

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

ミトコンドリア病モデル細胞ならびにモデルマウスを駆使したピルビン酸ナトリウム療法に関する研究

研究分担者 中田 和人 筑波大学生命環境系 教授

研究要旨

本研究では、変異型ミトコンドリアゲノム (mtDNA) を導入したミトコンドリア病モデル細胞ならびにモデルマウス群を活用し、ピルビン酸ナトリウム療法の有効性を検討することを最終目的としている。今年度は、ミトコンドリア病状態にある細胞において投与したピルビン酸がミトコンドリアマトリクスに取り込まれ、TCA サイクルの基質として利用される可能性を考察するために、欠失型 mtDNA を含有したマウス培養細胞ならびにマウスの臓器におけるピルビン酸輸送体の発現変化を解析した (実験 1)。さらに、欠失型 mtDNA を含有したモデルマウスにピルビン酸ナトリウムを経口投与し、血中乳酸値の変化をモニターした (実験 2)。実験 1 の結果として、変異型 mtDNA の蓄積とともにピルビン酸輸送体の発現が上昇することが分かった。これは、投与されたピルビン酸が、特にミトコンドリア病状態の細胞では、ミトコンドリアマトリクスに運ばれ、エネルギー産生に利用される可能性を強く示唆している。また、実験 2 から、ピルビン酸ナトリウムの投与によってモデルマウスの高乳酸血症が改善する可能性を見出すことができた。

A. 研究目的

ミトコンドリアゲノム(mtDNA)に生じた欠失突然変異や点突然変異が、ミトコンドリア病のみならず、糖尿病や神経変性疾患、さらにはがんや老化など、多様な疾患の原因になる可能性が示唆されている現在、変異型mtDNA分子種を起点とした多様な病態発症機構の解明とそれらの有効な治療法の探索は急務である。本研究では、変異型mtDNAを導入したモデルマウス群の作製とその活用から、変異型mtDNAの病原性発症機構の分子基盤とその病理の解明を目指すとともに、これらのモデルマウスを活用したピルビン酸ナトリウム療法の有用性を検討することを目的としている。

ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム療法の効果は、1)細胞内のピルビン酸を増加させることで解糖系の駆動に必須であるNAD⁺量を増加させ、結果として解糖系によるATP産生をさらに惹起させる、2)細胞内の乳酸/ピルビン酸比を低下させることで高乳酸状態を改善させる、3)細胞内のピルビン酸を増加させることで、TCAサイクルの基質であるピルビン酸を増加させることで、結果としてTCAサイクル～電子伝達系を活性化し、ATP産生を増強させる、4)細胞内外での抗酸化作用が期待できる、などが想定されている。特に、TCAサイクル以降の代謝経路に異常を来しているミトコンドリア病では、前述の3)の効果による病態改善は極めて重要かつ独創的な代謝療法となる。

そこで今年度は、ミトコンドリア病状態のモデル細胞やマウスの臓器を活用して、これらにおけるピルビン酸輸送体の発現変化を調べた。この発現変化から、投与されたピルビン酸がミトコンドリアマト

リクスに運搬されるための生体環境が、実際のミトコンドリア病状態の細胞にあるのか、否かを考察しようと考えた(実験1)。また、欠失型mtDNAを導入したモデルマウスにピルビン酸ナトリウム療法を実施し、高乳酸血症の改善効果についても解析した(実験2)。

B. 研究方法

実験 1:

前述のように、ピルビン酸ナトリウム療法ではTCAサイクルの基質であるピルビン酸の細胞内濃度が上昇するため、TCAサイクル～電子伝達系によるミトコンドリアエネルギー産生が増強される可能性がある。しかしこのような反応には、細胞質のピルビン酸をミトコンドリアマトリクスにリクルートするピルビン酸輸送体 (Mitochondrial Pyruvate Carrier: MPC1とMPC2) の発現が律速となる。そこで、欠失型mtDNAを含有したマウス培養細胞(欠失型mtDNAを0%～91%含有)ならびに既に採取済みの欠失型mtDNAを含有した心筋組織(欠失型mtDNAを0%～86%含有)におけるMPC1とMPC2のmRNA量とタンパク質量をReal-time PCR法とウェスタンブロッティング法にてそれぞれ解析した。

実験 2:

欠失型mtDNAを導入したモデルマウスに対するピルビン酸ナトリウム療法の効果を検証するために、12個体のモデルマウス(欠失型mtDNAを33%～71%含有)ならびにコントロールとして欠失型mtDNAを含有しない3個体のマウスに体重 1kg 当たり0.25gのピルビン酸濃度になるようにピルビン酸ナトリウムを経口投与(1回/1日:投与継続中)した。投

与後の血中乳酸値の変化を測定し、高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム療法の有効性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、筑波大学動物実験委員会から承認された実験計画書をもとに、「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減等に関する基準」及び「文部科学省基本指針(研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針)」等の関連規則に沿って、実験動物マウスの飼育、麻酔、処置、安楽死、さらには実験従事者の健康維持にも配慮した実験体制を実現し、実施された。

C. 研究結果

実験 1:

欠失型mtDNAを含有したマウス培養細胞(欠失型mtDNAを0%~91%含有)におけるMPC1とMPC2のmRNAとタンパク質の量は、含有される欠失型mtDNAがおおよそ80%を超えると顕著に増加することが分かった。一方、欠失型mtDNAを含有した心筋組織(欠失型mtDNAを0%~86%含有)では、含有される欠失型mtDNAが60%を超えるとMPC1のmRNAとタンパク質の量が増加することが分かった。しかし、MPC2のそれらには大きな変化が見られなかった。

実験 2:

欠失型mtDNAを0%~71%含有するマウスにピルビン酸ナトリウムを投与すると、投与後10分では、含有する欠失型mtDNAの割合に関係なく一過的に血中乳酸値の上昇を見た。しかし、興味深いことに、投与後4時間以降では、欠失型mtDNAの含有率がおおよそ40%を超える個体群の血中乳酸値が投与前のそれより低値になることが分かった。

D. 考察

実験 1:

欠失型mtDNAを含有するマウス培養細胞ならびに心筋組織では、含有される欠失型mtDNAの割合が高い状態ではMPCの発現が増加していた(培養細胞ではMPC1とMPC2の両方、心筋組織ではMPC1のみ)。このような結果は、欠失型mtDNAの蓄積をみる細胞では、細胞内のピルビン酸を積極的にミトコンドリアマトリクスにリクルートし、TCAサイクルから電子伝達系へのフラックスを強化していることを示唆している。ピルビン酸ナトリウム療法では、このような代謝適応状態にある細胞にさらにピルビン酸を負荷するため、ミトコンドリアエネルギー産生をさらに惹起できると思われる。この可能性を検証するため、高ピルビン酸状態で欠失型mtDNAを含有するマウス培養細胞を培養し、ATP産生の増加ならびに酸素消費量の増加を検討する予定である。

実験 2:

欠失型mtDNAを含有するマウスにピルビン酸ナトリウムを投与すると、投与後4時間以降の血中乳酸値は投与前のそれより低値になることが分かった。これは、ピルビン酸ナトリウム療法によって高乳酸血症をコントロールできる可能性を示唆している。特に、生体内の慢性的な高乳酸状態はミトコンドリアエネルギー代謝を負に調節することが分かっているため、慢性的な高乳酸状態を打開できるピルビン酸ナトリウム療法はミトコンドリア病の治療戦略として有効である可能性が高い。現在、欠失型mtDNA

を含有するマウスに対するピルビン酸ナトリウム療法を継続しているため、これらのマウス群の血中乳酸値だけでなく、体重変化、ミトコンドリア病の発症遅延または抑制効果、寿命、組織病理解析などを随時、実施する予定である。これらの解析を総合し、ミトコンドリア病におけるピルビン酸ナトリウム療法の有効性を詳細に評価したい。

E. 結論

変異型mtDNAの蓄積とともにピルビン酸輸送体の発現が上昇することが示され、投与されたピルビン酸が、特にミトコンドリア病状態の細胞では、ミトコンドリアマトリクスに運ばれ、エネルギー産生に利用される可能性を示唆された。

F. 健康危険情報

本研究では人に関する健康危険情報は存在しない。また、現状、マウスにピルビン酸ナトリウムを投与してもマウスの飼育・維持・健康に顕著な異常は見られていない。マウスへの経口投与も熟練者が実施しているため、経口投与による死亡例は見られていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Haruka Yamanashi, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. Administration of an Antioxidant Prevents Lymphoma Development in Transmitochondrial Mice Overproducing Reactive Oxygen Species. *Exp. Anim.*, 63: 459-466, 2014 (査読あり)
- 2) Takehiro Takahashi, Masashi Yamamoto, Kazutoshi Amikura, Kozue Kato, Takashi Serizawa, Kanako Serizawa, Daisuke Akazawa, Takumi Aoki, Koji Kawai, Emi Ogasawara, Jun-Ichi Hayashi, Kazuto Nakada, and Mie Kainoh. A Novel MitoNEET Ligand, TT01001, Improves Diabetes and Ameliorates Mitochondrial Function in db/db Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 352: 338-345, 2015 (査読あり)
- 3) Takayuki Mito, Hikari Ishizaki, Michiko Suzuki, Hitomi Morishima, Azusa Ota, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Akiteru Maeno, Toshihiko Shiroyoshi, and Jun-Ichi Hayashi. Transmitochondrial mito-mice Δ and mtDNA mutator mice, but not aged mice, share the same spectrum of musculoskeletal disorders. *BBRC*, 456: 933-973, 2015 (査読あり)
- 4) Akinori Shimizu, Takayuki Mito, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. G7731A mutation in mouse mitochondrial tRNA(Lys) regulates late-onset disorders in transmitochondrial mice. *BBRC*, 459: 66-70, 2015.
- 5) Osamu Hashizume, Haruka Yamanashi, Makoto M. Taketo, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. A Specific Nuclear DNA Background Is Required for High Frequency Lymphoma Development in Transmitochondrial Mice with G13997 A mtDNA. *PLoS ONE* 10: e0118561. doi:10.1371/journal.pone.0118561, 2015 (査読あり)

2. 学会発表

- 1) Kazuto Nakada “Model mouse studies: Regulation of threshold effects on pathogenesis of mitochondrial DNA-based diseases” Euromit 2014, Tampere, Finland, 15th June, 2014(招待講演)
- 2) 中田和人「ミトコンドリア遺伝子疾患の病態発現機構」アディポ・サイエンスシンポジウム、千里ライフサイエンスセンター、2014年8月23日(招待講演)
- 3) 中田和人、石原直忠、林純一「突然変異型ミトコンドリアゲノムの病原性制御～ミトコンドリア・ダイナミクスの関与～」第87回日本生化学会大会、4S04a-5 細胞と個体におけるミトコンドリアの形成と機能維持、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都、2014年10月18日(招待講演)
- 4) 中田和人「ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理に関する基礎研究」国立遺伝学研究所研究集会～オルガネラゲノムに支配される生命現象～、国立遺伝学研究所、2014年11月7日(招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし