

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461571

研究課題名(和文) ミトコンドリア病治療薬のための網羅的機能測定スクリーニングシステムの開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic biomarker of mitochondrial disorders

研究代表者

古賀 靖敏 (KOGA, Yasutoshi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：00225400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア病は、エネルギー産生が出来なくて早期に死亡する難病である。我々はMELASの細胞モデルを利用し、新規バイオマーカー(GDF-15)を発見(Mitochondrion 20:34-42.2014)、特許申請を行った(特願2014-005391、PCT/JP2015/50833)。このGDF15は、ミトコンドリア病のバイオマーカーとして最も理想的な指標となる事を示した(Annals of Neurology, 2015;78(5):814-23)。今後、ミトコンドリア病を疑う際の国際的スタンダードとなる(Nature Reviews Disease Primers 2016)。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial disorders, an intractable genetic disease, is the disorders who have not produce enough ATP generation. Using rho zero cellular model, we have identified GDF15, which is the most useful and reliable mitochondrial biomarker for diagnosis and monitor the clinical progression in mitochondrial disorders. We have been developing the testing device of GDF15 and doing the clinical trial for application for diagnostic device in Japan.

研究分野：ミトコンドリア病

キーワード：ミトコンドリア脳筋症 バイオマーカー 感度・特異度 GDF15 診断アルゴリズム 体外診断薬開発

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病の診断に有用なバイオマーカーの開発は、世界のミトコンドリア病研究者の長年にわたる悲願である。我々は、世界に先駆けて診断のみならず重症度の評価に有用である新規バイオマーカー (GDF15: growth differentiation factor 15) をメタボローム解析により発見 (Mitochondrion 2015;20:34-42)、その臨床的有用性につき報告した (Ann Neurology 2015;78:814-823)。しかしながら、GDF15 の有用性を明確にするためには、ミトコンドリアの一次的機能不全 (先天性遺伝子異常に起因するミトコンドリア病) のみならず、重要臓器の二次的なミトコンドリア機能不全でどのように変化するのか、つまり、GDF15 が細胞外へ分泌されるメカニズム、および分泌動態に影響する交絡因子を明らかにしなければならない。申請者により作成された、MELAS の細胞モデルである^oサイブリドシステムは、申請者が米国留学中に確立したシステムで (MCB 1992 ; 12 : 480-490)、現在ではミトコンドリア DNA 変異の機能解析を行うツールとして必須のシステムとなっている。我々は、ミトコンドリア DNA の A3243G および A3271C 変異量が 0% から 100% までを有する細胞系列を樹立しており、この細胞モデルを利用し、GDF15 分泌に関わるミトコンドリア機能不全の閾値、およびミトコンドリア DNA と核 DNA のクロストークの基盤となる分子を確定出来ると考える。

発見した GDF15 の開発は、医学生物学研究所との共同研究で順調に進み、現在 10 個のモノクローナル抗体を作出に成功し、ELISA での血清の同定も完了、病院での汎用品キット化への開発行っている。平成 27 年度中には、PMDA での体外診断薬開発として対面助言を予定している。

2. 研究の目的

ミトコンドリア病の診断に有用なバイオ

マーカーの開発は、世界のミトコンドリア病研究者の長年にわたる悲願である。我々は、世界に先駆けて診断および重症度の評価に有用であるミトコンドリア病の新規バイオマーカー (GDF15: growth differentiation factor 15) をメタボローム解析により発見 (Mitochondrion 2015;20:34-42) 報告した (Ann Neurology 2015;78:814-823)。申請者の開発した^oサイブリドシステムを活用して、GDF15 が細胞外へ分泌されるメカニズム、および分泌動態に影響するミトコンドリア機能の閾値、および交絡因子を明らかにし、GDF15 のヒトにおける分泌誘導メカニズムの分子基盤を明らかにする事が本研究の目的である。

3. 研究の方法

GDF15 のヒトにおける分泌誘導メカニズムの分子基盤を明らかにし、且つその分泌動態に影響を与える交絡因子を検証する目的で、1) ^oサイブリドシステムを用いた分子生物学的アプローチによりシグナル伝達のメカニズムを解析する。種々のレベルの電子伝達系酵素活性低下状態において、細胞から分泌される分子種を決定する目的で、メタボローム解析、遺伝子チップによる mRNA の発現解析、RNAi による転写ブロックの解析、ELISA によるタンパク解析などを実施する。2) 臨床検体の解析を行う。交絡因子を解明する目的で、久留米学病院を受診する種々の病気・病態・疾患で GDF15 を測定し、どのような因子が関与するのかを明らかにする。

(1) ^oサイブリドシステムを用いた分子生物学的アプローチ

MELAS の原因遺伝子である A3243G を 0-100% まで種々の変異率を有する^oサイブリド細胞株を用い、好氣的条件下での培養により (酸化ストレス状態) で、血清中に分泌される GDF15 を測定、一方で酸素消費量や電子伝達系酵素活性の残存酵素活性を測定

する。A3243G の変異率が変化することで、電子伝達系機能障害を来す事が判明している(閾値効果を約 90% と想定 PNA 1992;89:4221-4225)が、GDF15 の分泌促進のピークを確認する。この GDF15 の分泌促進前後での変異率を持つ細胞株で、どのような分子種の変化が確認されるのかを、細胞由来のホモジネートを用い、メタボローム解析、遺伝子チップによる mRNA の発現解析で確認する。細胞外への分泌型 (GDF15) ではない、核内物質もしくは細胞内物質を中心に解析する。

(2) 臨床検体の解析

ミトコンドリア関連病型、先天性ミオパチー、もしくは急性炎症性疾患、危急新生児疾患、慢性変性疾患、心疾患、腎疾患、肝疾患、有機酸血症、カルニチン代謝異常症、ライソゾーム病などありとあらゆる病気、病態における GDF15 の変動因子を解明し、交絡因子を同定する。また、ミトコンドリア病の筋生検検体を用いて、変異率と GDF15 のタンパクレベルの発現の関係を single fiber PCR 法で同定し相関を検討する (Koga Y Acta Neuropathol 2000;99:186-190)。この場合、市販品のポリクローナル抗体および医学生物学研究所との共同研究で我々が独自に開発したモノクローナル抗体を用いて、ミトコンドリア病の患者筋病理を用いた解析を行う。具体的には、筋生検の横断切片、縦断切片において、H&E、mGT、COX、NADH、SDH の各染色を連続切片で行い、筋線維を正常染色、中間型、RRF に分類、さらにそれらを COX 染色により正常と活性欠損線維に分類し、その A3243G 変異量と GDF15 の免疫組織染色と重ね合わせて、変異含量、COX 活性、RRF、GDF15 免疫染色による分子種の増加との相関を検証する。

4. 研究成果

ミトコンドリア病の新規バイオマーカー

(GDF15) は、国内・および国際特許を申請した(特願 2014-005391、PCT/JP2015/50833)。また、体外診断薬の開発では、医学生物学研究所と共同で汎用品開発を行っている。すでに既存の ELISA 試薬(R&D 社、DGD150)と同等の性能をもつ SwELISA 用抗体 16 クローンを取得、単一抗体で健常人血清に対して非特異凝集を起こさない 6 クローンを選択し、モノクローナル抗体作成。その後、サンドイッチ ELISA 試作品を開発、このキットを用いて臨床検体を測定し、今までの製品と同程度の測定値を示す良好な成績が得られた。また、新たに開発したラテックス試薬でもラテックス試薬での測定値と SwELISA 測定値の相関を確認し、良好な臨床性能試験結果を得ている。GDF15 の臨床的有用性は、NIH common data element のミトコンドリア病部門でもすでに記載され、近年発刊される Nature Review Primer の初版のミトコンドリア病総説論文(申請者が共著者)にも診断アルゴリズムのトップに記載されている。PMDA の体外診断薬開発として戦略相談を平成 28 年 6 月に予定している。

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 6 件)

Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A, Fukumoto Y, Arahata H, Kakuma T, Kojima T, Ito M, Tanaka M, Saiki R, Koga Y, Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders, Annals of neurology、査読有、2015;78(5):814-23

DOI: 10.1002/ana.24506

Wei FY, Zhou B, Suzuki T, Miyata K, Ujihara Y, Horiguchi H, Takahashi N, Xie P, Michiue H, Fujimura A, Kaitsuka T, Matsui H, Koga Y, Mohri S, Suzuki T, Oike Y, Tomizawa K、

Cdk5rap1-Mediated 2-Methylthio
Modification of Mitochondrial tRNAs
Governs Protein Translation and
Contributes to Myopathy in Mice and
Humans、Cell metabolism、査読有、
2015;21(3):428-42

DOI: 10.1016/j.cmet.2015.01.019

Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S,
Koga Y, Tanaka M、GDF15 is a novel
biomarker to evaluate efficacy of
pyruvate therapy for mitochondrial
diseases、Mitochondrion、査読有、
2015;20c:34-42

DOI: 10.1016/j.mito.2014.10.006

Fujii T, Nozaki F, Saito K, Hayashi A,
Nishigaki Y, Murayama K, Tanaka M,
Koga Y, Hiejima I, Kumada T、Efficacy
of pyruvate therapy in patients with
mitochondrial disease: A
semi-quantitative clinical
evaluation study、Mol Genet Metab、
査読有、2014;112(2):133-8、

DOI: 10.1016/j.ymgme.2014.04.008

[学会発表](計 23 件)

YATSUGA S, ISHII A, ARAHATA H, FUKUMOTO
Y, TANAKA M, KOGA Y、GDF15 (growth
differentiation factor 15) is the new
biomarker for muscle-related
mitochondrial diseases、The 67th
American Academy of Neurology Annual
Meeting、2015 年 4 月 22 日、Washington
(USA)

八ツ賀秀一、佐々木孝子、西岡淳子、片
山幸樹、牛嶋規久美、古賀靖敏、FGF-21
の日本人における基準値の検討、第 88 回
日本内分泌学会学術総会、2015 年 4 月 24
日、ホテルニューオータニ東京(東京都
千代田区)

YATSUGA S, ISHII A, FUKUMOTO Y, ARAHATA
H, KAKUMA T, KOGA Y、GDF15 is a novel

biomarker of mitochondrial diseases、
Society for Inherited Metabolic
Disorders 2015、2015 年 3 月 29 日、Salt
Lake City (USA)

YATSUGA S, KOGA Y、Growth
differentiation factor-15 (GDF-15): a
most reliable biomarker for
mitochondrial disorders、第 56 回日本
先天代謝異常学会、2014 年 11 月 14 日、
江陽グランドホテル(宮城県仙台市)

YATSUGA S, KOGA Y、Growth
differentiation factor 15 and
fibroblast growth factor 21: novel
biomarkers for mitochondrial diseases、
International Meeting on
Mitochondrial Pathology 2014、2014 年
6 月 16 日、Tampere (Finland)

YATSUGA S, KOGA Y、Growth
differentiation factor 15 and
fibroblast growth factor 21: novel
biomarkers for mitochondrial diseases、
Mitochondrial Medicine 2014、2014 年 6
月 6 日、Pittsburgh (USA)

八ツ賀秀一、古賀靖敏、血漿 FGF21 は筋
症状を伴うミトコンドリア病のバイオマ
ーカーになる、第 56 回日本小児神経学会
学術集会、2014 年 5 月 31 日、アクトシ
ティ浜松(静岡県浜松市)

YATSUGA S, KOGA Y、Follow-up study:
FGF21 is a new biomarker to diagnose
muscle-related mitochondrial diseases
in Japanese patients、International
Symposium on Mitochondria 2013、2013
年 11 月 7 日、六本木アカデミーヒルズ(東
京都港区)

八ツ賀秀一、古賀靖敏、西岡淳子、片山
幸樹、FGF21: 疾患特異的バイオマーカー
の探索、第 47 回日本小児内分泌学会学術
集会、2013 年 10 月 11 日、浅草ビューホ
テル(東京都台東区)

YATSUGA S, KOGA Y, Serum fibroblast growth factor 21 (sFGF21) is elevated in patients with congenital hypothyroidism and muscle-related mitochondrial diseases in Japanese population、European society for paediatric endocrinology、2013年9月18日、Milan (Italy)

八ツ賀秀一、FGF21:新規治療薬のバイオマーカーになり得るか?、九州若手小児内分泌セミナー、2013年5月18日、大分県大分市

〔図書〕(計 1 件)

総編集:杉江秀夫、分担編集:福田冬季子、西野一三、古賀靖敏、診断と治療社、代謝性ミオパチー Basic mechanism, Diagnosis and Practical Approach、2014年、255

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称:ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15
発明者:田中雅嗣、伊藤雅史、藤田泰典、古賀靖敏
権利者:地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター、学校法人久留米大学、ノーベルファーマ株式会社
種類:体外診断薬
番号:特願 2014-005391
出願年月日:2014年1月19日
国内外の別:国内

名称:DF15 as a useful diagnostic biomarker for mitochondrial disorders
発明者:Masashi Tanaka, Masashi Itoh, Yasunori Fujita, Yasutoshi Koga
権利者:地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター、学校法人久留米大学、ノーベルファーマ株式会社
種類:体外診断薬
番号:PCT/JP2015/50833
出願年月日:2015年1月14日
国内外の別:国外(米国、EU)

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 靖敏 (KOGA, Yasutoshi)
久留米大学医学部小児科・教授
研究者番号:00225400

(2) 研究分担者

八ツ賀 秀一 (YATSUGA, Shuichi)
久留米大学医学部小児科・助教
研究者番号:10454919

(3) 連携研究者

()

研究者番号: