

氏名(本籍)	はし 橋	づめ 爪	おさむ 脩(群馬県)
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第6346号		
学位授与年月日	平成24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 Mice Carrying Exogenously-Introduced Mitochondrial DNA with a ROS-Generating Mutation (ROS産生を引き起こす変異型ミトコンドリアDNAを導入したマウスの研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	林 純一
副査	筑波大学教授	博士(理学)	中田和人
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治
副査	筑波大学教授(連携大学院)	博士(理学)	三好浩之

論文の内容の要旨

ミトコンドリアは好気呼吸により生体エネルギーである ATP を産生する細胞小器官であり、その内部にはミトコンドリア独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) を保持している。mtDNA は ATP 産生を行う呼吸酵素複合体の一部のサブユニットと、tRNA、rRNA をコードしている。このようにミトコンドリアは内部に独自のセントラルドグマを有しているため、mtDNA 突然変異はミトコンドリア機能に重大な影響を及ぼすと考えられている。

実際に特定の大規模欠失型突然変異や点突然変異が起こると、ミトコンドリア呼吸機能が低下し、ミトコンドリア病と総称される様々な病態を示すことが知られている。また近年では、神経変性疾患や糖尿病、がん組織、老化したヒトの組織においても mtDNA 突然変異の存在が報告されている。さらにミトコンドリア呼吸機能低下により過剰産生される乳酸や活性酸素種 (ROS) がこれらの多様な疾患に関与している可能性も報告されているが、mtDNA 突然変異と病態の因果関係を直接示した研究は存在しない。これらの疾患と mtDNA 突然変異の因果関係を解明するためには生体を用いた研究が必要不可欠であり、変異型 mtDNA を導入したモデルマウス (mito-mice) を用いた研究が有効である。

所属研究室ではこれまでに3系統の mito-mice を作製してきた。そのうちのひとつ、mito-miceND6^M は、Lewis Lung Carcinoma 由来の高転移細胞株に由来する mtDNA を保有するモデルであり、この mtDNA には呼吸酵素複合体 I のサブユニットである ND6 に点突然変異が存在している。この突然変異は呼吸酵素複合体 I の活性を低下させ過剰な ROS 産生を引き起こすことで、がん細胞に高転移能を与える性質をもっていることが報告されている。このため、mito-miceND6^M はミトコンドリア呼吸機能低下だけでなく、過剰な ROS 産生による病態が期待されるモデルである。

この mito-miceND6^M を解析することで、生体内における ROS 過剰産生を伴うミトコンドリア呼吸活性低下がどのような病態を引き起こすのか検証した。

20ヶ月齢の mito-miceND6^M を用いて複数の臓器で呼吸酵素の活性測定を行ったところ、呼吸酵素複合体 I において約 50% の活性低下が確認された。さらに骨髄と脾臓における ROS (O₂) の産生量の測定を行った

ところ、骨髄において B6 と比較し 130% 程度の ROS 産生が確認された。変異型 mtDNA の病原性が確認されたので、ミトコンドリア呼吸不全の指標である血中乳酸値の上昇と、変異型 mtDNA や ROS との関係が示唆されている糖尿病を発症するかを検証した。ROS の過剰産生が起こらない変異型 mtDNA を導入した *mito-miceCOI^M* と B6、*mito-miceND6^M* の 3 系統のマウスを用いて血中乳酸値、血糖値の比較を行ったところ、呼吸活性が低下している *mito-miceND6^M* と *mito-miceCOI^M* では、糖負荷後乳酸値が B6 より高く推移した。これは呼吸機能低下を補うために解糖系が亢進し、乳酸の産生量が増加するためである。しかし、血糖値は B6 と *mito-miceCOI^M* は正常の推移を示したのに対して、*mito-miceND6^M* では高血糖状態が長く続いた。*mito-miceND6^M* においてのみ高血糖が確認されたことから、呼吸欠損ではなく ROS の増加が高血糖の原因であると考えられる。このため、ROS を抑制する効果のある抗酸化剤 N-acetylcystein (NAC) を自由飲水にて 1 週間投与を行った後に再び糖負荷試験を行ったところ、NAC 投与を行った *mito-miceND6^M* は B6 と同様の正常な血糖値の推移を示した。このことから、変異型 mtDNA に起因する ROS 過剰産生がマウス生体内における高血糖症状を引き起こした原因と考えられる。

さらに、加齢時の変異型 mtDNA の影響を検証するために B6 と *mito-miceND6^M* を 35 個体ずつ用意し、寿命と死因を検証した。B6 と *mito-miceND6^M* の間では生存期間に有為な差は見られなかったが、*mito-miceND6^M* では脾臓や肝臓が肥大化している個体が多く見られた。B6 では 8.6% の個体に異常が認められたのに対して、*mito-miceND6^M* では 45.7% の個体で異常が認められた。これらは病理切片から血球の腫瘍であることがわかった。さらに肺や肝臓などにおいても同様の血球細胞の浸潤が確認された点や、抹消血の塗抹標本において白血病で確認されるような白血球の増加は確認されなかったことから、*mito-miceND6^M* が発症する病態はリンパ腫であるといえる。このリンパ腫組織切片の免疫染色を行った結果、*mito-miceND6^M* ではリンパ腫発症 16 個体のうち 15 個体が B 細胞由来であった。B6 はリンパ腫発症個体 3 個体のうち 2 個体が B 細胞由来であった。

これらのことから、*mito-miceND6^M* の変異型 mtDNA はマウス生体内において B 細胞性リンパ腫を発症させる特性があることがわかった。変異型 mtDNA を導入することで高頻度にリンパ腫を発症するのは *mito-miceND6^M* だけであり、*mito-miceCOI^M* のリンパ腫発症頻度は B6 と同程度であったことから、リンパ腫発症を引き起こしているのはミトコンドリア呼吸機能低下ではなく、ROS の過剰産生によるものと考えられる。

本研究で用いた *mito-miceND6^M* の mtDNA は過剰な ROS 産生を引き起こす特徴をもつ。さらにその ROS に起因すると考えられる高血糖とリンパ腫発症という重大な病態が現れることを証明した。これは長い間示唆されてきた糖尿病やがん発症と変異型 mtDNA の関係を直接的に証明する画期的な発見であると言える。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本学位論文において橋爪脩氏は、先行研究で明らかにされたがん転移に寄与する mtDNA の変異を導入したマウスを解析することで、加齢に伴って変異型 mtDNA が高血糖やリンパ腫発症を引き起こすことを発見した。これまでにも変異型 mtDNA とがんや糖尿病の関係は示唆されているが、直接的に証明した報告はない。そのため変異型 mtDNA を導入したマウスがリンパ腫や高血糖症状を発症することを発見した本研究は非常に価値が高い研究であると言える。またその病態が過剰産生される活性酸素種に起因している可能性を示唆しており、がんや糖尿病の病態発症機構の解明や新たな治療法の開発につながる非常に重要な知見を示したと言える。

平成 24 年 9 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。