

ミトコンドリア病モデルマウスを用いた加齢に伴う病態変遷に関する基礎研究

栗山 貴成 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石川 香 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ミトコンドリアは、外膜と内膜の二重膜を有する細胞小器官の1つであり、内膜に存在する呼吸酵素複合体による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、ミトコンドリアは核DNAとは異なるミトコンドリアDNA (mtDNA) と呼ばれる環状二本鎖構造のゲノムを細胞当たり数百から数千コピー有している。哺乳類のmtDNAには、呼吸酵素複合体を構成するサブユニットのうちの13種類の遺伝子と、それらの翻訳に必要な2種類のrRNA遺伝子と22種類のtRNA遺伝子がコードされている。

細胞や組織に含有されるmtDNAに特定の病原性突然変異が生じ、このような分子種が優位に蓄積すると、ミトコンドリアにおけるATP産生の低下やROSの過剰生産といったミトコンドリアの機能異常が引き起こされ、ミトコンドリア病と呼ばれる代謝疾患が発症する。

mtDNAに生じる病原性突然変異は多数同定されている。興味深いことに、mtDNA突然変異の種類ごとに一定の型がある、すなわち、変異種特異的な病型形成機構の存在が示唆されている。さらに、最近では、変異型mtDNAがミトコンドリア病にとどまらず、糖尿病、神経変疾患、がん、不妊症、老化など、多様な病態表現型を誘導する可能性が提案されるに至っている。しかし、mtDNAに生じる突然変異の病原性はミトコンドリア呼吸機能の異常という共通の一次現象を原因とするため、なぜ変異型mtDNAが変異種特異的な病型を形成できるか、さらには、どのようにして多様な病態を誘導するのか、といった根源的な命題は解決されていない。この命題に答えるためには、病原性突然変異型mtDNAを導入したモデルマウスを樹立し、それらの病態解析を通して変異型mtDNA分子種特異的な病態発症機構を検証する必要がある。

このような状況の中、所属研究室では、mtDNAに突然変異を有するモデルマウスを複数樹立することに成功している。私は最近作製されたmtDNAのtRNA遺伝子領域に点突然変異をもつモデルマウスに注目した。tRNA遺伝子領域は病原性突然変異のホットスポットとなっており、当該モデルマウスと相同な突然変異を有する患者例ではミオパチーや筋力低下をはじめとする筋障害や、高乳酸血症、および、呼吸酵素複合体Iの活性低下などを発症することが報告されている。

成熟期(10カ月齢)の当該モデルマウスにおける病態解析を行った所属研究室の先行研究では、肝機能の低下と共に肝重量の有意な増大や脂肪滴の蓄積が確認されており、脂肪肝を発症していると考えられた。一般に肝臓の病態は、脂肪肝から肝炎となり、肝線維化が重篤化することにより肝硬変へと遷移し、最終的には肝がんに至るとされている。すなわち、当該モデルマウスの加齢に伴って、肝臓の病態は脂肪肝からさらに遷移していく可能性が考えられる。しかし、10カ月齢を超えたモデルマウスの病態解析は行われていないため、成熟期から老齢期にかけて病態の遷移があるのかということは明らかにされていない。

そこで本研究では、成熟期に病態が確認された肝臓に着目して老齢個体の肝臓の病態解析を行うことにより、tRNA遺伝子領域の点突然変異を原因とする肝臓の病態が加齢に伴って変遷(悪化)するか否かを検証した。

【方法】

10カ月齢時点での当該モデルマウスの病態解析を行った先行研究では、tRNA遺伝子領域の突然変異含有率が50%未満の場合は目立った病態を示さず、突然変異率が50%以上の場合にのみ、脂肪肝などの病態が現れることが示されている。そこで、本研究においても4週齢時の尾組織に含まれる変異型mtDNAの割合に従い、下記の通り実験群を設定した。

	% Low	% High
変異型 mtDNA 含有率	< 50%	≥ 50%

① サンプルング

体重計測後の20カ月齢の当該モデルマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、肝臓を採取した。採取した臓器の重量を計測し、組織学的な解析のためのサンプルとした。

② 脂肪肝の有無

摘出した肝臓からパラフィン切片を作製し、HE染色を行った。また、透過型電子顕微鏡による観察も行い、微小な脂肪滴の有無についても検討した。

③ 肝線維化の検証

摘出した肝臓のパラフィン切片を作製し、膠原繊維を赤染するピクロシリウスレッド染色を実施した。

【結果】

詳細な結果と考察については発表会にて報告予定である。