

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

ミトコンドリア病の調査研究

（H26-難治等（難）一般-053）

平成 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後 藤 雄 一

国立精神・神経医療研究センター

平成 29（2017）年 5 月

目 次

I. 総括・分担研究報告	----- 1
II. 参考資料	----- 8
● 平成 28 年度合同班会議プログラム	
● 平成 28 年度合同班会議議事録	
● 市民公開講座パンフレット	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----19
IV. 主な刊行物・別刷	-----21
V. 研究班員名簿	-----79

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

総括・分担研究報告書

ミトコンドリア病に関する調査研究

研究代表者 後藤 雄一 国立精神・神経医療研究センター神経研究所

研究要旨 ミトコンドリア病の症状は多臓器に及び、心疾患、眼疾患、代謝性疾患としても重要な病気である。本研究班ではミトコンドリア病の正確な診断とそれに基づく適切な治療を目的として、グローバルな観点から診断基準・重症度スケールの策定、診療ガイドラインの策定、患者レジストリー構築を実施した。アウトリーチ活動については、市民公開講座を主催し、患者会勉強会に協力した。患者レジストリーについては、種々の要因で本格稼働には至っていないが、グローバルな活動との連携、新しい倫理ガイドラインへの準拠などを着実に行って、次年度に構築する予定である。診療ガイドラインの作成は、実用化研究班（村山班）と連携して行い、平成28年12月に、「診療マニュアル」を刊行した。

研究分担者

- (1) 小坂 仁 自治医科大学小児科
- (2) 大竹 明 埼玉医科大学小児科
- (3) 北風政史 国立循環器病研究センター病院・研究開発基盤センター
- (4) 古賀靖敏 久留米大学医学部小児科
- (5) 小牧宏文 国立精神・神経医療研究センター
- (6) 佐野 輝 鹿児島大学学術研究院医歯学系精神機能病学
- (7) 末岡 浩 慶應義塾大学医学部産婦人科
- (8) 田中雅嗣 東京都健康長寿医療センター
- (9) 三牧正和 帝京大学医学部小児科
- (10) 山唄達也 東京大学医学部耳鼻咽喉科
- (11) 米田 誠 福井県立大学看護福祉学部

- (11) 西野一三 国立精神・神経医療研究センター
- (12) 中川正法 京都府立医科大学附属北部医療センター
- (13) 中村 誠 神戸大学大学院医学系研究科外科系講座眼科学
- (14) 萩野谷和裕 拓桃医療療育センター
- (15) 村山 圭 千葉県こども病院代謝科

研究協力者

- (1) 太田成男 日本医科大学大学院医学研究科
- (2) 岡崎康司 埼玉医科大学・ゲム医学研究センター
- (3) 金田大太 東京都健康長寿医療センター
- (4) 木村 円 国立精神・神経医療研究センター
- (5) 砂田芳秀 川崎医科大学神経内科
- (6) 須藤 章 榎の会こどもクリニック
- (7) 竹下絵里 国立精神・神経医療研究センター
- (8) 杉本立夏 国立精神・神経医療研究センター
- (10) 中野和俊 東京女子医科大学病院小児科

A. 目的

ミトコンドリアはすべての細胞内において、エネルギーを産生する小器官である。ミトコンドリアに異常があると、大量のエネルギーを必要とする神経・筋、循環器、代謝系、腎泌尿器系、血液系、視覚系、内分泌系、消化器系などに障害が起こる。なかでも、中枢神経や筋の症状を主体とするミトコンドリア病が代表的な疾患である。

国内においてミトコンドリア病の患者数の厳密な実態調査は行われていない。その理由は患者が多くの診療科に分散していること、診断基準が明確ではなかったことなどが挙げられるが、そのもっとも大きな要因は確定診断に必要な病理、生化学、遺伝子検査の専門性が高いことにある。平成27年1月にミトコンドリア病が指定難病に認定され認定基準を制定したが、本診断基準はミトコンドリア病を

包括的にとらえる事を目指したために、やや複雑な基準となっており、今後の診療・研究においては個別の病型の診断基準の作成が必要という状況になっている。

また英国では、ミトコンドリア病の一部の病型で、核移植を用いた生殖補助医療の適応が本格的に試みられようとしている (Nature 465: 82-85, 2010)。そのようなグローバルな研究や医療の流れに遅れないような本邦での調査研究が必要である。

本研究班では、ミトコンドリア病の検査手段（病理検査、生化学検査、DNA 検査）の標準化と集約的診断体制の確立、本疾患に関する情報提供手段の整備等を行い、臨床病型、重症度、合併症、主な治療の内容などの標準化をめざす。患者レジストリーを進め、具体的な治療に関する臨床研究や治験を進めるコーディネーター役を行うこと、また主に小児のミトコンドリア病を対象としている AMED 難治性疾患実用化研究事業の村山班と連携して診療ガイドラインを作成するとともに、市民公開講座や難病情報センター等を活用し、広報活動を行うことを目的とする。

B. 方法

1) 診断フローチャートの作成と検査標準化

ミトコンドリア病の診断に必要な3種類の検査方法（病理検査、生化学検査、遺伝子検査）の標準化と集約的な診断体制の構築を継続する。特に遺伝子検査の重要性が一段と増しており、臨床検査としての遺伝子検査実施体制の構築が行われる中に、ミトコンドリア病の遺伝子検査を位置づける。

① 遺伝子検査の実施と標準化

AMED 難治性疾患実用化研究事業の村山班と協力して、国立精神・神経医療研究センター、埼玉医科大学などを中心として、mtDNA 検査と核 DNA 上の原因遺伝子について、医療の中にどのように組み込むかを明確にする。また、先端的遺伝子検査（出生前診断）や適切な遺伝カウンセリングの提供体制を整備する。〈後藤、大竹、田中、末岡、杉本〉

② 病理検査の実施

ミトコンドリア異常を病理学的に捉えることは現在でも重要であり、国立精神・神経医療研究センターを中心に検査実施と標準化を行う。骨格筋以外の罹患臓器（心、肝など）の病理所見についても検討する。〈後藤、西野〉

③ 生化学検査の標準化

ミトコンドリア代謝系の異常を捉える生化学検査も確定診断に必要であり、特に小児期早期に発症する重症な代謝疾患を適切な診断できる体制を、国立精神・神経医療研究センター、埼玉医科大学等で拠点化して検査を実施し、標準化を行う。〈後藤、大竹、村山〉

2) 認定基準の改定、重症度スケール、グローバルな診断基準作成に参加

新たな難病政策における指定難病として、診断基準と重症度分類を策定する。欧米で進んでいる新たな診断基準作成の動きに応じて、わが国の代表として参加する。この動きは、患者レジストリーにおける情報項目の共通化、将来の国際共同治験を推進するための基盤整備として行う。

〈後藤、古賀、大竹、小牧〉

3) 診療ガイドラインの作成

ミトコンドリア病では、多くの臨床病型が知られている。ミトコンドリア病に比較的好く合併する臓器症状を診ている関連診療科（循環器科：北風、耳鼻科：山唄、精神神経科：佐野、など）の専門医も参加し、AMED 難治性疾患実用化研究事業の村山班と協力して、診療ガイドラインを作成する。〈全員〉

4) ミトコンドリア病に詳しい医師のネットワークと情報提供体制の整備とアウトリーチ活動

患者・家族や本疾患を診ている医療従事者に対して、本疾患の医療情報をホームページ等で提供する。また保健所等でのセミナーも積極的に行う。〈小牧、三牧〉

5) 実態調査を兼ねた患者レジストリーの構築

全国の主要な総合病院に対して、小児科、神経内科ばかりでなく、耳鼻咽喉科、眼科、精神科、

循環器内科、腎臓内科、糖尿病内科などにも、調査用紙を配布する実態調査を行う。AMED 難治性疾患実用化研究事業の村山班と連携して、日本におけるミトコンドリア病患者レジストリーを構築する。〈小牧、大竹、三牧〉

6) 生殖補助医療の情報収集と見解のまとめ

ミトコンドリア病、特にミトコンドリア DNA 変異で発症するリー脳症においては、出生前診断や受精卵診断が欧米では行われている。日本においても、受精卵診断が慶應大学病院で2例行われている。しかし、受精卵診断では得られない発症リスクの低い受精卵を得るために「核移植治療」が検討されており、2015年2月に英議会は、その臨床応用を認める判断を行った。この技術の有用性や倫理的問題について、本研究班で検討した。〈末岡、後藤〉

C. 結果と考察

1) 診断フローチャートの作成と検査標準化

ミトコンドリア病の確定診断には、病理検査、生化学検査、遺伝子検査を行い、総合的な評価が必要である。

① 病理検査

骨格筋の病理検査は国立精神・神経医療研究センター（以下 NCNP）が中心となって実施した。

② 生化学検査

検体は線維芽細胞もしくは各臓器を用いている。NCNP と埼玉医科大学（千葉こども病院）で行われている。NCNP は神経症状を主体とする小児・成人例を、埼玉医科大学では主に代謝異常症状を中心とする乳児、小児例を中心に生化学検査を行った。〈後藤、大竹、村山〉

③ 遺伝子検査

（拠点形成、検査会社の関与、集約化について）

本疾患は、ミトコンドリア DNA 変異の場合は遺伝型と表現型が一对一に対応しない、核 DNA 上に 200 近くの原因遺伝子が報告されている、という特徴があるため、可能であれば解析可能な施設に集約すべきである。

ミトコンドリア DNA の全周シーケンスを行える施設として NCNP などのいくつかの施設、検査会

社があるが、検査依頼に際しての基準、検査体制の整備、啓発が必要である。NCNP では、次世代シーケンサーを用いたミトコンドリア DNA 検査を確立した。

この方法は、ミトコンドリア DNA 全体を1セットのプライマーで増幅させ、核 DNA 上のミトコンドリア DNA 類似配列を除外した後に、MiSeq を用いてカバーレージを 1500~3000 程度までにあげることで、点変異の位置と種類、変異率が容易に計測できる。また、ミトコンドリア DNA の欠失は比較的頻度の高い変異であるが、その断点同定に時間がかかる作業であったが、この方法で断点周辺が簡単に見い出せることから作業の効率が格段に上昇した。

研究分担者の大竹らは、埼玉医科大学を中心に、千葉こども病院、自治医科大学、東京都健康長寿医療センターと協力して、特に乳児期発症の重症ミトコンドリア病に関して、酵素診断から網羅的な遺伝子検査にいたる系統的病因検索システムを構築した。〈大竹〉

2) 診断基準、重症度スケールについて

2015年1月の指定難病の認定に際して、新たな認定基準を作成した。本研究班の分担研究者の多くは、自らの患者における申請作業や各都道府県における認定作業に携わっており、概ね妥当なものと認識していた。

一方で、乳児期、小児期に発症するミトコンドリア病は重症例が多く、「代謝病」としての性格が前面にでる傾向がある。そのため、小児慢性特定疾患の認定基準は、そのような分類での認定方式を基本にしている。したがって、指定難病と小児慢性特定疾患の摺り合わせをどのようにするかが依然として問題になっている。さらに、本年度は、平成 29 年 4 月に追加してされる指定難病の中に、ミトコンドリア内酵素異常症が含まれており、その整合性について協議を行った。

さらに、本診断基準はできるだけ多くの患者を網羅できるようにと意図して作成しており、いわば「包括的診断基準」となっている。しかしながら、

新薬等の臨床試験等を考慮した場合には、個別の病型ごとに明確な診断基準を設定しておくことが望ましいという考え方がある。そこで、AMED 難治性疾患実用化研究班（村山班）と共同で、個々の病型の診断基準の作成に着手し、まずは MELAS と Leigh 脳症について確定させた。さらに、ミトコンドリア肝症やミトコンドリア心筋症の新たな診断基準の作成を試みた。

3) 診療ガイドラインの作成

実用化研究班（村山班）と協力して、診療ガイドライン作成を行う予定であった。ミトコンドリア病は診断基準が確定されていないこともあって、エビデンスとして採用できる研究成果が少ない。したがって、Minds 方式のガイドライン作成は極めて困難な状況であり、「診療マニュアル」として平成 28 年 12 月に刊行した。

4) ミトコンドリア病に詳しい医師のネットワークと情報提供体制の整備とアウトリーチ活動

市民向けのセミナーとしては、平成 28 年 11 月 19 日に札幌で「市民公開講座：ミトコンドリア病を知る」を開催した。また、難病情報センターの HP の情報を更新した。患者会主催の勉強会でセミナーを行った（平成 28 年 7 月 2 日：大阪）。

「ミトコンドリア病に詳しい医師のネットワーク」を構築する計画については、当初予定していた全国を 7 つの地域に分け、それぞれの地域毎にミトコンドリア病をよく知る小児科、神経内科の専門医が担当し、医療情報の提供や実態調査の援助をする計画であったが、平成 28 年度にはその準備に止まった。

5) 実態調査を兼ねた患者レジストリーの構築

実態調査については、平成 25 年度にミトコンドリア病の 1 病型である MELAS に関して、「ミトコンドリア脳筋症 MELAS の脳卒中用発作に対するタウリン療法の開発」研究班（研究代表者：砂田芳秀、川崎医科大学）で行った、日本小児神経学会及び日本神経学会の会員に対するアンケート調査に協力した。しかし、他の臨床病型を含め、ミトコンドリア病全体の状況がつかめていないため、平成 27

年 1 月に制定された新たな診断基準に基づく実態調査を行う計画であった、しかし、以下の述べるウェブを用いた患者レジストリー構築に手間取り、それに合わせて行う予定の実態調査はさらに遅れている。

患者レジストリーについては、AMED 難治性疾患実用化研究班（村山班）と連携して行うこととし、村山班では主に先天代謝異常症として小児（成人）患者レジストリーを、国立精神・神経医療研究センターでは、神経症状を中心とする成人（小児）患者レジストリーを行うこととした。

国立精神・神経医療研究センターにおけるミトコンドリア病患者レジストリーは、トランスレーショナル・メディカルセンターが実施している筋ジストロフィーの登録事業（Remudy）を敷衍する形態で作業を進めているが、費用等の面、新たな個人情報保護法施行に伴う倫理ガイドライン変更への対応、欧米での患者レジストリー事業との連携待ちの状況があり、平成 28 年度は明確な進展を得られず、平成 29 年以降に持ち越した。

一方、病気の原因や病態解析を進めて、新たな治療法、予防法を開発するには、患者の詳細は情報と患者由来の試料が不可欠である。こちらのレジストリーはバイオリソースとの連携で進めて行く必要があり、この点も欧米との連携を目指している。

6) 生殖補助医療の情報収集と見解のまとめ

平成 28 年 10 月に、米国ニューヨークの不妊クリニックが、「核移植治療」で 8993 変異をもち、リー脳症の母から健常な子が産まれたと発表した。この方法では、父と母（核ゲノム）に加えて別の女性（ミトコンドリアゲノム）が関わっており、「3 人の親」がいる子となる。英国内でも、英国外でも倫理的問題があると議論されてきており、米国では禁止された行為であった。しかし、今回の米国にあるクリニックでは、この行為のほとんどをメキシコで行う事で法をすり抜けていた。

日本においては、核移植を行う技術は十分備わっていることから、実際に行うクリニック等が出現しないか懸念がある。したがって、日本においては、

臨床研究として情報公開をしながら施行することを認めることが必要ではないか、という意見が班会議において大勢を占めた。

D. 結論

本研究班の活動はAMED 難治性疾患実用化研究班(村山班)と連携しながら進め、「診療マニュアル」を刊行した。全国レベルの診断体制の整備、診断基準や重症度スケールの改定作業を進めた。アウトリーチ活動として、市民公開講座や患者会勉強会での講演を行い、生殖補助医療の情報収集と日本での実現可能性について議論した。患者レジストリーは、種々の要因で進んでいないが、グローバルな視点でバイオバンクとの連動を図りながら、着実に進めてゆく必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

著書、総説

日本ミトコンドリア学会 編集 村山圭, 小坂仁, 米田誠 : 「ミトコンドリア病診療マニュアル2017」 診断と治療社, 東京, pp. 1-172 2016,

後藤雄一 : Kearns-Sayre 症候群. 小児の症候群. 小児科診療 2016 年増刊号, 診断と治療社, 東京, pp. 102, 2016

後藤雄一 : ミトコンドリア病. 特集 慢性疾患児の一生を診る, 小児内科増刊号, 東京医学社, 東京, pp. 1527-1529, 2016

後藤雄一 : ミトコンドリア病の病因研究の現状, 特集ミトコンドリア研究 UPDATE, 医学のあゆみ 260 (1): 63-66, 2017

後藤雄一 : ミトコンドリア病に対する医療体制の現

状と課題. 特集ミトコンドリア研究 UPDATE, 医学のあゆみ 260 (1): 123-127, 2017

三牧正和 : MELAS 症候群. 小児科診療増刊号 小児の症候群 pp. 108 頁, 診断と治療社, 東京, 2016

三牧正和 : 呼吸鎖複合体 I アセンブリー機構とミトコンドリア病. 医学のあゆみ 第1土曜特集 ミトコンドリア研究 UPDATE. Vol. 260, No. 1 pp. 49-54, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2017

Arakawa, K Ikawa M, Tada H, Okazawa H, Yoneda. M: Mitochondrial cardiomyopathy and usage of L-arginine. Arginine in Clinical Nutrition. Ed. Victor R. Preedy. Springer, NY. USA, pp. 461-470, 2016.

井川正道, 米田誠 : ミトコンドリア病の脳機能画像解析. 医学の歩み 260, 67-72, 2017.

井川正道, 岡沢秀彦, 米田誠 : 酸化ストレスイメーシング. Annual Review 神経 2017, p87-93, 2017.

原著論文

Yokota M, Hatakeyama H, Ono Y, Kanazawa M, Goto Y: Mitochondrial respiratory dysfunction disturbs neuronal and cardiac lineage-commitment of human iPSCs. Cell Death Dis 8(1): e2551, 2017

Hatakeyama H, Goto Y: Respiratory chain complex disorganization impairs mitochondrial and cellular integrity: Phenotypic variation in cytochrome c oxidase deficiency. Am J Pathol 187(1): 110-121, 2017

Ling F, Niu R, Hatakeyama H, Goto Y, Shibata T, Yoshida M: Reactive oxygen species stimulate

mitochondrial allele segregation toward homoplasmy in human cells. *Mol Biol Cell* 27(10): 1684-1693, 2016

Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Hashizume O, Nagatoishi S, Matsuo A, Sato T, Kudo T, Matsubashi T, Murayama K, Ohba Y, Watanabe S, Kanno SI, Minaki D, Saigusa D, Shinbo H, Mori N, Yuri A, Yokoro M, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Takeuchi Y, Kikuchi K, Toyohara T, Suzuki C, Ichimura T, Anzai JI, Kohzuki M, Mano N, Kure S, Yanagisawa T, Tomioka Y, Tohyomizu M, Tsumoto K, Nakada K, Bonventre JV, Ito S, Osaka H, Hayashi KI, Abe T: Mitochondrial acid 5 binds mitochondria and ameliorates renal tubular and cardiac myocyte damage. *Am J Soc Nephrol*, 27(7): 1925-1932, 2016

Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, Suomalainen A, Thorburn DR, Zeviani M, Turnbull DM. Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers* 2:16080, 2016

Yoshimuta H, Nakamura M, Kanda E, Fujita S, Takeuchi K, Fujimoto T, Nakabeppu Y, Akasaki Y, Sano A: The effects of olanzapine treatment on brain regional glucose metabolism in neuroleptic-naive first-episode schizophrenic patients. *Hum Psychopharmacol* 31, 419-426, 2016

Fujimoto C, Yamamoto Y, Kamogashira T, Kinoshita M, Egami N, Uemura Y, Togo F, Yamasoba T, Iwasaki S. Noisy galvanic vestibular stimulation induces a sustained improvement in body balance in elderly adults. *Sci Rep*. 6:37575, 2016

Kamogashira T, Hayashi K, Fujimoto C, Iwasaki S, Yamasoba T. Functionally and

morphologically damaged mitochondria observed in auditory cells under senescence-inducing stress. *npj Aging and Mechanisms of Disease* 23: 2, 2017

2. 学会発表

国際学会

Goto Y: Overview - mtDNA medicine, The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), Tokyo, 10. 31, 2016

Ling F, Niu R, Hatakeyama H, Goto Y, Shibata T, Yoshida M: An oxidative stress-stimulated mechanism for human mitochondrial alleles. The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, Tokyo, 10.30-11.1, 2016

国内学会

石山昭彦, 遠藤ゆかり, 斎藤義朗, 中川栄二, 小牧宏文, 須貝研司, 佐々木征行, 佐藤典子, 後藤雄一, 西野一三: 鉄硫黄アッセンブリング調節因子である IBA57 遺伝子は progressive cavitating leukoencephalopathy をひきおこす. 第 58 回日本小児神経学会学術集会, 東京, 6.3, 2016

笠毛溪, 中村雅之, 大毛葉子, 梅原ひろみ, 佐野輝: 精神症状を来し、mtDNA 多重欠失を認めたミトコンドリア脳筋症の家系例. 第 38 回日本生物学的精神医学会総会, 福岡, 9.8, 2016

井川正道, 岡沢秀彦, 松永晶子, 山村修, 濱野忠則, 清野泰, 中本安成, 米田誠: 抗 Evaluation of cerebral oxidative stress in patients with ALS using 62Cu-ATSM PET. 第 57 回日本神経学会総会, 神戸, 5.18-21, 2016

米田誠, 井川正道, 辻川哲也, 木村浩彦, 岡沢秀彦.

脳分子イメージングによる MELAS 脳卒中様発作の
病態解明:第 34 回日本神経治療学会, 米子, 11. 3-5,
2016

その他

後藤雄一: ミトコンドリア病とはどんな病気?-難
病研究班の活動と目標-, 市民公開講座-ミトコンド
リア病を知る, 札幌, 11. 19, 2016

後藤雄一: ミトコンドリア病, 第 7 回遺伝カウンセ
リング研修会, 札幌, 7. 17, 2016

後藤雄一: ミトコンドリア病をとりまく医療と治
療研究の現況, ミトコンドリア病患者家族の会
2016 年大阪勉強会, 大阪, 7. 2, 2016

後藤雄一: エナジーメタボリズムとミトコンドリ
ア病, ゲノム創薬・医療フォーラム第 5 回懇話会,
東京, 4. 26, 2016

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患政策研究事業
「ミトコンドリア病の調査研究」H26-難治等(難)-一般-053

日本医療研究開発機構（AMED）難治性疾患実用化研究事業
「ミトコンドリア病診療の質を高める、レジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイド
ラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究」

平成 28 年度合同班会議

プログラム

日時：平成 28 年 10 月 29 日（土）13：30～17：00
場所：東京国際フォーラム G610
〒100-0005 東京都千代田区丸の内3丁目5番1号
電話：03-5221-9000

13 : 30 ~ 13 : 35 開会のことば（政策班班長） 後藤雄一

13 : 35 ~ 13 : 40 ミトコンドリア病政策班の活動概要 後藤雄一

13 : 40 ~ 13 : 45 ミトコンドリア病実用化班の活動概要 村山 圭

13 : 45 ~ 14 : 30 診断基準

現行の診断基準について（指定難病） 後藤雄一

現行の診断基準について（小児慢性特定疾患） 村山 圭

個別病型の診断基準の制定と取り扱い

【ディスカッション】（問題点の抽出と対策）

- ① 包括的診断名か個別的診断名か？
- ② 指定難病と小漫の摺り合わせについて
- ③ 遺伝学的検査以外の検査について
- ④ その他の論点

14:30 ~ 14:50 遺伝学的検査

遺伝子検査システム・遺伝子パネルについて 岡崎康司

【ディスカッション】（問題点の抽出と対策）

- ① 保険適用について
- ② IRUDとの関係について
- ③ その他の論点

14:50 ~ 15:20 診療マニュアルについて

村山班作成マニュアルについて 小坂 仁・米田 誠

難病情報センター情報の更新 後藤雄一

国内外の臨床試験現況情報 後藤雄一

【ディスカッション】（問題点の抽出と対策）

- ① エビデンスをどう得るか（特に、治療に関して）
- ② 医師、医師以外の医療関係者、行政、患者に対する
広報について
- ③ 今後の方針
- ④ その他の論点

15:20 ~ 15:30 コーヒーブレイク

15:30 ~ 16:00 レジストリー

レジストリー事業の進捗状況

後藤雄一

小児レジストリー事業の進捗状況

村山 圭

【ディスカッション】（問題点の抽出と対策）

- ① だれのためのレジストリーか？
- ② 運営資金の根拠
- ③ 国際協力の可能性
- ④ ゲノム情報の取り扱い（個人情報保護法）
- ⑤ その他の論点

16:00 ~ 16:30 生殖補助医療

ミトコンドリア病を取り巻く生殖補助医療の新たな状況

後藤雄一

末岡 浩

【ディスカッション】（問題点の抽出と対策）

- ① 世界の動向
- ② 研究班としての対応をどうするか？
- ③ その他の論点

16:30 ~ 16:40 まとめと今後の活動計画

特にアウトリーチ活動

後藤雄一

16:40 ~ 16:45

総評

日本医療研究開発機構 戦略推進部・難病研究課 井坂弘道様
厚生労働省

16:45 ~ 16:50

閉会のことば（実用化班班長）

村山 圭

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等政策研究事業

「ミトコンドリア病の調査研究」

AMED 難治性疾患政策研究事業

「ミトコンドリア病診療の質を高める、レジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイドラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究

平成 28 年度合同班会議

日 時：

平成 28 年 10 月 29 日 13:30～16:50

場 所：

東京国際フォーラム G610

出席者（敬称略）：

後藤雄一、村山圭、松永綾子、志村 優、大竹明、山崎太郎、原嶋宏子、
太田成男、岡崎康司、木下善仁、水野洋介、小坂仁、宮内彰彦、金田大太、
武田充人、阿部二郎、池田善彦、岡本裕嗣、中島葉子、小川えりか、和田敬仁、
今井敦子、福田晃也、野口篤子、伊藤玲子、濱田悠介、田中雅嗣、末岡浩、
三牧正和、内野俊平、西野一三、米田誠、竹下絵里、杉本立夏（記録）

井坂弘道（AMED）

欠席者（敬称略）：

木村円、小牧宏文

ミトコンドリア病政策班の活動概要（後藤雄一）

- 診断に関する検査（遺伝学的検査、病理検査、生化学検査）の標準化
- 日本全体をカバーするような検査体制整備
- 成人レジストリー構築からの治療研究への発展
- 生殖補助医療に関して、研究班としてのどのような働きを担うか
来年度以降の継続を目標に上記について 3 年間のまとめを行う。

ミトコンドリア病実用化班の活動概要（村山圭）

- 創薬に結びつける病態解明
- 各病型の診療マニュアル（12 月に発刊予定）、診断基準の作成

- 小児レジストリーの運営
⇒ 成育医療センターの患者登録制度 JaSMIn より移行したデータも合わせて 99 例が登録済みである。
- 特殊診断システムの確立
検査実施内容と実施施設一覧を日本ミトコンドリア学会および MO Bank ホームページ、診療マニュアルに掲載した。
今後は CPEO・KSS の診断基準作成、自然歴調査、ミトコンドリア病に関連する糖尿病・難聴・腎症などの診療マニュアル作成が課題となる。

1. 診断基準

i. 現行の診断基準について（指定難病）：後藤雄一

- 昨年 1 月に指定難病の対象となった際に作成したものを継続使用。
- なるべく多くの臓器を対象とし、症状のある患者を拾い上げるよう診断基準を作成した。
- 遺伝学的検査、病理検査、生化学検査を中心に確定診断を行う
- 単独検査では非特異的な可能性があるため、なるべく 2 種類以上の検査を行うよう推奨する。
- 資料 2 に村山班から青字の部分の改訂案が出されている。
新生児のミトコンドリア肝症を考慮して主要項目に腹部所見が追加され、検査所見に CT・MRI 検査が追加されている。次回改訂時に追加を検討したい。
- 平成 29 年度には 24 疾患が追加指定予定されており、その中で 5 疾患がミトコンドリアに関連している。
- 非ケトーシス型高グリシン血症、メチルグルタコン酸尿症について難病対策課より従来のミトコンドリア病の診断基準との整合性についての質問があり、いずれかの基準で患者が拾い上げられれば問題ないのではないかという趣旨の回答をした（別紙資料）。
- 今回のように複数の診断基準に当てはまる疾患が出てくるであろう。すでにレーベル病については指定難病として単独で存在しながらミトコンドリア病の現行の基準でも診断は可能となっているため、最終的に患者を拾い上げられれば問題ないと考えますが、当局は厳密な種分けを主張してくるかもしれない。
- カルニチン回路異常症、メチルグルタコン酸尿症は現行のミトコンドリア病の基準では抜けてしまう可能性はある。
- 小児慢性特定疾患から指定難病へスムーズに移行できる体制を整備したい ⇒ 今後の課題

ii. 現行の診断基準について（小児慢性特定疾患）：大竹明

- 小児慢性特定疾患については、病名は生化学的な診断名を用いた。
- 以前の後藤斑で作成した診断基準から作成されているため、小児慢性特定疾患も指定難病も診断基準を同等と考える。
- 指定難病の改訂案を小児慢性特定疾患にも取り入れていきたい。
- 指定難病の診断のカテゴリーとして、**Definite** を遺伝子診断+別の項目とすれば良いのではないかと考えており、遺伝子診断について厚労省に問い合わせたところ、診断基準で遺伝子診断が必須になっていないために保険収載していないという返答だった。

（参加者の発言）

- ✓ ミトコンドリア病でも遺伝子診断の保険収載は困難ではないか、どの疾患でも診断基準で必須とすれば保険収載されるわけではないのではないか。
- ✓ 遺伝子診断を進めていくという姿勢をアピールするという意味では、遺伝子変異がある場合に **Definite** にするのは良いと思うし分かりやすいとも思うが、一方で臨床的に診断している現場では混乱も生じると思う。
- ✓ 現行の指定難病の診断基準には除外診断が書かれていないが、原因遺伝子が確定しているものはそれを基準に分類されている方がシンプルだと考えられるので、今後は除外項目の作成も検討すべきかもしれない。
- ✓ 遺伝子診断の重みを重視するのは良いが、除外しないといけないものも出てくるので難しい。
- ✓ 遺伝子診断を必須とする流れは理解出来るが、罹患臓器でしか変異を検出できない場合に、罹患臓器から検体を得られないために遺伝子診断が実施出来ない場合もあるので、必須というよりは多少緩めた方がいいのではないか。
- ✓ 二次的にミトコンドリア機能が障害される疾患は診断基準においてはミトコンドリア病と分けて考えるべきだろう。
- ✓ ミトコンドリア肝症については多くの患者が成長障害を伴い消化器症状がメインになるため、改訂案の内容を追記した。
- ✓ 改訂案について、主要項目-(1)⑥は症状ではなく検査所見に含まれるのではないかと←先天性高乳酸血症という診断名が昔から使用されており、苦肉の策でこのような記載となったが、『新生時期または乳児期の哺乳不良、発達遅滞』だけを残すと幅広くなり過ぎる
- ✓ 改訂案について、主要項目-(1)③の『凝固低下』は症状ではなく検査所見に含まれるのではないかと。

- ✓ 新生児期、幼児期発症の場合には小児慢性特定疾患での対応となるため、成人で指定難病に移行することを想定すると、指定難病の基準にどこまで組み込むのかという問題もある。
- ✓ 乳酸値が繰り返し高い、ということが『具体的に何回なのか』と聞かれることもあるが、Nature review に包括的な内容が書かれているので、それとの整合性をつけてはどうか ⇒ 回数は書いていない。
- ✓ 今後新たな病気が出てくると診断基準が広がってくるのは仕方ないことであり、状況に合わせて改訂していくことになるだろう。

2. 遺伝学的検査

i. 遺伝子検査システム・遺伝子パネルについて：岡崎康司

(参加者の発言)

- ✓ 臨床現場に実装する場合の費用、診断率の問題はどうか？40%くらいでVUSが検出されるとなると、臨床検査として認められるのか、保険収載は可能か？パネルであれば実装可能か？
⇒ 費用の問題がクリア出来れば可能と考える。
- ✓ 実施施設が1カ所の場合、そこに検体が集中することになるが、それに対応可能か？
⇒ 保険収載は難しいかもしれないが、技術的には診断は可能と考えるし、サンガーシークエンスで確認するので質も問題ないが、CLIA化するのか、基準化するのか、東大ではCLIA化ラボを作る動きもあるが保険点数化するかどうかはまた難しい問題と考える。
- ✓ 保険収載されると、よく分かっていない医師も検査を依頼可能になるので、検査施設・検査依頼方法・検体受付については、臨床検査としての区分けを考えていかないといけない。
- ✓ 臨床検査として費用は患者負担で実施すべきだろう
⇒ 他疾患の研究班とも横断的に連携して、各疾患の遺伝学的検査を保険収載していけるかどうか、具体的な提言を出していないといけない状況と考える。
- ✓ 検査会社が現在の遺伝学的検査の保険点数3,880点で実施するのは無理と考える
⇒ 1疾患ではなく1遺伝子で点数をとればパネルでもある程度の金額を設定出来るし、検査会社としても利益を出すことが出来るかもしれない。

⇒ 疑い病名で解析を依頼されるものの、実際には該当しないと考えられる症例も多いので、何とか工夫して研究費の範囲内で解析を引き受けてはいるが、そういった症例も含めてとなると検査会社が実施するには保険点数を上げていくしかないだろう。

- ✓ ミトコンドリア DNA の解析のみであれば検査会社も実施可能かもしれないが、核 DNA となると検査会社には困難ではないか。
- ✓ 全ゲノムシーケンスを 19 万 8 千円で東芝に依頼しているが、出てきたデータを読むのは非常に大変ではあるものの、色んな種類のパネルを重ねるより全ゲノムで見ってしまうという方法もある。
- ✓ 解析したデータに対して有料でフィルターをかけることも可能。
- ✓ ミトコンドリア病を理解していない医師から IRUD へ解析の依頼が入る可能性もあるが、整合性がついていない状況。
- ✓ 指定難病の臨床調査個人票には遺伝子診断の項目があるが、患者によって実施されている検査は多様であるため、記載法は来年度以降の検討事項に加えて欲しい、『どこまでの検査を実施した』ということを書けるように改訂してはどうか。

3. 診療マニュアルについて

i. 村山班作成マニュアルについて：小坂仁・米田誠

- Minds 診療ガイドライン 2014 に準拠した形での作成を目指したが、診療ガイドラインとせず、診療マニュアルに変更した。
- 将来的には診療ガイドライン作成に備えたい。
- すでに 12 月刊行予定であり、著作権は日本ミトコンドリア学会におき、PDF 版はホームページで公開することになった(閲覧のみ)。
- 肝症については日本小児栄養消化器肝臓学会より推薦された 8 名で作成しており、診療ガイドラインに準じた内容となっている。
- 学校や日常生活指導についても触れているのが特徴である。

(参加者の発言)

- ✓ インターネットで公開するのであれば継続的な問い合わせ先を掲示し実際の臨床現場で使用する医師からの意見を受け付けて改訂に繋げていけば良いのではないか。

⇒ 数年で新しいエビデンスはまた出てくるので、改訂に向けて意見は取り入れていきたい。

頻度の高い難聴、糖尿病、眼症を含めて欲しいというパブリックコメントもあったので、次版での検討課題にしたい。

- ✓ 臨床医は治験に関する情報を知りたいと考えるだろうから、臨床試験情報は公開していきたい。

4. レジストリー

i. レジストリー事業の進捗状況：後藤雄一

- NCNP の倫理申請を行っている段階であるが、金銭的な問題から独立した事務局の設置は困難である。Remudy 登録システムに加わることを考えている。
- 個人情報保護法の施行に伴って各種指針等が変更される可能性があり、特に病歴は要配慮情報とされる可能性が懸念されているため、倫理申請後の承認過程で中断している状況である。

ii. 小児レジストリー事業の進捗状況：村山圭

- 患者自身が自身の意思にて実名で登録する以上、個人情報の問題は乗り切れると考えている。
- 小児と成人のレジストリーはいずれ統合予定。
- 関連研究、治療薬に関わる研究に患者レジストリーが貢献出来るようリンクしていきたい。

5. 生殖補助医療

i. ミトコンドリア病を取り巻く生殖医療の新たな状況：末岡浩

- ミトコンドリア病の生殖補助医療としては、核移植など様々な技術が開発されており、実際に諸外国では新たな技術を用いた生児獲得が報告されているため、国内でも医療機関や患者から実施を希望する声が出てくる可能性がある。
- 日本国内ではルールがあってないようなものというのが現状である。我々医療者が進めることというよりは、希望する患者家族が前に出て、我々医療者がそれをサポートする立場となるべきである。
- 最新の技術を求めて希望者が海外へ渡航する可能性もある。

ii. ディスカッション

- 卵子核移植の承認が得られたイギリスでの生児獲得のニュースかと考えていたら、アメリカからのニュースで大変驚いた。
- 技術自体は難しくないとは聞いているので、日本国内のクリニックでも実施可能だろう

⇒ 国内の指針に照らし合わせると、研究として実施するとしても侵襲を伴う軽微な介入研究になるため、実施施設はモニタリン

グもしっかりやる、コンプライアンスもみるという組織作りが必要。やろうと思えばやれるかもしれないが、倫理委員会がゴーサインを出すかどうか。デメリットはあるけど進めようという人が倫理委員にいるかどうか、ただ「自分達にはこれが必要だ」と言ってくれる人達、つまり希望する患者家族が前に出ていければ、進めていくことは出来るかもしれない（末岡）。

- 日本としてどう対応すべきなのか、研究として実施し、研究成果の公表や長期の追跡調査も実施すべきではないか。
⇒ 日本ではやっと着床前スクリーニング検査（染色体）を研究として実施開始するところ。
- 研究班としてまとまった声明を出せば良いのではないか。
- ミトコンドリア病を防ぐという名目で始まって、いずれは不妊治療に使用されていく可能性はあるだろう
⇒ イギリスでは病気に限って実施すべきとルールを定めているが、アメリカのクリニックでは今回のケースを突破口にしようとしている可能性はあるし、アメリカが容認していない研究を他国（UAE など）で実施しているケースも知られているし、費用が高額でも希望するという患者家族は日本国内にもいるだろう（末岡）。
- 卵子の老化、ということ NHK のクローズアップ現代で取り上げられるまで日本人が知らなかったという知識の無さに驚いた
⇒ 日本では卵子提供実施可能な施設は限られている（末岡）。
- 卵子提供などについてブログで記事を作成すると関心が高いことが分かるが、知りたいけど情報や技術にアクセスする術がないということもあるだろう。
- 保守的な倫理委員からは「養子縁組みでもしたらいいんじゃないか」なんて言われることもあるが、自分の子どもを生みたいという気持ちを持つことは自然なことであり、それに対して「他からもらえば良い」などと言うことは、無責任な責任回避と考える。
- ミトコンドリアと核との不整合もあるのかもしれないという意見もあるが、男児を選んでおけば少なくとも子孫への影響はないと言えるだろう。
- ゲノム編集の議論の一番のポイントは、エビデンスを動物実験で求めるというところで、ミトコンドリア病の場合には動物実験で病気をみることは難しい。
- 自分達（研究者／医療者）が実施したいのではなく、他に方法のない、患者家族が希望しているんだ、というメッセージが重要ではないか。

- ミトコンドリアだけを提供する女性は“母”として“親”にカウントされるのか、ミトコンドリアの情報が親子で繋がっていてもいいと割り切れるかどうか。
- 非難されることを気にしなければ、日産婦から除名されても良いと考える人は実施することは可能か？→技術があれば可能ではないか。法律的には罰則はない。
- 今回のケースをきっかけに、科学的な視点から声を上げる必要があると考える。

6. まとめと今後の活動計画

i. 特にアウトリーチ活動：後藤雄一

- 後藤班では11月19日に札幌にて市民講座を実施予定
- 村山班も来年のどこかで市民公開講座を実施予定

以上

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍


著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
村山圭, 小坂仁, 米田誠ら、多数	ミトコンドリア病	ミトコンドリア学会、 村山圭, 小坂仁, 米田誠	ミトコンドリア病診療マニュアル2017	診断と治療社	東京	2016	1-172
後藤雄一	ミトコンドリア病	賀藤均	特集 慢性疾患児の一生を診る (小児内科増刊号)	東京医学社	東京	2016	1527-1529
後藤雄一	Kearns-Sayre症候群	岡明	小児の症候群 (小児科診療増刊号)	診断と治療社	東京	2016	102
三牧正和	MELAS症候群	岡明	小児の症候群 (小児科診療増刊号)	診断と治療社	東京	2016	108
井川正道, 岡沢秀彦, 米田誠	酸化ストレスイメージング	鈴木 則宏, 荒木 信夫, 宇川 義一, 桑原 聡, 川原 信隆	Annual Review of Neuroscience 2017	中外医学社	東京	2017	87-93
Arakawa, K Ikawa M, Tada H, Okazawa H, Yoneda.	Mitochondrial cardiomyopathy and usage of L-arginine.	Victor R. Preedy	Arginine in Clinical Nutrition	Springer	USA	2016	461-470

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
後藤雄一	ミトコンドリア病の病因研究の現状	医学のあゆみ	260(1)	63-66	2017
後藤雄一	ミトコンドリア病に対する医療体制の現状と課題	医学のあゆみ	260(1)	123-127	2017
三牧正和	呼吸鎖複合体 I アセンブリー機構とミトコンドリア病	医学のあゆみ	260(1)	49-54	2017
井川正道, 米田誠	ミトコンドリア病の脳機能画像解析	医学のあゆみ	260(1)	67-72	2017
Yokota M, Hatakeyama H, Ono Y, Kanazawa M, Goto Y	Mitochondrial respiratory dysfunction disturbs neuronal and cardiac lineage-commitment of human iPSCs.	Cell Death Dis	8(1)	e2551	2017
Hatakeyama H, Goto Y.	Respiratory chain complex disorganization impairs mitochondrial and cellular integrity: Phenotypic variation in cytochrome <i>c</i> oxidase deficiency.	Am J Pathol.	187(1)	110-121	2017

ミトコンドリア病 診療マニュアル2017

編集

 日本ミトコンドリア学会

作成

ミトコンドリア病診療マニュアル編集委員会

村山 圭 千葉県こども病院代謝科
小坂 仁 自治医科大学小児科学
米田 誠 福井県立大学看護福祉学部



診断と治療社



● 神経疾患

ミトコンドリア異常症

後藤雄一*

I. 疾患または病態の定義

ミトコンドリア異常症という用語は学術的には何を意味するかわかりにくい。ミトコンドリアにはエネルギー産生以外に、アポトーシス、活性酸素発生、細胞内カルシウムイオン濃度調節、感染防御などさまざまな機能を有している。したがって、ミトコンドリアの機能異常を本態とする病態全体をミトコンドリア異常症とするとその範囲が広すぎてしまう。そこで、本稿ではミトコンドリアの機能のなかでもエネルギー産生低下関連の病態で起きる病気であるいわゆる「ミトコンドリア病」を対象として解説する。

ミトコンドリア病は、原因が核 DNA 上にある遺伝子変異である場合とミトコンドリア DNA の質的・量的変化による場合がある。臨床症状は神経症状に限定されず、全身の臓器症状が起きる可能性がある。また、同じ遺伝子変異でありながら、小児期に発症する場合も成人になって発症する場合もある。さらに、臨床経過も進行性の場合も、自然に軽快するものもある。

このようにミトコンドリア病には臨床的多様性があるため、本稿では比較的頻度の高い三大病型の小児期発症例と Leigh 脳症に絞って解説することにしたい。

GOTO yuichi

* 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

〒187-8551 東京都小平市小川東町4-1-1)

TEL 042-346-3524 FAX 042-346-3557

E-mail: goto@ncnp.go.jp

1. 中枢神経症状を主体とする三大病型

三大病型とは、脳卒中様病変を特徴とする MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)、ミオクローヌスと小脳症状を特徴とする MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers)、外眼筋麻痺を特徴とする CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia) である (表)。これらは、中枢神経症状を中核にした病型分類であり、それぞれに特異的なミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異が存在することで知られている。しかし、注意すべきことはこれらの病型は固定されたものではなく、MELAS と MERRF がオーバーラップする場合、MELAS に外眼筋麻痺が合併する場合など、その臨床症状の組み合わせは多彩であることである。

2. Leigh 脳症

Leigh 脳症は、主に乳幼児期に発症するミトコンドリア病の一病型であり、症状としては精神運動発達遅延・退行、けいれん、ジストニアなどを呈し、検査所見として、両側性の大脳基底核や脳幹病変、高乳酸血症を特徴とする。その原因は約 20% が mtDNA 変異であるが、残り 80% は核 DNA 上の遺伝子変異と推定されている。核 DNA 上の原因遺伝子はさまざまであり、電子伝達系酵素複合体の構成分子やアッセムブリーにかかわる分子、mtDNA の転写や翻訳にかかわる分子、ピルビン酸脱水素酵素や TCA 回路関連分子、β酸化などにかかわる分子などが報告されている。今のところ、核 DNA 上の変異と考えられる症例の約 50% は原因が同定できておらず、全体として 40% 程度は原因未確定である。

II. 小児期における状態

小児期発症の三大病型と Leigh 脳症において、まずは確定診断を行うことが重要である。診断方法の詳細は他書に譲るとしても、遺伝学的検査とともに病理学的検査、生化学検査の重要性を強調しておきたい。遺伝学的検査は、核 DNA 上の遺伝子変異か mtDNA の変化かで病態が大きく異なることになる。一般的に、mtDNA 変化で起きる

表 代表的な小児発症ミトコンドリア病の病型と特徴

病型	慢性進行性外眼筋麻痺症候群	ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群	赤色ぼろ線維・ミオクローヌス・てんかん症候群	Leigh 脳症
英文略語	CPEO	MELAS	MERRF	
英文名	chronic progressive external ophthalmoplegia	mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes	myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers	Leigh encephalopathy
mtDNA 変異	単一欠失, 多重欠失 3243 変異など	3243, 3271, 13513 変異など	8344 変異など	8993, 9176, 13513 変異など
核 DNA 変異	ANT1, POLG, TP など	—	—	SURF1, PDHA1 など
遺伝形式	単一欠失: 突然変異など 多重欠失: 突然変異, 常染色体優性/劣性遺伝 mtDNA 点変異: 母系遺伝	主に母系遺伝	主に母系遺伝	mtDNA 点変異: 母系遺伝 核 DNA 変異: 主に常染色体劣性遺伝
発症年齢	小児～成人	小児～成人	小児～成人	乳児～小児
主な症状	眼瞼下垂, 全方向性眼球運動障害, 嚥下障害, 白質脳症など (CPEO に網膜色素変性, 心伝動障害を伴ったものを Kearns-Sayre 症候群という)	脳卒中様症状(けいれん, 意識障害, 半盲・視野狭窄, 運動麻痺など), くり返す頭痛・嘔吐発作, 精神症状	ミオクローヌス, てんかん, 小脳症状	精神運動発達遅滞, けいれん, 嚥下困難など
その他の症状	糖尿病, 難聴, 低身長, 副甲状腺機能低下症など	低身長, 筋力低下, 糖尿病・難聴, 心筋症, 糸球体病変, 多毛など	筋力低下, 心筋症など	典型的な症例では早期に呼吸不全にいたる
血中乳酸値	軽度上昇	中等度～高度に上昇	中等度～高度に上昇	高度に上昇
筋病理所見	特徴的变化あり	特徴的变化あり	特徴的变化あり	特徴的变化なし

病気は臨床症状が多彩であり、症状の組み合わせも個々の症状の重症度もさまざまである。とくに、細胞内に野生型と変異型 mtDNA が混在するヘテロプラスミーの状態で症状が出る三大病型の場合がその典型である。

ヘテロプラスミーの細胞では、その変異率が高くないと細胞障害が起きないことがわかっている。つまり、変異率が高度である細胞は機能障害や細胞死を起こし、変異率がそれほど高くない細胞はなら機能低下を起こさないと考えられる。通常、三大病型の患者においては変異率が高度に高い細胞が集中的に存在している臓器に症状が発現しており、ほかのほとんどの臓器は mtDNA 変異があっても症状が出現していないと推定される。ただ現在のところ、どの臓器（細胞）に変異 mtDNA が多く存在しているかを非侵襲的に調べ

る方法はない。新たな臓器症状の出現の予想も困難である。

三大病型の臨床経過も一定していない。たとえば、MELAS の場合に、脳卒中様症状の回数や重症度が予後に大きくかわるものの、どのような機序でそのイベントが出現するかが明らかになっていない。何度か脳卒中様発作をくり返したかと思うと、数年発作が出ないということもある。また、MELAS や MERRF では、定期的に心エコー検査を含む心機能を診ていながらも心原性と思われる突然死の症例もあり、その予後を予想することはなかなか難しい。しかしながら、三大病型の症例の医療では、もっとも重症の臓器症状に対する治療を中心としながら、神経・筋症状以外の、心、腎などの重要臓器の状態を見ながら経過を観察することが肝要である。

Leigh 脳症においては、mtDNA 変異の場合もホモプラスミーであり全身の細胞に多様性がないことが知られている。これは核 DNA 上の遺伝子変異の場合も同様で、ヘテロプラスミーの場合にみられる細胞ごとの違いが少ないと予想される。症状の出現は、原因遺伝子の特性や細胞・臓器のエネルギー依存度に左右されると考えられる。実際の臨床経過は急速に進行する症例は存在するものの、必ずしも進行性ではなく精神運動発達がみられる症例などがあり、一定していない。この点も患者を診ていく際には重要な点であり、経過をしっかりと診ていくことが肝要である。

なお、三大病型において、MELAS においては脳卒中様発作を予防する目的でアルギニンやタウリンが臨床試験としてその効果と副反応の有無が調べられており、結論はまだ得られていない。また、一般的に用いられているビタミン剤についても、効果はまだ明らかでないことを銘記しておく

べきである。食事内容を含めた生活指導がもっとも重要である。

Ⅲ. 成人期における状態と課題

小児期を比較的進行せずに過ごせた患者でも、成人期に入りそれぞれの症状が重症化することはまれではない。また、成人期の新たな臓器症状の出現にも注意が必要である。このような場合、対症療法は患者にとって重要であり、できるだけ当該臓器の治療に詳しい診療科における最新治療が受けられるようにすることが必要である。小児科医からそれぞれの臓器の診療科にコンサルトしてチームで患者を診ることを勧めたい。また、必要に応じて、その小児科医の役割を内科医や神経内科医に移行していくことも重要である。

一方で、ミトコンドリア病の原因療法（根本治療）の開発が望まれる。しかし現在のところ、そのような治療法で確たるものはない。

* * *

Chapter 36

Mitochondrial Cardiomyopathy and Usage of L-Arginine

Kenichiro Arakawa, Masamichi Ikawa, Hiroshi Tada, Hidehiko Okazawa, and Makoto Yoneda

Key Points

- Cardiomyopathy is present in 17–40 % of patients with mitochondrial disease and is one of the major causes of death in such patients.
- MELAS is a syndrome caused by an A-to-G transition at nucleotide position 3243 in tRNA-Leu of mtDNA and is the most common type of mitochondrial disease.
- In vivo functional imaging makes it possible to evaluate aspects of energy metabolism such as membrane potential and TCA cycle kinetics in MELAS patients noninvasively.
- L-Arg therapy is a promising approach for controlling the stroke-like episode of MELAS because of its vasodilative effect.
- L-Arg also has the potential to accelerate TCA cycle activity, irrespective of its vasodilative effect, and this can be used for treatment of mitochondrial cardiomyopathy.

Keywords Cardiomyopathy • MELAS • SPECT • PET • L-Arginine • TCA cycle

K. Arakawa, MD, PhD

Department of Cardiology, Jujinkai Medical Association Kimura Hospital,
4-4-9 Asahimachi Sabea City, Fukui 916-0025, Japan

Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui,
23-3 Shimoaizuki, Matsuoka, Eiheiiji, Fukui 910-1193, Japan
e-mail: ke.arakawa@jojinkai.or.jp

M. Ikawa, MD, PhD

Department of Neurology, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui,
23-3 Shimoaizuki, Matsuoka, Eiheiiji-Town, Fukui 910-1193, Japan

Molecular Imaging Branch, National Institute of Mental Health,
10 Center Drive, MSC-1026, Bldg. 10, Rm. B1D43, Bethesda, MD 20892-1026, USA
e-mail: iqw@u-fukui.ac.jp

H. Tada, MD, PhD

Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui
23-3 Shimoaizuki, Matsuoka, Eiheiiji, Fukui 910-1193, Japan
e-mail: htada@u-fukui.ac.jp

Abbreviations

MELAS	Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes
mtDNA	Mitochondrial DNA
ATP	Adenosine triphosphate
LVH	Left ventricular hypertrophy
Arg	L-Arginine
NOx	Nitric oxide
SPECT	Single-photon emission computed tomography
^{99m} Tc-MIBI	Technetium 99 m methoxyisobutylisonitrile
¹²³ I-BMIPP	Iodine-123-labeled 15-4-iodophenyl-3-(<i>R,S</i>)-methyl-pentadecanoic acid
PET	Positron emission tomography
TCA	Tricarboxylic acid
MBF	Myocardial blood flow

Introduction

It is well known that the most common morphology of cardiomyopathy is hypertrophy of the left ventricle. Practically, it is diagnosed as idiopathic hypertrophic cardiomyopathy, although occasionally it occurs secondary to systemic disease. The etiology of hypertrophic cardiomyopathy varies and can include ischemia, valve disease, inflammation, muscle dystrophy, toxemia, collagen disease, and metabolic diseases such as amyloidosis, Fabry's disease, and mitochondrial disease [1]. Accordingly, the treatment and prognosis of each individual disease differ, making a correct diagnosis important.

A recent epidemiological study has revealed that the prevalence or risk of developing mitochondrial DNA (mtDNA) disease is 12.48 per 100,000 individuals in the general population [2]. Moreover, pathogenic mtDNA mutations that can potentially cause disease are detected in at least one in 200 live births, indicating that mtDNA is not as rare a disease as once thought previously [3].

The human mitochondrial genome disorders discovered up to the present are cited in MITOMAP (URL: <http://www.mitomap.org/>), and more than 40 mutations of mtDNA or nuclear DNA associated with structural mitochondrial cardiomyopathy have been reported (Tables 36.1, 36.2, and 36.3). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) is the most common type of mitochondrial disease and is also related to familial cardiomyopathy, which is caused by an A-to-G transition at position 3243 (A3243G) in tRNA-Leu of the mtDNA [4, 5]. This mutation reduces the activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I), leading to impairment of respiratory chain function with consequent reduction of adenosine triphosphate (ATP) production [6]. Furthermore, this mutant and wild-type mtDNA coexist in each individual cell (heteroplasmy), and the proportion of mutant mtDNA must exceed a certain fixed level in order to result

H. Okazawa, MD, PhD
Biomedical Imaging Research Center, University of Fukui
23-3 Shimoaizuki, Matsuoka, Eiheiji, Fukui 910-1193, Japan
e-mail: okazawa@u-fukui.ac.jp

M. Yoneda, MD, PhD (✉)
Faculty of Nursing and Social Welfare Sciences, Fukui Prefectural University,
4-1-1 Kenjojima, Matsuoka, Eiheiji, Fukui 910-1195, Japan
e-mail: myoneda@fpu.ac.jp

Table 36.1 mtDNA mutations in rRNA/tRNA regions causing cardiomyopathy

Position	Locus	Disease	Allele	RNA	Homoplasmy	Heteroplasmy
1391	MT-RNR1	HCM	T1391C	12S rRNA	+	-
1556	MT-RNR1	HCM	C1556T	12S rRNA	+	-
1644	MT-TV	HCM+MELAS	G1644A	tRNA Val	-	+
3242	MT-TL1	MM/HCM+renal tubular dysfunction	G3242A	tRNA-Leu (UUR)	+	+
3243	MT-TL1	DMDF/MIDD/SNHL/FSGS/ cardiac + multiorgan dysfunction	A3243G	tRNA-Leu (UUR)	-	+
3260	MT-TL1	MMC/MELAS	A3260G	tRNA-Leu (UUR)	-	+
3303	MT-TL1	MMC	C3303T	tRNA-Leu (UUR)	+	+
4269	MT-T1	FICP	A4269G	tRNA Ile	-	+
4295	MT-T1	MHCM/maternally inherited hypertension	A4295G	tRNA Ile	+	+
4316	MT-T1	HCM with hearing loss/poss. hypertension factor	A4316G	tRNA Ile	+	+
4317	MT-T1	FICP/poss. hypertension factor	A4317G	tRNA Ile	+	-
5545	MT-TW	HCM severe multisystem disorder	C5545T	tRNA ^{Trp}	-	+
8296	MT-TK	DMDF/MERRF/HCM/epilepsy	A8296G	tRNA Lys	+	+
8348	MT-TK	Cardiomyopathy/SNHL/poss. hypertension factor	A8348G	tRNA Lys	+	+
8363	MT-TK	MICM+DEAF/MERRF/autism/ LS/ataxia + lipomas	G8363A	tRNA Lys	-	+
9997	MT-TG	MHCM	T9997C	tRNA ^{Gly}	nd	+
12297	MT-TL2	Dilated cardiomyopathy/LS/ failure to thrive and LA	T12297C	tRNA-Leu (CUN)	+	+
12308	MT-TL2	CPEO/stroke/CM/breast and renal and prostate cancer risk/altered brain pH	A12308G	tRNA-Leu (CUN)	+	+
15923	MT-TT	Infantile CM	A15923G	tRNA ^{Thr}	-	+
16032	MT-TP	Dilated cardiomyopathy	*	tRNA ^{Pro}	-	+

HCM hypertrophic cardiomyopathy, *MM* mitochondrial myopathy, *DMDF* diabetes mellitus + deafness, *MIDD* maternally inherited diabetes and deafness, *SNHL* sensorineural hearing loss, *FSGS* focal segmental glomerulosclerosis, *MMC* maternal myopathy and cardiomyopathy, *FICP* fatal infantile cardiomyopathy + a MELAS-associated cardiomyopathy, *MHCM* maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy, *MERRF* myoclonic epilepsy and ragged-red muscle fibers, *MICM* maternally inherited cardiomyopathy, *DEAF* maternally inherited deafness or aminoglycoside-induced deafness, *LS* Leigh syndrome, *LA* lactic acidemia, *CPEO* chronic progressive external ophthalmoplegia, *CM* cardiomyopathy

*T16032TTCTCTGTTCTTCAT (15 bp dup) (cited from MITOMAP and adapted to the text contents)

in clinically apparent respiratory chain failure [7, 8]. Thus, energy production differs from tissue to tissue and also among organs, markedly energy-dependent organs tending to be affected most significantly. The distinct clinical features of MELAS patients are systemic and include myopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes, hearing loss, diabetes mellitus, gastrointestinal manifestations, renal failure, and cardiomyopathies [4, 7, 8].

Mitochondrial cardiomyopathy often results in concentric left ventricular hypertrophy (LVH), and the severity of the LVH correlates with the burden of mitochondrial disease (Fig. 36.1). The reasons for development of LVH have been investigated using knockout mice with a deficiency in the mitochondrial adenine nucleotide translocator [9]. Like MELAS patients, these experimental mice show

Table 36.2 mtDNA mutations in the coding/control genes causing cardiomyopathy

Position	Locus	Disease	Allele	Nucleotide change	Amino acid change	Homoplasmy	Heteroplasmy
3337	MT-ND1	Cardiomyopathy	G3337A	G-A	V-M	+	-
3395	MT-ND1	HCM with hearing loss	A3395G	A-G	Y-C	-	+
3397	MT-ND1	ADPD/possibly LVNC cardiomyopathy associated	A3397G	A-G	M-V	+	-
3407	MT-ND1	HCM/muscle involvement	G3407A	G-A	R-H	+	-
5001	MT-ND2	Developmental delay, seizure, cardiomyopathy, lactic acidosis	A5001AA	A-AA	Frameshift	-	+
8528	MT-ATP8/6	Infantile cardiomyopathy	T8528C	T-C	W-R (ATP); M(start)-T(ATP6)	+	+
8558	MT-ATP8/6	Possibly LVNC cardiomyopathy associated	C8558T	C-T	P-S(ATP8); A-V(ATP6)	+	-
9058	MT-ATP6	Possibly LVNC cardiomyopathy associated	A9058G	A-G	T-A	+	-
15498	MT-CYB	HCM/WPW, DEAF	G15498A	G-A	G-D	-	+
15693	MT-CYB	Possibly LVNC cardiomyopathy associated	T15693C	T-C	M-T	+	-

ADPD Alzheimer's disease and Parkinson's disease, LVNC left ventricular noncompaction, WPW Wolff-Parkinson-White syndrome (cited from MITOMAP and adapted to the text contents)

Table 36.3 Nuclear DNA mutations causing mitochondrial cardiomyopathy

Gene	Chromosome	function	Chromosome	Inheritance	Clinical phenotype
<i>Structural gene</i>					
NDUFV2	FP fraction		18p11	AR	Cardiomyopathy, hypotonia, encephalopathy
<i>Complex assembly</i>					
NDUFAF1 (CIA30)	Assembly		15q13.3	AR	Cardioencephalopathy
SCO2	Copper transport		22q13	AR	Neonatal cardioencephalomyopathy
COX10	Heme A farnesyltransferase		17p12-p11.2	AR	Neonatal tubulopathy and encephalopathy, LS, cardiomyopathy
COX15	Heme A synthesis		10q24	AR	Early-onset hypertrophic cardiomyopathy
TMEM70	Assembly		8q21.11	AR	Neonatal encephalopathy, cardiomyopathy
<i>Mitochondrial import</i>					
DNAJC19	Protein import		3q26.3	AR	Cardiomyopathy, ataxia
<i>Mt protein synthesis</i>					
MRPS22	Mitochondrial translation		3q23	AR	Cardiomyopathy, tubulopathy
<i>Iron homeostasis</i>					
BOLA3	Iron-sulfur cluster biosynthesis		2p13.1	AR	Encephalomyopathy, cardiomyopathy
<i>CoQ10 biosynthesis</i>					
COQ9	CoQ10 deficiency		16q13	AR	Neonatal lactic acidosis, seizures, cardiomyopathy
<i>Chaperon function</i>					
G4.5 (tafazzin)	Cardiolipin defect		Xq28	X linked	Barth syndrome, X-linked dilated cardiomyopathy

FP flavin protein, AR autosomal recessive, CoQ coenzyme Q (cited from MITOMAP and adapted to the text contents)



Fig. 36.1 Representative photograph of hypertrophic cardiomyopathy of a patient with mitochondrial disease

ragged-red muscle fibers, lactic acidosis, and cardiac hypertrophy, suggesting that deficiency of ATP production plays an important role in these conditions. On the other hand, a rare form of dilated-type mitochondrial cardiomyopathy has also been reported [10, 11]. A subset of patients with LVH progress to the dilated phase, which resembles idiopathic hypertrophic cardiomyopathy [12], but in some cases dilated cardiomyopathy is already present in childhood [13]. This discrepancy has been explained using a transgenic mouse model of mtDNA mutations, in which increased production of mitochondrial reactive oxygen species during the aging process leads to initiation of apoptosis and plays a crucial role in the development of dilated cardiomyopathy [14].

The frequency of cardiomyopathy in patients with mitochondrial disease is reported to be 17–40 % and is one of the major causes of death in affected patients [15–17]. Unfortunately no effective therapies for cardiomyopathy have been found to date. Koga et al. reported that L-arginine (Arg) infusion during the acute phase of the stroke-like episodes in MELAS patients dramatically improved all of the stroke-like symptoms within 30 min [18]. Moreover, oral administration of L-Arg during the interictal phase significantly decreased the frequency and severity of stroke-like episodes in MELAS patients [19]. L-Arg therapy is therefore now a promising approach for controlling the stroke-like episode of MELAS. Here we further investigated the therapeutic effect of L-Arg infusion in patients with cardiomyopathy and the possible mechanisms responsible.

In Vivo Functional Imaging of Mitochondrial Cardiomyopathy

Although the histopathologic abnormalities of mitochondrial cardiomyopathy have been clearly revealed using autopsied and/or biopsied tissue samples, the pathogenesis of cardiomyopathy has been discussed largely on the basis of the experimental studies [9, 14, 20]. Here we evaluated energy states in the myocardium of patients with MELAS using in vivo functional imaging.

Evaluation of Mitochondrial Membrane Potential and the Anaerobic Pathway Using Single-Photon Emission Computed Tomography (SPECT)

Technetium 99 m methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc -MIBI) is incorporated and retained in the mitochondria of myocardial cells, a process that depends on mitochondrial membrane potential [21]. This tracer is not retained in necrotic or irreversibly ischemic myocardium and therefore can be used for assessing myocardial perfusion and myocardial cell viability [22].

Iodine-123-labeled 15-4-iodophenyl-3-(*R,S*)-methyl-pentadecanoic acid (^{123}I -BMIPP) is converted to acyl-CoA, a common pathway of myocardial fatty acid metabolism, but is not metabolized via beta-oxidation, which reflects the enhanced triglyceride pool [23]. An increasing number of studies have reported that patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy show reduced uptake of ^{123}I -BMIPP and that this is related to impairment of the plasma membrane of cardiac myocytes [24].

Using these two tracers, we recently reported that in MELAS patients, the ^{99m}Tc -MIBI washout rate (WOR) was increased, resulting in decreased uptake of ^{99m}Tc -MIBI (Fig. 36.2) [25]. In contrast, ^{123}I -BMIPP uptake increased according to the severity of left ventricular function (Fig. 36.2) [25]. These findings confirmed that respiratory chain failure leads to a continuous energy shift from the aerobic to the anaerobic (glycolytic) pathway, resulting in the lactic acidemia that is observed in MELAS patients. To ameliorate the over-reduction stress resulting from respiratory chain failure, reduction of dihydroxyacetone phosphate to glycerol-3-phosphate occurs in order to oxidize superfluous nicotinamide adenine dinucleotide [NADH] to [NAD⁺], the excess glycerol-3-phosphate being utilized for synthesis of triglyceride. Accumulation of ^{123}I -BMIPP in MELAS patients was provoked by this enhanced triglyceride pool (Fig. 36.2) [25].

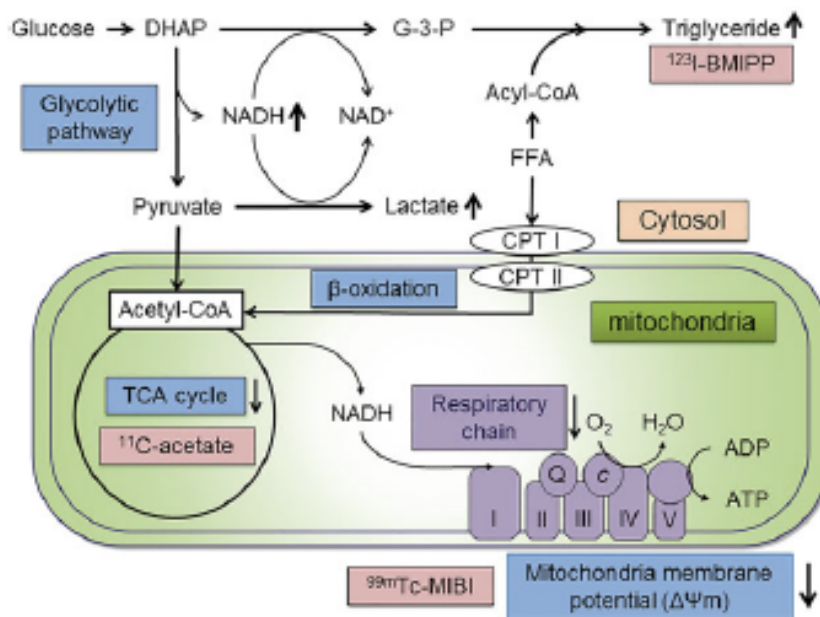


Fig. 36.2 Schematic illustration of energy production pathways in which functional imaging can be adapted. ^{99m}Tc -MIBI is incorporated and retained in the mitochondria depending on mitochondrial membrane potential created by the respiratory chain. ^{123}I -BMIPP is incorporated into the TG pool, associated with an excess of glycerol-3-phosphate (G-3-P), and is enhanced by increased glucose utilization. ^{11}C -acetate PET is responsible for the flux of TCA cycle. CPT carnitine palmitoyltransferase, FFA free fatty acid (cited from Ref. [25] with modifications)

Evaluation of TCA Cycle Kinetics Using Positron Emission Tomography (PET)

Radiolabeled ^{11}C -acetate kinetics demonstrated by PET are closely correlated with myocardial oxygen consumption [26, 27]. The acetate is known to be a substrate that can be utilized readily by the heart and is incorporated directly into the tricarboxylic acid (TCA) cycle after conversion to acetyl CoA. Therefore, ^{11}C -acetate can be used to measure the flux of the TCA cycle without being affected by conditions of energy production in the heart such as normoxemia, ischemia, and reperfusion, which advantages over other conventional tracers such as ^{18}F -deoxyglucose and ^{11}C -palmitate [28].

^{11}C -acetate PET also has the potential for detecting myocardial blood flow (MBF) using the early-phase (0–3 min after tracer injection) kinetics of ^{11}C -acetate [29]. Since the flux of the TCA cycle was measured using the delayed-phase (7–20 min after injection) kinetics of ^{11}C -acetate, these two parameters can be measured in exactly the same location in the heart.

Our SPECT study in MELAS patients with cardiomyopathy demonstrated a shift in energy production from the aerobic to the anaerobic pathway [25], although TCA cycle activity, which is of central importance in oxidative metabolism, was not fully evaluated. We therefore applied ^{11}C -acetate PET to MELAS patients and compared the findings with those in healthy controls [30]. The results revealed that TCA cycle activity tended to be lower in the patients than in the controls, thus confirming a shift of energy production to the anaerobic pathway according to impairment of electron transport and oxidative phosphorylation resulting from respiratory chain failure (Fig. 36.2) [25].

Effect of L-Arginine Administration on Mitochondrial Cardiomyopathy Evaluated by ^{11}C -Acetate PET

As described at the beginning of this chapter, L-Arg administration is now a promising therapy for the acute and interictal phase of the stroke-like episodes in MELAS patients [19]. One suggested mechanism is that L-Arg, which is a precursor of nitric oxide (NOx), may increase blood flow in the cerebral microcirculation and reduce ischemic damage to the brain. From the fact that the concentrations of L-Arg, citrulline, and NOx were low in the acute phase of the stroke-like episodes in MELAS patients, it seems plausible to supplement the amounts of these substances [19]. An improvement of endothelial function in MELAS patients was also observed after oral L-Arg supplementation, which would explain the long-term outcome [31]. As the impact of L-Arg administration on mitochondrial cardiomyopathy has not yet been reported, we recently evaluated the acute effect of L-Arg administration on cardiomyopathy using ^{11}C -acetate PET [30].

We performed ^{11}C -acetate PET before and after L-Arg infusion (0.5 g/kg, within 30 min) in six patients with clinically and genetically diagnosed MELAS. After L-Arg injection, TCA cycle activity (expressed as K_{trans}) of the entire heart did not increase significantly, although four of the six patients showed improvement after L-Arg administration. Due to heteroplasmy, mitochondrial dysfunction occurs in various tissues to varying degrees, a phenomenon known as “mosaicism of mitochondrial disease.” Therefore, we further divided the heart into nine segments. TCA cycle activity was improved after L-Arg injection among six to eight segments in four responders, whereas it was five segments in two nonresponders. On the other hand, MBF increased in two patients, decreased in two patients, and remained the same in two patients after L-Arg infusion. To analyze the relationship between TCA cycle activity and MBF, we prepared a bull’s-eye map of these two parameters before and after L-Arg injection. Figure 36.3 shows representative data for a MELAS patient who showed an increase of TCA cycle activity after L-Arg infusion. Surprisingly, the regions of improved TCA cycle activity did not correspond to the regions of increased MBF.

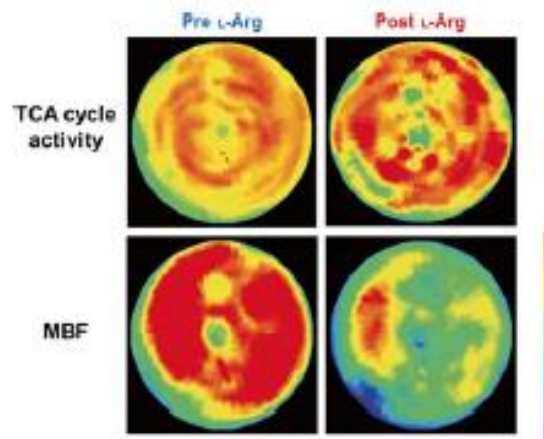


Fig. 36.3 Representative bull's-eye map of TCA cycle activity (*upper deck*) and myocardial blood flow (MBF; *lower deck*) before and after L-arginine administration in MELAS patients (cited from Ref. [30])

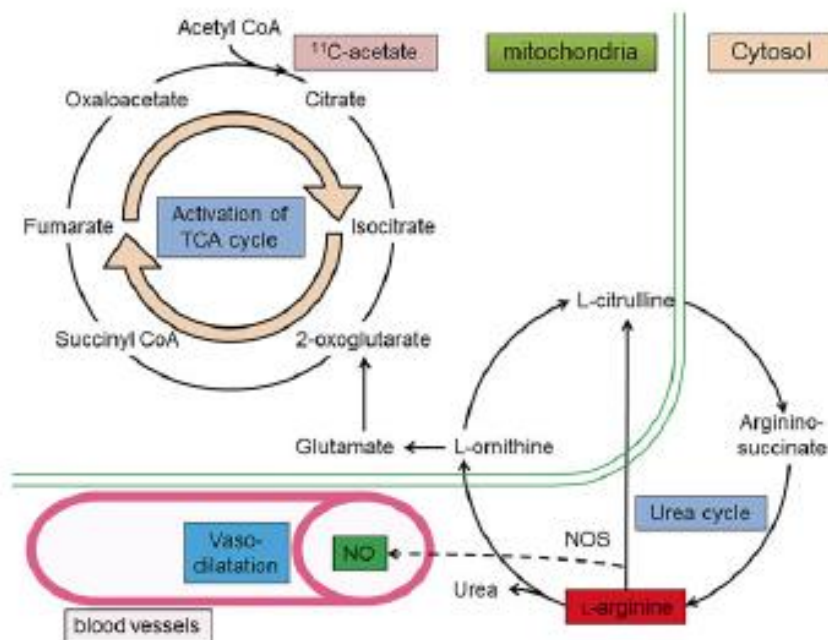


Fig. 36.4 Schematic illustration of L-Arg catabolism. Nitric oxide (NO) is synthesized from L-Arg catalyst of nitric oxide synthase (NOS). L-Arg has another potential to enter the TCA cycle by conversion to 2-oxoglutarate

L-Arg is a well-known precursor of NO_x affected by endothelial nitric oxide synthase, a strong endogenous vasodilator [32, 33]. Accordingly, we expected that the regions of improved TCA cycle activity would match the regions of increased MBF, but no such relationship was observed. Although the reason for this remains obscure, Arg has a wide range of biological roles, such as a precursor for synthesis of urea, NO_x, citrulline, ornithine, creatine, and agmatine. Furthermore, ornithine generates polyamine, proline, and particularly glutamate, which undergoes conversion to 2-oxoglutarate and enters the TCA cycle (Fig. 36.4). Therefore, an excess of 2-oxoglutarate in the TCA cycle induced by L-Arg injection could be responsible for acceleration of TCA cycle activity with little relevance to the coronary microcirculation.

The primary cause of the stroke-like episodes in MELAS patients remains uncertain but is thought to involve angiopathy, cytopathy, or both. Potential therapeutic effects of L-Arg for strokes are mainly thought to contribute to amelioration of angiopathy through its vasodilative effect and improvement of endothelial function. The logic of this approach is result from the loss of NOx in vascular endothelial and smooth muscle cells. However, the concentration of NOx was quite elevated in the interictal phase of stroke-like episodes [19]. Moreover, an *in vitro* experimental study has revealed that the synthesis of NOx was increased in cybrid cells carrying the A3243G mutation, which supports this condition [34]. Our study suggests that L-Arg enhances TCA cycle activity irrespective of vasodilation, which rescues the cytopathy (over-reduction stress) of MELAS patients. A recent study has also revealed that L-Arg improved the activity of complex I activity, a nonvascular system, in cybrid cells harboring A3243G mutation, thus strongly supporting our hypothesis regarding the metabolic effect of L-Arg [35].

Accordingly, our study has clearly demonstrated that L-Arg has dual pharmaceutical effects—vasodilatation (angiopathy) and acceleration of the TCA cycle (cytopathy)—which can be used as a treatment for patients with mitochondrial cardiomyopathy.

Conclusions

Mitochondrial cardiomyopathy is caused by respiratory chain failure due to mtDNA mutation, one of the key conditions that determine the prognosis of patients with mitochondrial disease. Functional imaging modalities such as SPECT and PET enable evaluation of *in vivo* energy production and the efficacy of treatment for patients with MELAS. It was clearly revealed that TCA cycle activity was markedly suppressed, resulting in a change in oxidative metabolism from an aerobic to an anaerobic state. L-Arg has the potential to enhance TCA cycle activity without being affected by any vasodilative effect, suggesting dual pharmaceutical effects that could be applied for treatment of mitochondrial cardiomyopathy.

Acknowledgments The research mentioned in this chapter was partially supported by Grants-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to M.Y. (24111517); Grants-in-Aid for Research on Intractable Diseases (Mitochondrial Disorders) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan to M.Y.; and an intramural research fund (25-4-7) for cardiovascular diseases from the National Cerebral and Cardiovascular Center to H.T.

Conflict of Interest None.

References

1. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International society and federation of cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841–2.
2. Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, et al. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol*. 2000;48:188–93.
3. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, et al. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet*. 2008;83:254–60.
4. Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, et al. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol*. 1984;16:481–8.
5. Förster C, Hübnér G, Müller-Höcker J, et al. Mitochondrial angiopathy in a family with MELAS. *Neuropediatrics*. 1992;23:165–8.
6. Ichiki T, Tanaka M, Nishikimi M, et al. Deficiency of complex I and mitochondrial encephalomyopathy. *Ann Neurol*. 1988;23:287–94.

7. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletion of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988;331:717–9.
8. Schon EA, Bonilla E, DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr*. 1997;29:131–49.
9. Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet*. 1997;16:226–34.
10. Majamaa-Voltti K, Peuhkurinen K, Kortelainen ML, et al. Cardiac abnormalities in patients with mitochondrial DNA mutation 3243A>G. *BMC Cardiovasc Disord*. 2002;2:12.
11. Chinnery PF. Mitochondrial disorders overview. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle, WA: University of Washington; 1993–2014.
12. Ten Cate FJ, Roelandt J. Progression to left ventricular dilatation in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Am Heart J*. 1979;97:762–5.
13. Vilarinho L, Santorelli FM, Osas MJ, et al. The mitochondrial A3243G mutation presenting as severe cardiomyopathy. *J Med Genet*. 1997;34:607–9.
14. Wallace DC. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am Heart J*. 2000;139:70–85.
15. Holmgren D, Wahlander H, Eriksson BO, et al. Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease. *Eur Heart J*. 2003;24:280–8.
16. Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, et al. Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics*. 2004;114:925–31.
17. Anan R, Nakagawa M, Miyata M, et al. Cardiac involvement in mitochondrial disease: a study on 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. *Circulation*. 1995;91:955–61.
18. Koga Y, Akita Y, Nishioka J, et al. L-arginine improves the symptom of strokelike episodes in MELAS. *Neurology*. 2005;64:710–2.
19. Koga Y, Akita Y, Nishioka J, et al. MELAS and L-arginine therapy. *Mitochondrion*. 2007;7:133–9.
20. Ban S, Mori N, Saito K, et al. An autopsy case of mitochondrial encephalomyopathy (MELAS) with special reference to extra-neuromuscular abnormalities. *Acta Pathol Jpn*. 1992;42:818–25.
21. Carvalho PA, Chiu ML, Kronauge JF, et al. Subcellular distribution and analysis of technetium-99m-MIBI in isolated perfused rat hearts. *J Nucl Med*. 1992;33:1516–22.
22. Crane P, Laliberte R, Heminway S, et al. Effect of mitochondrial viability and metabolism on technetium-99m-sestamibi myocardial retention. *Eur J Nucl Med*. 1993;20:20–5.
23. Knapp Jr FF, Ambrose KR, Goodman MM. New radioiodinated methyl-branched fatty acids for cardiac studies. *Eur Nucl Med*. 1986;12:39–44.
24. Nakamura T, Suguhara H, Kinoshita N, et al. Serum carnitine concentrations in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy: relationship with impaired myocardial fatty acid metabolism. *Clin Sci*. 1999;97:493–501.
25. Ikawa M, Kawai Y, Arakawa K, et al. Evaluation of respiratory chain failure in mitochondrial cardiomyopathy by assessments of ^{99m}Tc-MIBI washout and ¹²³I-BMIPP/^{99m}Tc-MIBI mismatch. *Mitochondrion*. 2007;7:164–70.
26. Klein LJ, Visser FC, Knaapen P, et al. Carbon-11 acetate as a tracer of myocardial oxygen consumption. *Eur J Nucl Med*. 2001;28:651–68.
27. Buxton DB, Nienaber CA, Luxen A, et al. Noninvasive quantitation of regional myocardial oxygen consumption in vivo with [1-¹³C]acetate and dynamic positron emission tomography. *Circulation*. 1989;79:134–42.
28. Brown M, Marshall DR, Sobel BE, et al. Delineation of myocardial oxygen utilization with carbon-11-labeled acetate. *Circulation*. 1987;76:687–96.
29. Kudo T, Hata T, Kagawa S, et al. Simple quantification of myocardial perfusion by pixel-by-pixel graphical analysis using carbon-11 acetate and nitrogen-13 ammonia. *Nucl Med Commun*. 2008;29:679–85.
30. Arakawa K, Kudo T, Ikawa M, et al. Abnormal myocardial energy-production state in mitochondrial cardiomyopathy and acute response to L-arginine infusion. *Circ J*. 2010;74:2702–11.
31. Koga Y, Akita Y, Junko N, et al. Endothelial dysfunction in MELAS improved by L-arginine supplementation. *Neurology*. 2006;66:1766–9.
32. Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, et al. L-Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation*. 1991;83:1118–20.
33. Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, et al. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation*. 1994;89:2176–82.
34. Gamba J, Gamba LT, Rodrigues GS, et al. Nitric oxide synthesis is increased in cybrid cell with m.3243A>G mutation. *Int J Mol Sci*. 2013;14:394–410.
35. Desquiret-Dumas V, Gueguen N, Barth M, et al. Metabolically induced heteroplasmy shifting and L-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822:1019–29.

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

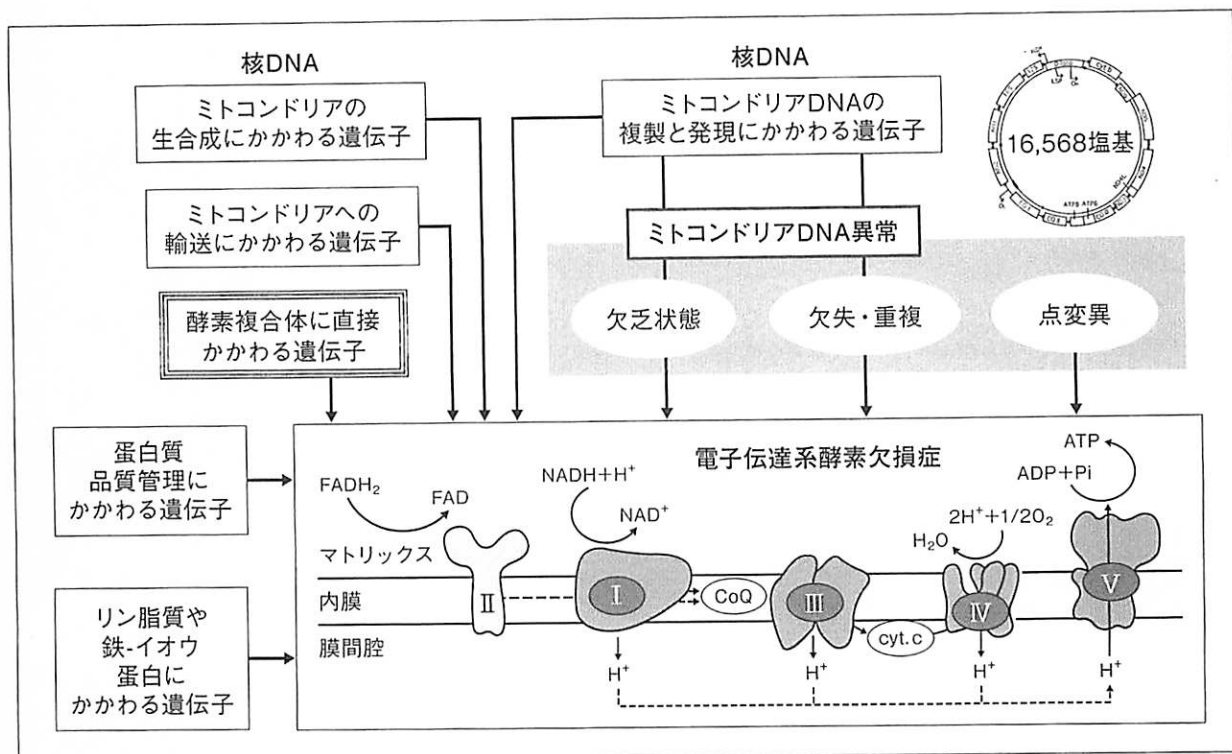


図 1 ミトコンドリア病の病因

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。

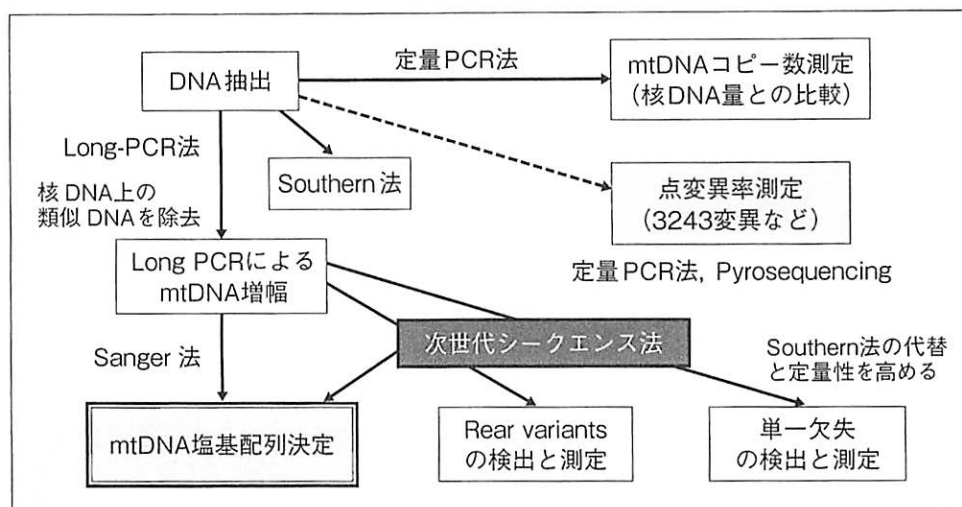


図 2 ミトコンドリアDNA解析の流れ

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

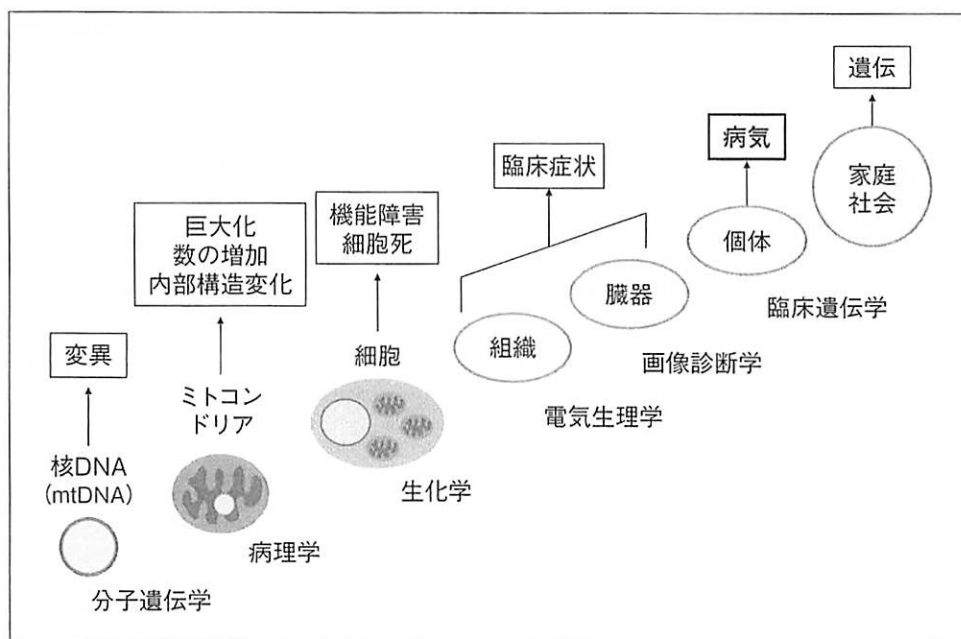


図 1 ミトコンドリア変化のレベルとアプローチ方法

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

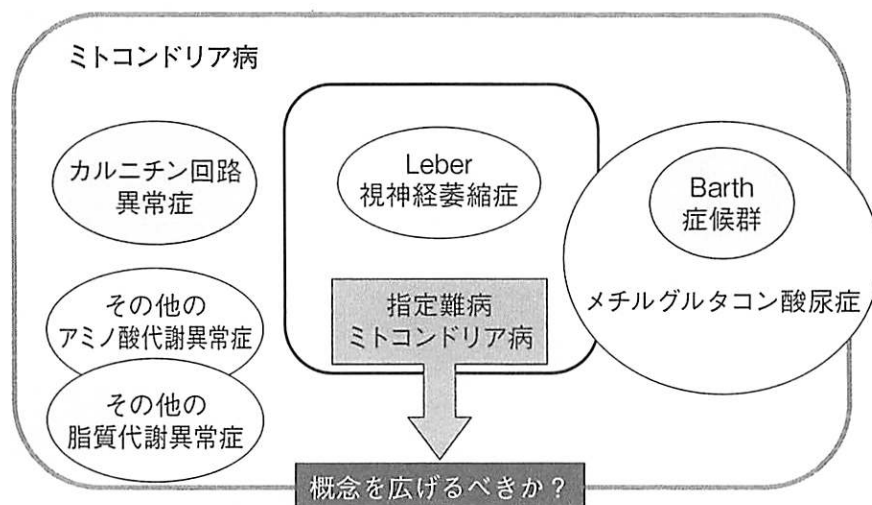


図 2 指定難病ミトコンドリア病の概念

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

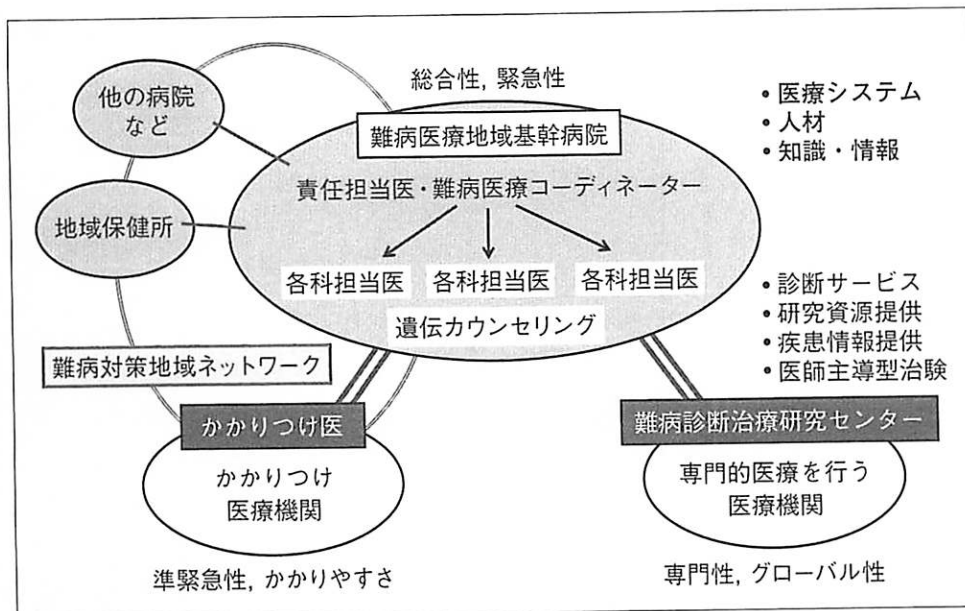


図 3 ミトコンドリア医療の全体像と将来

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ふこともあり、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

* * *

呼吸鎖複合体 I アセンブリー機構と ミトコンドリア病

Understanding mitochondrial complex I assembly in human mitochondrial disorders

Key Word

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I, ミトコンドリア病, アセンブリーファクター



三牧正和

Masakazu MIMAKI

帝京大学医学部小児科

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I は、電子伝達系の最初の役割を担う、呼吸鎖のなかで最大の複合体である。哺乳類においては、ミトコンドリア DNA にコードされた 7 種のサブユニットと、37 種にも及ぶ核にコードされたサブユニットから構成され、その分子量は 980 kDa にも及ぶ。機能を発揮する成熟した複合体を形成するには 44 種類ものサブユニットを組み立てるための複雑なプロセス(アセンブリー機構)が必要となる。複合体 I 欠損症はミトコンドリア病の原因としてもっとも多く、遺伝子診断に至っていない例も多いが、近年、アセンブリー機構の破綻を原因とする患者報告があいついでいる。また、これらの患者細胞の解析やプロテオミクスの応用などによりアセンブリー機構に必須の蛋白(アセンブリーファクター)が数多く見出されている。複合体 I のアセンブリープロセスは複雑で解析が困難であるが、その解明がミトコンドリア呼吸鎖異常症の病因診断、そして分子病態に基づいた治療法開発をもたらすことを期待する。

ミトコンドリアにおいてエネルギー(ATP)を合成する機能の中核を担うのが蛋白の集合体である呼吸鎖複合体であり、その異常は、エネルギー産生低下、ひいては細胞機能障害に直結し、ヒトにおいてはさまざまな臓器障害を伴うミトコンドリア病の原因となる。

近年、呼吸鎖異常の原因として、その構成蛋白(サブユニット)の欠損のみならず、呼吸鎖の集合にかかわる因子の異常がつつぎつつ見出されている。

本稿では、ミトコンドリア病患者でもっとも多く異常が見出される呼吸鎖複合体 I に焦点をあて、この巨大複合体の形成過程についてバイオジェネシスにかかわる因子に触れつつ解説する。

❖呼吸鎖複合体 I の構造と機能

ミトコンドリア呼吸鎖はミトコンドリア内膜に存在する複合体 I (NADH-CoQ reductase)、複合体 II (succinate-CoQ reductase)、複合体 III

(reduced CoQ-cytochrome *c* reductase)、複合体 IV (cytochrome *c* oxidase)の電子伝達系を構成する 4 つの複合体と複合体 V (ATP synthase)の 5 つからなる。クエン酸回路や脂肪酸の β 酸化によって還元された NADH や FADH₂ などの補酵素の還元電位エネルギーを用いて、ミトコンドリア内膜にプロトン濃度勾配を形成し、この電気勾配を用いて複合体 V が ATP を合成する。

複合体 I はこの呼吸鎖における電子伝達の最初の複合体であり、その分子量は約 980 kDa に及び呼吸鎖複合体のなかで最大である。クエン酸回路の電子キャリアである NADH から電子を受け取ってコエンザイム Q (ユビキノロン) に渡し、ユビキノロンが還元されユビキノールは膜の内部を自由に拡散し、複合体 III に電子伝達を行う。電子を伝達する間に、複合体 I はプロトンポンプ機構によってプロトンをミトコンドリアの内膜内(マトリックス)から外膜と内膜の間(膜間腔)に移動させ、プロトン濃度勾配をつくる。

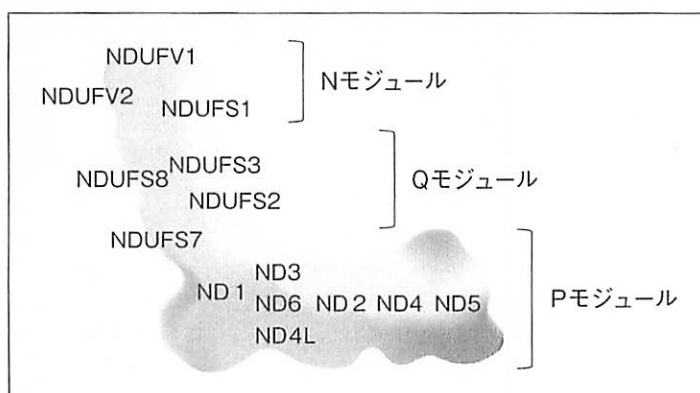


図 1 複合体 I の模式図

3つの機能的モジュール(NADHを還元するNモジュール, 電子をユビキノンに伝達するQモジュール, プロトンポンプ機能を果たすPモジュール)で構成されており, 内膜に埋め込まれた membrane armとマトリックス側に突出する matrix armからなるL字型構造をとる. 14個のコアサブユニットの位置を示す.

近年, 哺乳類においても複合体 I の構造が徐々に明らかとなっており, 内膜に存在する membrane arm とマトリックス側に突出する matrix arm からなる L 字型構造をとることがわかっている¹⁾. matrix arm は NADH と結合して酸化する N モジュールと電子伝達を仲介する Q モジュールからなり, membrane arm はプロトン膜間腔に汲み出すプロトンポンプの働きをもつ P モジュールで構成される. それぞれのモジュールには種を超えて保存される 14 個の蛋白(コアサブユニット)が存在し, 複合体 I の機能の中核を担っている(図 1). コアサブユニットのうち, ミトコンドリア DNA にコードされている ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 の 7 つは membrane arm を, 核 DNA にコードされている NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8 の 7 つは matrix arm を構成する. 哺乳類の複合体 I はこれら 14 個のコアサブユニットに 30 種の supernumerary subunit とよばれるアクセサリーサブユニットが加わり, 合計 44 の蛋白サブユニットから構成されている. 複合体 I の機能の中核を担うコアサブユニットに対し, これらの“付加的な”アクセサリーサブユニットは, 複合体 I の安定化させたり活性酸素によるダメージから複合体 I を防御したりしているといわれているが, その役割は十分には解明されていない.

❖呼吸鎖複合体 I のアセンブリー

哺乳類の複合体 I は多数の蛋白からなり, 分子量が約 1MDa にも及ぶ巨大な蛋白複合体であるがゆえに, その構造やサブユニットの集合, 組立て (assembly: アセンブリー) 機構の解析は困難である. さらに, 核とミトコンドリア DNA の二重の遺伝子支配を受けているため, 核にコードされた細胞質で生成された蛋白がミトコンドリア内に輸送され, ミトコンドリア DNA にコードされるサブユニットと共同して複合体 I を形成する過程は非常に複雑で, いまだアセンブリー機構の全容を解明するには至っていない.

しかし, 真菌モデルを用いた研究や, アセンブリー異常を有するミトコンドリア病患者の解析により, 複合体 I のアセンブリー機構は徐々に明らかになってきた. *N. crassa* の解析で, matrix arm を構成するサブユニットの変異によって matrix arm の形成が完全に欠損した際に, membrane arm が蓄積することが明らかにされ, 2 つの arm が別々に形成されていることが示された²⁾. 同様にヒトにおいても, membrane arm を構成する mtDNA にコードされたサブユニットをすべて失っても, matrix arm のアセンブリーが保たれることが示されている³⁾. このころより, 大分子蛋白複合体でもその構造を保ったままの解析が可能な Blue-Native 電気泳動 (BN-PAGE) が, 複合体 I の解析に盛んに応用され, membrane arm と

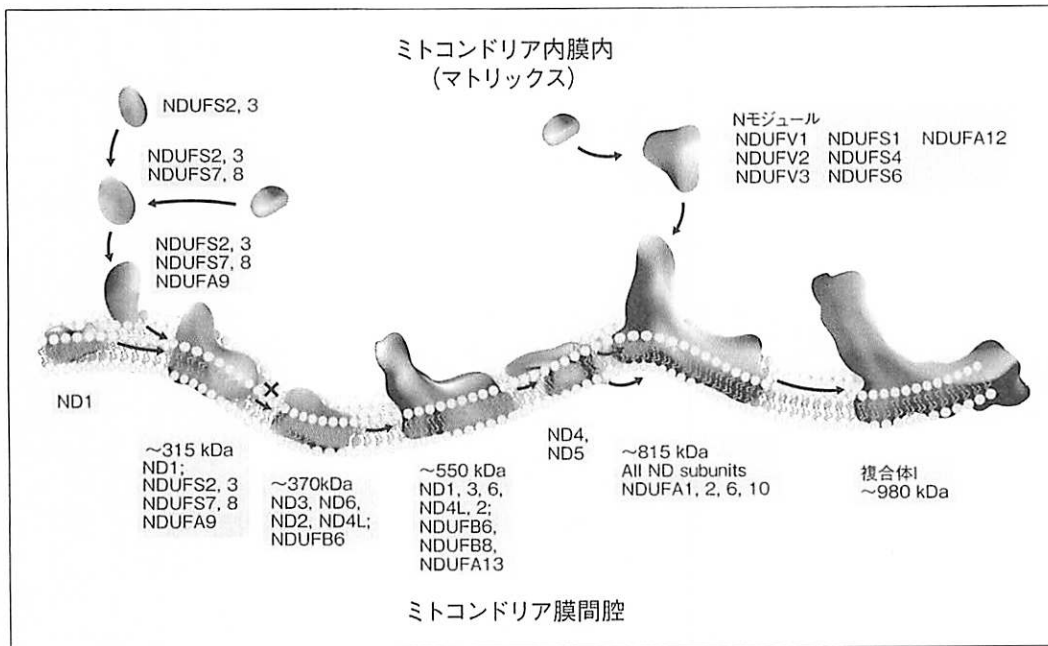


図2 ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iのアセンブリー過程のモデル(文献⁷⁾より引用)
 左から右へアセンブリーが進む過程で複合体が成熟し、約980 kDaの巨大な複合体Iを形成していく。図中の蛋白名は複合体Iのサブユニットの一部を示しており、ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6はミトコンドリアDNAがコードする蛋白である。

アセンブリーの早期段階では、親水性のコアサブユニット(NDUFS2とNDUFS3)がサブコンプレックスを形成し、続いてコアサブユニットのNDUFS7, NDUFS8, supernumerary subunitのNDUFA9などと集合する。さらに、ミトコンドリアDNAにコードされたND1を含むmembrane armの一部と合わせり約315 kDa程度のサブコンプレックスを形成する。一方、内膜には、ND3, ND6, ND2, ND4Lなどからなる複合体も形成されており、両者が一緒になり約550 kDaの中間複合体が形成され、これにND4やND5などが加わることでさらに成熟した約815 kDaの複合体がつけられる。一方で親水性のNモジュールがNDUFV1, NDUFV2, NDUFS1などからつくられ、最終段階に結合して成熟した複合体Iが完成すると考えられている。

matrix armが別々に形成された後に、両者が集合して成熟した複合体Iをつくるというアセンブリー過程がしだいに明らかとなった^{4,5)}。

近年は、哺乳類を含む複合体Iの構造の解明や、質量分析をはじめとした蛋白解析法の進歩によりアセンブリー過程がつつぎとアップデートされている。最近提唱されているアセンブリーモデルの早期段階では、親水性のコアサブユニット(NDUFS2とNDUFS3)が小さな複合体(サブコンプレックス)を形成し、続いてNDUFS7, NDUFS8などと集合してQモジュールがつけられると考えられている。そしてミトコンドリアDNAにコードされたND1を含む疎水性蛋白からなるmembrane armの一部と合わせり約315 kDa程度のサブコンプレックスを形成する。一方、ミトコンドリアDNAにコードされたND2, ND3, ND6などがmembrane armのもうひとつのサブコンプレックスを形成し、両者が集合して約550

kDaのさらに大きなサブコンプレックスが形成される。membrane armは最後にND4とND5などが加わることでさらに成熟し、約815 kDaの複合体がつけられる。一方で親水性のNモジュールがNDUFV1, NDUFV2, NDUFS1などからつくられ、最終段階で両者が集合して約980 kDaの機能を有する成熟した複合体Iが完成すると考えられている(図2)。さらに、最近の研究では約815 kDaの複合体の段階で複合体IIIと複合体IVが集合した後に複合体Iが完成し、複合体I, IIIとIVによって構成されるスーパーコンプレックスが形成され、生理的な機能を発揮することがわかってきた⁶⁾。

❖呼吸鎖複合体Iのアセンブリーファクター

この複雑なアセンブリー過程には複合体Iを構成するサブユニット以外に重要な因子が関与していることが明らかとなってきている。これらは一

表 1 複合体 I のアセンブリーファクター

アセンブリーファクター	アセンブリープロセスにおいて機能が想定されるモジュール	報告されたおもなミトコンドリア病型	文献番号
ACAD9	Pモジュール中間部(ND2を含むモジュール)	脳筋症, 心筋症	15)
ATP5SL	Pモジュール遠位部(ND5を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	18)
DMAC1	Pモジュール遠位部(ND5を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	18)
ECSIT	Pモジュール中間部(ND2を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	15)
FOXRED1	Pモジュール遠位部(ND5を含むモジュール)	Leigh 脳症	17)
NDUFAF1 (CIA30)	Pモジュール中間部(ND2を含むモジュール)	脳筋症, 心筋症	15)
NDUFAF2 (NDUFA12L, B17.2L)	NモジュールとPモジュールの結合	脳筋症, Leigh 脳症	19)
NDUFAF3 (C3orf60)	Qモジュール, QモジュールとPモジュールの結合	新生児/乳児ミトコンドリア病	8)
NDUFAF4 (C6orf66)	Qモジュール, QモジュールとPモジュールの結合	新生児/乳児ミトコンドリア病	9)
NDUFAF5 (C20orf7)	Pモジュール近位部(ND1を含むモジュール)	新生児/乳児ミトコンドリア病, Leigh 脳症	11)
NDUFAF6 (C8orf 38)	Pモジュール近位部(ND1を含むモジュール)	Leigh 脳症	12)
NDUFAF7 (homolog of MIDA)	Pモジュール近位部(ND1を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	14)
NUBPL (Ind1)	Nモジュール, Qモジュール	脳筋症(白質変性症)	10)
TIMMDC1 (C3orf 1)	Pモジュール近位部(ND1を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	13)
TMEM126B	Pモジュール中間部(ND2モジュール)	ミトコンドリア筋症	16)

時的にサブコンプレックスに結合することはあっても、最終産物である複合体 I には存在せず、サブユニットとは区別してアセンブリーファクターとよばれている。ヒトにおいては現在までに10個以上のアセンブリーファクターの存在が明らかとなっており、その多くでミトコンドリア病の遺伝子異常が見出されている⁷⁾(表 1)。すべてが核遺伝子にコードされており、細胞質でつくられてからミトコンドリア内に輸送され、サブコンプレックスの安定化や、サブコンプレックスどうしの集合に関与するシャペロン機能などを有すると考えられている。前述のように複合体 I は、モジュールごとに形成され、それらが集合して成熟するが、このアセンブリー過程に沿って現在までに同定されている 15 個のアセンブリーファクターを紹介する。

1. Qモジュールのアセンブリー

matrix arm の近位部を形成する Qモジュールは、コアサブユニットの NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8 に加え、アクセサリサブユニットの NDUFA5, NDUFA6, NDUFA9, NDUFAB1 と NDUFA7 からなるが、最初に NDUFS2, NDUFS3 と NDUFA5 が集合し、つぎの段階で NDUFS7 と NDUFS8 が加わると考えられている。

その際アセンブリーファクターである NDUFAF3(NADH dehydrogenase 1alpha subcomplex assembly factor 3)と NDUFAF4 が作用して、Qモジュールの安定化や Qモジュールと Pモジュールの結合にかかわっていると考えられている^{8,9)}。また、やはりアセンブリーファクターのひとつとされる NUBPL(iron-sulfur protein required for NADH dehydrogenase : Ind1)は複合体 I の鉄硫黄クラスターの取込みに関与していると考えられており、鉄硫黄クラスターをもつ Qモジュール内のコアサブユニット NDUFS7 と NDUFS8 の集合や機能に関与している可能性がある¹⁰⁾。

2. Pモジュールのアセンブリー

一方の membrane arm の主要部分については、ミトコンドリア DNA にコードされているコアサブユニットである ND1 を含むモジュールと、ND2 を含むモジュールが別々に形成された後に、両者が集合すると考えられている。

① Pモジュール近位部

Pモジュールの近位部には ND1 が位置しているが(図 1)、他にアクセサリサブユニットの NDUFA8, NDUFA3, NDUFA13 や NDUFA1 が集合して“ND1モジュール”がつくられ、前述の

ように形成された matrix arm の Q モジュールはこのモジュールと結合して約 315 kDa のサブアセンブリーを形成する段階で内膜とつながると考えられている(図 2)。次世代シーケンサーなどによる遺伝子解析によって発見された変異をもつ患者細胞の検討により、NDUFAF5 と NDUFAF6 が ND1 の生成や安定化にかかわる因子として報告されている^{11,12)}。さらに、最近のプロテオーム解析技術を応用し、コアサブユニットやアセンブリーファクターとの相互作用を解析することにより内膜に存在する蛋白の TIMMDC1 が ND1 モジュールの集合や安定化に必須の因子として見出されている¹³⁾。また、Q モジュールを構成する NDUFS2 と結合すると思われる NDUFAF7 は、ND1 と同じサブコンプレックスに存在し、ND1 モジュールの安定化にも関与していると考えられている¹⁴⁾。

② P モジュール中間部

P モジュールの中間部には ND2 が位置しているが、このコアサブユニットを含む部分“ND2 モジュール”はアセンブリーの初期段階では ND1 モジュールとは別々に形成されていることが以前から知られていた。ND2 モジュールは、ミトコンドリア DNA にコードされる ND3, ND6 や ND4L と、おそらくは NDUFC1 や NDUFC2 といったアクセサリサブユニットと約 370 kDa の集合体を形成するが(図 2)、この際複数のアセンブリーファクター、すなわち NDUFAF1, ECSIT (Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway), ACAD9 (Acyl-CoA dehydrogenase family member 9) と TMEM126B が結合して作用することがわかってきた^{15,16)}。これら 4 つの蛋白はたがいに結合して mitochondrial complex I assembly complex (MCIA コンプレックス) を形成し、ND2 モジュールの安定化に寄与し、さらに TIMMDC1 などと協働して ND1 モジュールとの集合に関与していると考えられる。

③ P モジュール遠位部

P モジュールの遠位部は、ミトコンドリア DNA にコードされた ND4 と ND5 に、NDUFB1~11 と NDUFAB1 から構成され、複合体 I の membrane arm の集合の最終段階で付加されると考えられて

いる。このプロセスで働いていると思われる因子としては、FOXRED1 が報告されていたが¹⁷⁾、最近になってあらたなアセンブリーファクターとして DMAC1 と ATP5SL が報告された¹⁸⁾。CRISPR/Cas-9 などのゲノム編集技術を用いてさまざまなサブユニットをノックダウンし、アセンブリープロセスに異常をきたした細胞を定量プロテオミクスにより比較することにより、これらの 2 つの因子が ND5 と FOXRED1 と相互作用をもち、P モジュール遠位部が集合して membrane arm を形成する過程に寄与していることが示された。

3. N モジュールのアセンブリー

matrix arm のもっとも遠位部を構成する N モジュールは、NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFA2, NDUFS4 と、おそらく NDUFV3 からなり、NDUFS6 と NDUFA12 は Q モジュールに面して位置していると考えられている。このモジュールは鉄硫黄クラスターをもつので、Q モジュール同様 NUBPL がアセンブリーファクターとして機能していると思われる。形成された N モジュールは複合体 I の最終段階で NDUFAF2 の作用のもと約 815 kDa の中間複合体に付加されて成熟した複合体 I が完成し機能を発揮する¹⁹⁾。

◇おわりに

複合体 I のアセンブリー機構はサブユニットが徐々に大きくなる単純な過程ではなく、モジュールごとにサブユニットが集合してサブアセンブリーを形成し、それらが集合して成熟した巨大な複合体を組み立てる複雑なプロセスである。種を超えて保存されているコアサブユニットに加え、これほどまでに多くのアクセサリサブユニットが、さまざまなアセンブリーファクターの助けを借りて組み込まれる理由はよくわかっていないが、生物の進化を考えるうえでたいへん興味深い。

一方、ミトコンドリア病患者のおよそ 4 割がいまだ遺伝子診断に至っていないといわれているが、なかでもミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 欠損はミトコンドリア病患者の病因としてもっとも多く、遺伝学的診断に至っていない症例も多い。そのため、この巨大な複合体のアセンブリー機構の理解は基礎研究のみならず臨床上も非常に重要で

ある。構造解析やプロテオミクスの進歩と、次世代シーケンサーをはじめとした最新の遺伝子解析技術を用いた患者解析は、複合体 I のアセンブリー機構の理解に大きな進歩をもたらした。そして多くのアセンブリーファクターが見出されてミトコンドリア病の原因遺伝子として同定されてきたが(表 1), それぞれの遺伝子異常がどのような臨床病型をもたらすかははっきりせず, 表現型と遺伝子異常の関連の解明にはさらなる症例の蓄積が必要である。また, あいついで発見されているアセンブリーファクターの作用機序もほとんどわかっておらず, アセンブリー機構の全容解明にはまだ時間を要する。しかし近年, 蛋白どうしの相互作用の解析技術は長足の進歩を遂げており, さらなる未知のアセンブリーファクターの発見や複合体 I の構造の解明がなされると思われる。アセンブリープロセスの解明が患者の病因診断と病態解析につながり, さらに分子病態に基づいた治療法開発をもたらすことを期待したい。

* * *

- 1) Zhu, J. et al. : *Nature*, **536** : 534-538, 2016.
- 2) Tuschen, G. et al. : *J. Mol. Biol.*, **213** : 845-857, 1990.
- 3) Bourges, I. et al. : *Biochem. J.*, **383** : 491-499, 2004.
- 4) Vogel, R. O. et al. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1767** : 1215-1227, 2007.
- 5) Mckenzie, M and Ryan, M. T. : *IUBMB Life*, **62** : 497-502, 2010.
- 6) Moreno-Lastres, D. et al. : *Cell Metab.*, **15** : 324-335, 2012.
- 7) Mimaki, M. et al. : *Biocim Biophys. Acta.*, **1817** : 851-862, 2012.
- 8) Saada, A. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, **84** : 718-727, 2009.
- 9) Saada, A. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, **82** : 32-38, 2008.
- 10) Scheftel, A. D. Et al. : *Mol. Cell. Biol.*, **29** : 6059-6073, 2009.
- 11) Sugiana, C. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, **83** : 468-478, 2008.
- 12) Mckenzie, M. et al. : *J. Mol. Biol.*, **414** : 413-426, 2011.
- 13) Andrews, B. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** : 18934-18939, 2013.
- 14) Zurita Rendon, L. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **23** : 5159-5170, 2014.
- 15) Nouws, J. et al. : *Cell Metab.*, **12** : 283-294, 2010.
- 16) Heide, H. et al. : *Cell Metab.*, **16** : 538-549, 2012.
- 17) Formosa, L. E. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **24** : 2952-2965, 2015.
- 18) Stroud, D. A. et al. : *Nature*, **538** : 123-126, 2016.
- 19) Ogilvie, I. et al. : *J. Clin. Invest.*, **115** : 2784-2792, 2005.

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

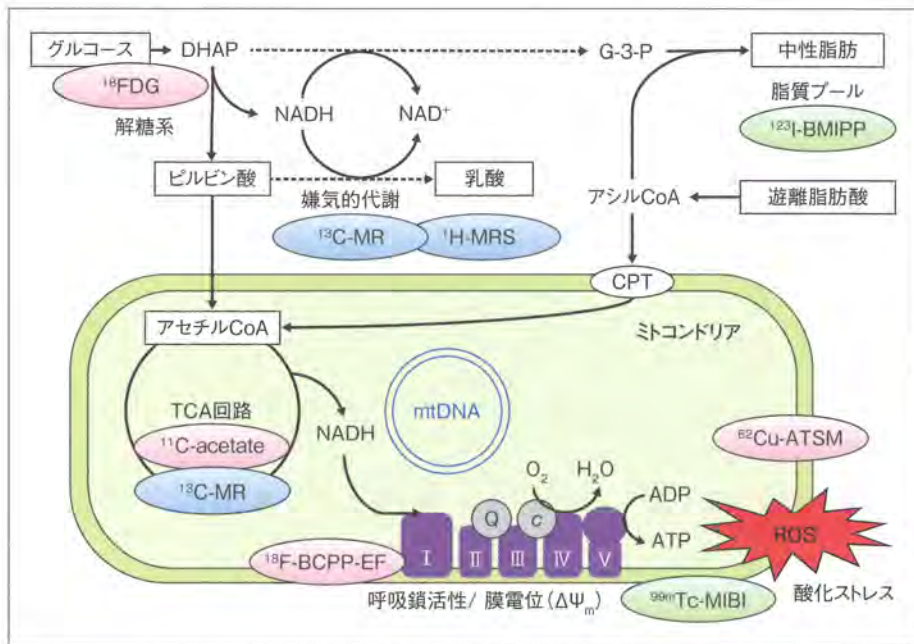


図 1 ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝とその分子イメージング⁶⁾

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 ($10^{-9} \sim 10^{-12} \text{M}$) 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。

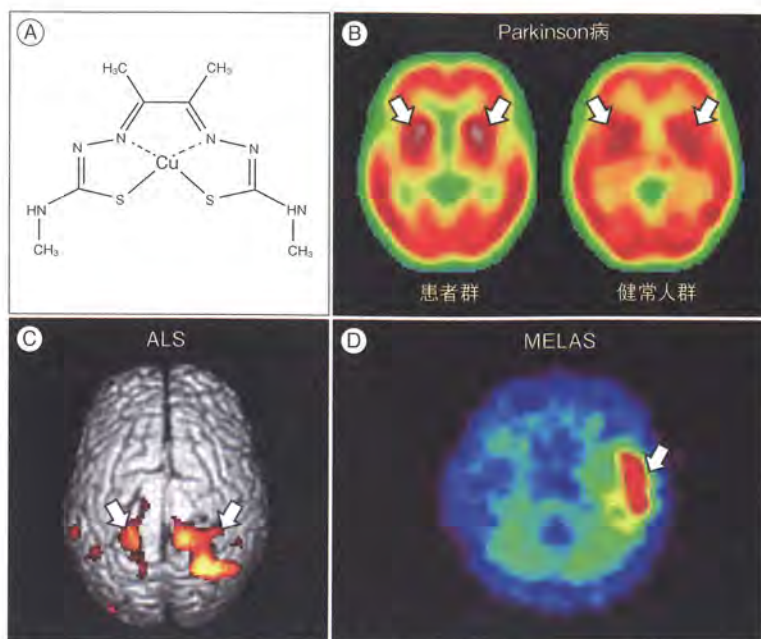


図 2 ^{62}Cu -ATSM PETによる酸化ストレスイメージング

- 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: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 か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

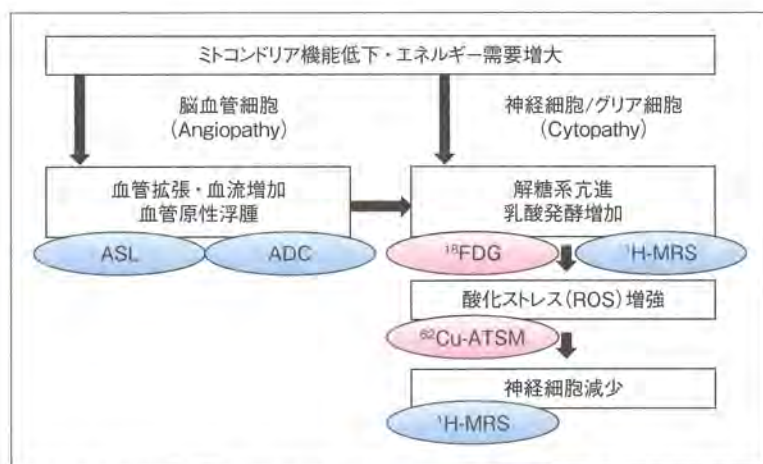


図3 分子イメージングによる知見をもとにしたMELAS脳卒中様発作の病態機序
 楕円形は代謝の各段階に対する分子イメージング手法を示す(桃色:PET, 青色:MRI)。
 詳細は本文参照。

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.

Mitochondrial respiratory dysfunction disturbs neuronal and cardiac lineage commitment of human iPSCs

Mutsumi Yokota^{1,2}, Hideyuki Hatakeyama^{*1,2}, Yasuha Ono¹, Miyuki Kanazawa³ and Yu-ichi Goto^{*1,2,3}

Mitochondrial diseases are genetically heterogeneous and present a broad clinical spectrum among patients; in most cases, genetic determinants of mitochondrial diseases are heteroplasmic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations. However, it is uncertain whether and how heteroplasmic mtDNA mutations affect particular cellular fate-determination processes, which are closely associated with the cell-type-specific pathophysiology of mitochondrial diseases. In this study, we established two isogenic induced pluripotent stem cell (iPSC) lines each carrying different proportions of a heteroplasmic m.3243A > G mutation from the same patient; one exhibited apparently normal and the other showed most likely impaired mitochondrial respiratory function. Low proportions of m.3243A > G exhibited no apparent molecular pathogenic influence on directed differentiation into neurons and cardiomyocytes, whereas high proportions of m.3243A > G showed both induced neuronal cell death and inhibited cardiac lineage commitment. Such neuronal and cardiac maturation defects were also confirmed using another patient-derived iPSC line carrying quite high proportion of m.3243A > G. In conclusion, mitochondrial respiratory dysfunction strongly inhibits maturation and survival of iPSC-derived neurons and cardiomyocytes; our presenting data also suggest that appropriate mitochondrial maturation actually contributes to cellular fate-determination processes during development.

Cell Death and Disease (2017) 8, e2551; doi:10.1038/cddis.2016.484; published online 12 January 2017

Mitochondria possess multiple copies of their own genome (mitochondrial DNA; mtDNA) and play some crucial roles in cellular energy metabolism. From the viewpoint of developmental biology, several recent studies have clearly indicated that mitochondria are functionally and morphologically reorganized for adaptation to an embryonic stem cell (ESC)-like intracellular environment during induced pluripotent stem cell (iPSC) generation.^{1–6} Moreover, mtDNA haplogroups (i.e., genetic population groups that share a common ancestor), which are known to be associated with various phenotypes (e.g., disease susceptibility, environmental adaptation or aging), also affect their intrinsic gene expression signatures involved in pluripotency, differentiation, DNA methylation and mitochondrial energy metabolism.⁷ Thus, appropriate mitochondrial rejuvenation or maturation may be one important step for *bona fide* cellular reprogramming or differentiation, as well as for epigenetic modification or resetting in nuclear DNA.

Most parts of pathogenic mutations in mtDNA-specific tRNA genes responsible for various types of mitochondrial diseases have been reported as heteroplasmy (i.e., wild-type mtDNA and mutant mtDNA coexist within a single cell), and induced mitochondrial dysfunction emerges only when mutation ratios of mtDNA exceed their intrinsic pathogenic thresholds at a cellular level.⁸ Mitochondrial diseases caused by heteroplasmic mtDNA mutations present a wide variety of affected

tissues and organs (e.g., central nervous system or cardiovascular system) among patients,^{9,10} probably due to variations in mutant mtDNA proportions at each tissue and organ level. Therefore, disease-relevant iPSCs carrying heteroplasmic mtDNA mutations will greatly help us to open new avenues for studying the patient-specific definitive genotype–phenotype relationship of affected tissues and organs in mitochondrial diseases.¹¹ In fact, several groups and we have reported the generation and the application of patient-derived iPSCs carrying various heteroplasmic mtDNA mutations toward *in vitro* human mitochondrial disease modeling;^{12–18} however, it remains uncertain whether and how such heteroplasmic mtDNA mutations affect particular cellular fate-determination processes during development. Recently, we also demonstrated that mitochondrial respiratory dysfunction caused by a heteroplasmic m.3243A > G mutation in *MT-TL1* gene,¹⁹ which is the most representative mutant mtDNA, strongly inhibits cellular reprogramming but does not affect maintenance of the pluripotent state.²⁰ Our findings may indicate that the degree of the molecular pathogenic influence of heteroplasmic mtDNA mutations actually changes during cellular lineage-commitment processes along with the degree of functional maturation in mitochondria.

In this study, we established two isogenic iPSC lines carrying different proportions of m.3243A > G from the same patient; one exhibited apparently normal and the other showed

¹Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo 187-8502, Japan; ²AMED-CREST, Japan Agency for Medical Research and Development, Tokyo 100-0004, Japan and ³Medical Genome Center, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo 187-8551, Japan

*Corresponding author: H Hatakeyama or Y-i Goto, Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira 187-8502, Tokyo, Japan. Tel: +81 42 346 1713; Fax: +81 42 346 1743; E-mail: hideyuki@ncnp.go.jp or goto@ncnp.go.jp

Received 02.9.16; revised 14.11.16; accepted 16.12.16; Edited by M Agostini

most likely impaired mitochondrial respiratory function. Using these isogenic iPSC lines, we demonstrated that induced mitochondrial respiratory dysfunction triggered by high proportions of m.3243 A>G strongly inhibits maturation and survival of iPSC-derived neurons and cardiomyocytes. Such *in vitro* neuronal and cardiac maturation defects were also confirmed by using another patient-derived iPSC line carrying quite high proportion of m.3243 A>G. Our presenting data therefore demonstrate that isogenic iPSC lines with different proportions of m.3243 A>G would make enormous contributions as *in vitro* human cellular disease models to greatly facilitate iPSC-based drug discovery and regenerative therapeutics in mitochondrial diseases.

Results

Generation of patient-derived isogenic iPSC lines carrying different proportions of m.3243A>G. First, we generated two isogenic iPSC lines from the same patient, each of which possessed different proportions of m.3243A>G (approximately 40 and 90% proportions of mutant mtDNA; denoted as P1-3243[40] and P1-3243[90], respectively). We also established two additional iPSC lines, each of which were derived from healthy control subject (denoted as Control) and from another patient carrying over 90% proportion of m.3243A>G (denoted as P2-3243[>90]), respectively. We have previously reported that the molecular pathogenic threshold level of m.3243A>G with regard to mitochondrial respiratory function is ~90% in patient-derived clonal fibroblasts.²⁰ We confirmed that no marked difference was observed between all iPSC lines with regard to ESC-like pluripotent characteristics such as pluripotency markers expression and embryoid body (EB)-mediated *in vitro* spontaneous differentiation into three germ layers (Figures 1a and b), in addition to pluripotency genes expression and silenced transgenes expression (Supplementary Figures S1A and B). Genetic identity of these isogenic iPSC lines was also verified by analysis of short tandem repeat variations (Figure 1c). We measured the overall mitochondrial respiration profile of all iPSC lines by a flux analyzer. Although no statistical significance was observed between two isogenic iPSC lines (P1-3243[40] and P1-3243[90]), mitochondrial energy metabolic potentials (e.g., basal respiration and ATP production) of P1-3243[90] iPSC line were both lower than those of P1-3243[40] iPSC line (Figure 1d). We further analyzed enzymatic activities of mitochondrial respiratory chain complexes in all iPSC lines. In fact, mitochondrial respiratory chain complex I activity was significantly suppressed by over 90% proportion of m.3243A>G (P2-3243[>90] vs Control), whereas mitochondrial respiratory chain complex IV activity was apparently unaffected in all iPSC lines (Figure 1e). Although no statistical significance was observed between two isogenic iPSC lines (P1-3243[40] and P1-3243[90]), mitochondrial respiratory chain complex I activity of P1-3243[90] iPSC line was actually lower than that of P1-3243[40] iPSC line. We also randomly selected several iPSC colonies from each patient-derived iPSC line to determine m.3243A>G proportions at each single-iPSC-colony level and found no significant segregation in m.3243A>G proportions during

self-renewal of iPSCs throughout this study (i.e., at least 5–10 passages in culture of each iPSC line) (Figure 1f). We therefore concluded that two isogenic iPSC lines with different proportions of m.3243 A>G from the same patient (P1-3243[40] and P1-3243[90]) were successfully established; one exhibited apparently normal and the other showed most likely impaired mitochondrial respiratory function.

Inhibited cardiac maturation triggered by exceeding the pathogenic threshold level of m.3243A>G. Next, we asked whether and how heteroplasmy levels of m.3243A>G affect cardiac maturation (Figure 2a). Using Control iPSC line, we confirmed the successful specification into cTNT-positive beating cardiomyocytes. P1-3243[90] iPSC line, which exhibited most likely impaired mitochondrial respiratory function, was also able to differentiate into beating cardiomyocytes expressing the representative cardiac lineage marker of cTNT similarly to those of isogenic P1-3243[40] iPSC line; in contrast, no beating cardiomyocytes were obtained from P2-3243[>90] iPSC line, which exhibited impaired mitochondrial respiratory function (Figures 2b–d and Supplementary Movies S1–S3). Of note, no marked difference was observed during the time course of cardiac induction between these iPSC lines (see also Figure 2b). Interestingly, however, all cardiomyocytes derived from P1-3243[90] iPSC line possessed less than 90% proportions of m.3243 A>G (Figure 2e). To confirm the molecular pathogenic influence of m.3243A>G on cardiac lineage commitment, we measured mitochondrial respiratory function of iPSC-derived cardiomyocytes by a flux analyzer; as expected, cardiomyocytes derived from P1-3243[90] iPSC line, all of which exhibited below the molecular pathogenic threshold level of m.3243A>G, showed apparently normal mitochondrial respiration profile and mitochondrial energy metabolic potentials (e.g., basal respiration and ATP production) similarly to those derived from P1-3243[40] iPSC line (Figure 2f). In addition, we found that one out of five iPSC-derived cardiomyocytes showed a significant decrease in m.3243A>G heteroplasmy level (approximately 60% proportion of mutant mtDNA) when compared with the distributions of m.3243A>G heteroplasmy levels in the parental P1-3243[90] iPSC line (77–92% proportions of mutant mtDNA) (see also Figure 2e). We also added mtDNA copy number analysis for iPSC-derived cardiomyocytes and their parental iPSCs. Cardiomyocytes derived from two isogenic iPSC lines (P1-3243[40] and P1-3243[90]) had more mtDNA copies per cell than those in the parental iPSCs; however, no significant difference in mtDNA copy number was observed between two isogenic iPSC lines (P1-3243[40] and P1-3243[90]), or among their iPSC-derived cardiomyocytes (Supplementary Figure S2). We therefore concluded that mitochondrial respiratory dysfunction caused by exceeding the pathogenic threshold level of m.3243A>G induced cardiac maturation defects.

Induced neuronal cell death triggered by exceeding the pathogenic threshold level of m.3243A>G. We then differentiated these iPSC lines into neurons using our stepwise induction method to clarify whether and how

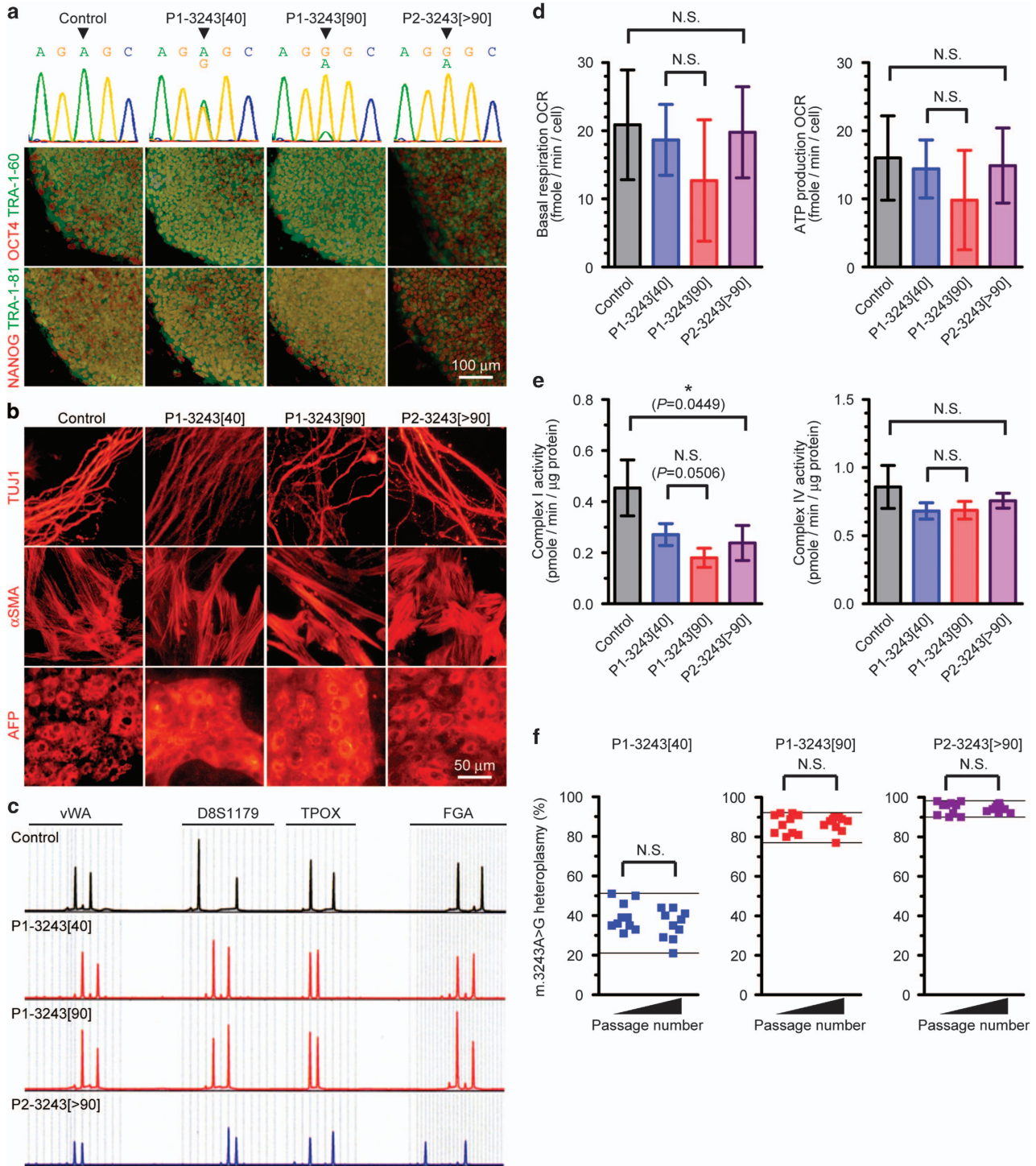


Figure 1 Generation of patient-derived isogenic iPSC lines carrying different proportions of m.3243A>G. **(a)** Representative images of the established iPSC lines; OCT4 (red), NANOG (red), TRA-1-60 (green) and TRA-1-81 (green). Electropherogram of heteroplasmic m.3243A>G mutation in each iPSC line was also shown. Arrowheads indicate m.3243A>G. **(b)** Representative images of the embryoid body (EB)-mediated *in vitro* spontaneous differentiation; TUJ1 (ectoderm, red), α SMA (mesoderm, red) and AFP (endoderm, red). **(c)** Representative images of STR variations (4 out of 16 genetic loci analyzed) demonstrated that isogenic iPSC lines carrying different proportions of m.3243A>G (P1-3243[40] and P1-3243[90]) shared the same nuclear DNA genetic background. **(d)** Mitochondrial respiratory function of patient-derived iPSC lines. Oxygen consumption rate (OCR) of each iPSC line was measured by a flux analyzer. Biological replicates of each iPSC line used were as follows: Control ($n=5$), P1-3243[40] ($n=3$), P1-3243[90] ($n=5$), P2-3243[>90] ($n=4$). Statistical significance was evaluated by unpaired, two-tailed *t*-test. NS, not significant. **(e)** Mitochondrial respiratory chain complexes activity of patient-derived iPSC lines. Three biological replicates of each iPSC line were used for the measurements. Statistical significance was evaluated by unpaired, two-tailed *t*-test. * $P<0.05$, NS, not significant. **(f)** Time-dependent changes in the distributions of m.3243A>G proportions in patient-derived iPSC line at each single-iPSC-colony level. Statistical significance was evaluated by unpaired, two-tailed *t*-test. NS, not significant

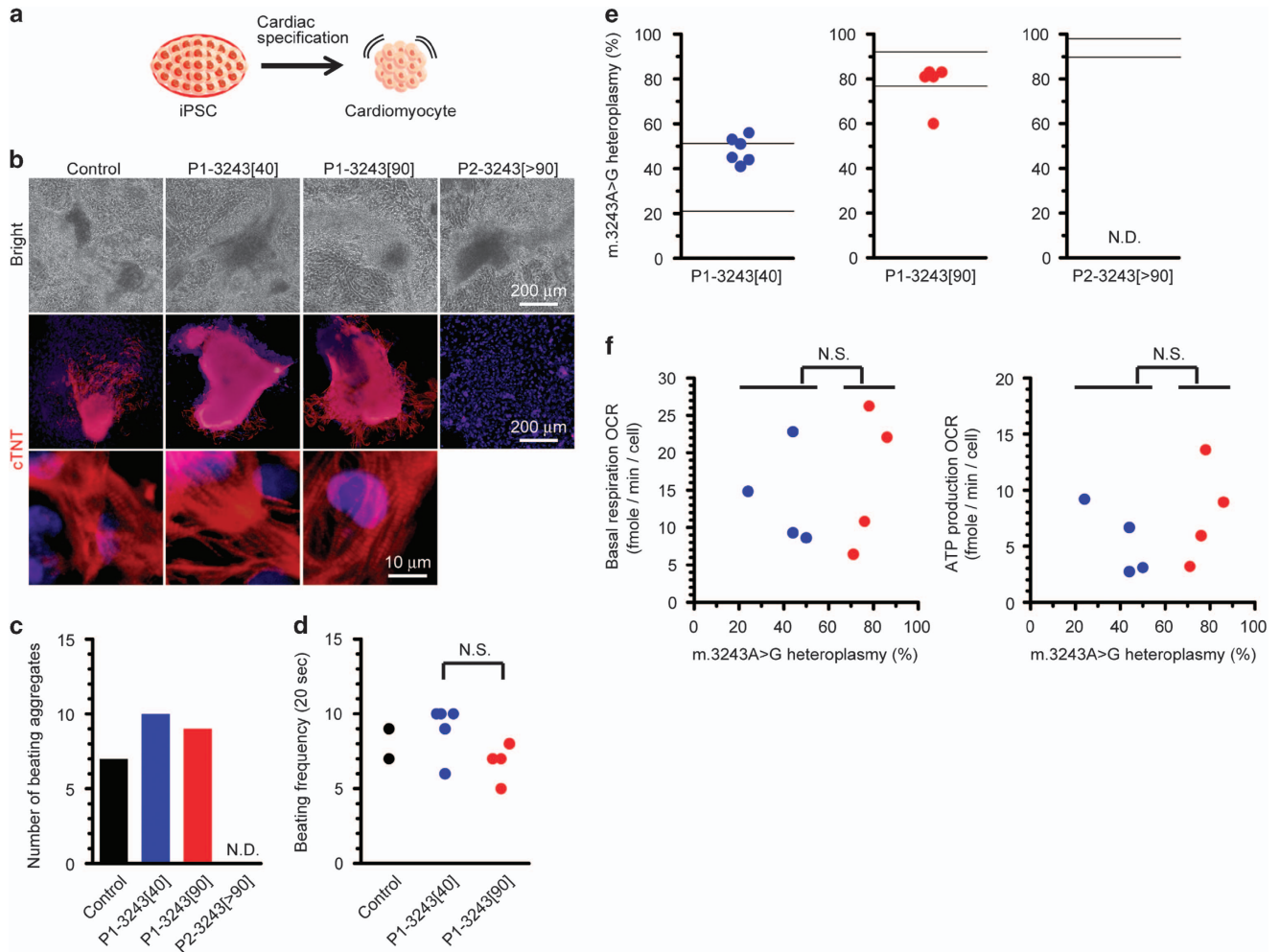


Figure 2 Induced cardiac maturation defects triggered by exceeding the pathogenic threshold level of m.3243A > G. (a) Experimental design used to identify the molecular pathogenic influence of m.3243A > G on cardiac differentiation. (b) Representative images of cardiomyocytes derived from each patient-derived iPSC line; cTNT (red). Cell nuclei were co-stained with Hoechst 33342 (blue). No cTNT-positive cardiomyocytes were observed in P2-3243[> 90] iPSC line. (c) Total number of beating aggregates after cardiac differentiation in each patient-derived iPSC line. Cardiac induction was independently performed three times, and data were gathered for graph preparation. ND, not detected. (d) Beating frequency of cardiomyocytes derived from each patient-derived iPSC line. Statistical significance was evaluated by unpaired, two-tailed *t*-test. NS, not significant. Representative movies of beating cardiomyocytes derived from each patient-derived iPSC line were also shown in Supplementary Movies S1–S3, respectively. (e) The distributions of m.3243A > G proportions in cardiomyocytes derived from patient-derived iPSC lines. Immunostained cells were collected for further mtDNA mutation analysis. ND, not detected. (f) Relationship between the distributions of m.3243A > G proportions and mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes derived from patient-derived isogenic iPSC lines. Oxygen consumption rate (OCR) of beating cardiomyocytes was measured by a flux analyzer. The proportions of m.3243A > G in cardiomyocytes were determined after biochemical measurement. Biological replicates of beating cardiomyocytes used were as follows: P1-3243[40] (*n* = 4), P1-3243[90] (*n* = 4). Statistical significance was evaluated by unpaired, two-tailed *t*-test. NS, not significant

heteroplasmy levels of m.3243A > G also affect neuronal maturation (Figure 3a). Using Control iPSC line, we confirmed that our neuronal induction protocol showed highly efficient neural stem cell (NSC) specification and neuronal differentiation (Figure 3b). Although P1-3243[40] iPSC line showed no apparent influence of m.3243A > G on directed differentiation into TUJ1-positive neurons similarly to that of Control iPSC line, two other iPSC lines carrying high proportions of m.3243A > G (P1-3243[90] and P2-3243[> 90]) showed induced cell death during neuronal lineage commitment; in particular, poorly surviving neurons in P1-3243[90] iPSC line, which exhibited most likely impaired mitochondrial respiratory function, and no living neurons in

P2-3243[> 90] iPSC line, which exhibited impaired mitochondrial respiratory function, were observed, respectively (Figures 3c and d). We also evaluated the completely detached and collapsed neurospheres in P2-3243[> 90] iPSC line as 'dead' in this experiment (see also Figure 3c). Of note, no cell death was observed during NSC specification and expansion in these iPSC lines, suggesting that m.3243A > G has minimal molecular pathogenic influence on NSCs. Focusing on P1-3243[90] iPSC line, m.3243A > G heteroplasmy levels were significantly higher in 'dead' neurospheres (86 ± 12% proportions of mutant mtDNA) than those in 'survival' neurons (73 ± 17% proportions of mutant mtDNA) with statistical significance (Figure 3e). To confirm

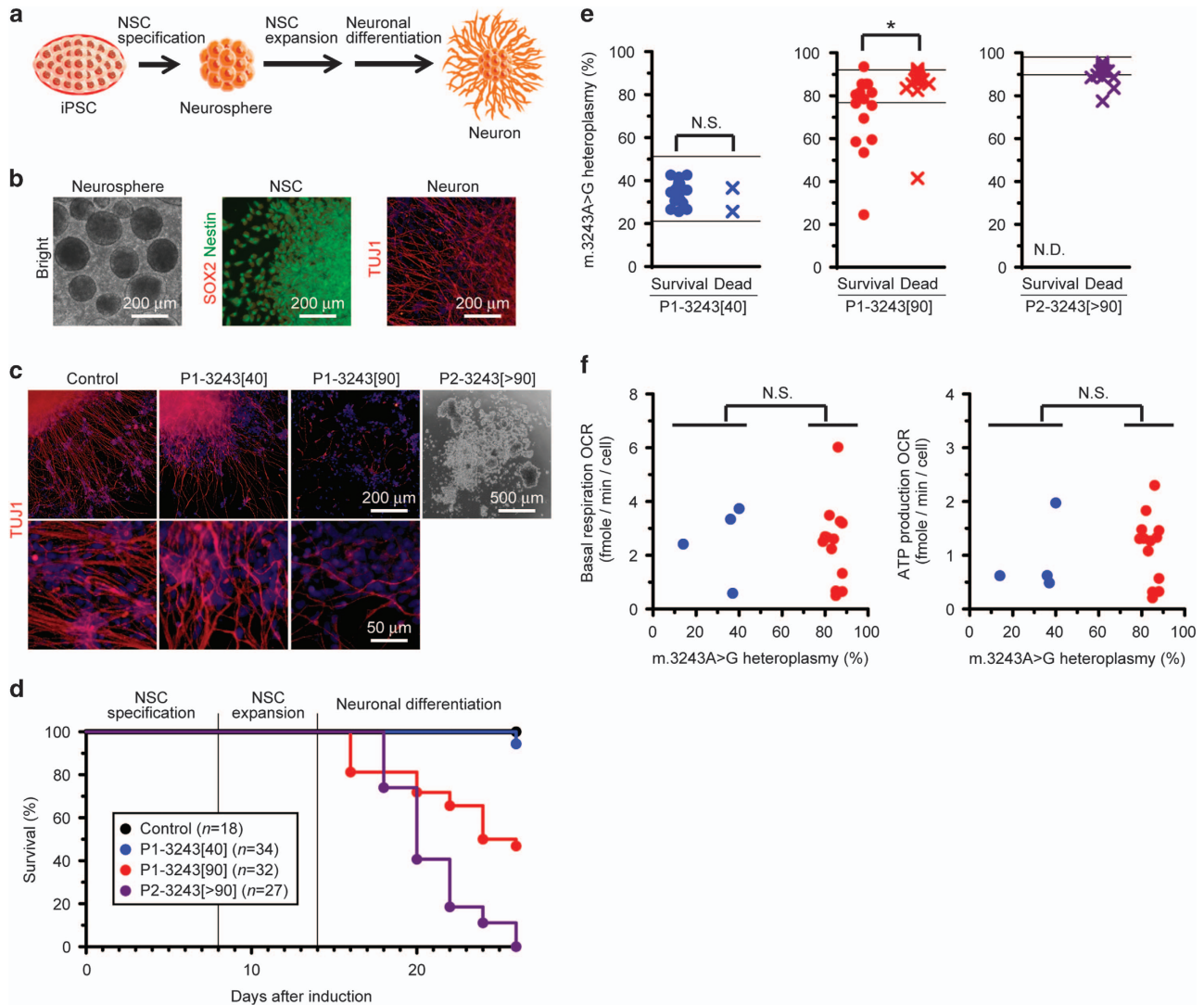


Figure 3 Induced neuronal cell death triggered by exceeding the pathogenic threshold level of m.3243A > G. (a) Experimental design used to identify the molecular pathogenic influence of m.3243A > G on neuronal differentiation. (b) Representative images of successive differentiation into neurons via neural stem cell (NSC) specification and expansion using Control iPSC line; SOX2 (red), Nestin (green), TUJ1 (red). Cell nuclei were co-stained with Hoechst 33342 (blue). (c) Representative images of neurons derived from each patient-derived iPSC line; TUJ1 (red). Cell nuclei were co-stained with Hoechst 33342 (blue). Representative image of induced neuronal cell death during neuronal differentiation in P2-3243[>90] iPSC line was also shown. (d) Induced neuronal cell death, but stable NSC specification and expansion, in two patient-derived iPSC lines carrying high m.3243A > G proportions (P1-3243[90] and P2-3243[>90]). Neuronal differentiation was independently performed three times, and data were gathered for graph preparation. (e) The distributions of m.3243A > G proportions in neurons from patient-derived iPSC lines. Immunostained 'survival' cells and spontaneously detached 'dead' neurospheres were collected for further mtDNA mutation analysis. Notably, 2 out of 34 neurospheres derived from P1-3243[40] iPSC line were detached from culture surfaces just before immunostaining (see also d). Therefore, we evaluated these detached neurospheres as 'dead' in this experiment. Statistical significance was evaluated by unpaired, two-tailed *t*-test. **P* < 0.05, NS, not significant; ND, not detected. (f) Relationship between the distributions of m.3243A > G proportions and mitochondrial respiratory function in neurons derived from patient-derived isogenic iPSC lines. Oxygen consumption rate (OCR) of neurons was measured by a flux analyzer. The proportions of m.3243A > G in neurons were determined after biochemical measurement. Biological replicates of neurons used were as follows: P1-3243[40] (*n* = 4), P1-3243[90] (*n* = 13). Statistical significance was evaluated by unpaired, two-tailed *t*-test. NS, not significant

the molecular pathogenic influence of m.3243A > G on neuronal lineage commitment, we measured mitochondrial respiratory function of iPSC-derived 'survival' neurons by a flux analyzer; similarly to the case of iPSC-derived cardiomyocytes, 'survival' neurons derived from P1-3243[90] iPSC line, all of which possessed less than 90% proportions of m.3243A > G, showed apparently normal mitochondrial respiration profile and mitochondrial energy metabolic potentials (e.g., basal respiration and ATP production) similarly to

those derived from P1-3243[40] iPSC line (Figure 3f). More remarkable than the case of cardiac lineage commitment, some iPSC-derived 'survival' neurons also showed drastic decreases in m.3243A > G heteroplasmy levels (i.e., 5 out of 15 neurons exhibited less than 70% proportions of mutant mtDNA) when compared with the distributions of m.3243A > G heteroplasmy levels in the parental P1-3243[90] iPSC line (77–92% proportions of mutant mtDNA) (see also Figure 3e), suggesting that mutant mtDNA segregation

may occur in some cell populations during neuronal maturation process in a stochastic manner. We further prepared other lines of iPSC-derived neurons from the parental P1-3243[90] iPSC line to experimentally reproduce such mutant mtDNA segregation behavior and to clarify the relationship between the segregation of m.3243 A>G heteroplasmy levels and the changes in mtDNA copy number. Unfortunately, however, no significant segregation of m.3243 A>G heteroplasmy levels was observed during the repetitive neuronal differentiation assays. In contrast to the case of iPSC-derived cardiomyocytes, 'survival' neurons derived from two isogenic iPSC lines (P1-3243[40] and P1-3243[90]) possessed less mtDNA copies per cell than those in the parental iPSCs; however, no significant difference in mtDNA copy number was observed between two isogenic iPSC lines (P1-3243[40] and P1-3243[90]), or among their iPSC-derived neurons (Supplementary Figure S3). We therefore concluded that mitochondrial respiratory dysfunction caused by exceeding the pathogenic threshold level of m.3243A>G also induced neuronal cell death; this phenomenon is similar to, but more pronounced than, that in cardiac lineage.

Neuronal maturation defect was also recapitulated by using mtDNA-depleted neuroblastoma cells. We further addressed whether severe mitochondrial respiratory dysfunction, which is triggered by mtDNA depletion, is also able to recapitulate neuronal maturation defect and even neuronal cell death during neuronal lineage commitment. We used SH-SY5Y neuroblastoma cell line (SH-SY5Y WT) to prepare its mtDNA-depleted cell line (SH-SY5Y ρ^0) and to differentiate both neuroblastoma cell lines into neurons (Figure 4a). We confirmed, in advance, that SH-SY5Y ρ^0 line showed severe mitochondrial respiratory dysfunction triggered by mtDNA depletion (Figure 4b). In fact, cytochemical staining of cytochrome *c* oxidase (COX), an indicator of mitochondrial respiration activity, also indicated that SH-SY5Y WT line showed strongly COX-positive, whereas SH-SY5Y ρ^0 line showed COX-negative (Figure 4d). As we expected, neuronal maturation was markedly suppressed by severe mitochondrial respiratory dysfunction triggered by mtDNA depletion, and in some cells, induced neuronal cell death was also observed in SH-SY5Y ρ^0 line during neuronal lineage commitment (Figure 4c and Supplementary Movies S4 and S5) with similar trend to iPSC-derived neurons carrying high proportions of m.3243 A>G. In this case, the remaining 'survival' neurons in SH-SY5Y ρ^0 line were COX-negative (Figure 4d). Although neuroblastoma cells have several distinct genetic, epigenetic and energy metabolic properties from iPSCs, we concluded that mitochondrial respiratory dysfunction caused by defective mtDNA with various mutation types actually induced neuronal maturation defect and even neuronal cell death *in vitro*.

Discussion

In this study, we generated two isogenic iPSC lines from the same patient; one exhibited apparently normal and the other showed most likely impaired mitochondrial respiratory function. Using these isogenic iPSC lines, our lineage-specific directed differentiation methods demonstrated that induced

mitochondrial respiratory dysfunction triggered by high proportions of m.3243 A>G strongly inhibits maturation and survival of iPSC-derived neurons and cardiomyocytes. Such *in vitro* maturation defects in both neuronal and cardiac lineages were also confirmed using another patient-derived iPSC line carrying over 90% proportion of m.3243 A>G. In addition to our results, Hämäläinen *et al.*¹⁵ reported the pathogenic influences of a heteroplasmic m.3243 A>G mutation on neuronal differentiation; briefly, their established patient-origin iPSC-derived neurons carrying approximately 80–85% proportions of m.3243 A>G exhibited specific down-regulation of mitochondrial respiratory chain complex I at both transcript and protein levels and showed accelerated mitophagy via the PARKIN–PINK1 pathway, probably due to clearance of damaged mitochondria for further neuronal differentiation and maturation. Taking these previous findings with our presenting data, we propose that appropriate mitochondrial rejuvenation or maturation must be required for *bona fide* cellular reprogramming or differentiation, and the degree of molecular pathogenic influence of mutant mtDNA actually determines the severity of the cell-type-specific disease phenotypes *in vitro*, including the differentiation efficiency into particular cell types (Figure 5).

As we noted above, severe mitochondrial respiratory dysfunction strongly induces neuronal cell death *in vitro*; however, most parts of mitochondrial disease patients carrying mutant mtDNA undergo normal brain development *in vivo* before symptomatic appearance. What is the crucial difference between iPSC-based *in vitro* cellular disease phenotypes and *in vivo* clinical symptoms? Some previous molecular neuropathological studies using postmortem brain of mitochondrial disease patients found that neuronal cells carrying higher proportions of mutant mtDNA frequently remained in some patients' cerebellar lesions (e.g., dentate nucleus neurons, olivary neurons and Purkinje cells).^{21,22} These findings suggest that neuronal cell death does not always correlate with mutant mtDNA proportions, leading to the discrepancy between our iPSC-based *in vitro* recapitulation of neuronal development and *in vivo* brain pathology of mitochondrial disease patients. With regard to this discrepancy, it is hypothesized that physiological and physical interaction with other non-neuronal cell types in the brain (e.g., astrocytes) may strongly enhance maturation and long-term survival of neurons having damaged mitochondria. Astrocytes are known to play a role as an energy supplier to neurons through the release of lactate;²³ for example, a co-culture system with astrocytes is generally used for accelerated functional maturation and long-term survival of neurons *in vitro*. Moreover, the predominant energy metabolic system in astrocytes is glycolysis, while that in neurons is mitochondrial respiration,²³ suggesting no apparent influence of mitochondrial respiration defects on physiological function in astrocytes to support neurons. In fact, we displayed the successive observation of TUJ1-positive neurons derived from P2-3243[>90] iPSC line through EB-mediated *in vitro* spontaneous differentiation, and even this iPSC line did not produce neurons using the directed neuronal differentiation method. On the other hand, aberrant early embryogenesis was reported using fertilized eggs derived from a female mito-mouse carrying 70% proportion of 4696-bp mtDNA

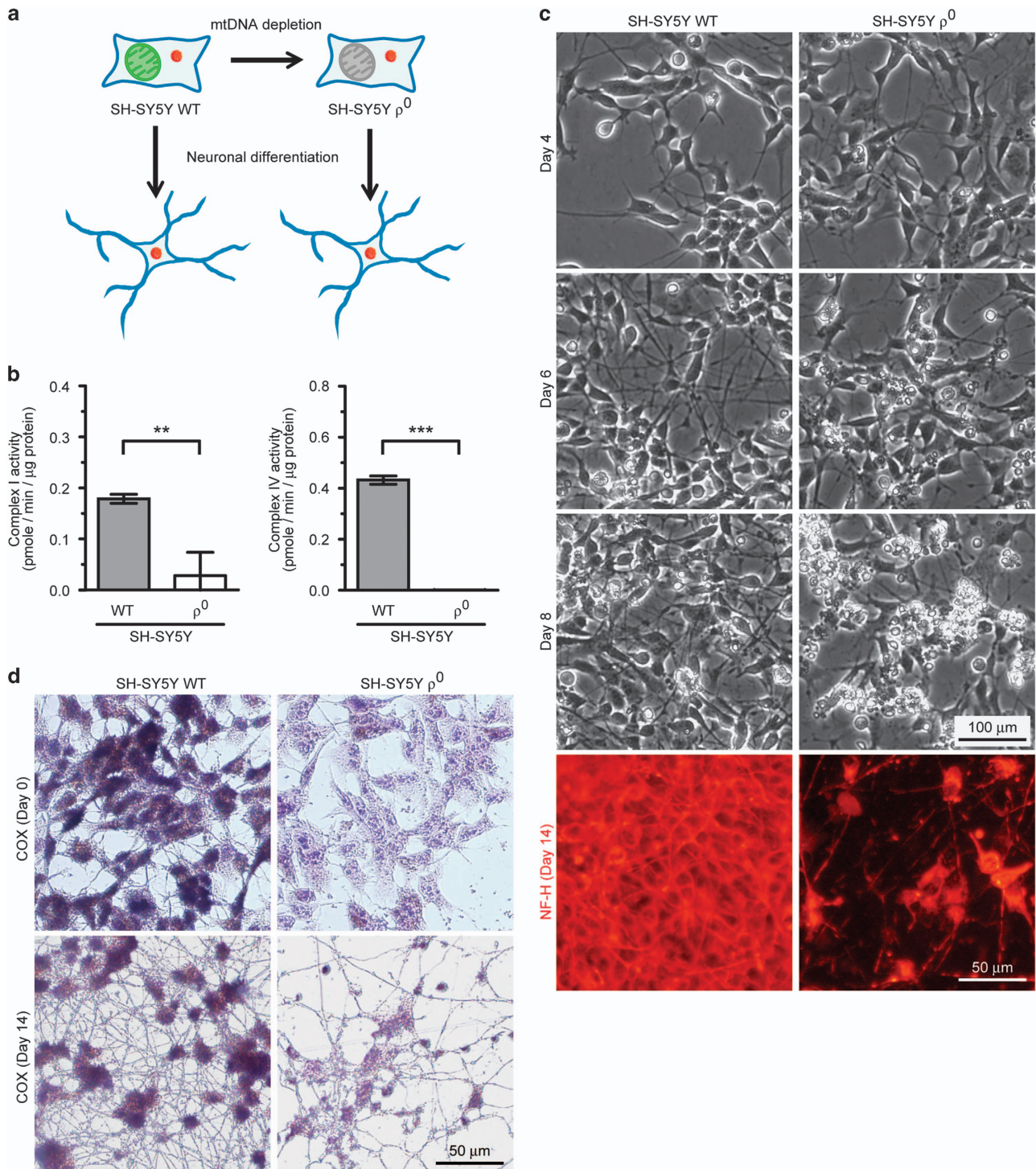


Figure 4 mtDNA-depleted neuroblastoma cells recapitulate neuronal maturation defect and even neuronal cell death during neuronal lineage commitment. (a) Experimental design used to identify whether mtDNA-depleted neuroblastoma cells recapitulate neuronal maturation defect and even neuronal cell death during neuronal lineage commitment. (b) Mitochondrial respiratory chain complexes activity of neuroblastoma cell lines. Three biological replicates of SH-SY5Y WT and SH-SY5Y ρ^0 were used for the measurements. Statistical significance was evaluated by unpaired, two-tailed *t*-test. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. (c) Representative images of neurons derived from SH-SY5Y WT and SH-SY5Y ρ^0 ; NF-H (red). Marked neuronal cell death in SH-SY5Y ρ^0 was also observed at day 8. Representative movies of differentiating neurons derived from SH-SY5Y WT and SH-SY5Y ρ^0 were also shown in Supplementary Movies S4 and S5, respectively. (d) Representative images of cytochemical COX staining for undifferentiated and differentiated SH-SY5Y WT and SH-SY5Y ρ^0 ; COX (brown). Cell nuclei were co-stained with hematoxylin (purple). Both samples of SH-SY5Y WT and SH-SY5Y ρ^0 were stained simultaneously for the same period

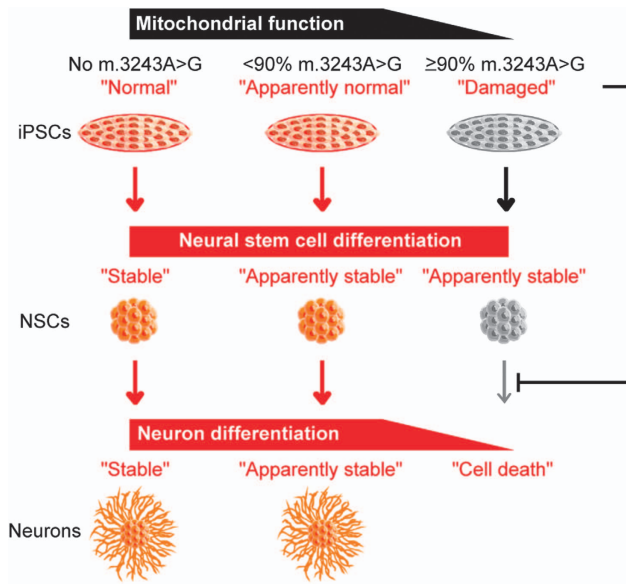


Figure 5 Graphical summary showing the relationship between mtDNA pathogenic threshold and inhibited neuronal differentiation. iPSC lines carrying over the pathogenic threshold level of m.3243A>G showed neuronal maturation defect and even neuronal cell death during neuronal lineage commitment; however, no cell death was observed during NSC specification and expansion in these iPSC lines, suggesting that m.3243A>G has minimal molecular pathogenic influence on NSCs

deletion,²⁴ this mouse mutant mtDNA exhibited the intrinsic pathogenic threshold level (60–80% proportions of mutant mtDNA) in relation to mitochondrial respiratory function, which was confirmed by *in vitro* biochemical analysis using trans-mitochondrial cellular systems and by *in vivo* phenotypic analysis using several lines of mito-mice.²⁵ Although there are some experimental differences between their findings and our presenting data (iPSC-based human model vs mouse model, mtDNA point mutation vs mtDNA partial deletion, etc.), the defective *in vitro* differentiation into particular cell types triggered by severely impaired mitochondrial respiration may be suggestive of such *in vivo* embryonic lethality.

Mitochondrial diseases present a broad clinical spectrum even among patients carrying the same heteroplasmic mtDNA mutations (e.g., variations in age of onset, in affected tissues and organs, or in disease progression and phenotypic severity), and vice versa, different mtDNA mutations share similar clinical features in mitochondrial diseases. Such clinical phenotypic diversity frequently makes us complicated to understand the overall pathology of mitochondrial diseases; therefore, curable treatments have yet to be established. Thus, our established isogenic iPSC lines from the same mitochondrial disease patient exhibiting either apparently normal or impaired mitochondrial respiratory function must be promising tools not only to recapitulate tissue- and organ-specific disease phenotypes but also to efficiently explore candidate chemical compounds (i) that ameliorate mitochondrial respiratory dysfunction or (ii) that induce reduced mutant mtDNA proportions. We believe that our presenting data display new insights not only into understanding how mitochondrial respiratory dysfunction

triggered by heteroplasmic mtDNA mutations influences cellular fate-determining processes but also into facilitating the applications in future iPSC-based drug discovery and regenerative therapeutics in mitochondrial diseases.

Materials and Methods

Patients. This study was approved by NCNP Institutional Review Board and was stringently conducted in accordance with the ethical principles of the 'Declaration of Helsinki'. Patient biopsy was performed for diagnostic purposes only after we received written informed consent with permission to study patient-derived iPSCs.

Fibroblast culture. Primary fibroblasts were established from patient-derived skin biopsies via a standard protocol. Patient-derived fibroblasts were maintained in DMEM/F12 (Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 µg/ml streptomycin (Gibco) at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed every 3 days. During establishment of primary fibroblasts, 0.5 µg/ml MC210 (DS Pharm, Osaka, Japan) as a mycoplasma reagent and 2.5 µg/ml fungizone (Gibco) as a fungicidal reagent were also added to culture medium.

Generation of patient-derived iPSCs with episomal vector.

Patient-derived iPSCs were generated using episomal vectors as described elsewhere²⁶ with modifications: briefly, each 1 µg of episomal plasmid vectors (Plasmid #27077, #27078, #27080; Addgene, Cambridge, MA, USA) were electroporated into patient-derived myoblasts (5 × 10⁵ cells) with an electroporator (Neon; Invitrogen, Waltham, MA, USA). Transformed patient-derived myoblasts (1 × 10⁵ cells) were reseeded onto mouse embryonic fibroblasts (MEF; ReproCELL, Yokohama, Japan) 4 days after electroporation. The next day, culture medium was replaced with primate ESC culture medium (ReproCELL) supplemented with 10 ng/ml bFGF (ReproCELL), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 µg/ml streptomycin (Gibco) and transformed patient-derived myoblasts were maintained at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed every other day. Emergent colonies with ESC-like morphology were manually picked up to establish patient-derived iPSCs, and these iPSCs were expanded either on MEF-seeded dishes in primate ESC culture medium or on Geltrex (Gibco)-coated dishes in mTeSR1 medium (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) supplemented with 100 units/ml penicillin (Gibco) and 100 µg/ml streptomycin (Gibco) for long-term maintenance. Culture medium was changed daily.

To evaluate the distributions of m.3243 A > G proportions in each patient-derived iPSC line, we randomly picked up several iPSC colonies from each patient-derived iPSC line to extract DNA for determination of m.3243 A > G proportions at each single-iPSC-colony level.

Characterization of patient-derived iPSCs.

Characterization of patient-derived iPSCs via detection of pluripotency markers was performed according to our previous report:¹⁷ Briefly, cultured and harvested patient-derived iPSCs were transferred onto MEF-seeded multi-well culture plates and were maintained in primate ESC culture medium at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed daily. After 3 days in culture, patient-derived iPSCs were characterized by standard immunocytochemical protocol. Fluorophore-conjugated primary antibodies used were as follows: Cy3-conjugated anti-OCT4 (1:100 dilution; Millipore, Billerica, MA, USA), Cy3-conjugated anti-NANOG (1:100 dilution; Millipore), AlexaFluor 488-conjugated anti-TRA-1-60 (1:100 dilution; Millipore), AlexaFluor 488-conjugated anti-TRA-1-81 (1:100 dilution; Millipore). Stained samples were observed under a fluorescent microscope (IX71 System; Olympus, Tokyo, Japan).

in vitro spontaneous differentiation of patient-derived iPSCs into EB-mediated three germ layers was also performed according to our previous report:¹⁷ Briefly, cultured and harvested patient-derived iPSCs were transferred onto ultra-low-adherent culture dishes (HydroCell; CellSeed, Tokyo, Japan) and were maintained in primate ESC culture medium without bFGF at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed every other day. After 7 days in floating culture, emergent EBs were transferred onto Geltrex (Gibco)-coated multi-well culture plates and were maintained in primate ESC culture medium without bFGF at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed every other day. After 14 additional days in adherent culture, spontaneously differentiated cells were characterized by standard immunocytochemical protocol. Primary antibodies used were as follows: anti-TUJ1 (1:200 dilution; Abcam, Cambridge, UK), anti-αSMA

(1:40 dilution; Abcam), anti-AFP (1:200 dilution; Abcam). Secondary antibody used was AlexaFluor 568 (1:800 dilution; Molecular Probes, Waltham, MA, USA). Stained samples were observed under a fluorescent microscope (IX71 System; Olympus).

Short tandem repeat (STR) analysis was performed to confirm the genetic identity of the established isogenic iPSC lines: Briefly, extracted DNA as template (0.5 ng) was amplified using a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) with a PowerPlex 16 HS System kit (Promega, Fitchburg, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The amplified DNA fragments were electrophoresed using a DNA analyzer (ABI PRISM 3130xl; Applied Biosystems). The obtained data were analyzed using GeneMapper Software (Ver. 5.0; Applied Biosystems).

Analysis of mtDNA mutation. Long PCR-based whole-mtDNA sequencing for the patient was performed as described elsewhere²⁷ with modifications to eliminate any adverse results arising from pseudo-sequences in nuclear DNA: Briefly, extracted DNA as a template (10 ng) was amplified via mtDNA-specific long-range PCR and the following mtDNA-specific nested PCR using a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems). The amplified mtDNA fragments were sequenced using a DNA analyzer (ABI PRISM 3130xl; Applied Biosystems).

Pyrosequencing was performed to determine m.3243 A>G proportions: Briefly, extracted DNA as a template (10–20 ng) was amplified using a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems). The amplified mtDNA fragments were sequenced using a pyrosequencing instrument (PyroMark Q24 Advanced; Qiagen, Venlo, Netherlands) with a PyroMark Q24 Advanced Reagents kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The obtained data were analyzed using PyroMark Q24 Advanced Software (Ver. 3.0.0; Qiagen). Primers used are listed in Supplementary Table S1.

Analysis of mtDNA copy number. mtDNA copy number analysis was performed according to our previous report.²⁰ Briefly, extracted DNA as a template (1 ng) was used for quantitative PCR with a SYBR Green I PCR Master Mix kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. A real-time PCR system (LightCycler 480II; Roche) was used to measure mtDNA copy number per cell. Measurement for each sample was performed in triplicate. $\Delta\Delta C_T$ -based relative quantification method was adopted for data analysis. Primers used are listed in Supplementary Table S1.

Analyses of pluripotency genes expression and transgenes silencing. Reverse transcription was performed with PrimeScript RT Master Mix kit (TaKaRa Bio, Shiga, Japan) according to the manufacturer's instructions. After reverse transcription of extracted total RNA, total cDNA as a template (10 ng) was used for quantitative PCR with a SYBR Green I PCR Master Mix kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. A real-time PCR system (LightCycler 480II; Roche) was used to measure pluripotency genes expression and transgenes silencing. Measurement for each sample was performed in triplicate. $\Delta\Delta C_T$ -based relative quantification method was adopted for data analysis. Primers used are listed in Supplementary Table S1.

Directed differentiation of iPSCs into cardiomyocytes. Directed differentiation of patient-derived iPSCs into cardiomyocytes was performed as described elsewhere²⁸ with modifications: Briefly, patient-derived iPSCs were cut into uniform-sized pieces of colonies using the STEMPRO EZ Passage (Invitrogen) to transfer onto Geltrex (Gibco)-coated culture dishes and were maintained in mTeSR1 medium (StemCell Technologies) at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed daily. After 7 days in culture, culture medium was switched to Cardiac induction medium I (RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 1 × B27 minus insulin (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco), 100 ng/ml Activin A (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) for first 1 day, Cardiac induction medium II (RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 1 × B27 minus insulin (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco), 10 ng/ml BMP4 (Peprotech), 10 ng/ml bFGF (Peprotech)) for next 4 days, and Cardiac induction medium III (RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 1 × B27 minus insulin (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco), 100 ng/ml DKK-1 (Peprotech)) for further 6 days, sequentially. Culture medium was changed every other day. Culture medium was finally switched to Cardiac maturation medium (RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 1 × B27 minus insulin (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco)) and was changed every

other day for terminal differentiation. The beating aggregates began to emerge at around 15 days of cardiac differentiation. At 26 or 27 days of cardiac differentiation in total, each beating cardiomyocyte-aggregate was transferred onto each well of Geltrex (Gibco)-coated multi-well culture plates and were used for further analyses.

Emergent cardiomyocytes were maintained in cardiac maturation medium and were characterized according to standard immunocytochemical protocol. Primary antibody used was as follows: anti-cTNT (1:200 dilution; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Secondary antibody used was as follows: AlexaFluor 568 (1:800 dilution; Molecular Probes). Stained samples were observed under a fluorescent microscope (IX71 System; Olympus).

Directed differentiation of iPSCs into neurons. Directed differentiation of patient-derived iPSCs into neurons was performed as follows: Briefly, cultured and harvested patient-derived iPSCs were transferred onto ultra-low-adherent culture dishes (HydroCell; CellSeed) and were maintained in NSC specification medium (Essential 6 medium (Gibco) supplemented with 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco), 10 μM SB431542 (Wako, Osaka, Japan), 100 nM LDN193189 (Wako)) for first 8 days at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed every other day. After floating culture, each neurosphere was transferred onto each well of Geltrex (Gibco)-coated multi-well culture plates and were maintained in NSC expansion medium (1:1 mixture of DMEM/F12 (Gibco) and Neurobasal medium (Gibco) supplemented with 1 × N2 (Gibco), 1 × B27 minus vitamin A (Gibco), 1 × GlutaMAX (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco), 10 μM SB431542 (Wako), 100 nM LDN193189 (Wako), 20 ng/ml EGF (Peprotech), 20 ng/ml bFGF (Peprotech)) for next 6 days at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed every other day. Culture medium was finally switched to Neuron induction medium (Neurobasal medium (Gibco) supplemented with 1 × N2 (Gibco), 1 × B27 minus vitamin A (Gibco), 1 × GlutaMAX (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco), 10 ng/ml BDNF (Peprotech), 10 ng/ml GDNF (Peprotech), 10 ng/ml NGF (Peprotech), 500 μM dbcAMP (Sigma), 200 μM ascorbic acid (Wako)) and was changed every other day for terminal differentiation. At 26 or 27 days of neuronal differentiation in total, neurons were used for further analyses.

Emergent NSCs were characterized according to the standard immunocytochemical protocol. Fluorophore-conjugated primary antibodies used were as follows: Cy3-conjugated anti-SOX2 (1:100 dilution; Millipore), AlexaFluor 488-conjugated anti-Nestin (1:100 dilution; Millipore). Stained samples were observed under a fluorescent microscope (IX71 System; Olympus).

Emergent neurons were characterized according to standard immunocytochemical protocol. Primary antibody used was anti-TUJ1 (1:200 dilution; Abcam). Secondary antibody used was AlexaFluor 568 (1:800 dilution; Molecular Probes). Stained samples were observed under a fluorescent microscope (IX71 System; Olympus).

Analysis of mitochondrial respiration. Analysis of mitochondrial respiratory potential was performed using a flux analyzer (Seahorse XF²⁴ Extracellular Flux Analyzer; Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) with a Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Seahorse Bioscience) according to the manufacturer's instructions. Basal respiration and ATP production were calculated to evaluate mitochondrial respiratory function according to the manufacturer's instructions. After the measurement, cells were harvested to count the cell number, and each plotted value was normalized relative to the number of cells used. The detailed procedures are as follows:

For iPSCs, several pieces of iPSC colonies were transferred onto each well of Geltrex (Gibco)-coated XF²⁴ cell culture plates (Seahorse Bioscience) and were maintained in primate ESC culture medium. After 3 days in culture, iPSCs were equilibrated in unbuffered XF²⁴ assay medium (Seahorse Bioscience) supplemented with 10 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate and transferred to a non-CO₂ incubator for 1 h before measurement. Oxygen consumption rate (OCR) was measured with sequential injections of 2 μM oligomycin, 1 μM FCCP and each 2 μM of rotenone/antimycin A.

For iPSC-cardiomyocytes, each beating cardiomyocyte-aggregate at 23 days of differentiation in total was transferred onto each well of Geltrex (Gibco)-coated XF²⁴ cell culture plates (Seahorse Bioscience) and was maintained in Cardiac maturation medium. At 26 or 27 days of differentiation in total, beating cardiomyocytes were equilibrated in unbuffered XF²⁴ assay medium (Seahorse Bioscience) supplemented with 10 mM glucose and 1 mM sodium pyruvate, and transferred to

a non-CO₂ incubator for 1 h before measurement. OCR was measured with sequential injections of 1 μM oligomycin, 0.5 μM FCCP and each 2 μM of rotenone/antimycin A.

For iPSC-neurons, each neurosphere at 8 days of differentiation in total was transferred onto each well of Geltrex (Gibco)-coated XF²⁴ cell culture plates (Seahorse Bioscience) and was maintained in NSC expansion medium for next 6 days, followed by terminal differentiation in Neuron induction medium. At 26 or 27 days of differentiation in total, neurons were equilibrated in unbuffered XF⁹⁶ assay medium (Seahorse Bioscience) supplemented with 10 mM glucose and 1 mM sodium pyruvate, and transferred to a non-CO₂ incubator for 1 h before measurement. OCR was measured with sequential injections of 2 μM oligomycin, 0.5 μM FCCP and each 2 μM of rotenone/antimycin A.

Analysis of mitochondrial respiratory chain complex activity.

Analysis of mitochondrial respiratory chain complex activity was performed according to our previous report.²⁰ Briefly, mitochondrial respiratory complex activity was measured with Complex I Human Enzyme Activity Microplate Assay kit (Abcam) and with Complex IV Human Enzyme Activity Microplate Assay kit (Abcam) according to the manufacturer's instructions, respectively. Cell extracts (150 μg for complex I, 50 μg for complex IV) were used to measure time-dependent absorbance alterations on a multi-well plate reader (SPECTROstar Nano; BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

Neuroblastoma cell culture and neuronal differentiation.

SH-SY5Y neuroblastoma cell line was maintained in Neuroblastoma growth medium (DMEM (Gibco) supplemented with 4.5 mg/ml glucose, 110 μg/ml sodium pyruvate, 50 μg/ml uridine (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10% FBS (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco)) at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed every other day.

For the establishment of mtDNA-depleted cell line (SH-SY5Y ρ⁰), sparsely plated SH-SY5Y cells were expanded in Neuroblastoma growth medium (DMEM (Gibco) supplemented with 4.5 mg/ml glucose, 110 μg/ml sodium pyruvate, 50 μg/ml uridine (Sigma), 10% FBS (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco)) with the addition of 5 μg/ml ethidium bromide to induce mtDNA depletion for at least 1 month in culture at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Culture medium was changed every other day.

For neuronal lineage commitment, SH-SY5Y WT and SH-SY5Y ρ⁰ (1 × 10⁵ cells, respectively) were transferred onto Geltrex (Gibco)-coated multi-well culture plates or culture dishes and were maintained in Neuroblastoma growth medium (DMEM (Gibco) supplemented with 4.5 mg/ml glucose, 110 μg/ml sodium pyruvate, 50 μg/ml uridine (Sigma), 10% FBS (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco)) at 37 °C under humidified atmosphere of 5% CO₂. The next day, culture medium was replaced with Neuron induction medium (Neurobasal medium (Gibco) supplemented with 1 × N2 (Gibco), 1 × B27 minus vitamin A (Gibco), 1 × GlutaMAX (Gibco), 100 units/ml penicillin (Gibco), 100 μg/ml streptomycin (Gibco), 10 ng/ml BDNF (Peprotech), 10 ng/ml GDNF (Peprotech), 10 ng/ml NGF (Peprotech), 500 μM dbcAMP (Sigma), 200 μM ascorbic acid (Wako)) with the addition of 50 μg/ml uridine (Sigma) and was changed every other day for terminal differentiation. At 14 days of neuronal differentiation, neurons were used for further analyses. Time-lapse images of neuronal lineage commitment from day 4 to day 8 were also obtained using a live cell imaging system (BioStudio; Nikon Engineering) at 30 min of interval.

Emergent neurons were characterized according to standard immunocytochemical protocol. Primary antibody used was as follows: anti-NF-H (1:200 dilution; Abcam). Secondary antibody used was as follows: AlexaFluor 568 (1:800 dilution; Molecular Probes). Stained samples were observed under a fluorescent microscope (IX71 System; Olympus).

Cytochemical COX staining. Cytochemical COX staining was performed as follows: Briefly, undifferentiated and differentiated SH-SY5Y WT and SH-SY5Y ρ⁰ were stained with COX reaction buffer (pH 5.5; 100 mM sodium acetate, 0.1% MnCl₂, 0.001% H₂O₂, 10 mM diaminobenzidine) at 37 °C for 1 h, followed by subsequent incubation with 1% CuSO₄ at 37 °C for 5 min. Stained samples were observed under a microscope (IX71 System; Olympus).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We are grateful to all patients and their families for participating in this study. We would also like to thank Junko Takei, Yumiko Ondo and Saki Okabe (NCNP, Japan) for their assistances. This study was financially supported in part by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (Grant No. 25860732 to MY) from the Japan Society for the Promotion of Science; by a Grant-in-Aid for the Research on Intractable Diseases (Mitochondrial Disorders) from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan; and by an AMED-CREST from the Japan Agency for Medical Research and Development.

Author contributions

HH conceived the study. HH and YG supervised the study. MY and HH designed experiments. MY, YO and MK performed experiments. MY and HH analyzed and interpreted data. MY, HH and YG wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript.

1. Armstrong L, Tilgner K, Saretzki G, Atkinson SP, Stojkovic M, Moreno R et al. Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2010; **28**: 661–673.
2. Prigione A, Fauler B, Lurz R, Lehrach H, Adjaye J. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2010; **28**: 721–733.
3. Suhr ST, Chang EA, Tjong J, Alcasid N, Perkins GA, Goissis MD et al. Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency. *PLoS One* 2010; **5**: e14095.
4. Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley CA IV, Ramalho-Santos J et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One* 2011; **6**: e20914.
5. Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* 2011; **14**: 264–271.
6. Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 2012; **11**: 596–606.
7. Kelly RD, Rodda AE, Dickinson A, Mahmud A, Nefzger CM, Lee W et al. Mitochondrial DNA haplotypes define gene expression patterns in pluripotent and differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells* 2013; **31**: 703–716.
8. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 2003; **370**: 751–762.
9. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 389–402.
10. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 2012; **13**: 878–890.
11. Hatakeyama H, Goto Y. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations and mitochondrial diseases: toward iPSC-based disease modeling, drug discovery, and regenerative therapeutics. *Stem Cells* 2016; **34**: 801–808.
12. Fujikura J, Nakao K, Sone M, Noguchi M, Mori E, Naito M et al. Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia* 2012; **55**: 1689–1698.
13. Cherry AB, Gagne KE, McLoughlin EM, Baccei A, Gorman B, Hartung O et al. Induced pluripotent stem cells with a mitochondrial DNA deletion. *Stem Cells* 2013; **31**: 1287–1297.
14. Folmes CD, Martinez-Fernandez A, Perales-Clemente E, Li X, McDonald A, Oglesbee D et al. Disease-causing mitochondrial heteroplasmy segregated within induced pluripotent stem cell clones derived from a patient with MELAS. *Stem Cells* 2013; **31**: 1298–1308.
15. Hämläinen RH, Manninen T, Koivumäki H, Kislin M, Otonkoski T, Suomalainen A. Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243 A > G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: E3622–E3630.
16. Kodaira M, Hatakeyama H, Yuasa S, Seki T, Egashira T, Tohyama S et al. Impaired respiratory function in MELAS-induced pluripotent stem cells with high heteroplasmy levels. *FEBS Open Bio* 2015; **5**: 219–225.
17. Hatakeyama H, Katayama A, Komaki H, Nishino I, Goto Y. Molecular pathomechanisms and cell-type-specific disease phenotypes of MELAS caused by mutant mitochondrial tRNA(Trp). *Acta Neuropathol Commun* 2015; **3**: 52.
18. Ma H, Folmes CD, Wu J, Morey R, Mora-Castilla S, Ocampo A et al. Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature* 2015; **524**: 234–238.
19. 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**: 651–653.
20. Yokota M, Hatakeyama H, Okabe S, Ono Y, Goto Y. Mitochondrial respiratory dysfunction caused by a heteroplasmic mitochondrial DNA mutation blocks cellular reprogramming. *Hum Mol Genet* 2015; **24**: 4698–4709.
21. Zhou L, Chomyn A, Attardi G, Miller CA. Myoclonic epilepsy and ragged red fibers (MERRF) syndrome: selective vulnerability of CNS neurons does not correlate with the level of

- mitochondrial tRNA(lys) mutation in individual neuronal isolates. *J Neurosci* 1997; **17**: 7746–7753.
22. Lax NZ, Hepplewhite PD, Reeve AK, Nesbitt V, McFarland R, Jaros E *et al*. Cerebellar ataxia in patients with mitochondrial DNA disease: a molecular clinicopathological study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; **71**: 148–161.
23. Petit JM, Magistretti PJ. Regulation of neuron-astrocyte metabolic coupling across the sleep-wake cycle. *Neuroscience* 2016; **323**: 135–156.
24. Ishikawa K, Kasahara A, Watanabe N, Nakada K, Sato A, Suda Y *et al*. Application of ES cells for generation of respiration-deficient mice carrying mtDNA with a large-scale deletion. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **333**: 590–595.
25. Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I *et al*. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* 2000; **26**: 176–181.
26. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S *et al*. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011; **8**: 409–412.
27. Akanuma J, Muraki K, Komaki H, Nonaka I, Goto Y. Two pathogenic point mutations exist in the authentic mitochondrial genome, not in the nuclear pseudogene. *J Hum Genet* 2000; **45**: 337–341.
28. Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, Fukushima H, Marui A, Katayama S *et al*. Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Sci Rep* 2014; **4**: 6716.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)



CELL INJURY, REPAIR, AGING, AND APOPTOSIS

Respiratory Chain Complex Disorganization Impairs Mitochondrial and Cellular Integrity



Phenotypic Variation in Cytochrome c Oxidase Deficiency

Hideyuki Hatakeyama^{*†} and Yu-ichi Goto^{*†‡}

From the Department of Mental Retardation and Birth Defect Research,^{*} National Institute of Neuroscience, and the Medical Genome Center,[‡] National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo; and AMED-CREST,[†] Japan Agency for Medical Research and Development, Tokyo, Japan

Accepted for publication
September 19, 2016.

Address correspondence to
Hideyuki Hatakeyama, Ph.D., or
Yu-ichi Goto, M.D., Ph.D.,
Department of Mental Retardation
and Birth Defect Research,
National Institute of Neurosci-
ence, National Center of
Neurology and Psychiatry, 4-1-1
Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo
187-8502, Japan. E-mail:
hideyuki@ncnp.go.jp or goto@ncnp.go.jp.

The relationships between the molecular abnormalities in mitochondrial respiratory chain complexes and their negative contributions to mitochondrial and cellular functions have been proved to be essential for better understandings in mitochondrial medicine. Herein, we established the method to identify disease phenotypic differences among patients with muscle histopathological cytochrome c oxidase (COX) deficiency, as one of the representative clinical features in mitochondrial diseases, by using patients' myoblasts that are derived from biopsied skeletal muscle tissues. We identified two obviously different severities in molecular diagnostic criteria of COX deficiency among patients: structurally stable, but functionally mild/moderate defect and severe functional defect with the disrupted COX holoenzyme structure. COX holoenzyme disorganization actually triggered several mitochondrial dysfunctions, including the decreased ATP level, the increased oxidative stress level, and the damaged membrane potential level, all of which lead to the deteriorated cellular growth, the accelerated cellular senescence, and the induced apoptotic cell death. Our cell-based *in vitro* diagnostic approaches would be widely applicable to understanding patient-specific pathomechanism in various types of mitochondrial diseases, including other respiratory chain complex deficiencies and other mitochondrial metabolic enzyme deficiencies. (*Am J Pathol* 2017, 187: 110–121; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.09.003>)

Cytochrome *c* oxidase [COX; alias complex IV (CIV)] is a terminal protein in the mitochondrial electron transport system with oxidative phosphorylation and comprises its 13 structural subunits. The three largest, most hydrophobic catalytic core subunits are encoded in mitochondrial DNA (mtDNA), and the others are encoded in nuclear DNA (nDNA). In addition, COX also requires several nDNA-encoded assembly factors for its holoenzyme organization and maintenance. COX deficiency is widely recognized as one of the representative clinical phenotypes in mitochondrial diseases and presents muscle histopathological diversity among patients (focally, diffusely, or completely deficient). Although disease-causative mutations in nDNA-encoded assembly factors are mostly inherited as autosomal recessive,¹ only a few detrimental mutations in nDNA-encoded COX structural subunits have been

reported.^{2,3} Other genetic defects in mtDNA-encoded COX structural subunits^{4–10} or in several mitochondrial tRNA genes are also responsible for COX deficiency; moreover, infantile reversible COX deficiency (alias reversible infantile respiratory chain deficiency), which is caused by homoplasmic m.14674T>C or T>G mutations in *MT-TE* gene, has recently been identified as a new disease subtype with rare, distinct disease outcome.^{11,12} To date, the relationships between pathogenic mutations in COX-

Supported in part by Japan Society for the Promotion of Science grant-in-aid for Young Researcher B 20790760 (H.H.); a Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan grant-in-aid of the Research on Intractable Diseases (Mitochondrial Disorder) (Y.G.); and Japan Agency for Medical Research and Development AMED-CREST.

Disclosures: None declared.

associating components and the aberrant COX holoenzyme organization become evident at a molecular level. However, there still remains no reasonable explanation how such gene-specific defects actually affect widespread mitochondrial and cellular functions, resulting in the variation and the severity of disease phenotypes at tissue and organ levels.

To overcome this problem, the use of cells derived from the affected tissues and organs is advantageous, because such cells faithfully recapitulate cell type-specific pathophysiology in a patient-specific manner. Herein, we established the method to identify disease phenotypic differences in patients exhibiting mitochondrial diseases by using a comprehensive functional analysis at mitochondrion and cell levels. We demonstrated that severely disrupted COX holoenzyme integrity (its function and structure) actually triggered several mitochondrial dysfunctions, including the decreased ATP level, the increased oxidative stress level, and the damaged membrane potential level, followed by the injured cellular homeostasis like the deteriorated cellular growth, the accelerated cellular senescence, and the induced apoptotic cell death. Therefore, COX holoenzyme disorganization determines the variation and the severity in clinical phenotypes of patients exhibiting mitochondrial diseases with muscle histopathological COX deficiency, and our proposed molecular diagnostic criteria may also be suggestive for effectively exploring disease-causative genetic defects, which are responsible for patient-specific pathology.

Materials and Methods

Patients

This study was approved by the institutional review board of the National Center of Neurology and Psychiatry and was stringently conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki. Patient skeletal muscle biopsy was performed for diagnostic purposes only after we received written informed consent. Note that 10 control subjects were also used in this study.

mtDNA Mutation Analysis

A long PCR-based whole mtDNA sequence in each patient was performed to eliminate any adverse results associating with pseudosequences in nDNA, as described elsewhere¹³ with modifications: Extracted DNA from cultured patients' myoblasts (100 ng) was amplified by mtDNA-specific long-range PCR and the following mtDNA-specific nested PCR using a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, Waltham, MA). The amplified mtDNA fragments were sequenced using DNA analyzer (ABI PRISM 3130xl; Applied Biosystems). The obtained mtDNA sequence data in each patient were compared with the WEB databases of Human Mitochondrial Genome Database (MITOMAP) and Human Mitochondrial Genome Polymorphism (mtSNP)¹⁴ to find any genetic variants.

RT-PCR

One-step RT-PCR was performed with the PrimeScript II High Fidelity RT-PCR kit (TaKaRa Bio, Shiga, Japan), according to the manufacturer's instructions. Extracted total RNA from cultured patients' myoblasts (100 ng) was applied for RT-PCR using a thermal cycler (GeneAmp PCR system 9700; Applied Biosystems). Amplified PCR products were electrophoresed, stained with ethidium bromide, and detected using UV transilluminator (GelDoc-It Imaging System; UVP, Upland, CA).

Primers used were as follows: *MT-CO1*, 5'-TTAGCT-GACTCGCCCACTCC-3' (forward) and 5'-AGTCAGGC-CACCTACGGTGA-3' (reverse); *MT-CO2*, 5'-CTCATGAG-CTGTCCCCACATTAG-3' (forward) and 5'-TTGACCG-TAGTATACCCCCGG-3' (reverse); *COX4*, 5'-CGGCA-GAATGTTGGCTACCA-3' (forward) and 5'-AGCGAAA-AGTCTTCGCTCTTAC-3' (reverse); *COX5B*, 5'-TGGCA-TCTGGAGGTGGTGT-3' (forward) and 5'-TGCCTGAA-GCTCCCTTTGG-3' (reverse); and *GAPDH*, 5'-CAAT-GACCCCTTCATTGACCTC-3' (forward) and 5'-CTCGCT-CCTGGAAGATGGTG-3' (reverse).

Cell Culture

Small portions of biopsied skeletal muscle tissues from the patients' biceps brachii were minced with surgical scissors and forceps, enzymatically digested with collagenase-trypsin solution [400 µg/mL collagenase (Wako, Osaka, Japan), 5× trypsin-EDTA (Gibco, Waltham, MA)] at 37°C for 1 hour, and centrifuged at 200 × g for 5 minutes to collect myoblasts. Cells were resuspended and seeded onto tissue culture dishes and were maintained at 37°C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Myoblast culture medium used was as follows: Dulbecco's modified Eagle's medium with F12 nutrient mixture (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (Gibco), 100 U/mL penicillin (Gibco), and 100 µg/mL streptomycin (Gibco). During primary culture, 0.5 µg/mL MC210 (DS Pharm, Osaka, Japan) as a mycoplasmacidal reagent and 2.5 µg/mL fungizone (Gibco) as a fungicidal reagent were also added into myoblast culture medium.

For cellular proliferation experiment, patients' myoblasts (100 cells/mm²) were seeded onto 96-well culture plates and were maintained at 37°C under humidified atmosphere of 5% CO₂. After 3 days in culture, cells were treated with bromodeoxyuridine chemiluminescence-based cell proliferation enzyme-linked immunosorbent assay kit (Roche, Basel, Switzerland), according to the manufacturer's instructions, and cellular proliferation potential was measured on chemiluminescent multiwell plate reader (Centro LB 960; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

For cellular growth experiment, patients' myoblasts (50 cells/mm²) were seeded onto 6-well culture plates and were maintained at 37°C under humidified atmosphere of 5% CO₂. Cells were observed under phase contrast microscope (IX71 System; Olympus, Tokyo, Japan) at

predetermined time intervals. Cell number per unit area was randomly counted and averaged in each sample. Cellular doubling time was also estimated at logarithmic proliferation stage.

For cellular senescence detection, patients' myoblasts (100 cells/mm²) were seeded onto 4-well culture slides and were maintained at 37°C under humidified atmosphere of 5% CO₂. After 3 days in culture, cells were treated with senescence-associated β -galactosidase staining kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), according to the manufacturer's instructions, and senescent cells were observed under optical microscope (BX50 System; Olympus).

For apoptotic cell death detection, patients' myoblasts (100 cells/mm²) were seeded onto 6-well culture plates and were maintained at 37°C under humidified atmosphere of 5% CO₂. After 3 days in culture, cells were treated with caspase-3 detection kit (Biotium, Fremont, CA), according to the manufacturer's instructions, and apoptotic cell death was observed under fluorescent microscope (IX71 System; Olympus).

For terminal differentiation into myotubes, patients' myoblasts (200 cells/mm²) were seeded onto 6-well culture plates and were maintained at 37°C under humidified atmosphere of 5% CO₂. After 3 days in culture, culture medium was switched to differentiation medium (Cell Applications, San Diego, CA) supplemented with 100 U/mL penicillin (Gibco) and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco), and cells were maintained for 2 weeks.

Cytochemistry

Patients' myoblasts (100 cells/mm²) were seeded onto 4-well culture slides and were maintained at 37°C under humidified atmosphere of 5% CO₂. After 3 days in culture, cells were stained with COX reaction buffer (pH 5.5; 100 mmol/L sodium acetate, 0.1% MnCl₂, 0.001% H₂O₂, and 10 mmol/L diaminobenzidine) at 37°C for 1 hour and were incubated with 1% CuSO₄ at 37°C for 5 minutes. Cell nuclei were costained with hematoxylin. Stained cells were rinsed, fixed, and dehydrated according to standard histological protocol. Samples were sealed with cover glass and were observed under optical microscope (BX50 System; Olympus).

Immunocytochemistry

Cultured patients' myoblasts and differentiated myotubes were fixed, permeabilized, and blocked according to standard immunocytochemical protocol. Primary antibody probing was performed at room temperature for 90 minutes. Secondary antibody probing was performed with 2.5 μ g/mL Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Waltham, MA) at room temperature for 45 minutes. Stained cells were observed under fluorescent microscope (IX71 System; Olympus).

Primary antibodies used were as follows: 2.5 μ g/mL anti-MT-CO1 (Molecular Probes), 2.5 μ g/mL anti-COX4 (Molecular Probes), 0.5 μ g/mL anti-SDHA (Molecular

Probes), 5 μ g/mL anti-myogenin (Abcam, Cambridge, UK), and 5 μ g/mL anti-actin, α 1, skeletal muscle (Abcam).

Mitochondrial Enzymatic Activity

Enzymatic activities for individual mitochondrial respiratory chain complexes were analyzed as described elsewhere¹⁵ with modifications: Cultured and harvested patients' myoblasts (100,000 cells/assay) were permeabilized with 0.1% digitonin at room temperature for 1 minute with gentle pipetting and were used for the experiment. A spectrophotometer equipped with a thermostated unit (U-2010; Hitachi, Tokyo, Japan) was used, and a baseline calibration was done before each measurement.

For complex I activity measurement, permeabilized cells were added into reaction buffer (pH 7.4; 50 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 10 μ mol/L decylubiquinone, 50 μ mol/L NADH, 5 μ g/mL antimycin A, and 2 mmol/L KCN) and were incubated in quartz cuvette at 37°C. Complex I activity was monitored by time-dependent absorbance alterations.

For complex II activity measurement, permeabilized cells were added into reaction buffer (pH 7.4; 50 mmol/L potassium phosphate, 20 mmol/L succinate, 50 μ mol/L 2,6-dichlorophenolindophenol, 50 μ mol/L decylubiquinone, 5 μ g/mL rotenone, 5 μ g/mL antimycin A, and 2 mmol/L KCN) and were incubated in quartz cuvette at 37°C. Complex II activity was monitored by time-dependent absorbance alterations.

For complex III activity measurement, permeabilized cells were added into reaction buffer [pH 7.4; 50 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 50 μ mol/L cytochrome *c*, 50 μ mol/L decylubiquinol (reduced form of decylubiquinone), and 2 mmol/L KCN] and were incubated in quartz cuvette at 37°C. Complex III activity was monitored by time-dependent absorbance alterations.

For complex IV activity measurement, permeabilized cells were added into reaction buffer [pH 7.4; 10 mmol/L potassium phosphate and 25 μ mol/L ferrocytochrome *c* (reduced form of cytochrome *c*)] and were incubated in quartz cuvette at 37°C. Complex IV activity was monitored by time-dependent absorbance alterations.

For citrate synthase activity measurement, permeabilized cells were added into reaction buffer [pH 8.0; 125 mmol/L Tris-HCl, 300 μ mol/L acetyl-CoA, 100 μ mol/L 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), and 500 μ mol/L oxaloacetate] and were incubated in quartz cuvette at 37°C. Citrate synthase activity was monitored by time-dependent absorbance alterations.

Electrophoretic Protein Separation

SDS-PAGE, blue native PAGE (BN-PAGE), and two-dimensional BN-PAGE/SDS-PAGE were performed as described elsewhere^{16,17} with modifications, respectively: Cultured and harvested patients' myoblasts were resuspended

in isolation buffer (pH 7.4; 210 mmol/L mannitol, 70 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EGTA, and 5 mmol/L HEPES) and were homogenated on ice. Cell lysates were centrifuged to isolate mitochondrial proteins. Obtained mitochondrial proteins were quantified by Bradford assay, and a calibration curve was generated using several known concentrations of bovine serum albumin.

For SDS-PAGE, isolated mitochondrial proteins (100 µg) were solubilized with 0.5% SDS containing 50 mmol/L dithiothreitol at 70°C for 10 minutes and were used for the experiment. Electrophoresis was performed on 4% to 12% NuPAGE polyacrylamide gel (Invitrogen, Waltham, MA) at room temperature under 200-V constant.

For BN-PAGE, isolated mitochondrial proteins (100 µg) were solubilized with either 0.5% *n*-dodecyl-β-D-maltoside (individual complexes detection) or 1% digitonin (super-complexes detection) on ice for 30 minutes and were used for the experiment. Electrophoresis was performed on 3% to 12% NativePAGE polyacrylamide gel (Invitrogen) at 4°C under 150-V constant for 30 minutes, then resumed at 4°C under 250-V constant.

Western Blot for Immunodetection

Electrophoresed gels were blotted onto polyvinylidene difluoride membranes using iBlot transfer system (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Blotted polyvinylidene difluoride membranes were blocked at room temperature for 30 minutes. Primary antibody probing was performed at room temperature for 90 minutes. Secondary antibody probing was performed with chromogenic antibody detection kit (WesternBreeze; Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

For SDS-PAGE and immunodetection, primary antibodies used were as follows: 0.5 µg/mL anti-SDHA (Molecular Probes), 2.5 µg/mL anti-MT-CO1 (Molecular Probes), 2.5 µg/mL anti-MT-CO2 (Molecular Probes), 2.5 µg/mL anti-COX4 (Molecular Probes), 2.5 µg/mL anti-COX5B (Molecular Probes), and 2.5 µg/mL anti-COX6B (Molecular Probes).

For BN-PAGE and immunodetection, primary antibodies used were as follows: 0.5 µg/mL anti-NDUFA9 (Molecular Probes), 0.5 µg/mL anti-SDHA (Molecular Probes), 0.5 µg/mL anti-UQCRC2 (Molecular Probes), 2.5 µg/mL anti-MT-CO1 (Molecular Probes), and 0.5 µg/mL anti-ATP5B (Molecular Probes).

Detection of Intracellular ATP

Cultured and harvested patients' myoblasts (100 cells/assay) were applied for the measurements. Cells were treated with rLuciferase/Luciferin chemiluminescence-based ATP detection kit (Promega, Fitchburg, WI), according to the manufacturer's instructions, and intracellular ATP amount was measured on chemiluminescent multiwell plate reader (Centro LB 960; Berthold Technologies). A calibration

curve was generated using several known concentrations of ATP.

Detection of Mitochondrial Oxidative Stress and Mitochondrial Membrane Potential

Quantitative fluorometry was performed as follows: Patients' myoblasts (100 cells/mm²) were seeded onto 96-well culture plates and were maintained at 37°C under humidified atmosphere of 5% CO₂. After 3 days in culture, cells were stained at 37°C for 1 hour. Stained cells were rinsed and measured on fluorescent multiwell plate reader (ARVO SX; Perkin Elmer, Waltham, MA), first at excitation/emission of 545/595 nm (red fluorescence) and then sequentially at excitation/emission of 485/535 nm (green fluorescence).

Fluorescent imaging was performed as follows: Patients' myoblasts (100 cells/mm²) were seeded onto 6-well culture plates and were maintained at 37°C under humidified atmosphere of 5% CO₂. After 3 days in culture, cells were stained at 37°C for 1 hour. Stained cells were rinsed and observed under fluorescent microscope (IX71 System; Olympus).

Fluorescent dyes used were as follows: 0.25 µg/mL MitoTracker Green (Molecular Probes), 0.25 µg/mL MitoSOX Red (Molecular Probes), and 0.25 µg/mL JC-1 (Molecular Probes).

Results

Molecular Pathogenic Variation among Patients with COX Deficiency

We examined seven mitochondrial disease patients with muscle histopathological COX deficiency, all of whom carry no detrimental mutation on entire mtDNA sequence (Supplemental Tables S1–S7). In addition, no typical pathological abnormality was observed in all patient-derived skeletal muscle tissues other than COX deficiency (Supplemental Figure S1). On muscle histopathological COX staining, the numerical and distributional variation of COX-negative muscle fibers was observed among patients' tissues (Figure 1A); Patients 5 and 6 also exhibited completely deficient COX activity. On cytochemical COX staining, a wide variety of the decreased COX activity was also observed among patients' myoblasts (Figure 1A), showing a trend similar to muscle histopathological COX staining. BN-PAGE and immunodetection indicated that the apparently diminished band corresponding to COX holoenzyme was detected only in Patients 5 and 6, whereas the other patients showed stable COX holoenzyme organization (Figure 1B); Patients 5 and 6 also showed no COX-containing respiratory chain supramolecular architectures that were essential for efficient ATP production in the mitochondrial electron transport system (Figure 1C). The assembly of the other respiratory chain complexes was unaffected in all patients. We therefore defined Patients 5

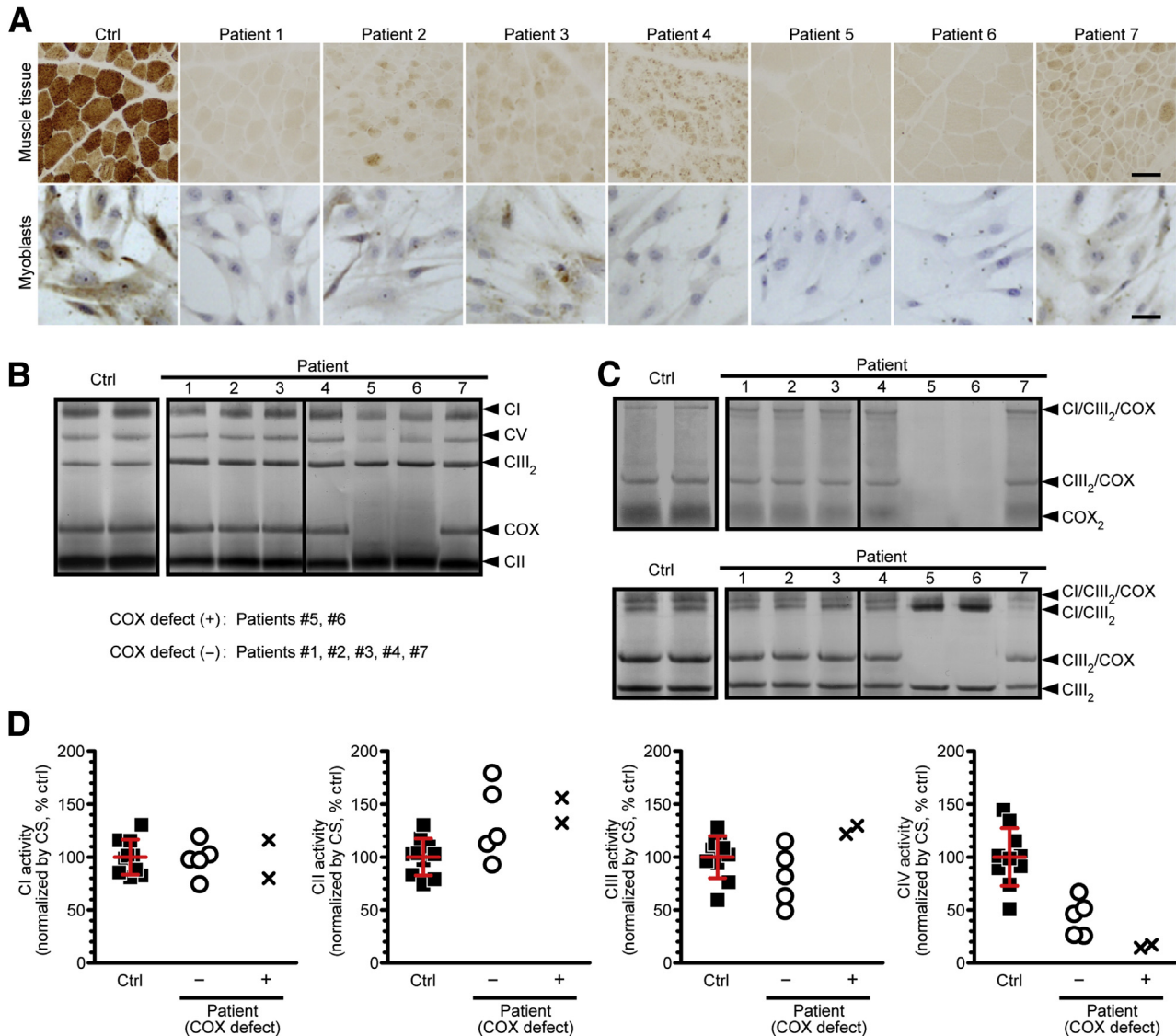


Figure 1 Molecular pathogenic variation among patients with COX deficiency. **A:** Representative images of COX staining for frozen section of skeletal muscle specimens (**top row**) and for cultured myoblasts (**bottom row**) of both controls (Ctrl) and patients. On cytochemical COX staining for cultured myoblasts, all samples were stained simultaneously with the same period. Cell nuclei were costained with hematoxylin. **B:** Immunodetection of individual respiratory chain complexes (CI, CII, CIII, COX, and CV) by BN-PAGE for the same amount of isolated mitochondrial proteins from both controls and patients. Primary antibodies used were as follows: anti-NDUFA9 (CI), anti-SDHA (CII), anti-UQCRC2 (CIII), anti-MT-CO1 (COX), and anti-ATP5B (CV). All samples were assayed at least in duplicate. **C:** Immunodetection of respiratory chain supercomplexes by BN-PAGE for the same amount of isolated mitochondrial proteins from both controls and patients. Primary antibodies used were as follows: anti-MT-CO1 (COX) (**top row**) and anti-UQCRC2 (CIII) (**bottom row**). All samples were assayed at least in duplicate. **D:** Enzymatic activities of individual mitochondrial respiratory chain complexes for cultured and harvested myoblasts of both controls and patients. Citrate synthase (CS) activity, as an internal marker in mitochondrial functions, was used for normalization in each sample. All samples were measured at least in duplicate and averaged. The **error bars** indicate means \pm SD of controls (**D**). $n = 10$ (**D**, controls); $n = 5$ [**D**, COX defect (-)]; $n = 2$ [**D**, COX defect (+)]. Scale bars = 50 μ m (**A**).

and 6 lacking COX holoenzyme as COX defect (+) and the other patients exhibiting stable COX holoenzyme as COX defect (-). Enzymatic activities of mitochondrial respiratory chain complexes revealed that COX activity in all patients was significantly decreased when compared with controls (**Figure 1D**); Patients 5 and 6 as COX defect (+) also displayed lower biochemical COX function. The other respiratory chain complex activities in all patients were almost within normal range, except for relatively higher complex II

activity, probably because of functional compensation in mitochondrial oxidative phosphorylation. From molecular diagnostic aspects in mitochondrial respiratory chain complexes, we concluded that all patients used in this study must be isolated COX deficiency.

Two-dimensional BN-PAGE/SDS-PAGE implied that the apparent loss of COX holoenzyme found only in Patients 5 and 6 was because of drastically decreased amounts of all COX structural subunits when compared with other

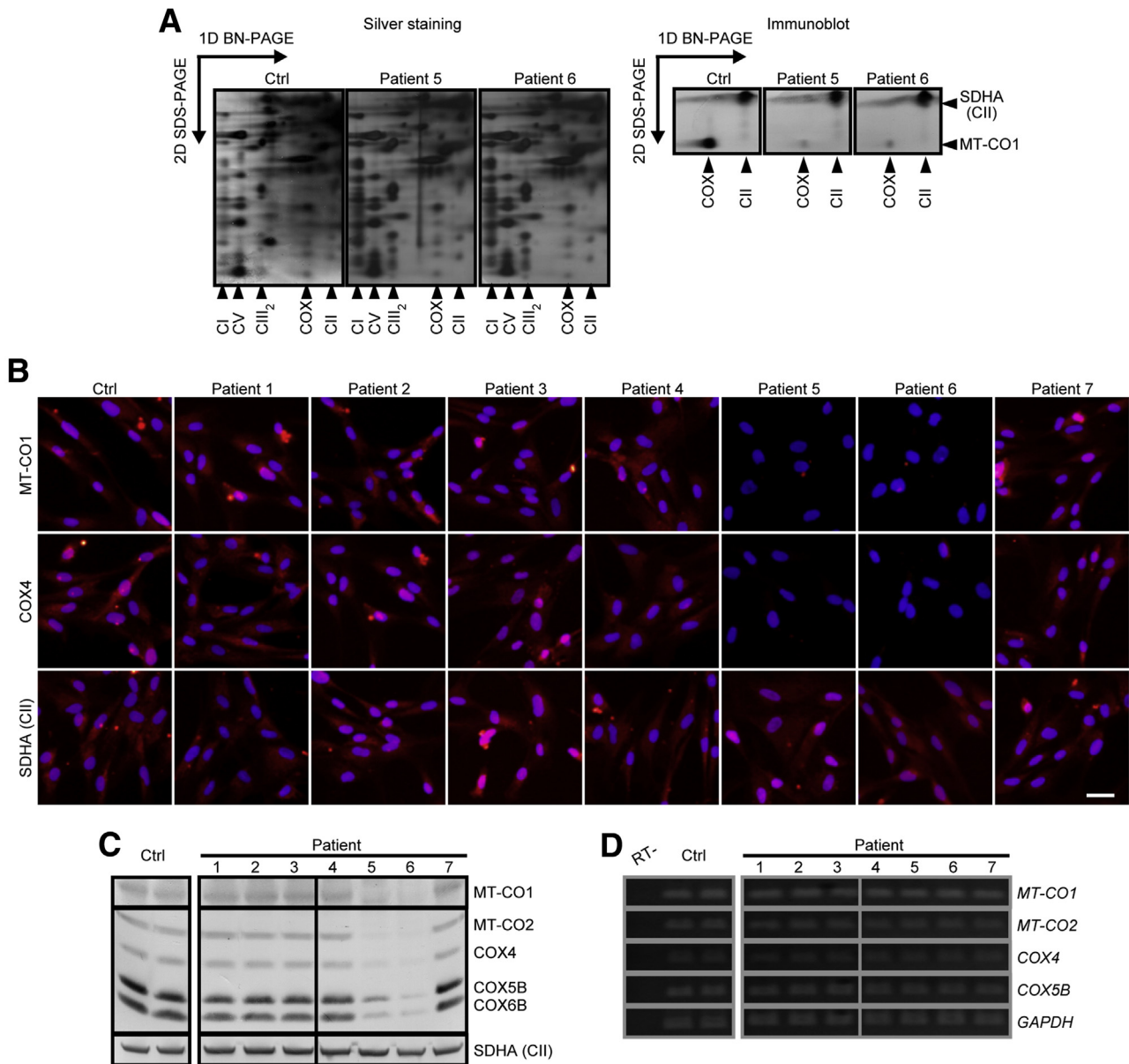


Figure 2 COX holoenzyme disorganization, found only in Patients 5 and 6, originates in the decreased protein levels, but not in mRNA levels, of each structural subunit. **A:** Visualization of all structural components in respiratory chain complexes by two-dimensional blue native PAGE (BN-PAGE)/SDS-PAGE and silver staining for the same amount of isolated mitochondrial proteins from both controls (Ctrl) and Patients 5 and 6 as COX defect (+). Immunodetection against MT-CO1 (COX) and SDHA (CII) was also shown. All samples were assayed at least in duplicate. **B:** Representative images of immunocytochemistry against MT-CO1 [COX, mitochondrial DNA (mtDNA) encoded], COX4 [COX, nuclear DNA (nDNA) encoded], and SDHA (CII) for cultured myoblasts of both controls and patients. Cell nuclei were costained with Hoechst 33342 (blue). **C:** Protein expression levels in COX structural subunits of MT-CO1 (mtDNA encoded), MT-CO2 (mtDNA encoded), COX4 (nDNA encoded), COX5B (nDNA encoded), and COX6B (nDNA encoded) by SDS-PAGE and immunodetection for the same amount of isolated mitochondrial proteins from both controls and patients. SDHA (CII) was used as an internal marker. All samples were assayed at least in duplicate. **D:** mRNA expression levels in COX structural subunits of *MT-CO1* (mtDNA encoded), *MT-CO2* (mtDNA encoded), *COX4* (nDNA encoded), *COX5B* (nDNA encoded) by RT-PCR for the same amount of extracted total RNA from both controls and patients. *GAPDH* was used as an internal marker. RT- indicates without the addition of reverse transcriptase in RT-PCR. All samples were assayed at least in duplicate. Scale bar = 50 μm (**B**).

respiratory chain complex components (Figure 2A); it was consistent with the results of immunocytochemistry against both COX structural subunits of mtDNA-encoded MT-CO1 and nDNA-encoded COX4 (Figure 2B). In fact, significantly lower protein expression levels of several COX structural subunits were confirmed only in Patients 5 and 6 when compared with controls and the other patients

exhibiting stable COX holoenzyme organization (Figure 2C). However, no significant alteration in mRNA expression levels was observed in all patients when compared with controls (Figure 2D). These results suggest that COX holoenzyme disorganization, found only in Patients 5 and 6, originates in the decreased protein levels, but not in mRNA levels, of each COX structural subunit.

Severely Impaired COX Holoenzyme Integrity Triggers the Deteriorated Mitochondrial and Cellular Homeostasis, but Does Not Affect Skeletal Muscle Development

To further investigate the influences of severely impaired COX holoenzyme integrity on mitochondrial and cellular homeostasis, we added cell-based functional analysis in all patients. The decreased ATP level was observed only in Patients 5 and 6 as COX defect (+) when compared with controls and the other patients exhibiting stable COX holoenzyme organization (Figure 3A). Interestingly, the increased oxidative stress level (Figure 3, B and D) and the damaged membrane potential level (Figure 3, C and E) were

both markedly detected only in Patients 5 and 6 as COX defect (+), whereas the other patients showed no significant alteration in mitochondrial functions when compared with those of controls. These results demonstrate that COX holoenzyme disorganization can strongly induce several mitochondrial dysfunctions.

Among patients' myoblast lines, Patients 5 and 6 as COX defect (+) exhibited significantly deteriorated proliferative potential in living cells (Figure 4A); it was consistent with the results of growth rate (Figure 4B) and doubling time (Figure 4B). Remarkably, some senescence-associated β -galactosidase-positive senescent cells (Figure 4C) and caspase 3-positive apoptotic cells (Figure 4D) were also detected only in Patients 5 and 6 as COX defect (+), even

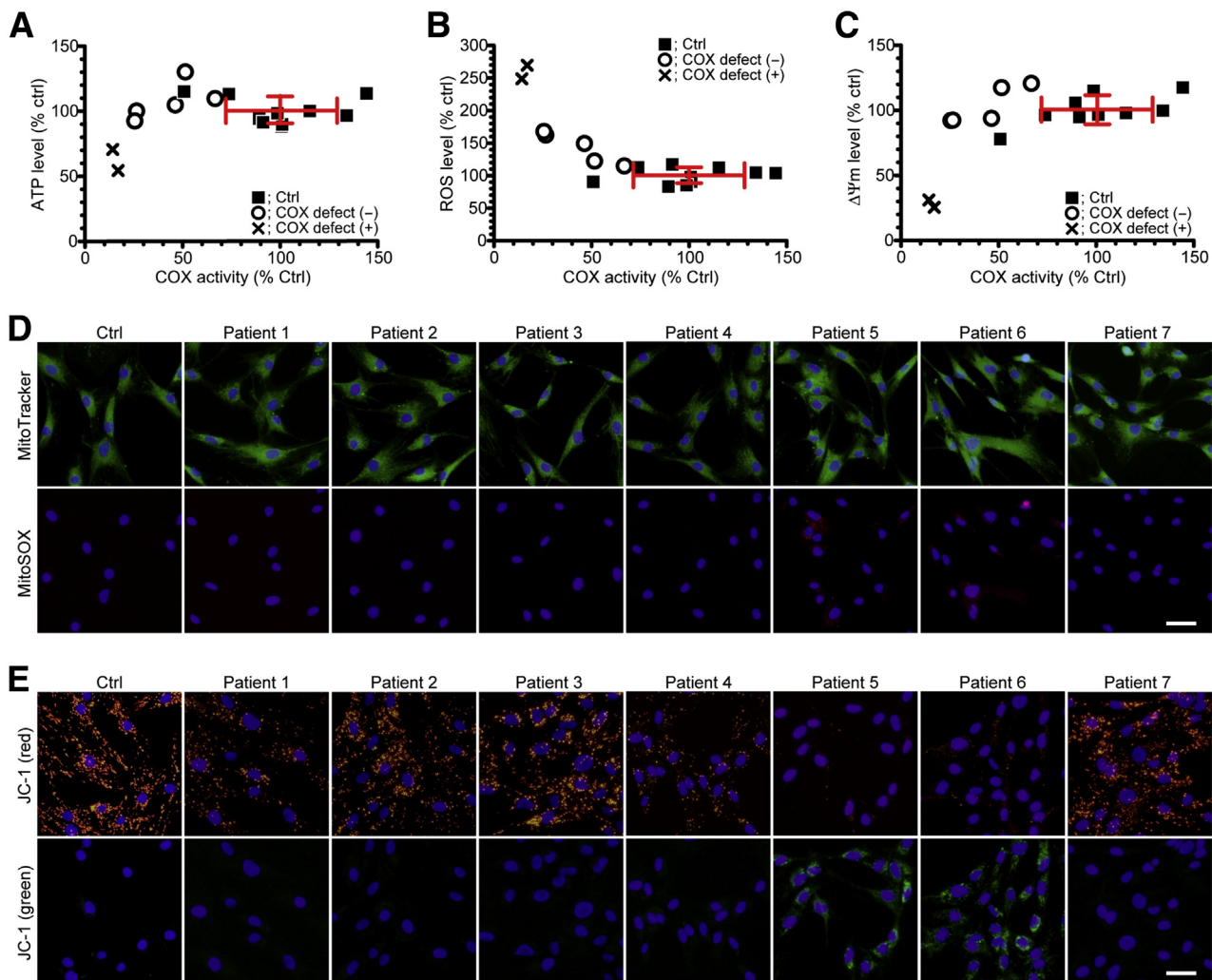


Figure 3 Severely impaired COX holoenzyme integrity triggers mitochondrial dysfunctions. **A:** Relationship between COX activity and ATP level for cultured and harvested myoblasts of both controls (Ctrl) and patients. All samples were measured at least in duplicate and averaged. **B:** Relationship between COX activity and oxidative stress [reactive oxygen species (ROS)] level for cultured myoblasts of both controls and patients. All samples were measured at least in duplicate and averaged. **C:** Relationship between COX activity and membrane potential ($\Delta\Psi_m$) level for cultured myoblasts of both controls and patients. All samples were measured at least in duplicate and averaged. **D:** Representative images of the intracellular localization of MitoTracker (green) or MitoSOX (red) for cultured myoblasts of both controls and patients. Cell nuclei were costained with Hoechst 33342 (blue). **E:** Representative images of the intracellular localization of JC-1 monomer (green) or aggregates (red) for cultured myoblasts of both controls and patients. Cell nuclei were costained with Hoechst 33342 (blue). The error bars indicate means \pm SD of controls (A–C). $n = 10$ (A–C, controls); $n = 5$ [A–C, COX defect (-)]; $n = 2$ [A–C, COX defect (+)]. Scale bars = 50 μ m (D and E).

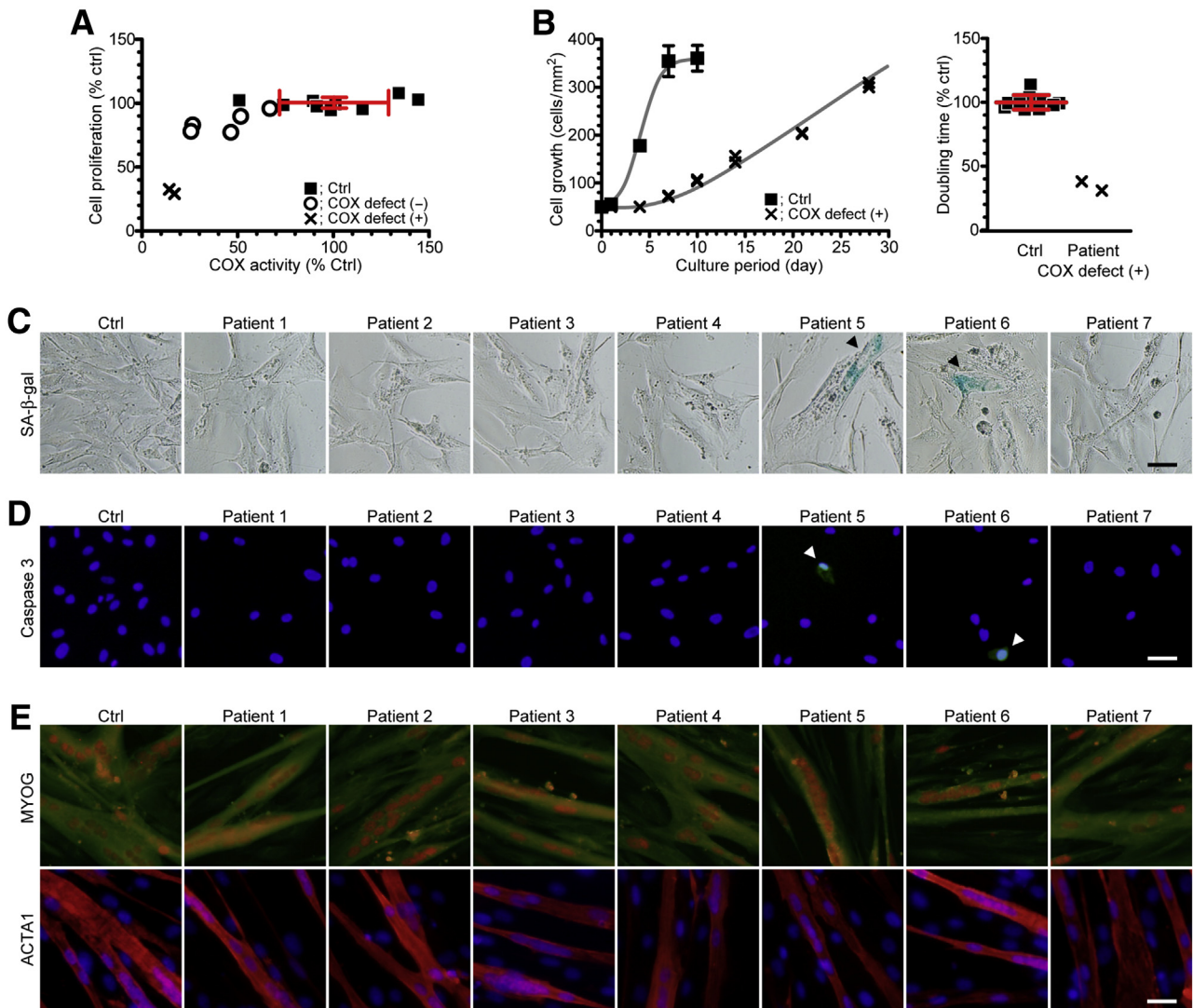


Figure 4 Severely impaired COX holoenzyme integrity also induces cellular dysfunctions, but does not affect skeletal muscle development. **A:** Relationship between COX activity and cellular proliferation potential (bromodeoxyuridine assay) for cultured myoblasts of both controls (Ctrl) and patients. All samples were measured at least in duplicate and averaged. **B:** Cellular growth rate for cultured myoblasts of both controls and Patients 5 and 6 as COX defect (+). The estimated doubling time in each sample was also shown. All samples were measured at least in duplicate and averaged. **C:** Representative images of cellular senescence for cultured myoblasts of both controls and patients. **Arrowheads** indicate senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal)—positive senescent cells. All samples were stained simultaneously with the same period. **D:** Representative images of apoptotic cell death for cultured myoblasts of both controls and patients. **Arrowheads** indicate caspase 3—positive apoptotic cells (green). Cell nuclei were costained with Hoechst 33342 (blue). **E:** Representative images of immunocytochemistry against skeletal muscle tissue—specific markers of myogenin (MYOG) and actin, α 1, skeletal muscle (ACTA1) for differentiated myotubes of both controls and patients. On MYOG immunostaining, mitochondria were costained with MitoTracker (green). On ACTA1 immunostaining, cell nuclei were costained with Hoechst 33342 (blue). The **error bars** indicate means \pm SD of controls (**A** and **B**). $n = 10$ (**A** and **B**, controls); $n = 5$ [**A**, COX defect (-)]; $n = 2$ [**A** and **B**, COX defect (+)]. Scale bars = 50 μ m (**C–E**).

under stable cell growth condition. Nevertheless, no apparent difference in *in vitro* differentiation propensity of myoblasts into myotubes was confirmed in all patients when compared with controls, which was determined by the results of immunocytochemistry against skeletal muscle tissue-specific markers of myogenin and actin, α 1, skeletal muscle (Figure 4E). These results demonstrate that mitochondrial dysfunctions triggered by COX holoenzyme disorganization can induce widespread cellular dysfunctions, but cannot affect skeletal muscle development in patients. The data presenting mitochondrial and cellular

biochemical diagnosis in each patient are summarized in Table 1.

Discussion

In this study, we characterized disease phenotypic differences among patients exhibiting mitochondrial diseases with muscle histopathological COX deficiency by using a comprehensive functional analysis in mitochondria and cells. We demonstrated that widespread mitochondrial and cellular dysfunctions were actually dominated, at least in

Table 1 Mitochondrial and Cellular Biochemical Diagnosis in Each Patient with Muscle Histopathological COX Deficiency

Patient no.	COX function*	COX structure	ATP level*	ROS level*	$\Delta\Psi_m$ level*	Cellular proliferation*	Cellular senescence	Cellular apoptosis	Cellular differentiation
10 Controls	100.0 \pm 27.2	Normal	100.0 \pm 10.3	100.0 \pm 12.2	100.0 \pm 11.2	100.0 \pm 3.9	ND	ND	Normal
1	26.5	Normal	100.2	162.5	92.5	83.1	ND	ND	Normal
2	46.4	Normal	104.8	149.6	93.9	77.3	ND	ND	Normal
3	51.5	Normal	130.2	122.6	117.6	89.8	ND	ND	Normal
4	25.6	Normal	92.6	168.2	92.3	78.1	ND	ND	Normal
5	14.3	ND	70.7	248.9	31.1	32.5	Detected	Detected	Normal
6	17.1	ND	54.4	269.8	25.6	29.1	Detected	Detected	Normal
7	66.9	Normal	109.7	115.2	120.8	96.0	ND	ND	Normal

COX, cytochrome *c* oxidase; ND, not detected; ROS, reactive oxygen species; $\Delta\Psi_m$, membrane potential.

*Values are expressed as the percentage against the mean value of 10 controls.

part, by the aberrant COX holoenzyme organization, possibly underlying the variation and the severity in clinical phenotypes of patients. According to these results, we also think it reasonable to classify two obviously different severities in molecular diagnostic criteria of COX deficiency (Figure 5): structurally stable, but functionally mild/moderate defect and severe functional defect with the disrupted COX holoenzyme structure, followed by several mitochondrial and cellular dysfunctions. Patients 5 and 6 are

categorized as histopathologically and biochemically severe COX deficiency because of COX holoenzyme disorganization, which must be caused by genetic defects in COX-associating genes. On the other hand, the other patients may be affected by functional abnormality of COX holoenzyme itself or by other unknown physiological abnormalities to apparently induce muscle histopathological COX deficiency as secondary clinical phenotypes. In these cases, it is speculated that disease-causative mutations of muscle

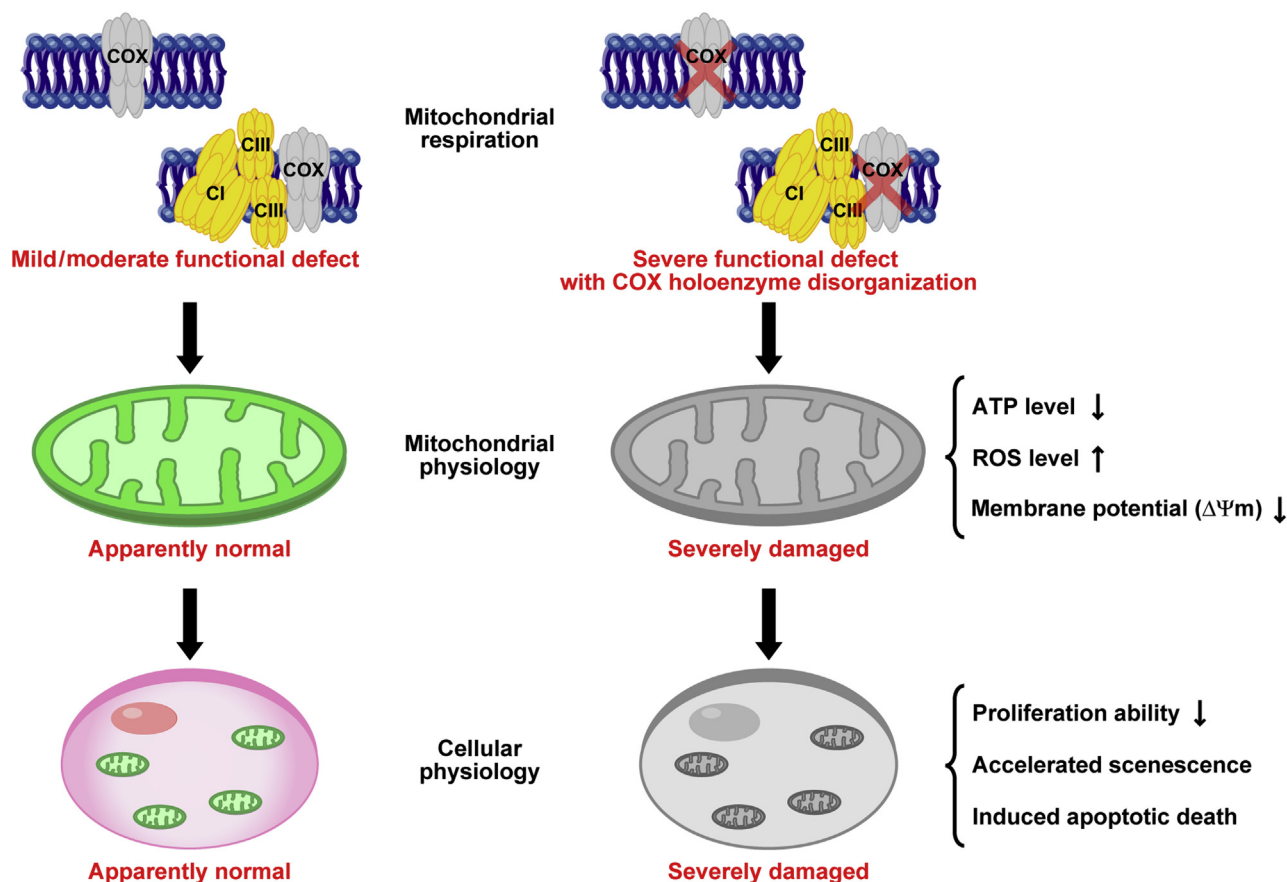


Figure 5 Mitochondrial and cellular phenotypic variation in COX deficiency: A graphical summary. Our *in vitro* diagnostic approaches successfully demonstrate two obviously different severities in molecular diagnostic criteria of COX deficiency: **left column**, structurally stable, but functionally mild/moderate defect; and **right column**, severe functional defect with the disrupted COX holoenzyme structure, followed by several mitochondrial and cellular dysfunctions.

histopathological COX deficiency patients exhibiting stable COX holoenzyme organization may be in non-COX-associating genes. Therefore, our proposed molecular diagnostic criteria would also be suggestive for effectively exploring the candidate genes, which are responsible for patient-specific pathology, by using next-generation sequencing technology.

The molecular pathomechanism of biochemically severe COX deficiency is summarized as follows: Genetic defects in any COX-associating genes can induce the aberrant COX holoenzyme organization,¹ and the synthesized but the un-assembled COX structural subunits are gradually degraded by some mitochondrial metalloproteases to prevent their accumulation in mitochondrial inner membrane.¹⁸ That is why lower protein expression levels of several COX structural subunits, despite their stable mRNA syntheses, were observed only in Patients 5 and 6 lacking COX holoenzyme. COX holoenzyme disorganization can induce not only its severe functional defect but also the diminished assembly to form COX-containing respiratory chain supramolecular architectures. In fact, the importance of COX holoenzyme in respiratory chain supercomplexes has been reported,¹⁹ and the optimized protein ratio of each respiratory chain complex is critical for their supramolecular assembly formation, allowing much higher electron transfer rates in mitochondrial oxidative phosphorylation.²⁰ Thus, significant loss of COX holoenzyme induces drastically decreased activity in the production of ATP and thermal energy caused by an insufficient proton electrochemical gradient between mitochondrial matrix and intermembrane space. Mitochondrial respiratory chain complexes are also generally known to increase oxidative stress with their functional defects, and in this case, severely impaired COX holoenzyme integrity seems most likely to affect the increased oxidative stress level. To date, it still remains uncertain whether approximately 2.5-fold increase of oxidative stress level observed only in Patients 5 and 6 lacking COX holoenzyme is substantially harmful in *in vivo* mitochondrial physiology. However, the increased oxidative stress level may trigger the accumulated oxidative damages to other mitochondrial enzymes, substrates, lipids, and mtDNA, all of which lead to the depressed overall mitochondrial functions and induce premature senescence at a cell level. In addition, the damaged membrane potential level implies two major mitochondrial abnormalities: transport machinery defects of proteins and substrates essential for mitochondrial biogenesis and bioenergetics and the accelerated leak of freely mobile cytochrome *c* molecules, as a caspase activator, in mitochondrial electron transport system, followed by the induced apoptotic signaling. Therefore, widespread cellular dysfunctions, including the deteriorated cellular growth, the accelerated cellular senescence, and the induced apoptotic cell death, all of which were observed only in Patients 5 and 6, are clearly explained by primary COX holoenzyme disorganization and the following secondary mitochondrial dysfunctions.

The relationships between the molecular abnormalities in mitochondrial respiratory chain complexes and their negative contributions to mitochondrial and cellular functions have been proved to be essential for better understandings in mitochondrial medicine. In particular, most parts of mitochondrial diseases are caused by heteroplasmic mutations in mtDNA (wild-type mtDNA and mutant mtDNA coexist within a single cell) and present a wide variety of clinical spectrum among patients, probably because of variations in mutant mtDNA proportions at each tissue and organ level. To date, patients' fibroblasts are mainly used for biochemical analysis. However, such fibroblasts do not always exhibit mitochondrial respiratory defects, most likely because of relatively lower mutant mtDNA proportions than those in the affected tissues and organs of some patients. Although this study does not include mitochondrial disease patients with muscle histopathological COX deficiency, those carrying heteroplasmic mtDNA mutations, our *in vitro* diagnostic approaches by using patients' myoblasts may be more advantageous, because cells derived from the affected tissues and organs can faithfully recapitulate their cell type-specific pathophysiology in a patient-specific manner. We also believe the use of nonviral, integration-free cellular reprogramming technology^{21,22} to generate disease-relevant induced pluripotent stem cells from patients' fibroblasts or peripheral blood cells can greatly help us to identify bona fide pathomechanism of complex, severe clinical phenotypes in mitochondrial diseases with multiple organ involvements. In fact, several groups and we have recently reported patient-specific induced pluripotent stem cells, those carrying various types of pathogenic mutant mtDNAs as *in vitro* human mitochondrial disease models,^{23–29} toward possible applications in induced pluripotent stem cell-based drug discovery and regenerative therapeutics.³⁰

Conclusions

Our cell-based *in vitro* diagnostic approaches documented herein would hold promise for enormous contributions to clinical research for future personalized medicine, which is based on the intrinsic molecular and cellular pathogenic features of each patient exhibiting various types of mitochondrial diseases, including other respiratory chain complex deficiencies and other mitochondrial metabolic enzyme deficiencies.

Acknowledgments

We thank all patients and their families for participating in this study; Mayuko Kato and Junko Takei (National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan) for helpful experimental assistance; and Dr. Ichizo Nishino (National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan) for providing clinical data of muscle histopathology in each patient.

H.H. conceived the study, designed and performed experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript; and Y.G. analyzed and interpreted data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.09.003>.

References

- Shoubridge EA: Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* 2001, 106:46–52
- Massa V, Fernandez-Vizarrá E, Alshahwan S, Bakhsh E, Goffrini P, Ferrero I, Mereghetti P, D'Adamo P, Gasparini P, Zeviani M: Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Am J Hum Genet* 2008, 82:1281–1289
- Indrieri A, van Rahden VA, Tiranti V, Morleo M, Iaconis D, Tammaro R, D'Amato I, Conte I, Maystadt I, Demuth S, Zvulunov A, Kutsche K, Zeviani M, Franco B: Mutations in COX7B cause microphthalmia with linear skin lesions, an unconventional mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 2012, 91:942–949
- Keightley JA, Hoffbuhr KC, Burton MD, Salas VM, Johnston WS, Penn AM, Buist NR, Kennaway NG: A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nat Genet* 1996, 12:410–416
- Comi GP, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N, Moggio M, Ausenda CD, Taanman JW, Scarlato G: Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol* 1998, 43:110–116
- Hanna MG, Nelson IP, Rahman S, Lane RJ, Land J, Heales S, Cooper MJ, Schapira AH, Morgan-Hughes JA, Wood NW: Cytochrome c oxidase deficiency associated with the first stop-codon point mutation in human mtDNA. *Am J Hum Genet* 1998, 63:29–36
- Bruno C, Martinuzzi A, Tang Y, Andreu AL, Pallotti F, Bonilla E, Shanske S, Fu J, Sue CM, Angelini C, DiMauro S, Manfredi G: A stop-codon mutation in the human mtDNA cytochrome c oxidase I gene disrupts the functional structure of complex IV. *Am J Hum Genet* 1999, 65:611–620
- Clark KM, Taylor RW, Johnson MA, Chinnery PF, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Andrews RM, Nelson IP, Wood NW, Lamont PJ, Hanna MG, Lightowlers RN, Turnbull DM: An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome c oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. *Am J Hum Genet* 1999, 64:1330–1339
- Rahman S, Taanman JW, Cooper JM, Nelson I, Hargreaves I, Meunier B, Hanna MG, García JJ, Capaldi RA, Lake BD, Leonard JV, Schapira AH: A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. *Am J Hum Genet* 1999, 65:1030–1039
- Tiranti V, Corona P, Greco M, Taanman JW, Carrara F, Lamantea E, Nijtmans L, Uziel G, Zeviani M: A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by Leigh-like syndrome. *Hum Mol Genet* 2000, 9:2733–2742
- Horvath R, Kemp JP, Tuppen HA, Hudson G, Oldfors A, Marie SK, Moslemi AR, Servidei S, Holme E, Shanske S, Kollberg G, Jayakar P, Pyle A, Marks HM, Holinski-Feder E, Scavina M, Walter MC, Coku J, Günther-Scholz A, Smith PM, McFarland R, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN, Hirano M, Lochmüller H, Taylor RW, Chinnery PF, Tulinius M, DiMauro S: Molecular basis of infantile reversible cytochrome c oxidase deficiency myopathy. *Brain* 2009, 132:3165–3174
- Mimaki M, Hatakeyama H, Komaki H, Yokoyama M, Arai H, Kirino Y, Suzuki T, Nishino I, Nonaka I, Goto Y: Reversible infantile respiratory chain deficiency: a clinical and molecular study. *Ann Neurol* 2010, 68:845–854
- Akanuma J, Muraki K, Komaki H, Nonaka I, Goto Y: Two pathogenic point mutations exist in the authentic mitochondrial genome, not in the nuclear pseudogene. *J Hum Genet* 2000, 45:337–341
- Tanaka M, Takeyasu T, Fuku N, Li-Jun G, Kurata M: Mitochondrial genome single nucleotide polymorphisms and their phenotypes in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1011:7–20
- Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC: Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmittochondrial cell lines. *Methods Enzymol* 1996, 264:484–509
- Schägger H: Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 2006, 1:16–22
- Wittig I, Braun HP, Schägger H: Blue native PAGE. *Nat Protoc* 2006, 1:418–428
- Arnold I, Langer T: Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1592:89–96
- Schafer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, Vonck J: Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 2006, 281:15370–15375
- Schägger H, Pfeiffer K: Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 2000, 19:1777–1783
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011, 8:409–412
- Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S: An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 2013, 31:458–466
- Fujikura J, Nakao K, Sone M, Noguchi M, Mori E, Naito M, Taura D, Harada-Shiba M, Kishimoto I, Watanabe A, Asaka I, Hosoda K, Nakao K: Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia* 2012, 55:1689–1698
- Cherry AB, Gagne KE, McLoughlin EM, Baccei A, Gorman B, Hartung O, Miller JD, Zhang J, Zon RL, Ince TA, Neufeld EJ, Lerou PH, Fleming MD, Daley GQ, Agarwal S: Induced pluripotent stem cells with a mitochondrial DNA deletion. *Stem Cells* 2013, 31:1287–1297
- Folmes CD, Martinez-Fernandez A, Perales-Clemente E, Li X, McDonald A, Oglesbee D, Hrstka SC, Perez-Terzic C, Terzic A, Nelson TJ: Disease-causing mitochondrial heteroplasmy segregated within induced pluripotent stem cell clones derived from a patient with MELAS. *Stem Cells* 2013, 31:1298–1308
- Hämäläinen RH, Manninen T, Koivumäki H, Kislin M, Otonkoski T, Suomalainen A: Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110:E3622–E3630
- Kodaira M, Hatakeyama H, Yuasa S, Seki T, Egashira T, Tohyama S, Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Hashimoto H, Kusumoto D, Kunitomi A, Takei M, Kashimura S, Suzuki T, Yozu G, Shimojima M, Motoda C, Hayashiji N, Saito Y, Goto Y, Fukuda K: Impaired respiratory function in MELAS-induced pluripotent stem cells with high heteroplasmy levels. *FEBS Open Bio* 2015, 5:219–225
- Hatakeyama H, Katayama A, Komaki H, Nishino I, Goto Y: Molecular pathomechanisms and cell-type-specific disease phenotypes of

- MELAS caused by mutant mitochondrial tRNA(Trp). *Acta Neuropathol Commun* 2015, 3:52
29. Ma H, Folmes CD, Wu J, Morey R, Mora-Castilla S, Ocampo A, Ma L, Poulton J, Wang X, Ahmed R, Kang E, Lee Y, Hayama T, Li Y, Van Dyken C, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Koski A, Mitalipov N, Amato P, Wolf DP, Huang T, Terzic A, Laurent LC, Izpisua Belmonte JC, Mitalipov S: Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature* 2015, 524:234–238
30. Hatakeyama H, Goto Y: Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations and mitochondrial diseases: toward iPSC-based disease modeling, drug discovery, and regenerative therapeutics. *Stem Cells* 2016, 34: 801–808

ミトコンドリア病に関する調査研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者	後藤雄一	国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第二部	部長
研 究 分 担 者	小坂 仁	自治医科大学小児科	教授
	大竹 明	埼玉医科大学小児科	教授
	北風政史	国立循環器病研究センター病院・研究開発基盤センター	部長
	古賀靖敏	久留米大学大学院医学研究科小児科学	教授
	小牧宏文	国立精神・神経医療研究センター病院小児神経診療部	医長
	佐野 輝	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科精神機能病学分野	教授
	末岡 浩	慶應義塾大学産婦人科	准教授
	田中雅嗣	東京都健康長寿医療センター臨床検査科	部長
	三牧正和	東京大学医学部小児科	講師
	山嵜達也	東京大学医学部耳鼻咽喉科	教授
	米田 誠	福井県立大学看護福祉学部	教授
研 究 協 力 者	太田成男	日本医科大学大学院医学研究科	教授
	岡崎康司	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター	教授・所長
	金田大太	大阪赤十字病院神経内科	副部長
	木村 円	国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター臨床研究支援部	室長
	杉本立夏	国立精神・神経医療研究センター病院遺伝カウンセリング室	遺伝カウンセラー
	砂田芳秀	川崎医科大学医学部神経内科	教授
	須藤 章	市立札幌病院小児科	副部長
	竹下絵里	国立精神・神経医療研究センター病院小児神経診療部	医員
	中野和俊	東京女子医科大学病院小児科	非常勤講師
	西野一三	国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部	部長
	中川正法	京都府立医科大学附属北部医療センター	病院長
	萩野谷和裕	拓桃医療療育センター・東北大学医学部小児科	副院長・臨床教授
	村山 圭	千葉県こども病院代謝科	主任医長
事 務 局	大科京子	〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1 (独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第二部 T E L 042-346-1713 F A X 042-346-1743 e-mail ohshina@ncnp. go. jp	事務員
経 理 事 務 担 当 者	松田敏宏	〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1 T E L 042-341-2712 (内線2157) F A X 042-346-1425 e-mail t-matsuda@ncnp. go. jp	財務経理部 財務経理課 第二契約係長