

## 論文の内容の要旨

論文題目 Identification and biological characterization of an Indonesian family with Leber's hereditary optic neuropathy

(インドネシアにおけるレーベル病家系の同定と生物学的解析)

氏名 西岡 朋生

ミトコンドリア病とは、細胞内のミトコンドリアの異常が原因となり、脳・神経系、心筋・骨格筋に起こる様々な障害を生じる疾患であり、CPEO・MELAS・MERRF 等がある。レーベル病もこれらミトコンドリア病のひとつで、主に 15~40 歳に発症し、急性の視力低下とそれに伴う視神経の萎縮が起こる。他のミトコンドリア病と比べ、視神経以外の神経・筋にほとんど異常が見られないこと、男性患者の割合が高い（患者の 80%が男性）ことが特徴となっている。レーベル病にはミトコンドリア DNA 上に 3 つの特異的遺伝子変異（G11778A・G3460A・T14484C）が見つかっており、これらの変異はすべてミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 I のサブユニットをコードする遺伝子上にある。レーベル病の報告・研究は、ヨーロッパで多くされているが、東南アジアにおける報告は少ない。インドネシアにおいて 6 世代にわたる家族性視力障害を有する家系が見つかった。本研究では、この家系の家族性視力障害がレーベル病であると同定し、この家系から得られた血液試料から DNA の抽出・株化 B 細胞の樹立を行い、これらの試料を用いてレーベル病についての生物学的解析を行った。

12 人の盲目患者を含めた 43 の DNA について、PCR-PFLP 法・Direct sequencing 法によるスクリーニングを行った結果、母系家族全員がミトコンドリア DNA 上に T14484C 変異をホモプラスミーの形で持つことが示され、この家系の家族性視力障害はレーベル病であることが明らかになった。この家系でのレーベル病の浸透率は 33.3%、患者の 75%が男性であった。また、この母系家族のミトコンドリア DNA はハプログループ M に属することが示

された。レーベル病を発症した母親と、発症していない母親の子供における発症率には差はなかった。

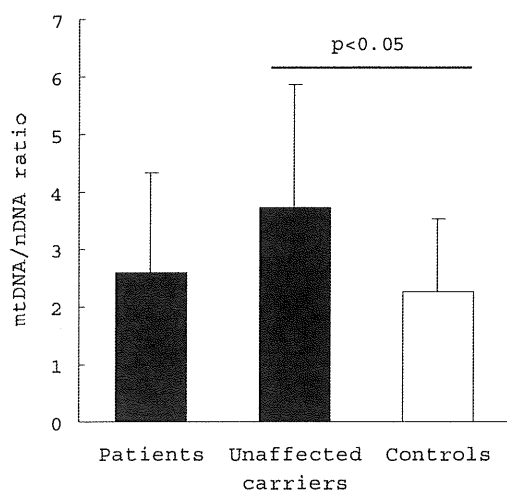


図1 末梢血細胞のmtDNA/nDNA ratio (平均+SD)。患者のミトコンドリア DNA 量は変化がないが、非発症変異保持者のものが対照群に比べ有意に多かった (Mann-Whitney test)。レーベル病特異的変異以外に非発症変異保持者のみがミトコンドリア DNA 量を変化させる要因を持っていた可能性は完全には否定できないものの、一つの村に住む家系を用い、対照群も患者の家族を用いており、環境要因や核遺伝子が 3 群間で類似していることから、非発症変異保持者におけるミトコンドリア DNA 量の増加は、レーベル病特異的変異による呼吸鎖酵素複合体 I の活性低下に対する補償作用と考えられる。G11778A 変異保持者の末梢血のミトコンドリア DNA 量が増加しているという報告も、この呼吸鎖酵素複合体 I の活性低下に対する補償作用という考えを支持する。T14484C 変異保持者の非発症者のミトコンドリア DNA 量が多いことについては、補償作用によるミトコンドリア DNA 量の増加は人によって異なり、視神経である程度までミトコンドリア DNA 量が増加した人はレーベル病の発症率が低下する、または増加したミトコンドリア DNA がレーベル病発症に伴い低下する可能性がある。このように T14484C 変異を持つレーベル病ではミトコンドリア DNA 量とレーベル病発症との間に関連があることが示された。また、G11778A 変異と T14484C 変異との間で相違があることから、変異によってレーベル病発症に関連する要素の関連度が異なることが示された。加齢によるミトコンドリア DNA 量の変化も調べたが、年齢とミトコンドリア DNA 量との間に有意な相関はなかった。

ミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 I の異常は、酵素活性の低下のほかに活性酸素種の放出量を増加させる。そこで、レーベル病と酸素ストレスとの関連を調べるために、末梢血から樹立した B 細胞株を用いて、レーベル病特異的変異保持細胞の酸化ストレスに対する感受性を調べた。B 細胞株を様々な濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 10 分間処理したところ、24 時間後・48 時間後の細胞の生存率は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度依存的に低下した。0.1mM・0.2mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度下では、

G11778A 変異を持つ集団の末梢血ミトコンドリア DNA 量は患者・非発症変異保持者ともに対照群のものに比べ増加しているという報告があり、レーベル病特異的変異を持つことでミトコンドリア DNA 量が増加することが示唆されている。今回、T14484C 変異を持つ家系について、リアルタイム PCR 法により末梢血における核 DNA あたりのミトコンドリア DNA 量を調べ、レーベル病患者・非発症変異保持者・対照群間で比較したところ、患者のミトコンドリア DNA 量は

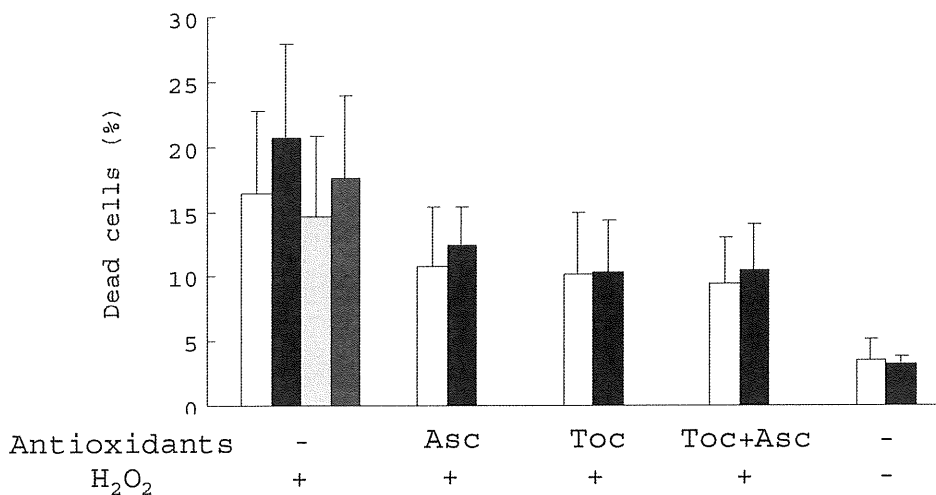


図2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理による細胞死と抗酸化剤の効果。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理から24時間後の死細胞の割合を示した。  
 □: 対照群 ■: T14484C変異保持細胞 ▨: 対照群+THF ▩: T14484C変異保持細胞+THF。  
 THF (テトラヒドロフラン) はα-tocopherolの溶媒として用いた。Asc: 10μM ascorbic acid 2-phosphate Toc: α-tocopherol+THF

T14484C 変異保持細胞の生存率は対照群に比べ有意に低下し (Man-Whitney test)、T14484C 変異保持細胞は酸化ストレスに対する感受性が高いことが示された。酸化ストレスの核への影響を調べるために H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理から 24 時間後の染色体異常の数を数えたところ、染色体異常数は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度依存的に増加したものの、T14484C 変異保持細胞と対照群との間で差はなかった。これらのことから、T14484C 変異保持細胞における生存率の大きな低下は、核の損傷のためではなくほかの細胞内小器官、おそらくミトコンドリアの損傷によると考えられる。酸化ストレスに対する抗酸化剤の効果調べるために、ascorbic acid 2-phosphate・α-tocopherol で前処理を行った細胞の酸化ストレスに対する感受性を調べた。抗酸化剤処理により H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理による死細胞の割合は低下した。T14484C 変異保持細胞では死細胞の割合が大きく低下し、抗酸化剤処理をしていないもので見られた対照群との差は抗酸化剤処理を行ったものでは見られなくなった。コメントアッセイ法により、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理から 1 時間後の DNA 損傷を測定したところ、抗酸化剤処理では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理による DNA 損傷は変化せず、また、T14484C 変異保持細胞と対照群との間にも DNA 損傷に差はなかった。培地に抗酸化剤を添加するという今回の方法では、抗酸化剤の効果は核内にまでは達しなかったと推測される。B 細胞株の酸化ストレスに対する感受性と、もとの末梢血のミトコンドリア DNA 量との関連を調べた結果、酸化ストレスによる細胞の生存率の低下の度合いと末梢血のミトコンドリア DNA 量との間には相関は見られなかった。B 細胞株のミトコンドリア DNA 量は、株化の過程もしくは培養下において変化し、もとの末梢血のミトコンドリア DNA 量と B 細胞株の酸化ストレスに対する感受性との関連はなくなっていると考えられる。

レーベル病では男性患者の割合が高いことが知られており、本研究の対象のレーベル病家系においても、男性患者数が有意に多かった。レーベル病の男性患者数が多くなる要因を見つけるために、ミトコンドリア DNA 量・酸化ストレスへの感受性について男女間での

比較を行った。末梢血ミトコンドリア DNA 量、 $H_2O_2$  処理による細胞の生存率の低下度、 $H_2O_2$  処理による DNA の損傷の程度とも、男女間で有意な差は見られず、今回の研究からはレーベル病の男性患者数が多くなる要因は見つからなかった。男女で発症率の異なる要因として、性ホルモンの影響・他の遺伝的背景の関与・男女間での活動性の相違等が考えられ、レーベル病の発症への X 染色体遺伝子の関与を調べた論文がいくつかあるが、否定的な結果が出ている。レーベル病の男性発症率が原因の解明には、男女間の相違を調べるとともに、レーベル病の発症に関わる機構を明らかにすることも必要であろう。

本研究により、インドネシアの家系の家族性視力障害はミトコンドリア DNA の T14484C 変異によるレーベル病であることが示された。また、T14484C 変異をもつひとの末梢血ミトコンドリア DNA 量とレーベル病発症とに関連があることが示され、ミトコンドリア DNA 量を測定することによりレーベル病のリスクを測れることが期待される。株化 B 細胞においてレーベル病変異保持細胞の酸素ストレスへの高い感受性が示され、レーベル病発症と酸素ストレスとの関連が示された。活性酸素種がレーベル病発症に影響するメカニズム、特にレーベル病とアポトーシス機構との関連についての更なる研究が待たれる。抗酸化剤処理によりレーベル病変異保持細胞の酸素ストレスへの高い感受性が低減されることが示され、今後の抗酸化剤によるレーベル病治療法の確立につながることを期待される。