

表 題 原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の診断系の構築とミトコンドリア病患者の
CoQ₁₀還元状態の評価、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の ferroptosis から
みた病態解析

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 渡邊 知佳

担当指導教員氏名 山形 崇倫 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
生殖・発達医学 分野
成育医学

2023年1月10日申請の学位論文

目次

1. はじめに.....	1
2. 対象と方法	7
2.1 皮膚線維芽細胞の CoQ ₁₀ 測定系の構築と、CoQ ₁₀ 還元状態の評価	7
1) ミトコンドリア疾患の皮膚線維芽細胞樹立	7
2) 細胞培養	11
3) CoQ 溶出	11
4) 酸化型 CoQ ₁₀ の還元反応	11
5) LC-MS/MS 分析	12
6) 分析法バリデーション	13
7) 蛋白定量、クエン酸シンターゼ測定	14
8) 呼吸鎖酵素活性の測定	15
2.2 原発性 CoQ ₁₀ 欠乏症の ferroptosis からみた病態	16
1) 対象	16
2) ferroptosis 誘導による脆弱性の評価	17
3) 過酸化脂質の測定	19
a) 細胞膜とミトコンドリア膜の過酸化脂質の評価	19
b) フローサイトメトリーによる細胞膜の過酸化脂質の解析	19
4) RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR	20
5) ウェスタンブロット	21
6) 総グルタチオン量および還元型グルタチオン/酸化型グルタチオン比の測定	23
2.3 統計学的解析	23
3. 結果	24
3.1 皮膚線維芽細胞の CoQ ₁₀ 測定系の構築と CoQ ₁₀ 還元状態の評価	24
1) ミトコンドリア疾患患者皮膚線維芽細胞の総 CoQ ₁₀ 値	24
2) 還元型 CoQ ₁₀ /総 CoQ ₁₀ 比	26
3) 呼吸鎖酵素活性	28
3.2 原発性 CoQ ₁₀ 欠乏症の ferroptosis からみた病態	29
1) ferroptosis 誘導時の正常細胞と患者細胞の生存率の比較	29
2) 過酸化脂質の評価	32
a) 細胞膜、ミトコンドリア膜の過酸化脂質の評価	32
b) 細胞膜の過酸化脂質の定量的評価	35
3) リアルタイム RT-PCR による ferroptosis 関連遺伝子発現の解析	36
4) ウェスタンブロット	38
5) 総グルタチオン値、還元型グルタチオン/酸化型グルタチオン比	39
4. 考察	40
5. おわりに	47

6. 参考文献	48
7. 謝辞	56

略語

〈英語〉 アルファベット順

ACAD9: acyl-CoA dehydrogenase, member 9

AOX: alternative oxidase

BH4: tetrahydrobiopterin

BOLA3: bolA family member 3

CHDH: choline dehydrogenase

CoQ₁₀: coenzyme Q₁₀

CS: citrate synthase

CV: coefficient of validation

DGUOK: deoxyguanosine kinase

DHODH: dihydroorotate dehydrogenase

Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM

ECHS1: short-chain enoyl-CoA hydratase

ESI-MS: Electrospray ionization-mass spectrometry

ETFDH: electron transfer flavoprotein dehydrogenase

FSP1: ferroptosis suppressor protein 1

GCH1: GTP cyclohydrolase-1

GPDH: glycerol phosphate dehydrogenase

GPX4: glutathione peroxidase 4

GSH: glutathione

GSSG: glutathione-S-S-glutathione

HPDL: hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like

LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MELAS: myopathy encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes

MRM: multiple reaction monitoring

NDUFA1: NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit A1

PDSS1: prenyl diphosphate synthase, subunit 1

PDSS2: prenyl diphosphate synthase, subunit 2

RE: relative error

RET: reverse electron transfer

ROS: reactive oxygen species

SQOR: sulphide: quinone oxidoreductase,

SRNS: steroid-resistant nephrotic syndrome

SURF1: SURF1 cytochrome c oxidase assembly factor

TBHQ: *tert*-butyl hydroquinone

UCP: uncoupling protein

1. はじめに

原発性 CoenzymeQ₁₀ (CoQ₁₀) 欠乏症は、CoQ₁₀ の生合成に関与する酵素をコードする *COQ* 遺伝子変異により、CoQ₁₀ の合成が障害され、CoQ₁₀ 欠乏をきたす常染色体潜性遺伝疾患である (1)。現在までに、11 の *COQ* 遺伝子 (*COQ2*, *COQ4*, *COQ5*, *COQ6*, *COQ7*, *COQ8A*, *COQ8B*, *COQ9*, *Prenyl diphosphate synthase, subunit 1: PDSS1*, *Prenyl diphosphate synthase, subunit 2: PDSS2*, *Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like: HPDL*) の病的バリエーションが原因として報告されている (図 1-1) (2, 3)。本症は、1989 年、小笠原らにより、家族性ミトコンドリア脳筋症として初めて報告された (4)。現在、180 家族から 280 名以上の患者が報告されており (5)、国内例の報告も散見される (5-8)。臨床症状は、脳症、心筋症、多臓器不全、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群など多彩であり、臨床診断は困難で、未診断例が多数存在すると考えられている (5)。確定診断は、*COQ* 遺伝子における両アレル性の病的バリエーションの同定と、生検筋での CoQ₁₀ 低値の証明である (1)。CoQ₁₀ 補充療法により治療介入可能な疾患であり、早期診断、早期治療が重要である。

CoQ₁₀ は、1957 年に Crane らにより同定された、酸化還元活性を持つベンゾキノン環と、親油性のあるイソプレノイド側鎖（ヒトでは 10 のサブユニットからなる）で構成される化合物である (9,10)。CoQ₁₀ は体内で合成が可能で、通常食事からの摂取は必要ない (図 1-1) (10,11)。CoQ₁₀ は、ベンゾキノン環の酸化還元状態により、酸化型（ユビキノン）、還元型（ユビキノール）、部分還元型（セミユビキノ

ン) の3つの形態をとる(10)。CoQ₁₀はユビキタスに存在するが、分布量や、還元型 CoQ₁₀の占める割合は、臓器や細胞によって異なる。心臓、腎臓、肝臓、筋肉には CoQ₁₀が多く分布し、肝臓や腎臓などでは還元型 CoQ₁₀が占める割合は多く、一方で脳や肺では還元型 CoQ₁₀が占める割合は少ない(11)。細胞画分では、CoQ₁₀はミトコンドリアに最も多く局在する(11)。

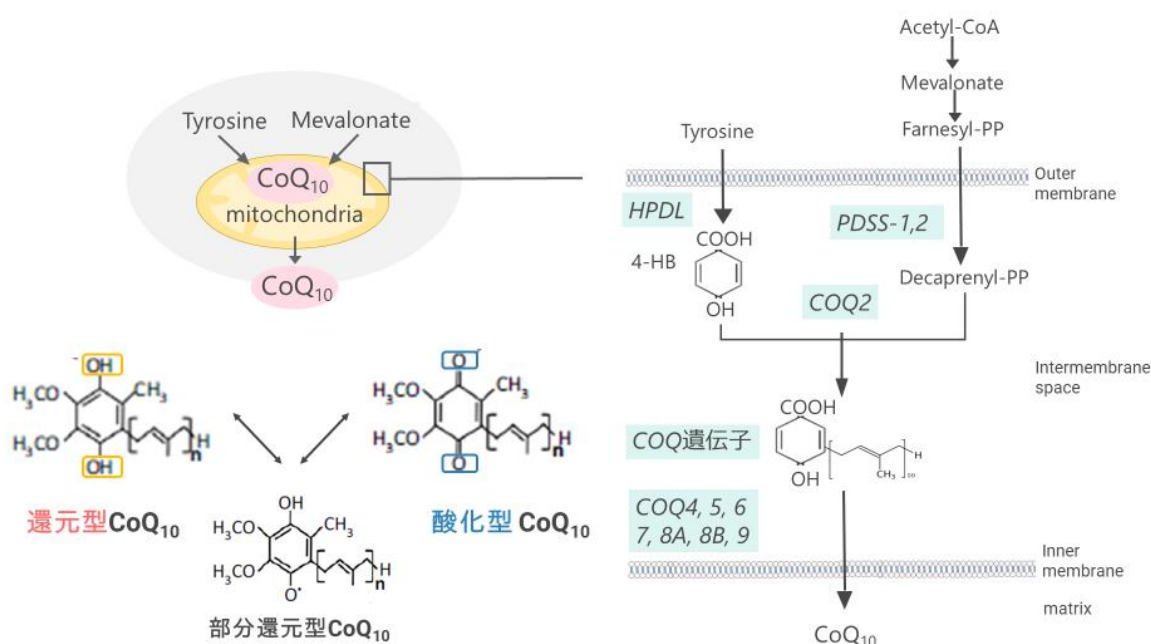


図 1-1. CoQ₁₀ の生合成

CoQ₁₀は、チロシン由来の4-ヒドロキシ安息香酸(4-HB)と、メバロン酸経路に由来するファシネルピロリン酸(FPP)から、ミトコンドリア内膜で合成され、細胞や細胞膜に遍在する。Wang et al., 2016, Banh et al., 2021 から一部改変。

CoQ₁₀には多様な生理活性を持ち、最も重要な働きは、ミトコンドリア呼吸鎖で酸化還元反応により電子伝達に関与することである(10)。順行性の電子伝達では、CoQ₁₀は、呼吸鎖複合体I、II、種々のデヒドロゲナーゼから電子を受け取り、酸化型から還元型になる(図1-2. A)。さらに複合体IIIで電子をシトクロムcに受け渡し、

再び酸化型になる。この順行性の電子伝達の結果、ミトコンドリアマトリクスと膜間スペースに電気勾配とプロトン勾配が生じ、複合体Vで ATP が産生される。一方で、CoQ₁₀ は、逆電子輸送 (reverse electron transfer: RET) においても重要な役割を果たす。RET は、コハク酸から複合体 II をへて還元型 CoQ₁₀ へ電子が伝達され、複合体 I で NAD⁺が消費されるもので、複合体 I の分解や複合体 I 由来の活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が生じる (図 1-2. B) (12,13)。

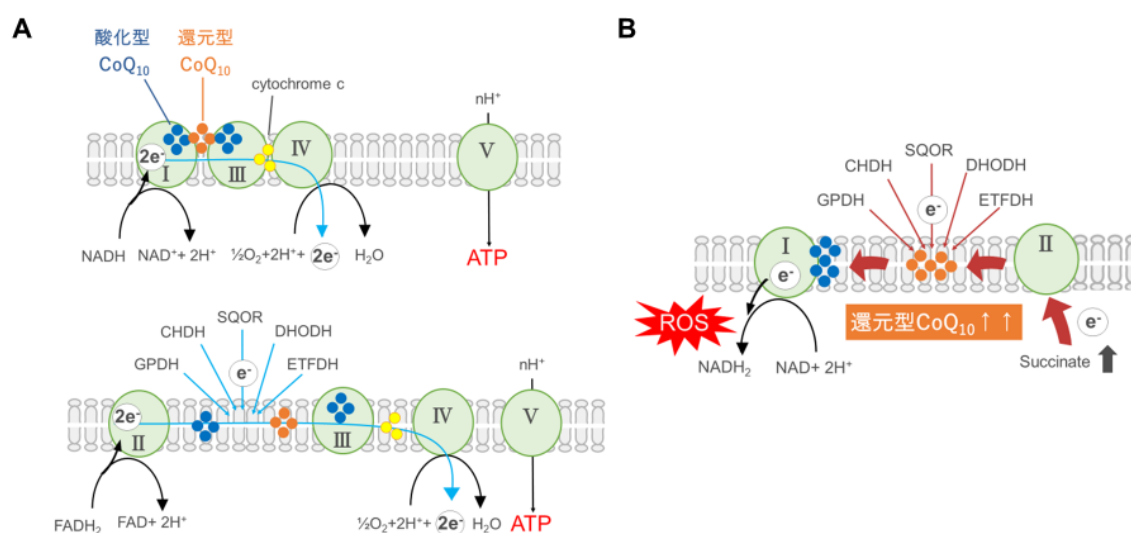


図 1-2. ミトコンドリアにおける電子伝達

A: 順行性、B: 逆行性の電子伝達。順行性の電子伝達により、複合体Vで ATP が産生される。逆行性の電子伝達の結果、複合体 I 由来の活性酸素種が生じる。

GPDH: glycerol phosphate dehydrogenase, CHDH: choline dehydrogenase,
SQOR: sulphide:quinone oxidoreductase, DHODH: dihydroorote dehydrogenase,
ETFDH: electron transfer flavoprotein dehydrogenase

CoQ₁₀ は抗酸化物質としても働く。活性型は還元型 CoQ₁₀ で、脂質過酸化の開始 (initiation) と伝播 (propagation) の両方を抑制する(14) 。細胞膜における主要な酸化還元酵素として NADH-quinone oxidoreductase 1、cytochrome b5 reductase が知られ

ていたが(15)、近年さらに ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) も同定された(16,17)。

また、還元型 CoQ₁₀ には、 α -トコフェロールやアスコルビン酸を活性型に再生させる働きもある(14)。他にも、CoQ₁₀ は脂肪酸の β 酸化 (18)、ピリミジン生合成(19)、硫化物の酸化(20)、脱共役タンパク質 (uncoupling protein; UCP) の必須の補因子としての働き(21)、ミトコンドリア透過性遷移孔の調節(22) などに関与する。

原発性 CoQ₁₀ 欠乏症における課題は、第一に早期診断をして、早期治療につなげることである。従来、本症の生化学的診断は生検筋の CoQ₁₀ 低値によりなされてきたが、筋生検は侵襲性が高く診断を遅らせる可能性がある。一方で、皮膚線維芽細胞での CoQ₁₀ 測定は筋生検より低侵襲で早期に実施でき、有用性も報告されている(23,24)。そこで我々は、皮膚線維芽細胞での CoQ₁₀ 測定系を構築し、疑い症例を解析診断することを目的とした。さらに、測定可能な CoQ₁₀ には還元型 CoQ₁₀ と酸化型 CoQ₁₀ があるが、本症においてどちらが欠乏するのか、に着目した報告はない。還元型/酸化型 CoQ₁₀ の比率はミトコンドリア代謝状態のマーカーとされており(25)、本症でも CoQ₁₀ 絶対値の低下だけでなく、還元型 CoQ₁₀、酸化型 CoQ₁₀ を個別に定量し、還元型/酸化型 CoQ₁₀ も評価することが望まれる。そこで我々は、皮膚線維芽細胞で還元型 CoQ₁₀、酸化型 CoQ₁₀ 個別の定量系を確立し、さらに還元型/酸化型 CoQ₁₀ を求めることによりミトコンドリアでの CoQ₁₀ の還元状態も評価することも目的とした。測定対象は、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症患者だけでなく、二次性 CoQ₁₀ 欠乏症をきたす可能性のあるミトコンドリア病患者も対象とした。

第二の課題として、本症では病態の全容が明らかでないことがあり、また、CoQ₁₀ 不応例に対する新たな治療戦略が求められている。CoQ₁₀ の主な生理活性は ATP 産生と抗酸化作用であることから、本症の病態に ATP 産生障害と ROS の発生が関与すると考えられている(26)。また、ピリミジン生合成(27)、硫化物代謝(28)、apoptosis などのプログラム細胞死(29)、mitophagy (30)などの関与も報告される。しかし、遺伝子型、臨床症状、発症年齢、重症度などが極めて多様であるため、共通の病態を見出すのは困難と考えられている。前述の通り、近年新規の CoQ₁₀ の酸化還元酵素である FSP1 が同定された(16,17)。FSP1 は細胞膜で CoQ₁₀ を還元し、還元型 CoQ₁₀ が脂質の過酸化を抑制することで、ferroptosis と呼ばれる細胞死を抑制する(16,17)。ferroptosis とは、鉄依存性で過酸化脂質の蓄積が関与する制御された細胞死である（図 1-3）(31,32)。ferroptosis は、apoptosis や necrosis など既知の細胞死とは形態学的にも機能的にも異なる、新たな細胞死形態である (33)。既報では COQ2 ノックアウト癌細胞 (HT1080)で ferroptosis が誘導されていることから(16)、本症の病態に ferroptosis が関与、かつ亢進していると予想される。しかし、患者細胞で検証した報告はない。そこで我々は、患者皮膚線維芽細胞を用いて、病態への ferroptosis の関与を検証し、ferroptosis と CoQ₁₀ 合成系との関連を検討した。

2. 対象と方法

2.1 皮膚線維芽細胞の CoQ₁₀ 測定系の構築と、CoQ₁₀ 還元状態の評価

皮膚線維芽細胞の CoQ₁₀ 測定の実験手順を図 2-1 に示す。

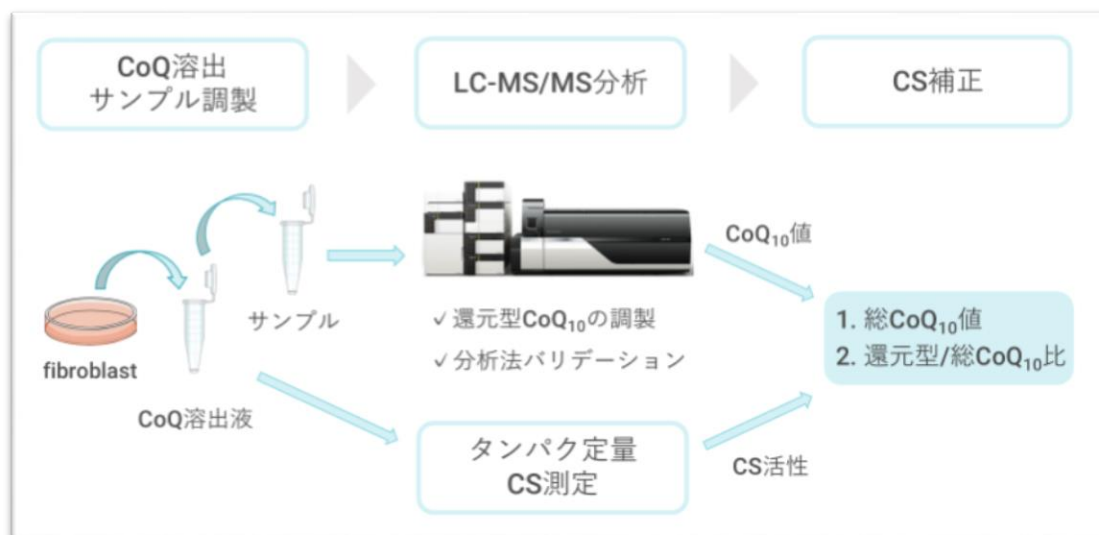


図 2-1. 皮膚線維芽細胞の CoQ₁₀ 測定
クエン酸シンターゼ (citrate synthase: CS)

1) ミトコンドリア疾患の皮膚線維芽細胞樹立

本学、神奈川県立こども医療センター、千葉県こども病院通院中の患者で、本学倫理委員会の承認に従い、親権者から検体採取の同意が得られた 24 名のミトコンドリア病患者を対象とした（承認番号：遺 20-変 12）。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症患者は、CoQ₁₀ 生合成に関わるタンパク質をコードする *COQ* 遺伝子の両アレルに病的変異を有する小児期発症例を対象とした。

樹立した皮膚線維芽細胞の患者背景を、表 2-1 に示す；

原発性 **CoQ₁₀** 欠乏症 5 例； *COQ2* 遺伝子変異は 1 例あり、症例 1 (c.[349G>C];[912+1G>del])であった。また *COQ4* 遺伝子変異は 4 例あり、症例 2 (6) (c.[718C>T];[421C>T])、症例 3 (7) (c.[431C>A];[718C>T])、症例 4、症例 5 (c.[190C>T];[479G>A]) であった。

ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症 10 例； 複合体I異常症が 7 例あり、症例 6 (34) (c.[55C>T], NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit A1: NDUFA1)、症例 7 (34) (m.10158T>C, MT-ND3)、症例 8 (35)、症例 9、症例 10 (36) (m.13513G>A, MT-ND5)、症例 11 (c.[811T>G];[1766-2A>G], Acyl-CoA dehydrogenase family member 9: ACAD9)、症例 12 (36) (c.[1150G>A];[1817T>A], ACAD9) であった。NDUFA1、MT-ND3、MT-ND5 はいずれも複合体Iのサブユニット構成蛋白、ACAD9 は複合体Iのアセンブリファクターである。また、複合体IV異常症が 2 例あり、症例 13 (37) (c.[743C>A], SURF1 cytochrome c oxidase assembly factor: SURF1)、症例 14 (7) (c.[367_368delAG];[572delC], SURF1) であった。SURF1 は複合体IVのアセンブリファクターである。さらに、複合体V異常症が 1 例あり、症例 15 (7) (m.8993T>G, MT-ATP6) であった。MT-ATP6 は複合体Vのアセンブリファクターである。

上記以外のミトコンドリア病 9 例；mtDNA 枯渇症候群が 3 例あり、症例 16 (38) (c.[143-307_170del335];[143-307_170del335], Deoxyguanosine kinase: DGUOK)、症例 17 (38) (c.[451dupC];[308_310del], MPV17)、症例 18 (38) (c.[148C>T];[149G>A], MPV17) であった。DGUOK と MPV17 は、mtDNA の維持に関わる。Kearns-Sayre 症候群が 1 例

あり、症例 19 (5513bp del; m.8290-13802) であった。MELAS (myopathy encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes) が 2 例あり、症例 20 (34) (m.3243 A>G, tRNA-Leu)、症例 21 (34) (m.5541 C>T, tRNA-Trp) であった。ECHS1 (Short-chain enoyl-CoA hydratase) 異常症が 1 例あり、症例 22 (39)(c.[832G>A]母方ヘテロ接合性変異、ECHS1) であった。*ECHS1* はバリン代謝に関わる遺伝子で、その異常によりミトコンドリア機能障害をおこす有害物質が蓄積する。BOLA3 (Bola family member 3) 異常症が 2 例あり、症例 23 (36)、症例 24 (c.[287A>G]; [287A>G], BOLA3) であった。BOLA3 は鉄硫黄クラスター生成に関連し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の組み立てに関与している。

対照の皮膚線維芽細胞として、PromoCell Company (#C-12300, GmbH, Heidelberg, Germany)から 2 つ、JCRB 細胞バンク(#TIG-120, #HT-2020, Japan)から 2 つ、Lonza Japan (#CC-2509, Tokyo, Japan)から 1 つ購入して使用した。また、ミトコンドリア病以外の患者細胞を 5 つ使用した。

表 2-1. ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞

症例 [文献]	疾患	遺伝子	遺伝子変異 (ヘテロプラスミー率%)	機能分類
1	原発性 CoQ ₁₀ 欠乏症	<i>COQ2</i>	c.[349G>C];[912+1G>del]	CoQ ₁₀ 生合成
2 [6]	原発性 CoQ ₁₀ 欠乏症	<i>COQ4</i>	c.[718C>T];[421C>T]	CoQ ₁₀ 生合成
3 [7]	原発性 CoQ ₁₀ 欠乏症	<i>COQ4</i>	c.[431C>A];[718C>T]	CoQ ₁₀ 生合成
4	原発性 CoQ ₁₀ 欠乏症	<i>COQ4</i>	c.[190C>T];[479G>A]	CoQ ₁₀ 生合成
5	原発性 CoQ ₁₀ 欠乏症	<i>COQ4</i>	c.[190C>T];[479G>A]	CoQ ₁₀ 生合成
6 [34]	Leigh 脳症	<i>NDUFA1</i>	c.[55C>T], 100% (X-linked)	複合体 I サブユニット
7 [34]	Leigh 脳症	<i>MT-ND3</i>	m.10158T>C (F *, 90%)	複合体 I サブユニットI
8 [35]	新生児心筋症	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A (F; 78.87%)	複合体 I サブユニット
9	新生児ミトコンドリア病	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A (B **, 77%)	複合体 I サブユニット
10 [36]	Leigh 脳症	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A (F; 26%)	複合体 I サブユニット
11	ミトコンドリア心筋症	<i>ACAD9</i>	c.[811T>G];[1766-2A>G]	複合体 I アセンブリファクター
12 [36]	乳児ミトコンドリア病	<i>ACAD9</i>	c.[1150G>A];[1817T>A]	複合体 I アセンブリファクター
13 [37]	Leigh 脳症	<i>SURF1</i>	c.[743C>A] (homoplasmy)	複合体IVアセンブリファクター
14 [7]	Leigh 脳症	<i>SURF1</i>	c.[367_368delAG];[572delC]	複合体IVアセンブリファクター
15 [7]	Leigh 脳症	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G (homoplasmy)	複合体Vアセンブリファクター
16 [38]	mtDNA 枯渇症候群	<i>DGUOK</i>	c.[143-307_170del335];[143-307_170del335]	ヌクレオチド合成
17 [38]	mtDNA 枯渇症候群	<i>MPV17</i>	c.[451dupC];[308_310del]	mtDNA 複製
18 [38]	mtDNA 枯渇症候群	<i>MPV17</i>	c.[148C>T];[149G>A]	mtDNA 複製
19	Kearns-Sayre 症候群		mtDNA 単独欠失 deletion (5513bp del; m.8290-13802)	
20 [34]	MELAS ***	(tRNA-Leu)	m.3243 A>G (F; 21%)	ミトコンドリア tRNA
21 [34]	MELAS	(tRNA-Trp)	m.5541 C>T (F; 49%)	ミトコンドリア tRNA
22 [39]	ECHS1 異常症	<i>ECHS1</i>	c.[832G>A]	バリン代謝異常による毒性化合物蓄積
23 [36]	BOLA3 異常症	<i>BOLA3</i>	c.[287A>G];[287A>G]	鉄硫黄クラスター合成
24	BOLA3 異常症	<i>BOLA3</i>	c.[287A>G];[287A>G]	鉄硫黄クラスター合成

* F ; fibroblast (皮膚線維芽細胞)、** B; blood (血液)、*** MELAS ; myopathy encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes

2) 細胞培養

皮膚線維芽細胞は 10% FBS (fetal bovine serum) と 100 units/ml ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した 1.0 g/L low glucose DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を使用し、37°C、5% CO₂ 下で培養した。継代数 4~29 の細胞を使用した。

3) CoQ 溶出

皮膚線維芽細胞の CoQ 溶出方法は、Buján らの方法を参考にした(24)。まず、60 mm ディッシュにセミコンフルエントまで培養した皮膚線維芽細胞を PBS で 2 回洗浄し、細胞を回収し、測定まで -80°C で保存した。測定当日、細胞を氷上で Lysis Buffer (0.25 mM scrose, 2 mM EDTA, 10 mM Tris, 100 UI/mL heparin, pH 7.4.) 500 µL に再懸濁し、5 秒間、2 回超音波破碎し、CoQ を溶出した。なお、この細胞懸濁液は 2.7) 項の蛋白定量やクエン酸シンターゼ測定にも使用した。

次に、液体クロマトグラフータンデム質量分析計 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS) で測定するためのサンプルを調製した。内部標準 CoQ₁₀-d₉ (IsoSciences, Ambler, PA) と 20 µM *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) (富士フィルム和光純薬、大阪、日本) 入りエタノール 900 µL に、細胞懸濁液 100 µL を加え、遠心 (15,700×g、10 分、4°C) し、その上清を測定に使用した。

4) 酸化型 CoQ₁₀ の還元反応

標準曲線を得るために、酸化型 CoQ₁₀、還元型 CoQ₁₀ それぞれの標準品を測定するが、還元型 CoQ₁₀ は容易に酸化されるため、測定直前に酸化型 CoQ₁₀ の標準品

に還元反応を行い、用時調製する必要がある。酸化型 CoQ₁₀ の還元反応方法は、Pandey らの方法を参考にした(40)。まず、ガラスチューブにヘキサン (LC/MS 用、富士フィルム和光純薬) 1.95 ml を入れ、酸化型 CoQ₁₀ (東京化成工業、東京、日本) 50 µL を溶解した。次に、還元剤であるテトラヒドロほう酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬) 20mg を加え、さらにメタノール 100 µL を加え、3 分間ボルテックスし、遮光し、室温で 5 分間静置した。100 µM EDTA 1 ml を加え還元反応を停止し、1 分間ボルテックスし、遠心 (1,500×g、5 分、4°C) した。還元型 CoQ₁₀ を含む上清を新しいガラスチューブに入れた。

5) LC-MS/MS 分析

酸化型 CoQ₁₀、還元型 CoQ₁₀ の測定方法は、Burger らの方法を参考にした(41)。超高速液体クロマトグラフは Nexera X2 (島津製作所、京都、日本)、トリプル四重極質量分析計は LCMS-8060 (島津製作所)、エレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization-mass spectrometry: ESI-MS) を使用した。分析カラムはガードカラム付き Kinetex-C18 column (100 mm x 2.1 mm, 2.6 µm, Phenomene, Torrance, CA) を使用した。カラムオーブン温度は 40°C に保持した。移動相はイソクラティック溶離で、2 mM ギ酸アンモニウム入りメタノールを用い、流速 0.8 mL/min で、サンプル注入量は 2 µL、分析時間は 6 分とした。インターフェース温度は 300°C、Desolvation Line (DL) 温度は 250°C、heat block 温度は 400°C とした。nebulizing gas 流速 3 L/min、heating gas 流速 10 L/min、drying gas 流速 10 L/min とした。サンプルは、オートサンプラーで注入されるまで 4°C に保持した。検出は MS/MS の multiple reaction monitoring (MRM) モード (酸化型 CoQ₁₀ : m/z 880.5 > 197.1、酸化型 CoQ₁₀ : m/z 882.4 > 197.0、CoQ₁₀-

d9（内部標準）： m/z 890.4 > 206.2）で行った。標準品とサンプルを LabSolutions ソフトウェアプログラムで定量し、酸化型 CoQ₁₀、還元型 CoQ₁₀、CoQ₁₀-d9 のピーク面積を求め、標準曲線を用いてサンプル中に存在する CoQ₁₀ 量を算出した。

6) 分析法バリデーション

試料には、皮膚線維芽細胞に CoQ₁₀ 標準試料 9 nM を添加したものと、CoQ₁₀ 標準試料 2 濃度（0.25 nM、25 nM）を用いた。日内（intra-assay）再現性は、精度を表す変動係数（coefficient of validation; CV）と、真度を表す相対誤差（relative error: RE）を、それぞれ 5 回測定して算出した。日間（inter-assay）再現性の精度と真度は、3 日間測定して評価した。精度は（標準偏差／平均濃度）×100（%）、真度は（定量値／理論値）×100（%）として求めた。

日内再現性の精度は還元型 CoQ₁₀ 0.58～3.28%、酸化型 CoQ₁₀ 1.39～3.10%、真度は還元型 CoQ₁₀ -4.27～4.20%、酸化型 CoQ₁₀ -4.90～2.50%であった。日間再現性の精度は還元型 CoQ₁₀ 1.27～4.77%、酸化型 CoQ₁₀ 1.73～5.58%、真度は還元型 CoQ₁₀ -0.89～10.54%、酸化型 CoQ₁₀ -7.49～1.18%であった（表 2-2）。

表 2-2. 還元型 CoQ₁₀、酸化型 CoQ₁₀ の日内再現性と日間再現性

	日内再現性		日間再現性	
	精度 (CV%)	真度 (RE%)	精度 (CV%)	真度 (RE%)
還元型 CoQ₁₀				
1) 皮膚線維芽細胞の内因性 CoQ ₁₀ + CoQ ₁₀ 標準試料 9 nM	0.58	4.20	1.27	10.54
2) CoQ ₁₀ 標準試料 0.25 nM	3.28	-2.40	4.77	1.23
3) CoQ ₁₀ 標準試料 25 nM	1.45	-4.27	1.64	-0.89
酸化型 CoQ₁₀				
1) 皮膚線維芽細胞の内因性 CoQ ₁₀ + CoQ ₁₀ 標準試料 9 nM	1.39	2.50	1.84	1.18
2) CoQ ₁₀ 標準試料 0.25 nM	3.10	-3.68	5.58	-7.49
3) CoQ ₁₀ 標準試料 25 nM	1.96	-4.90	1.73	-6.15

7) 蛋白定量、クエン酸シンターゼ測定

2.1.3) 項で調製した細胞懸濁液の上清の一部を用い、蛋白定量、クエン酸シンターゼ測定を行った。まず、Qubit™ Protein Assay Kits と Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で蛋白濃度を定量した。次に、ミトコンドリア酸化系酵素の指標としてクエン酸シンターゼ (citrate synthase; CS) 活性を、Srere (1969 年) の方法を参考に、分光測定法により求めた。1 mM DTNB (同仁化学研究所、熊本、日本) 20 µL、10 mM アセチル CoA (富士フィルム和光純薬) 6 µL、10 mM オキサロ酢酸 (東京化成工業、東京、日本) 10 µL、酵素サンプル液量は最終蛋白濃度が 12-20 µg となるよう 50-100 µL 調製し、DDW を加え total 200 µL とした。定量は TNB の生成に基づく 412 nm の吸光度の増加により測定した。CS 活性は以下の計算式で求めた：

CS 活性：

$$\text{units } (\mu\text{mol/ml/min}) = (\Delta A_{412}/\text{min} \times V \text{ (mL)}) / (\epsilon^{\text{mM}} \times L \text{ (cm)}) \times V_{\text{enz}} \text{ (mL)}$$

$V \text{ (mL)}$ ：反応液量 (200 μL)

$\epsilon^{\text{mM}} \text{ (mM}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ：412 nm における TNB の分子吸光係数 (13.6)

$L \text{ (cm)}$ ：光路長 (0.552cm)

$V_{\text{enz}} \text{ (mL)}$ ：酵素サンプル液量

最終的に、LC-MS/MS 分析で得られた CoQ₁₀ 値を、CS 活性で補正した (CoQ₁₀ 実測値/CS units (nmol/CS units))。

8) 呼吸鎖酵素活性の測定

複合体I異常のある患者 7 例を対象とし、既報を参考に、複合体 I、II、III、および IV の酵素活性を測定した(42-44)。サンプルは皮膚線維芽細胞から単離したミトコンドリア画分、もしくは 600g 後の組織の粗ホモジネートとした。各複合体の酵素活性は対照に対するパーセント (%) で示した。細胞株では 40%以下、組織では 30%以下を、酵素活性低下とみなした(45)。

2.2 原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の ferroptosis からみた病態

1) 対象

2.1 1) 項で樹立したミトコンドリア疾患の皮膚線維芽細胞のうち、症例 1（以下 Case 1 とする）、症例 3（以下 Case 2 とする）、症例 4（以下 Case 3 とする）の 3 例を患者細胞として、また PromoCell Company から購入した健常皮膚線維芽細胞 1 例を対照として、ferroptosis assay を行った。以下に患者背景を示す；

Case 1 ; 3 歳女児。18 か月時にステロイド抵抗性ネフローゼ症候群で発症。約 2 週の経過で腎不全となり、血液透析ののちに腹膜透析を導入をされた。発症前まで年齢相当の発達であったが、退行した（寝返り不可、発語消失）。皮膚線維芽細胞でミトコンドリア呼吸鎖酵素活性や、酸素消費量は低下しなかった。ミトコンドリア病疑いとして CoQ₁₀ 補充療法を受け、ADL が改善した。Case 1 の妹も、11 か月時にネフローゼ症候群を発症。姉妹ともに *COQ2* 遺伝子変異 ([c.349 G > C, p. Ala117Pro];[c.912+1 G>del]) を認めた。

Case 2 ; Case 2 の姉は、新生児期から呼吸障害と筋緊張低下、痙攣を呈した。生後 4 か月の頭部 MRI で広範な脳萎縮がみられた。ミトコンドリア病を疑い各種ビタミン内服を行ったが、生後 10 か月で呼吸不全で死亡した。Case 2 は出生時から筋緊張が低下し、姉の経過からミトコンドリア病を疑い、生後 1 か月から各種ビタミン薬内服を開始した。生後 1 か月に痙攣、生後 2 か月で心筋症、後に不整脈が出現した。皮膚線維芽細胞で呼吸鎖酵素活性の低下はみられなかったが、酸素消費量がコントロールの 53%と低下していた。姉妹とも *COQ4* 遺伝子変異 ([c.431 C > A, p. Thr144Asn];[c.718 C > T, p. Arg240Cys]) を認めた。

Case 3 ; 双胎第 1 子。男児。36 週 1 日、2884g で出生。5 か月時に WPW 症候群と診断された。1 歳 1 か月時に、嘔吐、意識現存を繰り返す焦点発作が群発した。Case 3 の妹は、1874g で出生、3 か月時に無熱性けいれんが群発し、抗てんかん薬が開始された。1 歳 6 か月時に嘔吐頻回、焦点発作が群発した。2 例とも、進行性の精神運動発達遅滞があり、脳卒中様発作を繰り返した。頭部 MRI で右後頭葉から頭頂葉の浮腫性の変化、基底核病変がみられた。また、高乳酸血症があり、皮膚線維芽細胞の酸素消費量が低下していた。兄妹とも *COQ4* 遺伝子変異 ([c.190 C>T, p.Pro64Ser];[c.479 G>A, p Arg160Gln]) を検出した。

2) ferroptosis 誘導による脆弱性の評価

まず、ferroptosis 誘導による脆弱性を評価するために、ferroptosis 誘導薬である RSL3 (Selleck, Houston, TX, USA)、FIN56 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)、Brequinar (Selleck) を各細胞に添加して細胞死を誘導し、細胞生存率を測定した (図 2-2)。RSL3 は、脂質ペルオキシドの還元酵素で酵素活性の補因子として抗酸化物質であるグルタチオン (glutathione: GSH) を使用するグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (glutathione peroxidase 4: GPX4) を阻害するため、脂質ヒドロペルオキシドの蓄積がおこり、ferroptosis を誘導する(46)。FIN56 は、GPX4 を分解するとともに、スクアレン合成酵素を活性化することで CoQ₁₀ の枯渇も引き起こす(47)。Brequinar は、ピリミジン生合成酵素である dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) を阻害し、ミトコンドリアの脂質過酸化を誘導し、GPX4 低発現細胞において ferroptosis を誘導する(48)。

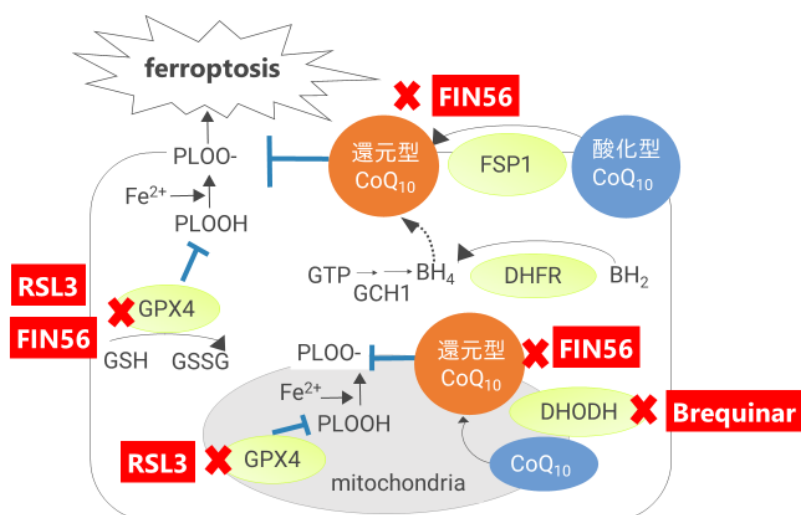


図 2-2. ferroptosis 誘導薬の作用点

次に、ferroptosis 阻害薬である ferrostatin-1 (Fer-1, Sigma-Aldrich) が、RSL3 や FIN56 により誘導された細胞死を抑制するか評価した。Fer-1 は脂質二重層にペルオキシラジカル補足することで過酸化脂質を抑制し、ferroptosis を阻害する(49,50)。さらに、ferroptosis 誘導薬により誘導された細胞死が、ferroptosis 以外の細胞死である apoptosis や necrosis に影響されていないか、apoptosis 阻害薬 (Z-VAD-FMK, Peptide institute Inc., Osaka, Japan)、necrosis 阻害薬 (GSK-872, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) による ferroptosis 阻止への影響も調べた。

セミコンフルエントまで培養した皮膚線維芽細胞を、細胞培養用 96 ウェルプレートに 5,000 細胞 / ウェルおよび 100 μ L 培地 / ウェルの濃度になるよう播種し、37°C、5% CO₂ の条件で 24 時間培養した。培養 24 時間後に試薬を添加し、添加 24 時間後に細胞生存率を測定した。細胞生存率の測定には、生細胞数測定試薬 AquaBluer (MultiTarget Pharmaceuticals LCC, SLC, USA) を使い、Benchmark Plus マイクロプレ

ートリーダー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) により吸光度を測定し、試薬非添加群と比較解析した。

3) 過酸化脂質の測定

a) 細胞膜とミトコンドリア膜の過酸化脂質の評価

ferroptosis の指標である過酸化脂質について、蛍光試薬 C11-BODIPY (581/591) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) と MitoPerOx (abcam, Cambridge, MA, USA) を用い、蛍光顕微鏡で評価した。C11-BODIPY は細胞膜に取り込まれ、酸化されると最大蛍光波長が 590 nm から 510 nm (赤色から緑色) にシフトする(51)。また MitoPerOx はミトコンドリア膜に特異的に取り込まれる試薬で、酸化されると最大蛍光波長が 590 nm から 520 nm (赤色から緑色) にシフトする(52)。

セミコンフルエントまで培養した皮膚線維芽細胞を、細胞培養用 96 ウェルプレートに 8,000 細胞 / ウェルおよび 100 μ L 培地 / ウェルの濃度になるよう播種し、37°C、5% CO₂ の条件で 24 時間培養した。培養 24 時間後に、control 群 (RSL3、Fer-1 非添加群)、250 nM RSL3 添加群、250 nM RSL3 + 1 μ M Fer-1 添加群に分け、75 分培養した。培養 75 分後に試薬を除去し、5 μ M C11-BODIPY または 50 nM MitoPerOx を添加し、30 分培養した。核染色として Hoechst 33342 (1:5000) を用いた。PBS で洗浄後、共焦点顕微鏡 Operetta CLS (Perkinelmer, Waltham, MA, USA) で観察した。

b) フローサイトメトリーによる細胞膜の過酸化脂質の解析

2.2.3) a) 項の結果、ferroptosis 誘導時に細胞膜での過酸化脂質が増加することが示唆されたため、細胞膜の過酸化脂質をフローサイトメトリーで定量的に評価した。

まず、セミコンフルエントまで培養した皮膚線維芽細胞を 60 mm ディッシュに 80,000 細胞 / ml および 4 ml /ディッシュの濃度になるよう播種し、37°C、5% CO₂ の条件で 48 時間培養した。培養 48 時間後に、control 群（RSL3、Fer-1 非添加群）、500 nM RSL3 添加群、500 nM RSL3+1 μ M Fer-1 添加群に分け、30 分培養した。培地を除去し、5 μ M C11-BODIPY を添加し、30 分培養した。PBS で 2 回洗浄後、細胞をトリプシン処理し、35 μ M strainer（Falcon tube with cell strainer CAP）で濾過し、1% ウシアルブミン入り PBS 600 μ L に再懸濁した。核を 7-AAD（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）で染色し、死細胞を除去した。フローサイトメーター（CytoFLEX, BECKMAN COULTER, Brea, CA, USA）の 488 nm レーザーで励起し、585/15 および 515/20 のフィルターからデータを収集し、1 サンプルあたり少なくとも 10,000 イベントを測定した。FlowJo Software (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)を用いて解析した。

4) RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR

ferroptosis に関与する遺伝子、*AIFM2*、*DHODH*、*GPX4*、*PTGS2*、*ACSL4* の発現を評価した。RNeasy® Mini Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を用いて、皮膚線維芽細胞から total RNA を付属のプロトコールに従い抽出した。得られた RNA から、Superscript® VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)を用いて cDNA を合成した。*GPX4*、*PTGS2*、*ACSL4* 遺伝子発現は SYBR Green 法で検出した。SYBR Green 法で用いたプライマーの塩基配列を、表 2-3 に示す。また、*AIFM2* と *DHODH* の遺伝子発現の検出は、SYBR Green 法で非特異的な増幅がみられたため、TaqMan® 法を用いた。PCR 反応は Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA) を用い、95°C 20 秒反応後、95°C 3 秒、60°C 30 秒を SYBR Green 法では 40 サイクル、TaqMan® 法では 60 サイクルで、定量 PCR 反応を行った。標的遺伝子の発現量は GAPDH の発現量に対して正規化し、データは $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて解析した。

表 2-3. SYBR Green 法で用いたプライマーの塩基配列

	Forward primer	Reverse primer
GPX4	GCCTTCCCGTGTAACCAGT	GCGAACTCTTTGATCTCTTCG
PTGS2	GCCTGAATGTGCCATAAGACTGAC	AAACCCACAGTGCTTGACACAGA
ACSL4	CCCTGAAGGATTTGAGATTACACA	CCTTAGGTCGGCCAGTAGAAC
GAPDH	CTTTGTCAAGCTCATTTCTCTGG	TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC

5) ウェスタンブロット

2.2 4) 項で、AIFM2 の遺伝子発現の増加がみられたため、RSL3 による ferroptosis 誘導時の AIFM2 蛋白発現をウェスタンブロット法で評価した。まず、60 mm ディッシュにセミコンフルエントになるまで皮膚線維芽細胞を培養し、control 群 (試薬非添加群)、1 μ M Fer-1 群、100 nM RSL3 群、100 nM RSL3 + 1 μ M Fer-1 群を作成し、100 nM RSL3 群で細胞死がみられるまでインキュベーター内で 37 °C、5% CO₂ の条件で 8~24 時間培養した。PBS で洗浄し、細胞を回収し、測定まで -80 °C で保存した。測定当日、TNE buffer (20 mM Tris-HCL [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) を用いて蛋白を抽出した。細胞溶解液を超音波破碎し、遠心 (15,000 rpm、30 分、4 °C) し、その上清の一部を用いて BCA 法の測定キット (Takara, T9310A) で蛋白濃度を定量した。上清 120 μ L を 5x SDS サンプルバッファー 30 μ L と混合し、

95 °C、3 分で熱処理した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、DRC ERICA MP 電気泳動槽 (XV PANTERA MP SYSTEM; DRC CO. LTD., Tokyo, Japan) で行った。AIFM2 は総蛋白量 17.28 μ g、 β -actin は総蛋白量 5 μ g とし、XV PANTERA MP Gel (ゲル濃度 12.5%) (丸幸商会、東京、日本) にアプライし、250V、20 分間の SDS-PAGE 電気泳動を行い、その後 28V、10 分間で Polyvinylidene Difluoride (PVDF) メンブレンに蛋白転写した。蛋白転写後のメンブレンを用いて immunoblot analysis を行った。ブロッキングバッファーは、AIFM2 では 5% スキムミルク in PBS/ 0.1% Tween20; PBS-T、 β -actin は 5% スキムミルク in PBS/ 0.1% TritonX-100 を使用し、室温で、1 時間ブロッキングした。一次抗体を添加した抗体希釈液は、AIFM2 では PBS-T、 β -actin は PBS/ 0.1% TritonX-100 を使用し、4 °C で静置し、一晩反応させた。AIFM2 は PBS-T、 β -actin は PBS/ 0.1% TritonX-100 で 10 分間、3 回洗浄した。二次抗体を添加した抗体希釈液は、AIFM2 では 5% スキムミルク in PBS-T、 β -actin は PBS/ 0.1% TritonX-100 を使用し、室温で、1 時間で反応させた。AIFM2 は PBS-T、 β -actin は PBS/ 0.1% TritonX-100 で 15 分間、3 回洗浄後、HRP 検出試薬 (#T7103A, TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) を 2 分間反応させ、Amersham Imager 680 (GE Healthcare) で蛍光検出した。バンドの強度は内在性コントロールで標準化し、タンパク発現量は対照群を基準として相対的に評価した。ウエスタンブロットで使用した抗体は表 2-4 に記載した。

表 2-4. ウエスタンブロットで使用した抗体

抗体	製造元	製品番号	希釈率
ラビット抗 AIFM2 抗体	Sigma-Aldrich	SAB2100080	1:3000
マウスモノクローナル抗 β -actin 抗体	Sigma-Aldrich	A1978	1:5000
マウス抗ラビット IgG 抗体	Santa Cruz	SC-2357	1:5000
マウス IgGk 結合タンパク質抗体	Santa Cruz	SC-516102	1:1000

6) 総グルタチオン量および還元型グルタチオン/酸化型グルタチオン比の測定

GSH/GSSG-GloTM Assay kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、総グルタチオン（酸化型グルタチオン+還元型グルタチオン）および酸化型グルタチオン (glutathione-S-S-glutathione: GSSG) を、付属のプロトコールに従って測定した。還元型グルタチオン/GSSG 比は、（総グルタチオン発光量-GSSG 発光量）／（GSSG 発光量／2）として算出した。

2.3 統計学的解析

統計解析は、GraphPad Prism ソフトウェアプログラム（version 9.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA）を用いて行った。多群間比較は、Dunnett 法による多重比較を行った。P < 0.05 を有意差ありと判定し、* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001 で示した。

3. 結果

3.1 皮膚線維芽細胞の CoQ₁₀ 測定系の構築と CoQ₁₀ 還元状態の評価

1) ミトコンドリア病患者皮膚線維芽細胞の総 CoQ₁₀ 値

皮膚線維芽細胞の還元型 CoQ₁₀ 値、酸化型 CoQ₁₀ 値、総 CoQ₁₀ 値（還元型 CoQ₁₀ 値＋酸化型 CoQ₁₀ 値）を、表 3-1 に示す。対照（n=10）の総 CoQ₁₀ 値は 2.30 ± 0.24 （平均±標準偏差）nmol / CS unit であった（図 3-1）。6 例で総 CoQ₁₀ 値低下（対照の総 CoQ₁₀ 値の 70%未満）がみられた。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症は全例（症例 1-5）低下した。また 1 例は Kearns-Sayre 症候群（症例 19）であった。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症（n=5）の総 CoQ₁₀ 値は 1.00 ± 0.19 nmol / CS unit で、対照より有意に低値であった（ $p < 0.01$ ）（図 3-1）。一方、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症以外のミトコンドリア病（n=19）の総 CoQ₁₀ 値は 2.23 ± 0.26 nmol / CS unit で、対照と比較し低下していなかった（ $p = 0.98$ ）。

以上の結果から、本測定系で CoQ₁₀ 欠乏症の生化学的診断が可能であると考えた。

表 3-1. 還元型 CoQ₁₀ 値、酸化型 CoQ₁₀ 値、総 CoQ₁₀ 値と CoQ 欠乏

症例	還元型 CoQ ₁₀		酸化型 CoQ ₁₀		総 CoQ ₁₀ (nmol/CS unit)		CoQ 欠乏 (%)
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	
1	0.37	0.15	0.37	0.02	0.74	0.13	32
2	0.12	0.00	0.16	0.00	0.28	0.00	12
3	0.57	0.45	0.59	0.18	1.16	0.63	50
4	0.64	0.03	0.74	0.20	1.38	0.17	60
5	0.78	0.01	0.64	0.02	1.42	0.01	62
6	0.48	0.01	1.65	0.00	2.13	0.01	
7	1.03	0.04	1.00	0.32	2.03	0.29	
8	1.22	0.04	0.82	0.18	2.04	0.22	
9	1.40	0.54	0.96	0.03	2.36	0.51	
10	0.86	0.16	1.34	0.30	2.20	0.46	
11	1.02	0.08	2.17	0.53	3.19	0.44	
12	1.18	0.56	1.31	0.17	2.49	0.38	
13	1.33	0.03	0.57	0.02	1.90	0.00	
14	1.77	0.31	0.58	0.10	2.35	0.21	
15	1.54	0.09	0.71	0.00	2.25	0.09	
16	0.86	0.02	1.46	0.01	2.32	0.01	
17	1.37	0.40	1.28	0.14	2.65	0.25	
18	1.01	0.20	1.52	0.08	2.53	0.29	
19	0.57	0.01	0.72	0.02	1.29	0.02	56
20	1.41	0.40	0.51	0.11	1.92	0.51	
21	1.24	0.28	0.65	0.28	1.89	0.56	
22	1.19	0.11	0.87	0.23	2.06	0.34	
23	0.81	0.19	1.84	0.46	2.65	0.27	
24	0.92	0.01	1.23	0.00	2.15	0.01	
対照 (n=10)	1.19	0.15	1.11	0.10	2.30	0.24	

CoQ 欠乏：対照の総 CoQ₁₀ 値の 70%未満、mean：平均、SD：標準偏差

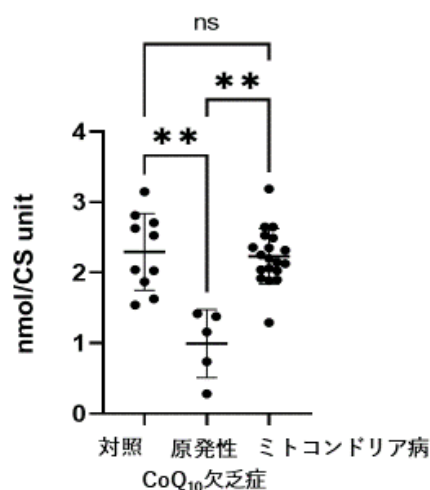


図 3-1. 皮膚線維芽細胞の総 CoQ₁₀ 値

6 例で総 CoQ₁₀ が低下（対照の総 CoQ₁₀ 値の 70%未満）していた。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症は、全例で総 CoQ₁₀ 値が低下した。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症以外のミトコンドリア病では、Kearns-Sayre 症候群（症例 19）を除き、総 CoQ₁₀ 値は低下していなかった。** p < 0.01。

2) 還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比

総 CoQ₁₀ 値に占める還元型 CoQ₁₀ の比率（還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比）を示す（表 3-2）。対照の還元型および酸化型 CoQ₁₀ の総 CoQ₁₀ に対する比率は、それぞれ 52% および 48% であった。還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比の低下（対照の還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ の 80%未満）が、6 例でみられた。うち複合体 I 異常症が 3 例（症例 6、10、11）、mtDNA 枯渇症候群が 2 例（症例 16、18）、BOLA3 異常症が 1 例（症例 23）であった。一方、還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比の増加（対照の還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ の 120%より大）が、5 例でみられた。うち複合体 IV 異常症が 2 例（症例 13、14）、複合体 V 異常症が 1 例（症例 15）、MELAS が 2 例（症例 20、21）であった。

原発性 CoQ₁₀ 欠乏症では、全例、対照と比較して変化がみられなかった（対照（n=10） $52 \pm 1\%$ （平均 \pm 標準偏差）、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症（n=5） $49 \pm 7\%$ 、 $p=0.95$ ）（図 3-2）。複合体 I 異常症では、7 例中 3 例で低下したが、全体では対照と比較して有意差はなかった（複合体 I 異常症（n=7） $44 \pm 7\%$ 、 $p=0.84$ ）。一方で複合体 IV または V 異常症では、全例、対照と比較して還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比は増加した（複合体 IV または V 異常症（n=3） $71 \pm 3\%$ 、 $p=0.0028$ ）。また、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症、複合体 I 異常症、複合体 I、IV、V 異常症以外のミトコンドリア病（症例 16-24）と比較しても、還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比は増加した（vs 原発性 CoQ₁₀ 欠乏症 $p=0.004$ 、vs 複合体 I 異常症 $p=0.017$ 、vs ミトコンドリア病 $p=0.017$ ）。その他のミトコンドリア病では、対照と比較して有意差はなかった（ミトコンドリア病（n=9） $49 \pm 4\%$ 、 $p=0.99$ ）。

以上の結果から、総 CoQ₁₀ 低下がみられない症例でも、還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比の変化を伴う病態が存在すると考えられた。

表 3-2. 還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比

症例	還元型 CoQ ₁₀ /総 CoQ ₁₀ 比(%) mean	SD	(症例の還元型 CoQ ₁₀ /総 CoQ ₁₀ 比) (対照の還元型 CoQ ₁₀ /総 CoQ ₁₀ 比) (%)
1	50	11	96
2	43	1	83
3	49	14	95
4	47	8	90
5	55	1	106
6	23	0	44
7	51	9	97
8	60	4	115
9	59	10	114
10	39	1	75
11	32	7	61
12	47	15	91
13	70	1	135
14	75	7	145
15	68	1	131
16	37	1	71
17	52	10	100
18	40	3	77
19	44	0	85
20	74	1	142
21	66	5	127
22	58	4	111
23	30	10	59
24	43	0	83
対照 (n=10)	52	1	

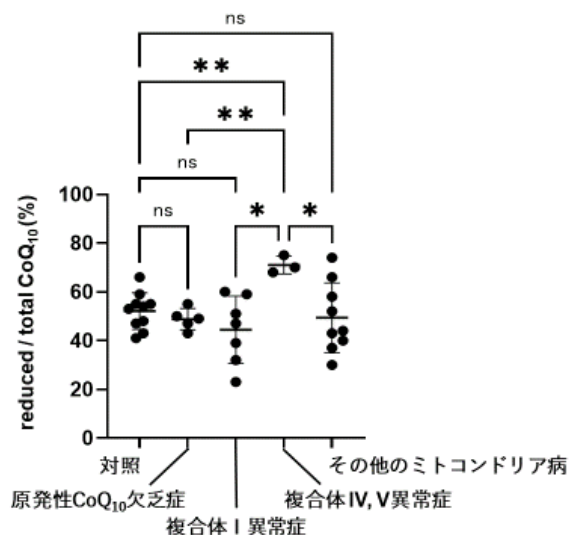


図 3-2. 皮膚線維芽細胞の還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比の比較

原発性 CoQ₁₀ 欠乏症では、還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比は変化がみられなかった。

一方、複合体I異常症では、3/7 例で還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比が低下（対照の <80%）し、複合体 IV、V 異常症では、全例で還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比が増加（対照の 120%<）した。*P < 0.05、**P < 0.01、NS; Not significant。

3) 呼吸鎖酵素活性

複合体 I 異常患者の呼吸鎖酵素活性値を表 3.3 に示す。皮膚線維芽細胞で、C1 活性だけが低下している症例は、症例 6、9、10、11 の 4 例であった。

表 3-3. 複合体 I 異常患者の呼吸鎖酵素活性値

症例	CI	CII	CII+III	CIII	CIV	サンプル
6	28	104	n/a	70	78	皮膚線維芽細胞
7	9.8	93.9	76.8	94.5	47.6	筋
8	9.6	20.3	14.9	33.9	28.1	皮膚線維芽細胞
9	22	61	62	97	76	皮膚線維芽細胞
10	29	91	50	101	100	皮膚線維芽細胞
11	34	232	129	72	202	皮膚線維芽細胞
12	64	102	52	77	76	皮膚線維芽細胞
12	13	185	186	140	138	筋

各複合体の活性は、対照に対するパーセント(%)で示した
細胞株では 40%以下、組織では 30%以下を、酵素活性低下とみなした

3.2 原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の ferroptosis からみた病態

1) ferroptosis 誘導時の正常細胞と患者細胞の生存率の比較

RSL3 および FIN56 による ferroptosis 誘導時の細胞生存率から、50%効果濃度 (EC₅₀) 値を算出した結果を、図 3-3 に示す。RSL3 による ferroptosis 誘導時、control の EC₅₀ は 361 nM であったのに対し、Case 1 では 14 nM、Case 2 では 78 nM、Case 3 では 65 nM であった (図 3-3. A)。また、FIN56 による ferroptosis 誘導時、control の EC₅₀ は 2.29 μM であったのに対し、Case 1 では 0.1 μM、Case 2 では 0.29 μM、Case 3 では 0.13 μM であった (図 3-3. B)。RSL3 による ferroptosis 誘導時には、特に Case1 で細胞の脆弱性がみられた。一方、FIN56 による ferroptosis 誘導時には、Case1-3 で同程度の細胞の脆弱性がみられた。前述の通り、FIN56 は CoQ₁₀ の枯渇も引き起こす (47)。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症では、従来 CoQ₁₀ が欠乏しているため、FIN56 による CoQ₁₀ 合成低下の影響が一様に出現したため、患者細胞間での差異はみられなかったと考えた。

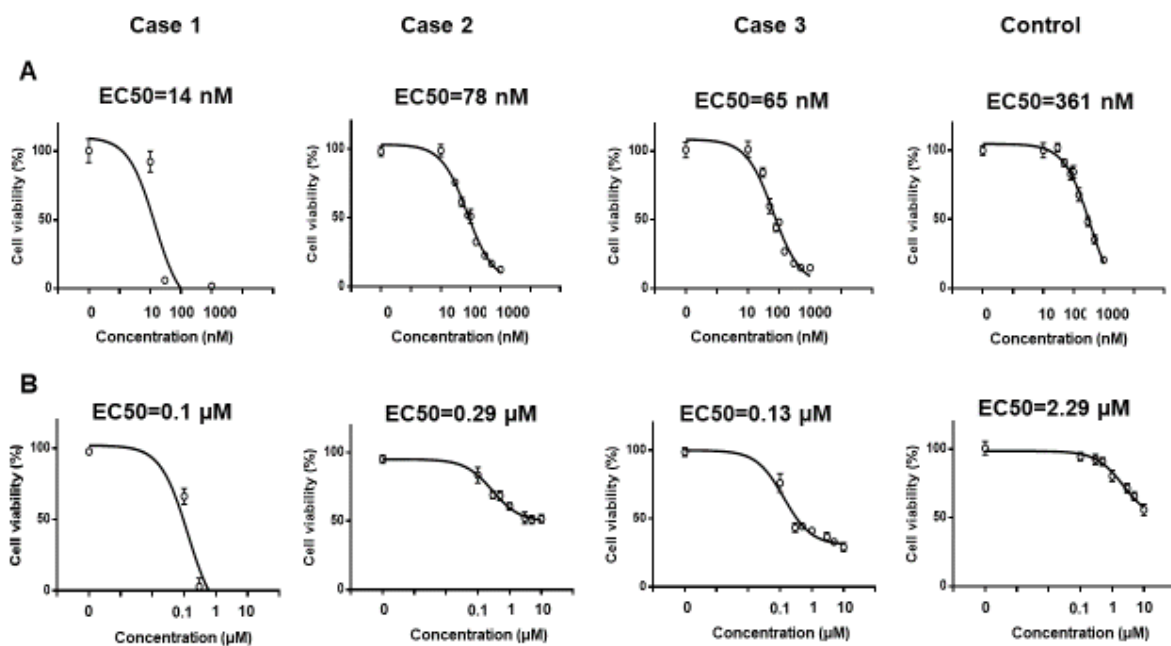


図 3-3. 患者由来細胞と正常細胞の生細胞率の比較

A; RSL3、B; FIN56 の細胞生存率から算出した EC_{50} 値

次に、Brequinar による、ミトコンドリア ferroptosis 誘導による細胞死を評価した。患者細胞と正常細胞で有意な差異はみとめなかった（図 3-4）。Brequinar は GPX4 低発現細胞において ferroptosis を誘導する。患者細胞では GPX4 の発現は保たれているため、細胞の脆弱性がみられなかったと考えた。

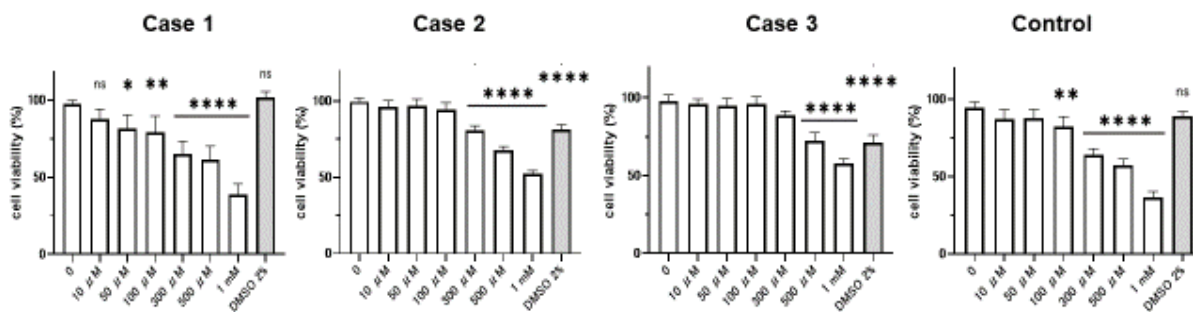


図 3-4. 患者由来細胞と正常細胞の Brequinar 添加による生細胞率の比較

1 mM Brequinar は 2% DMSO で溶解した。右端の Bar : 2% DMSO。

さらに、RSL3 と FIN56 で誘導された細胞死が、ferroptosis 以外の細胞死阻害剤で抑制されるか評価した。RSL3 (100 nM) と FIN56 (1 μ M) により誘導された細胞死は、ともに ferroptosis 阻害剤 Fer-1 (1 μ M) により抑制された (図 3-5)。しかし、apoptosis 阻害剤 z-VAD (1 μ M、20 μ M)、necrosis 阻害剤 GSK-872 (1 μ M、10 μ M) のいずれでも、細胞死は抑制されなかった。以上の結果から、ferroptosis が RSL3 および FIN56 による細胞死のメカニズムであることが確認された。

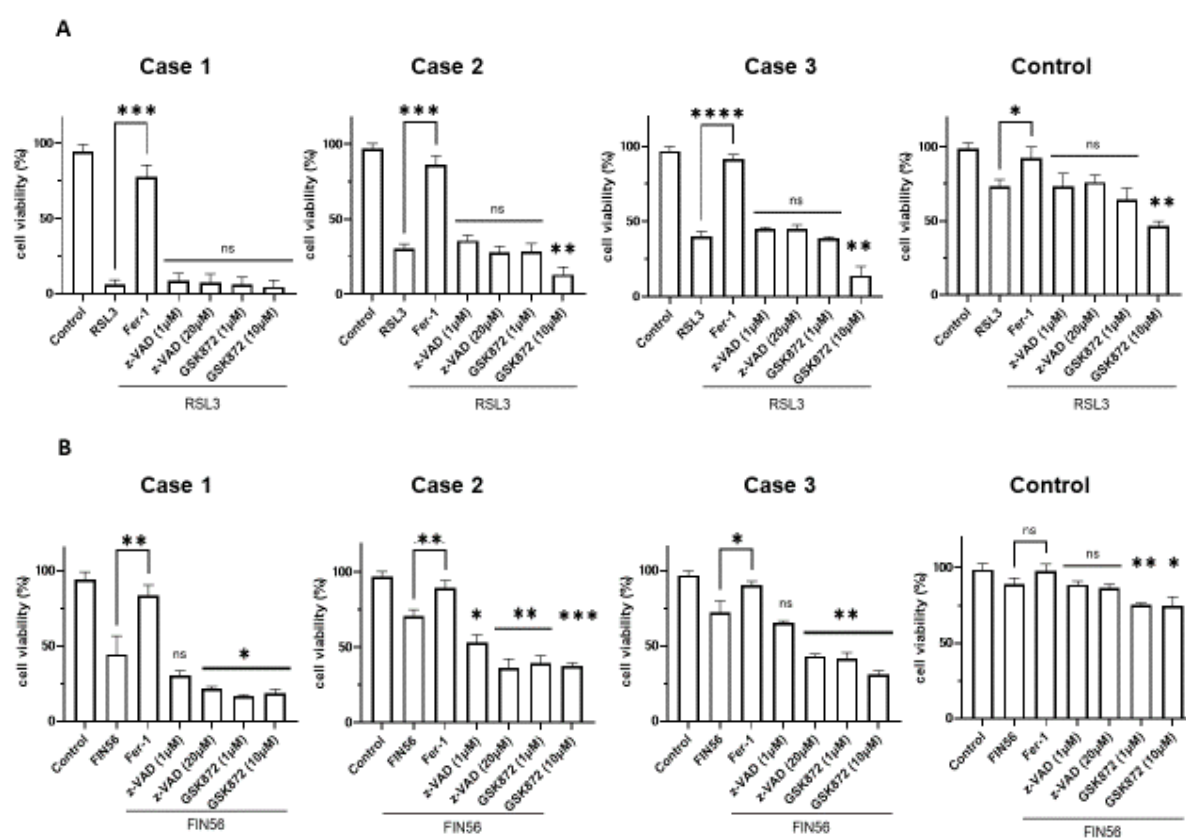


図 3-5. ferroptosis、apoptosis、necrosis 阻害剤による ferroptosis 抑制効果

A; RSL3、B; FIN56 による ferroptosis 誘導時の、ferroptosis 阻害 (Fer-1)、apoptosis 阻害 (z-VAD)、necrosis 阻害 (GSK-872) による細胞生存率。

2) 過酸化脂質の評価

a) 細胞膜、ミトコンドリア膜の過酸化脂質の評価

ferroptosis の特徴である過酸化脂質を、蛍光顕微鏡で定性的に評価した。蛍光色素 C11-BODIPY により細胞膜の過酸化脂質、蛍光色素 MitoPerOx によりミトコンドリア膜の過酸化脂質を観察した。いずれもの蛍光色素も、還元型では赤色蛍光、酸化型では緑色蛍光を呈し、緑色蛍光は過酸化脂質の存在を示唆する。

細胞膜の過酸化脂質について、正常細胞では、RSL3 による ferroptosis 誘導時にも、酸化型 C11-BODIPY はみられなかった (図 3-6)。Case 1 では、酸化型 C11-BODIPY は、RSL3 による ferroptosis 誘導がない場合にもみられ、Fer-1 による ferroptosis 阻害で減少した。一方、Case 2 および Case 3 では、ferroptosis 誘導時でも酸化型 C11-BODIPY はごく一部しかみられなかった。また、ミトコンドリア膜の過酸化脂質について、酸化型 MitoPerOx は、ferroptosis 誘導時に、Case1 のみわずかに観察されただけで、コントロール、Case 2 および Case 3 ではみとめられなかった (図 3-7)。

以上の結果から、過酸化脂質の増加は主として、ミトコンドリア膜でなく細胞膜でみられること、また増加の程度は細胞間で差異がみられ、Case 1 で特に強いことが示唆された。

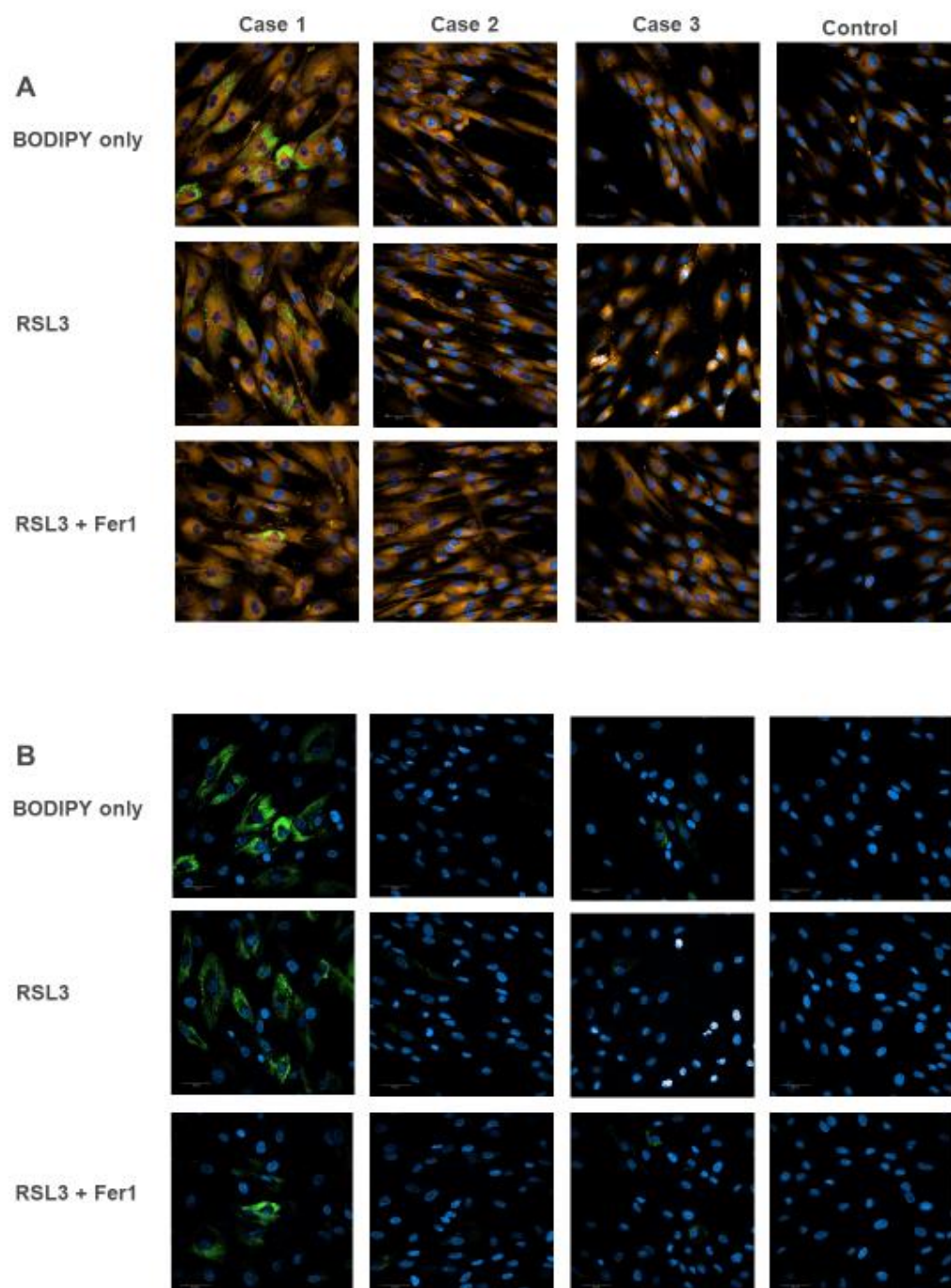


図 3-6. 細胞膜の過酸化脂質

RSL3 による ferroptosis 誘導時の細胞膜の過酸化脂質の観察。
 A; merge、B; 酸化型 C11-BODIPY。Case 1 では、RSL3 非添加時でも酸化型 C11-BODIPY がみられ、Fer-1 添加で酸化型 C11-BODIPY が減少した。
 赤 ; 還元型 C11-BODIPY、緑 ; 酸化型 C11-BODIPY、青 ; Hoechst 33342

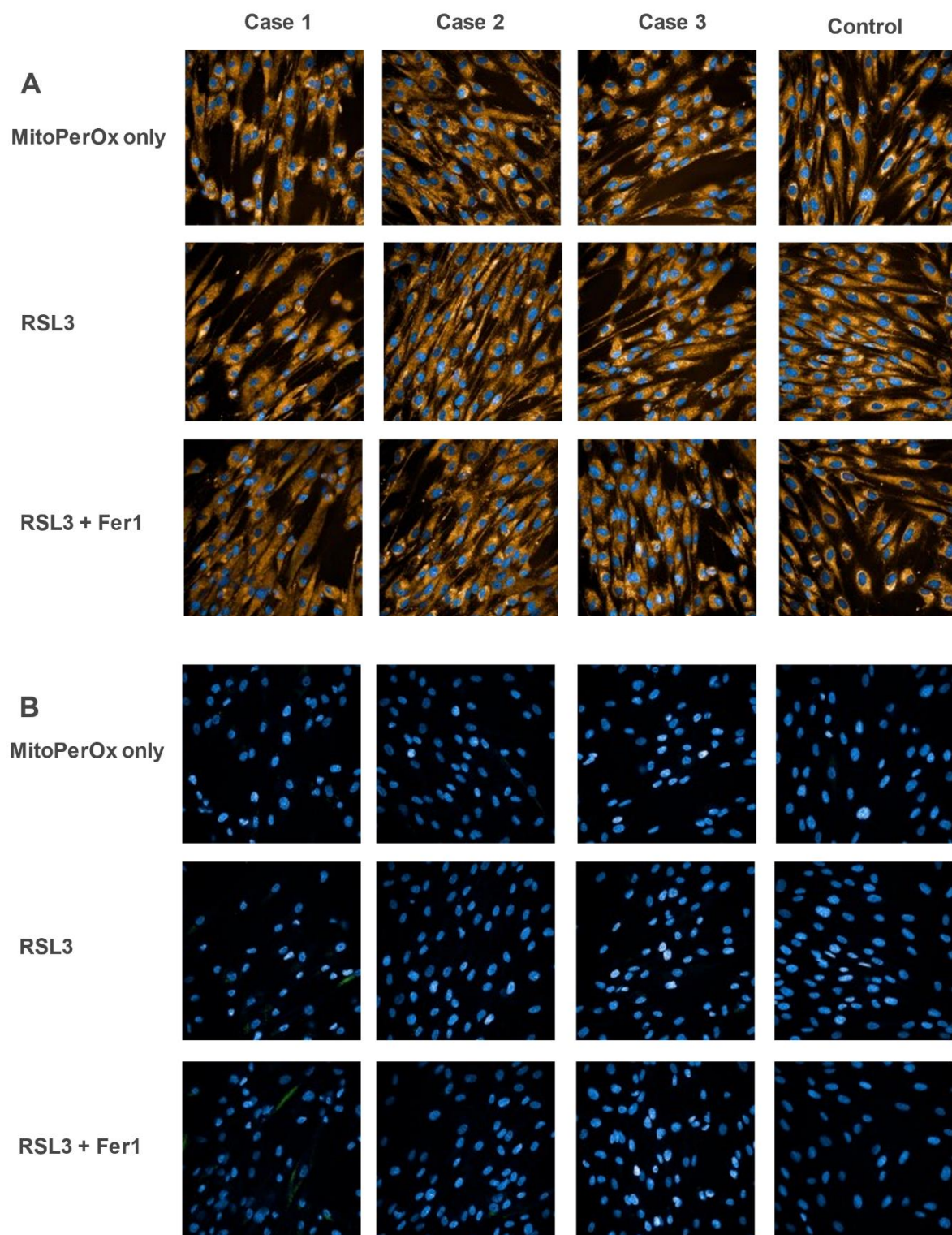


図 3-7. ミトコンドリア膜の過酸化脂質

RSL3 による ferroptosis 誘導時のミトコンドリア膜の過酸化脂質の観察。

A; merge、B; 酸化型 MitoPerOx。

Case1 でも、酸化型 MitoPerOx はごく一部しかみられない。

赤 ; 還元型 MitoPerOx、緑 ; 酸化型 MitoPerOx、青 ; Hoechst 33342

b) 細胞膜の過酸化脂質の定量的評価

3.2. 2) a) 項で細胞膜の過酸化脂質の増加が示唆されたため、細胞膜過酸化脂質について、C11-BODIPY を用いてフローサイトメトリーで定量的に解析した。酸化型 C11-BODIPY の結果を、図 3-8 に示す。正常細胞では、RSL3 による ferroptosis 誘導時、酸化型 C11-BODIPY は増加しなかった。一方、Case 1 では、ferroptosis 誘導時に酸化型 C11-BODIPY が著しく増加し、ferroptosis 阻害剤により増加が抑制された。Case 2 では、酸化型 C11-BODIPY は軽度増加した。Case 3 では、酸化型 C11-BODIPY は増加しなかった。

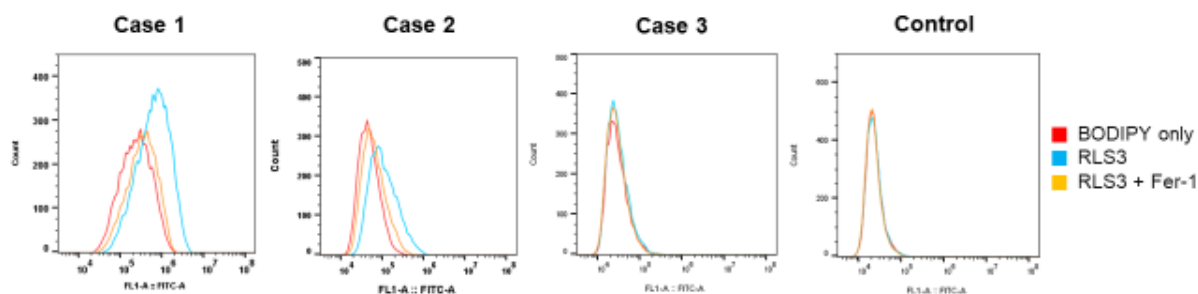


図 3-8. 細胞膜の過酸化脂質

RSL3 による ferroptosis 誘導時の酸化型 C11-BODIPY。

Case 1 では、ferroptosis 誘導時に酸化型 C11-BODIPY の増加がみられた。

赤 ; RSL3 非添加、青 ; RSL3、黄 ; RSL3 + Fer-1

蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーの結果から、Case 1 の細胞膜過酸化脂質は従来蓄積されており、ferroptosis 誘導でさらに増加したことが明らかになった。一方で、ミトコンドリア膜の過酸化脂質の増加は軽微であり、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症における過酸化脂質の増加の主な場所は細胞膜であると考えられた。

3) リアルタイム RT-PCR による ferroptosis 関連遺伝子発現の解析

ferroptosis 関連遺伝子; *AIFM2* (FSP1 をコードする)、*DHODH*、*GPX4*、*PTGS2*、*ACSL4* を評価した結果を、図 3-9 に示す。*AIFM2* の mRNA 発現量は、すべての患者細胞で ferroptosis 誘導により有意に増加し、ferroptosis 阻害により増加が有意に抑制された。また、対照では、*AIFM2* の mRNA 発現量は、ferroptosis 誘導により有意に増加したが、ferroptosis 阻害による増加抑制に有意差はみられなかった。さらに、Case 1、Case 2 では、*PTGS2* の mRNA 発現量の増加もみられた。*DHODH*、*GPX4*、*ACSL4* の mRNA 発現量に変化はみられなかった。

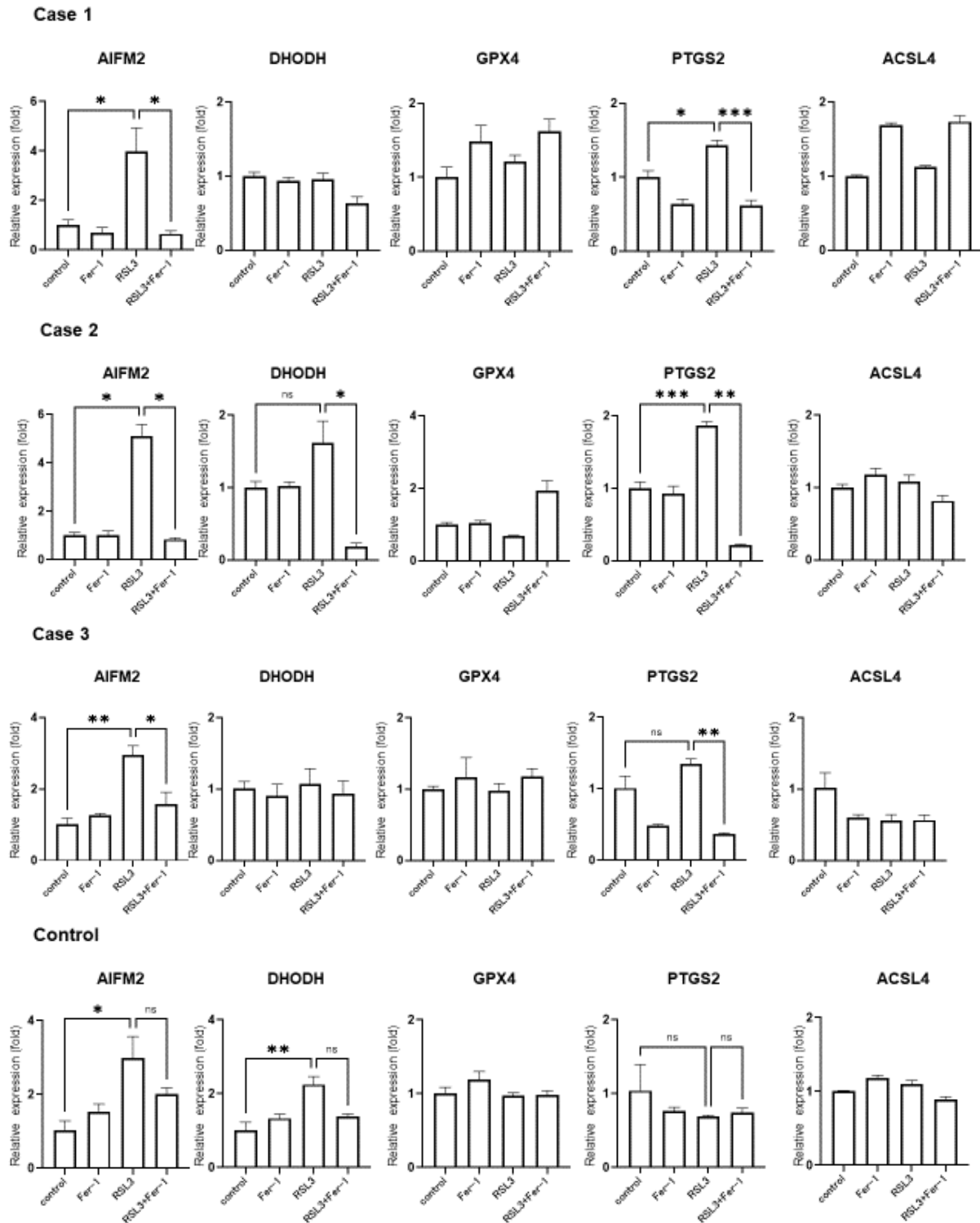


図 3-9. ferroptosis 関連遺伝子の mRNA の発現量

RSL3 ± Fer-1 で 24 時間処理した皮膚線維芽細胞の *AIFM2* (FSP1 をコードする)、*DHODH*、*GPX4*、*PTGS2*、*ACSL4* の遺伝子発現量。

Fer-1; ferrostatin-1、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

4) ウェスタンブロット

AIFM2 がコードする蛋白 AIFM2 (FSP1) の発現量を、図 3-10 に示す。AIFM2 の発現は、ferroptosis 誘導時に Case 1 で 1.83 倍、Case 2 で 2.74 倍、Case 3 で 2.88 倍に増加し、RSL+Fer-1 で ferroptosis 誘導を阻害した時には増加が抑制された。

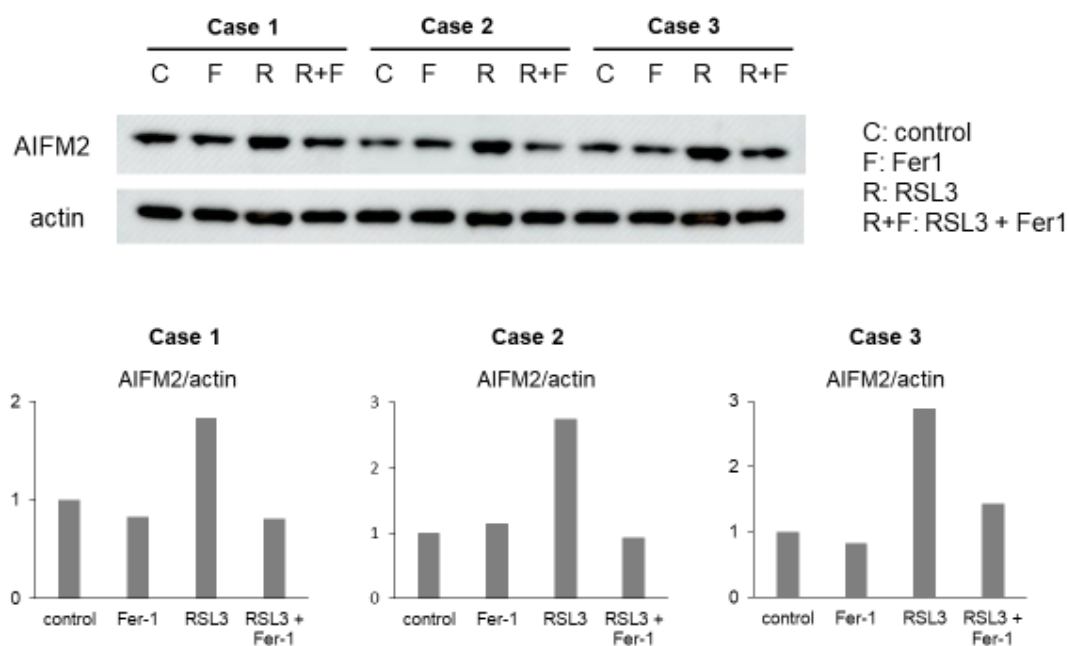


図 3-10. AIFM2 のタンパク発現量

RSL3 による ferroptosis 誘導時、AIFM2 のタンパク発現量は増加した。

5) 総グルタチオン値、還元型グルタチオン／酸化型グルタチオン比

患者細胞、正常細胞で、総グルタチオン値、還元型グルタチオン／酸化型グルタチオン比を測定した結果を、図 3-11 に示す。総グルタチオン値は、正常細胞で 1.79 ± 0.49 (平均 \pm 標準偏差) μM であったのに対し、患者細胞では Case 1; $2.56 \pm 0.57 \mu\text{M}$ 、Case 2; $2.75 \pm 1.13 \mu\text{M}$ 、Case 3; $2.23 \pm 1.09 \mu\text{M}$ であり、低下はみられなかった。また、還元型グルタチオン／酸化型グルタチオン比は、正常細胞 37.70 ± 1.62 (平均 \pm 標準偏差) であったのに対し、患者細胞では Case 1; 37.07 ± 0.01 、Case 2; 35.36 ± 2.34 、Case 3; 34.19 ± 1.18 であり、有意な変化はみられなかった。以上の結果より、患者細胞では GPX4/GSH 系に異常はないことが示唆された。

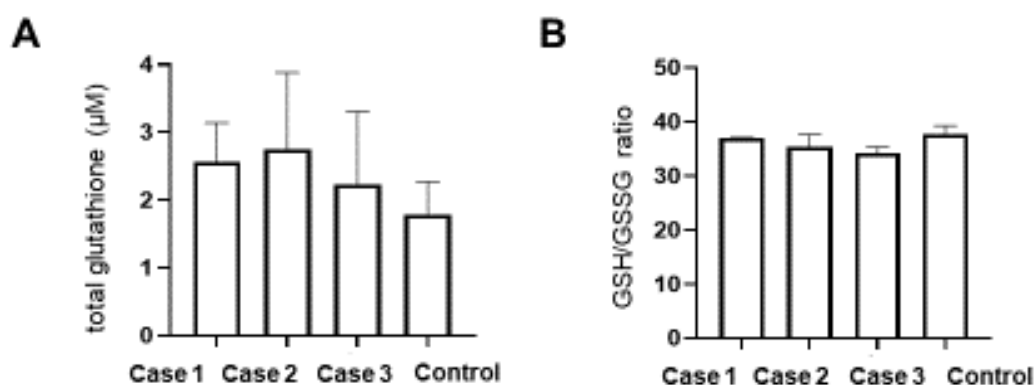


図 3-11. 総グルタチオン値、還元型グルタチオン／酸化型グルタチオン比

A; 総グルタチオン値、B; 還元型グルタチオン／酸化型グルタチオン比
患者細胞で、総グルタチオン値や、還元型グルタチオン／酸化型グルタチオン比の
低下はみられなかった。

4. 考察

構築した皮膚線維芽細胞の還元型・酸化型 CoQ₁₀ 測定系は、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の診断に有用である

測定した皮膚線維芽細胞の総 CoQ₁₀ 値は、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の全症例で有意に低下していた(53)。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症患者 6 例の筋と皮膚線維芽細胞の CoQ₁₀ 測定を比較した検討では、皮膚線維芽細胞の CoQ₁₀ 値は全例で低下したのに対し、筋の CoQ₁₀ 値が低下したのは 4 例であり、皮膚線維芽細胞での CoQ₁₀ 測定は筋生検と同等以上の診断の有用性が示唆されている(54)。今回、我々が構築した LC-MS/MS を用いた CoQ₁₀ 測定結果も、皮膚線維芽細胞の CoQ₁₀ 測定が、CoQ₁₀ 欠乏を検出するのに有用であるということを支持した(23,24)。また、CoQ₁₀ 値と表現型との相関も示唆されている(55,56)。今回総 CoQ₁₀ 値が最も低値であった症例 2 は非常に重篤な表現型であり、皮膚線維芽細胞の CoQ₁₀ 値は、臨床的な重症度を反映している可能性が考えられた。さらに原発性 CoQ₁₀ 欠乏症以外のミトコンドリア病でも、二次性 CoQ₁₀ 欠乏症が報告されている(57,58)。今回、mtDNA の粗大欠失を有する Kearns-Sayre 症候群 1 例で、顕著な CoQ₁₀ 低下がみられた（症例 19）。しかし CoQ₁₀ 欠乏がみられるとされる mtDNA 枯渇症患者 3 例では、CoQ₁₀ 低下はみられなかった（症例 16,17,18）。本症は、早期発見・早期治療により症状の進行を抑制し、予後を改善することができるが、不可逆的な臓器障害（例；神経細胞死、腎不全）を改善させることはできないため(1,59)、早期診断が重要である。本法を用いることで、早期診断が可能になる。

還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比は、ミトコンドリア呼吸鎖の CoQ₁₀ 還元状態を反映する可能性がある

我々は、ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞で、初めて還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比を測定した(53)。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症では、還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比は変化しなかった。一方、複合体I異常症では還元型/総 CoQ₁₀ 比は 7 例中 3 例で低下がみられ、複合体 IV・V 異常症では 3 例全例で上昇していた。

原発性 CoQ₁₀ 欠乏症は CoQ₁₀ 生合成の障害により CoQ₁₀ の絶対値が低下するが、予想通りミトコンドリアにおける酸化還元状態には影響しないことが示唆された。一方、呼吸鎖複合体の異常に関しては、CoQ₁₀ は複合体 I、複合体 II、その他のデヒドロゲナーゼから電子を受け取り酸化型から還元型になるため、複合体 I 異常では還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比が低下することが予想される (図 1-2)。しかしながら、我々の測定では、低下がみられたのは 7 例中 3 例だけであった。一方、CoQ₁₀ は複合体 III で、チトクローム c に電子を受け渡し再び還元型から酸化型になるため、複合体 III 以降の異常では還元型/総 CoQ₁₀ 比が増加すると考えられる (図 1-2)。実際、ウシミトコンドリアにおける還元型 CoQ₁₀ 比の検討では、複合体 I を阻害した時には還元型 CoQ₁₀ は有意に低下し、複合体 IV を阻害した時には増加がみられた(41)。我々の測定結果の一部は、これらの観察結果を支持したものとする。複合体 I 異常症のうち、皮膚線維芽細胞の複合体 I の呼吸鎖酵素活性だけが低下した症例 (症例 6、9、10、11) では、還元型/総 CoQ₁₀ 比が低下する傾向がみられた (3/4 例 ; 症例 6、10、11) (表 3-3)。一方、複合体 I のみならず複合体 III や IV の酵素活性も低下している患者 (症例 8) や、皮膚線維芽細胞では複合体 I の酵素活性が低下していない患者 (症例 12)、複合体 I のみ呼吸鎖酵素活性が低下したが測定サンプルが皮膚線維芽細胞でなく筋組織であった患者 (症例 7) では、還元型/総 CoQ₁₀ 比は変化しなかった。

ミトコンドリアにおける CoQ₁₀ の還元状態は、ミトコンドリア代謝状態のマ

一カーであると報告される(25)。RET ではミトコンドリアにおける過剰な還元 CoQ₁₀ がみられるのに対し、マウスのミトコンドリアに、異所的に発現させたカタユウレイボヤの代替酸化酵素 (alternative oxidase; AOX) により CoQ プールを酸化すると、RET から順方向電子伝達が誘導される(60)。今回我々が構築した測定系により、CoQ₁₀ の還元状態を評価することで、病態解明やバイオマーカーとしての応用につながる可能性がある。

なお本研究の限界としては 2 点あげられる。1 つ目は、ミトコンドリア画分を分離せず、全細胞の CoQ₁₀ を測定している点である。CoQ₁₀ は、細胞画分では主にミトコンドリアに局在するため測定結果はミトコンドリアの CoQ₁₀ を反映するものと考えられるが、他にゴルジ体やリソソームなどのオルガネラにも局在する(11)。2 点目は、400 以上の遺伝子変異を伴うミトコンドリア病のうち、今回検討できたのは一部の疾患である(2)。しかし、測定対象には、*ECHS1*、*SURF1*、*BOLA3*、*ACAD9*、*DGUOK* など頻度の多いミトコンドリア病原遺伝子が含まれる。

原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の一部の病態に ferroptosis が関与する

本症の病態における ferroptosis の関与について、初めて患者皮膚線維芽細胞を用いて検証した。ferroptosis 誘導時、患者細胞では脆弱性がみられたが、特に *COQ2* 異常のある Case 1 で顕著であった。また Case 1 では細胞内の過酸化脂質が顕著に増加したが、*COQ4* 異常のある Case 2、3 では軽微か明らかな増加はみられなかった。以上の結果と、*COQ2* ノックアウト細胞で ferroptosis が誘導された既報告(16)から、*COQ2* 異常症の病態に ferroptosis が関与していることが実証された。さらに、ferroptosis 誘導時、患者細胞全例で AIFM2 mRNA の発現、AIFM2 蛋白の発現が増加した。以上より、本症では、ferroptosis の防御機構として、AIFM2 の発現誘導が起こっているこ

とを始めて明らかにした。この発現誘導は正常皮膚繊維芽細胞でも認め、RLS3 による ferroptosis 誘導に対して細胞が起こす防御反応であることが推察される。しかしながら、少なくとも *COQ2* においては、これのみで抗 ferroptosis 活性が十分ではないと考えられる。本症の病態に ferroptosis が関与する可能性があるが、関与の程度は変異遺伝子の種類;すなわち合成過程のどの過程が障害されるかによって異なることが示唆された。

ferroptosis は、過酸化脂質の蓄積によって引き起こされる鉄依存性の制御された細胞死である(31,32)。ferroptosis は様々な疾患（腫瘍、神経変性疾患、心疾患など）の発症に関与する(61)。ferroptosis は形質膜とミトコンドリアにおいておこり、ferroptosis の制御機構として形質膜およびミトコンドリアの GSH/GPX4 系、形質膜の FSP1/CoQ₁₀ 系、ミトコンドリアの DHODH/CoQ₁₀ 系、GTP cyclohydrolase-1 (GCH1)/tetrahydrobiopterin (BH4)系が報告されている（図 1-3）(62)。GSH/GPX4 系では、GPX4 は還元型グルタチオンを補因子として、過酸化脂質を脂質アルコールに還元し、過酸化脂質の蓄積を抑制する(63)。FSP1/CoQ₁₀ 系では、形質膜で FSP1 が酸化型 CoQ₁₀ を還元し、還元型 CoQ₁₀ は親油性ラジカル捕捉型抗酸化剤として、過酸化脂質を抑制する(16,17)。GCH1/ BH4 系では、BH4 が抗酸化物質として働くだけでなく、CoQ₁₀ の前駆体である 4-ヒドロキシ安息香酸 (4-hydroxybenzoate: 4-HB) の産生を増加させることで、CoQ₁₀ の合成も促進する (64)。DHODH は、ピリミジン生合成の 4 番目の化学反応を触媒する酵素で、ミトコンドリア内膜で酸化型 CoQ₁₀ を還元型 CoQ₁₀ にすることで、ミトコンドリア膜の ferroptosis 制御に関わる(48)。このように CoQ₁₀ は ferroptosis の制御系において重要な分子であるが、制御系のうちで最も強力なものは形質膜における GSH/GPX4 系であり、GSH/GPX4 系が十分発現している場

合には FSP1 や GCH1 の不活化だけでは強力な ferroptosis はおきず、ferroptosis に対する感受性を高める程度とされる(62)。

原発性 CoQ₁₀ 欠乏症では、形質膜もミトコンドリアにおいても ferroptosis の感受性が高まっている状態と推測されるが、予想通り RSL3 および FIN56 による ferroptosis 誘導時、患者細胞では脆弱性がみられた。また、細胞間で差異がみられたものの、過酸化脂質が生じるのは、ミトコンドリア膜でなく形質膜であった。さらに、ferroptosis 誘導により、全例で *AIFM2* mRNA 遺伝子の増加と、AIFM2 蛋白の発現がみられた。しかし、AIFM2 蛋白が増加しても、本症では CoQ₁₀ が低下しているため、FSP1/CoQ₁₀ による防御機構が十分に働かないと考えられた。なお、患者細胞ではグルタチオンの低下は認めず、グルタチオンによる防御機構は十分に働いているものと考えられた。

COQ2 異常症と COQ4 異常症は、ferroptosis への関与の程度と臨床症状が異なる

今回の検討で、COQ2 異常と COQ4 異常において、ferroptosis に対する感受性の違いが示唆された。COQ2 ノックアウト癌細胞で ferroptosis が誘導されるという報告はあるが、COQ2 以外の COQ 遺伝子変異と ferroptosis の関連についての報告はない。感受性の違いがみられた一因として、それぞれの遺伝子産物が膜内に保持できるかどうかの違いによるものと推測された。CoQ₁₀ が ferroptosis 抑制に働くためには、CoQ₁₀ が細膜内に保持され、さらに FSP1 によって還元される必要がある。COQ₁₀ はベンゾキノン環とイソプレノイド側鎖から構成される。ポリイソプレノイド側鎖は親油性であり、CoQ₁₀ を細胞膜内に保持する。COQ2 によりコードされる蛋白は、ベンゾキノン環とイソプレノイド側鎖の触媒に関わる(図 1-1)(65)。その働きにより、様々な種類の細胞膜の脂質二重層の中層面に結合できる最初の CoQ 中間体が生成される。一方

で、*COQ4* の遺伝子産物の作用は解明されていないが、ヒト *COQ4* は酵母 *Coq4* のオーソログで、酵母 *Coq4* は CoQ 複合体の安定化に関わることから、ヒトでも同様の働きを担っていることが示唆されている(65,66)。また、*Coq4* ノックアウトマウスは胚致死であり、COQ4 蛋白が発生初期の段階で重要な役割を担っていることが示されている(67)。さらに、*COQ4* ノックアウトゼブラフィッシュでは、運動障害がみられ、ヒトの小脳に相当するゼブラフィッシュの後脳においてプルキンエ細胞の減少がみられている(68)。以上から、*COQ2* 変異では、膜に結合できる CoQ₁₀ 中間体が合成されないため細胞膜脂質の過酸化を抑制できず、抗 ferroptosis に働かないと考えた。一方で、*COQ4* は CoQ₁₀ 生合成において *COQ2* の下流で働くことから、*COQ4* 変異では少なくとも膜に結合できる CoQ₁₀ 中間体は生成されており、抗 ferroptosis 活性があるものと考えた。

COQ2 異常症 (MIM#607426) と *COQ4* 異常症 (MIM#616276) では、臨床症状においても特徴的な違いがみられる。*COQ2* 異常症では腎病変を合併するのに対し、*COQ4* 異常症では決して腎病変を合併しないことである(5)。また、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症における腎病変は、ミトコンドリア病としては非典型的なステロイド抵抗性ネフローゼ症候 (steroid-resistant nephrotic syndrome; SRNS) を呈することが特徴で、無治療の場合には小児期に末期腎不全に進展しうる(5)。*COQ2* 異常症の 87% の患者で SRNS を認める(5)。CoQ₁₀ 欠乏による糸球体上皮細胞障害をおこすメカニズムが、*COQ2* 腎症のショウジョウバエモデルで報告されている(69)。*Coq2* 遺伝子サイレンシングにより、腎細胞の異常ミトコンドリアの増加、オートファジーやマイトファジーの増加、ROS 増加や酸化ストレスに対する感受性の増加などがみられた。我々が知る限り、SRNS における ferroptosis の関与についての報告はなく、本症における腎症状と ferroptosis

の関連性については、今後の検討課題である。一方で、*COQ4* 異常症の主な表現型は、新生児期から乳児期発症の、脳症・心筋症型である(5)。71%が新生児期に多臓器障害で発症し、生後 1 か月時の致死率は 51%と、重篤な疾患である。

なお、*COQ* と ferroptosis の関連をさらに検証するために、皮膚線維芽細胞で *COQ2*、*COQ4* ノックアウト細胞の作成を試みたが、細胞維持が困難であり、実験や解析を行うことはできなかった。今後の課題である。

5. おわりに

皮膚線維芽細胞での還元型 CoQ₁₀、酸化型 CoQ₁₀ 個別測定系を構築し、総 CoQ₁₀ 値と還元型/総 CoQ₁₀ 比の評価が可能になった。また、総 CoQ₁₀ 値低下がなくとも、還元型/総 CoQ₁₀ 比の異常がみられる病態があることが明らかとなった。本研究は、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の未診断例の解析と迅速な治療に貢献できる。また、本測定法はミトコンドリアの CoQ₁₀ 還元状態のバイオマーカーとしての応用や、病態解析にも有用と考えられる。さらに、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の一部の病態に ferroptosis が関与することが検証された。今回の研究では、*COQ2* 異常では ferroptosis の関与が大きいが、*COQ4* 異常では関与が小さく、差異がみられた。CoQ₁₀ 生合成に関わる遺伝子の全ては解明されていないが(3)、CoQ₁₀ 生合成の障害過程と ferroptosis、CoQ₁₀ 欠乏症の臨床症状との関連を更に検討することにより、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の分子病態がより明確化するものと思われる。

6. 参考文献

1. Salviati, L., Trevisson, E., Doimo, M., and Navas, P. Primary Coenzyme Q(10) Deficiency. in *GeneReviews*(®), University of Washington, Seattle, 1993
2. Gusic, M., and Prokisch, H. Genetic basis of mitochondrial diseases. *FEBS Lett* 595, 1132-1158, 2021
3. Banh, R. S., Kim, E. S., Spillier, Q., Biancur, D. E., Yamamoto, K., Sohn, A. S. W., Shi, G., Jones, D. R., Kimmelman, A. C., and Pacold, M. E. The polar oxy-metabolome reveals the 4-hydroxymandelate CoQ10 synthesis pathway. *Nature* 597, 420-425, 2021
4. Ogasahara, S., Engel, A. G., Frens, D., and Mack, D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2379-2382, 1989
5. Alcázar-Fabra, M., Rodríguez-Sánchez, F., Trevisson, E., and Brea-Calvo, G. Primary Coenzyme Q deficiencies: A literature review and online platform of clinical features to uncover genotype-phenotype correlations. *Free Radic Biol Med* 167, 141-180, 2021
6. Brea-Calvo, G., Haack, T. B., Karall, D., Ohtake, A., Invernizzi, F., Carrozzo, R., Kremer, L., Dusi, S., Fauth, C., Scholl-Bürgi, S., Graf, E., Ahting, U., Resta, N., Laforgia, N., Verrigni, D., Okazaki, Y., Kohda, M., Martinelli, D., Freisinger, P., Strom, T. M., Meitinger, T., Lamperti, C., Lacson, A., Navas, P., Mayr, J. A., Bertini, E., Murayama, K., Zeviani, M., Prokisch, H., and Ghezzi, D. COQ4 mutations cause a broad spectrum of mitochondrial disorders associated with CoQ10 deficiency. *Am J Hum Genet* 96, 309-317, 2015
7. Ogawa, E., Fushimi, T., Ogawa-Tominaga, M., Shimura, M., Tajika, M., Ichimoto, K., Matsunaga, A., Tsuruoka, T., Ishige, M., Fuchigami, T., Yamazaki, T., Kishita, Y., Kohda, M., Imai-Okazaki, A., Okazaki, Y., Morioka, I., Ohtake, A., and Murayama, K. Mortality of Japanese patients with Leigh syndrome: Effects of age at onset and genetic diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 43, 819-826, 2020
8. Imasawa, T., Hirano, D., Nozu, K., Kitamura, H., Hattori, M., Sugiyama, H., Sato, H., and Murayama, K. Clinicopathologic Features of Mitochondrial Nephropathy. *Kidney Int Rep* 7, 580-590, 2022
9. Crane, F. L., Hatefi, Y., Lester, R. L., and Widmer, C. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 25, 220-221, 1957
10. Wang, Y., and Hekimi, S. Understanding Ubiquinone. *Trends Cell Biol* 26, 367-378, 2016
11. Turunen, M., Olsson, J., and Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 1660, 171-199, 2004

12. Scialò, F., Fernández-Ayala, D. J., and Sanz, A. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Front Physiol* 8, 428, 2017
13. Hidalgo-Gutiérrez, A., González-García, P., Díaz-Casado, M. E., Barriocanal-Casado, E., López-Herrador, S., Quinzii, C. M., and López, L. C. Metabolic Targets of Coenzyme Q10 in Mitochondria. *Antioxidants (Basel)* 10, 2021
14. Bentinger, M., Brismar, K., and Dallner, G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 7 Suppl, S41-50, 2007
15. Hyun, D. H. Plasma membrane redox enzymes: new therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Arch Pharm Res* 42, 436-445, 2019
16. Bersuker, K., Hendricks, J. M., Li, Z., Magtanong, L., Ford, B., Tang, P. H., Roberts, M. A., Tong, B., Maimone, T. J., Zoncu, R., Bassik, M. C., Nomura, D. K., Dixon, S. J., and Olzmann, J. A. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature* 575, 688-692, 2019
17. Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., Grocin, A. G., Xavier da Silva, T. N., Panzilius, E., Scheel, C. H., Mourão, A., Buday, K., Sato, M., Wanninger, J., Vignane, T., Mohana, V., Rehberg, M., Flatley, A., Schepers, A., Kurz, A., White, D., Sauer, M., Sattler, M., Tate, E. W., Schmitz, W., Schulze, A., O'Donnell, V., Proneth, B., Popowicz, G. M., Pratt, D. A., Angeli, J. P. F., and Conrad, M. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* 575, 693-698, 2019
18. Lee, S. K., Lee, J. O., Kim, J. H., Kim, N., You, G. Y., Moon, J. W., Sha, J., Kim, S. J., Lee, Y. W., Kang, H. J., Park, S. H., and Kim, H. S. Coenzyme Q10 increases the fatty acid oxidation through AMPK-mediated PPAR α induction in 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Signal* 24, 2329-2336, 2012
19. Evans, D. R., and Guy, H. I. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem* 279, 33035-33038, 2004
20. González-García, P., Hidalgo-Gutiérrez, A., Mascaraque, C., Barriocanal-Casado, E., Bakkali, M., Ziosi, M., Abdihankyzy, U. B., Sánchez-Hernández, S., Escames, G., Prokisch, H., Martín, F., Quinzii, C. M., and López, L. C. Coenzyme Q10 modulates sulfide metabolism and links the mitochondrial respiratory chain to pathways associated to one carbon metabolism. *Hum Mol Genet* 29, 3296-3311, 2020
21. Echtay, K. S., Winkler, E., and Klingenberg, M. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408, 609-613, 2000
22. Fontaine, E., Ichas, F., and Bernardi, P. A ubiquinone-binding site regulates the

- mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 273, 25734-25740, 1998
23. Liu, Y. T., Hersheson, J., Plagnol, V., Fawcett, K., Duberley, K. E., Preza, E., Hargreaves, I. P., Chalasani, A., Laurá, M., Wood, N. W., Reilly, M. M., and Houlden, H. Autosomal-recessive cerebellar ataxia caused by a novel ADCK3 mutation that elongates the protein: clinical, genetic and biochemical characterisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85, 493-498, 2014
 24. Buján, N., Arias, A., Montero, R., García-Villoria, J., Lissens, W., Seneca, S., Espinós, C., Navas, P., De Meirleir, L., Artuch, R., Briones, P., and Ribes, A. Characterization of CoQ₁₀ biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ₁₀ deficiency. *J Inherit Metab Dis* 37, 53-62, 2014
 25. Guarás, A., Perales-Clemente, E., Calvo, E., Acín-Pérez, R., Loureiro-Lopez, M., Pujol, C., Martínez-Carrascoso, I., Nuñez, E., García-Marqués, F., Rodríguez-Hernández, M. A., Cortés, A., Diaz, F., Pérez-Martos, A., Moraes, C. T., Fernández-Silva, P., Trifunovic, A., Navas, P., Vazquez, J., and Enríquez, J. A. The CoQH₂/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency. *Cell Rep* 15, 197-209, 2016
 26. Acosta, M. J., Vazquez Fonseca, L., Desbats, M. A., Cerqua, C., Zordan, R., Trevisson, E., and Salviati, L. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1857, 1079-1085, 2016
 27. López-Martín, J. M., Salviati, L., Trevisson, E., Montini, G., DiMauro, S., Quinzii, C., Hirano, M., Rodriguez-Hernandez, A., Cordero, M. D., Sánchez-Alcázar, J. A., Santos-Ocaña, C., and Navas, P. Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis. *Hum Mol Genet* 16, 1091-1097, 2007
 28. Quinzii, C. M., Luna-Sanchez, M., Ziosi, M., Hidalgo-Gutierrez, A., Kleiner, G., and Lopez, L. C. The Role of Sulfide Oxidation Impairment in the Pathogenesis of Primary CoQ Deficiency. *Front Physiol* 8, 525, 2017
 29. Baschiera, E., Sorrentino, U., Calderan, C., Desbats, M. A., and Salviati, L. The multiple roles of coenzyme Q in cellular homeostasis and their relevance for the pathogenesis of coenzyme Q deficiency. *Free Radic Biol Med* 166, 277-286, 2021
 30. Rodríguez-Hernández, A., Cordero, M. D., Salviati, L., Artuch, R., Pineda, M., Briones, P., Gómez Izquierdo, L., Cotán, D., Navas, P., and Sánchez-Alcázar, J. A. Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* 5, 19-32, 2009
 31. Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Fulda, S., Gascón, S., Hatzios, S. K., Kagan, V. E., Noel, K., Jiang, X., Linkermann, A., Murphy, M. E., Overholtzer, M., Oyagi, A., Pagnussat, G. C., Park, J., Ran, Q., Rosenfeld,

- C. S., Salnikow, K., Tang, D., Torti, F. M., Torti, S. V., Toyokuni, S., Woerpel, K. A., and Zhang, D. D. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* 171, 273-285, 2017
32. Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., 3rd, and Stockwell, B. R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060-1072, 2012
 33. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F. K., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Czabotar, P. E., D'Angiolella, V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K. M., DeBerardinis, R. J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V. M., Dixon, S. J., Duckett, C. S., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Elrod, J. W., Fimia, G. M., Fulda, S., García-Sáez, A. J., Garg, A. D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D. R., Greene, L. A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Harris, I. S., Hengartner, M. O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P. J., Juin, P. P., Kaiser, W. J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R. N., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lee, S. W., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., López-Otín, C., Lowe, S. W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J. C., Martin, S. J., Martinou, J. C., Medema, J. P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E. A., Molkentin, J. D., Moll, U. M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J. M., Pereira, D. M., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H. M., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M. P., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Ryan, K. M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H. U., Sistigu, A., Stockwell, B. R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S. W. G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M. G., Villunger, A., Virgin, H. W., Vousden, K. H., Vucic, D., Wagner, E. F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J. A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., and

- Kroemer, G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25, 486-541, 2018
34. Miyauchi, A., Kouga, T., Jimbo, E. F., Matsushashi, T., Abe, T., Yamagata, T., and Osaka, H. Apomorphine rescues reactive oxygen species-induced apoptosis of fibroblasts with mitochondrial disease. *Mitochondrion* 49, 111-120, 2019
 35. Shimozawa, H., Sato, T., Osaka, H., Takeda, A., Miyauchi, A., Omika, N., Yada, Y., Kono, Y., Murayama, K., Okazaki, Y., Kishita, Y., and Yamagata, T. A Case of Infantile Mitochondrial Cardiomyopathy Treated with a Combination of Low-Dose Propranolol and Cibenzoline for Left Ventricular Outflow Tract Stenosis. *Int Heart J* 63, 970-977, 2022
 36. Imai-Okazaki, A., Kishita, Y., Kohda, M., Mizuno, Y., Fushimi, T., Matsunaga, A., Yatsuka, Y., Hirata, T., Harashima, H., Takeda, A., Nakaya, A., Sakata, Y., Kogaki, S., Ohtake, A., Murayama, K., and Okazaki, Y. Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease: Prognosis and genetic background. *Int J Cardiol* 279, 115-121, 2019
 37. Tanigawa, J., Kaneko, K., Honda, M., Harashima, H., Murayama, K., Wada, T., Takano, K., Iai, M., Yamashita, S., Shimbo, H., Aida, N., Ohtake, A., and Osaka, H. Two Japanese patients with Leigh syndrome caused by novel SURF1 mutations. *Brain Dev* 34, 861-865, 2012
 38. Shimura, M., Kuranobu, N., Ogawa-Tominaga, M., Akiyama, N., Sugiyama, Y., Ebihara, T., Fushimi, T., Ichimoto, K., Matsunaga, A., Tsuruoka, T., Kishita, Y., Umetsu, S., Inui, A., Fujisawa, T., Tanikawa, K., Ito, R., Fukuda, A., Murakami, J., Kaji, S., Kasahara, M., Shiraki, K., Ohtake, A., Okazaki, Y., and Murayama, K. Clinical and molecular basis of hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome in Japan: evaluation of outcomes after liver transplantation. *Orphanet J Rare Dis* 15, 169, 2020
 39. Kuwajima, M., Kojima, K., Osaka, H., Hamada, Y., Jimbo, E., Watanabe, M., Aoki, S., Sato-Shirai, I., Ichimoto, K., Fushimi, T., Murayama, K., Ohtake, A., Kohda, M., Kishita, Y., Yatsuka, Y., Uchino, S., Mimaki, M., Miyake, N., Matsumoto, N., Okazaki, Y., Ogata, T., Yamagata, T., and Muramatsu, K. Valine metabolites analysis in ECHS1 deficiency. *Mol Genet Metab Rep* 29, 100809, 2021
 40. Pandey, R., Riley, C. L., Mills, E. M., and Tiziani, S. Highly sensitive and selective determination of redox states of coenzymes Q(9) and Q(10) in mice tissues: Application of orbitrap mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 1011, 68-76, 2018
 41. Burger, N., Logan, A., Prime, T. A., Mottahedin, A., Caldwell, S. T., Krieg, T., Hartley, R. C., James, A. M., and Murphy, M. P. A sensitive mass spectrometric assay for mitochondrial CoQ pool redox state in vivo. *Free Radic Biol Med* 147, 37-47, 2020

42. Kirby, D. M., Crawford, M., Cleary, M. A., Dahl, H. H., Dennett, X., and Thorburn, D. R. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 52, 1255-1264, 1999
43. Rahman, S., Blok, R. B., Dahl, H. H., Danks, D. M., Kirby, D. M., Chow, C. W., Christodoulou, J., and Thorburn, D. R. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 39, 343-351, 1996
44. Murayama, K., Nagasaka, H., Tsuruoka, T., Omata, Y., Horie, H., Tregoning, S., Thorburn, D. R., Takayanagi, M., and Ohtake, A. Intractable secretory diarrhea in a Japanese boy with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Eur J Pediatr* 168, 297-302, 2009
45. Bernier, F. P., Boneh, A., Dennett, X., Chow, C. W., Cleary, M. A., and Thorburn, D. R. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 59, 1406-1411, 2002
46. Yang, W. S., and Stockwell, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol* 26, 165-176, 2016
47. Shimada, K., Skouta, R., Kaplan, A., Yang, W. S., Hayano, M., Dixon, S. J., Brown, L. M., Valenzuela, C. A., Wolpaw, A. J., and Stockwell, B. R. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis. *Nat Chem Biol* 12, 497-503, 2016
48. Mao, C., Liu, X., Zhang, Y., Lei, G., Yan, Y., Lee, H., Koppula, P., Wu, S., Zhuang, L., Fang, B., Poyurovsky, M. V., Olszewski, K., and Gan, B. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer. *Nature* 593, 586-590, 2021
49. Zilka, O., Shah, R., Li, B., Friedmann Angeli, J. P., Griesser, M., Conrad, M., and Pratt, D. A. On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent Sci* 3, 232-243, 2017
50. Skouta, R., Dixon, S. J., Wang, J., Dunn, D. E., Orman, M., Shimada, K., Rosenberg, P. A., Lo, D. C., Weinberg, J. M., Linkermann, A., and Stockwell, B. R. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *J Am Chem Soc* 136, 4551-4556, 2014
51. Drummen, G. P., van Liebergen, L. C., Op den Kamp, J. A., and Post, J. A. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic Biol Med* 33, 473-490, 2002
52. Prime, T. A., Forkink, M., Logan, A., Finichiu, P. G., McLachlan, J., Li Pun, P. B., Koopman, W. J., Larsen, L., Latter, M. J., Smith, R. A., and Murphy, M. P. A ratiometric

- fluorescent probe for assessing mitochondrial phospholipid peroxidation within living cells. *Free Radic Biol Med* 53, 544-553, 2012
53. Watanabe, C., Osaka, H., Watanabe, M., Miyauchi, A., Jimbo, E. F., Tokuyama, T., Uosaki, H., Kishita, Y., Okazaki, Y., Onuki, T., Ebihara, T., Aizawa, K., Murayama, K., Ohtake, A., and Yamagata, T. Total and reduced/oxidized forms of coenzyme Q10 in fibroblasts of patients with mitochondrial disease. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 34, 100951, 2023
 54. Montero, R., Sánchez-Alcázar, J. A., Briones, P., Hernández, A. R., Cordero, M. D., Trevisson, E., Salviati, L., Pineda, M., García-Cazorla, A., Navas, P., and Artuch, R. Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin Biochem* 41, 697-700, 2008
 55. Desbats, M. A., Morbidoni, V., Silic-Benussi, M., Doimo, M., Ciminale, V., Cassina, M., Sacconi, S., Hirano, M., Basso, G., Pierrel, F., Navas, P., Salviati, L., and Trevisson, E. The COQ2 genotype predicts the severity of coenzyme Q10 deficiency. *Hum Mol Genet* 25, 4256-4265, 2016
 56. Kwong, A. K., Chiu, A. T., Tsang, M. H., Lun, K. S., Rodenburg, R. J. T., Smeitink, J., Chung, B. H., and Fung, C. W. A fatal case of COQ7-associated primary coenzyme Q(10) deficiency. *JIMD Rep* 47, 23-29, 2019
 57. Yubero, D., Montero, R., Martín, M. A., Montoya, J., Ribes, A., Grazina, M., Trevisson, E., Rodríguez-Aguilera, J. C., Hargreaves, I. P., Salviati, L., Navas, P., Artuch, R., Jou, C., Jimenez-Mallebrera, C., Nascimento, A., Pérez-Dueñas, B., Ortez, C., Ramos, F., Colomer, J., O'Callaghan, M., Pineda, M., García-Cazorla, A., Espinós, C., Ruiz, A., Macaya, A., Marcé-Grau, A., Garcia-Villoria, J., Arias, A., Emperador, S., Ruiz-Pesini, E., Lopez-Gallardo, E., Neergheen, V., Simões, M., Diogo, L., Blázquez, A., González-Quintana, A., Delmiro, A., Domínguez-González, C., Arenas, J., García-Silva, M. T., Martín, E., Quijada, P., Hernández-Lain, A., Morán, M., Rivas Infante, E., Ávila Polo, R., Paradas Lópe, C., Bautista Lorite, J., Martínez Fernández, E. M., Cortés, A. B., Sánchez-Cuesta, A., Cascajo, M. V., Alcázar, M., and Brea-Calvo, G. Secondary coenzyme Q10 deficiencies in oxidative phosphorylation (OXPHOS) and non-OXPHOS disorders. *Mitochondrion* 30, 51-58, 2016
 58. Montero, R., Grazina, M., López-Gallardo, E., Montoya, J., Briones, P., Navarro-Sastre, A., Land, J. M., Hargreaves, I. P., and Artuch, R. Coenzyme Q₁₀ deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion* 13, 337-341, 2013
 59. Montini, G., Malaventura, C., and Salviati, L. Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *N Engl J Med* 358, 2849-2850, 2008

60. Szibor, M., Gainutdinov, T., Fernandez-Vizarra, E., Dufour, E., Gizatullina, Z., Debska-Vielhaber, G., Heidler, J., Wittig, I., Viscomi, C., Gellerich, F., and Moore, A. L. Bioenergetic consequences from xenotopic expression of a tunicate AOX in mouse mitochondria: Switch from RET and ROS to FET. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1861, 148137, 2020
61. Zheng, J., and Conrad, M. The Metabolic Underpinnings of Ferroptosis. *Cell Metab* 32, 920-937, 2020
62. Gan, B. Mitochondrial regulation of ferroptosis. *J Cell Biol* 220, 2021
63. Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L., and Stockwell, B. R. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 156, 317-331, 2014
64. Kraft, V. A. N., Bezjian, C. T., Pfeiffer, S., Ringelstetter, L., Müller, C., Zandkarimi, F., Merl-Pham, J., Bao, X., Anastasov, N., Kössl, J., Brandner, S., Daniels, J. D., Schmitt-Kopplin, P., Hauck, S. M., Stockwell, B. R., Hadian, K., and Schick, J. A. GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling. *ACS Cent Sci* 6, 41-53, 2020
65. Awad, A. M., Bradley, M. C., Fernández-Del-Río, L., Nag, A., Tsui, H. S., and Clarke, C. F. Coenzyme Q(10) deficiencies: pathways in yeast and humans. *Essays Biochem* 62, 361-376, 2018
66. Casarin, A., Jimenez-Ortega, J. C., Trevisson, E., Pertegato, V., Doimo, M., Ferrero-Gomez, M. L., Abbadi, S., Artuch, R., Quinzii, C., Hirano, M., Basso, G., Ocaña, C. S., Navas, P., and Salvati, L. Functional characterization of human COQ4, a gene required for Coenzyme Q10 biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 35-39, 2008
67. Licitra, F., and Puccio, H. An overview of current mouse models recapitulating coenzyme q10 deficiency syndrome. *Mol Syndromol* 5, 180-186, 2014
68. Mero, S., Salvati, L., Leuzzi, V., Rubegni, A., Calderan, C., Nardecchia, F., Galatolo, D., Desbats, M. A., Naef, V., Gemignani, F., Novelli, M., Tessa, A., Battini, R., Santorelli, F. M., and Marchese, M. New pathogenic variants in COQ4 cause ataxia and neurodevelopmental disorder without detectable CoQ(10) deficiency in muscle or skin fibroblasts. *J Neurol* 268, 3381-3389, 2021
69. Zhu, J. Y., Fu, Y., Richman, A., Zhao, Z., Ray, P. E., and Han, Z. A Personalized Model of COQ2 Nephropathy Rescued by the Wild-Type COQ2 Allele or Dietary Coenzyme Q(10) Supplementation. *J Am Soc Nephrol* 28, 2607-2617, 2017

7. 謝辞

本研究の遂行、論文作成にあたりご指導およびご総括いただきました自治医科大学小児科学教授 山形崇倫先生、小児科学教授 小坂 仁先生に深謝いたします。小児科学講師 神保恵理子先生には研究全般に関して日々ご指導いただきました。小児科学研究補助員 渡邊美有紀様、青木志保様、大美賀成実様、大山友美様には研究全般を補助していただきました。

様々な分野の先生方にご指導ご尽力いただき、本研究が遂行出来ましたことを、ここに感謝申し上げます。

本研究の一部は、令和3年度自治医科大学大学院若手スタートアップ研究費および令和4年度自治医科大学大学院研究奨励賞により遂行しました。

原発性 CoQ_{10} 欠乏症の診断系の構築とミトコンドリア病患者の CoQ_{10} 還元状態の評価
原発性 CoQ_{10} 欠乏症の *ferroplosis* からみた病態解析

渡邊知佳