

19990217

総括研究報告書 (2頁)

分担研究報告書 (6頁)

平成11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)

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、及び mtDNA 量の新しい測定法の開発 (4) 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て、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。核 DNA に対する mtDNA 量の相対量、すなわち一細胞における mtDNA 絶対量を測定する新しい方法を開発する。
- (4) モデル動物を用いた病態・治療研究を行う。

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、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、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 TaqTan PCR 法を用いて、核 DNA 対する mtDNA 量を測定する方法をあたりに開発した(埜中)。
- (4) 欠失 mtDNA を有するマウスを作製し、その骨格病理等を検討した(林、後藤、埜中)。現在 Nature Genetics に投稿中である。

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2年間の成果は最終年度の研究につながる成果となった。とくに、欠失 mtDNA マウスの成功は、病態研究、治療研究に応用できる。また、2段階 DNA 導入法による任意な変異導入が可能になれば、さらに新しいモデル動物の作製が可能になる。

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

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 導入法を試みており、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、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による方法が確立した。問題は、導入された細胞の選択とミトコンドリア内でのみ発現するベクターの構築である。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と、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 PCR 法とサザン法を用いた。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 (COX) 染色で光顕と電顕レベルで検討した。

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 処理したものは、サザン法で核のプロープ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と PCR 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、COX 染色では、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みた。また電顕レベルの検討でも mtDNA を欠く細胞（COX 染色で染まらず、形態上も円形化している）に導入された HeLa 細胞由来ミトコンドリア分画が COX 活性をもち、形態上も正常化している細胞を確認した。

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。

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ぬことが多い。

また、導入した DNA が実際に転写、翻訳されるのかを確認するために、導入に用いる plasmid は、プロモーターとしてミトコンドリア DNA の LSP (L-strand promoter) を用い、さらにコドンミトコンドリア用に改変した GFP 遺伝子を組み込んだものであった。しかし、GFP のシグナルは、検出できず、また mRNA レベルでの確認もできていない。したがって、さらにミトコンドリア内発現ベクターは改変の作業が必要である。

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、ミトコンドリアに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、COX 活性を有する細胞 (HeLa 細胞) からとった分画を、COX 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した。しかも、電子顕微鏡的に導入されたミトコンドリアが COX 活性をもち、形態学的にも正常と同様な状態のものが確認できた。

以上のように、本年度の実験であきらかになったことは、ミトコンドリアを導入し機能的にも正常化した細胞を選択し増殖させてゆく方法の必要性である。そのために、選択マーカーとして neo 耐性 plasmid の共導入やピルビン酸の必要性による選択等を試みる。

また、外部から導入する DNA として、アンチセンスオリゴ等の他のものを試み、任意の部位の変異を惹起させる研究を行う。

さらに、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も重要である。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

2段階導入法は実用段階に迫った。来年度は導入細胞の選択法の確立に全力を注ぐとともに、この方法によって今後の mtDNA の動態、発現、複製に関する研究が一段と進むと予想される。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 後藤雄一、荒畑喜一 (1999). 日本内科学会雑誌 88: 787-792.
- 2) 後藤雄一. (1999) Clinical Neuroscience 17: 1233-1236.
- 3) Yasuo Kubota, Toshiya Ishii, Hiroshi Sugihara, Yu-ichi Goto, Masako Mizoguchi. (1999) J Am Acad Dermatol 41: 469-473.
- 4) Tishiko Nagashima, Masamitsu Mori, Katsuyuki Katayama, Mitsuru Nunomura, Hiroshi Nishihara, Hiroaki Hiraga, Shinya Tanaka, Yu-ichi Goto, Kazuo Nagashima. (1999) Acta Neuropathol 97:416-422.
- 5) Yu-ichi Goto. (2000) Neuroscience News 3:46-50.

2. 学会発表

- 1) Third Japanese-French Workshop on Muscular Dystrophies = Pathogenesis and management, 1999.5.29, Tokyo, Japan.
- 2) COE International Symposium. 1999.9.27, Tokyo, Japan.
- 3) 4th International Congress of the World Muscle Society. 1999.10.16. Antalya, Turkey.

G. 知的所有権の取得状況

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 林 純一 筑波大学・生物科学系

研究要旨：

ごく最近、ミトコンドリア遺伝子疾患の原因となるミトコンドリア DNA (mtDNA) の突然変異と全く同じ突然変異が、実際にはごく少量であるがほとんど全ての老化したヒトの組織で発見されたばかりでなく、かなり多くの糖尿病患者やアルツハイマー病患者の組織の mtDNA にも存在することが相次いで報告された。これによって mtDNA の突然変異とミトコンドリア遺伝子疾患、老化、神経変性疾患、糖尿病との因果関係はにわかに大きな注目を集めるようになった。しかし、mtDNA の突然変異が本当に老化などの原因であることが直接証明されたわけではない。本プロジェクトでは、我々が樹立したヒト mtDNA 欠損細胞を用いた mtDNA 導入系を活用することにより、ミトコンドリア遺伝子疾患を引き起こしたものと全く同じ mtDNA 突然変異が、老化や糖尿病などの多様な症状を引き起こすかどうかを調べ、両者の因果関係を直接立証することを試みる。一方、ごく最近樹立したマウス mtDNA 欠損細胞を利用することにより、ヒトと同じ mtDNA 突然変異を持つミトコンドリアノックアウトマウスの作製を計画している。これらを病態モデル動物として利用することによって、ミトコンドリア遺伝子疾患、老化、糖尿病に限らず、mtDNA 突然変異が起こす多様な臨床症状に対する有効な治療方法の手がかりを得る事が大いに期待できる。

A. 研究目的

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ことにより、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。さらに、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マウス 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 ノックアウトマウスを樹立する。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。

B. 研究方法

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 1ml 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。我々が最近樹立したマウスの mtDNA 欠損細胞に、老化したマウスの非分裂組織である脳のミトコンドリアを導入し

分裂を繰り返す事により、マウス病原性突然変異 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マウス受精卵に細胞融合法を用いて目的とする変異 mtDNA を有するマウスの樹立を目指す。

C. 研究結果、D. 考察、E. 結論

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 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. et al. J. Biol. Chem. 1999)。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に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. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999)。

2) マウス病原性突然変異 mtDNA を多量に持つ培養細胞の樹立と、この細胞を脱核し細胞質体をマウス受精卵に導入することに成功しその結果を投稿中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Daisaku Yamaoka, et al. (2000) Genetics, in press.
- 2) Yasumoto Sasaki, et al. (1999) Muscle Nerv 22: 258-261.
- 3) Sayaka Ito, et al. (1999) Proc. Natil. Acad. Sci. USA 96: 2099-2103.
- 4) Daisaku Takai, et. al. (1999) j. Biol. Chem. 274: 11199-11202.
- 5) Rumiko Matsuoka, et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 257: 228-233.
- 6) 磯辺ことよ、林 純一(1999) 細胞、31: 183-186.

2. 学会発表 (招待講演のみ)

- 1) COE International Symposium on mitochondrial encephalomyopathy -from pathophysiology to treatment-. 1999.9.27, Tokyo, Japan
- 2) 第 72 回日本生化学会シンポジウム. 1999.10.8, 横浜
- 3) 第 22 回日本分子生物学会シンポジウム. 1999.12. 福岡

G. 知的所有権の取得状況

特許申請中

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

変異型 mtDNA と正常型 mtDNA との比率を変化させる要因を研究し、それを操作させる方法を開発することを目指している本研究において、単純な変異型と正常型との比率だけでなく、核 DNA 量に対する全 mtDNA 量、すなわち、一細胞内の mtDNA 絶対量も考慮に入れることは重要である。われわれは、新しく TaqMan 法による測定法を開発した。この方法により、細胞数をカウントできない組織を用いても、一細胞ごとの mtDNA 量を推計でき、また mtDNA 絶対量の細胞に与える効果についても解析する j 方法を得た。また、この方法は現在研究中の 2 段階 DNA 導入法の評価にも応用できる。

A. 研究目的

ミトコンドリア脳筋症の多くはミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) 異常により引き起こされることが明らかとなってきた。その異常は大きく、量的異常と質的異常に分類できる。量的異常とは、通常 1 細胞に数千個存在している mtDNA のコピー数に変動することを意味する。質的異常には構造異常としての欠失や重複、配列異常としての点変異などがあるが、質的異常により引き起こされるミトコンドリア脳筋症では、変異 mtDNA が正常 mtDNA と種々の割合で共存するヘテロプラスミーの状態が普通である。この場合には、変異 mtDNA と正常 mtDNA の量的評価が必要になる。今回の研究目標である正常型と変異型の比率を変化させる要因の研究を行う際に、絶対量の減少や増加が細胞に与える影響を考慮することは、その基盤情報として不可欠である。しかし、その測定法には大きな問題があった。

従来 mtDNA 量の測定は、サザン法を用いて行われてきた。細胞培養などで細胞数が既知の場合と異なり、組織を用いる場合は総細胞数が不明のため、核 DNA 量に対する mtDNA 量の相対比を用いざるを得ない。一般的には核 DNA にコードされているリボソーム DNA をコードする DNA コピー数と mtDNA コピー数の相対比を求める形で解析が行われてきた。しかしサザン法では、一回の解析に用いる DNA はマイクログラムのオーダーであり、現実に検体量が十分に得られないことの多い患者検体や個々の細胞での解析を行う場合には、スクリーニング

は困難であった。今回我々は TaqMan-PCR 法を用いた、mtDNA の簡便な定量法を開発した。

B. 研究方法

当施設で最近 3 年間に登録された症例のうち、ミトコンドリア病が疑われた 211 例の生検筋検体より DNA を抽出し、解析を行った。TaqMan PCR 法により核 DNA 及び mtDNA 配列を増幅し、それぞれのコピー数を検出した後、相対比を求めることで mtDNA 相対量比を得た。

C. 研究結果

TaqMan PCR 法では、鋳型 DNA が 10^4 から 10^8 コピーの間で高い定量性をもって増幅された。211 例中 5 例では、mtDNA 相対量は平均の 15% 以下に低下しており、いずれも高乳酸血症や電子伝達系酵素活性低下をもつ、乳児期発症の症例であった。

D. 考察

TaqMan PCR 法を用いた mtDNA の定量法は、簡便で迅速であり、サザン法で認められるプローブの比活性の問題もない。臨床応用としての mtDNA 欠乏症候群患者の検出だけでなく、筋以外の他の臓器、組織の mtDNA 量の測定も可能になり、組織特異性の研究にも応用できる。

もっともこの方法が活用できるのは、今回の研究の目指している正常型と変異型 mtDNA の比率を変化させる操作法の開発において、単純な比率のみのパラメーターに加えて、核 DNA に対する相対量、すなわち一細胞内の mtDNA

絶対量という新たなパラメーターを加えられることである。これにより、mtDNA のもつ詳細な細胞生物学的作用を解析できるとともに、ミトコンドリア脳筋症の遺伝子治療を目指した2段階 DNA 導入法の評価にも活用できる。

また、この方法の感度上げることで、一細胞での mtDNA 量の測定が可能になる可能性がある。今後は、その点を研究する。

E. 結論

この新しい mtDNA 量の測定法の開発で、変異 mtDNA の細胞に与える量的影響を研究でき、変異 mtDNA 比率または量を変化させる要因を絞り込むことが可能になるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Michiko Makino, Satoshi Horai, Yu-ichi Goto, Ikuya Nonaka. (2000) J Hum Genet 45:69-75.

2. 学会発表

- 1) Third Japanese-French Workshop on Muscular Dystrophies = Pathogenesis and management, 1999.5.29, Tokyo, Japan.
- 2) COE International Symposium. 1999.9.27, Tokyo, Japan.

G. 知的所有権の取得状況

なし