

「ミトコンドリアミオパチーの原因解明」

研究分担者 後藤 雄一 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 部長
研究協力者 松本 直道 横浜市立大学 教授
竹下 絵里 国立精神・神経医療研究センター病院 医師
佐藤有希子 国立精神・神経医療研究センター病院 認定遺伝カウンセラー

研究要旨

ミトコンドリアミオパチーの約60%で原因が確定しておらず、そのほとんどが核DNAにコードされた核遺伝子と予想されている。1500余りのミトコンドリア関連タンパクが同定され、これまでに約200のタンパクの遺伝子に変異が報告されている。このような状況で、次世代シーケンサーで網羅的に原因遺伝子を検索することは研究的、臨床的に意義が高い。今年度は、約800のミトコンドリア関連タンパクをコードする遺伝子配列を調べるために、7368箇所の領域をキャプチャーするHaloplex®を用いた解析を生化学的に呼吸鎖酵素複合体機能低下症の2症例に試みた。その結果、それぞれに病因の可能性の高い遺伝子変異が、それぞれコンパウンドヘテロ接合体とホモ接合体で見いだされ、そのうち1例では表現系回復実験を行い病因と確定した。この方法の有用性が確認できた。今後はミトコンドリア機能異常が確定している症例についての解析を継続させるとともに、臨床診断への応用も視野に入れた活用法を追求する。

A. 研究目的

ミトコンドリアはATPを供給するオルガネラ(細胞内小機器官)で、その機能障害が引き起こす疾患としてミトコンドリアミオパチーがある。ミトコンドリアミオパチー患者はミトコンドリアDNA(mtDNA)もしくは核DNAコードのミトコンドリア関連遺伝子に病因変異を有する。従来の分子遺伝学的検査の大部分はmtDNAを対象としているため、核DNAコードの遺伝子に病因変異が確定している症例はそれほど多くない。実際、核DNAコードのミトコンドリア関連タンパク質は1500個以上に及び、それらの遺伝子すべてに疾患の原因があると推定され、今までに約200個の遺伝子に病的変異が同定されているのみである。

現在、ミトコンドリアミオパチー患者の約60%は病因が不明であり、そのほとんどが核DNAに病因的変異を有すると考えられている。

本研究ではmtDNAに変異を持たない症例について、次世代シーケンサーを用いて核DNAコードのミトコンドリア病関連遺伝子の変異を検索する方法を確立し、具体的に病因変異を特定することを目的とする。

B. 研究方法

1. 検体試料

国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリーには、すでに1500近くのミトコンドリアミオパチー患者の登録がある。臨床的に同病が疑われる患者から採取した凍結骨格筋を用いて、病理学的検査を行い、診断結果を担当医に報告するとともに、残余試料を研究に使用している。本研究では、ミトコンドリア病理異常や機能異常が確認され、欠失や点変異などのmtDNAの病的変異が同定されていない患者の筋組織、もしくは血液からのDNAを使用した。また、一部の患者では、

筋肉組織より樹立した筋芽細胞を解析に用いた。

2. 検体選定

過去 30 年以上の期間に収集した mtDNA に病的変異を持たない患者骨格筋は、おおよそ 1000 検体を保有している。その中で、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性を測定する生化学検査において服すの呼吸鎖酵素活性低下及びミトコンドリア DNA 由来タンパクの翻訳活性の低下している 2 検体を選定した。患者 1 は 1 ヶ月の男児で Leigh 症候群を呈し、患者 2 は 16 歳の男性で高乳酸血症を呈している。いずれの患者の両親も血族婚ではなかった。

翻訳活性に関しては、エメチンで各 DNA の翻訳活性を抑制した後に、35S メチオニンでラベルした 13 個のミトコンドリアタンパク質を PAGE で検出した (図 1)。

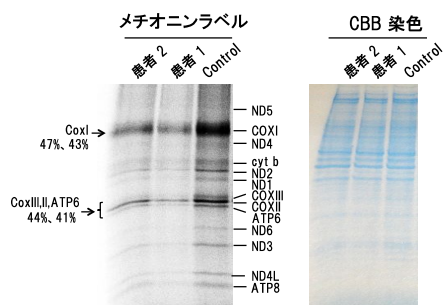


図1 生化学検査の結果 (翻訳活性)

患者由来筋芽細胞を用いて、細胞質の翻訳を停止させた状態で35Sメチオニンを用いてパルスラベルし、ミトコンドリア翻訳活性を検出した。左図はミトコンドリアの翻訳産物を示し、右図は同量のタンパク質が泳動されていることを確認するためのCBB染色像である。患者においてミトコンドリア翻訳活性がコントロールの40-50%に低下していた。

また、骨格筋を用いた呼吸鎖複合体 I の活性がコントロールの約 45%、複合体 II が 40%、複合体 III が 64% に低下していた。一方、患者 2 においては、呼吸鎖複合体 I の活性はコントロールの 26%、複合体 II が 23%、複合体 III が 39% に低下していた (図 2)。

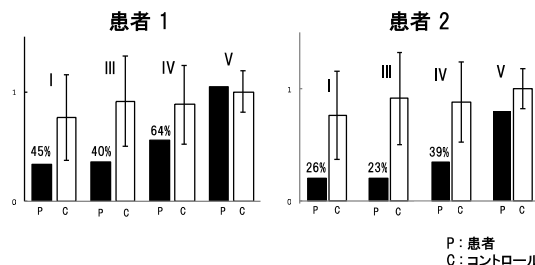


図2 生化学検査の結果 (呼吸鎖複合体酵素活性)

患者の骨格筋を用いた生化学検査において呼吸鎖複合体I-IVの活性を複合体IIの活性でノーマライズした値を示す。コントロールはミトコンドリア病でない5名の値。検体1、2とも複合体I、III、IVの活性低下が認められた。

3. シーケンス対象領域の選択

現在までにミトコンドリアミオパチーの核 DNA コードの病因遺伝子として報告されている約 200 遺伝子に加え、ミトコンドリア病を引き起こす可能性がある遺伝子として既知の病因遺伝子の類縁遺伝子や、遺伝子カスケードの前後に位置すると予想される遺伝子を選定した。さらに酵母のミトコンドリア関連遺伝子との類似性からミトコンドリアでの機能が予測される遺伝子のうち細胞内局在予測プログラム (Mitoprot) によりミトコンドリアへの局在の可能性が高い遺伝子を加え、合計約 800 遺伝子の 7368 領域をターゲットとした。ターゲット領域の抽出は HaloPlex® ターゲットエンリッチメントシステム (Agilent Technologies 社) を用い、添付のプロトコールに従って行った。

4. シーケンス及びその後の解析

次世代シーケンサーは MiSeq (illumina 社) を用いた。データの解析はアメリカ株式会社製のプログラム QCleaner、QMerge を用いて行った。その後の絞り込みは、イントロン領域の除去、同義置換変異の除去、ミスマッピングの除去、リード数が少なく判定不能なデータの除去を行い、公共的な SNP のデータベースを参照するなどして、その作業を行った。

(倫理面への配慮)

国立精神・神経医療研究センター倫理委員

会において、骨格筋の診断とその後の研究使用における研究計画の最初の倫理承認は平成9(1997)年1月であり、その後、倫理ガイドラインの改正や当センターにおける骨格筋管理の実態(培養細胞の追加、骨格筋レポジトリーを集中管理するトランスレーショナル・メディカルセンターの開棟など)に合わせ、平成13(2001)年7月19日、平成21(2009)年5月、平成24(2012)年8月に倫理委員会から承認を得ている。

C. 研究結果

1. Haloplex®を用いたターゲティング

これまで患者で報告のある200近くの遺伝子に加えて、600近くのミトコンドリア関連遺伝子を調べる目的で、総計7368領域をキャプチャーできる用に設計した。僅か2例の結果であるが、マッピングされたリード数は全体の82.3%であった(表1)。さらに、同一領域がマッピングされた数(depth)では、50以上のリード数の領域は、53.9%~54.5%、30以上のリード数の領域は64.2%~65.0%、10以上のリード数の領域は80.5%~81.5%であり、その後の解析に耐える比率であった。

	患者1	患者2
クオリティフィルターをパスしたリードの割合	99.4%	99.3%
上記のリードのうち、マッピングされたリードの割合	82.3%	82.2%
ターゲット領域の数	7368	7368
リードがマッピングされなかったターゲット領域の割合	3.2%	2.5%
10リード以上でカバーされているターゲット領域の割合	86.2%	84.2%
30リード以上でカバーされているターゲット領域の割合	73.4%	69.8%

表1. シーケンスリードのクオリティとターゲット領域のカバー率

2. 病因候補変異の絞り込み

7368の全ターゲット領域で見いだされた変異の数はそれぞれ、6295変異と6261変異であった。そこで、エキソン/スプライシング領域の変異に絞り、同義置換を除き、ミスマッピングの可能性の高いものを除き、リード数が少ないもの(10程度以下)の者を除くことで、それぞれ240変異、243変異に絞

られた(表2)。

サンプル番号	患者1	患者2
年齢・性別	1m Male	16y6m Male
臨床診断	Leigh脳症	高乳酸血症
血族婚	なし	なし
複合体活性	8%	20-30%
スーパーコンプレックス	60%	Not tested
解析パイプライン	BWA-GATK	BWA-GATK
キャプチャー方法	Haloplex	Haloplex
ターゲット領域の数	7368	7368
同定された全変異	5640	5534
エクソン/スプライシング領域の変異	1286	1289
同義置換変異を除く	811	818
ミスマッピングの可能性が高いものを除く	249	249
リード数が少なく(10程度以下)判定不能なものを除く	240	243
SNP登録ありを除く	16	12

表2 同定された変異と絞り込みの状況

さらに、公共的SNPデータベースやHGMD®を用いて、病的変異かSNPかの検討を行った。公共的SNPデータベースで検索すると、患者1については、登録のない変異が16個、患者2については、12個となった。患者1で見いだされた16個の変異は、いずれもヘテロ変異であった。そのうち同一の遺伝子に2つのヘテロ変異が見いだされた複合体サブユニット集合に係わる因子をコードする遺伝子Aは病因である可能性がある。また、患者2についてはSNP登録のない変異を12個見だし、そのうちの2個はホモ変異で存在した。この変異をもつ遺伝子BはミトコンドリアDNAの翻訳に係わるタンパクをコードしており、病因の可能性はある。

3. 遺伝子A(患者1)の病因確定

患者1で同一遺伝子上に2つの変異が確認された遺伝子Aについて、複合ヘテロ変異かどうかを確定できたのは、次世代シーケンサーでの結果であった。図3に示す通り、それぞれのリードに、どちらかの変異が同定された。

遺伝子名	機能	変異	SNP登録
遺伝子A	mtDNAコピー数調節?	c.T2G: p.M1R	なし
		c.C5T: p.A2V	なし

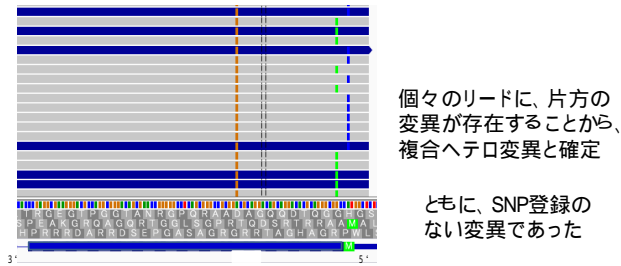


図3 患者1の原因遺伝子の有力候補

この遺伝子Aの2ヶ所の変異について、ゲノムDNAとcDNAを用いたサンガー法で変異確認を行ったところ、確かに2つの変異がヘテロで接合性に検出された。また、cDNAシーケンスの結果から、mRNAには質的变化はなく、新たなスプライシング異常などを起こしているものではないことが確認できた。

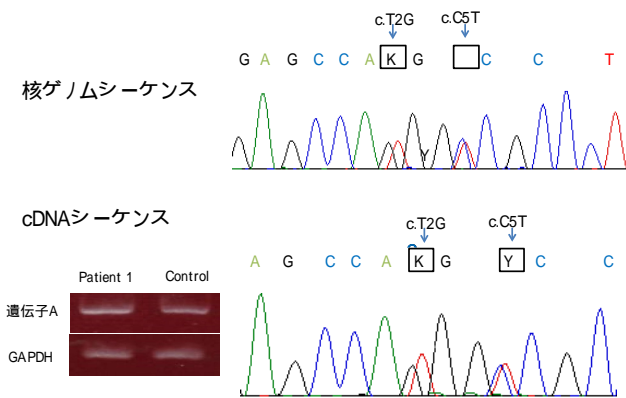
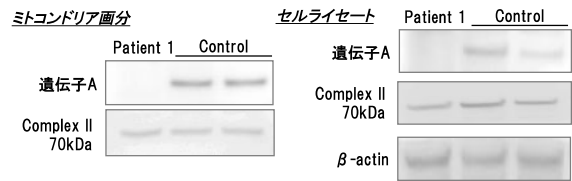


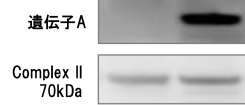
図4 サンガー法で変異の確認

さらに、タンパクレベルでの確認実験として、発現低下している患者由来細胞に正常な配列をもつ発現ベクターを導入して、発現が回復することを確認した。また、遺伝子Aの活性を測定する系を確立し、活性低下が回復することも確認できた。

〈筋芽細胞〉



〈骨格筋〉



患者由来細胞に野生型の遺伝子Aを導入し、患者細胞の表現型が回復することを確認した

→原因遺伝子と確定

図5 遺伝子Aのタンパク質発現

以上から、遺伝子Aの遺伝子変異は患者1の病因であると判定した。

4. 遺伝子Bの病因確定作業

患者2で見いだされた遺伝子Bが病因かどうかの確定作業は現在も継続中である。

D. 考察

ミトコンドリアミオパチーの病因としてすでに報告されている核DNAコードの遺伝子は200近くに昇っている。遺伝子型と表現型の関係は極めて複雑で、臨床症状から調べる遺伝子を選ぶことは困難であるのがミトコンドリア病の特徴である。このような点を考慮すると、多種類のミトコンドリアミオパチー原因核遺伝子を次世代シーケンサーで網羅的に解析することは理にかなっており、すでに欧米でもその戦略での原因遺伝子探索が進められている。

今年度はミトコンドリア関連タンパク質をコードする約800個の遺伝子をHaloplex®を用いたキャプチャー解析の方法で昨年見いだされた2例のうち、その1例の病因確定作業を中心に研究を進めた。

患者1の原因遺伝子候補は、次世代シーケンスの結果から複合ヘテロ接合性とわかり、現在標準的に用いられているサンガー法にて変異を確認した。さらに、タンパクレベルでの病因性の確認のためにレスキュー実験(表現型回復実験)を行い、タンパク量と酵素活性の両方で機能回復を認め、病因と確定した。

網羅的遺伝子解析を行う前提として、生化学的検査等を用いた詳細な機能解析を行って原因遺

伝子の確定できるように、臨床試料を用意しておくことが必要である。まだ最初の一例ではあるが、本研究では機能回復実験が可能な患者試料を確保していることが重要であり、その意味で培養細胞を含めた神経・筋疾患患者約1200例(そのうち、ミトコンドリア病患者症例は約300例)の試料が登録されている国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリーの持つ意味は大きい。

この点は、今後エキソーム解析やホールゲノム解析が次世代シーケンサーを用いて行われるように手法が進化しても、遺伝学的手法だけで病因の確定が困難になることは十分予想できる。したがって、ミトコンドリア機能解析を行う系を確立・運用しておくことが不可欠であり、特に疾患の臨床診断に応用する際には、さらにその重要性が増すと考えられる。

また別のキーとなる問題は、網羅的な解析を行う方法として、エキソーム解析を行うか、本研究で用いた有力な遺伝子群をキャプチャーして解析を行うかの選択である。ミトコンドリア病はそのほとんどがミトコンドリアに関連するタンパク質に原因があると予想され、すでに1500個ほどのミトコンドリア関連タンパク質のデータベースが構築されている。この点を考慮すると、キャプチャー解析を行うことは、次世代シーケンサーから出されるデータを効率的に解析し、病因遺伝子を同定できると考えられる。また、エキソーム解析を行った場合には、偶発的所見についての取り扱いを考慮することが不可欠になる。

E. 結論

本研究はこれまで病因変異の不明であったミトコンドリアミオパチー患者の核DNAコードの原因遺伝子の同定を行うものであり、約800の遺伝子をターゲットしたキャプチャー解析の有用性を示した。今後は機能解析(機能回復実験)が可能な試料をもつ患者を中心に症例を重ねてその研究的意義を高めつつ、臨床の現場にどのように応用させるかについての研究も行うことが肝要と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 著書、総説

後藤雄一. ミトコンドリア病, 「遺伝医学やさしい系統講義 18 講」, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, pp.95-111, 2013

後藤雄一. ミトコンドリア病, 「内科学、第10版」, 朝倉書店, 東京, pp.2339-2342, 2013

2) 原著論文

Ishiyama A, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Itagaki Y, Matsuzaki K, Nakura M, Nishino I, Goto Y, Sasaki M. Unusual exocrine complication of pancreatitis in mitochondrial disease. *Brain Dev* 35:654-659, 2013 August

Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene. *Brain Dev* 36: 180-182, 2014 Feb

2. 学会発表

1) 国際学会

Takeshita E, Mimaki M, Ishii T, Awazu M, Shinjoh M, Hasegawa T, Miki J, Hidaka Y, Motobayashi M, Kumagai E, Goto Y. Novel mitochondrial point mutation (m.9155A>G) in two patients with chronic renal failure caused by focal glomerular sclerosis. International Congress of Pediatrics 2013, the 27th Congress of the International Pediatric Association, Melbourne, Australia, 8.24-29, 2013

Ito S, Hirano Y, Nakano K, Goto Y, Ohtani Y, Shimada S, Ishigaki K, Funatsuka M, Oguni H, Osawa M, Nahgata S: The first case of infantile-onset spinocerebellar ataxia in Japan caused by novel autosomal recessive Twinkle/C12orf2 mutations. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013

Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita E, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y: Leigh-like syndrome associated with calci-

fication of the bilateral basal ganglia caused by mutaitons in mitochondrial poly(A) polymerase. International Symposium on Mitochondria 2013 , Tokyo , Japan, 11.6-11.7 , 2013

Yokota M, Hatakeyama H, Okabe S, Ono Y, Goto Y. Mitochondrial dysfunction is the barrier against cellular reprogramming. but not the maintenance of pluripotency. International Symposium on Mitochondria 2013 , Tokyo , Japan, 11.6-11.7 , 2013

Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y. *in vitro* neural modeling of various mitochondrial disorders using patient-derived iPSC cells. International Symposium on Mitochondria 2013 , Tokyo , Japan, 11.6-11.7 , 2013

Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y. Molecular pathogenesis and iPSC-cell-based disease modeling of MELAS caused by a mutation in anticodon-stem of *MTTW* gene. International Symposium on Mitochondria 2013 , Tokyo , Japan, 11.6-11.7 , 2013

2)国内学会

竹下絵里, 石井智弘, 栗津緑, 新庄正宜, 長谷川奉延, 三木純, 日高義彦, 本林光雄, 熊谷悦子, 後藤雄一: 巣状系球体硬化症による慢性腎不全を呈したミトコンドリア DNA9155A>G 変異の2例. 第116回日本小児科学会総会, 広島, 4.20, 2013

竹下絵里, 三牧正和, 西野一三, 埜中征哉, 後藤雄一: ミトコンドリア病の遺伝子診断には、long PCR 法、サザンプロット法、全周シーケンス法を用いた解析と総合的な判断が必要である. 第55回日本小児神経学会総会, 大分, 6.1, 2013

後藤雄一. 難病に対する生殖医療の近未来-アタ棚対策の方向性を求めて-. ART FORUM 2013, 大分, 8.5, 2013

根岸裕, 服部文子, 竹下絵里, 安藤直樹, 伊藤哲哉, 後藤雄一, 齋藤伸治. ミトコンドリア

DNA3697G>A ホモプラスミー変異を認めた Leigh 脳症の3同胞例. 日本人類遺伝学会第58回大会, 仙台, 11.23, 2013

三宅紀子, 矢野正三, 後藤雄一, 松本直通. UQCR2 ホモ接合性変異による新規ミトコンドリア呼吸鎖複合体欠損症. 日本人類遺伝学会第58回大会, 仙台, 11.23, 2013

竹下絵里, 三牧正和, 吉田寿美子, 西野一三, 後藤雄一. Leigh 脳症64例における原因遺伝子の検討. 日本人類遺伝学会第58回大会, 仙台, 11.23, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし