

ミトコンドリア病の病因研究の現状

Current status of research on etiology of mitochondrial diseases

Key Word

次世代シーケンサー(NGS), データシェアリング, ミトコンドリア DNA 変異



後藤 雄一

Yu-ichi Goto

国立精神・神経医療研究センター メディカル・ゲノムセンター センター長

ミトコンドリア病の病因は多様であり、ミトコンドリア DNA と核 DNA 上の遺伝子群の変異がある。近年の次世代シーケンサー(NGS)の応用により網羅的な解析が格段と進んでおり、両者の DNA 解析ともに NGS が主体になりつつある。一方で、複雑なミトコンドリア機能の解析には患者由来の組織や細胞が必要であり、それらを収集して基礎研究者とともに病因・病態研究を進めていくことが重要である。わが国のミトコンドリア病研究は臨床医と基礎研究者が連携して行う体制ができており、今後の成果が期待できる。

ミトコンドリア病はミトコンドリア機能が低下することによる病気の総称である。ミトコンドリアには1,500以上の分子が存在するので、その定義にすると膨大な数の疾患が含まれることになる。そのため、現在は便宜的に、ミトコンドリアのエネルギー代謝にかかわる機能障害によって起こる病気を総称することになっている。しかし、次世代シーケンサー(next generation sequencer: NGS)による解析の進展で、新しい原因遺伝子がつぎつぎと報告されている。

ミトコンドリアにおけるエネルギー産生に関連する分子は、エネルギー代謝経路に直接かかわる酵素群以外に、ミトコンドリア自体の生合成、オートファジー機構を含む形態維持に関する分子、ミトコンドリア DNA の複製や発現にかかわる分子、ミトコンドリアへの輸送にかかわる分子など、実にさまざまな機能分子の変化が病気の原因になりうる。したがって、ミトコンドリア病をエネルギー代謝にかかわる分子の変化に限定してみても、どこまでがエネルギー代謝かという点で明確な線が引きにくい。そういう意味で、最近の病因遺伝子発見のラッシュはミトコンドリア病の概念に少なからず影響を与えている。

ミトコンドリア病の原因となるのは、ミトコン

ドリア DNA 変異と核 DNA 上の遺伝子群である(図1)。本稿では、近年精力的に行われているミトコンドリア病の病因解析の現状と動向を、ミトコンドリア DNA と核 DNA に分けて解説する。

❖ミトコンドリアDNA検査の現状

ミトコンドリア DNA の特徴は、①細胞内に多数のコピーが存在すること(マルチコピー)、②核 DNA 上にミトコンドリア DNA 類似の配列が多数存在していること、③細胞ごとに変異の有無や変異の比率が違うこと、など核 DNA とは異なる性質がある点である。

現在一般的に行われているミトコンドリア DNA 検査の流れを図2に示す。まず、核 DNA 上のミトコンドリア DNA 類似配列を除外するために、ミトコンドリア DNA を一組あるいは二組のプライマーセットで PCR 増幅をしている。核 DNA 上の配列を除外するという目的ではあるが、逆にこれを行うことで間違った塩基が取り込まれるリスクも一定の確率であることになる。したがって、核分画とミトコンドリア分画を最初に分けてから DNA 分離を行う方法もあり、その点を考慮した DNA 分離キットも市販されている。しかし、ミトコンドリア DNA 欠乏(枯渴)を調べる

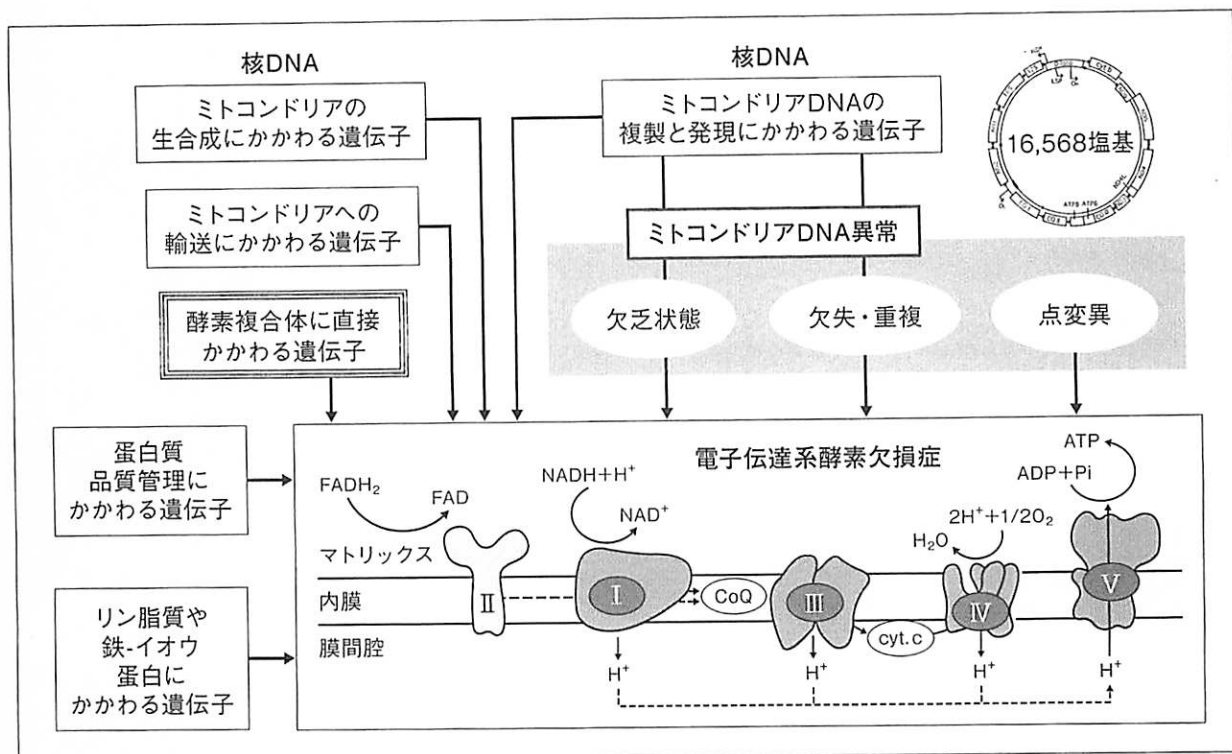


図 1 ミトコンドリア病の病因

ミトコンドリア病の病因は多彩である(表 1 も参照のこと)。核 DNA 上の原因遺伝子は優に 200 個を超えている。ミトコンドリア DNA の質的变化は欠失・重複などの構造変化と点変異であるが、マルチコピーであるミトコンドリア DNA は細胞内で、野生型と変異型が混在している場合(ヘテロプラスミー)、ほぼすべてが変異型の場合(ホモプラスミー)がある。単にミトコンドリア DNA コピー数が減少する欠乏(枯渇)状態でも病気になる。

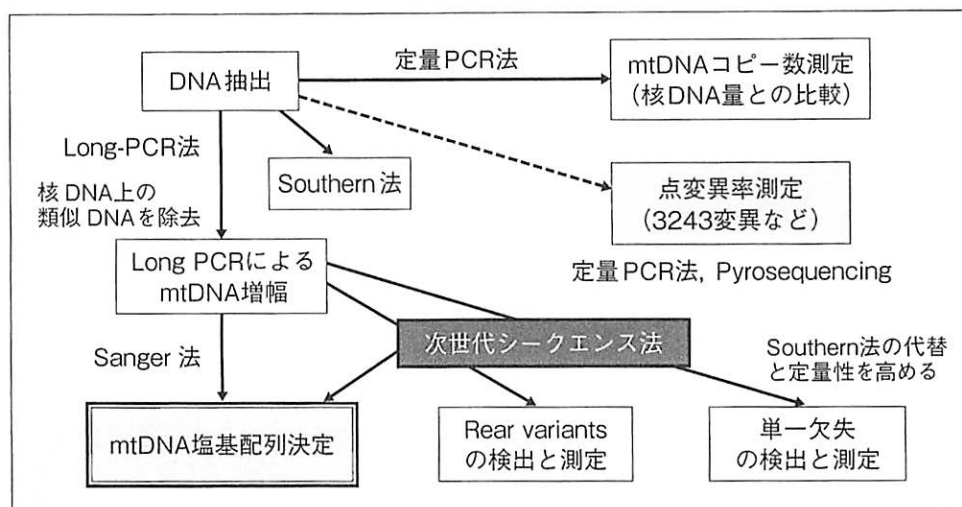


図 2 ミトコンドリアDNA解析の流れ

ミトコンドリア DNA は通常、核 DNA と一緒に抽出する(本文参照)。定量 PCR 法で核 DNA との相対比率でコピー数を推定する。頻度の高い変異は最初から定量 PCR やパイロシーケンスなどで変異の存在と変異率を計測する。通常の全周シーケンスは Sanger 法で行うが、解析前に核 DNA 上のミトコンドリア類似配列を除外するために long PCR を行う。次世代シーケンスは、まれなバリエーションや単一欠失の検出とその比率を調べることができる点で優れている。

ためにはミトコンドリア DNA 量の検査が必要であり、その場合に核 DNA に対する相対的なミトコンドリア DNA 量を調べるために、核 DNA とミトコンドリア DNA を一緒に分離する方法が一

般的である。

以前は病型に応じて頻度の高い点変異を調べる方法がよく行われてきたが、変異と病型との関係が緩く、病的点変異や欠失が存在すれば病型が一

表 1 核DNA上のおもな原因遺伝子とその機能²⁾

機能	原因遺伝子
1) リン脂質代謝	AGK, SERAC1, TAZ
2) 中毒分子の代謝	HIBCH, ECHS1, ETHE1, MPV17
3) 二硫化物代謝	GFER
4) 鉄-イオウ蛋白合成系	ISCU, BOLA3, NFU1, IBA57
5) 転移 RNA 修飾	MTO1, GTP3BP, TRMU, PUS1, MTFMT, TRIT1, TRNT1, TRMT5
6) アミノアシル転移 RNA 合成酵素	AARS2, DARS2, EARS2, RARS2, YARS2, FARS2, HARS2, LARS2, VARS2, TARS2, IARS2, CARS2, PARS2, NARS2, KARS, GARS, SARS2, MARS2
7) 転写調整因子	C12orf65
8) 転写伸長因子	TUFM, TSFM, GFM1
9) ミトコンドリアリボソーム蛋白	MRPS16, MRPS22, MRPL3, MRP12, MRPL44
10) mRNA プロセッシング因子	LRPPRC, TACO1, ELAC2, PNPT1, HSD17B10, MTPAP, PTC1D1
11) ミトコンドリア融合および分離因子	OPA1, MFN2
12) dNTP 合成系	DGUOK, TK2, TYMP, MGME1, SUCLG1, SUCLA2, RNASEH1, C10orf2, POLG, POLG2, DNA2, RRM2B
13) チアミンとリン酸の可溶性運搬体	SLC19A3, SLC25A3, SLC25A19
14) 呼吸鎖酵素系酵素サブユニット	<ul style="list-style-type: none"> • Complex I : NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFAF2, NDUFAF6, NDUFB11 • Complex II : SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF1 • Complex III : UQCRB, BCS1L, UQCRCQ, UQCRC2, CYC1, TTC19, LYRM7, UQCC2, UQCC3 • Complex IV : COA5, SURF1, COX10, COX14, COX15, COX20, COX6B1, FASTKD2, SCO1, SCO2, LRPPRC, TACO1, PET100 • Complex V : ATPAF2, TMEM70, ATP5E, ATP5A1 • Coenzyme Q10 deficiency : PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ4, COQ6, COQ8A, COQ8B, COQ9(secondary defects : ETFDH, APTX)
15) 蛋白質品質管理システム	FBXL4, AFG3L2, SPG7
16) ATP, ADP 運搬体	ANT1

義的に定まるものではないため、ミトコンドリア DNA 全体のシーケンスを行うことが一般的である。通常サンガー法で行っているが、変異率が低い(約10%)場合は同定が困難になる。正確な変異率を得るためには、定量PCRやパイロシーケンス法など他の方法を追加する必要がある。また、Sanger法は単一欠失例の欠失断点をとらえることもできる利点がある。欠失・重複についてはPCR法とともに、Southern法での量的評価が必要である。

上記のようなミトコンドリア DNA 検査方法が、NGSを中核とする検査方法へと大きく変化してきているのが現状である。その理由は、①ミトコンドリア DNA の場合、点変異や欠失などの質的变化とともに量的変化、すなわちヘテロプラ

スミー(一細胞内に野生型と変異型が混在)の程度を、NGSのリード回数(デプス)を増加させることで推定できる、②単一欠失も、デプスが極端に低下する領域に欠失断点があることで欠失領域を推定できる、からである。

しかし、血液ではミトコンドリア DNA 変異が同定できず、罹患臓器を用いて行うことが必要である。たとえば、ミトコンドリア DNA の多重欠失は血液では通常検出できず、罹患臓器である骨格筋でのみ確認できることが多い。また、筋生検時の不適切な検体処理や保存方法などによってミトコンドリア DNA が分断化し、正確な結果が得られない場合のあること、またわずかな量の欠失 DNA は細胞の老化現象の結果として出現することもあり、その意義を解釈する際に病因的と確定

できないこともある。適切な試料採取・保存、適切な検査、適切な解釈が重要である。

ミトコンドリア DNA 変異の情報については、MITOMAP が以前から共通データベースとして活用されている¹⁾。

◆核DNA上の原因遺伝子の解析

NGS を用いた解析が進展し、核 DNA 上に存在する原因遺伝子は増加の一途をたどっている。NGS を用いた遺伝子解析を行うとしても、①パネルを用いる方法、②エクソーム解析データのなかで興味ある遺伝子群の結果のみを解析する方法、が有力である。これらの方法では調べる遺伝子が限定されるので、別の疾患の原因遺伝子変異がみつかったりする二次的所見を生じることがない。しかし、NGS でみつかった変異は現在のところは Sanger 法で確認することが望ましく、NGS だけで検査が完結するわけではない。

みつかった遺伝子変異が病的意味のあるものかどうかの判定が、遺伝子解析のもっとも重要なステップである。得られたデータをほかの症例の遺伝子変異や多型データと比較検討することが有力な方法であり、そのためにできるだけ多くの症例データを共有する努力が必要である。欧米の同様な動きと歩調を合わせて、わが国でも大規模なデータ集積と共有化(データシェアリング)の研究事業が開始されることになっている。

核 DNA 上の原因遺伝子はすでに 200 種類以上になっている。それらの遺伝子の機能はエネルギー代謝に直接かかわるもの、ミトコンドリア DNA の複製と発現にかかわるものなど多彩である²⁾(表 1)。細胞レベルのレスキュー実験などで病因としての役割は確定したもの、病態の詳細が明らかになっていない原因遺伝子も多数存在する。

また、ミトコンドリア病のなかで比較的均一の病型として定義されている Leigh 脳症とその類縁疾患においては、関連する遺伝子は 2016 年に出版された論文で 75 種類以上とされた³⁾。そのなかの 10~20% はミトコンドリア DNA の変異であり、代表的な ATPase6 領域の変異を含む 13 個の変異がかかっている。結果として、Leigh 脳症とその類縁疾患患者の 80~90% は核 DNA 上の遺伝子

変異をもち、その種類は 62 種類以上になっており、さらに今後も増加していくことになるであろう。

◆今後の方向性

ミトコンドリアが関与する病態の広がりには想像以上に大きい。アメリカではじめられ、いまや日本を含め欧米各国がはじめている未診断患者のゲノム解析研究(undiagnosed disease program)によって、あらたに原因として明らかになる症例のなかにミトコンドリア関連の遺伝子がみつかることはよく知られている。従来のミトコンドリア病でみられた表現型とは異なる症例であっても、実はミトコンドリア機能異常がその本態であるということが見出される可能性がある。

ゲノム解析は血液が主体になることは避けられないとしても、得られたゲノム変異がもたらす機能変化はかならずしも血液では十分な検索対象にはならないことが多い。そのために、患者由来の組織がきわめて貴重であり、バイオリソースの重要性が理解できる。とくにミトコンドリア病ではあらゆる細胞・組織に影響を及ぼす可能性があることから、容易に取得できない脳や心臓の組織に近い性質をもつ研究材料が有用になる。患者培養細胞やそれに由来する iPS 細胞は新規原因遺伝子の病因性確認とともに、病態を理解するには格好の材料になりうる。

しかし、病因性の最終確認は機能解析であり、ミトコンドリア機能に関しての多様な解析手段が必須になる。患者由来の細胞や組織、iPS 細胞などの研究材料を得て多様な解析を行うことが重要である。その意味で、ミトコンドリアに関連する研究を行っている基礎研究者の関与が必須である。わが国では以前から“ミトコンドリア研究”は盛んであり、優れた基礎研究者が画期的な成果をあげており、その伝統と人脈を駆使してさらなるミトコンドリア病研究の進展が期待できる。

文献/URL

- 1) MITOMAP : <http://www.mitomap.org/MITOMAP>
- 2) Gorman, G. S. et al. : *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2** : 1-22, 2016.
- 3) Lake, N. J. et al. : *Ann. Neurol.*, **79** : 190-203, 2016.