

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(枯渇)を調べる

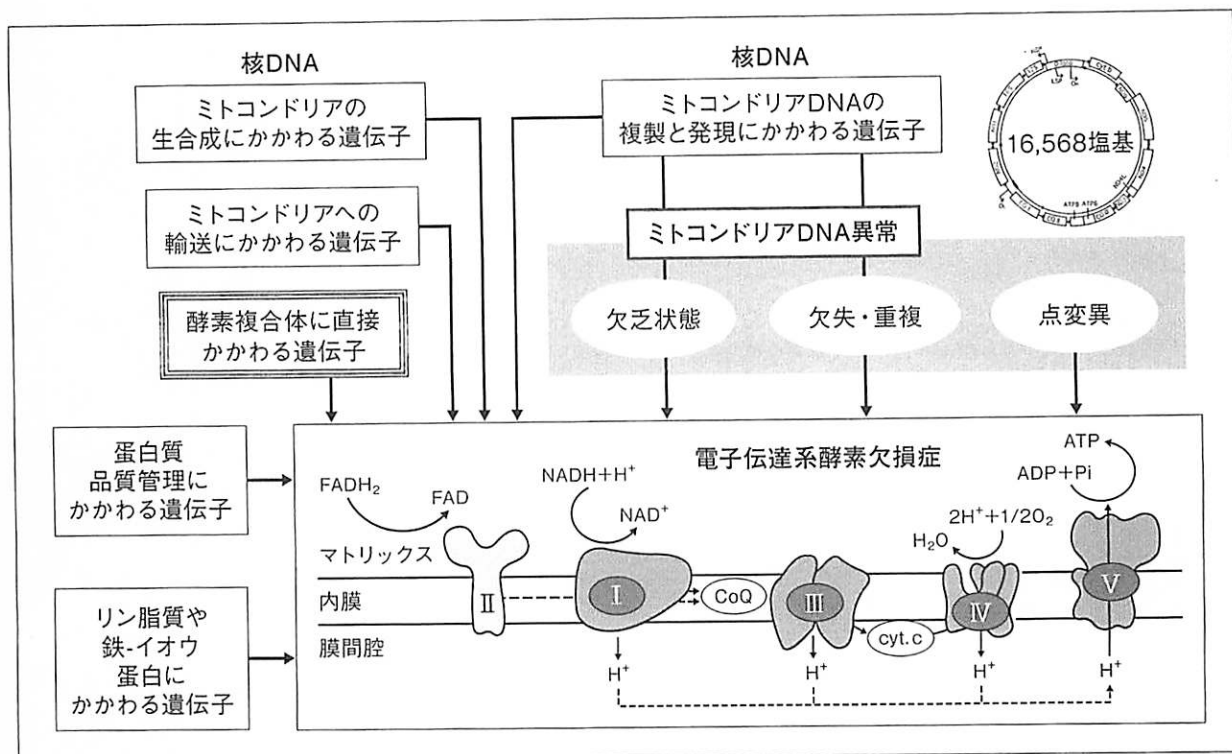


図 1 ミトコンドリア病の病因

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。

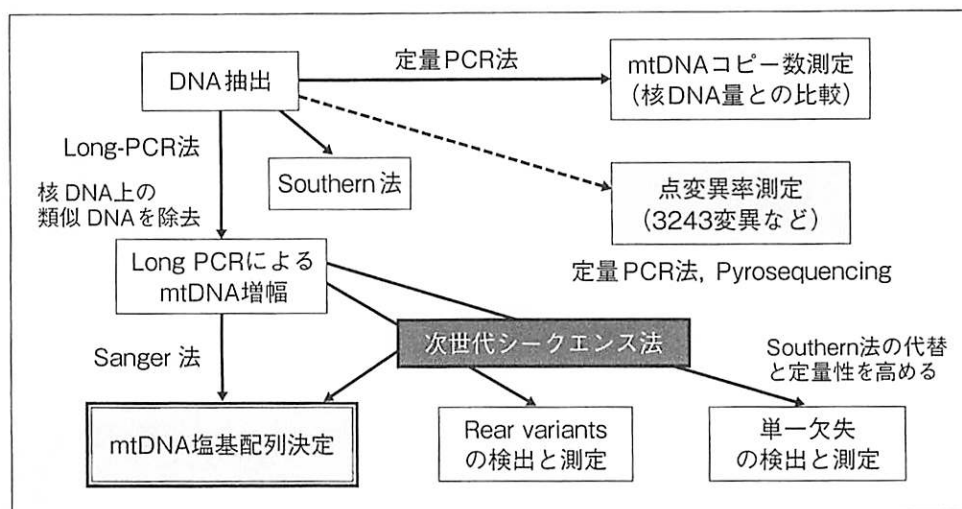


図 2 ミトコンドリアDNA解析の流れ

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.

ミトコンドリア病に対する医療体制の現状と課題

Current status of medical care system for mitochondrial diseases

Key Word

ミトコンドリア病, 指定難病, 診断システム



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医療は正確な診断に基づいた特異的な治療を行うことが理想である。しかし、ミトコンドリア病は“多様性”という特徴があるがゆえに、正確な診断のためには疾患(検査)専門家の関与が必須であり、集約的な診断システムを構築して対応している。また、臨床症状が多臓器に及ぶため、担当医師団がチームとして活動することが多く、そのコーディネーター役として小児科医と神経内科医の役割が重要である。最近新しい薬剤の臨床試験がはじまっており、日頃患者をみる難病基幹病院とともに、疾患専門家のいる難病専門診断治療センターや臨床試験実施にかかわる病院ネットワークが重要になる。

ミトコンドリア病の特徴はミトコンドリア自体がもつ多機能が反映したものであり、それはDNA、ミトコンドリア、細胞、組織・臓器などの各解剖学的レベルの特徴と相まって、複雑な“多様性”を形づくっている。臨床的には、いかなる臨床症状、いかなる発症年齢、いかなる臨床経過、いかなる遺伝形式としても認められ、患者はどの診療科にもかかる可能性がある。中枢神経症状を呈することが多いので、子どもでは小児科、成人では神経内科を受診することが普通である。しかし、糖尿病、難聴、視力低下など、小児科・神経内科以外の診療科を訪れる患者もいる。ミトコンドリア病を担当医が認識していないために、長い間診断が定まらない患者がいることも事実であり、“隠れミトコンドリア病”患者が数多く存在している可能性がある。確定診断に至らない場合は原因不明の疾患として経過をみられており、対応可能な症状に対する加療(対症療法)がなされているのみと推測される。

適切な医療の出発点は正確に診断することである。その意味でミトコンドリア病を診断することはきわめて重要なことでありながら、その診断には専門的な検査技術と経験・知識を必要とする。

その点を最初に論じたい。

ついで、確定診断がついた患者に対してどのように対応するかであるが、これには対症療法と根治治療があり、実はDNA、ミトコンドリア、細胞、組織・臓器などの各解剖学的レベルに応じた対応策の候補が出てきている。本特集の他稿で、ミトコンドリアターゲティング、薬物治療(臨床試験)、生殖補助医療などの解説がされている。本稿では、ミトコンドリア病に対する医療を実践するために、社会資源や難病政策全体の方向性との関係について述べる。

❖ミトコンドリア病の診断とその体制

ミトコンドリア病の診断にはミトコンドリアの変化を多次元でとらえる必要があり、遺伝子検査、病理検査、生化学検査の3つが必要である。それらはそれぞれ、①DNAレベル、②ミトコンドリア・細胞レベル、③細胞・組織レベルのミトコンドリア変化をとらえる手段であるからである(図1)。

遺伝子検査は病因を決定するにはもっとも決定的な所見を提供する。その遺伝子変異が実際に病気を発症させているかどうかを確かめることが確

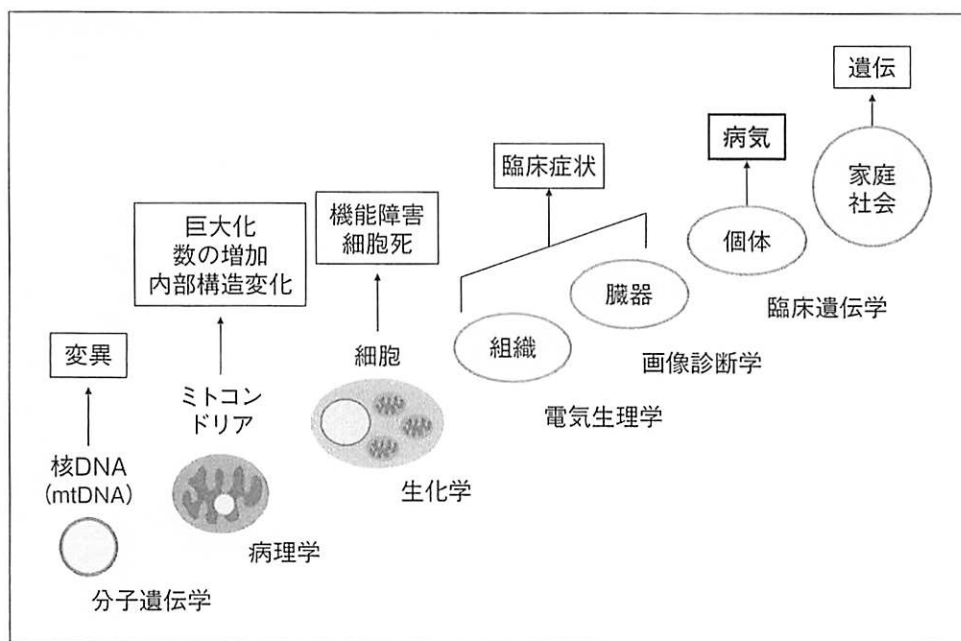


図 1 ミトコンドリア変化のレベルとアプローチ方法

ミトコンドリア変化は DNA, ミトコンドリア, 細胞, 組織, 臓器, 個体レベルで認められる。それぞれの解剖学的レベルに応じて、変化をとらえることができるが、そのためには種々のアプローチの方法を駆使することが必要になる。とくに細胞以下のレベルは確定診断に必須であり、分子遺伝学、病理学、生化学は検査の基本になる。

定診断であり、病理や生化学でのミトコンドリア変化の確認が診断の精度を高めることになる。

なぜ単独の検査で確定診断することを避けるべきかという点を解説しておきたい。たとえば、遺伝子検査で病因の候補となる変異が同定された場合、すでに病因として報告されていれば文献的にエビデンスがあるということになるが、その報告の内容が問題であり、当該遺伝子変異の機能解析がきちんとされていればよいが、曖昧な報告の場合はエビデンスとなりえないこともある。この点を考慮して、OMIM(Online Mendelian Inheritance in Man) や ClinGen(Clinical Genome Resource), MITOMAP などの数多くの遺伝子変異データベースが公開されており、HGMD (Human Genome Mutation Database) のように市販されているものもある。ただし、それを参照したとしても病因と確定できないことは多々あり、その際には個々の遺伝子変異に対応した機能解析が必要になる。その機能解析は研究者の視点での取組みが必要であり、データベースを調べれば問題が解決することにはならないことを十分理解してデータベースを使用することが肝要である。不十分な証拠でミトコンドリア病と診断して不要な

ビタミン剤などを投与することは医療的に問題になる。

本特集・著者らの「ミトコンドリア病の病因研究の現状」の稿でも述べたように、ミトコンドリア DNA 検査の特徴として、血液では変異を見出せずに、罹患している箇所(とくに骨格筋)で変異が同定できる場合や、別の要因で骨格筋病変が生じた結果、多種類のミトコンドリア DNA 欠失が認められる場合(封入体筋炎など)がある。そもそも NGSを用いた遺伝子検査をしても、ミトコンドリア DNA や核 DNA 上に変異がきちんと同定できないことも多い。すなわち、遺伝子検査でも得られた結果が一次的か二次的かを判断する必要がある。

同様に、病理検査においてミトコンドリア変化の代表とされる赤色ぼろ線維(ragged-red fiber: RRF)やシトクローム酸化酵素欠損線維も小児皮膚筋炎や高齢者の筋では非特異的に出現することがある。さらに生化学検査では、もっとも頻度の高いシトクローム酸化酵素活性低下は寝たきりの患者や麻痺のある患者(不動症)でも認めることがある。すなわち、どのような状態で採取した試料でどのように検査したか、検査値に影響する要因

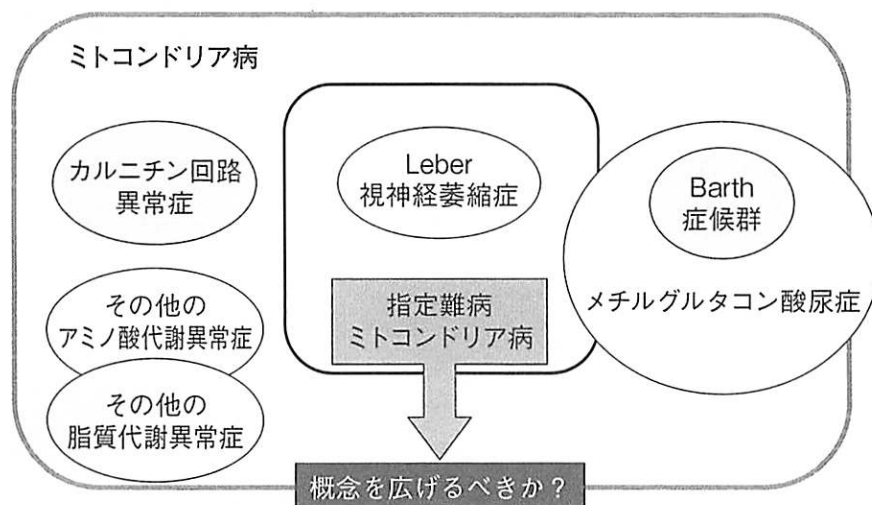


図 2 指定難病ミトコンドリア病の概念

中央に現行の指定難病ミトコンドリア病があるが、その中に別の指定難病である Leber 病が含まれている。また、平成 29 年度(2017)にカルニチン回路異常症やほかの謝酵素異常症があらたに指定難病に指定されようとしている。臨床病名と生化学的病名の合理的な共存が必要であるが、ただちにすっきりしたものになることは難しいであろう。

がないかを把握して、その結果の解釈を行うことが必要である。

したがって、遺伝子検査、病理検査、生化学検査のそれぞれに専門的な知識や経験が必須であり、さらに、得られた結果を検証できる(研究的)体制も必要である。その意味で希少疾患であればあるほど、検査を行う施設や人(専門家)を確保して集約化した診断体制を敷くべきである。ミトコンドリア病についてはミトコンドリア学会HPにそれらの検査を引き受ける施設が一覧表で示されている(<http://j-mit.org/160330kensaihiran.pdf>)。

❖指定難病としてのミトコンドリア病の診断

平成 27 年(2015)に制定された、通称“難病法”によって、それまで54疾患に絞られていた特定疾患が110疾患に拡大され、“指定難病”と名称が変わった。ミトコンドリア病はすでに特定疾患として認められていたが、指定難病になる時点でその診断基準を改定した(表 1)。また、指定難病では重症度判定が必須であり、中等度以上の重症度の患者には医療費援助が行われることから、その分類表を作成した。

難病や指定難病の規定が明確化され、数千といわれる難病に対して指定難病にすべき疾患を慎重に検討しながら、厚労省は対象疾患を増加させて

いる。平成 28 年(2016)現在は 306 疾患であるが、平成 29 年度(2017)からはさらに 24 疾患が追加される予定である。さきに述べたように、これら 330 疾患のひとつがミトコンドリア病であるが、ミトコンドリア病の一病型と考えられるレーベル遺伝性視神経症(Leber hereditary optic atrophy: LHON)が別の疾患として含まれたり、ミトコンドリア内の酵素欠損症であってミトコンドリア機能障害が本態である病気が今後含まれる予定であり、かならずしもすっきりした分類にはなっていない(図 2)。

とはいうものの、患者やその家族のために正確な診断を得て医療費援助が受けられるように制度設計することがもっとも重要であり、日本ミトコンドリア学会などの研究者コミュニティはその事業に積極的にかかわっている。また、小児慢性特定疾患事業と指定難病事業が連動し、小児患者が成人に達した際にシームレスに移行できる体制も必要になる。

❖ミトコンドリア病の治療体制と今後の方向性

ミトコンドリア病の特徴は臨床的多様性であり、患者はいろいろな診療科を初診するばかりでなく、多臓器の症状を有することから、同時に多くの診療科で診てもらったことが多い。その場合は

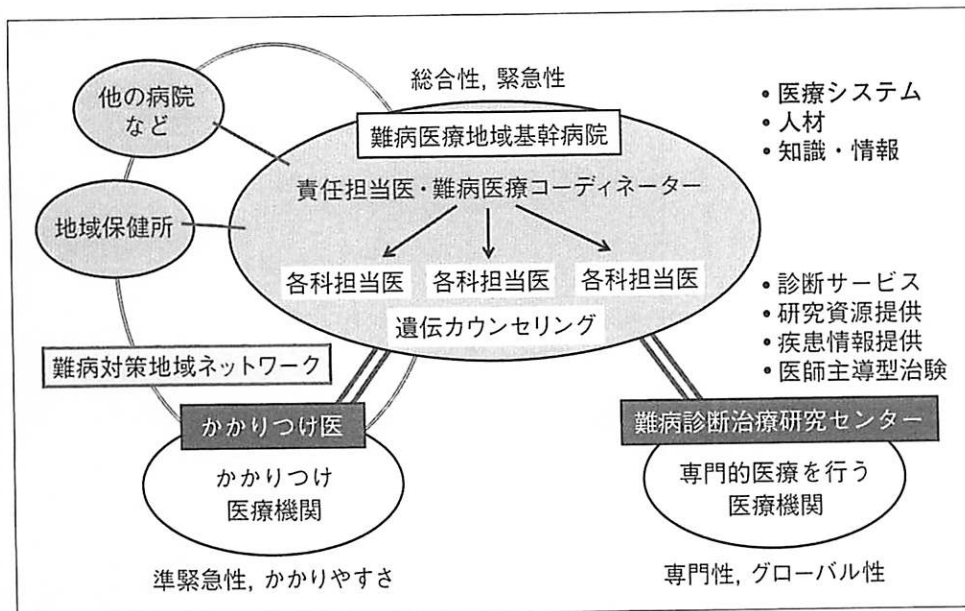


図3 ミトコンドリア医療の全体像と将来

ミトコンドリア病は希少疾患であり、難病である。患者を診てゆくには、難病医療に共通する医療システムと人材、知識・情報共有が必要である。中央には、ミトコンドリア病患者を日頃診る難病医療地域基幹病院(総合病院)があり、多臓器に及ぶミトコンドリア病に対応する必要がある。同時に、家の近くのかかりつけ医や医療機関、一方であらたな治療法の開発に関係する専門性の高い難病診断治療研究センターが必要である。

多科が併設されている総合病院での診療が適している。また、臓器別診療の弊害がでないように全人的に診るコーディネーター機能が必要になる。その役割を担うのは多くの場合、小児患者ならば小児科医、成人患者ならば神経内科であろうと推察できるが、中枢神経症状のない成人ミトコンドリア病患者の場合は主要な症状を診ている担当医がその任にあたるのが望ましい。

また、感冒などの軽症の合併症は家の近くで診てもらうこともあり、保健所機能を最大限活かす難病対策地域ネットワークが動くとう用であろう。また、最新の疾患情報を得たり、臨床試験を考慮したり、また通常の診療経過について定期的に疾患専門家からアドバイスを受ける機会を得る

ために、ミトコンドリア病の難病診断治療研究センター施設にかかることも必要である(図3)。

とくに、疾患情報の取得や臨床試験をどのように進めていくかを考えると、専門性の高い病院群を用意する、あるいはネットワークを形成することが今後は必須であり、ミトコンドリア病研究班の大きな課題のひとつである。

URL

- 1) 難病情報センター：ミトコンドリア病。(http://www.nanbyou.or.jp/entry/194)
- 2) OMIM：http://www.omim.org
- 3) ClinGen：https://www.clinicalgenome.org
- 4) MITOMAP：http://www.mitomap.org/MITOMAP

* * *

= 総 説 =

小児神経科医が知っておくべきミトコンドリア病の多様性

三 牧 正 和

要旨 ミトコンドリア病はあらゆる臓器障害を来しうるため臨床像が多彩で、しばしば診断に苦慮する。病態の中核は呼吸鎖酵素機能異常にあるため、酵素活性や複合体の量的・質的評価などの生化学的診断が重要だが、病因に応じた治療や遺伝カウンセリングのためには遺伝子診断が必要となる。病因遺伝子は核 DNA とミトコンドリア DNA の両方に数多く存在するが、網羅的遺伝子解析などでより多くの患者の診断が可能になってきた。遺伝子解析を役立てるには、症状や病型の多様性を知った上で注意深い病歴聴取と診察を行い、適切な臨床検査とともに生化学や病理学的評価などの特殊検査を駆使して、ミトコンドリア機能異常を証明することが重要である。

見出し語 ミトコンドリア病, 呼吸鎖酵素複合体, ミトコンドリア DNA, 核 DNA, 網羅的遺伝子解析

はじめに

ミトコンドリア病は、ミトコンドリア機能異常に起因する病気の総称であり、ミトコンドリア異常症とも呼ばれる疾患群である。ミトコンドリアは生体における主要なエネルギーの産生場であるため、エネルギー需要の高い中枢神経や骨格筋症状が前景に出る病型が多く、小児神経科医にとって馴染みの深い疾患である。しかし脳や筋肉以外にも様々な症状を呈することがあり、その病型は多彩で疾患概念が捉えにくい¹⁾。そのため、診療の場でしばしば鑑別疾患に挙げられながら、診断に至らないことも経験される。また、ミトコンドリアの遺伝子支配の複雑さが疾患原因遺伝子の多様性をもたらしていることも、確定診断を困難にしている。

ミトコンドリアには、脂肪酸 β 酸化やトリカルボン酸(TCA)回路、尿素回路などの代謝系が存在するが、一般的に狭義のミトコンドリア病は呼吸鎖酵素複合体の機能低下を本態とする疾患をさす。発症頻度は約 5,000 出生に対し 1 人と推定されており、先天代謝異常症としては決して稀な疾患ではない²⁾³⁾。本稿では呼吸鎖酵素異常を中心に、実際の症例や最近の知見を交えて診断プロセスについて紹介し、ミトコンドリア病診断を困難としている要因を整理し、今後の診療の展望につき概説する。

I ミトコンドリア呼吸鎖とその遺伝支配

ミトコンドリアは内膜と外膜の二重膜に囲まれた細胞内小器官であり、細胞内のカルシウム貯蔵、アポトーシス、感染防御など多様な機能をもっている。なかでも、酸素を利用して細胞における主要なエネルギーであるアデノシン三リン酸(ATP)を産生する、つまり細胞呼吸を行うことが全ての細胞の活動に必須の最も重要な機能である。細胞呼吸は内膜に埋め込まれた 5 つのタンパク複合体、すなわち呼吸鎖酵素複合体 I ~ IV からなる電子伝達系と、ATP 合成酵素である複合体 V が担っている(図 1)。TCA 回路や脂肪酸の β 酸化で生じた NADH や FADH₂ から電子を受け取り、ユビキノンやチトクロム c を担体として電子を伝達する際に生じる還元電位エネルギーを用いて内膜に形成したプロトン濃度勾配を利用して、複合体 V が ATP を合成するシステムである⁴⁾。ミトコンドリア病の病態を理解するにはこれらの複合体の遺伝子支配を知る必要がある。

ミトコンドリアは細胞において球形、ひも状、あるいは網目状など様々な構造をとり、ダイナミックに分裂と融合を繰り返している。1 細胞あたりの数は様々だが、多い場合では数千個以上のミトコンドリアが存在するといわれている。各ミトコンドリアには、その内部(マトリックス)に独自の遺伝子(ミトコンドリア DNA: mtDNA)を数コピー持っているため、1 個体では膨大な数の mtDNA が存在していることになる⁵⁾。正常人の体内では全ての mtDNA が同じ塩基配列より成り立っており、この状態をホモプラスミーという。一方、ミトコンドリア病では、正常型と変異型の mtDNA が混在する、ヘテロプラスミーの状態となることも多い。

mtDNA は 16569 塩基対からなる環状 2 本鎖 DNA であり、

帝京大学医学部小児科

連絡先 〒173-8605 東京都板橋区加賀 2-11-1

帝京大学医学部小児科 (三牧正和)

E-mail: mimaki@med.teikyo-u.ac.jp

(受付日: 2017. 10. 20. 受理日: 2017. 10. 20)

機能異常はあらゆる臓器の障害をもたらすため、ミトコンドリア病の症状は極めて多彩である。しかしながら、各臓器障害には特徴があり、まず代表的な症状を知ることが診療上重要であり(表1)、いずれかを認めた際には一度はミトコンドリア病を想起して見逃さないよう心がける。血液、髄液、画像など必要な臨床検査を積み重ね、ミトコンドリア機能異常を示唆する所見がないか検討することが大切であるが、そのためにはまず、丁寧な病歴聴取と身体診察が何より重要であることを改めて強調したい。

続いて症状に応じて病型分類を行うが、高乳酸血症と脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症(MELAS)、慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)、赤色ぼろ線維を伴うミオクロオスズてんかん症候群(MERRF)の3疾患が代表的病型としてよく知られている。しかしながら、小児期発症のミトコンドリア病はMELASと並んでLeigh脳症が多く⁷⁾、新生児期から乳児期に発症する乳児致死型ミトコンドリア病⁸⁾やAlpers症候群と呼ばれる重症型などの成人とは異なる病型⁹⁾もあり、より多様性に富んでいる。また、心筋症¹⁰⁾、肝症¹¹⁾、難聴、糖尿病¹²⁾など、単一の臓器障害が前景に出る病型もあることが、ミトコンドリア病の疾患概念をより捉えにくいものとしている。「多臓器障害を来した場合にはミトコンドリア病を疑う」という意識にとらわれすぎると、ミトコンドリア機能異常を基盤とした病態に気付かず診断上ピットホールとなりうる。病期によって症状が出揃わず、後になって新たな異常が顕在化して病型分類が可能となるような場合もあり、成長・発達途上にある小児においては特に注意深い経過観察が重要である。

同じ病型内でもその症状は多彩である。例えば、MELASの臨床症状は、頭痛、嘔吐、けいれん、意識障害、片麻痺、皮質盲などの脳卒中様発作が特徴だが、てんかん、難聴、うつ病などの精神神経症状、易疲労性や筋力低下、眼瞼下垂などの筋症状、肥大型心筋症やWPW症候群などの循環器症状、低身長、糖尿病、甲状腺機能低下症、Fanconi症候群、腸閉塞など、合併症は多臓器に及ぶ可能性がある¹³⁾¹⁴⁾(表2)。mtDNA変異率が高く、エネルギー需要の高い臓器が障害されやすいと考えられており、ヘテロプラスミー状態、すなわち個体内で変異率にばらつきがあることが、個々の症例の重症度や臨床症状の多様性をもたらすと考えられている。

病因と病型の関係も単純ではない。MELAS患者の約80%にmtDNA上の3243番目の塩基の点変異m.3243A>Gを認めるが¹⁵⁾、原因遺伝子変異は他にも知られており、同じロイシンの転移RNA(tRNA-Leu(UUR))内には他にm.3271T>Cなどの報告がある¹⁶⁾(図1)。タンパクをコードする領域にも変異報告が相次いでおり、呼吸鎖酵素複合体IのND5サブユニット内のm.13513G>AはMELAS患者の5%程度にみられる¹⁷⁾。逆にm.3243A>Gを持つ患者が必ずしもMELASを呈するわけではない。同変異を持つ患者の臨床診断は、脳卒中様発作を有するMELASが約3分の2を占めるものの、CPEO、

表1 ミトコンドリア病の臨床症状

中枢神経系	知的障害、てんかん、小脳失調、不随意運動(ジストニア、アテトーゼ、ミオクロオスズなど)、脳卒中様発作(頭痛、嘔吐、片麻痺、皮質盲など)、慢性頭痛、中枢性呼吸障害、うつ病
骨格筋	易疲労性、筋萎縮、筋緊張低下、筋力低下
心筋	肥大型心筋症、拡張型心筋症、心伝導障害
眼	視神経萎縮、網膜色素変性、白内障、眼瞼下垂、眼球運動異常
耳	感音性難聴、アミノグリコシド感受性難聴
肝臓	肝不全、脂肪肝、胆汁うっ滞、肝硬変
腎臓	近位尿管障害、巣状糸球体硬化症
膵臓	糖尿病、膵外分泌不全
消化管	麻痺性イレウス、慢性下痢
血液	鉄芽球性貧血、骨髄異形成、血小板減少
内分泌	低身長、副甲状腺機能低下症
その他	末梢神経障害、多毛症

Leigh脳症、MERRFなど他の病型を示す患者、糖尿病や難聴のみを呈し中枢神経症状のない患者もあり、その臨床症状は多彩である¹⁸⁾。また、同一家系内でも別の病型を呈することもあり、ミトコンドリア病の原因遺伝子と病型は一対一対応でないことが、診断をより複雑にしている。他の病型でも同様で、例えばCPEOはmtDNAの単一欠失が原因となるが、多重欠失や点変異が病因となることもあり、逆に多重欠失が原因でCPEO以外に神経・消化器症状を伴うミトコンドリア脳筋症(MNGIE)を呈することもある¹⁹⁾。

III 原因遺伝子の多様性

臨床情報を整理して病型を診断することは大切であるが、病型分類にとどまらず原因遺伝子を同定することは、病因に応じた治療の実現のためには必要であり、病態解明の進歩に伴いその重要性は増している。例えばミトコンドリア病の病因遺伝子変異としても最も頻度の高いm.3243A>Gのもたらす発症メカニズムは徐々に解明されている。m.3243A>GによってtRNA-Leu(UUR)内のアンチコドンの転写後のタウリン修飾が障害され、転移RNAが正しくコドンを認識できなくなり、ミトコンドリアタンパクの合成障害が起きてしまう可能性が示されている²⁰⁾²¹⁾。このことから、m.3243A>Gを有するMELAS患者に対しタウリンを投与して転移RNAの修飾異常を是正する治療法開発が進められている²²⁾。一方、m.13513G>Aを有するMELAS患者は呼吸鎖酵素複合体のタンパク異常が病因なので、タウリン投与の効果は理論上期待できない。MELASという病型分類に留まらず病因を同定することは、個々の患者の分子病態に応じた治療を目指すうえで極めて重要である。

また、小児期発症のミトコンドリア病でMELASとともに患者数が多いLeigh脳症についても、遺伝子診断は重要である。乳幼児期に精神運動発達遅滞・退行などの神経症状を示す亜急性に発症する脳症で、大脳基底核、脳幹の両側対称性病変を特徴とするので⁷⁾²³⁾、小児神経科医が診療に関わるこ

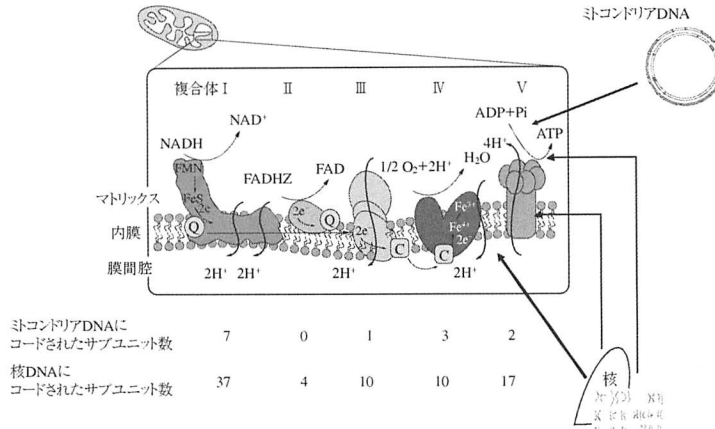


図1 ミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体の遺伝子支配

ミトコンドリア内膜に存在する複合体I (NADH-ユビキノン酸化還元酵素: NADH-ubiquinone oxidoreductase), 複合体II (コハク酸-ユビキノン還元酵素: succinate-ubiquinone reductase), 複合体III (ユビキノール-チトクローム c 還元酵素: ubiquinol-cytochrome c reductase), 複合体IV (チトクローム c 酸化酵素: cytochrome c oxidase), 複合体V (ATP合成酵素: ATP synthase) からなる。複合体II以外は、核DNAとmtDNAの両方にコードされたサブユニットで構成される。核DNAにコードされたサブユニットは細胞質で合成された後にミトコンドリアに輸送され、mtDNAにコードされたサブユニットはミトコンドリアのマトリックス内で合成され、両者が協働して複合体を形成する。Q: コエンザイムQ (ユビキノン), C: チトクローム c

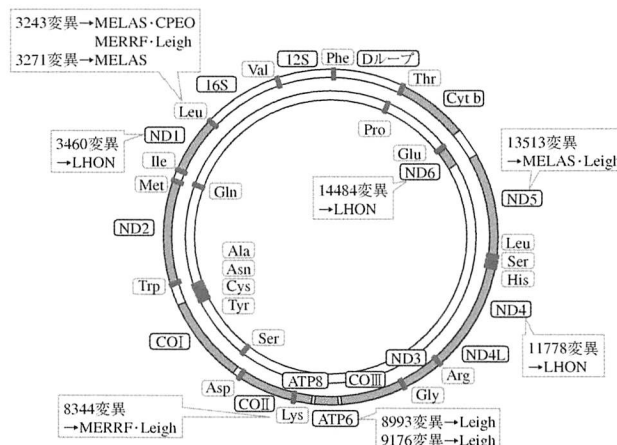


図2 ミトコンドリア DNA と主な病因点変異

環状の二重鎖構造をとっており、13種類の呼吸鎖複合体サブユニット (複合体IのND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, IIIのcyt b, IVのCO I, CO II, CO III, VのATP6, ATP8), 22種類の転移RNA, 二つのリボソームRNA (12S, 16S) をコードしている。図中のアミノ酸名は、それぞれの転移RNAの位置を示す。多くの遺伝子に、様々な病型の病因変異が存在する。

呼吸鎖酵素複合体I, III, IV, Vを構成するタンパク (サブユニット) のうち、それぞれ7, 1, 3, 2種の計13のタンパク, その翻訳に関わる2つのリボソームRNA (rRNA), 22種類の転移RNA (tRNA) をコードしている⁶⁾(図1, 2)。残りのサブユニットは全て核DNAにコードされ、呼吸鎖酵素複合体は核DNAとmtDNAの二重支配を受けており、いずれの遺伝子変異もサブユニット異常による呼吸鎖酵素機能低下をもたらす可能性がある。複合体IIは核DNAのみにコードさ

れているため、mtDNAの異常では一次的な活性低下は来さない。ミトコンドリアで働くタンパクは、上記の計13個の呼吸鎖複合体のサブユニット以外は全て核DNAにコードされており、細胞質で翻訳された後にミトコンドリアに輸送されて機能している。

II 小児期発症のミトコンドリア病の症状・病型の多様性

ミトコンドリアは赤血球以外の全ての細胞に存在し、その

表2 核DNA上の主な原因遺伝子と機能

機能		遺伝子	
ゲノム間 情報伝達	ミトコンドリアDNAの複製・維持, dNTP合成・運搬	<i>C10orf2, DGUOK, DNA2, FBXL4, MGME1, MPV17, POLG, POLG2, RRM2B, RNASEH1, SLC25A4, SUCLA2, SUCLG1, TK2, TYMP</i>	
	アミノアシル化転移RNA合成酵素	<i>AARS2, CARS2, DARS2, EARS2, FARS2, GARS, HARS2, IARS, IARS2, KARS, LARS2, MARS2, NARS2, PARS2, SARS2, TARS2, VARS2, YARS2, QRSL1, MRPS23</i>	
	転移RNA修飾	<i>GTPBP3, MTFMT, MTO1, PUS1, TRMU, TRMT5, TRNT1</i>	
	RNAプロセッシング	<i>ELAC2, HSD17B10, MTPAP, LRPPRC, PNPT1</i>	
	翻訳・転写調節因子	<i>C12orf65, GFM1, GFM2, RMND1, TFAM, TSFM, TUFM</i>	
	ミトコンドリアリボソームタンパク	<i>MRP12, MRPL3, MRPL44, MRPS7, MRPS16, MRPS22</i>	
呼吸鎖酵素 複合体形成	サブユニット	複合体I	<i>NDUFA1, NDUFA2, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFB3, NDUFB9, NDUFB11, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2</i>
		複合体II	<i>SDHA, SDHB, SDHC, SDHD</i>
		複合体III	<i>CYC1, UQCRCB, UQCRCQ, UQCRC2</i>
		複合体IV	<i>COX4I2, COX6A1, COX6B1, COX7B, NDUFA4, TACO1</i>
		複合体V	<i>ATP5A1, ATP5E</i>
	アセンブリファクター	複合体I	<i>ACAD9, FOXRED1, NUBPL, NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6</i>
		複合体II	<i>SDHAF1, SDHAF2</i>
		複合体III	<i>BCS1L, LYRM7, UQCC2, UQCC3, TTC19</i>
		複合体IV	<i>CEP89, COA5, COX10, COX15, COX14, COX20, FASTKD2, PET100, SCO1, SCO2, SURF1</i>
		複合体V	<i>ATPAF2, TMEM70</i>
その他	ミトコンドリア融合・分離	<i>DNM1L, MFF, OPA1</i>	
	タンパク品質管理	<i>CLPP, HSPD1, KIF5A</i>	
	リン脂質代謝	<i>AGK, SERAC1, TAZ</i>	
	中毒分子の除去	<i>ECHS1, ETHE1, HIBCH</i>	
	ミトコンドリア膜輸送系	<i>TIMM8A</i>	
	鉄-硫黄タンパク合成系	<i>BOLA3, IBA57, ISCU, LYRM4, NFU1</i>	
	コエンザイムQ10代謝	<i>COQ2, COQ4, COQ6, COQ7, COQ8A, COQ8B, COQ9, PDSS1, PDSS2</i>	
	ピオチン, チアミン, リン酸代謝	<i>BTD, SLC19A3, SLC25A3, SLC25A19</i>	
ビルビン酸脱水素酵素関連	<i>PDHA1, PDHB, PDHX, PDPI, PDK3, DLAT, DLD, LIAS, LIPT1, TPK1</i>		

との多い症候群であるが、その原因は極めて多様である。mtDNA変異を持つ場合が患者の2~3割を占め、その他の患者の原因は核DNA変異だと考えられている。常染色体劣性遺伝、X連鎖性遺伝、母系遺伝のいずれの遺伝形式もありうるため、Leigh脳症と病型診断するだけでは正確な遺伝子診断に立脚した遺伝カウンセリングができない。そこで遺伝子診断が必要となるが、発見された疾患原因遺伝子数は既に75以上にのぼるほど多いことが問題となる²⁴⁾。

このように、ミトコンドリア病の診断を困難にしている要因の一つに、原因遺伝子の多様性が挙げられる。呼吸鎖酵素複合体が核DNAとmtDNAの二重支配を受けていることや、関与する遺伝子の種類が多いこと、未知の因子も想定されていることから、患者の遺伝子診断は容易ではない。mtDNAの病態への関与の特殊性もあって、他疾患と比較して診断プロセスもわかりにくい。そこで、ミトコンドリア病の原因を

mtDNAと核DNAの異常に分けて、実際の診断の方法やその困難さに触れつつ、多様な遺伝子異常について整理する。

1. mtDNA変異

mtDNA上の37の遺伝子のほとんどに、実に250以上の点変異、100以上の欠失(単一欠失)、さらには多重欠失や重複などが疾患原因遺伝子異常として報告されている(図2)。これらミトコンドリアDNA変異の情報は、インターネット上のMITOMAP(a Human Mitochondrial Genome Database: <https://www.mitomap.org/MITOMAP>)が共通データベースとして活用されている。MELASやMERRF、あるいはLeber視神経萎縮症(Leber hereditary optic neuropathy; LHON)といった病型診断ができていない場合は、まずその原因として知られているmtDNAの高頻度点変異を調べ、CPEOの場合にはサザンブロット法やlong PCR法によって欠失の有無を確認する。異常が見出せなかった場合、あるいは病型分類が困難で変異が絞

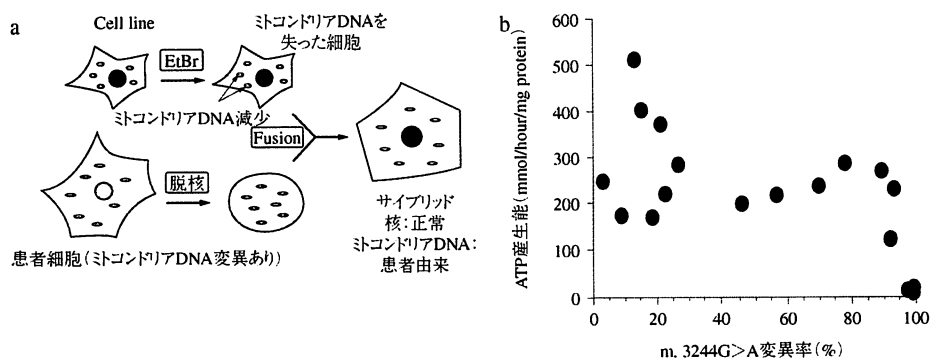


図3 ミトコンドリア DNA 変異の病因解析

- a : サイブリッドの作製. m.3244G>A 変異率が90%の患者由来の myoblast を脱核処理し, mtDNA をもたない細胞を融合させて様々な変異率をもつサイブリッドを作製する. 患者由来の mtDNA をもつサイブリッドにより, 患者の核 DNA の影響を排除した機能評価が可能となる.
b : m.3244G>A 変異の病因解析. m.3244G>A 変異率が90%を超えたサイブリッドで ATP 産生能が低下している.

り込めない場合には, mtDNA の全周塩基配列を決定し, 変異検索を行うこととなる. しかしながら, mtDNA の配列には個人差が大きく, 病因性のない正常多型が多いという特徴があり, 新規に見出された塩基置換が病因であるか否かについては慎重な検討が必要となる.

臨床的にミトコンドリア病を疑った小児例で, mtDNA の全周塩基配列決定によって m.3244G>A がヘテロプラスミーの状態で検出された一例を挙げて説明する²⁵⁾. この患者由来の線維芽細胞では ATP 産生能の低下が証明されたが, m.3243A>G と同じ tRNA-Leu (UUR) 内の変異であることや, データベースに多型として登録されていないことを理由にこれが病因遺伝子変異だとは断定できない. m.3244G>A が病因性のない正常多型にすぎず, 核 DNA 異常が発症原因である可能性を排除できないからである. このような場合, mtDNA は患者細胞由来, 核は他の培養細胞系由来の細胞 (サイブリッド) を人工的に作製し, 機能解析を行う手法がとられる (図 3a). m.3244G>A を様々な変異率でもつサイブリッドを得て, それぞれの ATP 産生能や呼吸鎖酵素活性を測定し, m.3244G>A を高率にもつ細胞の機能低下を示すことで, m.3244G>A の病因性を証明することができる (図 3b). しかし, その作業行程には多くの時間と労力が必要となり, mtDNA の新規変異の病因性証明は容易ではない. mtDNA の病因変異候補が見出されたものの, 臨床的意義づけができていないため遺伝子診断が確定していない症例は少なくなく, 大きな課題となっている.

また, ヘテロプラスミーの性質が細胞や組織ごとの変異率の多様性を引き起こすことにも注意が必要である. 適切な検体を用いなければ変異が検出できず診断に至らないことがある. 実際, 血液と筋肉の両方の検体が得られた m.3243A>G をもつ患者で mtDNA の比率を調べたところ, 全例で血液の変異率が筋肉より低く, 筋肉で mtDNA 変異が高率であるにも関わらず, 血液では検出感度以下である症例もみられた

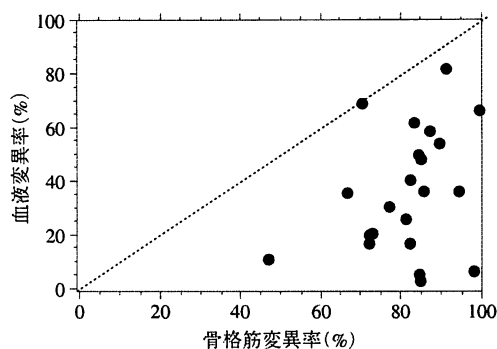


図4 血液と筋肉の m.3243A>G 変異率

血液と上腕二頭筋由来の両方から DNA 検体がえられた患者 22 例で m.3243A>G を測定したところ, 両者に相関はなかった. 全ての患者で血液の変異率の方が低く, 筋肉での変異率が高値でも血液では極めて低値である患者もみられる.

(図 4). また, CPEO では血液検体では mtDNA の欠失が検出されず, 筋肉検体で初めて診断できることはよく経験されることである. 検査の侵襲を考えるとまずは血液検体を用いた遺伝子検査を行うことが一般的であるが, 遺伝子異常が検出できなかった場合には, 他の組織, 特に罹患臓器から DNA を抽出して検査を行うことを検討すべきである. 一方, Leigh 脳症の場合には変異 mtDNA がほぼ 100% であることが多く, 血液検体による遺伝子検査の良い適応になる.

2. 核 DNA 異常

ミトコンドリアには 1,500 以上の遺伝子産物から存在しているといわれているが, そのほとんどは核 DNA にコードされているため, mtDNA で報告されているよりもはるかに多くの種類の核遺伝子の異常がミトコンドリア病の原因となることが理解できる. 特に小児期発症のミトコンドリア病では 7~8 割が核 DNA 異常によると考えられており, 逆に 7~8 割が mtDNA の異常が原因とされる成人期発症と比較して,

mtDNA の変異検索だけでは遺伝子診断に至らない例が多い²⁶⁾。

そこで核遺伝子の変異解析が必要になるのだが、呼吸鎖酵素複合体の構造や機能に関わる因子が多く、また、表現型から原因遺伝子が絞り込めないことから、多数の疾患関連遺伝子の検索や全エクソーム解析などの網羅的遺伝子解析が必要になることが多い。次世代シーケンサーの活用により、近年は患者の変異解析が飛躍的に進んでおり²⁷⁾、既に200以上の核遺伝子がヒトのミトコンドリア病の原因遺伝子として報告されており、その数はさらに増え続けている²⁸⁾。これら核遺伝子の異常は、mtDNA の量的・質的变化や発現異常をもたらすゲノム間情報伝達障害と、呼吸鎖酵素複合体の形成障害、それ以外に分けて考えると理解しやすい(表2)。

①ゲノム間情報伝達障害をもたらす核 DNA 異常

mtDNA の複製や維持に関わる因子をコードする核 DNA に一次的異常があり mtDNA 異常を来す、核とミトコンドリアのゲノム間情報伝達障害が知られている。mtDNA の複製障害は mtDNA polymerase γ の *POLG* 遺伝子変異²⁹⁾、mtDNA helicase の *C10orf2* 変異³⁰⁾、ミトコンドリアヌクレオチドプールのバランスに関わる thymidine phosphorylase をコードする *TYMP* 遺伝子変異³¹⁾ などにより、mtDNA の量的減少(欠乏)や多重欠失を来す。Alpers 病やミトコンドリア肝症などを来す mtDNA 枯渇症候群や、CPEO、MNGIE などの原因となることが知られている。

本邦でも呼吸鎖酵素活性の評価や遺伝子検査が精力的に行われ、呼吸鎖酵素活性低下を呈する患者が多く存在し、なかでも deoxyguanosine kinase をコードする *DGUOK* 遺伝子異常が多いことが明らかとなっている³²⁾。mtDNA 検査で多重欠失を見出したことを契機に、ゲノム間情報伝達障害を疑って核 DNA を検索し *POLG* 遺伝子異常を検出し診断に至ることもある。mtDNA の単一欠失は通常は孤発例であり遺伝しないが、核 DNA 変異による mtDNA の多重欠失はメンデル遺伝形式に則るので、遺伝カウンセリング上も両者の違いを知っておく必要がある。

また、mtDNA の量や構造には影響を与えないが、mtDNA の翻訳に関わる核遺伝子異常も、ミトコンドリア病を引き起こすゲノム間情報伝達障害として挙げられる。転移 RNA の修飾に関わる因子³³⁾、アミノアシル化転移 RNA の合成酵素³⁴⁾、mtDNA の転写や翻訳の調節因子³⁵⁾、ミトコンドリアリボソームタンパク³⁶⁾、RNA プロセッシングに関わる因子³⁷⁾ などがその例である。

②呼吸鎖酵素複合体の形成に関わる核 DNA 異常

当然のことながら、呼吸鎖酵素複合体を構成するタンパクの異常は複合体機能低下の原因となりうるため、実際に多くのサブユニットで病因変異がみついている。さらに、サブユニットとは異なり成熟した呼吸鎖酵素複合体自体には存在しないが、複合体の形成過程で機能する因子の変異が次々と見出され注目されている。

例えば、呼吸鎖の最初の段階を担う呼吸鎖酵素複合体 I は 45 個 (44 種) のサブユニットからなる約 980 kDa に及ぶ巨大なタンパク複合体であるが、そのサブユニットの大部分にミトコンドリア病の原因遺伝子変異が報告されている。核 DNA と mtDNA の二重の遺伝子支配を受けているため、核 DNA にコードされ細胞質で生成された 37 種のタンパクがミトコンドリア内に輸送され、mtDNA にコードされマトリックス内で生成された 7 種のサブユニットと共同して複合体 I を形成するプロセス (アセンブリー機構) は非常に複雑である³⁸⁾(図 5a)。そこで、大分子タンパク複合体でもその構造を保ったまま解析可能な blue native 電気泳動法 (BN-PAGE) が呼吸鎖酵素複合体の評価に応用され、複合体のアセンブリー機構がかなり明らかとなってきた。ミトコンドリア病患者の解析などから、アセンブリー機構の異常やその過程で働く因子 (アセンブリーファクター) の機能が少しずつ解明されてきている。複合体 I のアセンブリーファクターは 2016 年までに 15 種類発見され、うち 10 遺伝子でヒトのミトコンドリア病患者での変異が報告されている。BN-PAGE は呼吸鎖複合体の量だけでなく大きさも評価できるため、さらなる因子の発見やアセンブリー機構の解明をもたらすとともに、未診断のミトコンドリア病患者の遺伝子診断や病態解明に寄与するものと思われる。他の呼吸鎖複合体についての研究も含め今後の発展が望まれる。しかしながら、個々の遺伝子の変異候補が特定の施設で複数家系見出されることは稀であり、新規の遺伝子異常の病因性証明のためには、患者細胞に正常遺伝子を導入して機能回復を証明するレスキュー実験などが必要なが多い³⁹⁾(図 5b)。このことは、新規の核 DNA 異常が見出された場合に共通する問題であり、患者の遺伝子診断においてミトコンドリア機能の評価が重要となることを改めて強調したい。

③その他の核 DNA 異常

呼吸鎖複合体の機能に関わる因子は、これらサブユニットとアセンブリーファクターだけではない。コエンザイム Q10 などの各種補酵素をはじめ、ミトコンドリアの二重膜を形成するリン脂質代謝に関与する因子⁴⁰⁾ や、膜内外の物質輸送に関わるタンパクなども関与しており、それらの遺伝子異常がミトコンドリア病でも報告されている。また、ミトコンドリア自体の融合や分裂、運動に関わる *OPA1*⁴¹⁾、*MFF*⁴²⁾、タンパク品質管理に関わる *KIF5A*⁴³⁾、*HSPDJ*⁴⁴⁾ などの遺伝子異常もミトコンドリア病の原因となることが明らかとなってきた。このようなミトコンドリアのホメオスタシスに関わる遺伝子には、Charcot-Marie-Tooth 病の病因遺伝子である *MFN2*⁴⁵⁾、*GDAP1*⁴⁶⁾ や遺伝性痙性対麻痺の原因である *SPG7*⁴⁷⁾、*SPAST*⁴⁸⁾、Parkinson 病の原因である *PARK2*⁴⁹⁾、*PINK1*⁵⁰⁾ なども報告され、それぞれミトコンドリア機能低下との関連が示されている。ミトコンドリア呼吸鎖の機能異常が様々な神経疾患を引き起こすことが判明してきており、ミトコンドリア病の概念は広がりつつある。

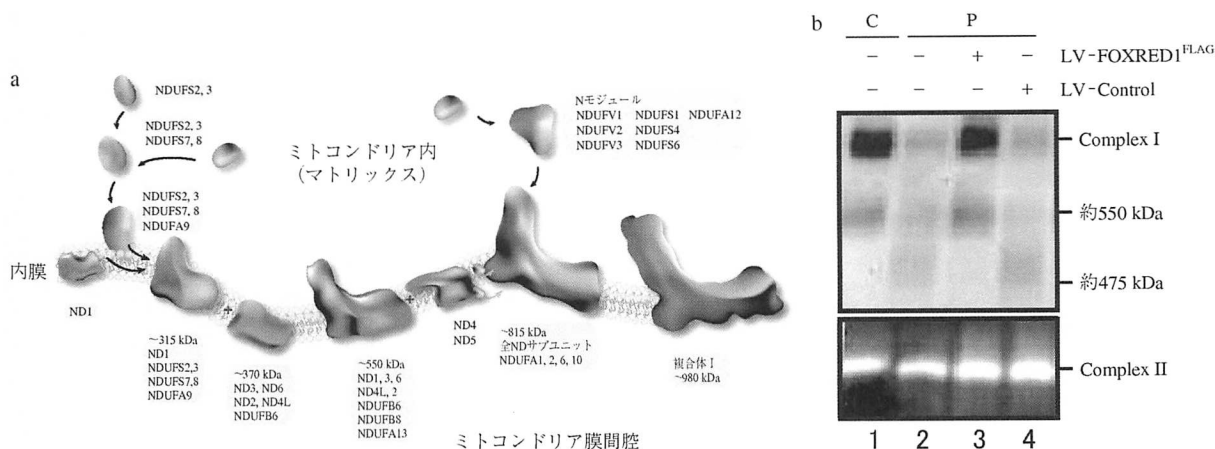


図5 呼吸鎖複合体Iのアセンブリー過程とその異常
 a: 呼吸鎖複合体Iのアセンブリー過程のモデル。左から右へアセンブリーが進む過程で小さな複合体が別々に形成され、組み立てられることで中間複合体が次第に成熟し、約980 kDaの複合体Iが形成される。図中のタンパク名はサブユニットの一部を示している。
 b: BN-PAGEを用いたFOXRED1(呼吸鎖複合体Iのアセンブリーファクター)の遺伝子変異の病因解析。正常線維芽細胞(レーン1)でみられる成熟した複合体I(Complex I)や約550 kDaの生理的中间複合体がFOXRED1遺伝子変異をもつ患者線維芽細胞(レーン2)ではみられず、約475 kDaの異常な複合体が検出されている。患者線維芽細胞にレンチウイルスを用いて正常なFOXRED1遺伝子を導入すると、成熟した複合体が形成されて異常な複合体も消失するが(レーン3)、導入していない細胞では複合体の形成が回復していない(レーン4)。Complex II(複合体II)はローディングコントロール。C:コントロール(正常細胞)、P:患者細胞

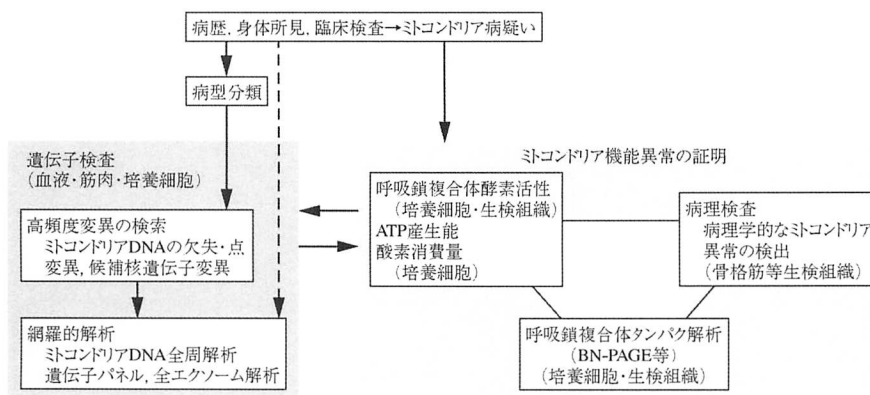


図6 ミトコンドリア病の診断プロセス
 病型分類が困難な例や、原因遺伝子数が多い病型では、早期から網羅的遺伝子解析を検討すべきだが、病因性の最終確認や病態解析のためには機能評価に立ち返る必要がある。

IV ミトコンドリア病の診断プロセス

以上のように、ミトコンドリア病の原因遺伝子は極めて多く、診断にあたってはその多様性の理解を踏まえた筋道だった戦略が必要となる(図6)。まず、患者の病歴、診察所見、臨床検査から病型分類が可能な場合は、対応するmtDNAの代表的点変異や欠失・重複の検出、核遺伝子変異の検索が効率的なために優先される。しかし、病型診断ができない場合、あるいは高頻度変異や既知の変異が見出されなかった場合には、呼吸鎖酵素活性測定やBN-PAGEなどの生化学的検査によるミトコンドリア機能異常の証明することが大切となる。

その際の検体は、患者の侵襲を考慮して皮膚生検由来の線維芽細胞を使用することが多いが、異常が検出できない場合には骨格筋などの罹患臓器、あるいは生検筋由来の筋芽細胞を使用することも考慮する。筋生検を行う場合にはあわせて病理学的評価も行い、ragged-red fiber (RRF)やCCO (cytochrome c oxidase) 欠損線維など、ミトコンドリア病に特徴的な所見の有無を確認する。また、酸素消費量(OCR)やATP産生能の評価も、呼吸鎖酵素活性異常が検出できない場合のミトコンドリア機能の評価法として応用されている。最近では血液で簡便に評価できるミトコンドリア病のバイオマーカーの開発も進んでおり、FGF 21 (fibroblast growth factor 21)⁵¹⁾や、本

邦で見出された GDF 15 (growth differentiation factor 15) は特に感度・特異度も高い物質として報告され⁵²⁾、今後の臨床現場での汎用化が期待される。これらの方法を駆使しミトコンドリア機能異常が検出された場合には、さらなる遺伝子検査を進めることとなる。mtDNA については、高頻度変異が検出されなかった場合には、ヘテロプラスミーの可能性を考えて使用する検体を再検討しつつ、全塩基配列の決定を考慮する。しかし、症状から原因遺伝子の絞り込みが困難な患者においては、可能であれば他の特殊検査に先んじて網羅的遺伝子解析を行うべきだと考える。核遺伝子に存在する mtDNA 類似の配列をもつ偽遺伝子 (pseudogene) の問題など議論すべき課題はあるものの、mtDNA の点変異や欠失・重複も次世代シーケンサーで検出できるよう工夫されており、網羅的遺伝子解析に組み込まれてきている。解析に要する時間の短縮やコストダウンが実現され、次世代シーケンサーはミトコンドリア病の原因遺伝子解析において非常に力を発揮している。今後はますます診断過程において網羅的遺伝子検査が優先され、診断プロセスが変化してくると思われる。

しかしながら、ミトコンドリア病が疑われる患者の4割程度は未だ遺伝子診断に至っておらず、全ゲノムシーケンスや RNA の網羅的な解析も試みられている。遺伝子検査で病因変異の候補が同定された場合も、既にエビデンスをもって報告されている場合は診断が確定するが、病因性が明らかでない場合は生化学的検査などによる機能解析での証明が必要となる。そのため、機能解析に立ち返る必要性を考慮し、遺伝子解析と同時に並行でミトコンドリア機能異常の証明のための検体を準備しておくが良い。患者の病態を解析するためにも重要である。一方で二次的な呼吸鎖酵素異常には注意が必要で、酵素活性低下という結果のために、他の神経筋疾患の診断の遅れに繋がった報告も散見される⁵³⁾。そのため、機能解析には酵素活性測定のみならず、タンパク解析や病理学的検査などの複数の手法を用いて評価することが望ましい。診療にあたる医師としては、研究室レベルの生化学検査や病理学的検査の結果について、臨床症状や病歴に立ち返って解釈する姿勢が大切である。場合によっては、ミトコンドリア病以外の疾患の鑑別を再検討することも必要となる。

おわりに

本稿ではミトコンドリア病の診療を困難としている要因につき、症状、病型、病因(原因遺伝子)の多様性に焦点をあてて解説した。残念ながら、現時点ではミトコンドリア機能障害を正常化する根本的治療法は存在しないが、近年になり患者診断技術が向上して新規の原因遺伝子の発見も進み、多様な病態が次第に明らかになってきている。病型や病因遺伝子異常に応じた特異的治療の開発も進んでおり、わが国でも複数の治験が進行中である。臨床試験をいかに進めるかは重要な課題であり、治療法開発を目指した患者登録システムの構築も行われている。診療現場においては、ミトコンドリア

病の多様性を知ったうえで可能な限り迅速かつ正確な診断に努め、分子病態に応じた治療法開発の実現に備えたい。

筆者の利益相反：本論文発表内容に関連して開示すべき事項なし。

文 献

- Munnich A, Rustin P. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 2001; **106**:4-17.
- Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 2003; **126**:1905-12.
- Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Anu Neurol* 2015; **77**:753-9.
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inheret Metab Dis* 2006; **29**:499-515.
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 2012; **13**:878-90.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999; **23**:147.
- Rahman S, Blok RB, Dahl HH, et al. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 1996; **39**:343-51.
- Gibson K, Halliday JL, Kirby DM, Yapfite-Lee J, Thorburn DR, Boneh A. Mitochondrial oxidative phosphorylation disorders presenting in neonates: clinical manifestations and enzymatic and molecular diagnoses. *Pediatrics* 2008; **122**:1003-8.
- Horvath R, Hudson G, Ferrari G, et al. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* 2006; **129**:1674-84.
- Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management. *Tex Heart Inst J* 2013; **40**:385-94.
- Lee WS, Sokol RJ. Mitochondrial hepatopathies: advances in genetics, therapeutic approaches, and outcomes. *J Pediatr* 2013; **163**:942-8.
- Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, et al. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1994; **330**:962-8.
- El-Hattab AW, Adesina AM, Jones J, Scaglia F. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab* 2015; **116**:4-12.
- Yatsuga S, Povalko N, Nishioka J, et al. MELAS: a nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1820**:619-24.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA (Leu) (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; **348**:651-3.
- DiMauro S and Hirano M. MELAS. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al eds. *GeneReviewsTM* [Internet]. 2001 [updated 2013 Nov 21] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1233/> [閲覧日 2017.10.10]
- Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, et al. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**:326-8.
- Hammans SR, Sweeney MG, Hanna MG, Brockington M, Morgan-Hughes JA, Harding AE. The mitochondrial DNA transfer RNA^{Leu} (UUR) A-->G (3243) mutation. A clinical and genetic study. *Brain* 1995; **118** (Pt 3): 721-34.
- Garone C, Tadesse S, Hirano M. Clinical and genetic spectrum of mito-

- chondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2011; **134**: 3326-32.
- 20) Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, Ohta S, Watanabe K. Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs (Leu) (UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem* 2000; **275**: 4251-7.
 - 21) Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, Ohta S, Watanabe K. Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J* 2001; **20**: 4794-802.
 - 22) Rikimaru M, Ohsawa Y, Wolf AM, et al. Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern Med* 2012; **51**: 3351-7.
 - 23) Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1951; **14**: 216-21.
 - 24) Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR. Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann Neurol* 2016; **79**: 190-203.
 - 25) Mimaki M, Hatakeyama H, Ichiyama T, et al. Different effects of novel mtDNA G3242A and G3244A base changes adjacent to a common A3243G mutation in patients with mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2009; **9**: 115-22.
 - 26) Dimauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005; **37**: 222-32.
 - 27) Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, et al. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genet* 2016; **12**: e1005679.
 - 28) Mayr JA, Haack TB, Freisinger P, et al. Spectrum of combined respiratory chain defects. *J Inherit Metab Dis* 2015; **38**: 629-40.
 - 29) Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 2004; **55**: 706-12.
 - 30) Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* 2001; **28**: 223-31.
 - 31) Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999; **283**: 689-92.
 - 32) Yamazaki T, Murayama K, Compton AG, et al. Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome. *Pediatr Int* 2014; **56**: 180-7.
 - 33) Ghezzi D, Baruffini E, Haack TB, et al. Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis. *Am J Hum Genet* 2012; **90**: 1079-87.
 - 34) Diodato D, Ghezzi D, Tiranti V. The Mitochondrial Aminoacyl tRNA Synthetases: Genes and Syndromes. *Int J Cell Biol* 2014; **2014**: 787956.
 - 35) Stiles AR, Simon MT, Stover A, et al. Mutations in TFAM, encoding mitochondrial transcription factor A, cause neonatal liver failure associated with mtDNA depletion. *Mol Genet Metab* 2016; **119**: 91-9.
 - 36) Gopisetty G, Thangarajan R. Mammalian mitochondrial ribosomal small subunit (MRPS) genes: A putative role in human disease. *Gene* 2016; **589**: 27-35.
 - 37) Van Haute L, Pearce SF, Powell CA, D'Souza AR, Nicholls TJ, Minczuk M. Mitochondrial transcript maturation and its disorders. *J Inherit Metab Dis* 2015; **38**: 655-80.
 - 38) Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1817**: 851-62.
 - 39) Formosa LE, Mimaki M, Frazier AE, et al. Characterization of mitochondrial FOXRED1 in the assembly of respiratory chain complex I. *Hum Mol Genet* 2015; **24**: 2952-65.
 - 40) Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D. A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet* 1996; **12**: 385-9.
 - 41) Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000; **26**: 207-10.
 - 42) Shamseldin HE, Alshammari M, Al-Sheddi T, et al. Genomic analysis of mitochondrial diseases in a consanguineous population reveals novel candidate disease genes. *J Med Genet* 2012; **49**: 234-41.
 - 43) Duis J, Dean S, Applegate C, et al. KIF5A mutations cause an infantile onset phenotype including severe myoclonus with evidence of mitochondrial dysfunction. *Ann Neurol* 2016; **80**: 633-7.
 - 44) Magen D, Georgopoulos C, Bross P, et al. Mitochondrial hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy. *Am J Hum Genet* 2008; **83**: 30-42.
 - 45) Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004; **36**: 449-51.
 - 46) Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, et al. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 2002; **30**: 21-2.
 - 47) Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, et al. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 1998; **93**: 973-83.
 - 48) McDermott CJ, Grierson AJ, Wood JD, et al. Hereditary spastic paraparesis: disrupted intracellular transport associated with spastin mutation. *Ann Neurol* 2003; **54**: 748-59.
 - 49) Mortiboys H, Thomas KJ, Koopman WJ, et al. Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Ann Neurol* 2008; **64**: 555-65.
 - 50) Morais VA, Haddad D, Craessaerts K, et al. PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity via Ndufa10 ubiquitination uncoupling. *Science* 2014; **344**: 203-7.
 - 51) Suomalainen A, Elo JM, Pietilainen KH, et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol* 2011; **10**: 806-18.
 - 52) Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A, et al. Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann Neurol* 2015; **78**: 814-23.
 - 53) Guo Y, Menezes MJ, Menezes MP, et al. Delayed diagnosis of congenital myasthenia due to associated mitochondrial enzyme defect. *Neuromuscul Disord* 2015; **25**: 257-61.

Diversity of mitochondrial disorders : what child neurologists should know

Masakazu Mimaki

Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine, Tokyo

Mitochondrial disorders cause various organ abnormalities. Consequently, the clinical presentation and disease concept are highly variable, making it difficult to diagnose. Because mitochondrial disorders are caused by abnormal respiratory chain enzyme complexes, biochemical diagnosis by examining respiratory chain enzyme activity and quantitatively or qualitatively evaluating protein complexes is important. However, genetic diagnosis is critical for determining treatment according to etiology and genetic counseling. Unfortunately, genetic diagnosis is not easy because of the following reasons: mitochondrial and nuclear DNAs are involved in the biogenesis of mitochondrial respiratory chain complexes, the pathogenicity of novel mitochondrial DNA mutations is difficult to evaluate, and causative genes cannot be identified even though nuclear DNA abnormality is suspected. Regarding the diagnosis of mitochondrial DNA mutations, it is important to pay attention to heteroplasmy, where the mutation rate varies depending on organ involvement. Nuclear DNA abnormalities are also observed in respiratory chain complexes and other factors involved in biogenesis, including respiratory chain assemblies. Although there are many types of etiologies of mitochondrial disorders, increasing numbers of causative genes have recently been discovered using next-generation sequencing, and patient diagnosis is progressing. In order to make the use of these genetic analyses, first of all, careful physical examination with an understanding of diverse clinical symptoms and types of mitochondrial diseases as well as a record of exhaustive medical history is required. Mitochondrial abnormalities should also be accurately diagnosed by comprehensive special examinations, such as biochemical and pathological evaluations, followed by appropriate clinical tests. The future treatments that correspond to individual and patient-specific disease etiologies require an accurate diagnosis and understanding of the disease mechanisms.

No To Hattatsu 2018; 50: 7-16