

氏名(本籍)	おがさわら え み 小笠原 絵 美 (茨城県)			
学位の種類	博 士 (理 学)			
学位記番号	博 甲 第 5570 号			
学位授与年月日	平成 22 年 11 月 30 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	Studies on Pathogenicity of Lactate Overproduced by Mitochondrial Respiration Defects (ミトコンドリア呼吸不全によって過剰産生される乳酸の病原性についての研究)			
主 査	筑波大学教授	理学博士	林 純 一	
副 査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治	
副 査	筑波大学教授	博士(医学)	千 葉 智 樹	
副 査	筑波大学准教授	博士(理学)	中 田 和 人	

論 文 の 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアは生体エネルギーとして利用できる ATP の大部分を産生する細胞小器官であり、その内部には核外ゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) を複数コピー保持している。そのため、特定の病原性突然変異型 mtDNA の蓄積は細胞内の ATP 産生の低下を誘導し、結果としてミトコンドリア病と総称される全身性の代謝疾患を引き起こすことが知られている。しかしながら、ミトコンドリア病の報告からおよそ 50 年が経過しているにも関わらず、出生前遺伝子治療の有効性はモデルマウスを駆使して立証されているものの、病態発症した患者に対する有効な治療法の確立には至っていない。

ミトコンドリア病では、病原性突然変異型 mtDNA の蓄積に起因したミトコンドリア呼吸不全を回避するための代謝適応として解糖系での ATP 産生が亢進し、結果として過剰な乳酸産生が誘発される。乳酸は低酸素環境下の解糖系における最終代謝産物として広く認識されている。しかし近年、乳酸が筋再生や精子形成、神経栄養、創傷治癒などに深く関与する事実が報告されたことを発端に、乳酸は単なる最終代謝産物でなく、生体機能やその恒常性維持を担う極めて重要な因子であると認識され始めた。このような乳酸の生体機能を鑑みた場合、ミトコンドリア病における過剰な乳酸産生は病態の一症状でなく生体機能に対して病原性を有する可能性が考えられる。そこで本研究では、特定の病原性突然変異型 mtDNA を導入したモデル細胞及びモデルマウスを用いてミトコンドリア病において過剰に産生される乳酸の病原性を精査し、その回避によるミトコンドリア病の治療戦略の有効性評価を目的とした。

野生型 mtDNA から 4,696bp を欠失した mtDNA (Δ mtDNA) を高率に含有する細胞 (B82mt Δ) では、ミトコンドリア呼吸機能が低下し、培養上清に高濃度の乳酸が蓄積する。この B82mt Δ 細胞に、乳酸産生の抑制効果を有するジクロロ酢酸塩 (DCA) を処理したところ、 Δ mtDNA の蓄積によって低下していたミトコンドリア呼吸機能の回復が観察された。一方、野生型 mtDNA のみを含有する正常細胞を B82mt Δ 細胞の培養上清や高濃度の乳酸を添加した培地で培養したところ、ミトコンドリア呼吸機能の低下が観察された。これらの結果は、乳酸が少なくとも培養細胞のミトコンドリア呼吸機能に対して病原性を発揮する可能性を示唆し

ている。

培養細胞を用いた実験結果は、個体においても過剰な乳酸がミトコンドリア呼吸機能の低下を誘導している可能性を予想させるとともに、ミトコンドリア病における代謝適応の結果として捉えられていた高乳酸血症がミトコンドリア病の病態を悪化させる二次的な要因となる可能性を示唆している。そこで、 Δ mtDNAを導入したミトコンドリア病モデルマウス（ミトマウス）を用いて、このような仮説の検証を行った。DCA投与によってミトマウスの高乳酸血症を抑制したところ、PBSを投与したコントロール群のミトマウスと比較し、ミトコンドリア呼吸機能の明らかな回復、さらには病態発症の緩和や遅延が観察され、結果として最長4ヶ月の延命効果を見た。さらに、PBS投与群ではミトコンドリアバイオジェネシスに参与する遺伝子群（CaMK, PGC1 α , TFAM）やmtDNAコードの遺伝子の発現抑制、さらにはmtDNAコピー数の低下が観察され、一方、DCA投与群ではこれらの遺伝子の有意な発現回復、さらにはmtDNAコピー数の上昇が観察された。これらの結果は、1) ミトコンドリア病における過剰な乳酸産生はミトコンドリアバイオジェネシスを低下させる病原性を有していること、2) そのため過剰な乳酸産生の抑制は、低下していたミトコンドリアバイオジェネシスを正常化させ、結果としてミトコンドリア呼吸不全を改善させることを示している。また、ミトマウスにおけるミトコンドリア呼吸不全は Δ mtDNAの蓄積によって制御されている（閾値効果）ため、DCA投与群でみられたミトコンドリア呼吸不全の改善は、 Δ mtDNAの含有率が閾値以上であってもmtDNA分子のコピー数の増加による野生型mtDNA分子種の全体量の増加に伴って Δ mtDNAの欠失部位にコードされていた遺伝子産物が提供されることに起因すると考察できる。

以上の研究成果より、ミトコンドリア病の病態形成にはこれまで想定されてきた病原性突然変異型mtDNA分子種によるミトコンドリア呼吸機能の低下という主因に加え、この主因による代謝適応の結果、過剰産生される乳酸がミトコンドリア呼吸機能をさらに低下させるという新たな病態発症機構の提案に至った。さらに、ミトコンドリア病罹患患者の有効な治療法が確立されていない現在、本研究成果である高乳酸血症を抑制による二次的な病原性の回避戦略は対処療法として効果的である可能性を提示している。

審査の結果の要旨

本論文では、根本的な治療法が確立されていないミトコンドリア病という難病に対して細胞生物学的な研究結果の裏づけを基に一定の治療効果を証明し、ミトコンドリア病研究の飛躍に貢献している。また、代謝産物として一般的に認識されている乳酸に着目し研究を遂行した点は独創性に秀でてしていると評価した。そして、様々な実験結果からミトコンドリア病の病態発症機構に乳酸の二次的な病原性を提唱した点に新規性が認められることから、本論文は学問的価値が高いと判断できる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。