

研究課題別評価

1 研究課題名:ミトコンドリア病の病態発現機構の解明と遺伝子治療法の探索

2 研究者氏名:中田 和人

3 研究の狙い:

欠失突然変異型や点突然変異型のミトコンドリア DNA(mtDNA)の蓄積はミトコンドリア脳筋症(ミトコンドリア病)の原因となり、さらに最近では、糖尿病や個体老化、パーキンソン病やアルツハイマー病等の原因となる可能性が強く示唆されている。しかし、突然変異型 mtDNA とこれらの多様な病態発症の因果関係は立証されておらず、さらに、その詳細な病態発症機構も解明されていない。そこで本研究は、病原性欠失突然変異型 mtDNA(欠失型 mtDNA)を導入したミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウス(mito-mice)を用いて、1)欠失型 mtDNA が引き起こす多様な病態の実体を精査し、その病態発現機構を解明し、2)細胞内のミトコンドリアが機能的に単一のオルガネラとして振る舞うこと(ミトコンドリア間相互作用)を利用し、mtDNA の突然変異に起因する様々な疾患群の効果的な治療法の探索を目指すものである。

4 研究成果:

本研究の成果は、以下の3点である。

(1) mito-mice を用いたミトコンドリア機能異常による多様な病態の精査

さきがけ研究遂行以前に、欠失型 mtDNA を優位に蓄積した mito-mice は多臓器のミトコンドリア呼吸不全を呈し、これにより低体重、高乳酸血症、心伝導障害、腎不全を発症することを突き止めていた。さきがけ研究の遂行によって、欠失型 mtDNA の含有率の高い mito-mice は、難聴、運動障害、精子形成異常、骨化の異常、網膜異常を発症することが分かった。これらの多様な病態発症は欠失型 mtDNA の蓄積によって誘導されるため、その原因は欠失型 mtDNA の蓄積のみに起因すると結論できる。現在のミトコンドリア遺伝子疾患に関する研究は患者研究に依存するところが多く、その基礎研究として患者由来の培養細胞を用いた体細胞遺伝学的研究がなされているに過ぎない。このような状況の中で、mito-mice が呈する多様な臨床症状の列挙は、実際の臨床における確定診断の一助として極めて重要な知見となる。

一方、欠失型 mtDNA の含有率の高い mito-mice は、これまでの報告とは異なり、糖尿病を発症しないことが分かった。特筆すべきは、欠失型 mtDNA の含有率が増加すると、インスリン分泌が亢進し、血糖値が低下してしまうのである。また、このようなエネルギー欠損に陥った mito-mice は糖負荷後に高乳酸血症になってしまう。つまり、エネルギー欠損に陥った mito-mice では、インスリン分泌を亢進させ、解糖系による ATP 産生を増強させるため、低血糖となり、結果として高乳酸血症に陥ってしまうと考えられる。したがって、少なくともマウスにおいては、突然変異型 mtDNA の蓄積は糖尿病発症の直接的な原因ではなく、むしろ、核ゲノムの突然変異や生活習慣に起因する糖尿病の発症を増強するような十分条件的な要因である可能性を示唆している。この結果だけでヒトのミトコンドリア糖尿病の再検討を提唱するわけにはいかないが、少なくともこの結果は、核—ミトコンドリア両ゲノム変異による新たな病態発症調節機構の存在を示唆しており、新たな研究分野の創出が十分に期待できると考えられる。

(2) ミトコンドリア相互作用と病態発症調節機構

ミトコンドリア病では、変異型 mtDNA が優位に蓄積しない限り、病態発症は起こらない。つま

り、病態発症には変異型 mtDNA の閾値効果が存在している。この実体を突き止めるため、正常な *M. spretus* 型の mtDNA を有した受精卵(正常なミトコンドリア呼吸機能を有する)に *M. m. domesticus* 由来の欠失型 mtDNA 含有するミトコンドリア(呼吸不全を呈する)を導入し、新たな mito-mice を作製した。このマウスの組織を構成する細胞の個々のミトコンドリアは、呼吸機能を有する宿主由来のミトコンドリアと呼吸不全のドナー由来のミトコンドリアがモザイクに存在するはずである。しかし、mito-mice の臓器の細胞は、一様に呼吸機能を有するミトコンドリアのみ、または、一様に呼吸不全のミトコンドリアのみを含有していた。さらに、呼吸機能を有するミトコンドリアのみを含有する細胞でさえ、ドナー由来の *M. m. domesticus* の欠失型 mtDNA が検出された。これらの結果は、ドナー由来のミトコンドリアと宿主由来のミトコンドリアの融合とそれに続く物質の交換、すなわちミトコンドリア間相互作用を想定してはじめて説明することができる。つまり、ミトコンドリア内の *M. m. domesticus* の欠失型 mtDNA の割合が閾値を超えない場合は、存在する *M. spretus* の野生型 mtDNA から転写される遺伝子産物のおかげでミトコンドリア呼吸機能も正常に近い状態を保つことができる。しかし *M. m. domesticus* の欠失型 mtDNA が閾値を超えると、*M. spretus* の野生型 mtDNA から転写される遺伝子産物が減少し、急激に全てのミトコンドリアの呼吸機能が失われてしまうのである。この全てのミトコンドリアの機能喪失こそが、様々な病態発症を引き起こす原動力となるのである。

このミトコンドリア間相互作用を検証するために作製した mito-mice では、個体内に含有されている mtDNA 分子の識別が可能である。これを利用して mtDNA の分子間組換えの解析を行ったところ、ドナーミトコンドリアに含まれていた *M. m. domesticus* の欠失型 mtDNA 分子内に宿主ミトコンドリアに含まれているはずの *M. spretus* の mtDNA の塩基配列が存在する、組換え型 mtDNA 分子を見出すことができた。このような分子の存在は、明らかに宿主とドナーのミトコンドリア間で物質交換が起こっていることを示している証拠となる。

(3) ミトコンドリア間相互作用を利用した遺伝子治療法の探索

ミトコンドリア間相互作用の存在は、新規治療法の開発の可能性を示唆している。つまり、欠失型 mtDNA を多含する受精卵であっても、野生型 mtDNA や欠失変異によって喪失している塩基配列を有する DNA 分子を持つミトコンドリアを導入できれば、相互作用によって、ミトコンドリア呼吸機能を相補できるわけである。しかし、現時点では、二重の生体膜によって完全に閉ざされたミトコンドリアマトリックス内に外来性の DNA 分子を導入する手段がないため、具体的な方法論の確立には至らなかった。

1つの治療方法としては、欠失型 mtDNA の含有率の高い mito-mice の受精卵の前核を、野生型 mtDNA を有する受精卵に核移植によって導入することが極めて現実的である。もちろん、mito-mice の受精卵の前核移植では核の周辺に存在する欠失型 mtDNA を含有するミトコンドリアも同時に移植されてしまうが、移植先の野生型 mtDNA を有するミトコンドリアと相互作用し、呼吸不全を回避できると考えられる。

5 自己評価:

提案した研究課題には大きくわけて2つの課題があった。1つは、mtDNA の突然変異に起因する多様な病態を枚挙し、その病態発症機構を明らかにすることであった。この課題に関しては、当初の目的を達成することができたと考えている。特に、細胞内の個々のミトコンドリアが分裂/融合を介して内容物を交換(ミトコンドリア間相互作用)することで、病態発症が制御されている事実、さらにはこの物質交換は mtDNA の遺伝子産物だけでなく、mtDNA も交換され組換えを起こすという事実を明確にできたことは特筆に値すると考えている。もう1つ課題である治療法の探索に関しては、具体的な治療法の開発ができず、前述のミトコンドリア間相互作用を利用して新たな治療法の開発が可能であるという提唱にとどまってしまった。この点は、研究立案段階や実際の研究

遂行段階で研究の方向性を明確に決定できなかったことが原因と考えている。

さきがけ研究では研究者個人の研究立案、実行、評価を最優先して頂けるため、研究者自身の questions に対する answers を得るためには最良の研究環境であった。このような研究環境を与えて頂いた領域代表の関谷先生、アドバイザーの先生方、領域事務所の皆様に心より感謝申し上げます。また、楽しい時間をともに過ごした本領域の仲間にも多くの助言を頂き、また多くの刺激も受けました、ありがとう。

6 研究総括の見解:

変異ミトコンドリアDNAを導入した疾患モデルマウス(mito - mice)の病態解析から、細胞内のミトコンドリアの分裂、融合を介して内容物を交換していることを明らかにしたことは優れた成果と評価できる。一方、モデルマウスを用いた治療法の開発に関しては、ミトコンドリアへの外来遺伝子導入の難しさから不発に終わったが、今後の新たな切り口での挑戦を期待したい。

7 主な論文等:

原著論文

1. A. Sato*, K. Nakada*, M. Akimoto, K. Ishikawa, T. Ono, H. Shitara, H. Yonekawa, and J.-I. Hayashi (2005): Rare creation of recombinant mtDNA haplotypes in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press. *These authors contributed equally.
2. K. Nakada*, A. Sato*, H. Sone, A. Kasahara, K. Ikeda, Y. Kagawa, H. Yonekawa, and J.-I. Hayashi (2004): Accumulation of pathogenic Δ mtDNA induced deafness but not diabetic phenotypes in mito-mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323: 175-184. *These authors contributed equally.
3. A. Sato, K. Nakada, H. Shitara, H. Yonekawa, and J.-I. Hayashi (2004): *In vivo* interaction between mitochondria carrying mtDNAs from different mouse species. *Genetics*, 167: 1855-1861.
4. C.-S. Chen, R. Matsuoka, S. Arai, Y. Momiyama, H. Murakami, S.-y. Kuno, K. Ishikawa, K. Nakada, M. Tawata, and J.-I. Hayashi (2004): Determination of normal ranges of mitochondrial respiratory activities by mtDNA transfer from 54 human subjects to mtDNA-less HeLa cells for identification of the pathogenicities of mutated mtDNAs. *J. Biochem.*, 135: 237-243.
5. T. Ono, Y. Kasahara, K. Nakada, and J.-I. Hayashi (2004): Presence of interaction but not complementation between human mtDNAs carrying different mutations within a *tRNA^{Leu(UUR)}* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314: 1107-1112.
6. K. Nakada, T. Ono, and J.-I. Hayashi (2002): A novel defense system of mitochondria in mice and human subjects for preventing expression of mitochondrial dysfunction by pathogenic mutant mtDNAs. *Mitochondrion*, 2: 59-70.

総説

1. 中田和人、林純一:「ミトコンドリア病の研究に有効なモデル細胞とモデルマウス」*Molecular Medicine* 41:306-312 (2004)。
2. 中田和人、林純一:「ミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウスとミトコンドリア病」*実験医学* 21:1724-1729(2003)。
3. 中田和人、小野朋子、林純一:「ミトコンドリア連携説」*遺伝子医学* 7:121-124(2003)。
4. 中田和人、井上貴美子、小野朋子、林純一:「ミトコンドリア遺伝子疾患の細胞・動物モデル」*脳の科学* 25:349-356 (2003)。
5. 中田和人、井上貴美子、小野朋子、林純一:「ミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウスの病

態発症とミトコンドリア連携説」蛋白質核酸酵素 増刊号 48:487-492(2003)。

特許 なし。

受賞 なし。

招待講演

1. 中田和人:「老化とミトコンドリア遺伝子制御」;第8回 Wako つくばフォーラム 長寿に向けて;最新の基礎研究と実践(2004年、筑波)
2. 中田和人、林純一:「ミトコンドリア病モデルマウス(mito-mouse)の開発」;第3回日本ミトコンドリア研究会、市民公開講座(2003年、福岡)
3. 中田和人、林純一:「マイトマウス:欠失変異型 mtDNA 導入マウスの思いがけない病態発症」;日本分子生物学会大会 シンポジウム (2003年、神戸)
4. K. Nakada and J.-I. Hayashi: Mouse models with mitochondrial DNA-based diseases; The 3rd Meeting on Pathology of Genetically Engineered Mice. (2003, Kumamoto).
5. K. Nakada and J.-I. Hayashi: The first model mouse for mitochondrial DNA-based diseases.; The 6th Molecular Biology and Biotechnology Workshop (2002, Osaka).
6. K. Nakada and J.-I. Hayashi: Interaction theory of mammalian mitochondria.; The 1st J-mit International Symposium. (2002, Tokyo).
7. 中田和人、小野朋子、林純一:「ミトコンドリア連携説」;第75回日本生化学大会シンポジウム「ミトコンドリアのダイナミクス」(2002年、京都)