21　ミトコンドリア異常と神経変性疾患の制御法の開発	伊藤　孝

【目的】多様な遺伝子変異によって引き起こされる不均一なミトコンドリア機能障害疾患の総称であるミトコンドリア病において、機能異常の主体はエネルギー産生低下と考えられている。ミトコンドリア異常はアルツハイマー病、パーキンソン病、加齢に伴う認知機能障害等、多くの神経疾患に認められるが、ミトコンドリア病とこれらの主要な神経疾患はいずれも根本的な治療法が存在しない。本研究開発では、我々が見出した解糖系酵素 PFK1 の新規阻害剤 TLAM によるミトコンドリア機能の適応的向上が神経変性の治療標的となるか検証する。

【方法】具体的に以下の項目を計画し、実際に検証を行った。1. PFK1 阻害がミトコンドリア異常を回復できる詳細の分子機構を細胞でトランスクリプトーム解析した。2. PFK1 阻害剤によりどの患者由来 iPS 細胞で神経関連障害を回復できるか評価した。3. PFK1 阻害剤で Leigh 脳症モデルマウスでの脳障害が軽減されるか評価した。4. PFK1 阻害剤で加齢性の神経変性を軽減できるか異なるマウスモデルでも評価した。

【結果】1. 細胞レベルのトランスクリプトーム解析において、ミトコンドリア病の原因となるミトコンドリア遺伝子変異を有する細胞と、保有しない親株での発現パターンには大きな差異があった。一方で、TLAM 投与後 48 時間経過の時点において、ミトコンドリア病型の発現パターンから正常型の発現パターンへの回復は認めなかった。この結果は、解糖系阻害による短期間でのミトコンドリア機能向上には必ずしも転写レベルの作用が必要とされないことを示唆する一方で、より長期的な改善効果には転写変動が寄与する可能性は否定されない。2. 疾患 iPS 細胞を、ミトコンドリア病で最も重篤な類型である Leigh 脳症の原因遺伝子変異（*Ndufs4* KO）を導入した疾患 iPS 細胞をゲノム編集で作製した。健常者由来 iPS 細胞と *Ndufs4* KO iPS 細胞から分化誘導した線維芽細胞と神経幹細胞において、TLAM 添加により、解糖系が阻害されるとともにミトコンドリア呼吸能が改善した。3. Leigh 脳症モデルマウス *Ndufs4* KO マウスにおいて、TLAM（100 mg/kg/day）の腹腔内投与で寿命が延長するとともに、運動機能（rotarod assay）が向上した。病理学的解析により、主要な病変である小脳において神経細胞死の抑制と神経炎症（ミクログリア活性）の低下が介入に伴って起きることを確認した。4. 異なる神経変性モデルとして、加齢性アルツハイマー病モデルマウス SAMP8 を用いて、TLAM の効果を確認した。TLAM（100 mg/kg/day、腹腔内投与）を 2 ヵ月投与した群と 4 か月投与した群でいずれも空間認知記憶評価試験（Barnes maze）の結果が、溶媒のみ投与した群に比べて有意に改善した。4 か月投与群では別の試験（Y maze）の結果も有意に改善した。

解糖系酵素 PFK1 阻害剤 TLAM はミトコンドリア異常を伴う神経変性モデルで改善効果がある



21. ミトコンドリア異常と神経変性疾患の制御法の開発

伊藤　孝

理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルゲノミクス研究グループ

Key words：ミトコンドリア病，解糖系阻害，疾患 iPS 細胞，*Ndufs4* KO マウス，SAMP8 マウス

緒　言

ミトコンドリア病（指定難病 21）の病因は、核 DNA 上の遺伝子の変異の場合とミトコンドリア DNA（mtDNA）の異常の場合があり、核 DNA 上の場合は 200 近い遺伝子の変異、mtDNA には欠失／重複、点変異など 100 を超える病的変異が同定されている。すなわち、ミトコンドリア病は多様な遺伝子変異によって引き起こされる不均一なミトコンドリア機能障害疾患の総称である。ミトコンドリア異常はアルツハイマー病、パーキンソン病、加齢に伴う認知機能障害等、多くの神経疾患にも認められ、臨床上重要な病態群を形成するものの、ミトコンドリア病とこれら神経疾患に根本的な治療法はない。基礎研究においても、低下したミトコンドリア機能を回復できる技術は確立されていない。ミトコンドリア病における病態発現の主要因は、ミトコンドリア呼吸機能の低下によるエネルギー産生低下と考えられており、特にエネルギーを多量に必要とする神経組織で臨床症状が現れるが、同時に代謝系全体の変調が見られる。代謝の変動が臨床症状として表れる事例として、ミトコンドリアによる ATP 産生障害の結果、解糖系へのエネルギー依存度が高くなるため、乳酸アシドーシスが引き起こされる。このようなミトコンドリア内を超えた、代謝ネットワーク全体の変化がどのように病態と関連するかは不明な点が多い。

本研究開発では、解糖系阻害によるミトコンドリア機能の適応的向上が神経変性の治療標的となるか検証することを目的とする。既にエネルギー産生が低下しているミトコンドリア障害に由来する神経障害において解糖系を抑えるという、一見逆説的なアプローチに妥当性があるか、HK1、PFK1、LDH の解糖系酵素阻害でミトコンドリア病マウスモデル *Ndufs4* KO で病態改善し、寿命が延びたデータと複数の細胞でもミトコンドリア機能を向上させた予備データをもとに発展・展開する。特に我々が独自に見出した PFK1 新規阻害剤である TLAM を中心にデータを取得し、検証する。

方法および結果

1. 解糖系阻害時の RNA Seq 解析

解糖系阻害が転写応答を介して中長期的に作用する機構を RNA-Seq を用いて解析した。TLAM（PFK1 阻害）と乳酸（LDH 阻害）がともに数分以内にミトコンドリア呼吸を向上した細胞株 3 種類を用いて解析を行った。以下は主成分分析による全体の変動を記載する。ミトコンドリア病の原因となるミトコンドリア遺伝子変異を有する細胞（143B Cybrid m.3243A>G 97%）と、保有しない親株（143B Cybrid m.3243A>G 0%）での発現パターンには大きな差異があった。一方で、TLAM 投与後 48 時間経過の時点における遺伝子変異以上の結果から、ミトコンドリア病型の発現パターンから正常型の発現パターンへの回復は認めなかった。乳酸添加において、発現パターン自体に大きな変化は見られたが、こちらも正常型の発現パターンへの回復が起こる遺伝子群は認めなかった（図 1a）。

上記細胞同等に解糖系阻害でミトコンドリア機能向上が見られた HeLa 細胞でも検討を行った。TLAM は 48 時間以内において顕著な遺伝子発現変動を引き起こす一方で、直接の標的である PFK1 をゲノム編集で欠損させた細胞では遺伝子変動を起こさなかった。一方で、TLAM による遺伝子変動は、*PFK1* KO HeLa 細胞と親株 HeLa 細胞における遺伝子発現変化と比較して、非常に小さかった（図 1b）。

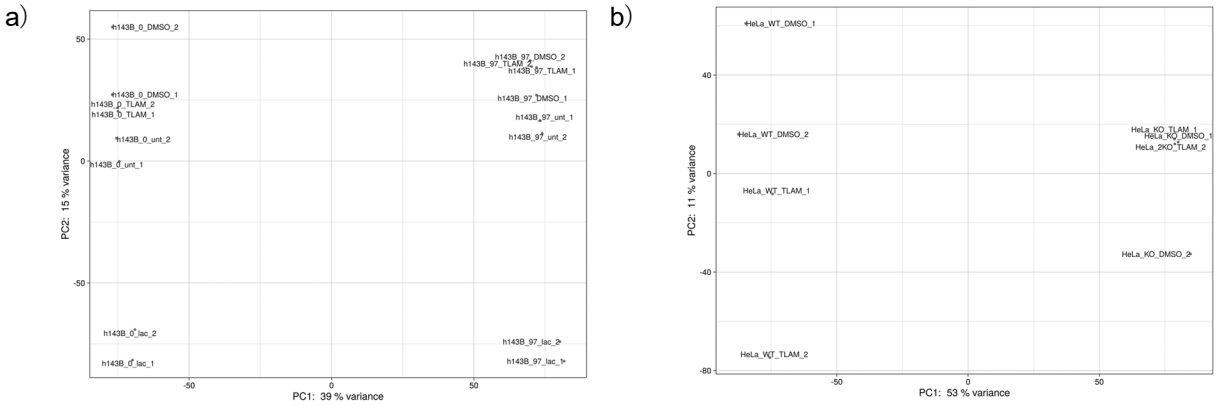


図 1. 解糖系阻害剤によると遺伝子発現変動パターンの変化

a) ミトコンドリア病型遺伝子変異を持つ細胞（h143B_97）と持たない親株（h143B_0）へ TLAM もしくは乳酸（lac）を投与して 48 時間後における RNA-Seq 解析の主成分分析。TLAM の対象群は DMSO を投与し、乳酸の対象群は非投与（unt）とした。

b) HeLa 細胞（HeLa_WT）と *PFK1* KO HeLa 細胞（HeLa_TLAM）へ TLAM を投与して 48 時間後における RNA-Seq 解析の主成分分析。

2. 異なる遺伝子変異を有する患者由来 iPS 細胞での検証

ミトコンドリア病で最も重篤な類型である Leigh 脳症の原因遺伝子変異（*Ndufs4* KO）を導入した疾患 iPS 細胞をゲノム編集で作製した。*Ndufs4* KO iPS 細胞と野生型（健常者由来）iPS 細胞から線維芽細胞へ分化誘導を行い、解糖系阻害剤投与によるミトコンドリア呼吸能への影響を細胞外フラックスアナライザーで評価した。TLAM もしくは乳酸のいずれかの添加により、疾患 iPS 細胞と健常者 iPS 細胞に由来する線維芽細胞において、ミトコンドリア呼吸能が向上した（図 2）。神経幹細胞にも分化誘導して行った同様の検討においても、解糖系阻害により呼吸能が向上した。

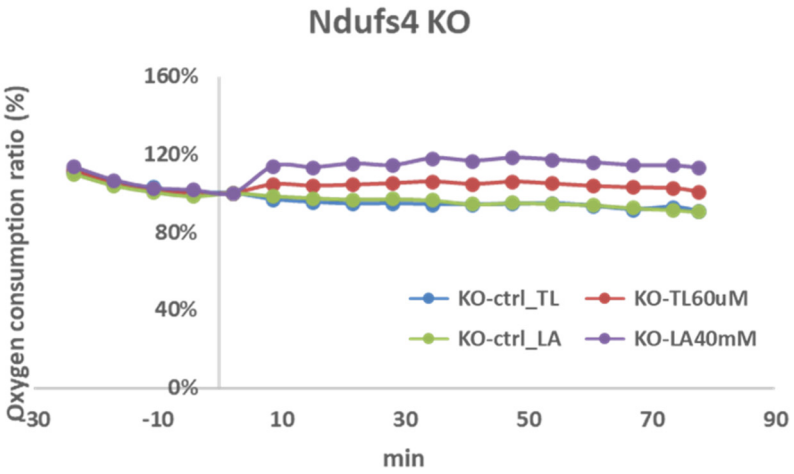


図 2. 解糖系阻害によりミトコンドリア病 iPS 由来細胞において呼吸能を改善するヒト *Ndufs4* KO iPS 細胞より分化した線維芽細胞における細胞外フラックスアナライザー解析（N＝3）。縦軸は酸素消費量を示し、横軸は化合物添加からの時間（分）を示す。TLAM（TL）、乳酸（LA）とそれぞれの対象群（ctrl）の結果を示す。

3. ミトコンドリア病マウス（*Ndufs4* KO）での解糖系阻害時の病理学的評価

Leigh 脳症モデルマウス *Ndufs4* KO マウスにおいて、TLAM（100 mg/kg）と乳酸投与（給水瓶で 0.05～2%の 4 点）、GlcNAc（HK1 阻害剤、0.5 mg/kg）で寿命が延長するとともに、運動機能（rotarod assay）が向上した。予備的検討において前所属機関でも得られていたが、現所属機関の動物実験施設においても同等の効果があり、ある程度の実験室環境の差異を超えて再現性があることを確認した。病理学的解析を行ったところ、主要な病変で神経細胞死の抑制と Iba-1 神経炎症（ミクログリア活性）の低下がこれらの介入で起きることを確認した。主要な病変である小脳と脳幹において、TLAM と乳酸は Iba-1 染色強度を低下し、GlcNAc は小脳においてのみ減弱した（図 3）。

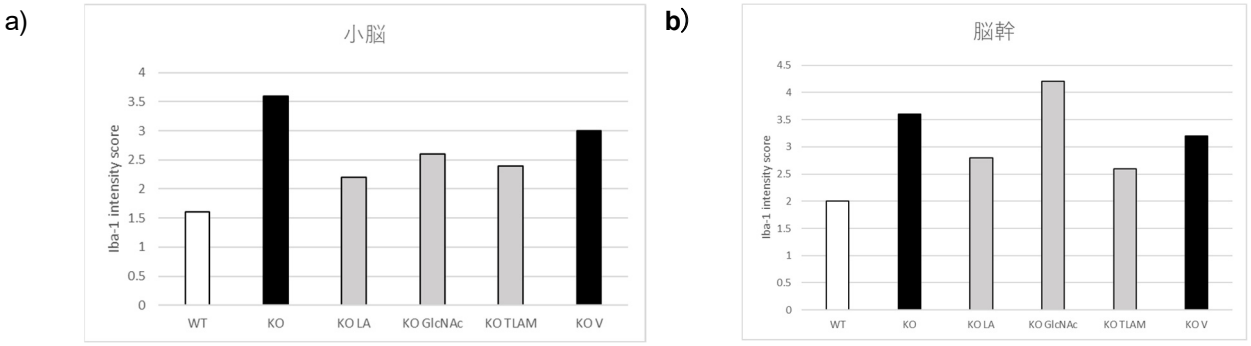


図 3. Leigh 脳症モデルマウスにおける解糖系阻害と神経炎症への影響

Ndufs4 KO マウス小脳 (a) と脳幹 (b) における iba-1 染色強度の評価。脳組織は 7～8 週令時点で、野生型 (WT)、*Ndufs4* KO （KO）マウスに乳酸（LA）、GlcNAc、TLAM、もしくは TLAM の溶媒（V）を投与した群で採取した。Iba-1 染色強度を、最も強い病巣を強拡大（対物レンズ×40）で観察した際の陽性細胞の占拠面積で分類し、score1 : 0～5%、score2 : 6～15%、score3 : 16～30%、score4 : 30～50%、score5 : 50～100%とした（N=5）。

4. 加齢促進モデルマウスでの解糖系阻害の評価

ミトコンドリアの遺伝子異常に起因しないが、加齢によりミトコンドリア機能異常と神経変性を誘発するモデルマウスへの PFK1 阻害剤の効果を検証した。SAMP8（Senescence-accelerated mouse-prone 8）は老化加速の表現型を呈し、加齢に伴いミトコンドリア機能低下とアルツハイマー病に近い症状を示す［1］。検討は TLAM（100 mg/kg/day、腹腔内投与）を 8 週間投与する実験群（N=6、短期投与）と 16 週間投与する実験群（N=8～10、長期投与）の 2 種類の投与プロトコルで行った。長期投与には SAMP8 の親系統に当たり、早老症やアルツハイマー病の症状を呈しない SAMR1 マウスを合わせて検討した。短期投与、もしくは長期投与終了後に、空間認知記憶、精神疾患様の行動変化、運動能力、筋力、のいずれかを評価する 9 種類の行動試験を行った。その結果、短期投与と長期投与のいずれにおいても TLAM により有意に変化した試験は、空間認知記憶を評価する指標である Barnes 迷路試験（装置は小原医科産業）だった。3 日間のトレーニング終了後の評価試験において、12 個ある穴のうち、トレーニング中に正解と記憶させた穴に繰り返し注意を向ける行動が、TLAM 短期投与において有意に改善した（図 4）。TLAM 長期投与においても SAMR1 と同等の頻度で当該行動を行い、溶媒のみ投与した SAMP8 は有意に頻度が低かった。残りの 11 個の不正解の穴に対しては、同一の行動は全ての実験群においてほとんど観察されなかった。また長期投与においては、別の空間認知記憶を評価する Y 迷路試験（装置は小原医科産業）でも TLAM 投与群における成績の有意な向上が確認された。

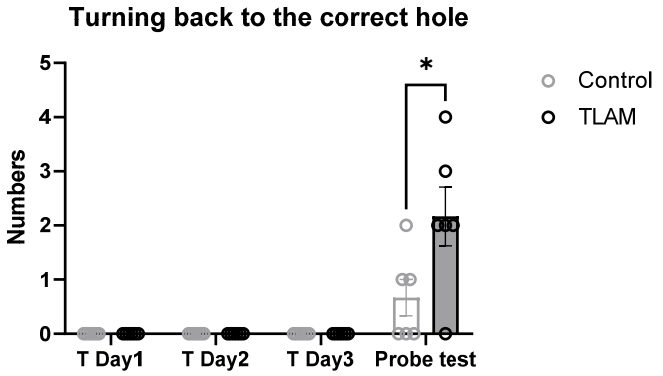


図4. アルツハイマー病モデルマウスにおける解糖系阻害と空間認知記憶への影響
SAMP8にTLAM 100 mg/kgを8週間投与したのちの、Barnes迷路試験における、正解の穴への振り返り行動回数の評価。Tはトレーニング日、Probe testは、正解の穴から逃避可能な巣箱を除去した上で、180秒間マウス個体の行動を記録したもの。*P＜0.05（t検定、N＝6）。

考　察

本研究開発では、解糖系阻害によるミトコンドリア機能の適応的向上が神経変性の治療標的となるか検証した。ミトコンドリア病 iPS 細胞とマウスモデルを用いた検討においては、PFK1 阻害剤 TLAM と LDH 阻害作用を持つ乳酸における神経系細胞と脳における改善効果を確認した。さらに加齢性でミトコンドリア機能が障害されるアルツハイマー病モデルマウスにおいて、TLAM による認知記憶能力の改善が見られた。複数の病因で、ヒト疾患細胞 iPS 細胞とマウスモデルにおいて病態改善効果を示したこれらの結果から、解糖系阻害、特に PFK1 阻害剤はミトコンドリア異常を伴う神経変性への治療戦略として有効性があると期待される。これまでの検討において、PFK1 阻害による作用機序は数分以内に生じる糖代謝に使われる経路の変化と、それに伴う AMPK などの栄養代謝センサーの活性化が関与することを示している［2］。本研究開発では細胞やマウスモデルでのより長期期間における作用機序の解明に資する目的で RNA-Seq 解析を行ったが、投与後 48 時間の時点では病態改善を示す顕著な遺伝子発現パターンは得られなかった。マウスでの長期投与による効果も含めた一連の病態改善効果に伴う分子作用機序の解明は今後の課題となる。今回使用したミトコンドリア病モデルマウスにおいて、3 週間にわたる別の薬剤の長期投与後に脳で解糖系酵素群のタンパク量が低下するなど多くのタンパク群の正常化が見られた結果［3］を考慮すると、病態改善効果に連動する時系列データを取得した上で、分子メカニズムの解析を進めていくことが望ましいと考える。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者の中で、特に主要な貢献を果たした理化学研究所環境資源科学研究センターケミカルゲノミクス研究グループの吉田稔博士、Nurmila Sari 博士、西村はる菜さん、東京薬科大学生命医科学科腫瘍医科学研究室の小林大貴博士、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター疾病研究第二部の後藤雄一博士、鈴木禎史博士、名古屋大学大学院医学研究科生体反応病理学の豊國伸哉博士、本岡大社博士に感謝する。本共同研究の推進に多大なるご支援をくださった上原記念生命科学財団の全ての関係者の皆様に心より感謝申し上げる。

文　献

1) Liu B, Liu J, Shi JS. SAMP8 Mice as a Model of Age-Related Cognition Decline with Underlying Mechanisms in Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2020;75(2):385-395. doi: 10.3233/JAD-200063. PMID: 32310176

2) Kobayashi H, Hatakeyama H, Nishimura H, Yokota M, Suzuki S, Tomabechi Y, Shirouzu M, Osada H, Mimaki M, Goto YI, Yoshida M. Chemical reversal of abnormalities in cells carrying mitochondrial DNA mutations. Nat Chem Biol. 2021 Mar;17(3):335-343. doi: 10.1038/s41589-020-00676-4. PMID: 33168978

3) Martin-Perez M, Grillo AS, Ito TK, Valente AS, Han J, Entwisle SW, Huang HZ, Kim D, Yajima M, Kaeberlein M, Villén J. PKC downregulation upon rapamycin treatment attenuates mitochondrial disease. Nat Metab. 2020 Dec;2(12):1472-1481. doi: 10.1038/s42255-020-00319-x. PMID: 33324011