

ミトコンドリア機能不全マーカーに関する基礎研究

須田和樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中田和人 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ミトコンドリアは外膜および内膜からなる二重の膜構造を呈している細胞小器官である。特に、内膜には呼吸酵素複合体 I ~ V が存在し、酸化的リン酸化反応によって、生体エネルギーである ATP の大部分を産生している。また、ミトコンドリアには独自のゲノム (ミトコンドリア DNA : mtDNA) が細胞あたり数百から数千コピー存在している。哺乳類の mtDNA には、呼吸酵素複合体 I、III、IV、V を構成する構造遺伝子とそれらの翻訳に必要な 2 種の rRNA と 22 種の tRNA がコードされている。

mtDNA に病原性突然変異が生じることで、ミトコンドリア病と総称される全身性の代謝疾患が発症することが知られている。ミトコンドリア病では、特定の病原性変異が生じた突然変異型 mtDNA 分子種が優位に蓄積することで、呼吸酵素複合体に異常が生じ、結果としてミトコンドリアから産生される ATP 量が顕著に低下してしまう。この ATP の産生低下がミトコンドリア病の病態形成の主因であると考えられている。

一方、病原性突然変異型 mtDNA 分子が優位に蓄積した状態では、細胞質における解糖系が増強され、代償的な ATP 産生が誘導される。このような状態では、前述のように、呼吸酵素複合体による電子伝達反応が正常に駆動していないため、TCA サイクルへのピルビン酸のリクルートが低下し、結果として、細胞質や血中の乳酸濃度が上昇してしまう。このような代謝転換によって誘導された血中乳酸値の上昇は、ミトコンドリア病の発見当初から診断マーカーとして利用されてきた。

乳酸は解糖系の最終産物であるため、ミトコンドリア病における血中乳酸値の上昇は代謝転換の結果であり、ミトコンドリア病の進展には寄与しないと認識されてきた。しかし、病原性欠失型 mtDNA 分子種を含有したミトコンドリア病モデルマウスを活用した所属研究室の先行研究において、代謝転換によって過産生された乳酸の除去によってミトコンドリア機能異常の緩和、ならびに、ミトコンドリア病の症度の軽減が観察されたことから、代謝転換によって過産生された乳酸はミトコンドリア病において二次的な病原性を発揮する Deconditioning 因子である可能性が提唱された。この結果を受け、現在、過産生された乳酸の低下、あるいは、細胞質の乳酸:ピルビン酸比の低下を誘導する化合物がミトコンドリア病の症状緩和や進行抑制に有効であるとして、臨床試験が実施されている。

ごく最近、ミトコンドリア病を罹患した患者集団では FGF21 と GDF15 の血中濃度が上昇することが報告され、この FGF21 と GDF15 がミトコンドリア病の新たな診断マーカーになるとして注目を集めている。FGF21 は多機能性細胞間シグナル因子であり、飢餓や糖脂質代謝異常の改善に寄与することが知られている。一方、GDF15 は TGF- β スーパーファミリーに属し、がん、腎疾患、心疾患などの様々な病態や、代謝をはじめとする多様な生物学的な機能に関与していることが知られている。

本研究では、細胞外 (血液中) に分泌される FGF21 ならびに GDF15 は、1) ミトコンドリア病の進行と同期して産生される

産物である、2) ミトコンドリア病の進行を促進 (悪化) させる病原性を有している、3) ミトコンドリア病の進行を抑制する生体機能を有している、という異なる 3 つの作業仮説を設定し、ミトコンドリア病における FGF21 ならびに GDF15 の生物学的な機能を解析することを最終目的とした。

【材料・方法】

培養細胞

HeLamtHeLa: ヒト由来である HeLa 細胞に薬剤処理を行って mtDNA を消失させて作製した ρ^0 HeLa 細胞に、HeLa 細胞の mtDNA を再度導入した細胞株。

HeLamt3243: ρ^0 HeLa 細胞に tRNA^{Leu(UUR)} の 3243 位に A から G への点突然変異を生じた病原性 mtDNA を導入した細胞株。本研究では A3243G の変異率が 65.5% と 100% の細胞を使用した。

- ① 3×10^4 cells の上記の細胞それぞれを 6-well dish に播種して、10 mM グルコースを含む RPMI 培地で 24 時間培養後、培地を、10 mM グルコースを含む PMI 培地、5 mM グルコースを含む RPMI 培地、5 mM グルコース+5 mM ガラクトースを含む RPMI 培地にそれぞれ置換し、24 時間、48 時間、72 時間後に培養上清および細胞を回収した。細胞はトリパンブルーによる染色後、細胞数を計測し経時的な変化を観察した。乳酸定量キット、GDF15 Human ELISA キット、FGF21 Human ELISA キットを用いて培養上清中に含まれる乳酸値、GDF15、FGF21 をそれぞれ定量した。
- ② 上記と同様の細胞および培養条件で培養した細胞を用いて、培地交換時に GDF15 ヒト組換えタンパク質、FGF21 ヒト組換えタンパク質をそれぞれ添加し、24 時間後、72 時間後に培養上清および細胞を回収した。細胞は上記と同様に細胞数を計測した。また、培養上清に含まれる ATP 量および乳酸値を測定した。

【結果】

得られた結果の詳細は発表会にて報告する。