

本研究成果のポイント

- 日本人ミトコンドリア病症例のゲノム解析を行い新たな原因遺伝子を同定
- *NDUFA8* 異常が引き起こすミトコンドリア機能破綻のメカニズムを解明
- ミトコンドリア病の病態解明と診断法・治療法の開発に期待

概要

千葉県こども病院代謝科の村山圭部長は、順天堂大学 難病の診断と治療研究センター 岡崎康司教授、埼玉医科大学小児科 大竹明教授らとの共同研究により、発達遅滞・小頭症・てんかんを併発する日本人のミトコンドリア病^{*1}の新たな病因遺伝子として *NDUFA8* 遺伝子を同定しました。また、*NDUFA8* タンパクの減少がミトコンドリア呼吸に必要な呼吸鎖複合体 I^{*2} 全体の欠損を引き起こすことを明らかにしました。本成果は、ミトコンドリア呼吸鎖異常の新たな発生メカニズムを明らかにしたことで、本疾患の病態解明と診断法・治療法の開発につながることを期待されます。本論文は *Clinical Genetics* 誌の8月号に掲載される予定です。

背景

ミトコンドリアの機能低下が原因となって発症する疾患を総称してミトコンドリア病と呼びます。新生児期・乳幼児期に発症する重篤なタイプから成人期に顕在化する軽症なタイプまで様々ですが、多くは共通の特徴として筋肉や神経に症状が見られます。

村山部長らの研究グループは十数年にわたり、順天堂大学（岡崎康司教授）、埼玉医科大学（大竹明教授）と共同で、全国から寄せられるミトコンドリア病疑い症例の生化学診断^{*3}と遺伝子診断に取り組んで来ました。ミトコンドリア病の原因遺伝子はミトコンドリア DNA だけでなく、核の DNA にも存在しており、これまでに 350 を超える原因遺伝子が明らかにされていること、またミトコンドリア病の遺伝形式も様々である（ミトコンドリア遺伝、常染色体顕性遺伝、常染色体潜性遺伝、X連鎖遺伝）ことから、ミトコンドリア病の遺伝子診断は大変複雑なものとなっています。今回の症例のように新規の原因遺伝子を同定した場合は「確かに疾患の原因であること」を証明しなければならず、多角的な機能解析実験を必要とします。

本研究では、研究グループに寄せられた発達遅滞・小頭症・てんかんを併発する日本人ミトコンドリア病症例を対象に生化学診断とゲノム解析を組み合わせ、新規の原因遺伝子の探索と病態解明を目指しました。

発表の内容

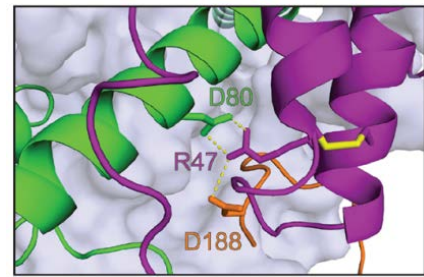
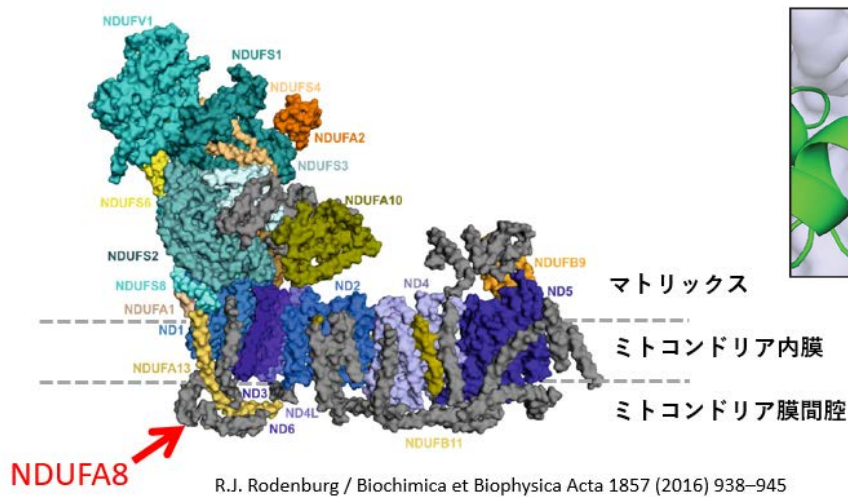
今回、発達遅滞・小頭症・てんかんを併発する日本人ミトコンドリア病症例の血液から抽出したゲノム DNA を対象に全エクソーム解析^{*4}を実施しました。その結果、核ゲノム上に *NDUFA8* 遺伝子を新たな原因遺伝子として同定しました。

ミトコンドリアでは、4つの呼吸鎖複合体が酸化還元反応（呼吸鎖複合体 I-IV）に沿って電子

を運び、ATP を産生する“酸化的リン酸化 (OXPHOS)”が行われています。呼吸鎖複合体 I は、45 個のサブユニットで構成される最大の呼吸鎖複合体です (図 1)。本研究グループがこれまでに蓄積してきたミトコンドリア病の生化学診断データ (症例数 650 超) によると、ミトコンドリア呼吸鎖に異常が見られた症例のおよそ 8 割で、この呼吸鎖複合体 I の活性が消失あるいは低下していました。本症例については遺伝子診断に先だって生化学診断が行われ、患者皮膚線維芽細胞のミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の酵素活性が正常レベルの約 3 割に低下していることがわかりました。NDUFA8 タンパクはミトコンドリア膜間腔に存在しますが (図 1 矢印で示す位置)、今回同定された遺伝子変異の部位についてタンパク質の機能解析を行なったところ、NDUFA8 タンパクの減少により呼吸鎖複合体全体の形成に異常 (欠損) を認め、呼吸鎖複合体 I の他の構成タンパクと結合する上で重要なアミノ酸であることがわかりました (図 1 右)。

呼吸鎖複合体 I 欠損症の最も一般的な症状としては、大脳基底核や脳幹の病変、呼吸器異常、筋力低下、発育不全、痙攣、高乳酸血症などが挙げられます。本症例の脳 MRI 所見では脳梁の菲薄化と小脳萎縮を認めました (図 2)。

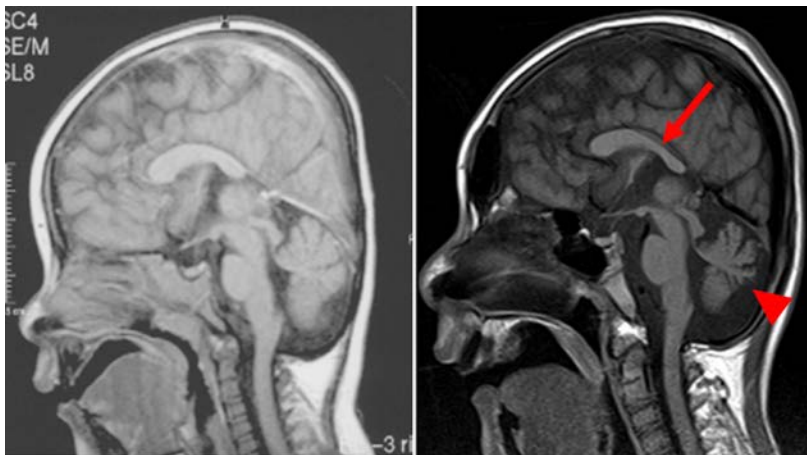
以上の結果から、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の構成タンパクの 1 つである NDUFA8 が遺伝子変異によって失われると、呼吸鎖複合体 I のみならず複合体全体の形成にまで影響が及び、患者の細胞ではミトコンドリア活性が失われ、発達遅滞・小頭症・てんかんを引き起こしていることが明らかになりました。



紫：NDUF8
 オレンジ：NDUFA13
 緑：NDUF5

NDUF8 タンパクのアルギニン (R47) がシステインに置換される変異が同定された。
 R47 の側鎖は呼吸鎖複合体 I の形成において他のタンパクとの相互作用に重要である。

図1 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I
 左：ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I における NDUF8 の位置
 右：NDUF8 の変異箇所 の構造模式図



発達遅滞・小頭症・てんかんを併発する日本人ミトコンドリア病症例 (24 歳で本研究グループに紹介)

脳 MRI 所見では、脳梁が菲薄化し (矢印)、小脳萎縮 (矢尻) が認められた。

図2 脳 MRI の T1 強調画像*5 (左：3 歳時、右：19 歳時)

今後の展開

本成果は、ミトコンドリア病の中で最も多い、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 活性低下の発生メカニズムの一端を新たに明らかにしたことで、本疾患の病態解明と診断法・治療法の開発につながることを期待されます。

ミトコンドリア病の遺伝子診断は大変複雑で、本研究では全エクソーム解析により新規原因遺伝子の同定に成功しましたが、より多くの患者がより早期に遺伝子診断を受けるためには、全エクソーム解析とミトコンドリア病の既知原因遺伝子を包括的に解析するパネル解析*6 の両方の整備が必要です。本研究グループで実施中のパネル解析は、現在、保険収載と民間会社への技術移管を目指した開発が進められています。また、症例ごとにより効果的なプラットフォーム選択（全エクソーム解析か、パネル解析）が行えるよう、臨床所見のスコア化と、スコアに応じたプラットフォーム選択基準の整備にも取り組んでいます。

用語解説

***1 ミトコンドリア病：**ミトコンドリア病とは、ミトコンドリアの働きが低下することが原因で起こる病気の総称です。エネルギー代謝系(ミトコンドリア呼吸鎖)の先天代謝異常症です。出生 5,000 人に 1 人の割合で発症し、いかなる臓器・組織、年齢、遺伝形式でも発症します。特に幼少時期発症例は症状が多様で重篤致死の症例が多いことが知られています。

***2 呼吸鎖複合体 I：**ミトコンドリアで ATP を産生する呼吸鎖複合体 I-IVのうち、45 個のサブユニットで構成される最大の呼吸鎖複合体です。ミトコンドリア病では呼吸鎖複合体 I の異常によるものが多いとされます。

***3 生化学診断：**ミトコンドリア病の生化学診断として、ミトコンドリア呼吸鎖の酵素活性や呼吸鎖複合体タンパクの量に異常があるかどうかを調べます。患者皮膚から樹立した皮膚線維芽細胞を使用することが多いですが、生検組織や剖検組織を使用することもあります。

***4 全エクソーム解析：**全エクソーム解析(Whole exome sequencing; WES)は、ゲノムの中でタンパク質をコードするエクソン領域(ヒトゲノムのうち 2%未満に相当)を選択的に配列解読する手法です。エクソンは、きわめて重要な領域のため、ここに多くの疾患の原因となる変異が存在しています。

***5 T1 強調画像：**MRIではT1強調画像とT2強調画像をセットにして撮影し、その組み合わせで組織を特定します。T1強調画像では脂肪や骨髄が白く写り、組織の形状を明瞭に捉えることができます。

***6 パネル解析：**全エクソーム解析が、全遺伝子のエクソン領域を網羅的に配列解読するのに対して、パネル解析では、特定の疾患(ここではミトコンドリア病)の原因遺伝子群に絞ってエクソン領域を調べます。ミトコンドリア病のパネル解析の場合は核にコードされた原因遺伝子およそ 350 の他、ミトコンドリア DNA 全長およそ 16kb も対象に含みます。標的領域を絞っているので、全エクソーム解析に比べて配列解析が簡便でコストも低く抑えることが出来ますが、既知の原因遺伝子のみを解析対象としているため新規原因遺伝子を見付けることは出来ません。

《本研究に係わる発表》

原著論文

本研究は *Clinical Genetics* 誌の 8 月号に掲載される予定です。

タイトル: A homozygous variant in *NDUFA8* is associated with developmental delay, microcephaly, and epilepsy due to mitochondrial complex I deficiency

タイトル(日本語訳): *NDUFA8* ホモ接合型変異は、ミトコンドリア複合体 I 欠損による発達遅滞、小頭症、てんかんに関連する

著者: Yukiko Yatsuka, Yoshihito Kishita, Luke E. Formosa, Masaru Shimura, Fumihito Nozaki, Tatsuya Fujii, Kazuhiro R. Nitta, Akira Ohtake, Kei Murayama, Michael T. Ryan, Yasushi Okazaki

著者(日本語表記): 八塚由紀子 1)2), 木下善仁 1)2), Luke E. Formosa 3), 志村優 4), 野崎章仁 5), 藤井達哉 5), 新田和広 1)2), 大竹明 6)7), 村山圭 4), Michael T. Ryan 3), 岡崎康司 1)2)8)

著者所属: 1) 順天堂大学 難病の診断と治療研究センター、2) 順天堂大学大学院医学研究科 難治性疾患診断・治療学講座、3) Monash University Department of Biochemistry & Molecular Biology、4) 千葉県こども病院 代謝科、5) 滋賀県立小児保健医療センター 小児科、6) 埼玉医科大学 難病センター、7) 埼玉医科大学 小児科学・ゲノム医療学、8) 国立研究開発法人 理化学研究所 生命医科学研究センター 応用ゲノム解析技術研究チーム

DOI: 10.1111/cge.13773

本研究は、AMED 難治性疾患実用化研究事業 (JP20ek0109468, JP19ek0109273)、AMED 臨床ゲノム情報統合データベース整備事業 (JP19kk0205014)、AMED ゲノム創薬基盤推進研究事業 (JP20kk0305015)、等の支援を受け、多施設との共同研究の基に実施されました。

また、本研究にご協力いただいた皆様に深謝いたします。