

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

ミトコンドリア呼吸鎖異常症の 迅速診断と疾病遺伝子異常の解明に関する研究

研究代表者 大竹 明 (埼玉医科大学 小児科)

研究分担者 岩佐 泰靖*

緒言

先天性高乳酸血症は小児科・新生児科領域における難病の一つで最も頻度の高い先天代謝異常症であるが、現在でもその約6割は病因診断がなされていない。正確な診断と、それに基づく的確なカウンセリングや治療法の開発が望まれる。診断が困難な最大の理由は先天性高乳酸血症の最大の原因と考えられるミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断が非常に困難なためである。Blue native ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE) 法は、膜に組み込まれて可溶化の非常に困難な大分子タンパク質の解析のために考案された方法である。私達はこの研究で *In vitro* 酵素活性測定と BN-PAGE 法によるタンパク質レベルの解析を組み合わせ、まずミトコンドリア呼吸鎖異常症を迅速で正確に診断するシステムを確立したい。

さらにミトコンドリア異常症の特性として、ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の二重支配を受けるために病因遺伝子の探索が極めて難しいことが挙げられる。本研究では BN-PAGE 法の特性を生かして異常症をまずタンパクレベルで効率的に分類し、その後ミトコンドリア及び核の既知遺伝子を解析する。次いで将来的には未知の核支配病因遺伝子についても発現マイクロアレー、ホモ接合ハプロタイプ法で解析したいと考える。

材料と方法

材料: この研究は埼玉医科大学倫理審査委員会において審議され許可を受けて進められた。対象となった症例は Bernier らのミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断基準において“可能性例 (possible)”以上の基準を満たした症例を検索対象とした。臨床症状

は、新生児期致死性高乳酸血症から思春期の軽い筋緊張低下や食欲不振までに涉り非常に幅広い。大部分が原因不明の高乳酸血症症例であるが、一部は高乳酸血症を呈さずに多臓器にまたがる症状を呈したことからミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) を疑われた症例も含む。半数以上の症例が、新生児期から乳児期にかけて発病していた。約4分の3の症例が、先天性高乳酸血症や何かのミトコンドリア異常症と臨床診断されていた。男女比はほぼ同等であった。平成20年5月末現在日本全国の臨床医 (主に小児科医) のご協力で、合計120家系123症例から156検体 (皮膚線維芽細胞89検体、肝臓34検体、筋肉22検体、心臓9検体、腎臓・脾臓各1検体) のご提供を頂いた。現在までのところ、103家系106症例の解析が終了している。線維芽細胞は皮膚または骨髄から採取した。

方法: 線維芽細胞の培養は既報に従った。ミトコンドリアは Argan らの方法に基づいて二段階遠心分離法で単離精製した。

1) ミトコンドリア呼吸鎖酵素活性の測定 (大竹)

個々の呼吸鎖酵素及び対照としてのクエン酸合成酵素 (citrate synthase; CS) 活性は、光度計を用いた既報に従った。即ち肝臓と心臓は粗ホモジェネートを直接に、線維芽細胞は単離したミトコンドリア画分を測定サンプルとした。呼吸鎖酵素活性は CS との相対比で表し、対照35人の平均に対するパーセントで示した。

2) Blue native 電気泳動 (BN-PAGE) 法を用いた解析 (大竹)

単離したミトコンドリア画分は使用まで -80°C 冷凍庫に保存した。線維芽細胞及び羊水細胞から単離したミトコンドリアは、界面活性剤であるドデシルマルトシドで可溶化し、BN-PAGE とそれに続くイムノブロット法を用いて呼吸鎖複合体の量と大きさを解析した。各複合体の解析に用いた抗体は以下のサブユニットに対するもので、いずれも Molecular Probe

* 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター トランスレーショナルリサーチ部門・リサーチフェロー

社から購入した. 呼吸鎖 I, 39 kDaサブユニット; 呼吸鎖 II, 70 kDaサブユニット; 呼吸鎖 III, コア1サブユニット; 呼吸鎖IV, サブユニット1. 核複合体の複合体IIに対する相対比は, Biorad GS-800 Calibrated Densitometerで定量し, 3回のBN-PAGE&イムノブロット実験の平均値で表した. 毎回の実験においては1枚のゲルに2つの対照を同時に流し, この2つの対照の相対比の平均を100%として計算した. 各呼吸鎖複合体のゲル内活性染色も既報に従った.

3) ミトコンドリアと核DNA量の比較定量 (mtDNA/nDNA) (大竹)

精製DNAを用いて, ミトコンドリア(呼吸鎖 I-ND1サブユニット)と核(豚のう胞性線維症遺伝子エクソン24)のDNAをreal time PCR (qPCR) で増幅しその量比を検討した. 実験は4回繰り返して行い, その平均と標準偏差を測定した.

4) ミトコンドリアDNA 枯渇症候群の責任遺伝子解析 (岩佐)

すでに病因として報告のある8種類の遺伝子(DGUOK, MPV17, PEO1, POLG, RRM2B, SUCLA2, SUCLG1, TK2) とその関連遺伝子2種 (POLG2, ANT1), 合計10種類の遺伝子を, 各エクソン毎にPCR増幅しその塩基配列を直接決定した.

結果

1) ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) の診断

まず細胞・臓器別の解析結果を述べる. 線維芽細胞では解析が終了した67症例中23例, 34%がMRCDと診断でき, 各種酵素異常症が幅広く存在していた. 肝臓では解析した31家系中34症例中21家系23症例, 68%がMRCDと診断できたが, そのうち後に示すミトコンドリアと核DNA量の比較定量 (mtDNA/nDNA) 結果からミトコンドリアDNA枯渇症候群と診断できた家系が8家系を占めることが特徴だった. 筋肉では解析した22症例中13例, 59%がMRCDと診断でき, 呼吸鎖 I とIVの異常症がそれぞれ4例ずつであった. 心臓では解析した9症例中6例, 67%がMRCDと診断でき, 呼吸鎖 I 異常症が過半数であった.

以上解析症例をまとめると解析した103家系106症例中, 51家系53症例 (50%) をMRCDと診断した (図1). 単独酵素欠損症としては呼吸鎖 I 欠損症が20例と最も多く, 他に呼吸鎖III異常症が4例, 呼吸鎖IV異常症を5例診断できた. さらに呼吸鎖IIの量と活性のみが残り, I, III, IVの量と活性の全てが低下した症例が10家系12症例存在し, ミトコンドリアDNA枯渇症候群と考えられた. これらについてはmtDNA/nDNAを検討した結果, 全てがmtDNA枯渇症候群と診断できた. 症例におけるmtDNA/nDNAの平均値は0.6~23.7%と幅があったが, 重症例ほどその値が低い傾向があった. 枯渇症候群症例の多くは新生児期から乳児早期に肝障害で発症する予後不良の症例で肝移植を受けている症例が半数以上であった.

2) 病因遺伝子の検討 (表1)

遺伝子診断のできた7家系8症例の一覧を表1に示す. ミトコンドリア遺伝子異常が4家系, 核遺伝子異常 (いずれも新規変異) が3家系4症例である. ただし症例5についてはまだDGUOKのヘテロ異常が一個見つかっているだけで現在も解析を継続中である. 症

Molecular Diagnoses

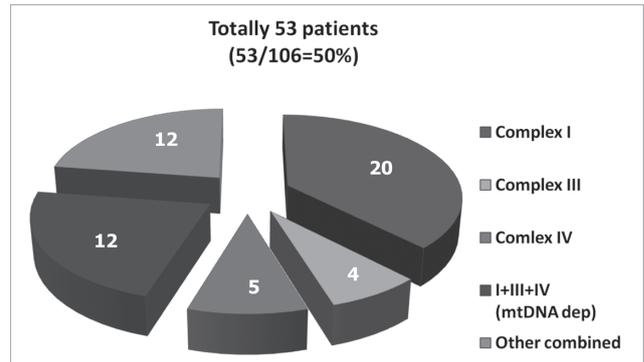


図1. ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) の診断結果. 解析した103家系106症例中, 51家系53症例 (50%) をMRCDと診断した. 単独酵素欠損症としては呼吸鎖 I 欠損症が20例と最も多く, 他に呼吸鎖III異常症を4例, 呼吸鎖IV異常症を5例, 呼吸鎖IIのみ活性の残るミトコンドリアDNA枯渇症候群を12例, 複数の酵素活性の低下した症例を12例診断した.

表 1. 遺伝子診断のついた症例の一覧

Pt	Sex	Initial symptom	Status	Complication	Blood lact/pyr (mM) (<1.8/<0.1)	qPCR (% mtDNA/nDNA)	Gene	mtDNA	Clinical diagnosis	Molecular Dx
1	M	Hypotonia (7y)	Alive (8y)	Hypertrophic cardiomyopathy	3.3-11.1/			A3236G (tRNALeuUUR)	Mitochondrial myopathy (RRF+)	Some MRCD (Other combined)
2	M	Convulsion (11y)	Alive (17y)	Retinal pigmentary degeneration	1.7/0.11			G3697A (ND1)	Epilepsy	Complex I deficiency
3	M	Hypotonia (10m)	Alive (3y)	Hypotonia, Myopathy, Periventricular leukomalacia	9.0/0.23			A3243G (tRNALeuUUR)	Some mitochondrial disorder	Some MRCD (Other combined)
4	F	Convulsion (2m)	Alive (2y)	West synd	4.4/0.22			T10191C (ND3)	Leigh's disease	Complex I deficiency
5	F	Poor feeding (8d)	Alive (9m)	Liver failure⇒Liver Tx MR, Failure to thrive	2.9/0.14	2.3% (Liver)	DGUOK (L248P only)		mtDNA depletion synd	mtDNA depletor (Hepatic)
6	M	Failure to thrive Aching stool (3m)	Dead (2y)	Liver failure⇒Liver Tx	Unknown	7.8% (Liver)	MPV17 (487msC/S170F)		Hepatic failure	mtDNA depletor (Hepatic)
7	M	Failure to thrive Vomiting (8m)	Alive (2y)	Liver failure⇒Liver Tx MR, GER, Respiratory distress	1.2/0.07	6.6% (Liver)	MPV17 (487msC/S170F)		Hepatic failure	mtDNA depletor (Hepatic)
8	F	Failure to thrive (4m)	Dead (7m)	Hypotonia, Nystagmus Her sister also died with liver failure.	1.76/0.1	2.7% (Liver)	POLG (I1185T/A857V), SUCLG1(P173A only)		Hepatic failure	mtDNA depletor (Hepatic)

Pts 6 and 7 are brothers.
MR: Mental retardation
Tx: Transplantation
GER: Gastro-esophageal reflux
RRF: Ragged red fiber

例6は両親の各々が一つずつ遺伝子異常を持つことも確認しており、発端者に認められたMPV17遺伝子の複合ヘテロ変異が病因である可能性は高い。症例8では、POLGの複合ヘテロ変異に加えて、SUCLG1のヘテロ変異も発見されたが、未だ両親の解析もできておらずこれらの遺伝子異常と病気との因果関係は不明である。

考 察

BN-PAGE と *in vitro* 酵素活性測定を用いて、103家系106症例の候補症例から、51家系53症例(50%)のミトコンドリア呼吸鎖異常症例(MRCD)を診断した。MRCD中では呼吸鎖I異常症が最多であった。病因遺伝子としてミトコンドリア遺伝子異常を4例、核遺伝子異常を3家系4症例に発見した。今後発現マイクロアレー、ホモ接合ハプロタイプ法やBN-PAGEでのアセンブリングパターンによるグループ分けを用いて更なる新規責任遺伝子に迫りたい。mtDNA枯渇症候群は複数(特にI+III+IV)の呼吸鎖酵素活性が低下した症例における最大の病因である。侵される臓器・組織特異性を含めた臨床症状の差異と残されたmtDNAの質と量を解析しつつ、候補遺伝子を絞り込み分子学的解析を進める予定である。

ミトコンドリア遺伝子異常を認めた症例の方が年長発症の軽症例が多い。今回核遺伝子異常はミトコンドリアDNA枯渇症候群に絞って解析を進めたことも年齢差を説明する理由にはなるが、一般的に核遺伝子異常によるミトコンドリア病の方が重症で、小児科領域ではMRCDの大多数が核遺伝子異常に由来することは最近の多くの文献でも明らかになってきている。

臨床的に注目すべきは3症例において高乳酸血症が存在していないことである。また症例2の網膜色素変性と症例8の眼振は特徴的である。たとえ高乳酸血症がなくとも、単一臓器起源としては説明のつかない多臓器にまたがる症状の存在する時、特に眼科的異常の併存する時はMRCDの存在も念頭に置かねばならない。

BN-PAGEはMRCDの迅速で正確な診断にとって必須であるのみならず、診断後の分子学的解析にも有用な情報を与えてくれる極めて有力な解析手段であると考えられた。

謝 辞

多大なご協力と励ましをいただいた千葉県こども病院代謝科村山圭先生に深謝いたします。

研究成果リスト

原著論文と著書

- 1) Yamazaki T, Yamaguchi T, Inoue M, Ohtake A, Sasaki N, Inoue I, Sato K, Ouchi K and Kishimoto T:

The inhibitory effect of antihyperlipidemic drugs on the growth of *Chlamydia pneumoniae* in vitro. *J Chemother* 2006; 18(1): 107-9.

- 2) Nagasaka H, Hirano K, Ohtake A, Miida T, Takatani T, Murayama K, Yorifuji T, Kobayashi K, Kanazawa M, Ogawa A and Takayanagi M: Improvements of hypertriglyceridemia and hyperlacticemia in Japanese children with glycogen storage disease type Ia by medium-chain triglyceride milk. *Eur J Pediatr* 2007; 166(10): 1009-16. Epub.
- 3) Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, Thorburn DR and Ryan MT: Analysis of the assembly profiles for mitochondrial and nuclear encoded subunits into Complex I. *Mol Cell Biol* 2007; 27(12): 4228-37.
- 4) 藤浪綾子, 高柳正樹, 山本重則, 小川恵美, 小川真司, 金澤正樹, 阿部博紀, 大竹明: 本邦における Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) 欠損症の臨床像について. *小児科臨床* 2007; 60(11): 2115-20.
- 5) Yasuno T, Kaneoka H, Tokuyasu T, Aoki J, Yoshida S, Takayanagi M, Ohtake A, Kanazawa M, Ogawa A, Tojo K, Saito T: Mutations of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) in Japanese patients with CPT II deficiency. *Clin Genet* 2008; 73(5): 496-501.
- 6) Murayama K, Nagasaka H, Tsuruoka T, Omata Y, Horie H, Tregoning S, Thorburn DR, Takayanagi M, Ohtake A: Intractable secretory diarrhea in a Japanese boy with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Eur J Pediatr* 2008; 167: Epub ahead of print.
- 7) 内藤幸恵, 村山圭, 相澤まどか, 大竹明: ミトコンドリア呼吸鎖の酵素活性により診断された新生児ミトコンドリア心筋症. *日本未熟児新生児学会雑誌* 2008; in press.
- 8) 大竹明: 新生児期に緊急処置を要する先天代謝異常. *小児の治療指針(小児科診療69増刊, 衛藤義勝, 斉藤加代子, 斉藤博久, 長谷川行洋, 平岩幹男, 渡辺博 編集主幹)*. 東京: 診断と治療社; 2006.p.868-72.
- 9) 大竹明: 6. 先天代謝異常 カルニチン回路異常症. *今日の小児治療指針, 第14版(大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎 編)*. 東京: 医学書院; 2006.p.169-70.
- 10) 大竹明, 雨宮伸: X III 糖代謝 18. 低血糖症 4) 反応性低血糖症 a. ガラクトース血症. *別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.3 内分泌症候群(第2版) — その他の内分泌疾患を含めて — III*. 東京: 日本臨床社; 2006.p.215-9.
- 11) 大竹明: 第2部: 疾患 IV. 先天代謝異常 69. メチルマロン酸血症. *小児疾患の診断治療基準第3版(小児内科38増刊, 小児内科編集委員会 責任編*

集五十嵐隆 編). 東京:東京医学社; 2006.p.165-6.

- 12) 大竹明: IV. 脂質代謝異常の臨床 2. 低脂血症
4) 各病態における二次性低脂血症の発症機序とその治療 h. 乳児期の低脂血症. 脂質代謝異常—高脂血症・低脂血症—(日本臨床65巻 増刊号7). 東京:日本臨床社; 2007.p.658-62.
- 13) 大竹明, 高柳正樹:【疾患別アトラス編】代謝, 変性, 脱髄疾患 有機酸代謝異常症. 小児中枢神経疾患の画像診断2008(小児内科39増刊, 『小児内科』『小児外科』編集委員会共編). 東京:東京医学社; 2007. p.526-7.
- 14) 大竹明: 8. トピックス 12. Fabry病(ライソゾーム病). 脳卒中診療:こんなときどうするQ&A(棚橋紀夫, 北川泰久 編). 東京:中外医学社; 2008.p.316-8.

学会発表

- 1) 大竹明: ミトコンドリア病: 臨床診断と病因診断の統合を目指して. 第289回日本小児科学会北陸地方会, 2007年3月11日, 石川県河北郡内灘町.
- 2) 大竹明: 臨床から見たスクリーニング—代謝異常症を中心に—第19回新生児マス・スクリーニングワークショップ, 2007年12月1日, 東京都品川区.
- 3) 大竹明: 新生児科医が知る必要のある先天代謝異常症—ハイリスク・スクリーニングと新しいマス・スクリーニング— 第63回多摩新生児懇話会, 2008年1月16日, 吉祥寺市.
- 4) Ohtake A, Honda M, Harashima H, Wu S, Kotake F, Murayama K, Ryan MT, Thorburn DR, Sasaki N: Blue native polyacrylamide gel electrophoresis is a powerful tool for screening of mitochondrial respiratory chain disorders. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening, 2006年9月16-19日, Awaji, Hyogo & Tokushima, Japan.
- 5) Ohtake A, Murayama K, Honda M, Ueda Y, Harashima H, Yamazaki T, Takayanagi M, Ryan MT, Thorburn DR, Sasaki N: Blue native polyacrylamide gel electrophoresis is a powerful tool for screening of mitochondrial respiratory chain disorders. SSIEM (Society for the Study Group of Inborn Errors of Metabolism) 2007 Annual Symposium, 2007年9月4-7日, Hamburg, Germany.
- 6) 大竹明, 本多正和, 原嶋宏子, 星野正也, 村山圭, 高柳正樹, 佐々木望, Mike T Ryan, David R Thorburn: ミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断におけるBlue Native 電気泳動法の有用性—複合体単独異常症とmtDNA 枯渇症候群—. 日本人類遺伝学会第52回大会, 2007年9月12日~15日, 東京都新宿区.
- 7) 大竹明, 山崎太郎, 赤塚淳弥, 本多正和, 原嶋宏子, 佐々木望, 村山圭, 高柳正樹, David R Thorburn: 日本人におけるミトコンドリア呼吸鎖異常症の酵素診断と分子病理. 第7回日本ミトコンドリア学会, 2007年12月20日~22日, 鹿児島市.
- 8) 本多正和, 大竹明, 原嶋宏子, 村山圭(千葉県こども病院), 小竹文秋, 宮路太, 佐々木望, :ミトコンドリア呼吸鎖異常症の病因診断: 高乳酸血症日本人20症例についての検討. 第109回日本小児科学会, 2006年4月21日~4月23日, 金沢市.
- 9) Honda M, Ohtake A, Harashima H, Wu S, Kotake F, Murayama K, Ryan MT, Thorburn DR, Sasaki N: Blue native polyacrylamide gel electrophoresis is a powerful tool for screening of mitochondrial respiratory chain disorders. Xth International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2006年9月12-16日, Chiba, Japan.
- 10) 本多正和, 大竹明, 原嶋宏子, 小竹文秋, 星野正也, 善利裕実, 村山圭, 佐々木望, Mike T Ryan, David R Thorburn: Blue Native 電気泳動法によるミトコンドリア呼吸鎖異常症の病因診断: 高乳酸血症日本人20症例についての検討. 日本人類遺伝学会第51回大会, 2006年10月17日~20日, 米子市.
- 11) 本多正和, 大竹明, 原嶋宏子, 小竹文秋, 星野正也, 村山圭, 佐々木望: ミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断に対するBlue Native 電気泳動法の有用性. 第110回日本小児科学会, 2007年4月20日~4月22日, 京都市.
- 12) 倉繁款子, 高杉尚志, 松下憲司, 細川卓利, 脇口宏, 村山圭, 大竹明: 肝型mitochondrial DNA depletion 症候群の1例. 第49回日本先天代謝異常学会, 2007年11月15日~17日, 山形市.
- 13) 村山圭, 鶴岡智子, 馬場景子, 長坂博範, 高柳正樹, 山崎太郎, 大竹明: ミトコンドリア呼吸鎖障害と代謝性肝疾患. 第49回日本先天代謝異常学会, 2007年11月15日~17日, 山形市.
- 14) 山崎太郎, 村山圭, 赤塚淳弥, 本多正和, 原嶋宏子, 佐々木望, 高柳正樹, David R Thorburn, Mike T Ryan, 大竹明: ミトコンドリア呼吸鎖異常症の病因診断と分子病理の解明. 第49回日本先天代謝異常学会, 2007年11月15日~17日, 山形市.
- 15) 後藤珠子, 中村幸恵, 森雅人, 山形崇倫, 村山圭, 大竹明, 桃井真理子: 広範な白質壊死をきたし呼吸鎖複合体I 活性低下を認めたLeigh 症候群の1例. 第7回日本ミトコンドリア学会, 2007年12月20日~22日, 鹿児島市.
- 16) 村山圭, 鶴岡智子, 馬場景子, 長坂博範, 原嶋宏子, 山崎太郎, 山本重則, 高柳正樹, 大竹明: ミトコンドリア呼吸鎖異常と小児肝疾患. 第7回日本ミトコンドリア学会, 2007年12月20日~22日, 鹿児島市.

- 17) 鶴岡智子, 村山圭, 長坂博範, 馬場景子, 原嶋宏子, 山崎太郎, 山本重則, 大竹明, 高柳正樹: 新生児期から難治性分泌性下痢症を呈したミトコンドリア呼吸鎖 I 欠損症. 第7回日本ミトコンドリア学会, 2007年12月20日～22日, 鹿児島市.

特許出願

なし