

氏 名	渡 邊 知 佳
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 687 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	原発性 CoQ ₁₀ 欠乏症の診断と ferroptosis からみた病態解明
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 高 橋 将 文 (委 員) 教 授 遠 藤 仁 司 講 師 笠 嶋 克 巳

論文内容の要旨

1 研究目的

(1) ① CoQ₁₀ 測定系の構築：原発性 CoQ₁₀ 欠乏症は、CoQ₁₀ 生合成に関与する酵素が欠損し、CoQ₁₀ 低値をきたす疾患で、脳症、心筋症、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群（SRNS）、多臓器障害など多彩な臨床症状を呈する。CoQ₁₀ 補充療法により症状の進行を抑制できることから、早期診断が重要である。確定診断は生検筋の CoQ₁₀ 低値の証明だが侵襲性が高いため、より侵襲性の低い皮膚線維芽細胞で定量系を構築し、早期診断につなげる。

② ①の CoQ₁₀ 測定系の応用：CoQ₁₀ の酸化還元状態がミトコンドリアの代謝状態を反映するマーカーであると報告された。CoQ₁₀ の酸化還元状態を評価することは病態解明や治療介入の糸口となると考えられるが、これまで原発性 CoQ₁₀ 欠乏症含め、ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞で還元型・酸化型 CoQ₁₀ に着目した報告はない。そこで、皮膚線維芽細胞で、還元型・酸化型 CoQ₁₀ を個別に定量する系を構築し、患者細胞で測定する。

(2) ferroptosis からみた病態：細胞膜の CoQ₁₀ は ferroptosis suppressor protein1(FSP1)により還元され、ferroptosis（鉄依存性で過酸化脂質の蓄積によりおこる制御された細胞死）を抑制することが明らかになった。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症患者の病態には、ATP 産生低下だけでなく、ferroptosis も関わる可能性が高いと考えられるが、患者細胞での検討はない。患者皮膚線維芽細胞を用い、病態における ferroptosis の関与を検討する。

2 研究方法

(1) 対象は、24 例のミトコンドリア病患者皮膚線維芽細胞（原発性 CoQ₁₀ 欠乏症 5 例、呼吸鎖複合体異常症 10 例を含む）とした。サンプルから CoQ₁₀ を抽出し、重水素で標識した ²H₉-CoQ₁₀ を内部標準として、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計（HPLC-MS/MS）で測定した。なお還元型 CoQ₁₀ は容易に酸化されるため、検量線用の還元型 CoQ₁₀ は酸化型 CoQ₁₀ に還元反応を行い用事調製し、最も酸化しにくい溶媒である Ethanol を用い、さらに抗酸化剤を添加し、サンプル処理後速やかに定量した。CoQ₁₀ 実測値をクエン酸シンターゼ活性量で補正し、総（還元型 + 酸化型）CoQ₁₀ 値と還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比を求め、CoQ₁₀ 欠乏と細胞内 CoQ₁₀ 還元状態を評価した。

(2) 対象は COQ2 異常 1 例 (p.[Ala117Pro]/[del])、COQ4 異常 2 例 (p.[Thr144Asn]/p.[Arg240Cys])

、 p.[Pro64Ser]/ p. [Arg160Gln])、対照の皮膚線維芽細胞とした。まず、ferroptosis誘導時の細胞生存率から、細胞の脆弱性を評価した。次に、ferroptosisの特徴とされる過酸化脂質を、蛍光試薬C11-BODIPYを用いて、蛍光顕微鏡で定性的に、フローサイトメトリーで定量的に評価した。さらに、ferroptosis関連遺伝子発現をリアルタイムPCR法で測定し、発現増加がみられた遺伝子産物についてウエスタンブロットで評価した。また、ferroptosisの重要な制御系であるグルタチオンも評価した。最後に、遺伝学的背景を同一とした*COQ2*、*COQ4*ノックアウト細胞を作製し、患者皮膚線維芽細胞での検討結果を検証することとした。

3 研究成果

(1) 皮膚線維芽細胞の還元型・酸化型 CoQ₁₀ の個別定量系を確立した。皮膚線維芽細胞の総 CoQ₁₀ 値は、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症 (n=5)、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症以外のミトコンドリア病 (n=19)、対照 (n=10) において、それぞれの 1.00 ± 0.19 (nmol / CS unit、平均±標準偏差)、 2.23 ± 0.26 、 2.30 ± 0.24 であった。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症では対照より有意に低下したが ($p < 0.01$)、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症以外のミトコンドリア病では低下はみられなかった ($p = 0.98$)。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症は、全例で総 CoQ₁₀ 値低下 (対照の総 CoQ₁₀ 値の 70%未満) がみられた。また、還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比について、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症 (n=5)、複合体 I 異常 (n=7)、複合体IV・V異常 (n=3)、その他のミトコンドリア病 (n=9)、対照 (n=10) において、それぞれ $49 \pm 7\%$ (平均±標準偏差)、 $44 \pm 7\%$ 、 $71 \pm 3\%$ 、 $49 \pm 4\%$ 、 $52 \pm 1\%$ であった。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症では、対照と比較して比の変化がみられなかったが ($p=0.95$)、複合体IV・V異常では比は増加した ($p=0.0028$)。

(2) ferroptosis 誘導時、患者細胞では脆弱性がみられたが、特に *COQ2* 異常で顕著であった (RSL3 の EC₅₀ : *COQ2* 異常 14 nM、*COQ4* 異常 78 nM、65 nM、対照 361 nM)。また *COQ2* 異常では細胞内の過酸化脂質が増加したが、*COQ4* 異常では明らかな増加はみられなかった。さらに、ferroptosis 誘導時、全例で FSP1 の遺伝子発現が増加し ($p < 0.05$)、患者細胞では FSP1 蛋白の発現量も増加した。なお、グルタチオンの低下はみられなかった。*COQ2*、*COQ4* ノックアウト細胞を作製し、患者細胞での結果の検証を試みたが、細胞維持が困難で、実験や解析はできなかった。

4 考察

(1) 皮膚線維芽細胞の総 CoQ₁₀ 値は、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の全例で有意に低下しており、構築した測定系は本症の診断に有用と考えられた。今後、国内外の疑い症例を解析し、早期診断・治療につなげる。また、今回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。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症では比の変化がなかったが、複合体異常症では比が上昇または低下した。総 CoQ₁₀ が低下しなくとも、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。さらに比の変化と呼吸鎖酵素活性との関連も示唆された。

(2) 本症における 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。*COQ2* 異常では ferroptosis に対する細胞の脆弱性と過酸化脂質の増加がみられ、既報告でも *COQ2* ノックアウト癌細胞で ferroptosis が誘導されたことから (Bersuker, Doll, 2019)、*COQ2* 異常症の病態に ferroptosis が関与することが実証された。しかし、*COQ4* 異常症では ferroptosis の関与は軽微であった。また、ferroptosis の防御機構として、FSP1 の発現誘導が起こることを

明らかにした。しかし、少なくとも *COQ2* においてこれのみで抗 ferroptosis 活性は十分でないと考えられ、関与の程度は原因遺伝子の種類；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。

5 結論

皮膚線維芽細胞の還元型・酸化型 CoQ₁₀ 個別測定系を構築し、総 CoQ₁₀ 値と還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比の評価が可能になった。本測定法は、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の診断と迅速な治療に貢献でき、さらに CoQ₁₀ 還元状態評価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。また、初めて原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の患者細胞を用いて、病態の一部に ferroptosis が関与することを実証した。ferroptosis の関与の程度は、変異遺伝子により異なることが示唆された。原発性 CoQ₁₀ 欠乏症における ferroptosis の検討は、CoQ₁₀ 生合成と ferroptosis 防御機構の解明に寄与する。

論文審査の結果の要旨

多彩な臨床症状を呈する原発性 CoQ₁₀ 欠乏症は、常染色体潜性遺伝疾患の一つであり、早期の CoQ₁₀ 補充療法により症状の進行を遅らせることが可能であることから、早期診断が重要である。現在、その確定診断には筋生検での CoQ₁₀ 低値が用いられているが、侵襲性が高いことが問題となっている。

申請者は、より侵襲の少ない皮膚線維芽細胞（原発性 CoQ₁₀ 欠乏症 5 例を含む 24 例のミトコンドリア病患者由来）における CoQ₁₀ の定量化について質量分析を用いて行い、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の皮膚線維芽細胞では、対象群や他のミトコンドリア病の細胞と比較して有意に CoQ₁₀ が減少していることを明らかにした。また、還元型および酸化型 CoQ₁₀ の測定系も確立し、還元型 CoQ₁₀/総 CoQ₁₀ 比の評価も可能とした。一方で、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症病態は、現在でも明らかになっていないが、これに関して CoQ₁₀ の酸化還元酵素である FSP-1 が制御された細胞死であるフェルトローシスに寄与することが最近報告されたことから、*COQ2*・*COQ4* 遺伝子変異を有する患者皮膚線維芽細胞を用いてフェルトローシスの関与を解析した。その結果、*COQ2* 異常の細胞においてフェルトローシス感受性が著明に亢進していることが明らかになった。また、この細胞では脂質過酸化の増加とともに、FSP-1 の発現も亢進していることも示された。

本研究の研究目的は明確で、研究方法も妥当であり、原発性 CoQ₁₀ 欠乏症の早期診断や病態の解明に寄与する新規性の高い研究であると評価した。また、本研究の成果は、将来的に新たな治療法の開発にもつながることが期待される。以上のことから、審査員全員一致で本学位論文は博士論文に相応しいと判断した。

最終試験の結果の要旨

最終試験において、申請者は研究背景や目的、方法、結果、考察について、決められた時間内に要領よく説明した。その内容の骨子は「論文審査の結果」に記載したとおりである。なお、審査委員からなされた主な質問やコメントは以下の通りである。

- 1) 表題をわかりやすく変更するほうが良いのではないか

- 2) 患者線維芽細胞の単離、培養方法について
- 3) フェロトーシス感受性における **COQ2** と **COQ4** の相違とその機序について
- 4) フェロトーシス誘導で使用した **RSL-3** の使用濃度について
- 5) 原発性 **CoQ₁₀** 欠乏症の病態におけるフェロトーシスの寄与について

申請者は、ほとんどの質問に対して的確に返答した。一部の質問に関しては、検討されていない、あるいはこれから検討予定とのことで、申請者自身の仮説を交えることで適切に答えることができた。また、提出された学位論文では、一部の指摘事項について、適切に修正かつ加筆された。

以上の発表および質疑応答から、申請者が十分な資質と能力を有していることが明らかになり、審査委員全員一致で合格と判断された。