

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

ミトコンドリア病モデル細胞を用いて、乳酸存在下とピルビン酸存在下における網羅的遺伝子発現を比較し、乳酸存在下で発現が顕著に上昇する遺伝子群を同定し、その中から、細胞外に分泌される蛋白質を選択した。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であることが明らかになった。既存の抗体を用いて Parkin-Elmer 社の α LISA 法を約 1000 人の高齢者の血清中の GDF15 濃度を測定した。さらに、新たに GDF15 に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を製造し、ELISA 法に基づいた体外診断薬キットを試作した。

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。既存の抗体を用いてParkin-Elmer社の α LISA法を約1000人の高齢者の血清中のGDF15濃度を測定した。さらに、新たにGDF15に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を製造し、ELISA法に基づいた体外診断薬キットを試作した。

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

血清中のGDF15を測定する体外診断薬キットを開発し、性能試験を実施している。ピルビン酸投与開始後3ヶ月で、ミトコンドリア病重症度スコア(JMDRS, NMDAS)の改善とともにGDF15レベルの低下が観察されている。ピルビン酸ナトリウムの第a相臨床試験において、症状の改善と同時にGDF15値の低下が観察されるかどうかを検証する。

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GDF15がミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なサロゲートマーカーになる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yasunori Fujita, Masafumi Ito, Toshio Kojima, Shuichi Yatsuga, Yasutoshi Koga, Masashi Tanaka: GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial

diseases. *Mitochondrion* 20:34-42, 2015.

2. 学会発表

M. Tanaka, Y Fujita, M Ito, T Kojima, S Yatsuga, Y Koga: GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. Mitochondrial and Fetal Medicine 9th International Symposium of Genomic Medicine 2014, Changhua Christian Hospital, Taiwan, November 15-16, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

田中雅嗣、伊藤雅史、藤田泰典、古賀靖敏：ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15
国際特許出願 (PCT)

出願番号 PCT/JP2015/050833

発明の名称 ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15

出願日 2015年(平成27年)1月15日

国内移行期限 2016年(平成28年)7月15日

[優先権情報]

(1) P14019TAN, JP2014-223500, 2014.10.31

(2) P13027TAN, JP2014-005391, 2014.01.15

2. 日本国特許出願

出願番号 特願2014-223500

発明の名称 ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15

出願日 2014年(平成26年)10月31日

[優先権情報]

P13027TAN, JP2014-005391, 2014.01.15

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし