

治療可能なミトコンドリア病の早期診断法の開発
～原発性 CoQ10 欠乏症～

研究分担者 小坂 仁 自治医科大学 教授

研究要旨

原発性 CoQ10 欠乏症は、CoQ10 生合成に関与する酵素が欠損し、CoQ10 低値をきたす疾患で、脳症、心筋症、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群、多臓器障害など多彩な臨床症状を呈する。CoQ10 補充療法により症状の進行を抑制できることから、早期診断が重要である。従来確定診断は生検筋の CoQ10 低値の証明だが侵襲性が高いため、より侵襲性の低い皮膚線維芽細胞で定量系を構築し、早期診断につなげた。また CoQ10 の酸化還元状態がミトコンドリアの代謝状態を反映するマーカーであることから合わせて、皮膚線維芽細胞で、還元型・酸化型 CoQ10 を個別に定量する系を構築し、ミトコンドリア病患者細胞で測定した。

A. 研究目的

CoQ10 測定系の構築：原発性 CoQ10 欠乏症は、CoQ10 生合成に関与する酵素が欠損し、CoQ10 低値をきたす疾患で、脳症、心筋症、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 (SRNS)、多臓器障害など多彩な臨床症状を呈する。CoQ10 補充療法により症状の進行を抑制できることから、早期診断が重要である。確定診断は生検筋の CoQ10 低値の証明だが侵襲性が高いため、より侵襲性の低い皮膚線維芽細胞で定量系を構築し、早期診断につなげる。

② ①の CoQ10 測定系の応用：CoQ10 の酸化還元状態がミトコンドリアの代謝状態を反映するマーカーであると報告された。CoQ10 の酸化還元状態を評価することは病態解明や治療介入の糸口となると考えられるが、これまで原発性 CoQ10 欠乏症含め、ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞で還元型・酸化型 CoQ10 に着目した報告はない。そこで、皮膚線維芽細胞で、還元型・酸化型 CoQ10 を個別に定量する系を構築し、患者細胞で測定する。

B. 研究計画・方法（概要）

対象は、24 例のミトコンドリア病患者皮膚線維芽細胞（原発性 CoQ10 欠乏症 5 例、呼吸鎖複合体異常症 10 例を含む）とした。サンプルから

CoQ10 を抽出し、重水素で標識した 2H9-CoQ10 を内部標準として、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (HPLC-MS/MS) で測定した。なお還元型 CoQ10 は容易に酸化されるため、検量線の還元型 CoQ10 は酸化型 CoQ10 に還元反応を行い用事調製し、最も酸化しにくい溶媒である Ethanol を用い、さらに抗酸化剤を添加し、サンプル処理後速やかに定量した。CoQ10 実測値をクエン酸シンターゼ活性量で補正し、総（還元型+酸化型）CoQ10 値と還元型 CoQ10/総 CoQ10 比を求め、CoQ10 欠乏と細胞内 CoQ10 還元状態を評価した。

C. 研究結果.

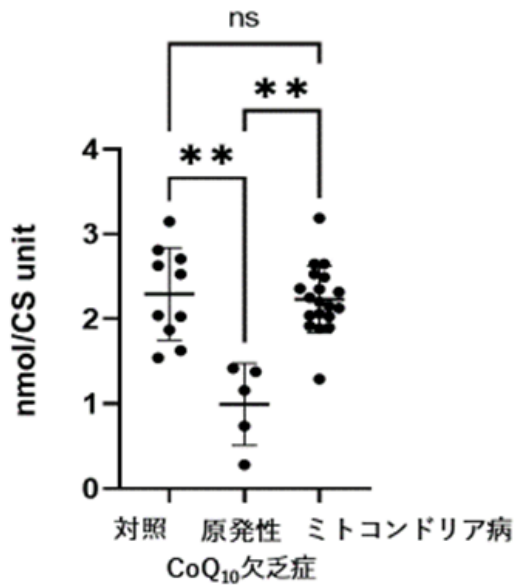


図1. 皮膚線維芽細胞の総 CoQ10 値
6例で総 CoQ10 が低下(対照の総 CoQ10 値の 70%未満)していた。
原発性 CoQ10 欠乏症は、全例で総 CoQ10 値が低下した。原発性 CoQ10 欠乏症以外のミトコンドリア病では、Kearns-Sayre 症候群(症例 19)を除き、総 CoQ10 値は低下していなかった。** $p < 0.01$ 。

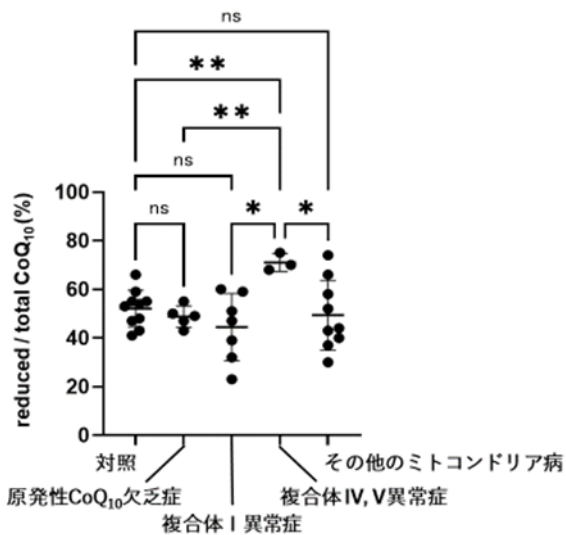


図2. 皮膚線維芽細胞の還元型 CoQ10/総 CoQ10 比の比較
原発性 CoQ10 欠乏症では、還元型 CoQ10/総 CoQ10 比は変化がみられなかった。一方、複合体 I 異常症では、3/7例で還元型 CoQ10/総 CoQ10 比が低下(対照の<80%)し、複合体 IV、V 異常症では、全例で還元型 CoQ10/総 CoQ10 比が増加

(対照の 120%)した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、NS; Not significant。

皮膚線維芽細胞の還元型・酸化型 CoQ10 の個別定量系を確立した。皮膚線維芽細胞の総 CoQ10 値は、原発性 CoQ10 欠乏症 (n=5)、原発性 CoQ10 欠乏症以外のミトコンドリア病 (n=19)、対照 (n=10) において、それぞれの 1.00 ± 0.19 (nmol / CS unit、平均±標準偏差)、 2.23 ± 0.26 、 2.30 ± 0.24 であった。原発性 CoQ10 欠乏症では対照より有意に低下したが ($p < 0.01$)、原発性 CoQ10 欠乏症以外のミトコンドリア病では低下はみられなかった ($p = 0.98$)。原発性 CoQ10 欠乏症は、全例で総 CoQ10 値低下(対照の総 CoQ10 値の 70%未満)がみられた。また、還元型 CoQ10/総 CoQ10 比について、原発性 CoQ10 欠乏症 (n=5)、複合体 I 異常 (n=7)、複合体 IV・V 異常 (n=3)、その他のミトコンドリア病 (n=9)、対照 (n=10) において、それぞれ $49 \pm 7\%$ (平均±標準偏差)、 $44 \pm 7\%$ 、 $71 \pm 3\%$ 、 $49 \pm 4\%$ 、 $52 \pm 1\%$ であった。原発性 CoQ10 欠乏症では、対照と比較して比の変化がみられなかったが ($p=0.95$)、複合体 IV・V 異常では比は増加した ($p=0.0028$)。

D. 考察

皮膚線維芽細胞の総 CoQ10 値は、原発性 CoQ10 欠乏症の全例で有意に低下しており、構築した測定系は本症の診断に有用と考えられた。今後、国内外の疑い症例を解析し、早期診断・治療につなげる。また、今回ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞で、初めて還元型 CoQ10/総 CoQ10 比を測定した。原発性 CoQ10 欠乏症では比の変化がなかったが、複合体異常症では比が上昇または低下した。総 CoQ10 が低下しなくとも、還元型 CoQ10/総 CoQ10 比の変化を伴う病態が存在すると考えられた。さらに比の変化と呼吸鎖酵素活性との関連も示唆された。

E. 結論

皮膚線維芽細胞の還元型・酸化型 CoQ10 個別測定系を構築し、総 CoQ10 値と還元型 CoQ10/総 CoQ10 比の評価が可能になった。本測定法は、原発性 CoQ10 欠乏症の診断と迅速な治療に貢

献でき、さらに CoQ10 還元状態評価のバイオマーカーとしての応用や病態解析にも有用と考えられる。

F 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimozawa, H., T. Sato, H. Osaka, A. Takeda, A. Miyauchi, N. Omika, Y. Yada, Y. Kono, K. Murayama, Y. Okazaki, Y. Kishita and T. Yamagata (2022). "A Case of Infantile Mitochondrial Cardiomyopathy Treated with a Combination of Low-Dose Propranolol and Cibenzoline for Left Ventricular Outflow Tract Stenosis." Int Heart J **63**(5): 970-977.
- 2) Watanabe, C., H. Osaka, M. Watanabe, A. Miyauchi, E. F. Jimbo, T. Tokuyama, H. Uosaki, Y. Kishita, Y. Okazaki, T. Onuki, T. Ebihara, K. Aizawa, K. Murayama, A. Ohtake and T. Yamagata (2023). "Total and reduced/oxidized forms of coenzyme Q(10) in fibroblasts of patients with mitochondrial disease." Mol Genet Metab Rep **34**: 100951.

2. 学会発表

- 1) Chika Watanabe, Hitoshi Osaka, Miyuki Watanabe, Akihiko Miyauchi, Eriko F. Jimbo, Yoshihito Kishita, Yasushi Okazaki, Kei Murayama, Akira Ohtake, Takanori Yamagata
The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases November 24th, 2022, Kumamoto

H. 知的財産権

なし