

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07906

研究課題名(和文) 白質脳症・認知症の原因としてのミトコンドリア病の原因遺伝子探索

研究課題名(英文) Mitochondrial Disease as a Cause of Leukoencephalopathy and Dementia: A Search for the Causal Genes of Mitochondrial Disease

研究代表者

岡本 裕嗣 (Okamoto, Yuji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：60709658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は潜在的に存在する高齢発症ミトコンドリア病の原因遺伝子を明らかにし、白質脳症・認知症に及ぼす影響を明らかにすることを目的として研究を行なった。

次世代シーケンサーを用いて既報告の167の核遺伝子による診断パネルを用いていくつかの成果を得たが、診断効率が上がらないため、今後検索範囲をさらに拡充して検索を行う必要性を確認した。一方、疾患マーカーとして血清GDF-15が高齢者や白質脳症の症例に有用であるかどうかの検討を行なったが、中枢性ミトコンドリア病のマーカーにはなりえなかった。本研究ではさらに、髄液からのメタボローム解析を行い、複数の髄液中のマーカー候補を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは、細胞のエネルギー産生に関与する小器官で、その異常であるミトコンドリア病は出生時から老年期に渡り存在することがわかってきました。しかし、高齢者におけるミトコンドリア病の診断は難しいのが現状のため、高齢発症ミトコンドリア病の原因遺伝子を明らかにし、白質脳症・認知症に及ぼす影響を明らかにすることを目的として本研究を行ないました。本研究では既存の遺伝子を167選択し調べましたが、さらに検索範囲を広げる必要性を確認しました。また、病態のマーカーとして髄液のメタボローム解析を行い、新規バイオマーカー候補をいくつか発見しました。ミトコンドリア病の髄液を用いた研究はこれまでにない研究です。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial diseases are characterized by diverse pathologies, with many cases of unknown etiology. We hypothesize that mitochondrial diseases are potentially present in older adults and aim to elucidate the causative genes for latent adult and late-onset mitochondrial diseases, as well as their impact on leukoencephalopathy and dementia.

We have utilized next-generation sequencing for complete mitochondrial DNA sequencing. However, we confirmed the need to expand the search range further, as relying solely on reported genes does not improve diagnostic efficiency. We have also been investigating disease markers critical for diagnosis, specifically examining the utility of serum GDF-15 as a biochemical marker in older adults and leukoencephalopathy cases. Although, it could not serve as a marker for central mitochondrial disease. In this study, we conducted metabolomic analyses of cerebrospinal fluid and identified multiple cerebrospinal fluid marker candidates.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：ミトコンドリア病 白質脳症 GDF-15 髄液メタボローム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病の病態は多様である。小児期から成人期にかけて脳症、筋症を中心として様々な病態を引き起こすが、臨床的には本症が強く疑われながら、遺伝子診断未確定の病態が数多く存在する。その理由としては、ミトコンドリア病が、細胞ごとにヘテロプラスミー（細胞内局在差）が存在するミトコンドリアDNA (mtDNA) と、1500近くある核DNAのどちらの異常によってももたらされるからである。そのため、障害されている臓器でないとは異常なmtDNAが同定することができなかつたり、膨大な候補遺伝子を網羅的に解析することが難しいことが確定診断を困難にしている。次にミトコンドリア自体の加齢による影響や、経年的なmtDNA異常の蓄積によりはじめて表出する症状もあるため、高齢者におけるミトコンドリア病診断は難しい。しかし、壮年期、老年期発症のミトコンドリア病は、我々のデータからも潜在的に存在しており、老化と疾病を考える上でミトコンドリア機能異常を考えることは重要である。

2. 研究の目的

2-(1) 成人型・高齢発症ミトコンドリア病の遺伝学的原因を明らかにするために次世代シーケンサーを用いて、mtDNA探索だけでなく、ミトコンドリア関連核遺伝子についても遺伝子パネルと全エクソームシーケンシングを行い、認知症、白質脳症の原因としてのミトコンドリア病の原因を調べる。そして、新規原因遺伝子候補の存在が同定され予測された時には機能解析、ショウジョウバエモデルの作成を行い、原因遺伝子であるか否かを調べる。

2-(2) ミトコンドリア機能異常に用いるマーカーとして、現在最も感度の高い検査とされる Growth differentiation factor 15 (GDF-15)測定を行い、診断ツールの一つとして、治療効果判定の一つとして有用性があるかを調べる。同時にGDF-15以外の新規のミトコンドリア脳症のバイオマーカーの探索を行う。

3. 研究の方法

3-(1) 原因遺伝子同定

次世代シーケンサーは、Miseq (illumina)、Ion Proton (LifeTechnologies)を用いる。NGS検索を行う条件として、mtDNA欠失など独自の基準をもうけて選定する。検索する遺伝子として、既にミトコンドリア病の病的遺伝子として報告されている167遺伝子を診断パネルとして検索。陰性例に関しては全エクソーム解析を行い、疾病の原因として報告されていない関連遺伝子について調べる。

3-(2) 新規原因遺伝子の病的意義を同定するためのモデル生物を用いた機能解析

新規原因遺伝子が同定された場合、家系内の遺伝子検査を行い、real-timePCRなどにより発現なども評価し、その

上で機能解析を行う。方法としては生化学検査（筋肉組織、繊維芽培養細胞）を用いてBN-PAGE (Blue Native Polyacrylamide Gel electrophoresis)を用いたイムノプロット解析やミトコンドリア呼吸鎖の酵素活性の測定を行なう。さらにショウジョウバエモデルを用いてSiRNA法による遺伝子KO（ノックアウト）ショウジョウバエを作成し、神経、運動機能解析を行う。

3-(3) Growth differentiation factor 15 (GDF-15)測定

GDF15は、病気を特定できる感度・特異度が98%とほぼ100%に近く現時点で最も有用なミトコンドリア病の診断バイオマーカーである。病気の重症度、ひいては薬効評価にも有用であるこ

ミトコンドリア病パネル (167遺伝子)

KARS2	ACADL	ACADM	ACADVL	AGL	ACADS
C10orf2	CPT1B	CPT2	DARS2	DGUK	EARS2
GAA	GY31	HADHA	HADHB	HARS2	MPV17
MTPAP	OPA1	OPA3	PFKM	PGAM2	PGM1
PHKA1	POLG	POLG2	PYGM	RARS2	RRM2B
SARS2	SOD2	SLC25A4	SUCLA2	SUCLG1	TAZ
TK2	TUFM	TYMP	YARS2	ACACA	ACACB
ACAD9	ACAT	ADCK3	ARG1	ATPSA1	ATP5E
ATPAF2	AUH	BCS1L	BTBD	C12orf65	COQ2
COG9	COX15	COX4I1	COX4I2	COX8B1	COX7A1
GPS1	OPT1A	DLAT	DLSD	ETFA	ETFB
ETFDH	ETHE1	FARS2	FASTKD2	FBXL4	FOXRED1
OSPC	GBE1	OFM1	QSOX2	HLC5	ISOU
IVD	KARS	LARS2	LMBRD1	LPN1	LRPPRC
MARS2	MCOO1	MCOO2	MGME1	MMAA	MMAB
MMACHC	MMADHC	MPI	MRPL40	MRPL44	MRPS18
MRPS18A	MRPS2	MRPS22	MRPF	MTFMT	MTRR
MUT	NAGS	NARS2	NDUFA1	NDUFA10	NDUFA11
NDUFA13	NDUFA2	NDUFA7	NDUFA8	NDUFAF2	NDUFAF5
NDUFB6	NDUFS1	NDUFS2	NDUFS3	NDUFS4	NDUFS5
NDUFS6	NDUFS7	NDUFS8	NDUFV1	NDUFV3	NLBP1
OTC	PC	PCGA	PCGB	PDHA1	PDHB
PDHX	POP1	POSS1	POSS2	PHKA2	PHKB
PHKG2	PMM2	PUS1	PYGL	SCO1	SDHAF1
SDHAF2	SDHB	SDHC	SLC22A5	SLC25A13	SLC25A15
SLC25A19	SLC25A20	SLC25A3	SLC37A4	SUCLG2	SURF1
TACO1	TON2	TFAM	TFB1M	TMM6A	TMM6B
TOMM20	TRMU	TSM	UQCRCB	UQCRCQ	

とが示されている。R&D Systems製のHuman GDF-15 ELISAキットを用いて測定する。

4. 研究成果

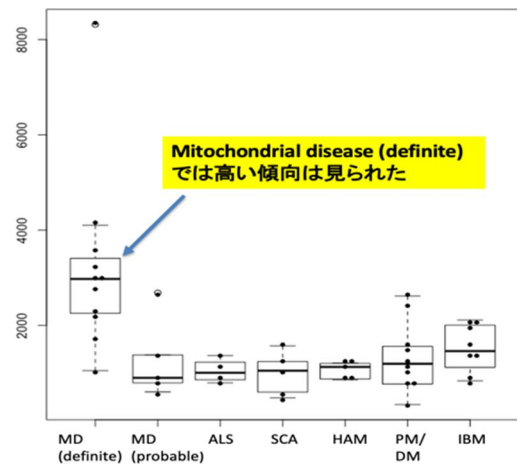
4-(1) 新規原因遺伝子の探索

今回の検討では、新規の原因遺伝子同定にまで至らなかった。その原因として、従来のミトコンドリア病の原因とされる遺伝子では他臓器の症状を呈する病態や、小児期発症例が多いことが予測された。今後、1500近くあるミトコンドリア関連遺伝子に範囲を広げて行く予定である。また、本研究期間中にミトコンドリア病以外の白質脳症の原因遺伝子パネルも作成(右図)したので、今後はスクリーニングとして新規白質脳症パネルも使用していく。

NOTCH3	EIF2B4	MLC1	RARS	RNF216	GRN
HTRA1	EIF2B5	HEPACAM	PYCR2	ASPA	MAPT
COL4A1	GFAP	CLCN2	AARS2	IFIH1	TARDBP
COL4A2	CSF1R	PLP1	DARS2	RNASEH2B	VCP
COLGALT1	ABCD1	GJC2	EARS2	RNASSET2	CHMP2B
GLA	GALC	AIMP1	KARS1	SPG11	ITM2B
TREX1	PSAP	HSPD1	LARS2	SPAST	SQSTM1
CTSA	ARSA	TUBB4A	SOX10	APP	TBK1
EIF2B1	TREM2	POLR3A	PEX6	PSEN1	CHCHD10
EIF2B2	TYROBP	POLR3B	PEX10	PSEN2	ApoE
EIF2B3	LMNB1	POLR1C	PEX13	FUS	PRNP

4-(2) Growth differentiation factor 15 (GDF-15)

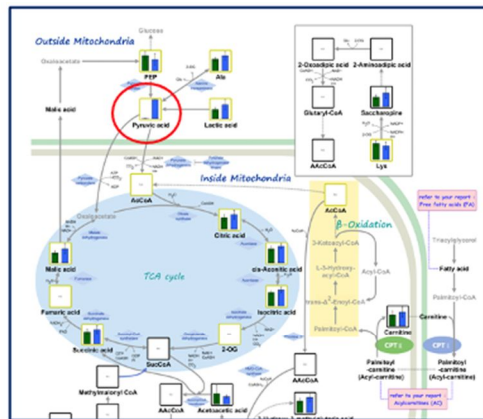
GDF-15はミトコンドリア病の診断に有用なマーカーとして近年報告されているため、先行研究において、血清検体を用いた自検例を確認したところ、感度・特異度の高い検査として使用できることを確認した(右図)。しかし、中枢性のミトコンドリア病のスクリーニングに同マーカーが使用できるかについても検討をすすめたが、有効性を確認することはできなかった。



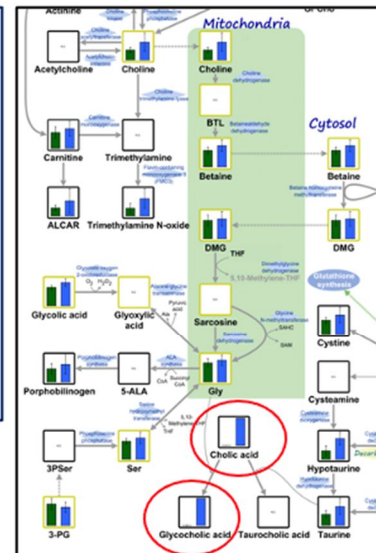
4-(3) 髄液メタボローム解析を用いた新規バイオマーカーの探索

新規バイオマーカー探索として、髄液メタボローム解析を行った。ミトコンドリア病の髄液を用いたメタボローム解析は過去に報告がないため、ミトコンドリア病のマーカーとして有名なピルビン酸を調べたところ、右図.aに見られるようにTCA回路にて上昇を認めた。その他にも図.bで結果の一部のみを引用したが、複数の新規バイオマーカー候補が見出されている。今後の研究では、これらのバイオマーカーを中心に中枢性のミトコンドリア異常のマーカーを探索する。

図a. 髄液解析でもミトコンドリア病のマーカーとして有名なピルビン酸の上昇を認める



図a. 髄液解析でもミトコンドリア病のマーカーとして有名なピルビン酸の上昇を認める



図b. 一部の代謝経路を示したが、ミトコンドリア病で有意に新規バイオマーカーの上昇を認めた

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiramatsu Y, Okamoto Y, Yoshimura A, Yuan J, Ando M, Higuchi Y, Hashiguchi A, Matsuura E, Nozaki F, Kumada T, Murayama K, Suzuki M, Yamamoto Y, Matsui N, Miyazaki Y, Yamaguchi M, Suzuki Y, Mitsui J, Ishiura H, Tanaka M, Morishita S, Nishino I, Tsuji S, Takashima H	4. 巻 -
2. 論文標題 Complex hereditary peripheral neuropathies caused by novel variants in mitochondrial-related nuclear genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00415-022-11026-w	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 菊池 晃、岡本 裕嗣、橋口 裕、吉重 幸一、谷口 雄大、出口 尚寿、高嶋 博、西尾 善彦	4. 巻 63
2. 論文標題 認知機能低下を契機に発見されたミトコンドリア糖尿病の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 糖尿病	6. 最初と最後の頁 344 ~ 349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11213/tonyoby.63.344	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------