

図2 臨床症状の把握から診断までの流れ

病気の状態の患者(個体)は臨床症状として多様な症状を呈する。たとえば、脳卒中様症状、精神症状、てんかんなどは脳(臓器)や神経(組織)のレベルの障害を現しているし、心筋症や心伝導障害は心臓(臓器)や刺激伝導系(組織)の障害を現している。しかし、そのような臨床症状を示す基盤として本当にミトコンドリア異常があるのかどうかを確かめるには、細胞以下のレベルでの確認が必要であり、その場合の検査手段として生化学、病理学、分子遺伝学の3つの方法を用いるのが基本である。DNA レベルとしては、ミトコンドリアDNA(mtDNA)もしくは核DNA上の遺伝子の変異が存在し、ミトコンドリアレベルでは主に形態異常として、そして細胞レベルでは生化学的機能障害もしくは細胞死としてミトコンドリア異常が捉えられる。

ミトコンドリア病の診断が難しいのは、まず、遺伝子変異がmtDNAの場合、核DNA上の遺伝子の場合、その両方の場合のあることがあげられる。そして、遺伝子変異と病理所見、生化学所見が1対1に対応しないことがもう一つの原因である。

臨床症状の把握から診断までの流れ(図2)

その際、各臓器の症状については臓器特異的な検査が必要になることが多い。たとえば、中枢神経症状では脳画像検査、電気生理学的検査などであり、心症状では心電図、心エコー、生化学検査などである。したがって、この段階で他科の医師との連携が必要になることがほとんどである。

ここで、ミトコンドリア病の確定診断に進む前に、多くのミトコンドリア病症例で認められる高乳酸血症(高ピルビン酸血症)を確認しておくことが不可欠である。血中の乳酸値は、食事、運動、採血時の様子などでかなり変動す

るので何度か測定しておく方がよい。また、最大血圧と最小血圧の中間の圧をマンシェットで与えておいて、肘の屈伸運動を行う運動負荷をかけて乳酸/ピルビン酸値を測定する阻血下運動負荷試験は、軽微な骨格筋のミトコンドリア異常をも検出できる方法として使われている。一方、髄液の乳酸/ピルビン酸値は、てんかん発作を繰り返している場合や脳卒中様症状の直後などを除いて、中枢神経系のミトコンドリア機能異常を比較的良好に反映しており有用な検査である。しかし、すべての症例で高乳酸血症(高ピルビン酸血症)を伴うわけでもないため、注意が必要である。

臨床症状と乳酸/ピルビン酸値の検査でミトコンドリア病が疑わしいとされた場合に、次いでミトコンドリア異常を確認する検査を行うことになる。その基本は骨格筋生検であり、方法は病理検査、生化学検査、遺伝子検査である。

主な検査の概要

ミトコンドリア病の確定診断に必要な検査のうち、頻度の高い遺伝子変異の検査はその一部を検査会社で行っているが、病理検査や生化学検査は検査会社では行っていない。病理検査は国立精神・神経医療研究センター、生化学検査は国立精神・神経医療研究センター、埼玉医科大学、千葉こども病院などに依頼することが望ましい。

1. 病理検査

病理学的には、Gomoriトリクローム変法染色やこはく酸脱水素酵素(succinate dehydrogenase:SDH)活性染色やチトクローム酸化酵素(cytochrome c oxidase:COX)活性染色などの各種組織化学的検査を行うとともに、電子顕微鏡的にミトコンドリア形態異常の有無を検査する。ミトコンドリア病のなかでも、代表的なMELAS(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and

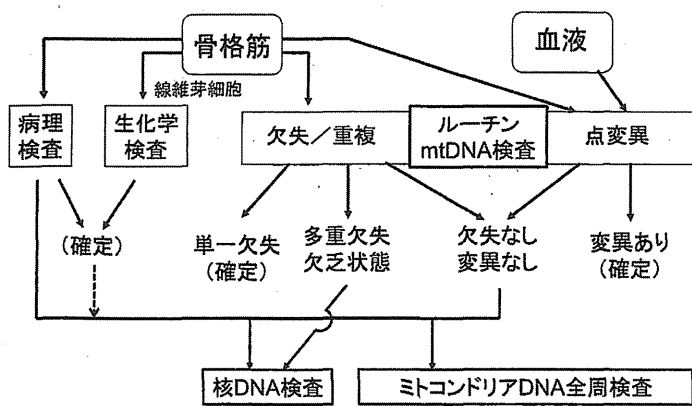


図3 筋生検を主体にした診断プロセス

stroke-like episodes), MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers), 慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (Kearns-Sayre 症候群を含む) の患者の筋では, ragged-red fiber や strongly SDH-reactive blood vessel, COX 活性のない筋細胞 (COX 部分欠損線維) が確認できることがほとんどである。ただし, 骨格筋には明らかな形態異常を確認できず, 後に述べる分子遺伝学的検査に頼らねばならない場合は, 筋生検を必要としないこともある。また, 骨格筋以外の組織・臓器でも, SDH や COX の活性染色や電子顕微鏡検査を試みることは可能であるが, 正常を常にコントロールとしておかないと判断を誤ることがあるので注意を要する。

2. 生化学検査

生化学的検査では, 凍結検体や培養細胞を用いて電子伝達系酵素複合体の活性や量を調べる。正常の何パーセントの酵素活性であるかの判断はできないが, SDH や COX の活性染色で生化学異常を捉えることもできる。ミトコンドリア病を疑って筋生検を行う場合には, 皮膚の採取と同時に, 線維芽細胞や筋芽細胞を樹立しておくことがきわめて重要である。この培養細胞によって詳細な生化学検査が可能になる。また, 病因性が不明な mtDNA 変異や核 DNA 上の遺伝子変異が見つかった場合にも培養細胞があればその対応が可能になることがある。

3. 分子遺伝学的検査

分子遺伝学的には mtDNA 異常と核 DNA 変異を調べる。mtDNA 異常には量的異常と質的異常がある。通常一細胞内に数千コピー存在する mtDNA の量が減少すると, mtDNA 欠乏 (枯渇) 症候群と称される病気が発症する。一方, mtDNA の質的異常として, 欠失・重複などの構造異常と点変異がある。核 DNA 変異としては, 酵素複合体を

構成する蛋白, 酵素が集合する際に必要な蛋白, ミトコンドリアへの輸送に関わる蛋白, mtDNA の複製や維持に関わる蛋白などをコードする遺伝子の変異が多数明らかにされ, すでに 100 種類を超えている。現在は, 生化学的な所見を元に遺伝子を選んで検査することを余儀なくされており, そのため原因遺伝子を同定することがたいへん困難な状態である。最近では次世代シーケンサーによる網羅的な核遺伝子検査が研究的に試みられており¹⁾, 近い将来にそれが臨床の現場で応用される日は近いと予想される。

検査・診断の注意点

1. 標準的検査は培養細胞樹立を含めた筋生検検査である (図3)

MELAS や MERRF, Leber 病などの臨床病型に合致する典型例の場合は, 血液での点変異の検査で診断がつく場合がある。しかし, その場合でも, 血液でのルーチン遺伝子検査で陽性所見を認めないことを想定して, 筋生検を念頭に診断手順を考えておくことが必要である。非典型例の場合は罹患臓器の生検と筋生検を考慮すべきである。

2. 慢性進行性外眼筋麻痺がある時は最初から筋生検を考える

慢性進行性外眼筋麻痺症候群の場合にもっとも多いのは mtDNA の欠失である。これは血液では検出しづらく, 特に多重欠失の場合は血液では全く同定できない。したがって, 初めから筋生検を考慮すべきである。

3. 全身の臓器症状を把握する

ミトコンドリア病は多彩な臨床症状を伴うので, 神経・筋以外の臓器の症状の有無を調べるのが肝要である。特に, 心, 腎, 肝, 膵などの主要臓器についての検査は診断時ばかりでなく, 経過観察においても新たな症状の出現に注意しながら, 定期的に全身の検査を行うべきである。

むすび

ミトコンドリア病の確定診断には病理検査, 生化学検査などの専門的な技能が必要である。また遺伝子検査に関しても, 頻度の高い mtDNA 検査で診断がつく例はそれほど多くない。したがって, 診断に際しては専門医療施設に相談すること, 筋生検を行う場合には培養細胞の樹立を含めることが特に重要と考える。

文献

1) Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. Sci Transl Med. 2012; 4: 118ra10.

ミトコンドリア DNA の構造と発現制御

太田 成男 安川 武宏

はじめに

ミトコンドリアには独自の DNA (mtDNA) があって、呼吸鎖酵素複合体のサブユニット遺伝子と ATP 合成酵素のサブユニット遺伝子が存在する。mtDNA の研究がめざましく進んでいるが、従来の概念から抜け出せないでいる場合がよく見受けられる。本稿では、従来の mtDNA の概念の誤解を指摘しながら最新の知見を紹介したい。

ヒトミトコンドリアゲノムの構造とその特徴

ミトコンドリアの中にはミトコンドリア DNA (mtDNA) があり、哺乳類では組織によって異なるが一細胞内にだいたい数百から数千コピー存在する。そこで正常 mtDNA と異常 mtDNA が混在する状態が生じる。常染色体の核遺伝子では、父親由来の遺伝子と母親由来の遺伝子の 2 種類であるが、mtDNA は細胞内に多数存在するので、変異が生じると複数の mtDNA が混在することになる。mtDNA が細胞内で均一な状態をホモプラズミー、異種の mtDNA が混在している状態をヘテロプラズミーという。さらに、核 DNA と異なるのは、環状であり、16.5 キロ塩基対と短いことである。核 DNA ではイントロンが多く、タンパク質をコードする領域は数% 以下であるのに対し、哺乳動物 mtDNA はそのゲノム上にほぼ隙間なく遺伝子をコードしているという遺伝子構成が mtDNA の際立った特徴である。核ゲノムは一見必要のない配列を増加するように進化してきたのに対し、ミトコンドリアゲノムはウイルスゲノムと同様に短くなる方向に進化してきたといえる¹⁾。

具体的には、細胞が活動する上で必要なエネルギーの大半を産生するミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体を構成する重要なサブユニットが 13 種類コードされており、また、これらの遺伝子を発現させるためにミトコンドリア内で働く 22 種類のトランスファー RNA (tRNA)、2 種類のリボソーム RNA (rRNA) がコードされている^{2,3)} (図 1)。

DNA の複製、RNA の合成、タンパク質の合成を司る因

子はすべて核遺伝子にコードされており、ミトコンドリア外で合成され、ミトコンドリア内に移行してはじめて機能をもつに至る。また、13 種類のタンパク質はすべて核遺伝子産物と複合体を形成し、機能をもつことができる。すなわち、ミトコンドリア遺伝子のコードされるタンパク質は単独で機能をもつことはできない。

tRNA 遺伝子が遺伝子間の境界に存在し、全ゲノムを短くすることに貢献している。ATP 合成酵素のサブユニット 8 遺伝子では、1 つの領域が 2 つの遺伝子を重複しており、1 塩基ずつずらして別のアミノ酸をコードしている。

さらに、tRNA の一部や mRNA の一部も RNA が合成されてから、塩基が付加されて機能できるように徹底して短くする方向に進化してきたように思える。

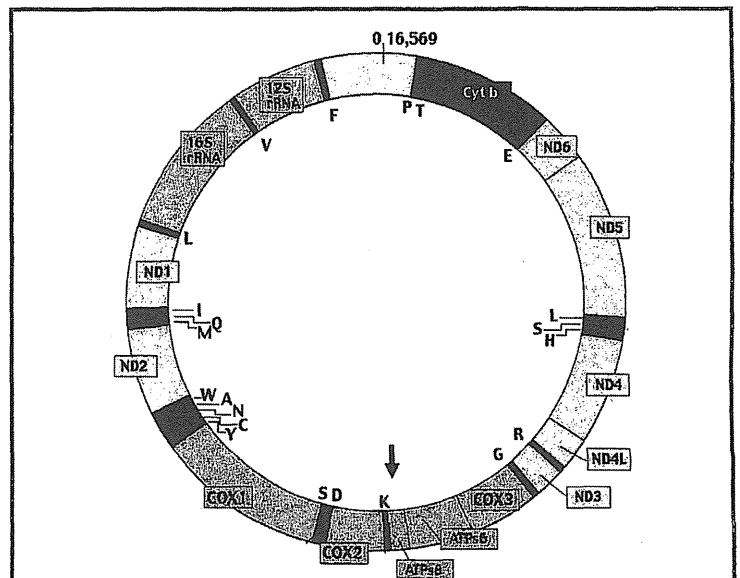


図 1 ミトコンドリアゲノムの構造

12SrRNA, 16SrRNA はリボソーム RNA 遺伝子, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 は呼吸鎖酵素複合体 I のサブユニット遺伝子, Cyt b は複合体 III のサブユニット遺伝子, COX1, COX2, COX3 は複合体 IV のサブユニット遺伝子, ATP6, ATP8 は ATP 合成酵素のサブユニット遺伝子, “FVLIQMWANCYS DKGRH SLETP” はそれぞれのアミノ酸 (一文字表記) に対応する tRNA 遺伝子を示す。

おたしげお 日本医科大学大学院教授/医学研究科加齢科学系
専攻細胞生物学分野

やすかわたけひろ The Wolfson Institute for Biomedical
Research, University College London

ミトコンドリア遺伝子の起源⁴⁾

真核生物が存在しなかった 20 億年前に、真正細菌(バクテリア)が古細菌に入り込んで共生生活を始めたことが、ミトコンドリアと真核生物の由来である。入り込んだ真正細菌の遺伝子は古細菌の遺伝子と一緒に核を形成するようになった。そして、一部の真正細菌の遺伝子は取り残され、現在の mtDNA となった。

以前は、真核生物に真正細菌が入り込んだという説が主流であった。それは、ミトコンドリアが存在しない真核生物が現在も存在することを根拠としていた。しかし、核にミトコンドリア遺伝子の残骸が見つかったので、ミトコンドリアが存在しない真核生物はミトコンドリアが入り込む以前の生物ではなく、ミトコンドリアが失われた真核生物であることが判明した。

ミトコンドリアは真核生物に寄生した生物の名残ではなく、真正細菌と古細菌の合体により新しい生物「真核生物」が生じたと考えるべきである(図 2)。

ミトコンドリア DNA の複製⁵⁾

従来、mtDNA の複製は一方向に合成され、1 本鎖 mtDNA が生じると考えられていたが、現在は、核 DNA と基本的には同じように、複製途上の鎖は本質的に 2 本鎖 DNA として合成される。さらに、複製起点は昔のモデルでいわれたような特定の位置ではなく、cytochrome b(cyt

b), NADH dehydrogenase subunits 5, 6(ND5, ND6)の 3 遺伝子を含んだ約 4 キロ塩基対にまたがった広い領域に分布している。そしてリボヌクレオチドを相当量取り込みながら新生鎖が合成されている。

DNA 複製を担う酵素には、mtDNA ポリメラーゼ γ (mtDNA 複製酵素 γ ; POLG) と Twinkle(helicase; DNA らせん巻き戻し酵素)がある。いずれも核遺伝子にコードされており、この遺伝子の欠損により、mtDNA の多重欠損や mtDNA の欠失(mtDNA の減少)につながる。

POLG の校正機能を低下させると mtDNA に高頻度に変異が生じ、老化のモデル動物が作製される⁶⁾。同時に双極性障害(躁うつ病)のモデルにもなる⁷⁾(図 3)。

ミトコンドリアにおける転写(RNA 合成)とその制御^{2,3)}

mtDNA 上には非コード領域(non-coding region, NCR)の部分を除き、ほぼ隙間なく遺伝子がひしめいており、このため各 RNA が独自の転写プロモーターをもたず、NCR にそれぞれの鎖を転写するためのプロモーターが配置されており(HSP, LSP), 各 RNA は連続した鎖としての RNA として転写された後、特殊な酵素によってそれぞれの RNA へと切断される。LSP(L strand promoter)からは L 鎖が転写されて mtDNA を一周し、1 種類の mRNA と 8 種類の tRNA の前駆体となる。HSP(H strand promoter)は 2 種類存在し、互いに約 50 塩基離れている。一方は H

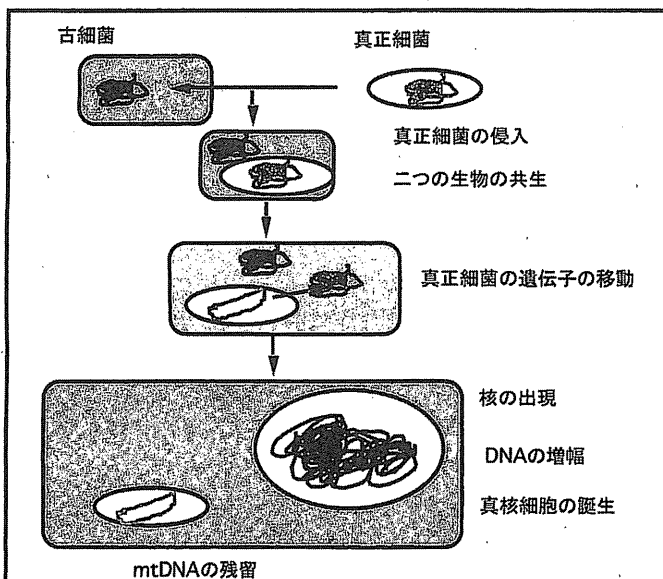


図 2 ミトコンドリア DNA の起源と真核生物の出現
太古の 20 億年前に真正細菌(バクテリア)が古細菌に入り込み、共生を続けた。各々の遺伝子が一カ所に集まり核を形成し、真正細菌はミトコンドリアとなり、核に移行しなかった DNA は mtDNA となった。

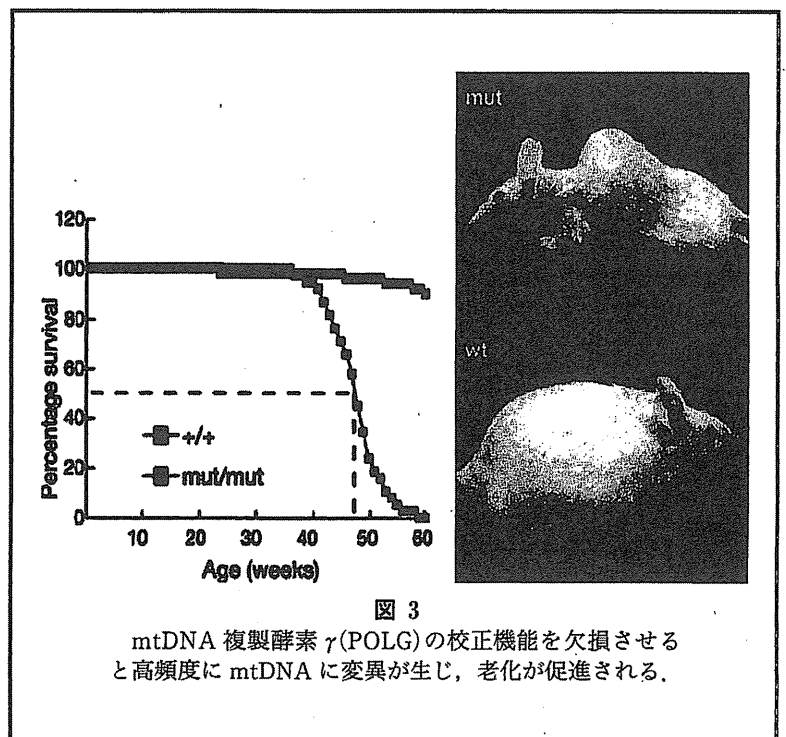


図 3
mtDNA 複製酵素 γ (POLG)の校正機能を欠損させると高頻度に mtDNA に変異が生じ、老化が促進される。

鎖全体を一周して転写し、12種類の mRNA と 14種類の tRNA、そして2種類の rRNA の前駆体となる。もう一方のユニットは高い転写活性をもち、16SrRNA 遺伝子の下流にある tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子上に結合して転写を終結させる因子 mTERF によって終結する。この転写ユニットにより2つの rRNA は効率よく大量に転写される。そして上記の前駆体からそれぞれの RNA が切断されると mRNA はポリ A が付加され、成熟 mRNA となる。tRNA には CCA 末端が付加され、また、tRNA、rRNA には必要な転写後修飾が施され、それぞれの RNA が正しく機能するようになる⁸⁾。

女性ホルモンであるエストロジェンは、ミトコンドリアにおいて転写を制御している。エストロジェンレセプターはミトコンドリアにも存在し、このホルモンのシグナルを受け入れる。そのため、エストロジェンによって呼吸鎖酵素が増加し、ミトコンドリアの活性化を促す⁹⁾。最近では、アルツハイマー病との関連についていくつもの論文が報告されている¹⁰⁾。

ヌクレオイド構造¹¹⁾

ミトコンドリアにはヒストンが存在せず、核遺伝子のようにクロマチン構造をもたず、mtDNA は裸で存在するように思われてきた。しかし、現在はヌクレオイド構造を形成して、多くのタンパク質が結合して mtDNA を保護していることが明らかになった。このヌクレオイド中の主成分は Tfam である。Tfam は、最初 mtDNA の転写制御因子として分離されたが、mtDNA を安定化していることが判明した。Tfam はミトコンドリア量と同じくらい存在し、mtDNA のすべてを覆う量が存在する。Tfam と mtDNA は常にお互いを安定化し、mtDNA が減少すると Tfam も少なくなる。逆に Tfam を増加させると mtDNA も増加する¹²⁾。Kang らはその性質を利用して、Tfam を強制的に増加させることで mtDNA が増加した遺伝子組み換えマウスを作製した。このマウスは加齢による認知機能低下を抑制している¹³⁾。どうやら、mtDNA が増えることによって老化を防ぐことを可能にしそうである。

Tfam にはその他多様な機能があり、mtDNA を保護している(図4)。

ミトコンドリア DNA の修復

ミトコンドリアではエネルギー産生の際に、ある頻度で必然的に活性酸素種を放出する。そのため、mtDNA はヌクレオイド構造により保護されているといっても、活性酸素種によって損傷を受けやすい。

従来は、mtDNA はヒストンがなく、裸であり、修復酵

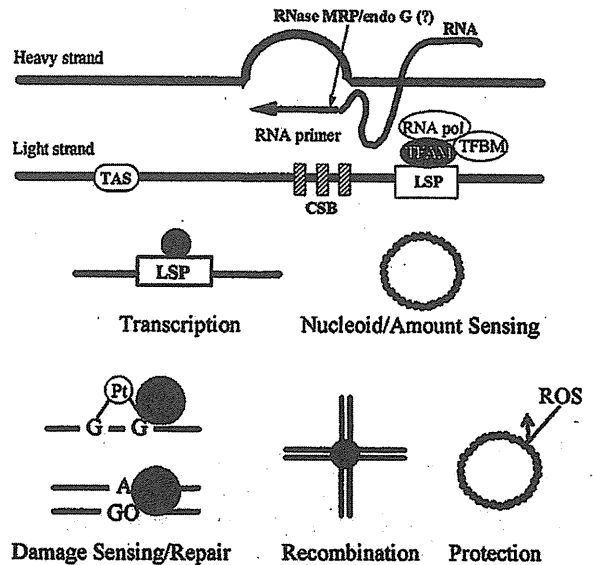


図 4

Tfam は様々な因子と結合し多彩な役割を果たす。Tfam は LSP に結合し転写因子として機能する (transcription)。また、mtDNA に結合しヌクレオイド構造を形成し、mtDNA を安定に保ち mtDNA の量を決定する (Nucleoid/Amount Sensing)。ヌクレオイド構造は ROS から mtDNA を保護する (Protection)。さらに、mtDNA の損傷を識別し修復と再結合に関与する (Damage Sensing/Repair ; Recombination)。

素も存在しないので、変異の頻度が各遺伝子に比べて 20 倍も高いといわれてきたが、ミトコンドリアには多くの種類の修復酵素が存在する。「mtDNA はヌクレオイド構造により保護され、ミトコンドリアは修復酵素に富むにもかかわらず遺伝子変異の頻度が高い」というべきである¹⁴⁾。このことは、活性酸素種がいかに遺伝子に損傷を与えているかを物語っている(図5)。

炎症のシグナルとしてのミトコンドリア DNA

最近、自然免疫とミトコンドリアの関係が注目されている。細胞内では、損傷関連分子パターン (damage-associated molecular pattern, DAMP) や病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) に反応して、炎症性サイトカインを放出する。IL-1 β や IL-16 は、インフラマソームによって炎症性サイトカインが作られる。このインフラマソームの形成にはミトコンドリアから発せられる活性酸素種が必須であることが明らかにされている¹⁵⁾。

mtDNA はミトコンドリアだけで機能するだけではないことが最近になって判明してきた。ここでは、最近のトピックスとして mtDNA と自然免疫の関係を紹介しよう。損傷 mtDNA は損傷ミトコンドリアを特異的に除去するシステム (マイトファジー) により除去されるが、一部の mtDNA

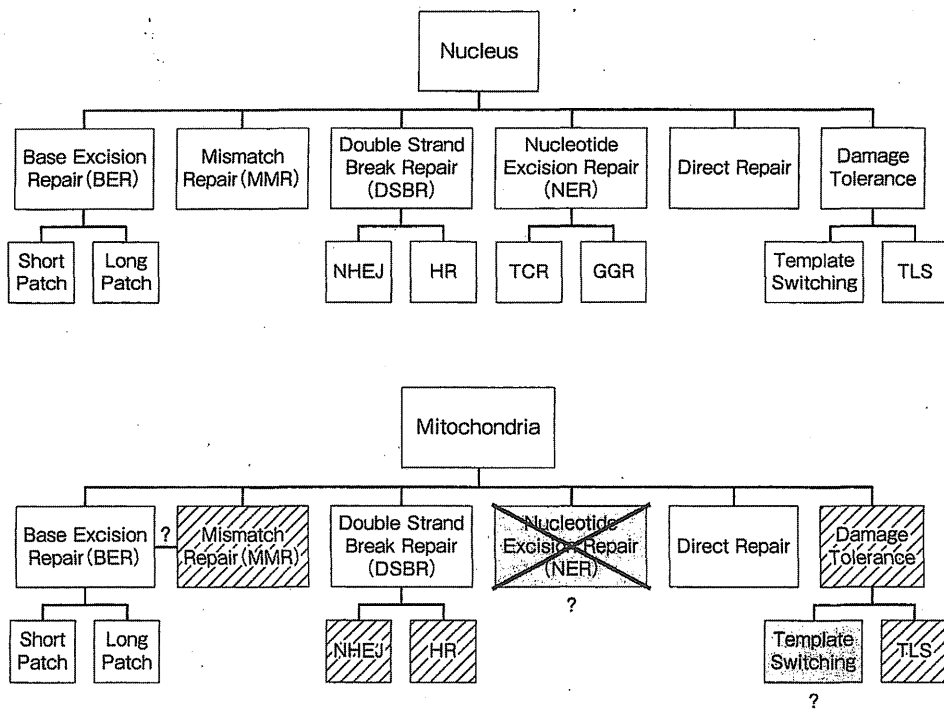


図 5 ミトコンドリア DNA と核 DNA の修復酵素

は逃れて残存する。あるいは、アポトーシスによって細胞が除去される場合にも一部の mtDNA は残存する。mtDNA は核遺伝子とは異なりメチル化が生じず、現在も真正細菌の DNA の性質を保持している。mtDNA は侵入

細菌と同様なシグナルを発揮することによって、自然免疫機構に関与し、生体防御機構に貢献している¹⁶⁾。とくに、酸化した mtDNA が損傷を認識させ、自然免疫のシグナルになる¹⁷⁾。

文献

- 1) Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999 ; 23 : 147.
- 2) Fernández-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol.* 2003 ; 88 : 41-56.
- 3) Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 2007 ; 76 : 679-99.
- 4) Dyall SD, Johnson PJ. Origins of hydrogenosomes and mitochondria : evolution and organelle biogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2000 ; 3 : 404-11.
- 5) Yasukawa T, Yang MY, Jacobs HT, et al. A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell.* 2005 ; 18 : 651-62.
- 6) Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature.* 2004 ; 429 : 417-23.
- 7) Kato T. The role of mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Drug News Perspect.* 2006 ; 19 : 597-602.
- 8) Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, et al. Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J.* 2001 ; 20 : 4794-802.
- 9) Simpkins JW, Yi KD, Yang SH, et al. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Biochim Biophys Acta.* 2010 ; 1800 : 1113-20.
- 10) Long J, He P, Shen Y, et al. New evidence of mitochondrial dysfunction in the female Alzheimer's disease brain : deficiency of estrogen receptor- β . *J Alzheimers Dis.* 2012 ; 30 : 545-58.
- 11) Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochim Biophys Acta.* 2012. [Epub ahead of print]
- 12) Kang D, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA : overview of its multiple roles. *Ann NY Acad Sci.* 2005 ; 1042 : 101-8.
- 13) Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, et al. Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J Neurosci.* 2008 ; 28 : 8624-34.
- 14) Boesch P, Weber-Lotfi F, Ibrahim N, et al. DNA repair in organelles : pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochim Biophys Acta.* 2011 ; 1813 : 186-200.
- 15) Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011 ; 469 : 221-5.
- 16) Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature.* 2012 ; 485 : 251-5.
- 17) Shimada K, Crother TR, Karlin J, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity.* 2012 ; 36 : 401-14.

核移植治療の有用性と問題点

末岡 浩

はじめに

生殖医療の発展は、受精および胚に対する多様な技術と普及をもたらし、とりわけ1980年代以降、体外受精と付帯する生殖補助技術(assisted reproductive technology; ART)の発展は遺伝医学の領域に対しても大きく寄与することになった。生殖は遺伝形質を伝える生物学的行為であり、遺伝病の伝播に対する対策として生殖医療技術が役立つ時代を迎えている。本稿ではミトコンドリア遺伝病への対策として用いられる生殖医療の手法を紹介し、その利点と問題点を解説する。

ミトコンドリア遺伝子の生殖における特徴と疾患対策

ミトコンドリア遺伝子(mtDNA)は、16,569塩基対からなる2本鎖環状DNAで¹⁾、一つのミトコンドリア当たり数コピーの遺伝子がキメラ状に存在するとされ、その数は細胞種によって異なることが知られている。一細胞中にmtDNAは多く存在し、リンパ球では10,000コピー、成熟卵子では100,000コピー以上のmtDNAを有している。これに対し、精子のmtDNA量は少なくとも数十コピー以下であり、母系遺伝の根拠の一つとなっている。mtDNAにはイントロンが存在せず、核蛋白も存在しないことから変異が多く、核DNAの10倍程度変異をおこしやすい。mtDNA異常を持つミトコンドリア病は、正常型と変異型のmtDNAが共存(ヘテロプラスミー)し、組織や個体ごとにある一定の変異比率(threshold)を超えると発症する²⁾。疾患発症に及ぶ変異比率は疾患ごと遺伝子変異の型によって各々異なり、Leigh脳症では90%以上の変異であるとの報告が多いのに対し、MTTKでは変異比率50%以下では発症がみられない³⁻⁵⁾。mtDNAは電子伝達系酵素複合体をコードし、細胞のエネルギー産生に深く関与しているため、ミトコンドリアの障害は低能率な解糖系(嫌氣的)エネルギー産生への依存状態を余儀なくされて病態が発生する。

生殖におけるmtDNAの動向は疾患の伝播の対策を考

すえおか こう 慶應義塾大学准教授/産婦人科学

えるうえで重要である。本来ヘテロプラスミーとして存在する変異mtDNAの比率は体細胞分裂の際にはランダムに分配される。変異比率は保たれたまま基本的には各細胞に分配されるが、生殖に関与して二つの大きな特徴が存在する。その一つは、卵子の有するmtDNA量は精子に比して 10^5 倍多く、さらに、精子由来の少量のmtDNAは胚発生初期に消失すると考えられていることもあり、受精卵のmtDNAは父親由来のものは子どもに伝わらず、母親由来のmtDNAのみが伝わる(母系遺伝)と考えられている点である⁶⁾。もう一つの特徴は、mtDNA変異を持つ母親(保因者)の卵巣において卵子形成過程でmtDNAのコピー数が極端に減る時期があり、この際に変異比率の異なる卵子が形成され、その後に変異mtDNA量が増加する際に分配された変異mtDNAの比率を保ったまま増加する現象(ボトルネック効果)が生じるとの仮説である。このメカニズムに対しては議論があるが、結果的に卵子の有するmtDNA変異のヘテロプラスミー比率は正常からほとんど全てが変異である状態まで幅広い分布をすることが示唆されている。

ミトコンドリア遺伝子の生殖における特徴と疾患予防策

生殖過程に伝播するミトコンドリア遺伝病の予防対策として考えられる生殖医療からの手法には、理論的に以下の①~⑤までの方法が考えられる。① 出生前診断、② 着床前遺伝子診断(preimplantation genetic diagnosis; PGD)、③ 卵細胞質移植、④ 核移植、⑤ 健全な第三者からの提供卵子、の5種であるが、技術面以外にも倫理的、法的な観点からの問題点が議論されている。

出生前診断については、この方法は妊娠成立後に診断をすることから、疾患が疑われる結果が得られた場合には、患者にとって大きな身体的・精神的ストレスに直面する事態となる。そのため、それ以外の手法が新たな対策として検討されている。これに対してPGDについては他の遺伝子疾患に対して行うのと同様に、妊娠成立前に胚を診断し、選択の情報を得ることができるとの長所である。ミトコンドリア遺伝病に対するPGDは、卵子形成過程で異

なる変異比率を有する卵子によってできた mtDNA 変異比率を測定し、安全域にあると考えられる胚を診断して胚移植する。この他の方法として、健常な mtDNA を有する卵の細胞質の一部を保因者の卵に注入する卵細胞質移植 (ooplasmic transfer) や、健常な第三者由来の卵との間で、ミトコンドリア遺伝病の保因者女性から得た卵の核を置換する核移植 (nuclear transfer) の方法が考えられる。これらは、いずれの方法も健常な第三者からの提供卵子を必要としており、現在イギリスを中心として、法的、倫理的議論が行われている。わが国では、第三者からの卵子提供が正式には容認されていないことから、なお実施は現実的に困難な状況にある。

着床前遺伝子診断

PGD は、体外受精によって得られた胚から遺伝子診断を行い、疾患の発症を予防する目的にかなう遺伝情報を有する胚を移植して妊娠をもたらす方法である。一般的に排卵誘発プロトコールによって複数の成熟卵子を得た後、単一精子を顕微注入する卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法を用いて受精を行うのが一般的である。診断に供する生検細胞として、主として 4~8 細胞期胚の胚細胞が用いられるが、減数分裂で排出された極体や 5 日目の胚盤胞から孵化しようとして突出してくる trophectoderm を生検細胞とする。

PGD は主として単一遺伝子病や染色体異常の診断に至る幅広い疾患が対象となる⁷⁾。しかし、倫理上の議論や法律上の観点から国によってその対応は異なる。とくにわが国では限定的な対象に対して事例毎に二段階の倫理審査を求めるなど、極めて慎重な対応をとっている。具体的な対象としては、臨床経過が重篤な遺伝性疾患に限られている。重篤な疾患の定義については、現在までの日本産科婦人科学会の倫理上の判断の原則は、成人に至るまでに生命に関わる重い病状が生じるなどの重篤性を認知できるものとしている。現段階で承認された疾患は、Duchenne 型筋ジストロフィー、筋緊張性筋ジストロフィー、副腎白質ジストロフィー、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、ピルビン酸脱水素酵素欠損症、習慣流産を伴う均衡型転座保因者の他、ミトコンドリア遺伝病の Leigh 脳症も含まれている。

ミトコンドリア病には、① 核 DNA 変異 (メンデル遺伝)、② mtDNA 変異、③ その両者を同時に持つ場合が存在する。

このなかで mtDNA 変異によるミトコンドリア病には、発症に至るヘテロプラスミー変異比率の threshold など、

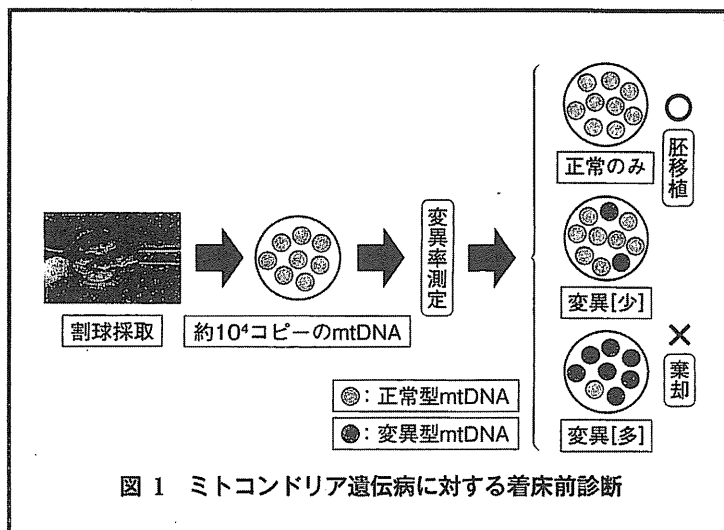


図 1 ミトコンドリア遺伝病に対する着床前診断

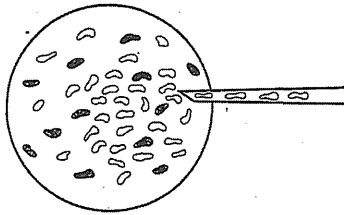
疾患にも特徴があり、PGD の対象として有効性が高いと考えられるものとそうではないものがあると考えられる。また、PGD によって健常胚が得られる効率についてはなお不明な点も多い。

mtDNA 変異によって生じるミトコンドリア病に対する PGD として、neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP) およびレーベル遺伝性視神経萎縮症 (Leber's hereditary optic neuropathy : LHON) に対する実施の報告がなされている。われわれは NARP よりさらに重篤な表現型を有する Leigh 脳症に対して実施している。

ミトコンドリア病のなかで mtDNA に起因する疾患の PGD 手順を図 1 に示す。mtDNA のヘテロプラスミー変異比率を測定し、疾患が発症するヘテロプラスミーの threshold 以下である胚を選択して胚移植に供する。ヘテロプラスミー変異比率の測定方法は、蛍光プライマーを用いた TaqMan 法⁸⁾による real-time PCR 法での変異比率測定法を行っている⁸⁾。点変異部位を含む範囲の PCR プライマーおよび点変異部位に正常配列と変異配列の各々に対応する 2 種類の蛍光プローブを作成し、PCR 反応の際に正常と変異遺伝子のそれぞれに対して特異的にハイブリダイズするプローブから遊離する 2 種類の蛍光量を測定して、これらの比を算出し、あらかじめ作成してある検量線から変異比率を測定する方法である。検量線は正常と変異配列を有するプラスミド DNA を作製し、各変異比率に対する比較定量解析によって診断する。

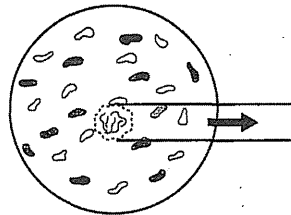
着床前遺伝子診断の問題点

PGD を行ううえでミトコンドリア遺伝病の疾患特殊性から、適合する疾患と適合しづらい疾患が存在する。いず

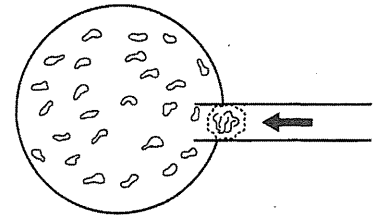


正常ミトコンドリア細胞質注入

図2 卵細胞質移植



1) ミトコンドリア異常受精卵から脱核



2) 正常ミトコンドリアの除核未受精卵へ注入

図3 核移植

れも遺伝学的に、以下に示す不確定要素が存在することが理由である。

① mtDNA の変異比率は組織特異性があり、組織によって変異比率が異なる。② 胚発生や胎児発育に伴い変異比率が変化し、実際には児の変異比率が胚診断とは異なることがある。③ 疾患の重篤度と変異比率の関係には幅があり、胚診断によって疾患発症の危険性を回避するための変異比率に確実な基準を設けることが難しい、などの理由による。しかし、このなかで最も PGD の有力な適応として考えられる病型は、8993T>G および 8993T>C 変異によって発生する Leigh 脳症、およびその軽症型の NARP である。どちらの変異も臓器間や時間的な変異比率変化はほとんど認められず、変異比率と疾患重篤度も密接に相関しており、安全性の高い診断基準を設けやすい⁹⁾。この 8993T>G 変異の NARP 症例に対する PGD の報告がなされたが、0% の変異比率を有する健康な男児が出生したことが報告されている¹⁰⁾。

変異比率から移植適合胚と判断できる基準については threshold 以下であることや、少なくとも発症していない家系内保因者の変異比率を超えない胚を基準と考えることが実務的な判断となるが、なお議論がある。この際も測定誤差や割球間の mtDNA のばらつき (5~10% 程度) などを考慮して、カットオフレベルを設定している。

8993T>G/C 変異については、変異比率 90% 以上の場合にはほぼ確実に発症するが、60% 以下の場合には臨床症状を呈することはないとされており、信頼できる疾患発症予測が可能と考えられている。しかし 60~90% の変異比率の場合には主として軽症型の発症が危惧され、疾患予防の観点から診断胚の移植基準として現時点であまり望ましいこととは考えられない。

また、どれだけの割合で mtDNA の変異比率が疾患発症に至らない安全域の卵子が得られるかについては、なお確実なデータは得られていない。従って、mtDNA 変異に対

する PGD 実施例のなかには、診断胚の変異比率が全て胚移植に適さないとの判断に至ることも十分に考えられる。PGD の効率や変異比率と病型との関わりについてデータ集積が必要である。

ドナー卵子を用いる方法

ミトコンドリア遺伝病が母系遺伝であり、卵子の有する mtDNA 変異の比率によって発症するかが決定され、また、その病態の程度が決定されることが知られている。変異比率の少ない卵子による胚を選択することを目的とした PGD の問題点は、第 1 にその効率が明確でないことである。卵子形成の際に変異比率の高い卵子から低い卵子まで分配されることが予測されるが、その効率は明らかでない。第 2 に変異比率を胚細胞から診断したとしても、分化してゆく過程でその変異比率が変化し、疾患の発症への関与が必ずしも明確でないことである。従って、胚診断を行った際の変異比率のカットオフレベルの判断が困難になることがある。

これに対して、より確実で効率のよい、児の発症を防ぐ方法として、健全な第三者の卵子を用いる方法が考えられた。それが卵細胞質移植と核移植である。しかし、同時にこれらは、共に第三者の卵細胞を使用する点で議論がある。医学的なミトコンドリア遺伝病の伝播を防止する効果とそのリスクについて解明されていない点が多いことその他、倫理的および法的な視点での議論があり、なお意見の分かれる内容を多く含んでいる¹¹⁾。

1. 卵細胞質移植

mtDNA の変異比率の高い保因者の女性の卵子に存在するヘテロプラスミー変異比率を低下させる目的で、正常な mtDNA を有する第三者の卵子の一部を注入する方法である (図 2)。ヒトの卵細胞質移植は、本来は胚発育が得づらい不妊女性の卵活性化を目的に検討される経緯がある。

注入する細胞質は約 10~15% であり、変異 mtDNA に

対して、補充される正常 mtDNA が十分な量と機能を有するの否かについて明らかなエビデンスがないことが基本的な問題である。発症を防止するためには、上限で 50% の正常細胞質のドナー卵子からの移植が必要となる。現実的にはその補填は不可能ではないかとの疑問がある。

2. 核移植

mtDNA 変異を持たないドナーの卵細胞と変異保因者の女性から得た卵子の核を入れ替える技術で、卵細胞質移植と異なり mtDNA 変異の比率を安全に 0 にすることができ (図 3)。疾患の発症を防止する意味からは合理的な方法と考えられる。

核移植を行う時期には、① 未受精卵、② 前核期胚、③ 初期胚の 3 種のパターンが考えられる。排卵された MII ステージの卵子の核膜は消失しており、未受精卵の核移植は現実的には困難である。検討されているのは前核期胚からの核移植であり、方法論的に最も現実的な手法である。とくに核移植に関して、ヒトのクローニングとみなされる行為か否かについて議論がある。初期胚の割球の核を移植する方法では複製を作成することにつながるの危険があり、倫理のみならず法的に困難であると考えられる議論が存在する。この方法のなかにも胚細胞同士の間で核を入れ替える胚細胞クローニングと、体細胞からの核を胚細胞に移植する体細胞クローニングとは、そのリスクの重みが異なるとの議論があるが、ヒト胚のクローニングへの危険がなされていることは事実であり、技術と適応を明確に議論する必要がある。

実際には英国のニューキャッスル大学および Human Fertilization and Embryology Authority (HFEA) における議論で、前核を用いた核移植についての研究を承認するに至っている。

倫理とは別に、法の解釈は各国で異なり、この英国における議論とは全ての国で必ずしも一致しない可能性がある。ミトコンドリア遺伝病の発症を防止する目的での核移植については十分な議論のうえ、研究を前提とした実用的なトライアルが行われる可能性が考えられる。同時に mtDNA もゲノムの一部であり、3 人の生物学的“親”を有

することになる技術ともいわれるこれらの方法をどのように理解し、管理してゆくかについては、なお慎重に議論を続けなければならない問題であろう。

むすび

ミトコンドリア遺伝病に対する治療の一貫として、生殖医療技術を用いて新たな生命に発症することを防ぐ対策が進行している。このなかで法や倫理上の大きな課題が存在し、現在なお、慎重に検討が進んでいる状況である。それに対し、新たな選択肢を待ち望んでいる変異遺伝子を有するクライアントは進捗を心待ちにしている。人類の英知で技術と法・倫理の接点を模索するなかで、コンセンサスの得られる解決策に到達することが期待される。

文献

- 1) Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290: 457-65.
- 2) Howell N. Origin, cellular expression, and cybrid transmission of mitochondrial CAP-R, PYR-IND, and OLI-R mutant phenotypes. *Somatic Cell Genet*. 1983; 9: 1-24.
- 3) Chinnery PF, Howell N, et al. Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain*. 1997; 120 (Pt10): 1713-21.
- 4) White SL, Collins VR, Wolfe R, et al. Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993. *Am J Hum Genet*. 1999; 65: 474-82.
- 5) van de Glind G, de Vries M, Rodenburg R, et al. Resting muscle pain as the first clinical symptom in children carrying the MTTK A8344G mutation. *Eur J Paediatr Neurol*. 2007; 11: 243-6.
- 6) Giles RE, Blanc H, Cann HM, et al. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 6715-9.
- 7) 末岡 浩, 橋場剛士, 浅田弘法, 他. 配偶子, 受精卵の遺伝子診断. *日本受精着床学会誌*. 1996; 13: 20-6.
- 8) Tajima H, Sueoka K, Moon SY, et al. The development of novel quantification assay for mitochondrial DNA heteroplasmy aimed at preimplantation genetic diagnosis of Leigh encephalopathy. *J Assist Reprod Genet*. 2007; 24: 227-32.
- 9) White SL, Shansek S, McGill JJ, et al. Mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993 show a lack of tissue or age-related variation. *J Inherit Metab Dis*. 1999; 22: 899-914.
- 10) Steffann J, Frydman N, Gigarel N, et al. Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J Med Genet*. 2006; 43: 244-7.
- 11) Bredenoord AL, Pennings G, de Wert G. Ooplasmic and nuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disorders: conceptual and normative issues. *Hum Reprod Update*. 2008; 14: 669-78.

特集

心疾患の病理

ミトコンドリア心筋症*

井川正道**
米田誠***
田中雅嗣****

Key Words : mitochondrial cardiomyopathy, mitochondrial disease, mitochondrial DNA

はじめに

ミトコンドリアは、エネルギー産生やアポトーシスといった、生命活動の根幹を担う細胞内小器官である。体内のほとんどすべての細胞に複数存在し、その内部にある呼吸鎖(電子伝達系とATP合成酵素)において、糖質や脂質をもとにエネルギー産生を行っている(図1)。こうしたミトコンドリアの機能は、ミトコンドリア自体の中に存在するミトコンドリア遺伝子と、核遺伝子の一部が協調して制御している。ミトコンドリア病は、これらの遺伝子の異常などによってミトコンドリア機能が低下し、その結果、全身の臓器に障害をきたす疾患である。

ミトコンドリア心筋症はミトコンドリア病の一つであり、ミトコンドリア機能の障害によって、心筋症あるいは心伝導障害などの病態を呈する疾患である。心筋症が主体となる場合、中枢神経系症状などに合併し、いわゆるミトコンドリア脳筋症の部分症として出現する場合がある。心筋症のみを呈しているようにみえても、全身疾患であるミトコンドリア病としての

理解が必要である。

病因・病態

ミトコンドリア心筋症を含むミトコンドリア病は、ミトコンドリア遺伝子あるいはミトコンドリア機能に関連する核遺伝子の異常による、ミトコンドリア機能低下が病因である。大半の原因はミトコンドリア遺伝子の変異であり、このためミトコンドリア内の呼吸鎖におけるエネルギー産生の低下が引き起こされ、心臓であれば心筋や心伝導系に障害をきたす²⁾。呼吸鎖機能の低下はエネルギー産生の低下だけでなく、フリーラジカルの発生増加による遺伝子や蛋白などの酸化損傷を惹起し、さらなるミトコンドリア機能の低下をきたすといった悪循環を招く。

ミトコンドリア遺伝子はミトコンドリアの内部にある独自の遺伝子であるが、核遺伝子と異なり、一つのミトコンドリア内に複数存在する。さらにミトコンドリア自体も、その細胞内で複数存在し、互いに協調・干渉しあっている³⁾。このため、細胞や臓器によって、ミトコンドリア遺伝子の変異率やミトコンドリア機能の低下の程度が異なることが多く、同一遺伝子変異での症状の個体差や、臓器別の障害の差が現れる原因となる。

* Mitochondrial cardiomyopathy.

** Masamichi IKAWA, M.D. & Makoto YONEDA, M.D.: 福井大学医学部附属病院神経内科[〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3]; Department of Neurology, University of Fukui Hospital, Fukui 910-1193, JAPAN

*** 福井大学医学部附属病院遺伝診療部

**** Masashi TANAKA, M.D.: 東京都健康長寿医療センター研究所健康長寿ゲノム探索部門

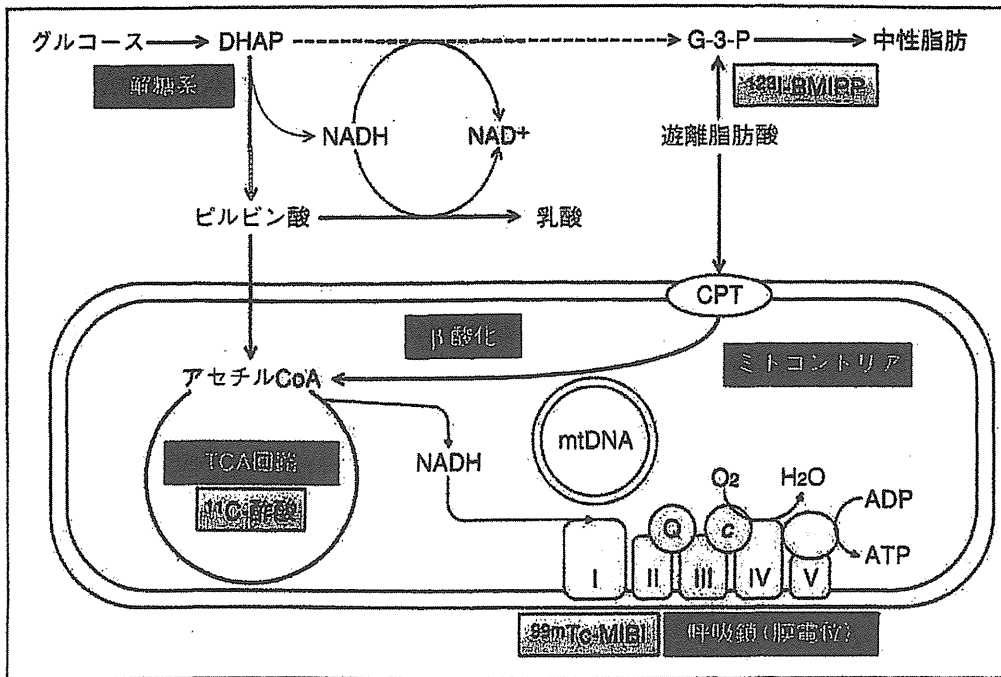


図1 ミトコンドリアにおける代謝経路

ミトコンドリアに関連した代謝経路および^{99m}Tc-MIBI (SPECT), ¹²³I-BMIPP (SPECT), ¹¹C-酢酸 (PET) の集積機序を示す. mtDNA: ミトコンドリア遺伝子, CPT: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ, DHAP: ジヒドロキシアセトンリン酸, G-3-P: グリセロール3リン酸, I・II・III・IV・V: 呼吸鎖酵素複合体, Q: コエンザイムQ₁₀, c: チトクロームc

ミトコンドリア遺伝子は、ヒトでは16,569塩基対の環状二本鎖であり、すべて母親由来である。変異の修復機構が脆弱であるため、核遺伝子に比べて容易に変異が起きる。現在までに、ミトコンドリア心筋症に関連すると考えられるミトコンドリア遺伝子の変異(点変異もしくは欠失)は、20種類以上が報告されており、MITOMAP (URL: <http://www.mitomap.org/>)にて検索可能である。代表的な変異としては、塩基番号3243A>G (tRNA^{Leu(UUR)}⁴), 3260A>G (tRNA^{Leu(UUR)}⁵), 4269A>G (tRNA^{Iso}), 4317A>G (tRNA^{Iso}), 8344A>G (tRNA^{Lys}⁶), 8993T>G (ATPase 6)⁷がある。変異の多くが代表的なミトコンドリア病である、MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes), MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers), 慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (chronic progressive external ophthalmoplegia: CPEO)あるいはKearns-Sayre症候群 (KSS)の原因となりうる。したがって、これらのミトコンドリア病の部分症として、心筋症を呈することも

多い。また、呼吸鎖酵素など、ミトコンドリア内で機能する蛋白をコードしている核遺伝子の変異でもミトコンドリア心筋症が起こりうる。

ミトコンドリア病全般にいえることであるが、上述のように、同一の遺伝子変異を有していても表現型は非常に多彩であり、同一家系内でも、ほとんど症状のない人から、心筋症のみを呈する人、中枢神経系の障害など典型的なMELASの症状を有する人まで、症状や重症度に幅があることが特徴的である。このため、心症状だけでなく、本人を含めた家系内で、下記のようなミトコンドリア病にみられやすい症状の有無を聴取することが、診断において重要である。

臨床症状

ミトコンドリア病と疑う契機となるのは、心症状のみにとどまらない、ミトコンドリア機能障害を示唆する多彩な症状の合併と、母系に偏った家族歴である。

ミトコンドリアはあらゆる臓器・組織に存在し、その活動の源となっていることから、ミト

コンドリアの機能低下によって心筋以外のさまざまな臓器にも障害が出るため、ミトコンドリア心筋症は全身疾患の一部として捉えられるべきである。したがって、心筋症や心伝導障害といった心症状以外にも、ほかの臓器障害の有無についても検討が必要である。特に、心筋と並んでエネルギーを大量に必要とする、中枢神経系と骨格筋に障害が出やすい。また、難聴や糖尿病の合併も多く、心筋症以外にこれらの症状がないかを検討することが、ミトコンドリア心筋症を見落とさないために重要である。

中枢神経系の症状としては、痙攣発作、精神発達遅滞、認知症、小脳失調などが一般的に合併しやすい。特にMELASでは、繰り返す脳梗塞様の症状と画像所見を示し、頭痛、嘔気、痙攣発作が頻発する、脳卒中様発作が特徴的である。ただし、ごく軽度であったり、非特異的な場合もあったりするため、疑われる場合には神経内科もしくは小児科での精査が望ましい。外眼筋麻痺や網膜色素変性症などの眼症状を伴うことも多く、特に心伝導障害と合併する場合にはCPEO (KSS)が疑われる。骨格筋も心筋と同様に侵されやすく、筋力低下や筋萎縮を伴うことが多い。また、低身長、やせ、易疲労感などの、非特異的な症状も多い。

ミトコンドリア遺伝子は母系遺伝するため、母系における家族歴があれば疑う契機となる。ただし、同一家系(同一の遺伝子変異)の中でも表現型が大きく異なることが一般的であるため、心筋症だけでなく、上記のようなミトコンドリア病でよくみられる症状についても家族歴の聴取が必要である。乳児致死型心筋症として発症する場合もあるため、流産や乳児期死亡の有無についても確認する。

しかしながら、CPEO (KSS)のように孤発例が大多数である場合や、原因が核遺伝子で常染色体遺伝形式をとる場合もあるため、母系遺伝でないことでは否定はできない。また、MELASを代表とするミトコンドリア脳筋症に合併した場合は幼児期から青年期の発症が多いが、心筋症を主体とした場合には中高年期での発症も多いため、発症年齢で否定すべきではない。

検査所見

ミトコンドリア心筋症は肥大型心筋症となることが多く、典型的には全周性に左室壁肥大を認める。このなかでも特に中隔に比べ、後壁の肥大が著明であることが多く(図2-A, B)、この所見は特発性肥大型心筋症における中隔優位の肥厚(非対称性中隔肥厚)と対照的で、ミトコンドリア心筋症に特徴的な所見である可能性があり⁸⁾、心臓超音波検査で疑う契機となる。しかし、拡張型や拘束型の所見を呈することもあり、病期によって病型が移行することもあるため、注意が必要である。

心電図では、房室ブロック、脚ブロック、Wolff-Parkinson-White(WPW)症候群、上室性頻拍、心房細動などの心伝導障害や、ST-T異常、心房・心室負荷、左室側高電位、異常Q波、左軸偏位などの心筋症を反映した所見が認められることが多い。

ミトコンドリア機能障害を反映して、血中乳酸値の上昇および乳酸アシドーシスが認められることが多く、乳酸/ピルビン酸比は高値となる。中枢神経系の症状を伴う場合には、髄液中の乳酸値上昇もしくは頭部MRIでの¹H-MRスペクトロスコピー(MRS)における髄腔や脳実質の乳酸ピークの上昇を確認することも有用である⁹⁾。

^{99m}Tc-MIBI(methoxyisobutyl isonitrile)および¹²³I-BMIPP[15-4-iodophenyl-3-(R,S)-methyl-pentadecanoic]を用いた心筋シンチグラフィによるミトコンドリア機能障害の証明も参考となる。われわれは、ミトコンドリア遺伝子3243A>G変異を有するミトコンドリア心筋症患者に対して、これらの核種による心筋シンチグラフィを行い、左室駆出率が低下している重症例ほど、^{99m}Tc-MIBIの洗い出し率が充進し、¹²³I-BMIPPの集積は増加するという¹²³I-BMIPP/^{99m}Tc-MIBIミスマッチが起きることを明らかにした⁸⁾(図1, 図2-C)。

^{99m}Tc-MIBIは、心筋細胞におけるミトコンドリア膜電位(呼吸鎖により生じる)に応じて心筋に保持される特性を持つため、^{99m}Tc-MIBIの洗い出し率充進は、膜電位の低下、すなわちミトコンドリア機能の低下を反映する¹⁰⁾。また、ミトコンドリア機能障害では、解糖系の充進によって過剰

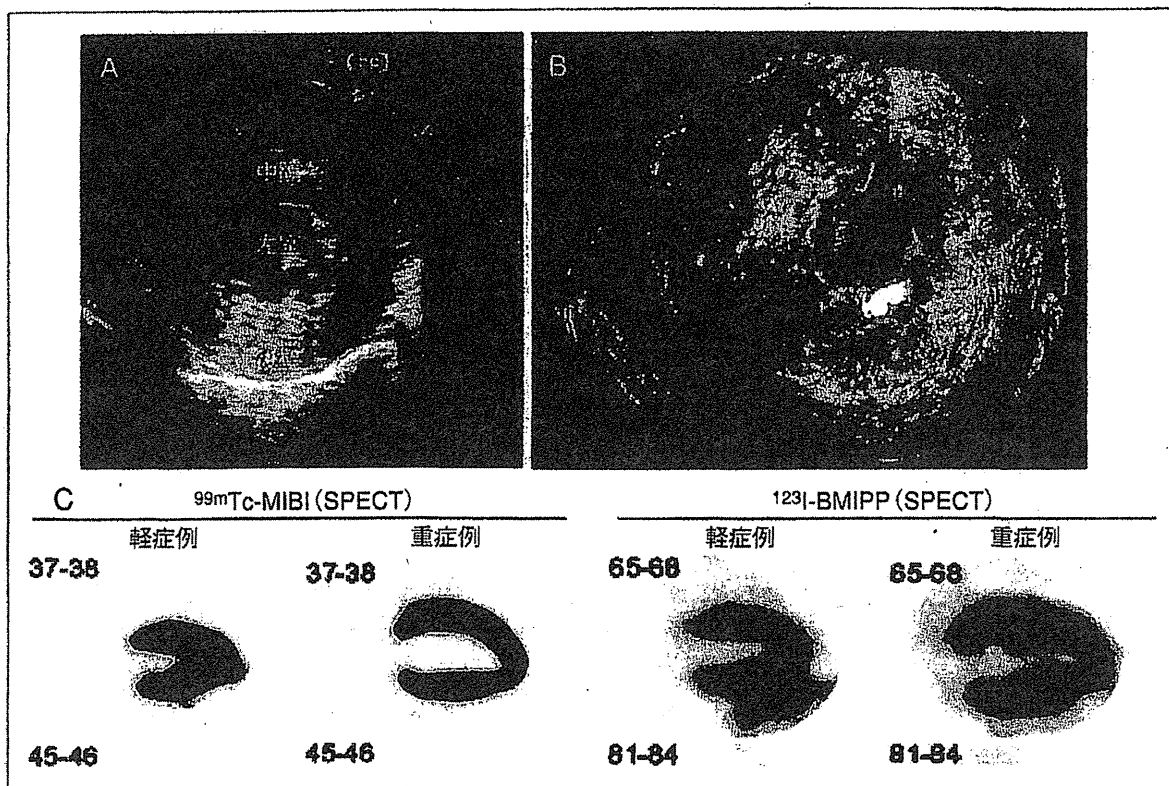


図2 ミトコンドリア心筋症における心臓超音波検査(A), 剖検心(B), 心筋シンチグラフィ(C)

A: ミトコンドリア遺伝子3243A>G変異を有するミトコンドリア心筋症の重症例における心臓超音波検査所見。全周性の左室壁肥大が認められるが、中隔(15mm)に比べて後壁(22mm)の肥厚が目立つ。B: ミトコンドリア遺伝子3243A>G変異を有するミトコンドリア心筋症患者の剖検心所見。Aと同様に、全周性の左室壁肥大が認められる。C: ミトコンドリア遺伝子3243A>G変異を有するミトコンドリア心筋症の軽症例と重症例における^{99m}Tc-MIBI(早期像)および¹²³I-BMIPPによる心筋シンチグラフィ所見。軽症例ではほぼ正常であるが、重症例では¹²³I-BMIPPの集積増加と^{99m}Tc-MIBIの集積低下とのミスマッチが認められる。

となったNADHを処理するためにグリセロール3リン酸が増加するが、これは脂肪酸と反応して中性脂肪となるため、脂肪酸のアナログである¹²³I-BMIPPの集積増加は同様にミトコンドリア機能の低下を反映する¹⁴⁾。したがって、¹²³I-BMIPPの集積増加と^{99m}Tc-MIBIの集積低下・洗い出し率亢進が同時に認められるミスマッチ所見は、ミトコンドリア心筋症に特徴的な所見であり、診断に有用であるだけでなく、重症度を反映すると考えられる⁸⁾。

心筋生検により、異常ミトコンドリアの集簇などの特徴的な所見が認められれば診断に有用であるが、採取できる検体量などに限りがあるため、有意な所見が得られないことも多い。危険性も考慮すると、まずは上記のような画像や遺伝子検査を優先すべきであり、さらに組織学的診断が必要である場合には、骨格筋生検を検

討することが望ましい。

診断・経過

前述のような、ミトコンドリア機能障害を示唆する症状・所見が認められ、ミトコンドリア心筋症に関連した遺伝子変異が認められれば、確定診断となる。診断にあたって、ミトコンドリア心筋症を含めたミトコンドリア病に関する特定疾患治療研究事業における認定基準が有用であり、上記の臨床症状や検査所見が診断基準に組み込まれている(URL: <http://www.nanbyou.or.jp/>)。

なお、ミトコンドリア遺伝子検査を行う際に、変異があっても、血液(白血球)での変異率が低く検出できない場合もある。疑わしい場合には、血液よりも変異率が高い、筋などの組織で検討する必要がある。また、代表的ないくつかの変

異は、三菱化学メディエンスやSRLで検査を行っているが、ミトコンドリア遺伝子変異を網羅的に解析する方法が開発され¹²⁾、G & Gサイエンスにて検査を行っている (URL : <http://www.gandgscience.co.jp/index.html>)。しかしながら、核遺伝子を含め候補となる変異は多岐にわたるため、必ずしも遺伝子診断に至れるわけではない。

経過としては、病初期には心筋肥厚の程度に比べて収縮能が保たれていることが多いが、病期の進行に従って急激に収縮能が低下し、拡張相肥大型となる場合や、肥大型から拡張型へ移行する場合もある¹³⁾。また、初期より心伝導障害による重篤な不整脈が起きることも多い。いずれも次第に心不全症状や心室性不整脈を伴うようになり、患者の生命予後を規定する。

治 療

ミトコンドリア心筋症に対しては、現時点では遺伝子治療などの根本的治療が行えないため、ミトコンドリア機能と心機能の維持を主眼とした対症療法が中心となる。

ミトコンドリアでのエネルギー産生は、糖質を解糖系で、脂質を脂肪酸代謝系で代謝し、さらにTCA回路で代謝することによって、その過程で得られたNADHなどの電子伝達体を呼吸鎖で受け渡して、最終的にATPを産生することにより行う(図1)。したがって、ミトコンドリア機能の維持のためには、呼吸鎖だけでなく、それに連なる代謝系の機能維持・賦活が必要である。このために、脂肪酸をミトコンドリアへ運搬する際に必要なカルニチンや、TCA回路の入り口であるピルビン酸脱水素酵素(pyruvate dehydrogenase complex : PDHC)の補酵素として働くチアミン(ビタミンB₁)などのビタミン類、ATPなどの投与が一般的に行われる。

また、ミトコンドリア(呼吸鎖)の機能が低下すると、ATP産生の低下だけでなく、フリーラジカル発生増加によって酸化ストレスが増強する。実際に、患者剖検心筋において酸化物の増加が報告されている¹⁴⁾。生体においても、われわれは、ミトコンドリア遺伝子3243A>G変異を有する患者群と対照群において、FRAS4^R(Free Radical Ana-

lytical System ; H & D srl, Italy)を用いて、患者群での血清中の酸化ストレスの有意な増加を明らかにしている¹⁵⁾。したがって、ミトコンドリア病患者では、症状のある臓器を中心に、全身的・慢性的に強い酸化ストレスに晒された状態にあると考えられるため、体内で抗酸化物質となるトコフェロール(ビタミンE)、コエンザイムQ₁₀などの投与もよく行われる。

心症状に対しては、減塩や利尿薬・強心配糖体などの、心不全に対する一般的な治療も早期から行う。心伝導障害が高度の症例では、ペースメーカー植え込みの適応となる。特にCPEO(KSS)では、心伝導障害は必発であり、10歳代で完全房室ブロックをきたし致命的となることが多く、診断がつき次第、早期よりペースメーカー植え込みを考慮すべきである。

一般的な注意としては、過度の運動・リハビリ、寒暖の著しい場所で過ごすこと、感染などによる発熱は、ミトコンドリア機能に負荷となるため、リハビリは筋力維持程度にとどめ、悪化の要因を避ける、環境の調整を行うなどの指導を行う。また、乳酸を基剤とした輸液(乳酸加リンゲル)は、乳酸の蓄積をきたすため禁忌であり、輸液としては、乳酸を含まない酢酸リンゲル液の使用が勧められる。

近年、L-アルギニンとピルビン酸の有効性が相次いで報告されている。L-アルギニンは、体内で一酸化窒素合成酵素(NOS)によって一酸化窒素(NO)となることで血管拡張作用を発揮し、MELASにおける脳卒中様発作の軽減・予防に有効であることが古賀らによって示されている¹⁶⁾。加えてわれわれは、ミトコンドリア心筋症の患者に対しても、¹⁴C-酢酸PETを用いた検討によって、L-アルギニンは心筋におけるTCA回路の代謝を促進し、心筋のエネルギー代謝を改善することを報告しており、心筋症に対しても有用である可能性がある¹⁷⁾。ピルビン酸も、解糖系やTCA回路における代謝の促進作用があり、心不全症例に対する心機能改善効果が報告されている¹⁸⁾。いずれも今後、臨床試験による実証が待たれるが、これらの薬剤は、現時点では保険適応外であるため、使用にあたっては、臨床研究として、各施設での倫理審査委員会の承認や患者・家族

の同意が必要である。予後が不良な患者が多く、有効な治療法の開発が心から望まれる。

おわりに

以上、ミトコンドリア心筋症について、診断と治療を中心に概説した。ミトコンドリア心筋症自体は比較的稀な疾患であるが、心症状以外の症状や遺伝歴を確認することで、診断の契機となるため、注意深い問診や診察が重要である。診断に際して、髄液検査や骨格筋生検を必要とすることが多いため、その際には神経内科や小児科にご相談いただければと思う。また、発端者の診断を契機に、家系内にはほかにも多数の患者がいることが明らかになることも多く、遺伝子診療部門への依頼も検討していただきたい。根本的な治療法がない疾患ではあるが、早期からの介入により予後を改善できる可能性は十分あり、また家系への遺伝的影響を考えると、正確な診断をくださ意味は大きい。本稿がその一助になれば幸いである。

文 献

- 1) Anan R, Nakagawa M, Miyata M, et al. Cardiac involvement in mitochondrial diseases. A study on 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. *Circulation* 1995 ; 91 : 955.
- 2) DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 2656.
- 3) Yoneda M, Miyatake T, Attardi G. Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. *Mol Cell Biol* 1994 ; 14 : 2699.
- 4) Vilarinho L, Santorelli FM, Rosas MJ, et al. The mitochondrial A3243G mutation presenting as severe cardiomyopathy. *J Med Genet* 1997 ; 34 : 607.
- 5) Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, et al. Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy : association with mutation in mitochondrial DNA tRNA (Leu) (UUR). *Lancet* 1991 ; 338 : 143.
- 6) Vallance HD, Jevon G, Wallace DC, et al. A case of sporadic infantile histiocytoid cardiomyopathy caused by the A8344G (MERRF) mitochondrial DNA mutation. *Pediatr Cardiol* 2004 ; 25 : 538.
- 7) Obayashi T, Hattori K, Sugiyama S, et al. Point mutations in mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1992 ; 124 : 1263.
- 8) Ikawa M, Kawai Y, Arakawa K, et al. Evaluation of respiratory chain failure in mitochondrial cardiomyopathy by assessments of ^{99m}Tc-MIBI washout and ¹²³I-BMIPP/^{99m}Tc-MIBI mismatch. *Mitochondrion* 2007 ; 7 : 164.
- 9) Tsujikawa T, Yoneda M, Shimizu Y, et al. Pathophysiologic evaluation of MELAS strokes by serially quantified MRS and CASL perfusion images. *Brain Dev* 2010 ; 32 : 143.
- 10) Piwnica-Worms D, Kronauge JF, Chiu ML. Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium (I) in cultured chick myocardial cells. Mitochondrial and plasma membrane potential dependence. *Circulation* 1990 ; 82 : 1826.
- 11) Fujibayashi Y, Yonekura Y, Takemura Y, et al. Myocardial accumulation of iodinated beta-methyl-branched fatty acid analogue, iodine-125-15-(p-iodophenyl)-3-(R,S) methylpentadecanoic acid (BMIPP), in relation to ATP concentration. *J Nucl Med* 1990 ; 31 : 1818.
- 12) Nishigaki Y, Ueno H, Coku J, et al. Extensive screening system using suspension array technology to detect mitochondrial DNA point mutations. *Mitochondrion* 2010 ; 10 : 300.
- 13) Tanaka M, Obayashi T, Yoneda M, et al. Mitochondrial DNA mutations in cardiomyopathy : combination of replacements yielding cysteine residues and tRNA mutations. *Muscle Nerve* 1995 ; 3 : S165.
- 14) Ishikawa K, Kimura S, Kobayashi A, et al. Increased reactive oxygen species and anti-oxidative response in mitochondrial cardiomyopathy. *Circ J* 2005 ; 69 : 617.
- 15) Ikawa M, Arakawa K, Hamano T, et al. Evaluation of systemic redox states in patients carrying the MELAS A3243G mutation in mitochondrial DNA. *Eur Neurol* 2012 ; 67 : 232.
- 16) Koga Y, Akita Y, Nishioka J, et al. L-arginine im-

- proves the symptoms of strokelike episodes in MELAS. *Neurology* 2005 ; 64 : 710.
- 17) Arakawa K, Kudo T, Ikawa M, et al. Abnormal myocardial energy-production state in mitochondrial cardiomyopathy and acute response to L-arginine infusion. C-11 acetate kinetics revealed by positron emission tomography. *Circ J* 2010 ; 74 : 2702.
- 18) Hermann HP, Arp J, Pieske B, et al. Improved systolic and diastolic myocardial function with intracoronary pyruvate in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004 ; 6 : 213.

* * *

V.

新聞記事

夕刊フジ(平成 24 年 4 月 26 日)

読売新聞 (平成 24 年 11 月 20 日)

ミトコンドリア病

遺伝カウンセリングセミナー

(平成 24 年 6 月 30 日、7 月 1 日)

市民公開講座

(平成 25 年 2 月 9 日)

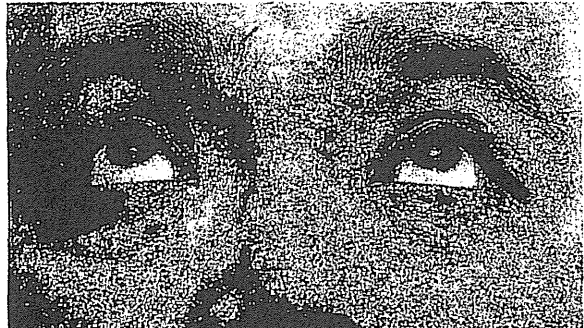
ミトコンドリア病

この時季
この病気になる
この症状

米生物学者ワトソンとクリックによりDNAの二重らせん構造の論文が発表されてから今日で59年。以来、DNAの研究は飛躍的に進み、いまではDNAの変異で起る「ミトコンドリア病」といふ聞き慣れない病気の存在も分かってきた。

【脳や筋肉の障害が多い】
ミトコンドリアは、ひとつの細胞内に数百個存在し、細胞が生きるために必要なエネルギー(ATP)を作り出している。ミトコンドリア病は、細胞内の核DNAもしくはミトコンドリアDNAの変異で、ミトコンドリアの機能が低下して引き起こされる病気の総称だ。

この病気に詳しい国立精神・神経医療研究センター神経研究



所の後藤雄一郎氏は「体のどの細胞にも異常が起るからで症状は多岐にわたる。ただ、エネルギーをたくさん必要とする脳、筋肉、心臓は他の部位より障害が出やすい」と説明する。

主症状の特徴によって分類することができ、その代表が別項のよつな脳や筋の病気だ。

【患者数は氷山の一角】
ミトコンドリアDNAの変異は、生まれながら親から受け継ぐ場合もあれば、老化などで後から生じるケースもあり、発症年齢は人によってまちまちとい

細胞が変異、機能が低下 脳、筋肉に障害出やすい

う。「たゞ変異があっても、その変異したDNAが細胞内であ

【症状で分類される代表的なミトコンドリア病の種類】
メラス 脳卒中に似た意識障害や運動麻痺の症状が急激に現れる。
マーフ 自分の意志とは関係なく体の筋肉がピクピク動いてしまう症状が主体。
CPEO 眼球を上下左右に動かす筋肉に障害、眼球を動かせなくなる。

る程度まで増えなければ症状は現れません。何が原因で増えるのか、解明できていないのが現状です」(後藤部長)

2年前から国の特定疾患に認定されており、その公費負担の受診者数は数百人ほど。だが、その数は氷山の一角で、実際の患者数は把握されていない。というのも、発症頻度が高く、よく知られた病気の中にミトコンドリア病が隠れていることが分かってきたからだ。

【持病の原因の疑い】
後藤部長は「糖尿病全体の1%はミトコンドリア病が原因とみられている」と話す。

「他にも脳卒中、心筋症、難聴、腎臓病、精神障害、ホルモン異常など、組み合わせの自然な病気の合併があれば、ミトコンドリア病によって各臓器が障害されている疑いがあります」

治療は、いまのところ特效薬はない。各臓器の症状には従来からの対症療法を行い、ミトコンドリアの機能低下の改善には、ビタミン剤やコエンザイムQ10などが処方されているという。

後藤部長は「予防や治療の研究が進んでいて、将来的には発症を防げると思う。老化もミトコンドリアの機能低下で起きるので、ミトコンドリア病の研究はアンチエイジングの研究にもつながります」と話している。

NAVIGATOR

ミトコンドリア病 どんな症状が

細胞小器官の一つ、ミトコンドリアの異常によって起きるミトコンドリア病。症状がさまざまで医師でさえ気づかない場合があるが、この病気が糖尿病やパーキンソン病などという異なる病気にかかわっていることが分かってきた。

■2012年11月20日 毎日新聞 朝刊 13面

ミトコンドリア病 どのような症状が 複数の臓器に異常をきたすのが特徴だ。例えば糖尿病病

患者に難聴の症状がある場合、母方の家族に同様の症状の人がいればミトコンドリア病の疑いがあるという。糖尿病患者の1/3程度はミトコンドリア病が原因といわれる。また、手足の震えやこわばりなどが主な特徴のパーキンソン病の発症にも関係があることがほぼ確実になってきた。

10年度に厚生労働省の難治性疾患克服研究事業の特定疾患に指定され、11年度は945人が患者に認定された。ただ、実際はさらに多いと見られる。医師も正確な診断難しく

複数の臓器に異常 疑いを

ミトコンドリアは、核のDNAとは別に独自の遺伝子をもつ細胞内の小器官。全ての細胞にあり、呼吸や栄養素の代謝など細胞の活動に必要なエネルギーを作る。機能が低下すると、心臓や骨格筋、脳の神経細胞が正常に働かなくなり、さまざまな病気になる。

*

ミトコンドリア病に詳しい国立精神・神経医療研究センターの後藤雄一・神経研究所疾病研究第2部長によると、症状はけいれんや糖尿病などさまざまイラスト。複数の臓器の機能不全が同時に起き

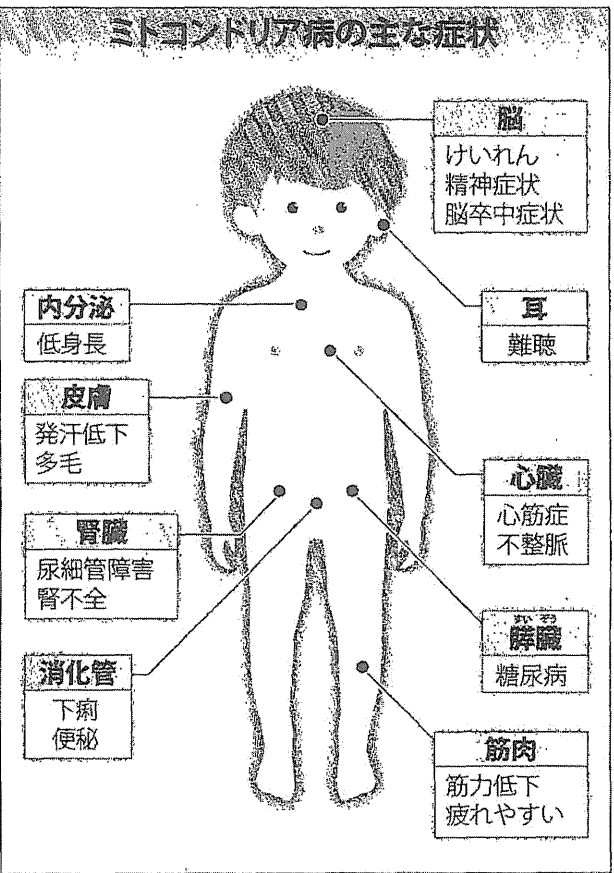
ミトコンドリア病には主に五つの病気の型があるが、最も多いのが「MELAS」(メラス)だ。小児や青年期に脳卒中のような発作を起すほか、頭痛、嘔吐、一過性の失明、知的障害などの症状が出る。血液中の乳酸値も高い。

*

98年に設立され、約170家族が参加する「ミトコンドリア病患者・家族の会」(MCM家族の会、事務局・神奈川県横浜須賀野市)。代表の杉野原郁哉さん(42)は01年、長男直樹君をミトコンドリア病の

した。アルギニンが脳内の血管を広げ、乳酸の蓄積を抑えたとみられる。試験中の死亡例もなく、来春、国に薬の承認申請をする予定。古賀教授は承認されれば「世界初のメラス治療薬となる」と話す。

糖尿病、低身長などに ■医師も正確な診断難しく



ミトコンドリア病の主な症状