

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

ミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なバイオマーカーの探索

分担研究者 田中 雅嗣 東京都健康長寿医療センター臨床検査科部長
 研究協力者 藤田 泰典 東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
 伊藤 雅史 東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
 古賀 靖敏 久留米大学医学部小児科学教授

研究要旨 ミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なバイオマーカーの探索を目的として、ミトコンドリア病モデル細胞を用いた実験系の確立、網羅的遺伝子発現解析による候補バイオマーカーの同定、臨床検体による検証を実施した。その結果 growth differentiation factor 15 (GDF15)がミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なバイオマーカーになる可能性が示された。

A. 研究目的

ミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なバイオマーカーの探索を目的として、以下の通り、ミトコンドリア病モデル細胞を用いた実験系の確立、網羅的遺伝子発現解析による候補バイオマーカーの同定、臨床検体による検証を実施した。

B. 研究方法

1. ミトコンドリア病モデル細胞を用いた実験系の確立

本研究では、ミトコンドリア病の中でも比較的発症頻度の高い MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) 患者の筋芽細胞とヒト骨肉腫由来 143B 細胞から樹立したサイブリッドをモデル細胞として使用した。具体的に、MELAS の原因変異である A3243G 変異を 90%以上有する細胞株をミトコンドリア病モデル細胞 (2SD)、A3243G 変異が検出されない細胞株をコントロール細胞 (2SA) とした。

これまでに、2SD 細胞と 2SA 細胞のメタボローム解析を行い、細胞内のエネルギー代謝に対するピルビン酸の効果を明らかにしてきた。その中で、2SD 細胞に高濃度 (10 mM) の乳酸を投与すると 4 時間後にはエネルギー代謝障害が

促進していること、高濃度 (10 mM) のピルビン酸ではそれらが認められないことを示した。また、2SA 細胞では高濃度の乳酸やピルビン酸を投与してもエネルギー代謝に大きな影響は認められなかった。これらの結果をもとに、2SD 細胞において高濃度の乳酸で発現誘導される分泌タンパクが、細胞内のエネルギー代謝障害を反映し、ミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用な新規バイオマーカーになる可能性を着想した。そこで、10 mM 乳酸あるいは 10 mM ピルビン酸を投与した 2SA 細胞と 2SD 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、バイオマーカーの候補となる分泌タンパクの探索を実施した。

2. 網羅的遺伝子発現解析による候補バイオマーカーの同定

10 mM 乳酸または 10 mM ピルビン酸を投与後 0・4・8 時間の 2SD 細胞と 2SA 細胞を回収した。これらの RNA を抽出した後、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。データ解析の結果、2SD 細胞に 10 mM 乳酸を投与した場合に発現が誘導される遺伝子を 313 個同定した。

血中バイオマーカーを探索するために、313 個の遺伝子の中から分泌タンパクをコードするものを選抜し、23 個の遺伝子を同定した。

これらの遺伝子に関する文献を精査し、

23個の遺伝子の中から3個の遺伝子を選抜した。

これら3遺伝子の定量 RT-PCR を行い、網羅的遺伝子発現解析の再現性を検証した。その結果、いずれの遺伝子についても再現性が確認されたため、これら3種類の分泌タンパクを候補バイオマーカーとして同定した。

候補バイオマーカーとして同定した分泌タンパクの細胞培養上清中の濃度を、ELISA とマルチプレックスサスペンションアレイで測定した。その結果、growth differentiation factor 15 (GDF15)の濃度は2SA細胞と比較して2SD細胞で高値を示した。また、2SD細胞では、10 mM 乳酸の投与によってGDF15の濃度がさらに増加していた。他の分泌タンパクについては、検出限界以下で測定できなかった。

(倫理面への配慮)

ミトコンドリア病患者血清の採取と分析については久留米大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。

C . 研究結果

ミトコンドリア病の診断に有用な新規バイオマーカーとしてGDF15を同定した。

D . 考察

ミトコンドリア病のバイオマーカーとしてフィンランドの研究グループはFGF21を報告していた。FGF21とGDF15を同時に測定したところ、FGF21と比較してGDF15の方が感度・特異度ともに高いことが判明した。

1) 達成度について

ミトコンドリア病の早期診断を可能にする新規バイオマーカーを同定したことは大きな進歩である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでミトコンドリア病の診断には、血中の乳酸・ピルビン酸比(L/P比)、筋組織・培養線維芽細胞におけるミトコンドリア電子伝達系酵素活性の測定、ミトコンドリアDNAおよび核DNAの遺伝子検査などが用いられてきた。GDF15の血中レベルを測定することにより迅速にミトコンドリア病の診断が可能になる。ピルビン酸ナトリウム療法などの適切な治療法を早期に開始することができれば、症状の進行を遅らせることが可能になる。

3) 今後の展望について

GDF15の測定系をキット化し、ミトコンドリア病の重症度分類ならびに治療効果判定に利用する予定である。

4) 研究内容の効率性について

培養細胞における遺伝子発現解析の研究から、臨床の場で使用できる診断システムの開発に発展させたものであり、信頼性と実用性が確保されている。

E . 結論

以上の結果から growth differentiation factor 15 (GDF15)がミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表 投稿準備中

2. 学会発表

1) Yasunori Fujita, Masafumi Ito, Toshio Kojima, Yasutoshi Koga, Masashi Tanaka. Identification of potential biomarkers for mitochondrial diseases by global gene expression analysis. International Symposium on Mitochondria 2013. Tokyo November 7, 2013

2) Tanaka, M. Metabolomic and Transcriptomic analyses of MELAS cybrids for validation of pyruvate therapy and for discovery of new biomarkers. 10th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine. Seoul November 4, 2013

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15」特願2014-5391(平成26年1月15日出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし