

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25年4月1日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650091

研究課題名（和文） 病原性ミトコンドリアゲノムの臓器特異的維持・排除機構の解析

研究課題名（英文） Studies on tissue-specific dynamics of pathogenic mutant mitochondrial DNA in mice

研究代表者

中田 和人（NAKADA KAZUTO）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80323244

研究成果の概要（和文）：大規模欠失型（ Δ ）ミトコンドリアゲノム（mtDNA）を含有するマウスの病態表現型を精査した結果、新生児期には造血と鉄代謝異常を主体とした肝臓病態を、成体時期には全身性のエネルギー欠損による全身性の代謝異常病態がそれぞれ誘導され、また個体によってはこれら2つの病態を遷移発症することを見出した。さらに、このような複雑な病態発症は、臓器に導入されている Δ mtDNAの量的変化によって制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Our model mouse study clearly shows that a single deleted mtDNA was responsible for at least two distinct disease phenotypes at different ages and suggests that the level and dynamics of deleted mtDNA load in affected tissues would be important for the onset and transition of disease phenotypes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	600,000	0	600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総 計	2,100,000	450,000	2,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：ミトコンドリア、ミトコンドリア DNA、病原性突然変異、ミトコンドリア呼吸機能異常、エネルギー欠損、ミトコンドリア病、モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞の核外ゲノムであるミトコンドリアゲノム(mtDNA)は、細胞あたり数百～数千コピー存在し、母性遺伝様式に従って次世代に伝達されている。そのため、哺乳類のmtDNA分子集団は、老化とともに体細胞突然変異が生じるものの、ほぼ均一な分子集団であると言われている。これらのことから、均一なmtDNA分子集団はランダムに、且つ、バルクとして複製、維持され、臓器間での差異

はもとより、特定のmtDNA分子種が特異的に蓄積することはないと考えられてきた。

先行研究において申請者らは、正常なマウス受精卵に大規模欠失変異型（欠失型）mtDNA分子を導入することで、ミトコンドリア呼吸機能異常マウスを樹立し（nature genet., 2000）、ミトコンドリア遺伝子疾患の病態発症機構を解明してきた（Nature Med., 2000; PNAS, 2005&2006; FEBS Lett., 2007; Mol. Brain, 2008）。このマウスに導入されている

欠失型 mtDNA は分子サイズが小さいため、例えば野生型と欠失型を共存させた培養細胞内では欠失型 mtDNA は時間とともにその存在比が増加するという、複製上の利点を有している。したがって、このミトコンドリア呼吸機能異常マウスにおいても、老化とともに欠失型 mtDNA の存在比が増加すると予想していた。ところが、出生後、心臓や骨格筋、腎臓では増加し、肝臓や脳ではほとんど一定、驚くべきことに卵では減少していくことが分かった (Genetics, 2007; Mol. Brain, 2008)。このような現象は、臓器間や細胞種間で mtDNA 分子種をモニタリングし、結果として排除するような生体機構の存在を強く示唆している。

2. 研究の目的

病原性突然変異型 mtDNA の蓄積が様々な病気 (ミトコンドリア病、神経変性疾患、がん、糖尿病など) などに関連している可能性が示唆され、大きな注目を集めている。しかし、このようなミトコンドリア関連疾患の病態発症研究では変異型 mtDNA の病原性探索に終始し、それらの病型を特徴づける可能性がある「臓器間における変異型 mtDNA の蓄積の差異」については、その分子機構はおろか、存在すら証明されていないのが現状である。

そこで本研究では、野生型 mtDNA と病原性欠失型 mtDNA を混在させたマウスにおいて、欠失型 mtDNA の蓄積が臓器間で異なるという現象の発見を発端に、この「臓器間における欠失型 mtDNA の蓄積の差異」による多様なミトコンドリア関連疾患の病態原理を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Δ mtDNA 分子種を導入した実験動物マウス (C57BL/6) (以後、ミトマウス Δ) を用いて、胚時期—出生—成長という時間軸における Δ mtDNA の動的变化 (野生型 mtDNA に対する存在割合の変化) を多様な臓器において決定した。この動的变化をもとに、各臓器ならびに個体の病態解析 (組織学的解析、電子顕微鏡的観察、代謝生化学的解析など) を行った。これらの結果から、 Δ mtDNA の時間軸による変動と臓器ならびに個体病態との連動を総合的に判定した。

4. 研究成果

野生型 mtDNA と Δ mtDNA の両方を含有するミトマウス Δ を用いて、胚時期—出生—成長という時間軸における臓器内の Δ mtDNA の動態変化 (野生型に対する存在割合) と病態発症特性について検討した。その結果、以下のような結果を得た。

出生時に Δ mtDNA を 50%以上含有する個体のおよそ半数は生後 1 ヶ月以内に死亡してし

まう。このような個体の死因を明確にするため、 Δ mtDNA を 50%以上含有する後期胚 (出生前日の胚) を精査した結果、このような後期胚では造血異常 (網状赤血球の増加) と肝臓における鉄代謝異常 (鉄イオンの沈着) が観察された。胚時期の造血は肝臓で行われているため、 Δ mtDNA を 50%以上含有する後期胚の病態は肝臓に局限すると結論した。

先行研究において、 Δ mtDNA の病原性は、その蓄積割合が 80%を超えないと発揮されない (ミトコンドリア異常やエネルギー産生低下が起こらない) ことを把握している。このため、 Δ mtDNA を 50%以上含有する後期胚の肝臓で病態が発症する理由 (50%という低い含有率で病原性を発揮する理由) を精査した。その結果、 Δ mtDNA を 50%以上含有する後期胚の肝臓では、構造と機能が正常に近いミトコンドリアと両者が明らかに異常なミトコンドリアが単一の肝細胞ならびに造血細胞に存在していることが分かった。

細胞内の個々のミトコンドリアは分裂・融合を繰り返しことで内容を交換することができる。このため、mtDNA に何らかの突然変異が生じててもこのような分子種がある一定以上蓄積しない限り (前述のようにこれまでの先行研究では、 Δ mtDNA は 80%以上蓄積することが必要)、病原性は発揮できない。これは、 Δ mtDNA が失った遺伝子産物が野生型 mtDNA から供給されることによりミトコンドリアのエネルギー産生能が正常化されることに起因する (ミトコンドリア間相互作用)。このため、 Δ mtDNA の蓄積が 80%以下の細胞では全てのミトコンドリアが正常に、逆に Δ mtDNA の蓄積が 80%以上の細胞では全てのミトコンドリアが以上になることが分かっている。

一方、 Δ mtDNA を 50%以上含有する後期胚の肝細胞と造血細胞では構造と機能において正常なミトコンドリアと異常なミトコンドリアが単一細胞質に共存していた。すなわち、このような細胞ではミトコンドリア間相互作用が作動せず、結果として Δ mtDNA の存在比が 50%程度であっても病原性が発揮されてしまうと考えられた。

前述のように、出生時に Δ mtDNA を 50%以上含有する個体のおよそ半数は生後 1 ヶ月以内に死亡してしまうが、半数は生存する。この生存個体を精査した結果、生後 1 ヶ月齢までに造血異常 (網状赤血球の増加) と肝臓における鉄代謝異常 (鉄イオンの沈着) が緩解することが分かった。この緩解現象中の Δ mtDNA の変動を Real-time PCR 法で追跡した結果、驚くべきことに、血液と肝臓サンプル中の Δ mtDNA の割合が低下することが分かった。この罹患臓器における Δ mtDNA の低下現象は Δ mtDNA を有意に含有する細胞の細胞死やミトコンドリアに品質管理によって達成さ

れるのではないことも明らかとなった。現状、このような現象の詳細機構は不明である。

そして、このような出生時に Δ mtDNAを50%以上含有するも造血系の病態を緩解、生存した個体であっても、各臓器の Δ mtDNAの含有率が増加に転じ、 Δ mtDNAの含有率が80%を超えると、エネルギー代謝異常が誘導され、多様な病態（高乳酸血症、網膜異常、心伝導障害、腎障害など）を発症することが分かった。このような症状は典型的なミトコンドリア病（カーンズセイヤ症候群）に類似していた。

総じて、本研究の遂行により、単一の Δ mtDNA分子種がマウス個体の発生・成長過程において少なくとも2つの病態を誘導できることを明らかにできた。そして、このような複雑な病態誘導の制御基盤は、罹患臓器におけるmtDNAの蓄積に対する感受性と Δ mtDNAの動態変化にあることを明らかにできた。

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13件）

① Mito T, Kikkawa Y, Shimizu A, Hashizume O, Katada S, Imanishi H, Ota A, Kato Y, Nakada K, Hayashi J. Mitochondrial DNA mutations in mutator mice confer respiration defects and B-cell lymphoma development. PLoS One. 2013; 8(2): e55789. doi: 10.1371/journal.pone.0055789. 査読あり.

② Hashizume O, Shimizu A, Yokota M, Sugiyama A, Nakada K, Miyoshi H, Itami M, Ohira M, Nagase H, Takenaga K, Hayashi J. Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development. Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109(26): 10528-33. doi: 10.1073/pnas.1202367109. 査読あり.

③ Yamaguchi J, Nishiyama S, Shimanuki M, Ono T, Sato A, Nakada K, Hayashi J, Yonekawa H, Shitara H. Comprehensive application of an mtDsRed2-Tg mouse strain for mitochondrial imaging. Transgenic Res. 2012; 21(2): 439-47. doi: 10.1007/s11248-011-9539-1. 査読あり.

④ Nakada K, Hayashi J. Transmitochondrial mice as models for mitochondrial DNA-based diseases. Exp Anim. 2011; 60(5): 421-31. <http://dx.doi.org/10.1538/expanim.60.421> 査読あり.

⑤ Imanishi H, Hattori K, Wada R, Ishikawa K, Fukuda S, Takenaga K, Nakada K, Hayashi

J. Mitochondrial DNA mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. PLoS One. 2011; 6(8): e23401. doi: 10.1371/journal.pone.0023401. 査読あり.

⑥ Imanishi H, Yokota M, Mori M, Shimizu A, Nakada K, Hayashi J. Nuclear but not mitochondrial DNA involvement in respiratory complex I defects found in senescence-accelerated mouse strain, SAMP8. Exp Anim. 2011; 60(4): 397-404. <http://dx.doi.org/10.1538/expanim.60.397> 査読あり.

⑦ Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M, Lee MS, Tanaka K, Komatsu M. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. J Cell Biol. 2011; 193(2): 275-84. doi: 10.1083/jcb.201102031. 査読あり.

⑧ Ishikawa K, Toyama-Sorimachi N, Nakada K, Morimoto M, Imanishi H, Yoshizaki M, Sasawatari S, Niikura M, Takenaga K, Yonekawa H, Hayashi J. The innate immune system in host mice targets cells with allogenic mitochondrial DNA. J Exp Med. 2010; 207(11): 2297-305. doi: 10.1084/jem.20092296. 査読あり.

⑨ Nishiyama S, Shitara H, Nakada K, Ono T, Sato A, Suzuki H, Ogawa T, Masaki H, Hayashi J, Yonekawa H. Over-expression of Tfam improves the mitochondrial disease phenotypes in a mouse model system. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 401(1): 26-31. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.143. 査読あり.

⑩ Yokota M, Shitara H, Hashizume O, Ishikawa K, Nakada K, Ishii R, Taya C, Takenaga K, Yonekawa H, Hayashi J. Generation of trans-mitochondrial mito-mice by the introduction of a pathogenic G13997A mtDNA from highly metastatic lung carcinoma cells. FEBS Lett. 2010; 584(18): 3943-8. doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.048. 査読あり.

⑪ Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M, Nakada K, Shitara H, Sou YS, Kimura M, Sato S, Hattori N, Komatsu M, Tanaka K, Matsuda N. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. Genes Cells. 2010; 15(8): 887-900.

doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01426.x.
査読あり.

⑫ Inoue S, Noda S, Kashima K, Nakada K, Hayashi J, Miyoshi H. Mitochondrial respiration defects modulate differentiation but not proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells. FEBS Lett. 2010; 584(15): 3402-9.
doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.036.
査読あり.

⑬ Ogasawara E, Nakada K, Hayashi J. Lactic acidemia in the pathogenesis of mice carrying mitochondrial DNA with a deletion. Hum Mol Genet. 2010; 19(16): 3179-89.
doi: 10.1093/hmg/ddq228.
査読あり.

〔学会発表〕(計8件)

- ①中田和人、林純一. ミトコンドリア糖尿病のマウス逆遺伝学. 第85回日本生化学会大会. 2012年12月14日. 福岡.
- ②中田和人、林純一. 病原性ミトコンドリアゲノム変異のマウス逆遺伝学. 第55回日本腎臓学会学術総会. 2012年6月2日. 横浜.
- ③ Nakada K, Hayashi J. Reverse genetic studies on mammalian mtDNA mutations. European Meeting on Mitochondrial Pathology (Euromit 8). 2011, 6, 21. Spain.
- ④ Nakada K. Reverse genetic studies on defects of mitochondrial central dogma. UCL-JSPS International Symposium. 2011, 2, 10. UK.
- ⑤中田和人、小笠原絵美、北潔、林純一. ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理. BMB2010, ワークショップ「ミトコンドリア研究の最前線: 基礎生命科学から臨床まで」. 2010年12月9日. 神戸.
- ⑥ Nakada K, Hayashi J. Mouse models of mtDNA defects. Mitochondrial Medicine 2010. 2010, 6, 18. Tokyo.
- ⑦中田和人. モデルマウスから得られた新知見. 第113回日本小児学会学術集会. 2010年4月23日. 横浜.
- ⑧中田和人、小笠原絵美、林純一. ミトコンドリア遺伝子疾患における乳酸産生とその病原性. 第32回日本分子生物学会大会ワークショップ「代謝適応と破綻に見る新たなミトコンドリア機能研究」. 2009年12月12日. 神戸.

〔図書〕(計1件)

- ①沼田治、千葉智樹、中野賢太郎、中田和人. 細胞生物学. 化学同人. 2012年4月. 総数203頁.

〔その他〕

ホームページ:

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 和人 (NAKADA KAZUTO)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 80323244

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし