

ミトコンドリア呼吸鎖障害の非心筋細胞における意義

新谷泰範

国立循環器病研究センター 分子薬理部

【研究の背景】

ミトコンドリアにおける ATP 合成は普遍的な機構であるが、その活性を上昇させることは困難とされてきた。2015 年、申請者らは呼吸鎖複合体 IV (CcO) の activator である Higd1a を同定した。Higd1a は CcO に直接結合し、その活性を上昇させ、正常ラット心筋細胞において ATP 産生速度を上昇させた¹⁾。これは世界で初めての電子伝達系の活性を正に調節するアロステリック因子の報告であった。この知見に基づき、ウシ心臓から単離精製し、結晶を作る精製度の高い CcO を用いて *in vitro* 活性測定系を構築し、約 22 万種類の低分子化合物について CcO 活性化剤の探索を行い、複数のヒット化合物を取得、さらにミトコンドリア病患者由来細胞を使った高次スクリーニングもおこない、リード候補化合物の取得に成功した。マウス体内動態の比較的良好な化合物の取得に成功しており、*in vivo* で CcO 活性化剤の薬効を定量的に評価するため、Ndufs6 KO マウス²⁾を用いた。本マウスは心臓に有意なエネルギー産生障害がみられ、生後 4 週から心収縮力の低下が生じる。これまでミトコンドリア病の病態形成において、呼吸鎖障害の免疫細胞のみならず、非実質細胞における細胞分化、浸潤、病態形成における役割は明らかにされていない。

【目 的】

ミトコンドリア心筋症の原因は、ミトコンドリア呼吸鎖の機能不全であり、有効な治療薬がない。免疫細胞においてエネルギー代謝がその分化・運命決定に影響を及ぼすことが報告されているが、ミトコンドリア心筋症の病態形成における呼吸鎖障害の意義を、免疫細胞をふくめた 1 細胞レベルで検討した研究はない。本研究では、ミトコンドリア心筋症モデルを用いて、呼吸鎖障害の非心筋細胞における意義、病態修飾に及ぼす影響を検討する。

【方 法】

Ndufs6 KO マウスおよびコントロールマウスの心臓組織を凍結させ、Dounce ホモジナイズ、密度勾配遠心法により核を抽出し、single cell nucleus RNA sequence 法にて、1 細胞レベルでの発現プロファイルを解析する。

【結 果】

Ndufs6 KO マウスの自然経過をみるため、心エコーにて経時的にフォローしたところ、メスマウスでは生後 4 週から、緩徐に心収縮能が低下していくことを確かめた。そこで 8 週齢の WT をコントロール、メスの KO マウスの 8 週齢、17 週齢の 3 個体について、心臓組織を凍結保護剤を用いて凍結させ、Dounce ホモジナイズと遠心分離、さらに核染色後に FACS をおこない intact な核を抽出し、single cell nucleus RNA sequence 法にて、1 細胞レベルでの発現プロファイルを解析した。3 個体から合計 31812 個の細胞の良質な遺伝子発現情報を取得することに成功した。心臓を構成する細胞の種類、クラスター数について、ヒトの報告と遜色ないものであり、サンプル処理から解析がうまく進んでいることを裏付ける。興味深いことに KO マウスで減少する細胞種が複数同定された。しかしながら Ndufs6 のノックダウン率は細胞種間で偏りがなく、これらの変化は Ndufs6 ノックダウン効率ではなく、呼吸鎖不全に対する細胞の反応性の違いであることが示唆された。今回細胞種内で多く

のクラスターがみられた繊維芽細胞に注目し、8週齢のマウス心臓を用いて trajectory 解析に成功し、その transition に関わる可能性のある候補分子を10個同定した。

【考 察】

心臓を構成する細胞の種類、クラスター数について、ヒトの報告と遜色ないものであり、サンプル処理から解析がうまく進んでいることを裏付ける。心臓組織を凍結保護剤を用いて凍結させたことが有用であったと考えられ、今後ヒト組織に展開するにあたり、サンプルの処理法について有用な情報を得ることができた。Ndufs6 のノックダウン率は細胞種間で偏りがなく、呼吸鎖不全に対する細胞の反応性の違いを検証する有用なモデルであることが確かめられた。今回見出した繊維芽細胞だけでなく、免疫細胞についても、発現プロファイルの transition を見出しており、今後も研究継続し機能解析につなげることが必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

治療薬開発をすすめるにあたり、治療効果の判定のためバイオマーカー探索は必須である。非実質細胞に着目することで新規バイオマーカーの創出につながることで、また病態理解にも貢献することが期待できる。

本計画であげる成果により CcO 活性化剤のスムーズなリード最適化、開発候補品の創出、さらに臨床試験への移行をめざす。CcO 活性化剤は、ミトコンドリア病の治療のみならず、二次的に呼吸鎖障害が見られる多くのヒト疾患(パーキンソン病(指定難病6)やアルツハイマー病などの神経変性疾患、糖尿病、NASH、肥満など)に対しても治療応用が期待できる。

【参考・引用文献】

1. Hayashi T et al.,PNAS.2015;112:1553-
2. Ke BX et al.,PNAS.2012;109:6165-