

<シンポジウム 10—3> ミトコンドリア病治療の現況と将来

## 治療戦略のためのモデル動物

中田 和人 佐藤 晃嗣 林 純一

**要旨：**ミトコンドリア病の多くの症例から特定の点突然変異や欠失突然変異を有したミトコンドリア DNA (mtDNA) が検出されている。さらに、糖尿病や神経変性疾患の発症や個体老化にも変異型 mtDNA の関与が示唆されており、ミトコンドリアゲノム変異と多様な病態との因果関係が注目を集めている。このような状況の中、われわれは世界に先駆けて病原性欠失突然変異型 mtDNA (欠失型 mtDNA) を導入したマウス (ミトマウス) の作製に成功した。欠失型 mtDNA を 80% 以上含有するミトマウスはミトコンドリア病でみられるような多様な病態を発症することから、ミトマウスはミトコンドリア病のモデルマウスであると結論できた。ミトマウスの登場によって、ミトコンドリア病の病態発症機構の解明だけでなく、効果的な治療法を探索するための環境がようやく整ったといえる。

(臨床神経, 48 : 1013—1015, 2008)

**Key words：**ミトコンドリアゲノム変異, 呼吸不全, ミトコンドリア病, モデルマウス, 核移植治療

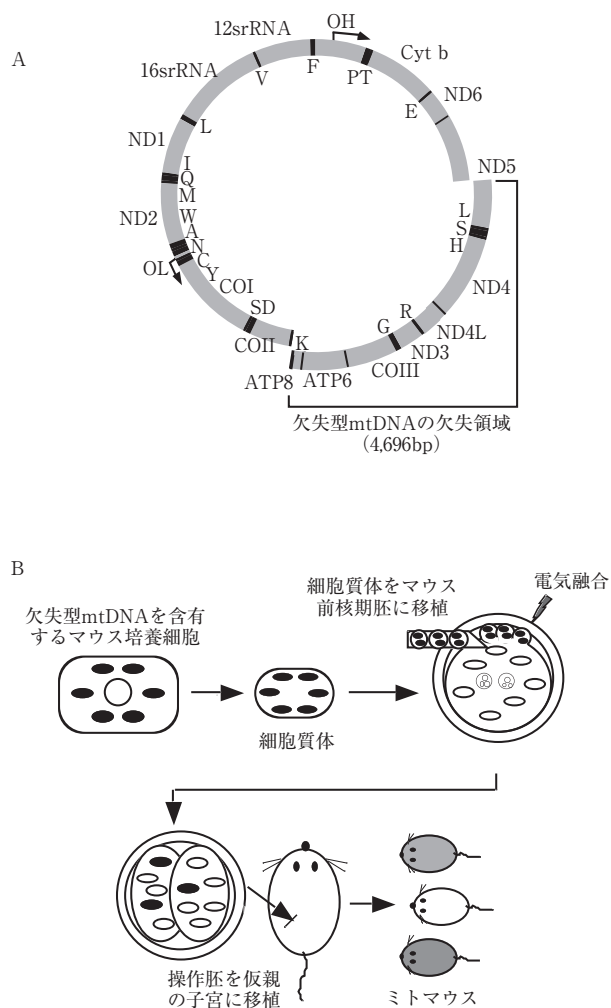
ミトコンドリア病の多くの症例では mtDNA にコードされた特定の遺伝子の点突然変異や大規模欠失突然変異がみられ、同様の変異型 mtDNA が糖尿病、パーキンソン病やアルツハイマー病といった神経変性疾患、そして老化個体からも散見されていることから、mtDNA の突然変異に起因するミトコンドリア呼吸機能異常が多様な病気の原因になっている可能性が出てきている<sup>1)</sup>。このような可能性を検証し、詳細な病態発症機構を解明するためには、変異型 mtDNA を導入した逆遺伝学的なモデルマウスの活用がもっとも有効な戦略となる。ところが、ミトコンドリア外膜と内膜に完全に閉ざされたミトコンドリアマトリックスに、それも複数コピー存在する mtDNA に人為的な突然変異を導入することはきわめて困難であることから、変異型 mtDNA を含有したモデルマウスの作出は不可能であると考えられてきた。

このような状況の中でわれわれは、マウス培養細胞に体細胞突然変異によって生じていた欠失型 mtDNA (Fig. 1A) をミトコンドリアごとマウス初期胚導入するという画期的な方法を駆使して、欠失型 mtDNA を含有するミトコンドリア病モデルマウス (ミトマウス) の作製に成功した (Fig. 1B)<sup>2)</sup>。ミトマウスは、ヒトのミトコンドリア病でみられる common deletion 型の mtDNA と類似した欠失型 mtDNA (全長 16.3 kb のうち 4,696bp を欠失) と野生型 mtDNA の両方を有するヘテロプラズミーマウスである。欠失型 mtDNA は mtDNA がコードする複合体 I, III, IV, V の構成サブユニットである 13 種の構造遺伝子のうちの 7 つの構造遺伝子と、それらの翻訳に必要な 6 種の tRNA 遺伝子を欠失している (Fig. 1A)。このため、欠失型 mtDNA の病原性は mtDNA がコードする 13 種の構造遺伝子の翻訳異常を介したミトコンドリア呼吸不全として表現される<sup>2)3)</sup>。

ミトマウスに導入されている欠失型 mtDNA は母性遺伝

によってランダムに子孫に伝搬されるため、出生したミトマウス集団では個体ごとに欠失型 mtDNA の含有率がことなっている<sup>2)~4)</sup>。つまり、ミトマウス集団においては欠失型 mtDNA の含有率が変数となる。したがって、たとえば、欠失型 mtDNA の含有率の高いミトマウスで何らかの病態が確認されたばあい、その病態はすべて導入した欠失型 mtDNA によるミトコンドリア呼吸不全に原因があると結論することができる。結果として、含有率が 70% 以下のミトマウスは正常な表現型を呈するが、含有率が 70% を超えると軽度のミトコンドリア呼吸異常と乳酸血症を呈し、80% を超える個体では全身性の呼吸不全によるミトコンドリア病の症状を主体とする多様な病態表現型 (低体重、全身性のミトコンドリア呼吸機能異常、高乳酸血症、貧血、運動障害、ミオパチー、難聴、心伝導障害、腎不全、雄性不妊など) を呈する<sup>2)~7)</sup>。

現状、変異型 mtDNA を起点としたミトコンドリア病の治療としては、呼吸鎖酵素の基質やビタミン類の投与などがおこなわれている。しかし、このような戦略では根本的な原因である変異型 mtDNA を取り除くことはできない。そこで着目したのが卵に対する出生前遺伝子治療である。mtDNA は母性遺伝するため、変異型 mtDNA を保有するミトコンドリア病の母親からの子孫は変異型 mtDNA だけでなくミトコンドリア病も受け継いでしまう可能性が高い。しかし、卵において変異型 mtDNA の割合を減らすことができれば、子孫のミトコンドリア病の発症を軽減または抑制できる可能性がある。ミトマウス受精卵に含有される欠失型 mtDNA の割合を低下させる方法としては、除核した正常なマウス卵 (野生型 mtDNA のみを含有する) にミトマウス受精卵の核を移植する方法をとった<sup>8)</sup>。核移植の際には核の周囲の欠失型 mtDNA をふくむミトコンドリアも同時に持ち込まれることになるが、その割合は卵全体のミトコンドリアの約 6% であり、呼吸



**Fig. 1** マウス欠失型 mtDNA の遺伝子地図とミトマウスの作製方法

A, マウス欠失型 mtDNA の変異部位.

mtDNA には 13 種の構造遺伝子 (複合体 I を構成する ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6; 複合体 III を構成する Cytb; 複合体 IV を構成する COI, COII, COIII; 複合体 V を構成する ATP6, ATP8), 2 種類の rRNA (12SrRNA, 16SrRNA) 遺伝子, 22 種類の tRNA 遺伝子が存在している. ミトマウスに導入されている欠失型 mtDNA は, tRNA-Lys 遺伝子 (K) から ND5 遺伝子に至る外側の弧で示した領域の 4,696bp を欠失している.

B, ミトマウスの作製方法.

野生型 mtDNA のみをもつミトコンドリアを白色で, 欠失型をもつミトコンドリアを黒色で示した.

活性の低下をひきおこすことはないと予想された. さらに, 細胞内の個々のミトコンドリアは互いに分裂・融合をくりかえし, 内容物を交換すること (ミトコンドリア間相互作用) が可能なため<sup>3)9)</sup>, 持ち込まれた約 6% のミトコンドリアは正常なミトコンドリアと相互作用し, 正常な呼吸活性をもつミトコンドリアになると考えられる.

欠失型 mtDNA を 35% 程度含有するミトマウスの受精卵をそのまま発生させると, 欠失型 mtDNA は出生時に 65%

に増加し, 8 カ月齢には 80% を超え, ミトコンドリア病を発症し, 死亡してしまう. 欠失型 mtDNA は野生型のそれにくらべ, 分子サイズが小さいため複製の効率が良い<sup>2)</sup>. そのため, 時間 (発生) とともに欠失型 mtDNA の含有率は増加してしまうのである<sup>4)</sup>. 一方, 欠失型 mtDNA を 35% 程度含有するミトマウスの受精卵の核を正常マウスの受精卵に移植すると, 欠失型 mtDNA は出生時に 11% 程度にまで減少し, その後, 1 年を超えても 20% 程度にしか増加しなかった. また, このような個体ではミトコンドリア病に特徴的な臨床症状はまったく観察されず, 正常マウスと同様の寿命を有していた. つまり, 核移植によって受精卵における欠失型 mtDNA を減少させれば, ミトコンドリア病の諸症状を完全抑制できると結論できた<sup>8)</sup>.

哺乳類の mtDNA は母性遺伝するため, 個体にふくまれる mtDNA は単一の分子集団である (個々の分子にはことなる体細胞突然変異が生じていることはある). しかし, 核移植治療によって誕生した個体には元の受精卵由来と移植先の受精卵由来の 2 種の mtDNA 分子種が混在してしまうことになる. その上, 先行研究においてわれわれは, 哺乳類個体の細胞では mtDNA 分子間の組換えがおこることを実験的に示している<sup>10)</sup>. したがって, 核移植に治療をおこなったばあい, 第三者の mtDNA 分子だけでなく, 組換えによって生じた新たな分子種を形成する可能性がある. このような mtDNA 分子種の混在による病原性の検証が今後の大きな研究課題である.

## 文 献

- Wallace DC: Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999; 283: 1482—1488
- Inoue K, Nakada K, Ogura A, et al: Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nature Genet* 2000; 26: 176—181
- Nakada K, Inoue K, Ono T, et al: *Inter*-mitochondrial complementation: mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nature Med* 2001; 7: 934—939
- Sato A, Nakada K, Shitara H, et al: Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germcells with age. *Genetics* 2007; 117: 2031—2037
- Nakada K, Sato A, Sone H, et al: Accumulation of pathogenic  $\Delta$ mtDNA induced deafness but not diabetic phenotypes in mito-mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 175—184
- Nakada K, Sato A, Yoshida K, et al: Mitochondria-related male infertility: Normal mitochondrial respiration is required for mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 15148—15153
- Inoue SI, Yokota M, Nakada K, et al: Pathogenic mtDNA-induced respiration defects in bone marrow cells result in

- anemia by suppressing erythroid proliferation and maturation. *FEBS Lett* 2007; 581: 1910—1916
- 8) Sato A, Kono T, Nakada K, et al: Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16765—16770
- 9) Sato A, Nakada K, Akimoto M, et al: Rare creation of recombinant mtDNA haplotypes in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 6057—6062
- 10) Ono T, Isobe K, Nakada K, et al: Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nature Genet* 2001; 28: 272—275

### Abstract

#### A model mouse for mitochondrial DNA-based diseases

Kazuto Nakada, Ph.D., Akitsugu Sato, Ph.D. and Jun-Ichi Hayashi, Ph.D.  
Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Patient studies suggested that accumulation of pathogenic mitochondrial (mt) DNAs having large-scale deletion or point mutation and the resultant mitochondrial respiratory abnormalities are associated with a wide variety of disorders, such as mitochondrial diseases, neurodegenerative diseases, diabetes, and aging. Although the pathogenicities of these mtDNA mutations were proved by co-transmission of the mutant mtDNAs and respiration defects to human mtDNA-less cells, there is as yet no convincing reverse genetic evidence to explain whether accumulation of these pathogenic mutant mtDNAs in tissues is responsible for the expressions of various clinical phenotypes. In such situation, we have succeeded in generating mice with pathogenic deletion mutant mtDNA, named “mito-mice”, by introduction of mitochondria with mtDNA which is deleted 4,696 bp (nt 7,759-12,454) including 6 tRNA genes and 7 structural genes (del-mtDNA). In the mito-mice, del-mtDNA was transmitted maternally, and its accumulation induced mitochondrial dysfunction in various tissues, resulting in mitochondrial disease phenotypes, such as low body weight, lactic acidosis, ischemia, myopathy, heart block, deafness, male infertility, and renal failure. Thus, mito-mice are the first model animal for mtDNA-based diseases, and the mice should be valuable for screening effective drugs and testing therapies.

(*Clin Neurol*, 48: 1013—1015, 2008)

**Key words:** mutated mtDNA, respiration defects, mitochondrial diseases, model mouse, nuclear transplantation therapy

---