

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659281

研究課題名(和文)アルツハイマー病とミトコンドリアDNA多型の大規模解析

研究課題名(英文)Mitochondrial DNA analysis for Alzheimer disease cohort study

研究代表者

康 東天(KANG, DONGCHON)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80214716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアDNA(mtDNA)の転写・複製の制御部位であるD-loop領域の約1kbpと電子伝達系複合体Iサブユニット6をコードする約1kbpをターゲットとして、上記1500人の全配列を決定した。現在この配列データを基に、疾患との連鎖する多型について多変量解析を終えた。その結果、P値が0.01未満の多型を見出した。今後さらに長期にわたってフォローする予定。このSNP mtDNAと対照mtDNAを持つサイブリッド細胞を作製し、両細胞間のミトコンドリア機能やエネルギー代謝の変化の違いなどを解析する予定。

研究成果の概要(英文)：The mitochondrial DNA sequences in the two regions (D-loop and ND6) have been determined for about 1.5 thousand residents in Hisayama town, Fukuoka prefecture. We have found that one single nucleotide polymorphism (SNP) is statistically linked to Alzheimer disease. We are planning to establish the cybrid cell lines which contain the SNP and to analyze their mitochondrial activities, energy metabolism, and so on.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：ミトコンドリアDNA アルツハイマー病 コホート研究

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の発症とその進展にミトコンドリア機能異常が深く関わっているとの報告が多数ある。なかでもミトコンドリア DNA はミトコンドリアにおける ATP 合成電子伝達系の必須サブユニットをコードしており、その異常がミトコンドリアでの ATP 産生能の低下あるいは活性酸素産生の増加を来すことはよく知られている。このような異常はミトコンドリアによる好氣的代謝への依存度が高い神経組織で組織の機能異常として表れやすい。このことは先天的なミトコンドリア DNA 変異が原因の疾患がしばしばミトコンドリア脳筋症と言う表現型をとることからも容易に理解できる。またミトコンドリア DNA 変異は糖尿病の発症とも密接に関連していることはよく知られているが、近年、耐糖能異常がアルツハイマー病の非常に重要な発症リスクであることが認めら得ようになっている。このように、ミトコンドリア DNA 多型がアルツハイマー病の発症リスクとなりうるのが想定されるが、ミトコンドリア DNA 多型とアルツハイマー病発症リスクに関しては、コホート研究によって明確な関連を示せたものは国内外で皆無である。

その最大の理由は、耐糖能、血圧、BMI など重要なアルツハイマー病発症リスク関連情報を網羅し、長期的にフォローでき、かつ低い相関でも検出できる十分な数の解析対象者をそろえた研究ができていないことによる。申請者は九州大学の久山町コホート研究という世界的に稀な地域密着長期コホートスタディーとタイアップしその問題点を克服することを目指す。

2. 研究の目的

九州大学の久山町コホート研究グループは、近年、年齢、性別等をマッチングさせた 3000 人以上のゲノムサンプルの収集を終え、長期前向きのコホートスタディーを新たに開始している。特筆すべきはこれら解析対象者全員について、生活習慣情報や一般検査情報に加え、糖負荷試験による精密な耐糖能情報に加え、認知症に関する検査情報が詳細に得られていることである。申請者は共同研究として、この大集団のミトコンドリア DNA 配列を解析することで、これまで誰も明確に示すことが出来なかったミトコンドリア DNA 多型と糖尿病発症リスクとの関連にはっきりとし

た結論を出すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) DNA 配列決定：ミトコンドリア DNA の D-loop 領域ならび複合体 I サブユニット遺伝子群の DNA 配列の決定。DNA サンプルは久山町研究グループ（連携研究者：清原 裕）から提供を受ける。

(2) 多変量解析：久山町研究グループがこれまで起こってきている方法による（連携、清原 裕）

4. 研究成果

ミトコンドリア DNA の転写・複製の制御部位である D-loop 領域の約 1kbp と電子伝達系複合体 I サブユニット 6 をコードする約 1kbp をターゲットとして、上記 3000 人以上の全配列を決定した。現在この配列データを基に、疾患との連鎖する多型について多変量解析を終えた。その結果、P 値が 0.01 未満の多型を見出した(下図参照。具体的位置は未発表のため伏せている)。今後、長期間のフォローを予定している。

ミトコンドリアDNA久山町解析

塩基部位X

	非アルツハイマー病群			確定アルツハイマー病群		P値
	アリル	アリル (%)	対象者数	対象者数	年齢性別 マッチング後 オッズ比 (95%CI)	
野生型	A	96.7	1266	59	1.000 (対照)	
多型	G	3.3	43	7	5.548 (2.204-13.965)	0.0003

この SNP を持つミトコンドリア DNA と対照配列ミトコンドリア DNA を持つサイブリッド細胞を作製する予定である。サイブリッド細胞とは、ミトコンドリア DNA を持たない細胞（⁰細胞と呼ぶ）に目的ミトコンドリアだけを導入したものである。このような細胞は核ゲノムは同一でミトコンドリアゲノム情報だけが異なることになる。このようなサイブリッド細胞を作ることによって、ミトコンドリア DNA の配列の違いだけに依存する表現型を探索することが出来る。2013 年に本研究室にメタボローム測定、プロテオーム測定用の最新の質量分析装置が 5 台導入された。今後作成するサイブリッド細胞を用いてのエネルギー代謝の違いなどをメタボローム解析によって詳細に分析する予定である。

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 26 件)

1) Ikeda, M., Ide, T., Fujino, T., Arai, S., Saku, K., Kakino, T., Tyynismaa, H.,

- Yamasaki, T., Yamada, K., Kang, D., Suomalainen, A. and Sunagawa, K. (2015) Overexpression of TFAM or Twinkle Increases mtDNA Copy Number and Facilitates Cardioprotection Associated with Limited Mitochondrial Oxidative Stress, *PLoS One*. 10, e0119687.
- 2) Ikeda, K., Ichihara, K., Hashiguchi, T., Hidaka, Y., Kang, D., Maekawa, M., Matsumoto, H., Matsushita, K., Okubo, S., Tsuchiya, T. and Furuta, K. (2015) Evaluation of the short-term stability of specimens for clinical laboratory testing, *Biopreserv Biobank*. 13, 135-43.
- 3) Hirota, Y., Yamashita, S., Kurihara, Y., Jin, X., Aihara, M., Saigusa, T., Kang, D. and Kanki, T. (2015) Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways, *Autophagy*. 11, 332-43.
- 4) Unal, S., Gumruk, F., Yigit, S., Tuncer, M., Tavil, B., Cil, O., Takci, S., Urata, M., Hotta, T., Kang, D. and Cetin, M. (2014) A novel mutation in protein C gene (PROC) causing severe phenotype in neonatal period, *Pediatr Blood Cancer*. 61, 763-4.
- 5) Mukai, N., Yasuda, M., Ninomiya, T., Hata, J., Hirakawa, Y., Ikeda, F., Fukuhara, M., Hotta, T., Koga, M., Nakamura, U., Kang, D., Kitazono, T. and Kiyohara, Y. (2014) Thresholds of various glycemic measures for diagnosing diabetes based on prevalence of retinopathy in community-dwelling Japanese subjects: the Hisayama Study, *Cardiovasc Diabetol*. 13, 45.
- 6) Iizuka, Y., Yamashita, K., Sakasegawa, S., Hanada, T., Tani, W., Adachi, H., Haga, R., Yamaguchi, M., Kurotani, W., Sekiguchi, M., Osawa, S., Hosogaya, S., Kang, D. and Ueda, S. (2014) Improvement and evaluation of a 1,2-dioleoylglycerol method for measuring pancreatic lipase catalytic activity in serum, *Clin Chem Lab Med*. 52, e171-3.
- 7) Hoshina, T., Nakashima, Y., Sato, D., Nanishi, E., Nishio, H., Nagata, H., Yamamura, K., Doi, T., Shiokawa, Y., Koga, Y., Kang, D., Ohga, S. and Hara, T. (2014) Staphylococcal endocarditis as the first manifestation of heritable protein S deficiency in childhood, *J Infect Chemother*. 20, 128-30.
- 8) Baba, T., Otake, H., Sato, T., Miyabayashi, K., Shishido, Y., Wang, C. Y., Shima, Y., Kimura, H., Yagi, M., Ishihara, Y., Hino, S., Ogawa, H., Nakao, M., Yamazaki, T., Kang, D., Ohkawa, Y., Suyama, M., Chung, B. C. and Morohashi, K. (2014) Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1, *Nat Commun*. 5, 3634.
- 9) Aihara, M., Jin, X., Kurihara, Y., Yoshida, Y., Matsushima, Y., Oku, M., Hirota, Y., Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiumi, T., Yamamoto, T., Sakai, Y., Kang, D. and Kanki, T. (2014) Tor and the Sin3-Rpd3 complex regulate expression of the mitophagy receptor protein Atg32 in yeast, *J Cell Sci*. 127, 3184-96.
- 10) Uchiumi, T., Tanamachi, H., Kuchiwaki, K., Kajita, M., Matsumoto, S., Yagi, M., Kanki, T. and Kang, D. (2013) Mutation and functional analysis of ABC2/multidrug resistance protein 2 in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome, *Hepatol Res*. 43, 569-75.
- 11) Ohga, S., Ishiguro, A., Takahashi, Y., Shima, M., Taki, M., Kaneko, M., Fukushima, K., Kang, D. and Hara, T. (2013) Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood, *Pediatr Int*. 55, 267-71.
- 12) Nakanishi, N., Fukuoh, A., Kang, D., Iwai, S. and Kuraoka, I. (2013) Effects of DNA lesions on the transcription reaction of mitochondrial RNA polymerase: implications for bypass RNA synthesis on oxidative DNA lesions, *Mutagenesis*. 28, 117-23.
- 13) Matsunaga, Y., Ohga, S., Kinjo, T., Ochiai, M., Ito, N., Doi, T., Kang, D. and Hara, T. (2013) Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of non-inherited protein C deficiency, *J Perinatol*. 33, 239-41.
- 14) Matsuda, T., Kanki, T., Tanimura, T., Kang, D. and Matsuura, E. T. (2013) Effects of overexpression of mitochondrial transcription factor A on lifespan and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*, *Biochem Biophys Res Commun*. 430, 717-21.
- 15) Kanki, T., Kurihara, Y., Jin, X., Goda, T., Ono, Y., Aihara, M., Hirota, Y.,

Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiyumi, T. and Kang, D. (2013) Casein kinase 2 is essential for mitophagy, *EMBO Rep.* 14, 788-94.

16) Fang, J., Uchiyumi, T., Yagi, M., Matsumoto, S., Amamoto, R., Takazaki, S., Yamaza, H., Nonaka, K. and Kang, D. (2013) Dihydro-orotate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction, *Biosci Rep.* 33, e00021.

17) Yagi, M., Uchiyumi, T., Takazaki, S., Okuno, B., Nomura, M., Yoshida, S., Kanki, T. and Kang, D. (2012) p32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial translation: importance of its RNA-binding ability, *Nucleic Acids Res.* 40, 9717-37.

18) Wollen Steen, K., Doseth, B., M, P. Westbye, Akbari, M., Kang, D., Falkenberg, M. and Slupphaug, G. (2012) mtSSB may sequester UNG1 at mitochondrial ssDNA and delay uracil processing until the dsDNA conformation is restored, *DNA Repair (Amst).* 11, 82-91.

19) Takazaki, S., Abe, Y., Yamaguchi, T., Yagi, M., Ueda, T., Kang, D. and Hamasaki, N. (2012) Arg 901 in the AE1 C-terminal tail is involved in conformational change but not in substrate binding, *Biochim Biophys Acta.* 1818, 658-65.

20) Oba, T., Yasukawa, H., Hoshijima, M., Sasaki, K., Futamata, N., Fukui, D., Mawatari, K., Nagata, T., Kyogoku, S., Ohshima, H., Minami, T., Nakamura, K., Kang, D., Yajima, T., Knowlton, K. U. and Imaizumi, T. (2012) Cardiac-specific deletion of SOCS-3 prevents development of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol.* 59, 838-52.

21) Morimoto, N., Miyazaki, K., Kurata, T., Ikeda, Y., Matsuura, T., Kang, D., Ide, T. and Abe, K. (2012) Effect of mitochondrial transcription factor a overexpression on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis model mice, *J Neurosci Res.* 90, 1200-8.

22) Matsumoto, S., Uchiyumi, T., Tanamachi, H., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T. and Kang, D. (2012) Ribonucleoprotein Y-box-binding protein-1 regulates mitochondrial

oxidative phosphorylation (OXPHOS) protein expression after serum stimulation through binding to OXPHOS mRNA, *Biochem J.* 443, 573-84.

23) Matsumoto, S., Uchiyumi, T., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T. and Kang, D. (2012) Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins, *Mitochondrion.* 12, 391-8.

24) Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiyumi, T. and Kang, D. (2012) Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast, *J Biol Chem.* 287, 3265-72.

25) Fujino, T., Ide, T., Yoshida, M., Onitsuka, K., Tanaka, A., Hata, Y., Nishida, M., Takehara, T., Kanemaru, T., Kitajima, N., Takazaki, S., Kurose, H., Kang, D. and Sunagawa, K. (2012) Recombinant mitochondrial transcription factor A protein inhibits nuclear factor of activated T cells signaling and attenuates pathological hypertrophy of cardiac myocytes, *Mitochondrion.* 12, 449-58.

26) Fang, J., Uchiyumi, T., Yagi, M., Matsumoto, S., Amamoto, R., Saito, T., Takazaki, S., Kanki, T., Yamaza, H., Nonaka, K. and Kang, D. (2012) Protein instability and functional defects caused by mutations of dihydro-orotate dehydrogenase in Miller syndrome patients, *Biosci Rep.* 32, 631-9.

〔学会発表〕(計 20 件)

(1) ミトコンドリアゲノムと酸化ストレス：TFAMから見る細胞機能
康東天 (特別講演)
第 2 2 回生物試料分析科学会年次学術集会
2012 年 3 月 10 - 11 日 (福岡)

(2) Implications of mitochondrial oxidative stress in common diseases
Dongchon Kang (Invited speaker)
International symposium of mitochondrial biomedicine & ASMRM Council Meeting
April 8, 2012 (Hangzhou, China)

(3) 日本版センチネルプロジェクトにおける標準化の課題：JLAC10
康東天

(HELICS チュートリアル「医療情報を二次利用するための標準化」招待講演)
第 16 回日本医療情報学会春季学術大会
2012 年 5 月 31 日 - 6 月 2 日 (函館)

(4) 検査データの現状と課題
康東天 (大会企画「医療情報データベースの特性と質」招待講演)
第 16 回日本医療情報学会春季学術大会
2012 年 5 月 31 日 - 6 月 2 日 (函館)

(5) 老化におけるミトコンドリアと TFAM
康東天 (シンポジウム「身から出た錆: ミトコンドリアから長寿を科学する」招待講演)
第 12 回日本抗加齢医学会総会
2012 年 6 月 22 - 24 日 (横浜)

(6) ミトコンドリアゲノムの維持とヒトの疾患: 活性酸素と TFAM の意義
康東天 (WS「ミトコンドリアゲノムが制御する多様な生命現象」招待講演)
第 84 回日本遺伝学会大会
2012 年 9 月 24-26 日 (福岡)

(7) RNA-binding proteins involved in mitochondrial proteins synthesis
Dongchon Kang (Invited speaker)
7th International Symposium on Genomic Medicine of CCH
(Joint Symposium of Taiwan Society for Mitochondrial Research and Medicine/
Australasian College of Medical Sciences and Research)
October, 26-27, 2012, Taichung, Taiwan

(8) 臨床検査項目標準コード (JLAC10) 最新情報 ~ 今後の方向性
康東天 (シンポジウム「臨床検査の医療情報」招待講演)
第 32 回日本医療情報学連合大会
2012 年 11 月 15-17 日 (新潟)

(9) 臨床化学の魅力: 自動化の先にあるもの
康東天 (会長シンポジウム「臨床検査の再生と将来展望」招待講演)
第 59 回日本臨床検査医学会学術集会
2012 年 11 月 29 日 - 12 月 2 日 (京都)

(10) p32/gC1qR の臓器特異的ノックアウトマウスの解析
康東天 (シンポジウム「ミトコンドリア新機能と破綻による疾患」招待講演)
第 86 回日本生化学会大会
2013 年 9 月 11-13 日 (横浜)

(11) 臨床検査学サインティストの養成
康東天
(シンポジウム「次世代を担う臨床検査技師に必要な教育とは」招待講演)

第 60 回日本臨床検査医学会学術集会
2013 年 10 月 31 日 - 11 月 3 日 (神戸)

(12) 項目コード (JLAC10) を用いた多施設間検査情報共有のための取り組みと問題点
康東天
(EBLM シンポジウム「多施設間検査データ活用における現状と今後の課題」招待講演)
第 60 回日本臨床検査医学会学術集会
2013 年 10 月 31 日 - 11 月 3 日 (神戸)

(13) ERAL1 and p32: factors for mitochondrial ribosome assembly
Dongchon Kang
(Session: Mitochondrial Gene Expression, invited speaker)
10th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine
2013, November 3-5 (Seoul, Korea)

(14) ミトコンドリアゲノム安定性と代謝
康東天
(シンポジウム「ミトコンドリア生物学からミトコンドリア疾患学へ」招待講演、世話人)
第 87 回日本内分泌学会総会
2014 年 4 月 24-26 日 (福岡)

(15) JCCLS 共用基準範囲と血清脂質
康東天
(シンポジウム「血清脂質の基準範囲を考える」招待講演)
第 54 回日本臨床化学会年次学術集会
2015 年 9 月 5-7 日 (東京)

(16) ミトコンドリア翻訳因子 p32/gC1qR 臓器特異的ノックアウトマウスの解析
康東天
(シンポジウム「細胞と個体におけるミトコンドリアの形成と維持機能」招待講演、世話人)
第 87 回日本生化学会大会
2014 年 10 月 15-18 日 (京都)

(17) Tissue specific KO mice of p32/gC1qR, a mitochondrial RNA chaperone: brain and heart
Dongchon Kang (invited speaker)
The 11th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine
2014, November 14-15 (Taipei, Taiwan)

(18) Brain - and heart-specific disruption of p32 gene in mice causes vacuolar degeneration in mid-brain and dilated cardiomyopathy
Dongchon Kang (invited speaker)
The 9th International Symposium of Genomic Medicine
2014, November 15-16 (Changhua, Taiwan)

(19)ミトコンドリアと疾患
康 東天 (会長講演)
第 61 回日本臨床検査医学会学術集会
2014 年 11 月 22-25 日 (福岡)

(20)ミトコンドリア異常と臨床検査
康 東天
(シンポジウム：未来的臨床検査のパーспекティブ)
第 10 回日本臨床検査医学会特別例会
第 29 回日本医学会総会 2015 関西・分科会
2015 年 4 月 13 日(京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ URL
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/ccIm/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

康 東天 (KANG DONGCHON)
九州大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80214716

(2)連携研究者

清原 裕 (KIYOHARA YUTAKA)
九州大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80161602