

総括研究報告書（2頁）

分担研究報告書（6頁）

平成10年度
厚生科学研究費脳科学研究事業

ミトコンドリア脳筋症の発症予防と治療法開発の研究
(H10-脳-004)

主任研究者：後藤雄一（国立精神・神経センター神経研究所）

分担研究者：林 純一（筑波大学、生物科学系）
埜中征哉（国立精神・神経センター神経研究所）

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
総括研究報告書

ミトコンドリア脳筋症の発症予防と治療法開発の研究

主任研究者 後藤雄一 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨

(1) ミトコンドリア脳筋症患者培養細胞株の樹立、(2) 任意の DNA をミトコンドリアに導入する方法の開発、(3) 変異 mtDNA/正常 mtDNA 比率の変動に関する研究、(4) ミトコンドリア脳筋症モデル動物での治療実験という全体計画にそって以下の研究成果を得た。(1) 研究材料として有意義な細胞株樹立のその新しい方法の開発、(2) ミトコンドリアへの 2 段階 DNA 導入法の条件、方法の確定、(3) 異種の変異 mtDNA を有する細胞における mtDNA の動態と発現、ゲルマニウムの mtDNA に与える影響、(4) ゲルマニウム中毒マウスの失敗と欠失 mtDNA を有するマウスの作製の成功、である。変異 mtDNA の量を操作し、ミトコンドリア脳筋症の予防法、治療法を開発しようとする今回の研究において、この 1 年の成果は次年度の研究に大いに寄与する。

分担研究者

林 純一 筑波大学生物科学系・教授
埜中征哉 国立精神・神経センター神経研究所・部長

A. 研究目的

ミトコンドリア脳筋症患者の約 70% は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) に変異をもつ。患者の細胞の中では、変異 mtDNA と正常 mtDNA がそれぞれのミトコンドリアのなかで共存して存在している。そして、何らかの要因で変異 mtDNA の比率が高いミトコンドリアが増加し、一定の値（閾値）を越えると細胞の機能が障害され、病気が発症する。本研究の目的は、細胞の中の変異 mtDNA を多く含むミトコンドリアを減少させ、変異 mtDNA の少ないミトコンドリアを増加させる方法を見出し、発症予防や治療法を開発することにある。

B. 全体計画

- (1) ミトコンドリア脳筋症患者培養細胞株の樹立
- (2) 任意の DNA をミトコンドリアに導入する方法の開発
- (3) 変異 mtDNA/正常 mtDNA 比率の変動に関する研究
- (4) ミトコンドリア脳筋症モデル動物での治療実験

C. 研究方法

- (1) 自然経過で改善する乳児良性型チトクローム c 酸化酵素欠損症や変異 mtDNA 比率が改善した症例などの特殊例の患者細胞株を樹立する。

- (2) 細胞から 1 度ミトコンドリア分画を分離し、そこに外から DNA を導入した後、ミトコンドリアを細胞にもどす方法（2 段階導入法）を開発する。
- (3) 欠失を有する細胞と点変異を有する細胞を融合させることで、両方の変異 mtDNA の動態から、変異 mtDNA/正常 mtDNA 比率の変動に関わる内因性因子の研究を行った。また、患者培養細胞株に対して、外因性因子の一つとしてゲルマニウム等を投与し、変異 mtDNA/正常 mtDNA の比率の変化の有無を調べる。
- (4) ゲルマニウム中毒のミトコンドリア脳筋症モデル動物として、マウスに同様な変化を生じかどうかを検討する。

D. 結果と考察

- (1) 自然に改善する乳児良性型チトクローム c 酸化酵素欠損症の培養細胞株を確立し（後藤）、また、血液 1 ml から得たミトコンドリア分画を培養細胞に導入する方法を確立した（林）。
- (2) 新鮮で純度の高いミトコンドリア分画を得る方法、そのミトコンドリアにエレクトロポレーション法にて DNA を導入する条件、ミトコンドリアをマイクロインジェクションで細胞に戻す方法を確立し、ここでミトコンドリアへの 2 段階 DNA 導入法が実用段階に入った（後藤）。
- (3) 変異 mtDNA の比率を変化させる内因性因子の研究として、異なる変異を有する細胞株を融合させる実験を行い、互いに他の障害を補いあう（代償作用）ことが明らかになった（林）。また外因性因子のひとつとして、培養液中に

ゲルマニウムを加え検討したが、明らかな変化は認めなかった（埜中）。

- (4) ゲルマニウム中毒によるミトコンドリア脳筋症モデル動物として、ラットの系は確立していたが、同様の中毒実験をマウスに対して行った。しかしマウスでは、ミトコンドリア機能異常の指標であるチトクローム c 酸化酵素活性低下を示す筋線維の出現が認められなかった（埜中）。

E. 結論

変異 mtDNA / 正常 mtDNA の比率を変化させて、細胞を正常な機能に保ち（予防）、または機能を回復させる（治療）ことをめざして進めている今回の研究において、この 1 年の実験結果は次年度につながる成果となった。とくに、個々の細胞レベルでの DNA、RNA、蛋白の研究が緊急かつ重要なものであることがますます明らかになり、次年

度においては全体計画をふまえつつ、この点に力を集中する。また、世界ではじめて欠失 mtDNA を有するマウスを作製でき（未発表）、その臨床所見を詳細に調べるとともに、治療研究に応用してゆく。

F. 発表

1. 論文発表

Daisaku Takai, Kotoyo Isobe, and Jun-Ichi Hayashi. (1999) Transcomplementation between different types of respiration-deficient mitochondrial with different pathogenic mutant mitochondrial DNAs. J. Biol. Chem., in press.

2. 学会発表

Jun-Ichi Hayashi. ゴードンリーチ・カンファレンスでの招待講演、1998. 9. 16. レ・ディアブルレ、スイス

ミトコンドリア脳筋症の発症予防と治療法開発の研究

主任研究者 後藤雄一 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨

細胞内のミトコンドリアに含まれる mtDNA に変化を起こさせるために、ミトコンドリアへの 2 段階 DNA 導入法を試みた。フィルターリングによる迅速な（1 時間以内）のミトコンドリア分画の採取、そのミトコンドリアへのエレクトロポレーション法による DNA の導入、最後にミトコンドリア分画の細胞へのマイクロインジェクションなど、基本的な操作の条件は確定した。この方法は、今後の mtDNA の動態、その発現、複製などの研究に応用可能であり、変異 mtDNA の量を操作する今回の研究に大いに寄与するものと期待される。

A. 研究目的

変異ミトコンドリア DNA (mtDNA) の比率の変化を操作する研究を行う際に、外部から任意の DNA をミトコンドリア内に導入できる方法を得ておくと、実験の応用性が格段と向上する。また、変異 mtDNA をもつミトコンドリアを獲得しておく、受精卵に導入することでモデル動物の作製が可能となる。そのような目的で、効率的なミトコンドリアへの DNA 導入法を確立するために、2 段階導入法を検討した。

B. 研究方法

まず前段階として、培養細胞からミトコンドリア分画を取り出し、第 1 段階として DNA をミトコンドリアへ導入、第 2 段階としてミトコンドリアを細胞に戻す方法（2 段階導入法）を研究した。

前段階では、培養細胞系として HeLa 細胞を用い、従来から行われている遠心分画法で得られたミトコンドリア分画をフィルターリングした。この行程は 1 時間以内で終了した。この分画を電子顕微鏡で形態を観察するとともに、Dnase 処理をした分画と処理しない分画を用いて、核成分の残りぐあいをサザン法で検討した。プローブは、mtDNA の部分プローブと核 DNA 上に存在するリボソーム RNA をコードする領域を認識するプローブを用いた。

第 1 段階の、ミトコンドリア分画に外から DNA を導入する方法としてエレクトロポレーションを用いた。導入する DNA としては、4kb の plasmid DNA を用い、導入の確認はサザン法を用いた。エレクトロポレーションを行ったミトコンドリア分画と plasmid DNA との混合液は、Dnase 処理を行ってミトコンドリア外に存在する DNA を除いてから DNA を抽出した。また、エレクトロポレーション前後のミトコンドリア膜を電子顕微鏡で観察した。

第 2 段階のミトコンドリアを細胞に戻す方法として、マイクロインジェクション法を用いた。まず前段階の方法で得られたミトコンドリア分画の浮遊液をそのままミトコンドリア DNA を欠く細胞（ローゼロ細胞）にインジェクションし、その細胞が生存するか、ミトコンドリア機能が回復するかを、cytochrome c oxidase 染色で確認した。

C. 研究結果

前段階で得られたミトコンドリア分画を、電子顕微鏡で観察すると、核の成分や他の細胞分画が比較的少ないサンプルが得られていることが判明した。また、内膜のクリスタも良く保たれたミトコンドリアが多数存在した。この分画を Dnase 処理したものでは、サザン法で核のプローブで反応するものがなく、きわめて純度の高いミトコンドリア分画が得られていることが証明できた。

次いで、第 1 段階でエレクトロポレーションを行ったあと、plasmid DNA は確実に導入されていることをサザン法で確認した。また、エレクトロポレーション前後のミトコンドリア膜も、電子顕微鏡上、特に相違を認めなかった。

第 2 段階の実験では、マイクロインジェクション法で、細胞を破壊せずにミトコンドリアを含む液を注入でき、cytochrome c oxidase 染色で、戻したミトコンドリアが活性をもって細胞内に存在していることを確認した。

D. 考察

変異 mtDNA の動態を実験的に捉えてゆくためと任意の変異 mtDNA をもつ細胞を得るために、確実にまた効率的に DNA をミトコンドリア内に導入するシステムが必要と考え、2 段階 DNA 導入法を検討した。

新鮮で膜が破壊されていないミトコンドリア分

画を得るために、従来の遠心分画法に変更を加えて、フィルターによる処理を採用した。その原理は、直径1~2ミクロンのミトコンドリアをフィルターの穴から通し、短時間で核のコンタミのないミトコンドリア分画を得ることである。今回の実験により、この操作は1時間弱で終了すること、DNase 処理に対する耐性や電子顕微鏡による形態学的なミトコンドリア膜の安定性などが確認できた。

ミトコンドリア分画に対する外部からの DNA 導入の実験では、約4 kb の plasmid DNA が確実にエレクトロポレーションで入ることがサザン法で確認できた。しかし、mtDNA は16.6 kb であり、その大きさでは導入できないこと (data not shown)、導入した DNA の量が個々のミトコンドリアごとではどうなっているのか、など実験的に解明しなければならないことが多い。また、導入した DNA が実際に転写、翻訳されるのか、また複製は可能かなど、ドナーミトコンドリアを細胞に戻した上での、確認実験が必要である。

ミトコンドリアを細胞に戻す方法として、マイクロインジェクション法を採用した。その利点は、ミトコンドリアを戻された細胞の挙動を観察しやすいためである。これまでの研究では、cytochrome c oxidase 活性を有する細胞 (HeLa 細胞) からとった

分画を、cytochrome c oxidase 活性のない細胞 (ローゼロ細胞) に戻す実験で、マイクロインジェクション後、1週間、1ヶ月後でも活性を有する細胞を組織化学的に証明できたのみである。今後は、

電子顕微鏡的な確認、分子生物学的な確認作業を行う予定である。また、同時に、マイクロインジェクションを受けた細胞が増殖してゆく過程、またはアポトーシスで消滅してゆく過程を追求する。

以上のように、今回の実験であきらかになったことは、内在する mtDNA、外部から導入した DNA、それらからできる RNA や蛋白の発現状態などを、個々の細胞レベルで調べることが不可欠であるということである。個々の細胞レベルでの DNA、RNA の状態を定量的 DNA/RNA 検出装置 (リリースで貸与された) や in situ hybridisation 法で、蛋白の発現や活性の確認を免疫組織化学や電子顕微鏡での観察で行ってゆく。

E. 結論

今回の2段階導入法の実験結果により、今後の mtDNA の動態、発現、複製に関する研究に広く応用できると予想される。また、この実験系をマウスの系に変えることで、モデルマウスの作製が現実のものとなる。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

ミトコンドリア脳筋症の発症予防と治療法開発の研究

分担研究者 林 純一 筑波大学・生物科学系

研究要旨：

ミトコンドリア脳筋症患者培養細胞株の樹立と変異 mtDNA の比率の変動についての研究に関して以下の結果が得られた。

- 1：核のバックグラウンドを共通に持ち、様々な疾患の原因となり得る病原性突然変異 mtDNA を持つ細胞バンクを利用し、全く異なる病原性が証明されている欠失突然変異 mtDNA と点突然変異 mtDNA を同一細胞に共存させたところ、両者に相互作用があることが証明された。このことは mtDNA に様々な突然変異が蓄積してもミトコンドリアの呼吸機能にほとんど影響を与えないという我々の最近の発見をよく説明できる。
- 2：ヒトで病原性を持つことが明らかになった mtDNA 突然変異と同等の Maus 病原性突然変異 mtDNA を多量に持つ培養細胞の樹立に成功した。現在この細胞を脱核し細胞質体を Maus 受精卵や ES 細胞に細胞融合法で導入することを検討中である。

A. 研究目的

- 1：mtDNA 欠損 HeLa 細胞に様々な突然変異を持つ患者由来の mtDNA を導入した細胞株を分離する事により、核のバックグラウンドを共通に持ち、様々な疾患の原因となり得る病原性突然変異 mtDNA を持つ細胞のバンクを樹立する。このことによって異なる突然変異がどのようにして異なる臨床症状を生み出すのか、それが子孫にどのように伝達されるのかを解明することが可能になる。
- 2：病原性を持つことが明らかになった mtDNA 突然変異と同等の突然変異を持つ Maus mtDNA を細胞に導入することにより、いまだに世界で成功のない mtDNA ノックアウト Maus を樹立するための基礎とする。

B. 研究方法

- 1：従来は、患者の線維芽細胞から患者由来の mtDNA を mtDNA 欠損 HeLa 細胞に導入していたが、我々は最近末梢血 1 ml を用いればよい方法を確立できたことから、様々な患者や健常者にこの方法を応用し細胞バンクの充実が可能になった。
- 2：最近樹立した Maus の mtDNA 欠損細胞に、老化した Maus の非分裂組織である脳のマイトコンドリアを導入し分裂を繰り返す事により、Maus 病原性突然変異 mtDNA を多量に持つ培養細胞を樹立する。最終的にはこのミトコンドリアを Maus 受精卵に細胞融合法を用いて導入し、mtDNA ノックアウト Maus の樹立を目指す。

C. 研究結果

- 1：上記の細胞バンクを利用し、全く異なる病原性が証明されている欠失突然変異 mtDNA と点突然変異 mtDNA を同一細胞に共存させたところ、両者に相互作用があることが証明された (Takai, D., Hayashi, J.-I., J. Biol. Chem. 1999, in press)。このことは mtDNA に様々な突然変異が蓄積してもミトコンドリアの呼吸機能にほとんど影響を与えないという我々の最近の発見をよく説明できる (Ito, S., Hayashi, J.-I., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2099-2103.)。
- 2：Maus 病原性突然変異 mtDNA を多量に持つ培養細胞の樹立に成功した。現在この細胞を脱核し細胞質体を Maus 受精卵や ES 細胞に細胞融合法で導入することを検討中である。

D. 考察と E. 結論

異なった病原性を持つ突然変異 mtDNA 間に相互作用があることは臨床的にも基礎学問としても極めて重要な発見である。何故なら、エネルギー要求が高く、非分裂組織である脳に老化に伴って様々な突然変異 mtDNA が蓄積してもこれらの間に相互作用が存在すると直ちにエネルギー欠損にならないことが推察できるからである。

従って単一突然変異 mtDNA 分子の蓄積が問題となる。現在このような Maus 病原性突然変異 mtDNA を多量に持つ培養細胞の樹立に成功しており、この変異を Maus の受精卵などに導入することによる疾患モデル Maus の樹立を目指しているところである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroshi Shitara, Jun-Ichi Hayashi, Sumiyo Takahama, Hideki Kaneda, and Hiromichi Yonekawa. (1998) *Genetics* 148:851-857.
 - 2) Kotoyo Isobe, Sayaka Ito, Hideka Hosaka, Yukio Iwamura, Hiroshi Kondo, Yasuo Kagawa, and Jun-Ichi Hayashi. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:4601-4606.
 - 3) Noboru Nakamichi, Douglas Rhoads, Jun-Ichi Hayashi, Yasuo Kagawa, Toshiharu Matsumura. (1998) *J. Biochem.* 123:392-398.
 - 4) Sayaka Ito, Kimiko Inoue, Nami Yanagisawa, Motohisa Kaneko, and Jun-Ichi Hayashi. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:432-435.
 - 5) Takaki Hayakawa, Mitsuhiko Noda, Kazuki Yasuda, Hiroshi Yorifuji, Shigeki Taniguchi, Ichitomo Miwa, Hiroshi Sakura, Yasuo Terauchi, Jun-ichi Hayashi, Geoffrey W.G. Sharp, Yasunori Kanazawa, Yasuo Akanuma, Yoshio Yazaki, and Takashi Kadowaki (1998) *J. Biol. Chem.* 273:20300-20307.
 - 6) Takehiro Yasukawa, Tsutomu Suzuki, Takuya Ueda, Jun-ichi Hayashi, Sigeo Ohta, and Kimitsuna Watanabe. (1998) *Nucleic Acids Symposium Series* 39:257-258.
 - 7) 副島 亜紀、林 純一 (1998) *インスリン分泌におけるミトコンドリア DNA の役割. 分子糖尿病学の進歩 -基礎から臨床まで-* (金原出版) pp24-32
 - 8) Yasutomo Sakai, Yukio Iwamura, Jun-Ichi Hayashi, Nao Yamamoto, Norio Ohkoshi, and Hiroshi Nagata. (1999) *Muscle Nerv* 22:258-261.
 - 9) Sayaka Ito, Shigeo Ohta, Kiyomi Nishimaki, Yasuo Kagawa, Rika Miyazaki, Shin-ya Kuno, Yasuko Komatsuzaki, Hidehiro Mizusawa, and Jun-Ichi Hayashi. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2099-2103.
 - 10) Daisaku Takai, Kotoyo Isobe, and Jun-Ichi Hayashi. (1999) *J. Biol. Chem.*, in press.
 - 11) Rumiko Matsuoka, Michiko Furutani, Jun-Ichi Hayashi, Kotoyo Isobe, Kaoru Akimoto, Toshimitsu Shibata, Shin-ichiro Imamura, Mariko Tatsuguchi, Yoshiyuki Furutani, Atsuyoshi Takao, Satoshi Ohnishi, Hiroshi Kasanuki, and Kazuo Momma. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
 - 12) 磯部ことよ、林 純一 (1999) 印刷中
- ### 2. 学会発表
- 1) ゴードンリサーチカンファレンス (レ・ディアブルレ、スイス) 招待講演
 - 2) 日本生化学会 一般講演 6 題
 - 3) 日本-イタリア 合同セミナー (バリ、イタリア) 招待講演

G. 知的所有権の取得状況 特になし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

ミトコンドリア脳筋症の発症予防と治療法開発の研究

分担研究者 埜中征哉 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨

ラットにミトコンドリア脳筋症と同様な病理変化を起こす濃度（0.15%）のゲルマニウムを含む飼料を用いて、マウスに同様な病変が起こるかどうかを検討した。結果は、投与8週までに死亡し、骨格筋にミトコンドリア異常は認めなかった。ついで、0.05%の飼料を用いた実験で、生後14週までのマウスを検討したところ、骨格筋の中心部にミトコンドリアが存在しないコア構造が出現したものの、cytochrome c oxidase 活性の欠損した筋線維の出現は認めなかった。また、ラット骨格筋由来の培養細胞にゲルマニウムを投与した実験では、cytochrome c oxidase 活性の低下は再現できなかった。

A. 研究目的

Higuchi ら、Wu らにより、ラットにゲルマニウムを投与することによって、骨格筋にミトコンドリア異常を呈することが病理、組織化学、生化学的に証明されているがその機序については明らかではない。今回、マウスにゲルマニウムを投与することで、ミトコンドリア異常が起こるかどうかを調べ、ミトコンドリア病のモデル動物として有用性について検討した。また、培養細胞に対してのゲルマニウムの効果を検討した。

B. 研究方法

使用するマウスは C57BL/6J のオスで生後4週のものを使用した。30匹のマウスをゲルマニウム投与群、非投与群の2群にわけ、投与群には酸化ゲルマニウムを含有した食事を与えた。非投与群には酸化ゲルマニウムを含有していない同じ内容の食事を与えた。体重は週1回測定した。2週毎にそれぞれの群3匹ずつを頸椎脱臼した直後に、病理、組織化学用に前頸骨筋、長指伸筋、ヒラメ筋、生化学用に大腿直筋を採取した。

組織化学的検討では Gomori トリクローム変法, succinic dehydrogenase(SDH), NADH-tetrazolium reductase(NADH-TR), cytochrome c oxidase (CCO) 各染色を通常の方法を用いて施行した。

呼吸鎖電子伝達系酵素活性は、まず新鮮筋より定法を用いてミトコンドリア分画を採取し、NCCR(NADH-cytochrome C-reductase: complex

I-III), SCCR(SDH-cytochrome c-reductase: complex II-III), CCO(complex IV)活性を測定した。

投与する酸化ゲルマニウムの含有濃度を0.15%として実験を開始したところ、投与開始後2-3週頃よりゲルマニウム投与群に不活発さが目立つようになり、投与開始8週までにすべて死亡した。骨格筋の組織化学的検査ではミトコンドリア異常は認められず、ミトコンドリア障害以外の原因で死亡した可能性が高いと考えられたため、GeO₂の濃度を酸化ゲルマニウムの含有濃度を0.05%に減らして再度検討した。

C. 研究結果

観察期間中、投与群、非投与群の間で体重の相違は認められなかった。組織化学的検査では、ヒトのミトコンドリア病でしばしばみられる ragged-red fiber は認められなかったものの、投与開始後12, 14週の投与群において、コア構造を認める線維が散在しており、特に前頸骨筋で多く約10%の線維で認められた。その部位はヘマトキシリンエオジン、Gomori トリクローム変法では赤くみえるはずのミトコンドリアがなく、酸化酵素染色である succinic dehydrogenase (SDH), NADH-tetrazolium reductase(NADH-TR), cytochrome c oxidase(CCO)それぞれで、コア構造の部位は活性がみられなかった。これらのコア構造は、非投与群では全く認められなかった。

電子伝達系酵素活性は投与開始後12, 14週の検体について施行した。NCCR; 12週: 非投与群 222±36、投与群 148±39、14週:

非投与群 283±85、投与群 161±26、SCCR；
1 2 週：非投与群 389±128、投与群 247±60、
1 4 週：非投与群 308±86、投与群 332±39、
CCO；1 2 週：非投与群 435±50、投与群 367
±40、1 4 週：非投与群 443±92、投与群 433
±77 (単位は nmol/min/mg protein) で有意の
活性低下はみられなかった。

D. 考察

組織化学の検討で、ゲルマニウム投与でコア構造を呈することが明らかになり、その部位のミトコンドリアの減少を反映しているものと思われた。この結果を確認するために現在電子顕微鏡での検討を施行中である。電子伝達系酵素活性で投与群、非投与群の間で差がなかったのはミトコンドリア障害を呈している線維が少なかったため全体の活性に影響しなかったためと思われる。ラットでの実験では、ragged-red fiber

が出現し、電子伝達系酵素活性で NCCR, CCO 活性は低下しており、今回とは異なる結果である。この違いの原因は不明であるが、種の違い、ゲルマニウム投与量、投与期間 (マウスはより長期投与が必要なかもしれない) などによるものと思われる。

E. 結論

マウスにおいてもゲルマニウム投与によるミトコンドリア障害が起こることが明らかとなった。しかし、ragged-red fiber が出現せず、電子伝達系酵素活性の低下もなかったことより、通常のヒトのミトコンドリア病でのミトコンドリア障害とは機序が異なる可能性もあり、モデル動物として適当かどうかは、今後投与期間の延長などの再検討により判断すべきものと考えられた。