

ミトコンドリア代謝・酸化ストレスの分子イメージング

Molecular imaging for mitochondrial metabolism and oxidative stress

Key Word

ミトコンドリア, 酸化ストレス, 分子イメージング, PET, MRI



井川正道(写真) 米田 誠

Masamichi IKAWA^{1,2} and Makoto YONEDA^{3,4}

福井大学医学部病態制御医学講座内科学(2)¹, 同附属病院神経内科・遺伝診療部², 福井県立大学看護福祉学部³, 福井大学高エネルギー医学研究センター⁴

ミトコンドリア機能・代謝障害および酸化ストレスは、ミトコンドリア病や多くの神経変性疾患の病態に関与していることが基礎研究から示唆されているが、これまで生体での評価は困難であった。最近のPET, SPECT, MRIによる分子イメージング技術の進歩によって、患者生体における局所的な病態変化を直接的・非侵襲的に評価することが可能となってきている。著者らは分子イメージングによって、ミトコンドリア心筋症患者におけるミトコンドリア代謝の変化、パーキンソン病(PD)や筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者における病態関連脳部位での酸化ストレスの増強、ミトコンドリア病(MELAS)の脳卒中様発作における病態の進展機序を明らかにしてきた。これらの知見は、ミトコンドリアや酸化ストレスを標的とした治療法の開発が重要であることを示唆している。今後の分子イメージングの発展が、ミトコンドリアがかかわる疾患における病態解明や治療薬開発を促すことが期待される。

ミトコンドリアは生命活動に不可欠なエネルギー産生を行っている細胞内小器官であり、独自の遺伝子(ミトコンドリア遺伝子)を有し、ヒトのほぼすべての細胞に存在している。ミトコンドリアでは解糖系やTCA回路から得られた電子(NADH)を、その内部にある呼吸鎖で受け渡し、最終的にエネルギー(ATP)を得ている(図1)。しかし、何らかの理由により、いったんその活動が低下すると、エネルギー産生の不足だけでなく、活性酸素種(ROS)の発生による酸化ストレス(酸化的傷害)を招き、疾患の原因あるいは一因となりうる。実際に多くの疾患、とくに、ミトコンドリア遺伝子変異によるミトコンドリア病(脳筋症)や心筋症、パーキンソン病(Parkinson's disease: PD)、筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)、アルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD)などの神経変性疾患など、エネルギー需要の高い臓器である脳や心筋の障害をきたす疾患において、ミトコンドリア機能障害および酸化ストレスの関与が病理や遺伝子、モデル動物

などの研究によって以前から強く示唆されている¹⁻³⁾。

これまで患者生体ではミトコンドリア機能・代謝や酸化ストレスの直接的な評価は困難であったが、PET(positron emission tomography), SPECT(single-photon emission computed tomography), MRS(MR spectroscopy)などの分子イメージング技術(「サイドメモ」参照)の開発・進歩によって脳や心筋などの臓器・病変における非侵襲的・リアルタイムな病態解析が可能となってきている。本稿ではその一端を紹介する。

❖ミトコンドリア代謝のイメージング

前述のようにミトコンドリアは、グルコースや遊離脂肪酸の代謝によってNADH(電子)を得て、内蔵する呼吸鎖(電子伝達系とATP産生酵素)でATPを産生している(図1)。このいずれの系が障害されてもミトコンドリア機能低下をきたす。したがって、ミトコンドリアで行われる代謝の評価はミトコンドリアがかかわる疾患の理解にとって

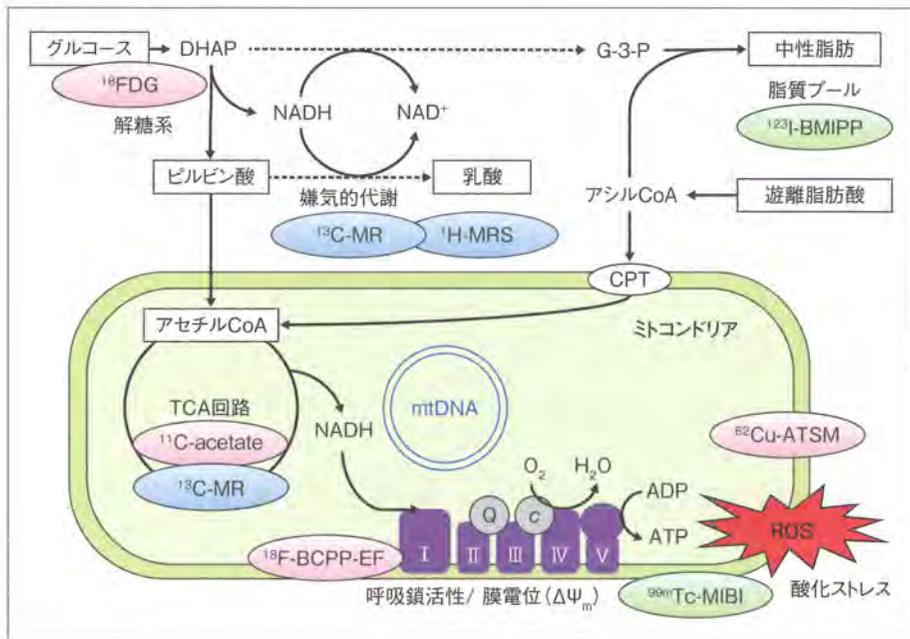


図 1 ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝とその分子イメージング⁶⁾

I・II・III・IV・V:呼吸鎖酵素複合体, CPT:カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ, DHAP:ジヒドロアセトンリン酸, G-3-P:グリセロール三リン酸, mtDNA:ミトコンドリアDNA, NAD:ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド, ROS:活性酸素種。

楕円形は代謝の各段階に対する分子イメージング手法を示す(桃色:PET, 緑色:SPECT, 青色:MRI), 詳細は本文参照。

非常に重要である。

著者らは、ミトコンドリア遺伝子変異による心筋症(ミトコンドリア心筋症)患者におけるミトコンドリア代謝の変化を、PET、SPECTを用いた分子イメージングによって明らかにしている。ミ

トコンドリア心筋症はおもに肥大型心筋症による心機能低下・心不全を呈し、A3243G変異をはじめとするミトコンドリア遺伝子の点突然変異などが原因となって発症する。A3243G変異は、代表的なミトコンドリア病であるMELAS(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes)症候群の原因にもなり、MELASの部分症として心筋症が現れることも多い。

SPECT用イメージング剤である^{99m}Tc-MIBIはミトコンドリア呼吸鎖がつくる膜電位に応じて心筋細胞内に取り込まれるため、ミトコンドリア呼吸鎖の活性を反映する。同じくSPECT用製剤である¹²³I-BMIPPは脂肪酸のアナログであるが、β酸化で代謝されず、アシルCoAを介して脂質プールに取り込まれる。ミトコンドリア代謝、すなわち好氣的エネルギー産生が低下すると、解糖系によるATP産生(嫌氣的代謝)が亢進するが、その際に発生したNADHの過剰状態(過還元状態)を解消するために、解糖系の中間代謝物を乳

サイドメモ

分子イメージング

分子イメージング(molecular imaging)は、PETやSPECTなどの核医学検査、MRSやASL撮影法などの機能的MRI検査を用いて生体内における分子レベルでの生物学的現象・過程を可視化(イメージング)する技術の総称である。とくにPETでは、ナノモラー(10^{-9} ~ 10^{-12} M)レベルの非常に高い検出感度を有し、特異性の高いリガンドの設計・投与によって生体における受容体や代謝の微小な変化をとらえることが可能である。さらに、PETにおいては薬理作用を起こさないほどのごく少量(マイクロドーズ)のリガンド(薬物)投与によって、イメージングによる動態解析を介して治療標的における薬物動態が評価できる。このためPETをはじめとした分子イメージングは病態解明の有力な手段としてだけでなく、より効果的な創薬のツールとしての期待が高まっている。

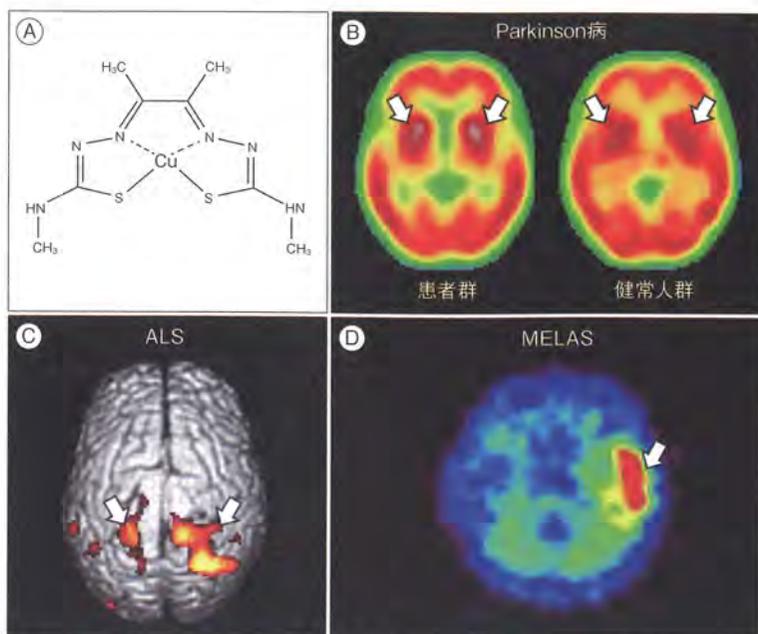


図 2 ^{62}Cu -ATSM PETによる酸化ストレスイメージング

- A: ^{62}Cu -ATSMの構造式。
 B: PD患者での検討。平均画像において患者群で健常人群に比べて、線条体(矢印)における集積増加が認められる¹³⁾。
 C: ALS患者での検討。統計学的解析(SPM)画像において、患者群で健常人群に比べて運動野・運動関連皮質(矢印)での集積増加が認められる¹⁵⁾。
 D: MELAS患者での検討。脳卒中様発作の亜急性期病変(矢印)において集積増加が認められる²³⁾。

酸発酵(ピルビン酸から乳酸へ)や、グリセロールリン酸シャトル〔ジヒドロアセトンリン酸(DHAP)からグリセロール三リン酸(G-3-P)へ〕によって処理し、代謝を維持している。変換されたG-3-Pは遊離脂肪酸由来のアシルCoAと結合し、中性脂肪(脂質プール)となるため、 ^{123}I -BMIPPの集積増加、すなわち脂質プールの増加は好氣的代謝から嫌氣的代謝(解糖系)へのシフトを反映している。また、PET用イメージング剤である ^{11}C -acetateは、アセチルCoAを介してTCA回路で代謝されるため、TCA回路における代謝の活動性を評価するのに有用である(図1)。

これらのPET, SPECTイメージングを用いて著者らは、ミトコンドリア心筋症患者においては心機能の重症度に比例して、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBIの心筋への集積は低下(洗い出し率が亢進)し、それに対して ^{123}I -BMIPPの集積は増加することを見出し、このような ^{123}I -BMIPP/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBIのミスマッチがミトコンドリア心筋症の特徴であることを明

らかにした⁴⁾。さらに、健常人と比較して、 ^{11}C -acetateで評価したTCA回路の代謝低下が認められた⁵⁾。以上の結果より、ミトコンドリア心筋症においてはミトコンドリア呼吸鎖の障害、TCA回路代謝の低下、およびそれに伴う嫌氣的代謝へのシフトが起こっていることが明らかになった⁶⁾。これらの代謝変化はミトコンドリア心筋症に特徴的であり、ほかの心筋症との鑑別にも用いることができる。

上記以外にもミトコンドリア代謝のイメージング手法として、従来からの ^{18}F FDG PETによる糖代謝(解糖系)、 ^1H -MRSによる乳酸(嫌氣的代謝)の測定に加え、近年では ^{13}C -ピルビン酸の投与による超偏極(hyperpolarized)MRI(^{13}C -MR)を用いたピルビン酸代謝(乳酸発酵、TCA回路など)の評価がおもに腫瘍の領域で臨床応用されつつある⁷⁾。また、まだ動物による前臨床の段階であるが、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iに選択的なPETリガンド(^{18}F -BCPP-EF)が塚田らによって

開発されており⁸⁾、臨床応用がまたれる。これらの分子イメージング手法を複合的に組み合わせることで、ミトコンドリア代謝が詳細かつ包括的に評価できるようになりつつある(図1)。

◆酸化ストレスのイメージング

冒頭で、ミトコンドリアはエネルギー産生の要だけでなく、ROS発生による酸化ストレスの源であることを述べた。解糖系などから得られた電子(NADH)はミトコンドリア呼吸鎖で受け渡され、最終的に酸素分子に捕獲されるが、呼吸鎖機能に障害があると、電子が過剰に滞留し(過還元状態)、酸素分子との不均衡が生じて大量のROSが発生・漏出して酸化的損傷を引き起こす(酸化ストレス)。実際にPDやALS、ADにおいて、患者剖検脳や髄液での酸化物増加や、家族性疾患の原因遺伝子の機能解析からミトコンドリア機能低下や酸化ストレス増強が示唆されてきたが、これまで患者生体での酸化ストレスの直接的な評価は困難であった。

著者らは酸化ストレスイメージングとして⁶²Cu-ATSM PETを開発し、各種の神経変性疾患における酸化ストレスの増強を患者生体で明らかにしてきた⁹⁾。⁶²Cu-ATSMは二価銅Cu(II)が中心に配位されたキレート錯体であり(図2-A)、電子が滞留している部位(過還元状態)にて銅[Cu(II)]が還元により一価銅[Cu(I)]となって錯体から外れ組織内に集積し、同時に銅(⁶²Cu)がβ⁺崩壊により陽電子を放出して集積部位を知らせる¹⁰⁾。すなわち、⁶²Cu-ATSMはROSの発生素地である過還元状態に集積するため、生体での酸化ストレスの直接的な評価(イメージング)を可能とする。実際に著者らおよびオーストラリアのグループは基礎的研究として、ミトコンドリア遺伝子A3243G変異を導入した細胞を用いて過還元状態に比例したCu-ATSMの集積増加を明らかにしており^{11,12)}、⁶²Cu-ATSMの集積は酸化ストレスを反映することを証明している。

実際にPD患者に対して⁶²Cu-ATSM PETを施行したところ、健常人群と比較して患者群における脳線条体への集積の有意な増加が認められた¹³⁾(図2-B)。線条体への集積はUPDRS(Unified

Parkinson's Disease Rating Scale)で評価した重症度と正の相関を示しており、PDにおける神経変性への酸化ストレスの関与を明らかにすることができた。さらに著者らは、¹²³I-FP-CIT(ドパミントランスポーター:DaT)SPECTを⁶²Cu-ATSM PETと同時期に撮影し、得られたDaTの分布密度、すなわち残存ドパミン神経細胞の密度で⁶²Cu-ATSMの集積を補正することによって、重症度(UPDRS)との相関がより強くなることを明らかにしている(投稿中)。この結果より、残存するドパミン神経細胞における酸化ストレスは疾患の進行に伴ってさらに増強しており、変性を加速させていると考えられた。近年、*Parkin*、*PINK1*、*CHCHD2*といった家族性PDの原因遺伝子がミトコンドリアの品質管理(mitophagy)に関与していることが明らかになっており¹⁾、遺伝子機能の面からもPDの病態におけるミトコンドリア機能低下・酸化ストレスの関与が強く示唆されている。多系統萎縮症においてもミトコンドリア内の代謝酵素遺伝子の異常が示されている¹⁴⁾。今後、これらPDの遺伝性あるいは関連疾患においても酸化ストレスイメージングによる病態解明が期待される。

著者らはALS患者においても⁶²Cu-ATSM PETによる酸化ストレスイメージングを実施し、健常人群に比べて患者群における運動野および運動関連皮質での有意な集積増加を見出している¹⁵⁾(図2-C)。これらの領域における集積はALSFRS-R(Revised ALS Functioning Rating Scale)で評価した重症度と正の相関を示しており、ALSにおける運動ニューロン変性への酸化ストレスの関与を明らかにすることができた。Cu-ATSMは治療薬としての可能性も示されており、オーストラリアのグループから非放射性Cu-ATSMの経口投与による*SOD1*変異ALSモデルマウスの運動機能・生存率の改善、病変部位における神経保護が報告されている¹⁶⁾。ALSではすでに、抗酸化薬であるエダラボンが治療薬として承認されているが、Cu-ATSMでは抗酸化作用に加えて変異*SOD1*への銅の補充が作用機序として推定されており、Cu-ATSMはあらたなALS治療薬の候補としても期待されている。

PD, ALS だけでなくほかの神経変性疾患、とくに AD においてもミトコンドリア機能障害および酸化ストレスの関与が以前から示唆されている³⁾。脳血管障害においても同様であり、著者らのグループでは慢性期脳虚血性疾患患者において、¹⁵O ガス PET による脳酸素摂取率(OEF)類似の画像を⁶²Cu-ATSM PET によって得ている¹⁷⁾。今後、これらの疾患においても酸化ストレスイメージングによる検討を予定している。

⁶²Cu-ATSM はこれまでのところ、酸化ストレスに対する唯一の PET イメージング剤であるが、半減期が短く(10 分)、信号ノイズ比が比較的低いことが問題点であった。現在、著者らはより半減期の長い(13 時間)⁶⁴Cu-ATSM の臨床応用を開始しており、さらに PET/MR 一体型スキャナで撮影することによって、より感度・特異度の高い画像データが得られるようになってきている。このほかに、まだ動物による前臨床の段階であるが、中国のグループによってスーパーオキシドに選択的な PET リガンド(¹⁸F-12)も開発されており¹⁸⁾。今後、酸化ストレスを標的としたイメージングはさらに発展していくものと考えられる。

◆MELAS脳卒中様発作のイメージング

ミトコンドリア遺伝子変異によるミトコンドリア病である MELAS はおもに A3243G 変異が原因となり、心筋症、糖尿病、難聴といった症状のほかに、繰り返し出現する脳卒中様発作が特徴的である。心筋症と並んで脳卒中様発作が MELAS 患者の予後を規定するため、発作の出現・進展機序の解明が望まれている。著者らはこれまでイメージングを用いて、MELAS 脳卒中様発作の病態解明を行ってきた¹⁹⁾(図 3)。

まず、MRI での ASL(arterial spin labeling)撮影法によって、脳卒中様発作の急性期では発作病変の局所脳血流は著明に上昇し、経過とともに低下することを明らかにした²⁰⁾。ASL は造影剤を使用せずに灌流画像が得られる撮影法であり、通常の MRI と同時に撮影できるため、局所脳血流の経時的な評価に適している。さらに、後方視的に検討すると、発作発現の3カ月以上前の間欠期から、発作病変の出現に先行して潜在的な局所脳血流の

増加が同部位に認められた²¹⁾。脳卒中様発作の病態として脳血管の機能不全(angioopathy)が唱えられており、angioopathy を反映した所見として、発作急性期における病変部位の血管拡張や、ADC (apparent diffusion coefficient) 画像による血管原性浮腫が知られている²²⁾。今回の結果は発作出現のはるか以前から angioopathy が潜在的に先行していることを示すものであった。続いて著者らは、脳卒中様発作をきたした患者に⁶²Cu-ATSM PET(酸化ストレス)と¹⁸FDG PET(糖代謝)の撮影を経時的に行い、発作病変においては急性期には糖代謝が亢進し、それに続く亜急性期には酸化ストレスが増強していることを明らかにした²³⁾(図 2-D)。さらに、¹H-MRS を長期間にわたり経時的に撮影したところ、発作病変以外の見かけ上正常な部位においても、潜在的な乳酸の蓄積と神経細胞密度(NAA)の低下が認められた²⁰⁾。

以上の結果より、MELAS 脳卒中様発作ではもとのミトコンドリア機能障害に由来する潜在的な脳血管(内皮・平滑筋細胞)の機能不全(angioopathy)があり、感染やストレスなどへの反応によるエネルギー需要の増大(hyperexcitability)などの要因によって発作が誘発され、急性期には血管拡張・血流増加による血流不均衡や血管原性浮腫に加え、脳細胞(神経・グリア細胞)におけるエネルギー産生・細胞機能の低下(cytopathy)、およびそれに伴う嫌氣的代謝へのシフト(解糖系の亢進、乳酸発酵の増加)が起こり、その結果として酸化ストレスの増強を招き、最終的には細胞機能が障害されて神経細胞死に至るといった病態機序が明らかとなった²³⁾(図 3)。

病態機序の解明によって、特異的治療薬の開発促進が期待できる。さらに、イメージングは治療標的における治療薬の効果の直接的な判定に用いることができる。実際に、MELAS ではすでに L-アルギニンによる脳卒中様発作の軽減や抑制が古賀らによって示されている²⁴⁾。著者らは¹¹C-acetate PET によって、L-アルギニンによる心筋での TCA 回路の代謝改善を明らかにしており、臨床症状だけでなく代謝面でも改善効果があることを示している⁵⁾。現在、ミトコンドリア代謝を改善させるピルビン酸や、抗酸化作用を有する

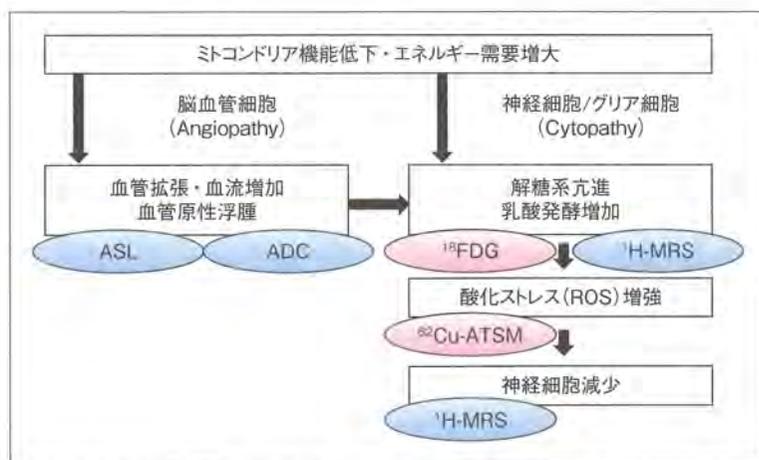


図3 分子イメージングによる知見をもとにしたMELAS脳卒中様発作の病態機序
楕円形は代謝の各段階に対する分子イメージング手法を示す(桃色:PET, 青色:MRI)。
詳細は本文参照。

EPI-743 などのあらたな治療薬が臨床応用の段階となっており、今後、分子イメージングで解明された病態機序の各段階に対する治療薬の開発が期待される。とくに、ASL 画像で脳卒中様発作の前段階がとらえられたように、顕在化前に変化をとらえて治療介入を行えば、発作の抑制にもっとも有効であると考えられるため、経時的に病態・病期を評価できるイメージング手法は、適切な治療戦略を考えるうえで不可欠なものになってくるであろう。

❖おわりに

以上、ミトコンドリア代謝、酸化ストレスを中心とした分子イメージングの現状と可能性について概説した。分子イメージングによって各疾患の病態におけるミトコンドリア代謝の変化や酸化ストレスの増強が明らかになり、今後より多くの疾患において詳細・包括的な評価が可能になることが期待される。さらに、病態評価だけでなく、イメージングで得られた病態機序をもとにした治療薬の開発や、患者生体における治療効果のリアルタイムな評価方法として、分子イメージングの果たす役割は今後ますます大きくなると考えられる。

謝辞：本稿で紹介した研究の共同研究者である福井

大学高エネルギー医学研究センター・岡沢秀彦教授、
同医学部放射線医学・木村浩彦教授に深謝いたします。

文献

- 1) Abeliovich, A. : *Nature*, **463** : 744-745, 2010.
- 2) Kiernan, M. C. et al. : *Lancet*, **377** : 942-955, 2011.
- 3) Querfurth, H. W. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **362** : 329-344, 2010.
- 4) Ikawa, M. et al. : *Mitochondrion*, **7** : 164-170, 2007.
- 5) Arakawa, K. et al. : *Circ. J.*, **74** : 2702-2711, 2010.
- 6) Ikawa, M. et al. : *Circ. J.*, **74** : 2560-2561, 2010.
- 7) Wilson, D. M. et al. : *J. Nucl. Med.*, **55** : 1567-1572, 2014.
- 8) Tsukada, H. et al. : *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **41** : 755-763, 2014.
- 9) Okazawa, H. et al. : *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **58** : 387-397, 2014.
- 10) Fujibayashi, Y. et al. : *J. Nucl. Med.*, **38** : 1155-1160, 1997.
- 11) Yoshii, Y. et al. : *Nucl. Med. Biol.*, **39** : 177-185, 2012.
- 12) Donnelly, P. S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109** : 47-52, 2012.
- 13) Ikawa, M. et al. : *Nucl. Med. Biol.*, **38** : 945-951, 2011.
- 14) Multiple-System Atrophy Research Collaboration : *N. Engl. J. Med.*, **369** : 233-244, 2013.
- 15) Ikawa, M. et al. : *Neurology*, **84** : 2033-2039, 2015.
- 16) Roberts, B. R. et al. : *J. Neurosci.*, **34** : 8021-8031, 2014.
- 17) Isozaki, M. et al. : *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **38** : 1075-1082, 2011.
- 18) Chu, W. et al. : *Org. Biomol. Chem.*, **12** : 4421-4431, 2014.
- 19) Yoneda, M. et al. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1820** : 615-618, 2012.
- 20) Tsujikawa, T. et al. : *Brain Dev.*, **32** : 143-149, 2010.
- 21) Ikawa, M. et al. : *Mitochondrion*, **13** : 676-680, 2013.
- 22) Yoneda, M. et al. : *Neurology*, **53** : 2182-2184, 1999.
- 23) Ikawa, M. et al. : *Mitochondrion*, **9** : 144-148, 2009.
- 24) Koga, Y. et al. : *Neurology*, **64** : 710-712, 2005.