

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19100007

研究課題名 突然変異導入マウス作製による哺乳類ミトコンドリアゲノムの生理的役割の全貌解明

研究課題名（英文） Analysis of entire physiological roles of mammalian mtDNA by generation of mice carrying various pathogenic mutations

研究代表者

林 純一（HAYASHI JUN-ICHI）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60142113

研究成果の概要（和文）：様々な病原性を持つ mtDNA 突然変異の中で、ミトコンドリア呼吸酵素複合体をコードする ND6 遺伝子に病原性変異が生じると、活性酸素（ROS）の大量漏出と肺転移を誘導することを突き止めた。更にこの変異を生殖細胞系列に導入して作製したミトマウスは早期老化ではなく糖尿病とリンパ腫が多発することを明らかにした。また病原性を持たない多型変異の中には、自然免疫系に認識され特異的に排除される新機能が mtDNA 存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In this project we showed that specific pathogenic mutations that induce significant ROS production induced highly metastatic potentials in tumor cells. Moreover, when we introduced one of them into female germlines, and generated mito-mice with the mutation, mito-mice expressed diabetes and lymphoma development. On the contrary, we also found novel roles of specific polymorphic mtDNA mutations, which can be recognized and excluded by innate immune systems.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	35,900,000	10,770,000	46,670,000
2008 年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2009 年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2010 年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2011 年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
総 計	85,100,000	25,530,000	110,630,000

研究分野：分子細胞遺伝学

科研費の分科・細目：実験動物・病態モデル

キーワード：ミトコンドリアゲノム変異

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた我が国にとって老化やがん、生活習慣病などの老化関連疾患は重大な社会問題である。近年、mtDNA のさ

まざまな病原性突然変異がこれらの疾患で高頻度に観察されることから、その原因が老化に伴う mtDNA の突然変異蓄積による呼

吸欠損であるという仮説（老化ミトコンドリア原因説）が提出され大きな注目を集めるようになってきている。しかしこの仮説はすべて状況証拠に基づくもので、以下の大きな未解決の問題がある。

（１）呼吸欠損は核側遺伝子の突然変異によっても誘導されることから、mtDNA の病原性突然変異が本当に老化や老化関連疾患の原因となることが直接証明されたわけではない。

（２）mtDNA の多型突然変異に注目すると、種類によってはエネルギー産生以外の生理機能に重大な影響を与える可能性が否定できないが、未だに直接的な証拠が提出されていない。

2. 研究の目的

これらの問題を解決するためには核ゲノムのバックグラウンドが同一であるマウス系統に、多様な病原性突然変異 mtDNA を導入した多様な病態モデルマウスを作出し、呼吸欠損の発現と臨床症状の発症の有無と両者の連動性を明にしなければならない。

しかしヒトのミトコンドリア病の原因となる突然変異 mtDNA をマウスの細胞に導入しても複製されないし、mtDNA に人工的に任意の突然変異を導入することは現在の技術では不可能である。この技術的な問題を解決するため本研究はマウス培養細胞の mtDNA にわずかに存在する体細胞突然変異 mtDNA を濃縮してから生殖系列に導入することで病態モデルマウスを作製する戦略をとった。これによって mtDNA の突然変異が、単にミトコンドリア病だけでなく、本当に老化や老化関連疾患（がん、生活習慣病など）の原因になるか否かを明らかにし、その病態発症機構の解明を目的とする。

また本研究は、呼吸欠損を引き起こす病

原性突然変異に加え、呼吸欠損を引き起こさない多型突然変異の生理学的機能も同時に解析することで哺乳類 mtDNA の生理的役割の全貌解明を目的とする。

3. 研究の方法

（１）病原性突然変異 mtDNA 導入モデルマウスの作製と病態解析

第1の方法：マウスの高転移性肺がん細胞に呼吸欠損のみならずROS産生を誘発する病原性突然変異（13997）mtDNAが存在することを明らかにした。そこでこのmtDNAをマウス肺がん細胞から、マウスES細胞を通してマウス生殖細胞系列に導入することで新奇ミトコンドリア病態モデルマウス（ミトマウス）を作製し早期老化や生活習慣病関連疾患発症の有無を検証する。

第2の方法（ボトルネック法）：各細胞に数千コピーも存在するmtDNA分子数を特殊な薬剤を使うことで1-2個程度に絞り込み（ボトルネックをかけ）、それを解除することでボトルネックを通り抜けた特定のmtDNA分子のみを持つ細胞株を樹立する。PCRを用いて特定の病原性突然変異mtDNAが濃縮できた細胞株を選別しマウスES細胞を通してマウス生殖細胞系列に導入する。

第3の方法（転移結節法）：ROS産生を誘発するmtDNAの病原性突然変異が培養細胞に転移能を与えるという申請者が発見した性質を活用する。まずマウスがん細胞をマウスの尾静脈に注入し、その結果肺転移結節を形成した細胞のみを再度培養系に確保することでこの細胞のmtDNAをマウスES細胞を通してマウス生殖細胞系列に導入する。

（２）多型突然変異 mtDNA の自然免疫系による認識機構の解明

mtDNA の病原性突然変異が呼吸欠損を引き起こし様々な病態を誘発する可能性があるのに対し、多型突然変異は呼吸欠損を引き起

こさないことから、常識的には生理学的にも全く問題ないはずである。しかし申請者の先行研究から特殊な多型突然変異 mtDNA を持つ細胞は自然免疫系に認識され拒絶反応を引き起こす可能性が出てきた。そこで自然免疫系の様々な細胞を欠損したマウスを用いることでその認識に携わる自然免疫細胞を特定し、認識と排除の機構解明を行う。

4. 研究成果

(1) 病原性突然変異 mtDNA 導入モデルマウスの作製と病態解析

第一の方法の研究成果：

研究成果 1 (Science 2008)

マウス肺がん細胞株である P29 細胞（低転移性）と A11 細胞（高転移性）の間で mtDNA のみ完全に置換したサイブリッドを作製したことで、A11 細胞にのみ表現されていた呼吸欠損と高転移性は、A11 細胞の mtDNA に存在する G13997A 突然変異に起因することを明らかにした。

さらに活性酸素（ROS）の産生量や核遺伝子の発現パターンの変化から、この体細胞突然変異が呼吸欠損を誘発することで過剰な ROS が発生し、その結果、核 DNA に存在する遺伝子の発現量が変化し低酸素でも生存できるような状態になるため高転移性を獲得することが証明された。この場合、ROS を除去する抗酸化剤を使用することにより、転移が抑制されることから、転移の治療には抗酸化剤が有効であることも証明できた。

これらの研究成果はその学術的インパクトが極めて高いと評価され、国際一流雑誌である Science の電子版（2008 年 4 月 4 日）に掲載されると同時に、同じく国際一流雑誌である Cell、Nature Medicine、そして Nature Review Cancer でも紹介され世界中の注目を集めただけでなく、国内でも今後のがん転移治療に格段の発展をもたらす可能性がある

として多くのマスコミで報道された。

研究成果 2 (FEBS Lett. 2008)

上記 G13997A 突然変異型 mtDNA によって転移が誘発されるのは、呼吸欠損に伴う ROS の過剰産生以外に、解糖系の上昇（Warburg 効果）の可能性が残されていた。この問題を解決するため、呼吸欠損による解糖系の上昇を伴うが、ROS を過剰産生しない大規模欠失突然変異型 mtDNA を導入したマウス肺がん細胞で転移能を調べた。その結果、この場合は転移能を誘発しなかったことから、Warburg 効果ではないことが証明された。

研究成果 3 (J. Biol. Chem. 2009)

上記 G13997A 突然変異型 mtDNA によって転移が誘発されるのは、呼吸欠損に伴う ROS の過剰産生であることが明確になったが、ROS がいかにして転移能を誘発するのかは不明であった。今回の結果から、PI3Kinase と AKT のシグナル経路を使って、低酸素誘導因子である HIF-1 の安定化するためであることを証明した。

研究成果 4 (FEBS Lett. 2010)

マウス XO 型 ES 細胞に高転移性肺がん細胞から G13997A 突然変異型 mtDNA を移植し、キメラマウスを作製後、雌の生殖系列を通して、同じ変異を 100% 持つマウス（ミトマウス）が誕生した。生後 3 ヶ月のミトマウスを用いて呼吸活性を調べたところ、調べた全ての組織で予想通り呼吸酵素複合体 I の活性が低下していたが、顕著な異常は認めなかった。

研究成果 5 (PLoS ONE 2011)

高転移性ヒト乳がん細胞に正常な mtDNA を導入したところ高転移性が抑制された。これによってマウスのがん細胞で証明されたこと（Science 2008）が、ヒトのがん細胞でも普遍的に存在する現象であることを明らかにした。

研究成果 6 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012)

マウス X0 型 ES 細胞に高転移性肺がん細胞から G13997A 突然変異型 mtDNA を移植し、キメラマウスを作製後、雌の生殖系列を通して、同じ変異を 100% 持つマウス（ミトマウス）が誕生した（研究成果 4）。加齢に伴う老化促進の有無を見るためこのミトマウスを 2 年半以上飼いつけた結果、変異を持たないコントロールマウス、ROS を出さない別の病原性突然変異 mtDNA を持つミトマウスと同等の寿命であるにもかかわらず、このミトマウスのみが糖尿病の症状と B リンパ腫を多発することが明らかになった。このことにより ROS を出す特殊な病原性突然変異 mtDNA は老化関連疾患を誘発することを世界で初めて直接的に証明した。

第 2 の方法による研究成果

病原性を持つと推定した新奇の 2 種類の体細胞突然変異 mtDNA の濃縮に成功した。しかし、そのうちの一つをほぼ 100% 持つ細胞の呼吸活性は低下しなかったことから、この変異は病原性突然変異ではなかった。これに対し、もう一つは呼吸活性が顕著に低下したことから病原性突然変異と判断し、マウス ES 細胞を通してマウス生殖細胞系列に導入することで新奇ミトコンドリア病態モデルマウス（ミトマウス）の作製まで実験行程が進んでいる。この突然変異は tRNA^{Leu} 遺伝子に有るため、MELAS などヒトミトコンドリア病の病態モデルとして今後の活用が期待できる。

第 3 の方法による研究成果

転移結節由来の細胞株で呼吸欠損となるものを選別し、その mtDNA をマウス ES 細胞に導入したが、キメラマウスの作製にまで至っていない。これは mtDNA に存在する突然変異の病原性が強すぎて致死になるためと判断し、今後は別の高転移性細胞株を用いることとした。

（2）多型突然変異 mtDNA の自然免疫系による認識機構の解明

研究成果 6（J. Exp. Med. 2010）

呼吸活性に影響を与えないような多型突然変異が mtDNA に生じた場合、それが生命活動に影響を与えるか否かについてはまったく研究がなされていない。今回、mtDNA の多型突然変異が細胞の表現型、たとえば細胞増殖能や腫瘍形成能などに与える影響の有無を明確にするため、正常なマウス由来細胞の mtDNA を、多型突然変異をもつ他系統マウス由来の mtDNA で置換した細胞を作製した。その結果、B6mtNZB 細胞（核 DNA は B6 マウス由来、mtDNA は NZB マウス由来）ではその呼吸活性や細胞増殖能は正常であったにもかかわらず、B6 マウスの背部皮下にこの細胞を打ち込んだ場合、この細胞のみが選択的に増殖が抑制された。この選択的排除が B6 マウスの免疫系によるものである可能性を確かめるため獲得免疫系不全マウス（ $\beta 2m^{-/-}$ 、 $Tap1^{-/-}$ 、 $Ab\beta^{-/-}$ 、 $Rag2^{-/-}$ ）と自然免疫系不全マウス（ $Rag2^{-/-}/\gamma c^{-/-}$ 、 $Myd88^{-/-}$ 、 $Myd88^{-/-}NK^{RED}$ ）それぞれにこれらの細胞を打ち込み確認を行った。その結果、B6mtNZB 細胞の増殖が確認できたのは自然免疫系不全マウスだけであり、獲得免疫系ではなく自然免疫系が今回の選択的排除に重要な役割を果たしていることが証明された。

これらの結果から、従来は ATP 合成のみに関係していると考えられていた mtDNA は、自然免疫系が「自己か非自己か」を認識する際にも重要な役割を果たしているということ、さらに自然免疫系はその個体の細胞内の mtDNA に生じた多型突然変異というわずかな違いも認識し、その多型突然変異を持つ細胞のみを選択的に排除できる能力を持っているという従来の常識を超えた事実が明らかになった。

また、今回の発見はミトコンドリアや自然免疫系の新たな生理機能を突き止めた点だけに限らず、移植免疫の分野にも貴重な情報を提供したと言える。たとえば、iPS 細胞由来の再生臓器を用いて臓器移植を行う場合、もし iPS 細胞提供者自身の老化に伴い多型突然変異が mtDNA に蓄積していたとすると、再生臓器が自身の自然免疫系に認識され拒絶反応が起こる可能性を否定することができない。このため mtDNA 多型突然変異が原因となる拒絶反応がないことをあらかじめ確かめる必要があるといえる。この研究成果はマスコミでも報道された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 37 件)

- ① Osamu Hashizume, Akinori Shimizu, Mutsumi Yokota, Atsuko Sugiyama, Kazuto Nakada, Hiroyuki Miyoshi, Makiko Itami, Miki Ohira, Hiroki Nagase, Keizo Takenaga, and Jun-Ichi Hayashi. Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 査読有, 2012, in Press
- ② Hirotake Imanishi, Keisuke Hattori, Reiko Wada, Kaori Ishikawa, Sayaka Fukuda, Keizo Takenaga, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. Mitochondrial DNA mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. *PLoS One*. 査読有, 6, 2011, e23401.
<https://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/handle/2241/114066>
- ③ Kaori Ishikawa, Noriko Toyama-Sorimachi, Kazuto Nakada, Mami Morimoto, Hirotake Imanishi, Mariko Yoshizaki, Shigemi Sasawatari, Mamoru Niikura, Keizo Takenaga, Hiromichi Yonekawa, and Jun-Ichi Hayashi. The innate immune system in host mice targets cells with allogenic mitochondrial DNA. *J Exp. Med.* 査読有, 207, 2010, 2297-2305.
<https://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/handle/2241/107854>
- ④ Mutsumi Yokota, Hiroshi Shitara, Osamu Hashizume, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Rie Ishii, Choji Taya, Keizo Takenaga, Hiromichi Yonekawa, and Jun-Ichi Hayashi. Generation of trans-mitochondrial mito-mice by the introduction of a pathogenic G13997A mtDNA from highly metastatic lung carcinoma cells. *FEBS Lett.* 査読有, 84, 2010, 3943-3948.
<https://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/handle/2241/106654>
- ⑤ Nobuko Koshikawa, Jun-Ichi Hayashi, Akira Nakagawara, and Keizo Takenaga. Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha gene transcription via phosphatidylinositol3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J. Biol. Chem.* 査読有, 284, 2009, 33185-33194.
- ⑥ Kaori Ishikawa, Osamu Hashizume, Nobuko Koshikawa, Sayaka Fukuda, Kazuto Nakada, Keizo Takenaga, and Jun-Ichi Hayashi. Enhanced glycolysis induced by mtDNA mutations does not regulate metastasis. *FEBS Lett.* 査読有, 582, 2008, 3525-3530.
<https://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/handle/2241/101219>
- ⑦ Kaori Ishikawa, Keizo Takenaga, Miho Akimoto, Nobuko Koshikawa, Aya Yamaguchi, Hirotake Imanishi, Kazuto Nakada, Yoshio Honma, and Jun-Ichi Hayashi. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 査読有, 320, 2008, 661-664.
<https://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/handle/2241/101575>
- ⑧ Shin-Ichi Inoue, Mutsumi Yokota, Kazuto Nakada, Hiroyuki Miyoshi, and Jun-Ichi Hayashi. Pathogenic mitochondrial DNA-induced respiration defects in hematopoietic cells result in anemia by suppressing erythroid differentiation. *FEBS Lett.* 査読有, 581, 2007, 1910-1906.
- ⑨ Liqin Cao, Hiroshi Shitara, Takuro Horii, Yasumitsu Nagao, Hiroshi Imai, Kuniya Abe, Takahiko Hara, Jun-Ichi Hayashi, and Hiromichi Yonekawa. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat. Genet.* 査読有, 39, 2007, 386 - 390
- ⑩ Akitsugu Sato, Kazuto Nakada, Hiroshi

Shitara, Atsuko Kasahara, Hitomichi Yonekawa, and Jun-Ichi Hayashi. Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germ cells with age. *Geneics* 査読有, 177, 2007, 2031-2037.

[学会発表] (計 20 件)
(すべて招待講演)

- ① 林 純一、特別講演：ミトコンドリアDNA突然変異とがん転移能、第 28 回分子病理学研究会、2009 年 07 月 19 日、神戸
- ② Jun-Ichi Hayashi, Symposium: Mitochondrial genome and cellular functions: Mitochondrial bottleneck is not generated by the reduction of mtDNA copy number in mouse female germlines 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 12 日、神戸
- ③ Jun-Ichi Hayashi, -From basic mechanisms to disease and ageing- Role of mtDNA mutations in metastasis" City Conference Centre. The 7th European meeting on mitochondrial pathology (EUROMIT VII), 2008 年 06 月 13 日, Stockholm, Sweden

[図書] (計 11 件)

- ① Kaori Ishikawa, Jun-Ichi Hayashi, Academic Press. Methods in Enzymology, Part B, Mitochondrial function (Edited by W. S. Allison and Anne N. Murphy), Generation of mtDNA-exchanged cybrids for determination of the effects of mtDNA mutations on tumor phenotypes, 2009 年, 335-346.
- ② 今西 泰起、石川 香、反町 典子、林 純一、学研メディカル秀潤社、細胞工学、2010 年、Vol. 30: 416-417

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~jih-kzt/>

筑波大学公式 HP (プレス用記事):

http://www.tsukuba.ac.jp/public/press/080402press_mitocondoria.pdf

日本学術振興会 最近の研究成果:

http://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/31result/seibutsu/23_hayashi.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 純一 (HAYASHI JUN-ICHI)
筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号: 60142113

(2) 研究分担者

米川 博通 (YONEKAWA HIROMICHI)
財) 東京都医学研究機構・東京都臨床
医学総合研究所・副所長
研究者番号: 30142113