトコンドリア電子伝達系の構成因子群は、全症例でコントロール検体 (10 症例) と同様の結果であった。COX 複合体の機能・構造異常を伴う重篤な 3 症例でのみ、ほぼすべての

COX 複合体サブユニットタンパク発現量の低下を認めた。しかしながら興味深いことに、COX 複合体サブユニットの mRNA 発現量は、全症例でコントロール検体と同様の結果であった。COX 欠損症患者に対する原因遺伝子の探索を行った結果、全症例において既知の COX 複合体サブユニット遺伝子群はすべて陰性であった。COX 複合体の機能・構造異常を伴う重篤な 3 症例でのみ、ミトコンドリアエネルギー代謝の指標となる ATP 産生量の有意な低下、ミトコンドリア酸化ストレスの指標となる活性酸素種産生量の有意な上昇、ミトコンドリア膜電位変化の顕著な異常を認めた。種々のミトコンドリア機能異常の影響を受け、細胞レベルでは増殖能低下、アポトーシス惹起などの機能異常が検出された。

以上の結果、COX 複合体の機能・構造異常によりミトコンドリア・細胞レベルでの重篤な機能異常が誘発されることが明らかとなった。重篤な 3 症例に関しては、未知の COX 関連遺伝子の異常によるものと類推され、現在、候補遺伝子を探索中である。一方、COX 複合体サブユニットの mRNA およびタンパク発現量の解析結果から、これら 3 症例ではタンパク合成は正常に機能しているものの、未知の COX 関連タンパクの機能・構造異常により COX 複合体が形成されず、ミトコンドリア内部の特異的プロテアーゼにより COX サブユニットが次第に消化されていくことが示唆される。なお、本結果は、同一疾患においても、患者間で病態の発症機序や症状の重篤度に明確な差異が存在することを強く示唆している。

② mtDNA の新規変異に対する病原性の同定
mtDNA 上の tRNA 遺伝子群中に新規に検出された種々の変異に対して分子レベルでの病原性をそれぞれ検討した結果、これらの変異により誘発されるミトコンドリア特異的な tRNA 翻訳機構の異常が主要な病因となりうることを明らかにした。これらの変異における病態発症機構を分子・タンパク・ミトコンドリア・細胞レベルでそれぞれ解明した。

(4) 本研究成果により期待される効果

本研究における一連の結果から、ミトコンドリア病患者由来組織より樹立した培養細胞に対する網羅的・体系的機能診断技術は、多様なミトコンドリア機能（エネルギー代謝、酸化ストレス、各種シグナル伝達、アポトーシスなどの制御）の全体像を分子・タンパク・オルガネラ・細胞レベルで解析可能とした。本診断技術は、mtDNA / nDNA 中に検出された新規変異に対する病原性の検討のみならず、ミトコンドリア病全般の分子基盤と組織・臓器特異的な病態発症機序との関連性を解明する上で極めて有用であるといえる。

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 2 件）

- (1) Masakazu Mimaki, Hideyuki Hatakeyama, 他 8 名、Reversible infantile respiratory chain deficiency: a clinical and molecular study, *Annals of Neurology*, Accepted, 2010、査読有
- (2) Masakazu Mimaki, Hideyuki Hatakeyama, 他 9 名、Different effects of novel mtDNA G3242A and G3244A base changes adjacent to a common A3243G mutation in patients with mitochondrial disorders, *Mitochondrion*, 9(2), p115-122, 2009、査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

- (1) 畠山英之・澤佳世・喜多俊二・後藤雄一、COX 欠損症により支配される重篤なミトコンドリア機能傷害、第 9 回日本ミトコンドリア学会年会、2009 年 12 月 18 日、東京大学鉄門講堂
- (2) Hideyuki Hatakeyama, Kayo Sawa, Yu-ichi Goto, Functional threshold in mitochondria with cytochrome *c* oxidase deficiency: A cell-based diagnostic approach for mitochondrial diseases, The 6th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, October 31, 2009, Taipei Medical University, TAIWAN
- (3) Hideyuki Hatakeyama, Kayo Sawa, Yu-ichi Goto, A systematic cell-based analysis for the patients with cytochrome *c* oxidase deficiency, The 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, October 23, 2009, Hawaii Convention Center, USA
- (4) 畠山英之・小牧宏文・後藤雄一、新規に発見された tRNA-Trp 遺伝子中の c5541t 変異は、ミトコンドリアの機能傷害を伴う細胞レベルでの重篤な表現型を示す、第 8 回日本ミトコンドリア学会年会、2008 年 12 月 18 日、東京女子医科大学弥生講堂
- (5) 畠山英之・後藤雄一、培養筋芽細胞による Cytochrome *c* oxidase 欠損症の機能診断、第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 12 日、神戸ポートアイランド
- (6) Hideyuki Hatakeyama, Hirofumi Komaki, Yu-ichi Goto, Two mutations at the opposite sites in anticodon stem of mitochondrial tRNA-Trp gene cause different phenotypes on cytochrome *c* oxidase activity, The 58th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, November 12, 2008, Pennsylvania Convention Center, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 英之 (HATAKEYAMA HIDEYUKI)
国立精神・神経センター・神経研究所疾病
研究第二部・流動研究員
研究者番号：70466225