

平成14年度採択分

平成19年 3月31日現在

研究課題名(和文) ミトコンドリア DNA 突然変異導入モデルマウスを用いた病態発症機構の解明

研究課題名(英文) Application of disease-model mice with mutant mtDNA for precise investigation of its pathogenesis

研究代表者

氏名 林 純一 (Jun-Ichi Hayashi)

所属研究機関・部局・職 筑波大学大学院・生命環境科学研究科・教授



研究の概要:

核外ゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) は酸素呼吸によるエネルギー産生に必須な遺伝子をコードしている。したがってこれらの遺伝子に病原性突然変異を生じると生体は呼吸欠損に陥り生命の存続が危うくなる。それが具体的にどのような症状として発現されるのかを明らかにするために、われわれがすでに世界で初めて樹立した病原性突然変異 mtDNA を導入したマウス(ミトマウス)を用いて研究を行った。

研究分野/科研費の分科・細目/キーワード:

複合領域/実験動物学/ ミトコンドリア遺伝病 マウス突然変異型 mtDNA 病態モデルマウス 核移植による遺伝子治療 クローンマウス

1. 研究開始当初の背景

酸素呼吸の副産物として、ミトコンドリア内には有害な活性酸素が大量に発生するため、mtDNA は突然変異などの大きなダメージを受け続けることになる。その結果、生体はエネルギー供給量の低下をきたし、特殊なミトコンドリア病の発症にとどまらず、神経変性疾患や生活習慣病、さらには老化の原因となり得るといふ仮説(老化ミトコンドリア原因説)が提唱されている。この仮説を直接検証するためには突然変異型 mtDNA を導入したマウスの樹立が急務であったが、われわれはミトコンドリア移植法を用いてこのような病態モデルマウス(ミトマウス)の樹立に世界で初めて成功したことから、これら問題点を一気に解決できる糸口を確保した。

2. 研究の目的

(1)ミトマウスを病態モデルとしてヒトミトコンドリア病の詳細な遺伝機構、病態発症機構の解明;(2)ミトマウスを用いた mtDNA 遺伝様式の基礎研究;(3)核側突然変異による病状多様性の証明;(4)新規突然変異型 mtDNA 導入マウスの作製;(5)受精卵遺伝子治療法と成体遺伝子治療法の確立

3. 研究の方法

(1)マイクロダイセクション法と定量 PCR 法;(2)XO タイプの ES 細胞;(3)受精卵核移植法と成体骨髄移植法

4. 研究の主な成果

成果 1: ミトコンドリア間に相互作用がありこれが突然変異型 mtDNA による急激な病態発症を防御しているというわれわれの仮説(ミトコンドリア連携説)に全く問題がないことを新たなデータを加えて論理的に立証した¹⁾。さらに、ミトマウスの欠失突然変異型 mtDNA が雄の生殖細胞に蓄積して呼吸欠損を起こすと、男性不妊の原因になることを、世界で初めて証明した。しかし一般にいわれている糖尿病や心筋症の発症は誘導しなかったことから、これら疾患の原因になる可能性は低いという結論に達した²⁾。この研究成果は、平成 18 年 10 月 3 日の NHK の「おはようっぼん」で放映され、読売新聞、毎日新聞など全国版朝刊や、インターネットニュースでも一斉に報道され、また 10 月 13 日には朝日新聞夕刊の科学欄で紹介された。

成果 2: mtDNA の突然変異が短い世代を経るだけで定着するという奇妙な現象に対し、従来は卵形成過程で mtDNA のコピー数が極端に減るボトルネック効果があるからだと言明されてきたが、実際に注意深い測定をすることで、コピー数の減少ではなく複製単位の減少であることを明らかにした³⁾。この研究成果は平成 19 年 2 月 14 日の日刊工業新聞朝刊と 2 月 23 日の科学新聞で報道された。mtDNA は母性遺伝するため組換えが無いという主張と、組換えが有るといふ主張の間で議論が続いていたが、ミトマウスを使った本

研究で殆ど組換えが生じないと言う明確な結論を得た⁴⁾。

成果3：糖尿病モデルマウス受精卵の核をミトマウス受精卵へ移植することが技術的に難しかったためこの目的は終了年度内に達成できなかったが、1-2年後には論文を公表する予定である。

成果4：今回極めて特殊なXO型のES細胞で新たな点突然変異型mtDNA導入マウスの作出に成功した⁵⁾。さらに大量の活性酸素を生産するユニークな突然変異型mtDNAの確保に成功し、がん転移能との関係を解析中で今後の展開が期待される。

成果5：ミトマウスの受精卵遺伝子診断法と治療法の確立に世界で最初に成功した。この技術はそのまま人間に適用可能であるが、今後のわれわれの役割はこのような受精卵遺伝子治療を実施した場合の副作用の存在の有無を、マウスを使って実証していくことである⁶⁾。この研究成果は世界初の受精卵遺伝子治療の成功であることから社会的なインパクトが極めて強く、平成17年11月8日の読売新聞、東京新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞、常陽新聞で、11月11日の朝日新聞夕刊の科学欄で報道された。骨髄細胞に万能性をもつ幹細胞がある可能性を想定し、放射線照射したミトマウスに正常なmtDNAをもつ骨髄を移植することで、正常細胞による入れ替えを試みた。その結果、完全な回復は認めなかったが1ヶ月以上の延命効果があった。今後は更に延命効果が期待できる万能細胞の導入を試みる予定である⁷⁾。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

(1) 基礎研究分野での学問的インパクト：哺乳類mtDNAの遺伝様式に関し長年議論的であった「組換え」と「ボトルネック」の存否に明確な解答を提供できた。これによって人類の起源を特定した世に有名な「ミトコンドリアイブ説」を再検討する必要が無いことを明確にした。

(2) 応用研究分野での学問的インパクト：最もインパクトが強かった成果は「突然変異型mtDNAが男性不妊の原因になることの世界初の証明」と「世界初のミトコンドリア病受精卵遺伝子診断・治療の成功」である。特に後者の研究成果は2005年10月にPNASに掲載されたが、その直前の同年9月に、英国ニューカスル大学の研究チームがヒトの卵を使ってミトコンドリア病の遺伝子治療を行うための予備実験を行うと発表したことから、人体実験が認可されたとして世界中に報道された。われわれは今後もミトマウスの受精卵を用いてヒトの受精卵遺伝子治療が安心して行えるための最新情報を世界に発信して行くつもりである。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) **Jun-Ichi Hayashi**, Kazuto Nakada, and Tomoko Ono (2002). In reply to inter-mitochondrial complementation of mtDNA mutations. *Nature Genet.* 30:361.
- 2) Kazuto Nakada, Akitsugu Sato, Kayo Yoshida, Takashi Morita, Hiromitsu Tanaka, Shin-Ichi Inoue, Hiromichi Yonekawa, and **Jun-Ichi Hayashi** (2006) Mitochondria-related male infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15148-15153.
- 3) Liqin Cao, Hiroshi Shitara, Takuro Horii, Yasumitsu Nagao, Hiroshi Imai, Kuniya Abe, Takahiko Hara, **Jun-Ichi Hayashi**, Hiromichi Yonekawa (2007) Mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in mouse female germ cells. *Nature Genet.* 39:386-390.
- 4) Akitsugu Sato, Kazuto Nakada, Miho Akimoto, Kaori Ishikawa, Tomoko Ono, Hiroshi Shitara, Hiromichi Yonekawa, and **Jun-Ichi Hayashi** (2005) Rare creation of recombinant mtDNA haplotypes in mammalian somatic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:6057-6062.
- 5) Atsuko Kasahara, Kaori Ishikawa, Makiko Yamaoka, Masahito Ito, Naoki Watanabe, Miho Akimoto, Akitsugu Sato, Kazuto Nakada, Hitoshi Endo, Yoko Suda, Shinichi Aizawa, and **Jun-Ichi Hayashi** (2006) Generation of trans-mitochondrial mice carrying homoplasmic mtDNA with a missense mutation in a structural gene using ES cells. *Hum. Mol. Genet.* 15: 871-881.
- 6) Akitsugu Sato, Tomohiro Kono, Kazuto Nakada, Kaori Ishikawa, Shin-Ichi Inoue, Hiromichi Yonekawa, and **Jun-Ichi Hayashi** (2005) Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:16765-16770.
- 7) Shin-Ichi Inoue, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Akitsugu Sato, Hiroyuki Miyoshi, **Jun-Ichi Hayashi** (2006) Suppression of disease phenotypes of adult mito-mice carrying pathogenic mtDNA by bone marrow transplantation. *Hum. Mol. Genet.* 15:1801-1807.

ホームページ等

http://www.geocities.jp/ji_hayashi_lab/