

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15397

研究課題名（和文）疾患iPS細胞を用いたBOLA3変異における膨状ミトコンドリアの病態意義の解明

研究課題名（英文）Study of the Pathological Significance of Enlarged Mitochondria in BOLA3 Mutations Using iPSCs.

研究代表者

徳山 剛士（Tokuyama, Takeshi）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30808093

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの機能は様々な方法で制御されるが、そのひとつにミトコンドリアの形態調節がある。ミトコンドリア心筋症由来の線維芽細胞を観察した結果、ミトコンドリアの一部が膨れたような形態異常を発見しMito-Ballと名付けてその生理的意義を調査した。Mito-BallはATPやROSが多く存在し、マトリックスやミトコンドリアの内部構造が凝集しているような構造を取っていた。また構造体を減らす方法も見つけており、今後これらの技術を用いた実験によってMito-Ballを指標とした治療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアの機能異常はアルツハイマー病・肥満・糖尿病・不妊など多岐にわたる疾患の病態基盤であると考えられている。今回観察されたMito-Ballは遺伝子変異箇所などによらず広範な細胞で観察されるもので、Mito-Ballはミトコンドリア障害においてユビキタスな現象であると考えられる。このことから、Mito-Ballに着目した研究成果はミトコンドリアを原因とする多くの病気の病態解明・治療法確立に役立つ知見になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial functions are regulated in various ways, one of which is through the modulation of mitochondrial morphology. By observing fibroblasts derived from mitochondrial cardiomyopathy, we discovered an abnormal swollen morphology in some mitochondria, which we named Mito-Ball. We investigated its physiological significance. Mito-Balls were found to contain high levels of ATP and ROS, with a structure suggesting aggregation of the matrix and internal mitochondrial components. We also identified methods to reduce the presence of these structures. Future experiments using mice are anticipated to develop therapies using Mito-Balls as indicators.

研究分野：病態生理学

キーワード：ミトコンドリア 創薬 BOLA3 ミトコンドリア心筋症 ミトコンドリアダイナミクス 疾患iPS細胞 ミトコンドリア

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアは、生命活動の根源を担う重要なエネルギー生成装置である。このミトコンドリア機能の調節機構として、融合と分裂による形態変化「ミトコンドリアダイナミクス」が存在する。このシステムが崩壊すると、ミトコンドリア機能が顕著に低下するため、ミトコンドリアダイナミクスはミトコンドリア機能維持に重要な役割を果たしていることが予測される。ミトコンドリア機能障害はアルツハイマー病、糖尿病、肥満、不妊など、多くの疾患発症の根底にあると考えられているが、ミトコンドリアダイナミクスと病態の関係性については多くが未解明である。

(2) 申請者は以前、ミトコンドリア形態調節因子として MITOL (Mitochondrial Ubiquitin Ligase) が DRP1 (dynamin-related protein 1) の制御を通じて心臓の機能を維持していることを報告した (Tokuyama Takeshi et al. *iScience* vol. 257 104582. 11 Jun. 2022)。また、この研究で MITOL の過剰発現を利用してミトコンドリアダイナミクスを変化させると心筋梗塞時の心毒性が一部軽減することを見出し、ミトコンドリアダイナミクスの調節が心筋細胞の機能維持に強く寄与することを発見した。

## 2. 研究の目的

複数のミトコンドリア心筋症の患者由来線維芽細胞のミトコンドリア形態を観察したところ、新しくミトコンドリアの一部が膨れた形態異常が観察され、これを Mito-Ball と名付けて調査を行った。本研究の目的は、BOLA3 遺伝子変異に起因するミトコンドリアダイナミクス異常がミトコンドリア心筋症の病態基盤であることを証明することである。さらに、膨れたミトコンドリア形状異常を指標とした創薬探査が可能かどうかを検討する。本研究は、新規ミトコンドリア構造異常の提唱や、BOLA3 心筋症のメカニズムの同定、ヒト疾患 iPS 由来心筋を使用した病態解明・創薬開発に大きな意義がある。

## 3. 研究の方法

BOLA3 の遺伝子変異を持つ細胞群全 5 例で優位に異常な形状のミトコンドリアが多かったため、これら 5 例の BOLA3 変異に着目し、Mito-Ball の性質を調べた。研究対象としては患者由来線維芽細胞を含め、これらの細胞から得られた iPS 細胞、さらにこの iPS 細胞から樹立した心筋細胞において研究を行った。

(1) BOLA3 患者線維芽細胞を用いて、Mito-Ball の性質を評価した。

(2) iPSC から心筋細胞を得て、Mito-Ball の形成を評価した。

(3) Mito-Ball の形成を抑える方法を探索した。

## 4. 研究成果

(1) Mito-Ball は他の部分と比べて内部に大量の mtDNA と ROS が蓄積している。Mito-Ball は MitoTracker Orange による染色で強く染まるため観察が容易である。mtDNA の凝集と Mito-Ball の関連を調べるため、TFAM-mClover の過剰発現により間接的に mtDNA の位置を観察した。その結果、Mito-Ball の部分で TFAM の発色団が周辺の他の部分のミトコンドリアと比べて強く凝集していることが明らかとなった (Fig.1)。続いて細胞毒性につながる ROS の蓄積と Mito-Ball の関連を調べた。その結果、mtDNA と同様に Mito-Ball には多量の ROS が集まっていることが明らかとなった (Fig.1)。これらの結果から、Mito-Ball ではミトコンドリアの内容物が凝集し、ROS が局所的に集められていることが示唆された。

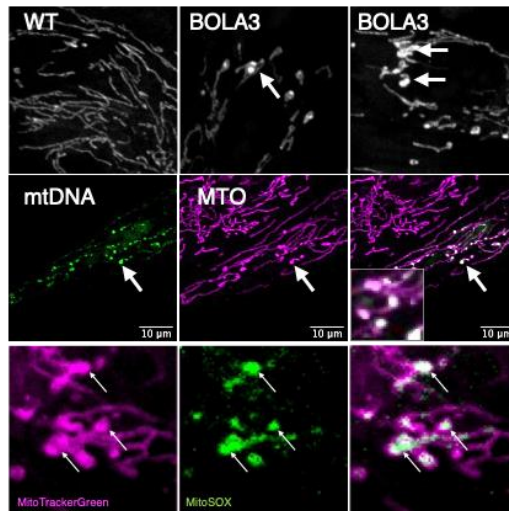


Figure 1. BOLA3 遺伝子変異線維芽細胞における Mito-Ball の mtDNA と ROS の蓄積  
 上段：MitoTracker Orange を用いて染色されたミトコンドリア。BOLA3 変異の線維芽細胞 2 例において膨れた輝度の強い Mito-Ball が観察される。中段：TFAM-mClover による mtDNA と Mito-Ball (MitoTracker Orange) の位置関係。下段：MitoSOX によるミトコンドリア ROS と Mito-Ball の位置関係。

(2) Mito-Ball は線維芽細胞と心筋細胞で観察される。BOLA3 患者由来線維芽細胞、iPS 細胞、この iPS 細胞から樹立された心筋細胞の 3 細胞において Mito-Ball の形成を確認した。その結果、線維芽細胞と心筋細胞においては Mito-Ball が観察されたが、iPS 細胞においては顕著に Mito-Ball が形成される様子は観察されなかった。これは、iPS 細胞の細胞内代謝においてミトコンドリアがあまり使われていないことに起因していると考えられる。したがって、Mito-Ball の形成はミトコンドリアの代謝のバランスによって引き起こされることが示唆された。また、心筋細胞においてミトコンドリアはサルコメアの配列に従ってきれいに整列するが、Mito-Ball のサイズは極端に大きいため、物理的なストレスによって心筋細胞中の繊維に負荷がかかることが予想された。

(3) Mito-Ball の形成はミトコンドリアの内膜の構造に依存する。すでにミトコンドリア病に対して使用されている化合物から Mito-Ball の形成を低下・増加させるものを探索した結果、複数の化合物を探り当てることに成功した。しかし、これらの化合物は Mito-Ball を持つ他の遺伝子変異の線維芽細胞には効果がなかった。このことから、Mito-Ball 形成は可逆的であると考えられた。前述の結果から Mito-Ball は内部構造に異常が出ている可能性が示唆されている。そこで、ミトコンドリアの内膜の構造維持に重要な OPA1 (Optic atrophy 1) の発現を抑制することで Mito-Ball 形成が低下・増加するかを観察した。その結果、siRNA による OPA1 の発現抑制によって Mito-Ball 形成は顕著に抑制された。OPA1 によるクリステ構造の維持と Mito-Ball の構造に関連があることが示唆された。

本研究から、ミトコンドリアの新規形態異常として Mito-Ball の存在を確認した。また、Mito-Ball が細胞内の毒性につながる可能性を見出し、さらに Mito-Ball を指標とした化合物の探索に成功した。本成果は、ミトコンドリア心筋症だけでなく、ミトコンドリア機能障害を伴う多くの疾患の病態理解や治療法開発に向けた新たな発見となり、循環器分野だけでなく他の臓器のミトコンドリア病態解明にも波及効果を持つと期待される。

## 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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hino, T., Omura, S. N., Nakagawa, R., Togashi, T., Takeda, S. N., Hiramoto, T., Tasaka, S., Hirano, H., Tokuyama, T., Uosaki, H., Ishiguro, S., Kagieva, M., Yamano, H., Ozaki, Y., Motooka, D., Mori, H., Kirita, Y., Kise, Y., Itoh, Y., Matoba, S., ... Nureki, O.	4. 巻 186
2. 論文標題 An AsCas12f-based compact genome-editing tool derived by deep mutational scanning and structural analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 4920 ~ 4935.e23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2023.08.031	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 Tokuyama Takeshi, Yanagi Shigeru	4. 巻 14
2. 論文標題 Role of Mitochondrial Dynamics in Heart Diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1876 ~ 1876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14101876	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 Razan E. Ahmed, Takeshi Tokuyama, Tatsuya Anzai, Nawin Chanthra and Hideki Uosaki	4. 巻 377
2. 論文標題 Sarcomere maturation: function acquisition, molecular mechanism, and interplay with other organelles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci	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) 10.1098/rstb.2021.0325	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 Watanabe, C., Osaka, H., Watanabe, M., Miyauchi, A., Jimbo, E. F., Tokuyama, T., Uosaki, H., Kishita, Y., Okazaki, Y., Onuki, T., Ebihara, T., Aizawa, K., Murayama, K., Ohtake, A., & Yamagata, T.	4. 巻 34
2. 論文標題 Total and reduced/oxidized forms of coenzyme Q10 in fibroblasts of patients with mitochondrial disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Genet Metab Rep	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) 10.1016/j.ymgmr.2022.100951	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takeshi Tokuyama
2. 発表標題 The mitochondrial ubiquitin ligase MITOL is downregulated in myocardial infarction and induces mitophagy via mitochondrial fission.
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会 (JCS2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 徳山剛士, 魚崎英毅, 柳茂
2. 発表標題 ミトコンドリア酵素MITOLの低下は心臓老化や心筋梗塞を増悪し、MITOLの活性化は心筋梗塞の重症化を抑制する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳山剛士, 魚崎英毅, 柳茂
2. 発表標題 ミトコンドリア外膜上の掃除機構の破綻が心筋梗塞の病態を悪化させる
3. 学会等名 第51回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 徳山剛士, 魚崎英毅	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2
3. 書名 生体の科学 2023 Oct 15; 74(5):396-397	

1. 著者名 徳山 剛士, 魚崎 英毅	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 実験医学増刊 Vol.41 No.5 ミトコンドリア 疾患治療の新時代	

〔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
---------	---------