

表 題 ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞を用いた
中枢神経薬剤ライブラリのスクリーニングと
新規候補治療薬の探索

論文の区分 博士課程

著 者 名 宮内 彰彦

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

2019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	4
2.1 対象	4
1) ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞樹立	4
a) 対象患者とコントロール	4
b) 細胞培養	5
2) 薬剤ライブラリ	5
2.2 方法	5
2.2.1 薬剤スクリーニング	5
1) 酸化ストレス負荷試験（一次スクリーニング）	6
2) ミトコンドリア機能の評価試験（二次スクリーニング）	8
3) 細胞内の ROS 産生と GSH レベルの分析	10
4) バイオマーカー（GDF-15）の測定	11
2.2.2 候補薬により発現が変化した分子検索	12
1) 候補薬投与時の LS 患者細胞の total RNA 抽出	12
2) マイクロアレーを用いた RNA 発現解析	12
3) Western blot analysis	13
2.2.3 統計学的解析	14
3. 結果	15
3.1 酸化ストレス負荷試験	15
3.1.1 酸化ストレス負荷時の正常細胞と患者由来細胞の生細胞率の比較	15
3.1.2 患者細胞を用いた酸化ストレス負荷試験による薬剤スクリーニング	16
3.1.3 治療薬候補薬の 50%効果濃度の算出	18
3.2 患者細胞に治療薬候補薬を添加した際のミトコンドリア機能の評価試験	20
3.3 Apomorphine 添加時の患者細胞における細胞内 ROS および GSH	23
3.4 GDF-15 による Apomorphine の有効性の予測	24
3.5 マイクロアレーによる Apomorphine 投与前後の遺伝子発現解析	25
3.6 LS 患者細胞における Apomorphine の mTOR 活性への影響	27
4. 考察	29
5. おわりに	33
6. 参考文献	34
7. 謝辞	43

略語

〈英語〉 アルファベット順

ATP (adenosine triphosphate)

BSO (L-buthionine-(S,R)-sulfoximine)

CNS (central nervous system)

CoQ10 (Coenzyme Q10)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DMSO (dimethyl sulfoxide)

ED (Erectile Dysfunction)

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

ETC (electron transport chain)

FBS (fetal bovine serum)

FDA (Food and Drug Administration)

GCS (γ -glutamylcysteine synthetase)

GDF-15 (growth differentiation factor 15)

GSH (glutathione)

GSSG (glutathione-S-S-glutathione)

LHON (Leber's hereditary optic neuropathy)

LS (Leigh Syndrome)

mTOR (mammalian target of rapamycin)

MELAS (myopathy encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes)

MERRF (myoclonic epilepsy and ragged red fibers)

mt DNA (mitochondrial DNA)

NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

OCR (oxygen consumption rate)

PD (Parkinson's Disease)

ROS (reactive oxygen species)

1. はじめに

ミトコンドリアは、細胞の活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) や adenosine triphosphate (ATP) 産生あるいはアポトーシスの制御誘導といった細胞エネルギー代謝において重要な役割を果たす細胞内小器官である (1,2)。ミトコンドリア病はミトコンドリア DNA あるいは核 DNA の変異によって起こるミトコンドリア電子伝達系 (Electron transport chain; ETC) やミトコンドリア遺伝子の転写・複製あるいは複製・維持・分裂等の機能不全から生じる疾患の総称で、小児では最も多い遺伝性代謝性疾患であり 500 人に 1 人の頻度で発症する (1-4)。ミトコンドリア病の臨床病型は多様であり、Leigh 脳症 (Leigh syndrome; LS)、ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群 (myopathy encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes; MELAS)、myoclonic epilepsy and ragged red fibers (MERRF)、Pearson's syndrome、Kearns-Sayre syndrome、レーバー遺伝性視神経炎 (Leber's hereditary optic neuropathy; LHON) などがある (1,5)。その中でも LS および MELAS は小児ミトコンドリア病の約 60%を占め、小児領域における二大病型とみなされている (6)。

LS は、基底核や脳幹の左右対称性の壊死性変化を特徴とする遺伝性神経変性疾患である。約 80%が 2 歳以内に筋緊張低下や精神運動発達遅滞などの中枢神経症状を発症する。進行性に精神運動発達退行やてんかん、脳幹病変に起因する眼球運動障害や嚥下障害、呼吸障害などを認め、しばしば感染などを契機に急速な進行を示す (7,8)。MELAS は脳卒中様発作、けいれんや認知障害を伴う脳症、高乳酸血症や筋病理での赤色ぼろ線維 (ragged red fibers) を特徴とする疾患で、約 70%が 20 歳以下で発症し、精神運動発達退行やてんかんのみならず、感音性難聴や低身長、心機能障害、糖尿病などを合併することもある。MELAS の約 80%の症例がミトコンドリア

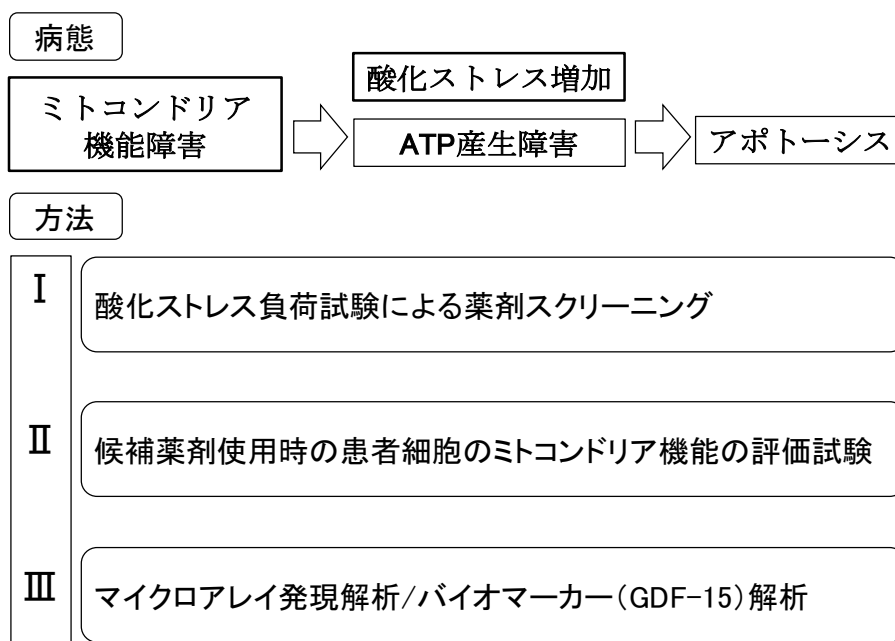
DNA (mitochondrial DNA; mtDNA) の m.3243A>G 変異により引き起こされるが、他の mtDNA 変異や *POLG1* 変異などの核 DNA 変異も報告されている (9-11)。しかしながら、LS、MELAS をはじめとするミトコンドリア病では、いずれも根本的な治療方法が確立していない。

ミトコンドリアの機能障害では酸化ストレスの増加や ATP 産生の障害が起こり、これにより細胞のアポトーシスが引き起こされる。このため、酸化ストレス時における活性酸素や有害代謝物の除去や好気性 ATP 産生を担う電子伝達鎖機能/呼吸鎖複合体活性の向上は、ミトコンドリア病の主な治療戦略となる (12)。ミトコンドリアの治療薬として承認されている薬剤としては、補酵素 Q10 の類縁体であるイデベノンが、LHON に対する治療薬として欧州において認可されているのみである (13)。このため、ミトコンドリア病に対する有効な治療薬が切望されている。

最近の薬剤開発研究では、既に承認され臨床の場である疾患に使用されている薬剤を対象と、ドラッグリポジショニングにつながる新しい生物学的活性や標的分子の発見、または新規作用機序の発見により別の疾患に有効な薬物効果を見つけ出す研究手法が盛んに行われている (14)。ミトコンドリア病では全臓器が罹患対象となりうるが、脳や筋のようにエネルギーを大量に必要とする臓器は、ATP 産生不全と酸化ストレスの増加に特に感受性が強い (5,15)。LS や MELAS では特に、進行性かつ不可逆性の中樞神経 (central nervous system; CNS) 症状が予後と強く関係している (5)。このため、我々はスクリーニングの対象薬剤として、Prestwick Chemical Library (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) から、脳血液関門を通過することのできる 275 種の薬剤を含む CNS 薬剤ライブラリを選択した。Prestwick Chemical Library は、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) により臨床での使

用が認可された薬剤およそ 1200 を含む薬剤ライブラリで、多くの研究でドラッグリポジショニングの候補薬剤を探索するために使用されている (16-18)。また、ミトコンドリアは全ての細胞にあり全身性疾患であることから、患者皮膚由来の線維芽細胞も疾患の病態生理学的な特徴を保持しているため、*ex vivo* モデルの薬剤探索において有用なサンプルと考えられる (19,20)。

以上の背景から、本研究では、ミトコンドリア病の中でも小児領域で頻度の高い LS と MELAS 患者の皮膚線維芽細胞を用いて、既存の CNS 薬剤ライブラリからの新規ミトコンドリア病治療薬の検索を第一主題とし、更に抽出された治療候補薬に関して、そのミトコンドリアに対する作用の確認や作用機序の検索をすることを第二主題とした (図 1)。



(図 1) 研究概略図

2. 対象と方法

2.1 対象

1) ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞樹立

a) 対象患者とコントロール

対象としたミトコンドリア病患者は、自治医科大学附属病院小児科および関連病院の通院患者とし、LS および MELAS の症例選択は臨床症状や生化学検査所見および病原性遺伝子変異が確認された症例とした。検体の採取に関しては自治医科大学附属病院の倫理委員会により承認されており、全ての患者家族からインフォームドコンセントを得た（自治医科大学遺伝子解析研究 第遺 18—変 07）。

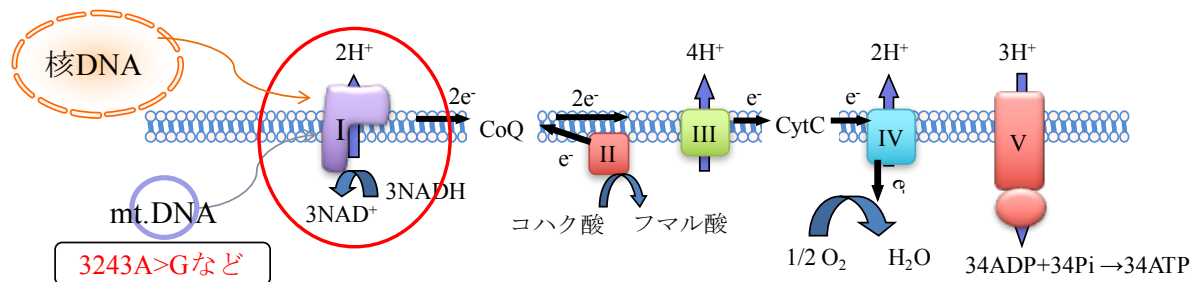
以下の実験は 4 例のミトコンドリア病患者を対象として、ミトコンドリア遺伝子変異による LS 患者の症例 1（LS^{ND3}、m.10158 T>C (p.S34P)、ND3）、核遺伝子変異による LS 患者の症例 2（LS^{NDUFA1}、c.55 C>T (p.P19S)、NDUFA1）、ミトコンドリア遺伝子変異による MELAS 患者 2 例の症例 3（MELAS^{tRNA-Leu}、m.3243 A>G、tRNA-Leu）と症例 4（MELAS^{tRNA-Trp}、m.5541 C>T、tRNA-Trp）からそれぞれ樹立した皮膚線維芽細胞を使用した（表 1）。また、対照の皮膚線維芽細胞として、Promo Cell 社から購入した健常皮膚線維芽細胞（#C-12300, GmbH, Heidelberg, Germany）を使用した。LS 患者 2 例の ND3、NDUFA1 はいずれも呼吸鎖複合体 I のサブユニットの構成蛋白であり、変異により複合体 I の活性低下を引き起こすことが知られている（図 2）。MELAS 患者の m.3243 A>G 変異は MELAS 患者の約 80%に認める最も多くみられる変異であり、tRNA^{Leu} のタウリン修飾の障害が病態と関わりとされる(21)。また我々が対象としたミトコンドリア病患者 4 症例のうち、症例 1（LS^{ND3}）、症例 2（LS^{NDUFA1}）、症例 4（MELAS^{tRNA-Trp}）はそれぞれ症例報告されている (22-24)。

症例	Cell ID	疾患	年齢 (歳)	遺伝子変異	蛋白	変異率 (%)
1	LS ^{ND3}	LS	0	m.10158 T>C, p (S34P)	ND3	90
2	LS ^{NDUFA1}	LS	5	c.55 C>T, p(P19S)	NDUFA1	100% (X linked)
3	MELAS ^{tRNA-Leu}	MELAS	14	m.3243 A>G	(tRNA-Leu)	21
4	MELAS ^{tRNA-Trp}	MELAS	23	m. 5541 C>T	(tRNA-Trp)	49

(表 1) ミトコンドリア病患者の線維芽細胞

線維芽細胞は、LS および MELAS 患者から樹立された。患者の年齢、遺伝子変異、タンパク質、突然変異率などの特徴を表に示す。全ての線維芽細胞は 15 歳未満で使用した。ミトコンドリア遺伝子変異を有する各症例のヘテロプラスミー率は変異領域の Deep sequencing によって変異率を分析した。

呼吸鎖複合体 I ~ V の模式図



(図 2) 呼吸鎖の全体像

LS 患者の ND3、NDUFA1 はいずれも呼吸鎖複合体 I のサブユニットの構成蛋白であり、変異により複合体 I の活性低下を引き起こす。MELAS 患者の m.3243 A>G 変異は MELAS 患者の約 80% が有する最も多くみられる変異である。

b) 細胞培養

患者由来の皮膚線維芽細胞は、非動化した 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum) と 100 units/ml ペニシリンおよび 100µg/ml ストレプトマイシンを加えた DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を使用し、5% CO₂ 下、37°C で培養した。培養細胞の継代数は Passage 5~15 の細胞を使用した。

2) 薬剤ライブラリ

LS または MELAS は中枢神経系において主要な症状が発現する。そこで、血液脳関門を通過し得ることが知られている市販の薬剤ライブラリである Prestwick Chemical Library Ver.16; 中枢神経作動薬 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用した。この薬剤ライブラリは、275 個の公知の薬剤を含む。ライブラリのすべての化合物 (粉末) は、DMSO に溶解し、使用時まで -20°C で保存した。

2.2 方法

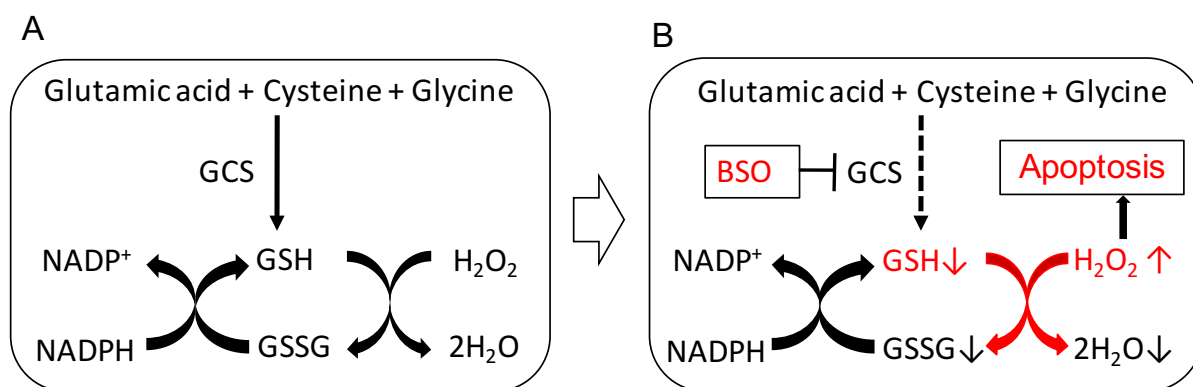
2.2.1 薬剤スクリーニング

ミトコンドリアの機能障害を有する個体では、正常な個体と比較して、酸化ストレスに対して脆弱であることが報告されている (19)。そこで、各患者の皮膚線維芽細胞に酸化ストレスを付与してアポトーシスを誘導した条件下で、各細胞に薬剤ライブラリの対象薬剤を投与する一次スクリーニングを実施した。次いで、一次スクリーニングで選抜された治療薬候補薬剤を用いて、ミトコンドリア機能の評価試験による二次スクリーニングを実施した。さらに有望な候補薬剤に関しては、マイクロアレイ発現解析やバイオマーカー、細胞内の代謝物質等の *in vitro* 評価試験を行った。

1) 酸化ストレス負荷試験 (一次スクリーニング)

酸化ストレス負荷試験は、L-ブチオニン-(S,R)-スルホキシミン (BSO) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) の添加によって細胞死を誘導した (25)。BSO は細胞内における抗酸化物質であるグルタチオン (glutathione; GSH) の合成を阻害し GSH を枯渇させることにより、細胞内の活性酸素の過剰を引き起こし細胞のアポト

ーシスを誘導することが知られている (図 3) (19,26,27)。

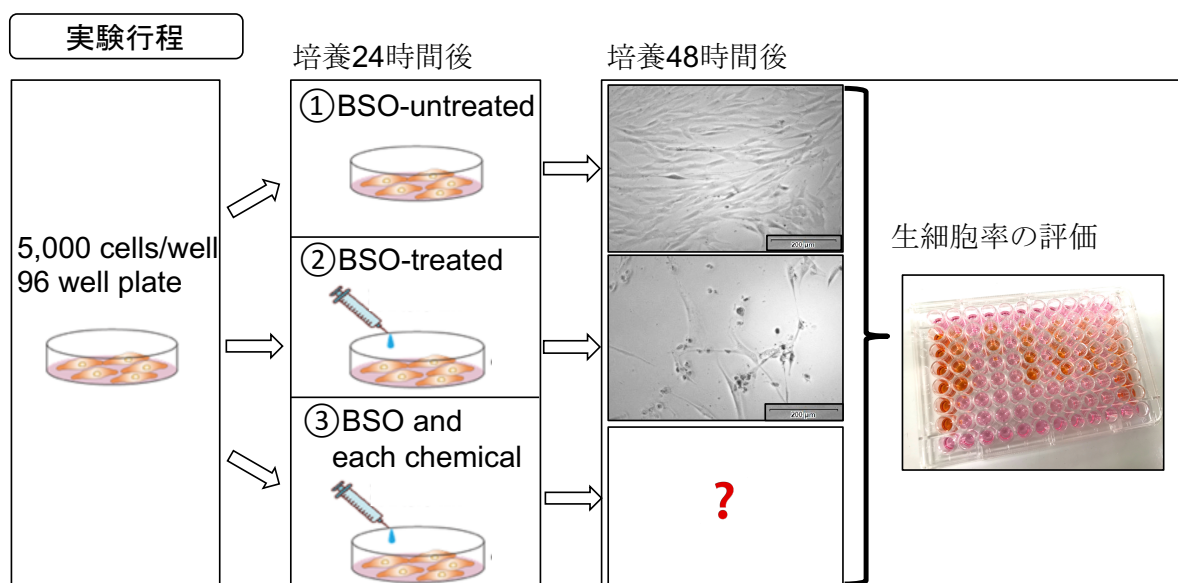


(図 3) グルタチオン代謝と BSO

(A) 通常の状態、(B) BSO 使用時の代謝図を示す。BSO は GSH 合成阻害により H₂O₂ を始めとする活性酸素の過剰産生を生じ、細胞のアポトーシスを引き起こす。GCS: γ -glutamylcysteine synthetase, GSH: glutathione, GSSG: glutathione-S-S-glutathione, BSO: L-buthionine-(S,R)-sulfoximine, NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate。

酸化ストレス負荷試験の実験手順を図 3 に示す。試験に用いる患者由来皮膚線維芽細胞を、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、炭酸ガスインキュベーター内で 37°C、5% CO₂ の条件で 24 時間培養した。培養 24 時間後に、BSO 非添加群、BSO 添加群 (最終濃度 100~500 μ M)、BSO および薬剤ライブラリの対象薬剤 (最終濃度 1 μ M) 共添加群の 3 群に分け、添加 48 時間後に生細胞率を測定した。生細胞率の測定には、生細胞数測定試薬 SF (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用し、生成されたホルマザンの吸光度を Benchmark Plus マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) により測定し、BSO 非添加群と比較解析した。BSO 濃度は、BSO 添加群 (酸化ストレス負荷群) の生細胞率が約 10-20%となるように、各細胞において 100~500 μ M の範囲で調整した。この生細胞率を BSO 添加群 (酸化ストレス負荷群) と比較した時の生細胞率の向上を確認することにより、対照薬剤の酸化ストレスに対するミトコン

ドリア機能障害の改善効果を評価した。



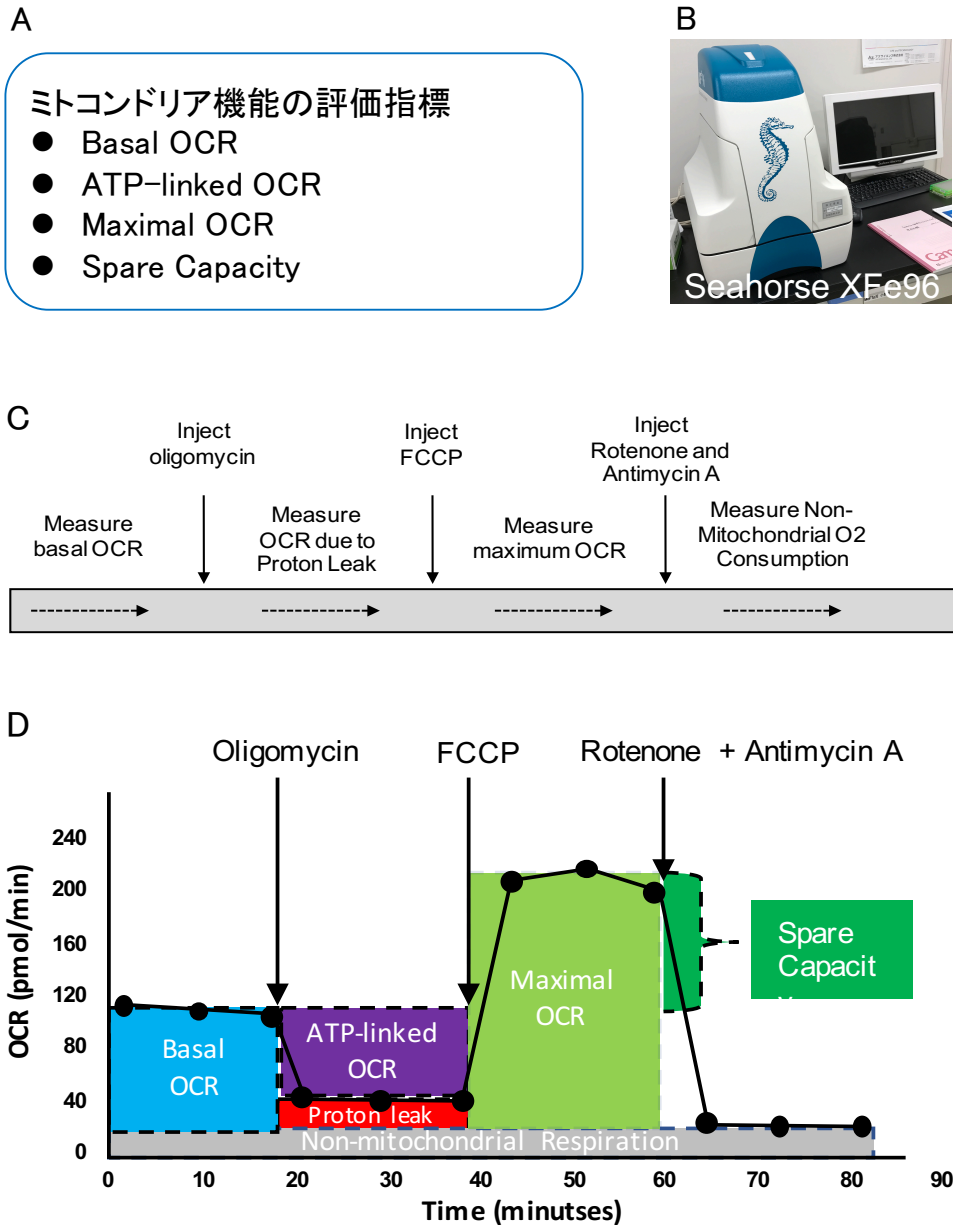
(図4) 酸化ストレス負荷試験のプロトコール

BSO の添加によって細胞死を誘導した条件下で行い、実験行程で BSO 非添加群、BSO のみの添加群、BSO と対象薬剤の共添加群の 3 グループに分け、48 時間後に、患者細胞の生細胞率を BSO 添加群と比較し、生細胞率の向上を確認することで改善効果を評価した。

また、陽性コントロールとして、我々はイデベノン（最終濃度 1 μ M）を使用した。イデベノンはキノンに属するコエンザイム Q10（Coenzyme Q10; CoQ10）の類似体で、親水性であることから CoQ10 よりも幅広い臓器に分布することが可能な薬物特性をもつ。抗酸化作用に加え、呼吸鎖複合体 I を迂回し複合体 III に直接電子を移すことによる電子伝達鎖機能の改善作用を有しており、複合体 I 機能障害によるミトコンドリア視神経症である LHON に対して有効性が示されている。ミトコンドリア病に対する治療薬としては唯一、ヨーロッパにおいて 2015 年 9 月に LHON 患者の視機能維持薬として承認されており（Roxane[®]、Santhera Pharmaceuticals 社）、LHON 患者への使用が開始されている (13)。

2) ミトコンドリア機能の評価試験（二次スクリーニング）

一次スクリーニングで得られた治療薬候補薬を対象とした二次スクリーニングとして、ミトコンドリア病患者細胞に対象化合物を添加した際のミトコンドリア機能の評価試験を行った。ミトコンドリア機能の評価試験は、細胞外フラックスアナライザーである Seahorse XFe96 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用して実施した。細胞外フラックスアナライザーは、細胞の ATP 合成時にミトコンドリアで使用される酸素消費速度 (oxygen consumption rate; OCR) を測定することで、生細胞においてミトコンドリア機能の評価を行うことができる。評価項目は、本アッセイのミトコンドリア機能評価における主要な指標とされる Basal OCR、ATP-linked OCR、Maximal OCR および Spare Capacity について算出した (28,29)。測定時には、ATP 合成酵素阻害剤 (オリゴマイシン、ロテノンおよびアンチマイシン A)、および脱共役剤 (カルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP)) を添加しながら継続的に測定することで、各評価指標を産出した (図 5)。試験の手順は、下記の通りである。試験に用いる細胞を、細胞培養用 96 ウェルプレートに、20,000 細胞 / ウェルおよび 80 μ L 培地 / ウェルの濃度になるよう播種し、炭酸ガスインキュベーター内で 37°C、5% CO₂ の条件で 24 時間培養した。培養 24 時間後に、候補薬 (濃度 100 nM) または対照として 0.1% のジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide ; DMSO) をウェル中の細胞に添加し、次いで薬剤添加 20 分後にオリゴマイシン (濃度 2 μ M) を、薬剤添加 50 分後に FCCP (濃度 2 μ M) を、薬剤添加 80 分後にロテノンおよびアンチマイシン A (濃度 0.5 μ M) を、順次添加して、OCR を経時的に測定し、化合物添加 24 時間後における測定結果を解析した。



(図 5) 細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能の評価
 細胞の ATP 合成時にミトコンドリアで使用される酸素消費速度 (OCR) を測定した。A; 評価項目、B; 細胞外フラックスアナライザー Seahorse XFe96 を用い、C; ATP 合成酵素阻害剤 (オリゴマイシンおよびロテノン)、および脱共役剤 (FCCP)) を添加しながら継続的に OCR を測定し、D; Basal OCR、ATP-linked OCR、Maximal OCR および Spare Capacity について、添加薬剤と時間経過により解析した。

3) 細胞内の ROS 産生と GSH レベルの分析

治療薬候補薬を使用した際の LS 患者の患者細胞 (LS^{ND3}) における ROS とレドックス代謝物への影響を調べるため、既報の方法を用いて ROS および GSH をそれぞれ測定した (27,30)。ROS 測定には OxiSelect ROS Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を使用した。測定時には細胞に対し Assay Kit に付属している H₂O₂ (1mM) による酸化ストレス処理を行い、DMSO (0.1%) または候補薬 (10nM、100nM、1μM) を添加した際の蛍光強度をマルチプレートリーダーARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) により測定することで、ROS 産生レベルを定量的に評価した。GSH レベルの測定には GSH-Glo™ Glutathione Assay kit (Promega, Madison, WI, USA) を使用した。測定時には BSO 処理または非処理の状態では候補薬 (1μM) を使用した際の蛍光強度をマルチプレートリーダーARVO により測定し、GSH レベルを定量的に評価した。

4) バイオマーカーの growth differentiation factor 15(GDF-15)測定

GDF-15 はミトコンドリア病患者の血液中で特異的に上昇することが知られている蛋白で、ミトコンドリア病の診断や治療におけるバイオマーカーとして、その臨床的有用性が報告されている (31)。加えて、BSO による酸化ストレス負荷試験においてミトコンドリア病患者由来細胞の培養培地の GDF-15 を測定しその変動を評価することにより、化合物のミトコンドリア病に対する有効性を検討した報告もある (30)。我々は既報(30,31)と同様の手法を用い、Quantikine Human GDF-15 ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用し、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法にて GDF-15 レベルを測定した。検体は、酸化ストレス負荷試験の際の LS 患者の細胞 (LS^{ND3}) の BSO 非添加群、BSO 添加群、BSO および候補薬

の共添加群の3群について、培養48時間後の培養培地を測定に使用した。測定値は内部標準の値を参照して算出し、酸化ストレスを負荷しないBSO非添加群の細胞の培養培地の値を100%として、それぞれGDF-15の値を比較した。

2.2.2 候補薬により発現が変化した分子検索

1) 候補薬投与時のLS患者細胞のtotal RNA抽出

LS患者細胞 (LS^{ND3}) を播種して24時間後に、BSOを添加して酸化ストレスを付与した群と、BSO (200 μ M) および候補薬 (最終濃度1 μ M) を共添加した群を2検体ずつ作成した。炭酸ガスインキュベーター内で37 $^{\circ}$ C、5% CO₂の条件で48時間培養した後に、細胞ペレットを作成し、RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いてRNAを抽出した (32)。

2) マイクロアレーを用いたRNA発現解析

Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用し、5.0 μ gのRNAにCyanine-3 (Cy3) でラベルを付与しcRNAを作成し、RNeasy column (QIAGEN, Valencia, CA, USA)により精製した。その後、Cy3ラベル化cRNAを25 μ lのAgilent fragmentation bufferと2x Agilent blocking agentの混合溶液内で30分、60 $^{\circ}$ Cで反応させ断片化した。そこに25 μ lの2x Agilent hybridization bufferを加えて、65 $^{\circ}$ Cで17時間、SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K Microarray Ver3.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) に断片化混合を交雑させた。交雑後にGE Wash Bufferで洗浄し、8x60kアレイスライドの一色法でAgilent SureScan Microarray Scanner (G2600D) を使用してスライドをスキャンした。スキャン後の解析はFeature Extractionソフトウェア・プログラム (バージョン12.0.3.1 Agilent

Technologies、Santa Clara, CA, USA) を使用して行い、2 群間の遺伝子発現比率を解析した。

3) Western blot analysis

LS 患者の皮膚線維芽細胞 (LS^{ND3}) を用いて、BSO 処理下で候補薬添加時と非添加時の蛋白発現をウェスタンブロット法により評価した。患者細胞は播種して 24 時間後に、BSO (200 μ M) を添加して酸化ストレスを付与した群と、BSO および候補薬 (最終濃度 1 μ M) を共添加した群を 2 検体ずつ作成した。炭酸ガスインキュベーター内で 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件で 48 時間培養した後に、PBS で洗浄後に TNE バッファ (20 mM Tris-HCL [pH 7.4], 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA [pH 7.4]) を用いて蛋白を抽出した。細胞溶解液は超音波破碎し、氷上で 5 分静置した。その後、4 $^{\circ}$ C、20,600 x g で 30 分遠心分離し、上清の一部を用いて Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) で蛋白濃度を測定した。上清は、5x SDS サンプルバッファと混合し、最終蛋白濃度が 2 μ g/ μ l となるよう調整し、95 $^{\circ}$ 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。熱処理後の細胞溶解液は、各 well に 10 μ l (総蛋白量 20 μ g) を XV PANTERA MP Gel (ゲル濃度 10%) (丸幸商会、東京、日本) にアプライし、300V、12 分間の SDS-PAGE 電気泳動を行い、その後 45V、22 分間で 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。メンブレンは、5%スキムミルク、0.1%Tween20 を含む PBS (PBST) で室温、1 時間でブロッキングし、一次抗体として以下を用いた; anti-S6 kinase (1:1000) (#2708; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、anti-phospho-S6 kinase (#9234; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、mouse monoclonal anti-beta-

actin (1:2000) (A1978; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。一次抗体は 4 °C で静置し一晩反応させた。PBST で 3 回洗浄後、二次抗体は goat anti-rabbit IgG Horse Radish Peroxidase (1:5000) (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) および anti-mouse IgG HRP (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いて室温、1 時間で反応させた。PBST で 3 回洗浄後、Hyper HRP Substrate (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) で 2 分反応させ、ImageQuant LAS 4000 で蛍光検出した。

2.2.3 統計学的解析

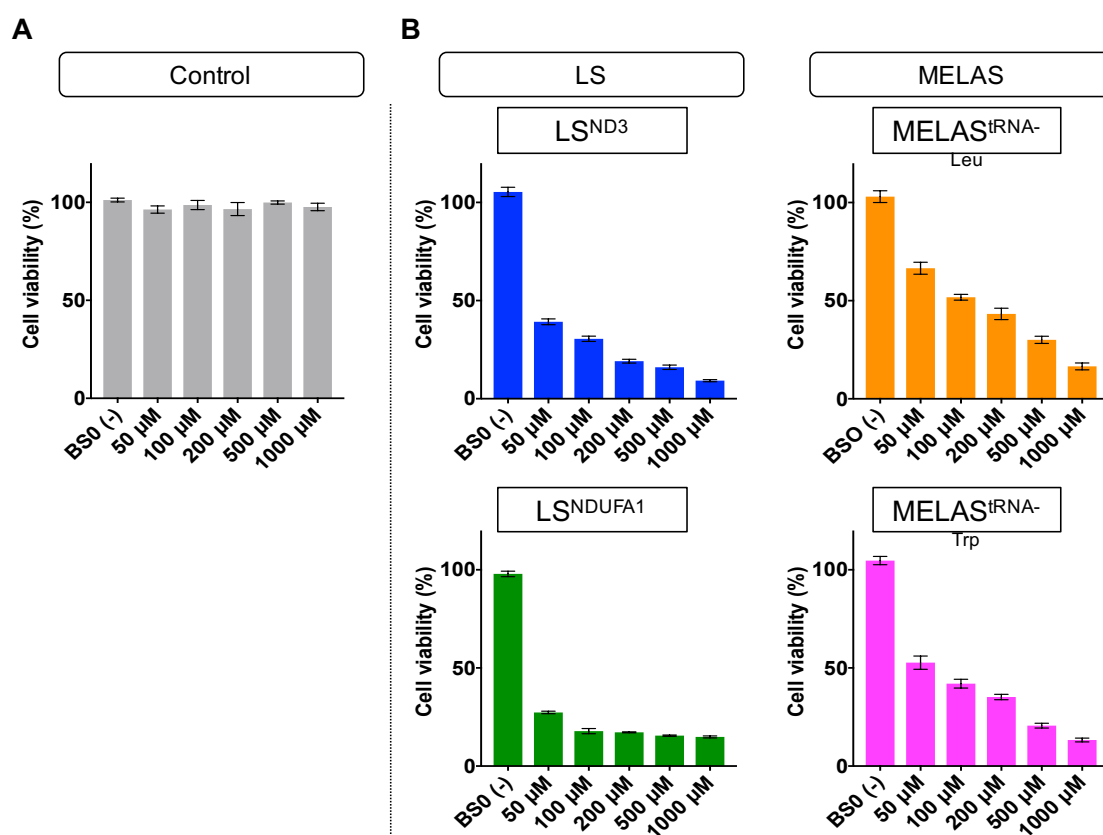
統計解析は、GraphPad Prism ソフトウェアプログラム (バージョン 7.0、GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて行った。サンプル間の比較は、二群間の比較についてはスチューデントの t 検定を、多群間比較については One way ANOVA 法用いて行った。結果は平均±標準偏差として表され、いずれの検定法についても $P < 0.05$ を有意差ありと判定し、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ で示した。

3. 結果

3.1 酸化ストレス負荷試験

3.1.1 酸化ストレス負荷時の正常細胞と患者由来細胞の生細胞率の比較

正常細胞とミトコンドリア病患者由来皮膚線維芽細胞を用いて、酸化ストレス負荷条件下での生細胞率を比較した結果を示す (図 6)。



(図 6) 正常細胞と患者由来細胞の生細胞率の比較

A; コントロールの細胞に対して BSO による酸化ストレス負荷をかけた際の生細胞率。B; LS および MELAS 患者由来の細胞に対して BSO による酸化ストレス負荷をかけた際の生細胞率。

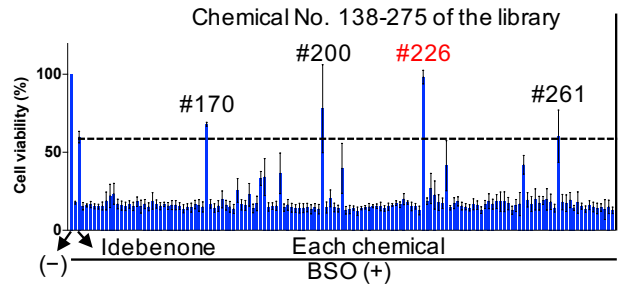
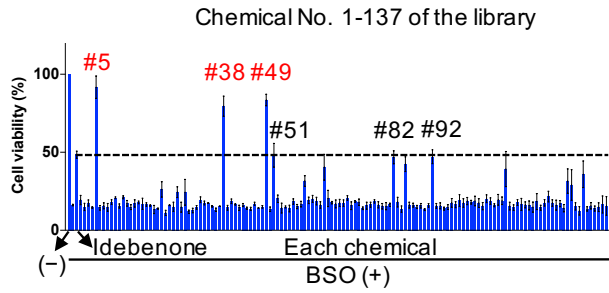
BSO により酸化ストレス負荷を各細胞に付与した結果、正常細胞では BSO の濃度によらず生細胞率はほぼ 100%を保った一方で、患者由来の皮膚線維芽細胞では BSO の濃度が高くなるにつれ濃度依存性に生細胞率の低下がみられた。既報告のミトコンドリア病由来の皮膚線維芽細胞の酸化ストレスに対する脆弱性が本研究で用

いた患者由来細胞においても見られた (19)。LS 患者由来細胞と比べて MELAS 患者由来の皮膚線維芽細胞の方が、全体的に生細胞率が高かった理由としては、MELAS 患者ではヘテロプラスミーにより変異率が規定され (MELAS^{tRNA-Leu} : 21%、MELAS^{tRNA-Trp} : 49%)、正常ミトコンドリアがある一定の割合で存在していることが要因の一つとして考えられた。以上の結果から、これらの細胞を用いた BSO による酸化ストレス負荷下での薬剤スクリーニングが可能であると考えた。

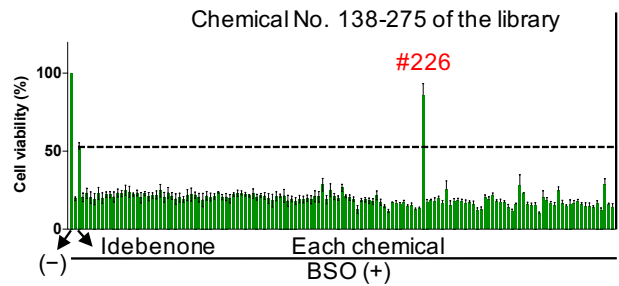
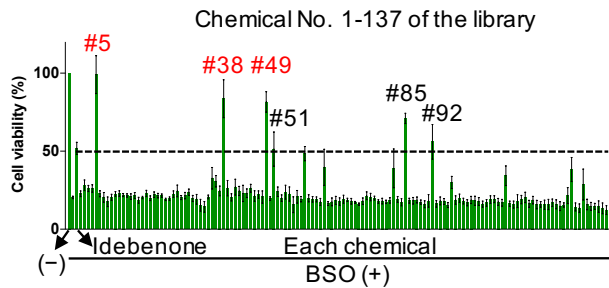
3.1.2 患者細胞を用いた酸化ストレス負荷試験による薬剤スクリーニング

4 系統の患者由来細胞で薬剤スクリーニングを行った結果を図 7 に示す。それぞれ一番左のバーが BSO 非添加群 (酸化ストレスの負荷がない群)、二番目が BSO だけの添加群 (酸化ストレス負荷のある群)、三番目が BSO とイデベノンを追加した群で、以降は BSO と対象薬剤を共添加した際の生細胞率を示す。陽性コントロールとして使用したイデベノンは、いずれの患者細胞に対しても酸化ストレスに対する細胞保護効果を示した。このイデベノンと同等以上の生細胞率を示した薬剤を「有効」と定義した。

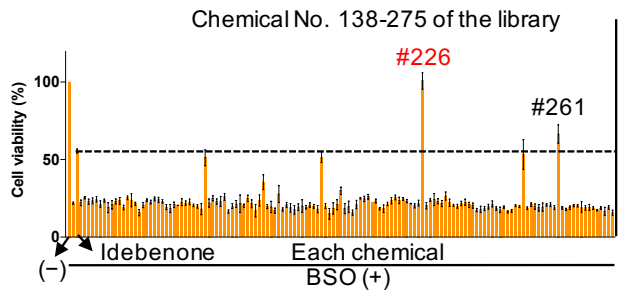
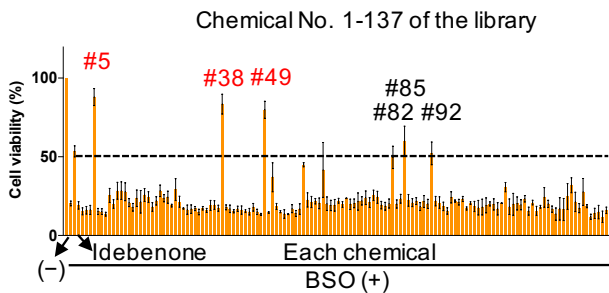
Case 1, LS^{ND3}



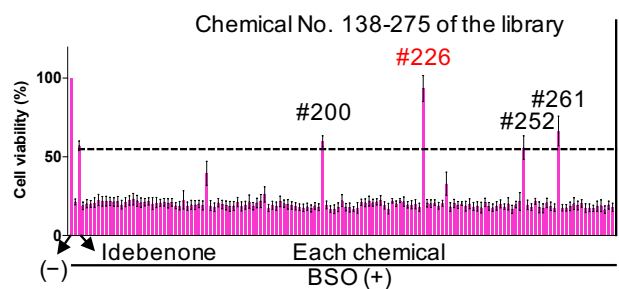
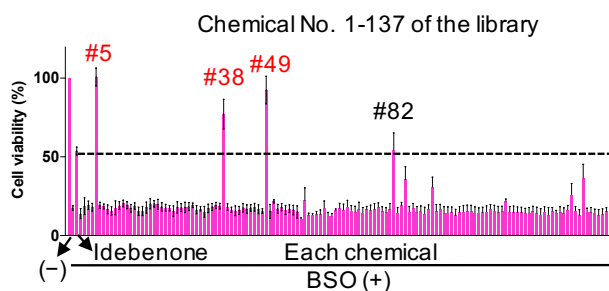
Case 2, LS^{NDUFA1}



Case 3, MELAS^{tRNA-Leu}



Case 4, MELAS^{tRNA-Trp}



(図7) 酸化ストレス負荷テストによる薬剤スクリーニング結果

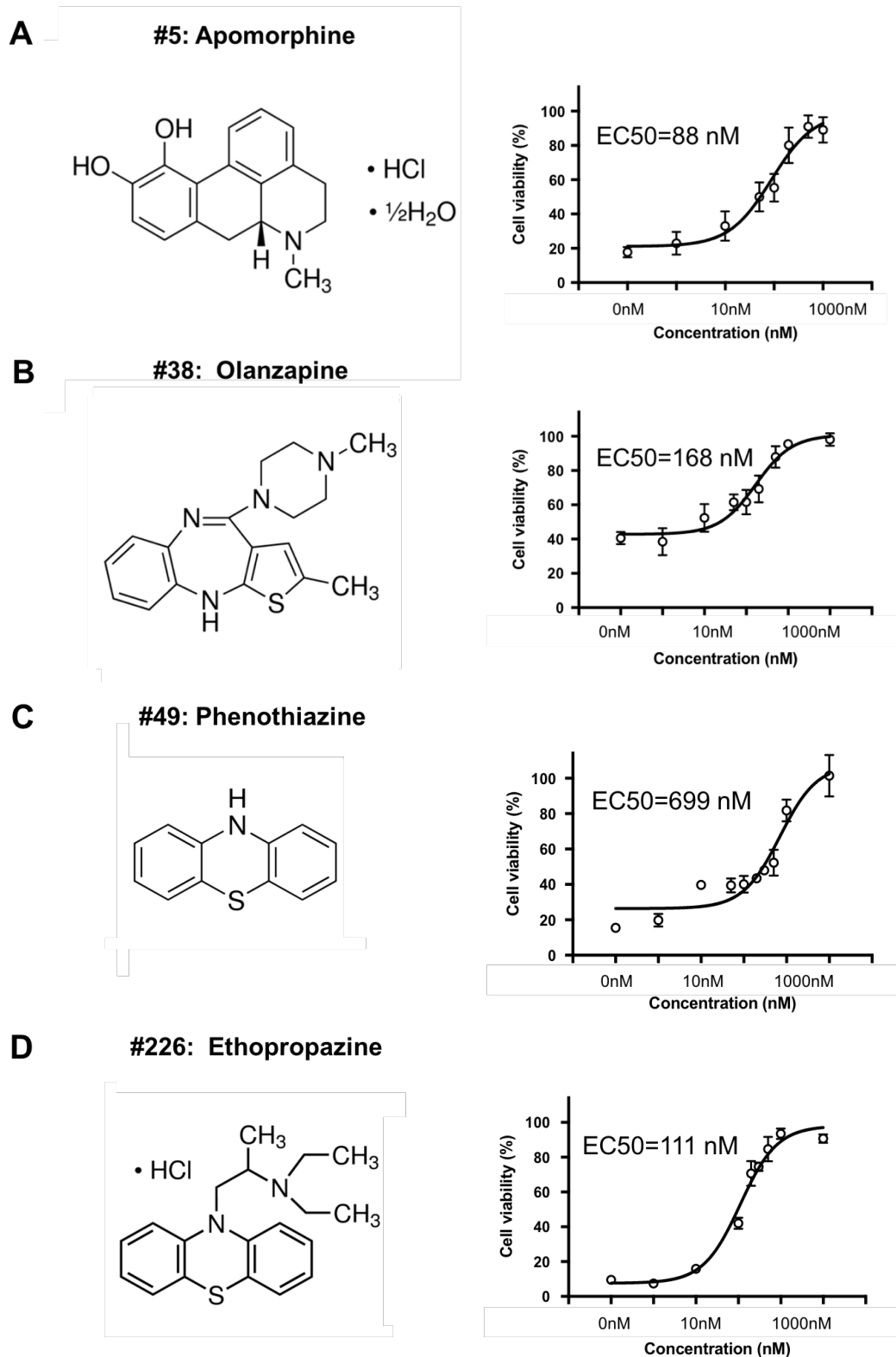
ミトコンドリア病患者4例の皮膚線維芽細胞の生細胞存率アッセイの結果を示す。上から Case 1; LS^{ND3}、Case 2; LS^{NDUFA1}、Case 3; MELAS^{tRNA-Leu}、Case 4; MELAS^{tRNA-Trp} の結果を示す。それぞれ一番左のバーが BSO 非添加群 (酸化ストレスの負荷がない群)、二番目が BSO のみの添加群 (酸化ストレス負荷の

ある群)、三番目が BSO とイデベノン を添加した群で、以降は BSO と対象薬剤を共添加した際の生細胞率を示す。

図 7 に示す通り、スクリーニングの結果少なくとも 1 例の患者細胞において有効と判定された薬剤が計 12 種類 (#5: R(-) Apomorphine hydrochloride hemihydrate (Apomorphine), #38: Olanzapine, #49: Phenothiazine, #51: Perphenazine, #82: DO 897/99, #85: Promazine hydrochloride, #92: Methotrimeprazine maleate salt, #170: Trazodone hydrochloride, #200: Metergoline, #226: Ethopropazine hydrochloride (Ethopropazine), #252: (-)-Eseroline fumarate salt, #261: Perospirone) 存在した。そのうちの 4 種類の薬剤 (#5: Apomorphine, #38: Olanzapine, #49: Phenothiazine, #226: Ethopropazine) は、全ての患者細胞においてイデベノンよりも高い生細胞率を示していたことから、これらを一次スクリーニングにおける治療薬の候補薬とした。

3.1.3 治療薬候補薬の 50%効果濃度の算出

続いて、4 種類の治療薬候補薬 (#5: Apomorphine, #38: Olanzapine, #49: Phenothiazine, #226: Ethopropazine) についてそれぞれ 50%効果濃度 (EC₅₀) を算出した (図 8)。



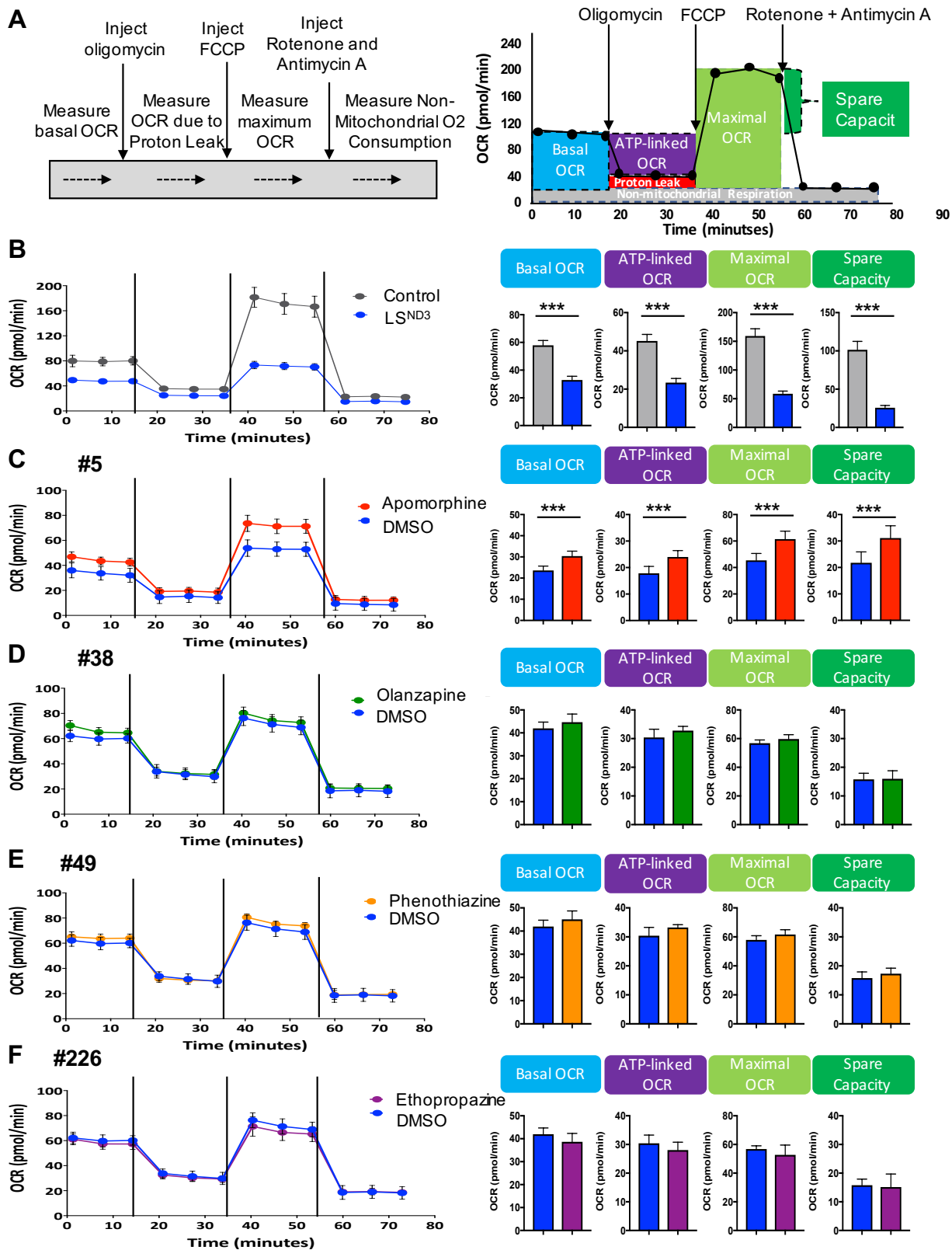
(図 8) 4種の候補薬剤の構造と EC₅₀ 値

これらの4つの候補薬は、酸化ストレス下で全例の患者細胞を細胞死から救済した。#5: Apomorphine (A)、#38: Olanzapine (B)、#49: Phenothiazine (C)、#226: Ethopropazine (D)の各候補薬の EC₅₀ 値は、異なる濃度で使用した際の LS 患者細胞 (LS^{ND3}) の生細胞率を評価し算出した。

各薬剤の細胞保護効果はいずれも用量依存的に確認され、それぞれの EC₅₀ 値は、#5: Apomorphine が 88 nM、#38: Olanzapine が 168 nM、#49: Phenothiazine が 699 nM、#226: Ethopropazine が 111 nM であり、#5: Apomorphine が最も低濃度の EC₅₀ 値を示した。

3.2 患者細胞に候補薬を添加した際のミトコンドリア機能の評価試験

ATP 合成時にミトコンドリアで使用される酸素消費速度 (OCR) を測定し、そこからミトコンドリア機能の評価指標である Basal OCR、ATP linked OCR、Maximal OCR および Spare Capacity について産出した (図 9A)。第一に、評価に用いた LS 患者の細胞 (LS^{ND3}) と正常細胞のミトコンドリア機能について評価した (図 9B)。その結果、LS 患者細胞 (LS^{ND3}) では、Basal OCR、ATP linked OCR、Maximal OCR、Spare Capacity のいずれの指標も正常細胞に比べて有意に低下しており、患者細胞の呼吸鎖複合体機能障害によるミトコンドリア機能障害を示す所見がみられた。続いて、酸化ストレス負荷テストにおいて見出した 4 種類の薬剤 (#5: Apomorphine, #38: Olanzapine, #49: Phenothiazine, #226: Ethopropazine) を添加し、培養 24 時間後の OCR を評価した (図 9 C~F)。3 種類の候補薬 (#38: Olanzapine, #49: Phenothiazine, #226: Ethopropazine) に関しては、対照の DMSO (0.1%) と比べ、いずれの指標も有意な変化を示さなかった一方で、#5: Apomorphine のみがいずれの指標においても有意な改善を示した。この結果から、#5: Apomorphine が LS 患者由来の皮膚線維芽細胞に対してミトコンドリアの ATP 産生低下を改善し得ることが示された。



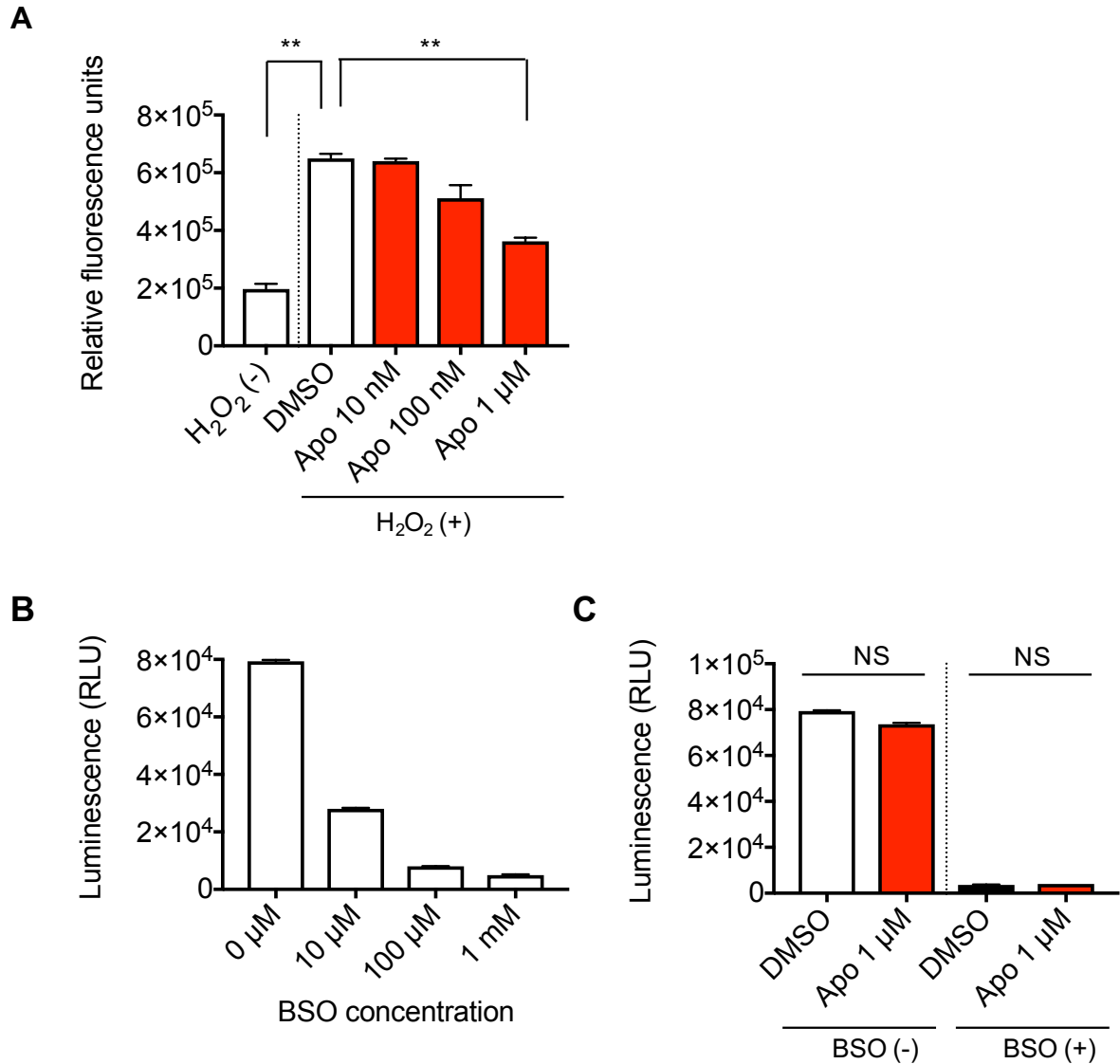
(図 9) 候補薬添加時の患者細胞のミトコンドリア機能の評価
細胞外フラックスアナライザーにより、ATP 合成時にミトコンドリアで使用される酸素消費速度 (OCR) を測定し、候補薬添加時のミトコンドリア機能の評

価を行った。(A) ミトコンドリア機能評価試験のプロトコール。(B) 正常細胞と LS 患者 (LS^{ND3}) のミトコンドリア機能の比較結果。(C-F) 4 種類の候補薬 (#5: Apomorphine, #38: Olanzapine, #49: Phenthiazine, #226: Ethopropazine) 添加時の患者細胞におけるミトコンドリア機能の評価。

ここまでの一次スクリーニングおよび二次スクリーニングの結果から、我々は Apomorphine を治療薬の第一候補薬として、以後の検討を行った。

3.3 Apomorphine 添加時の患者細胞における細胞内 ROS および GSH

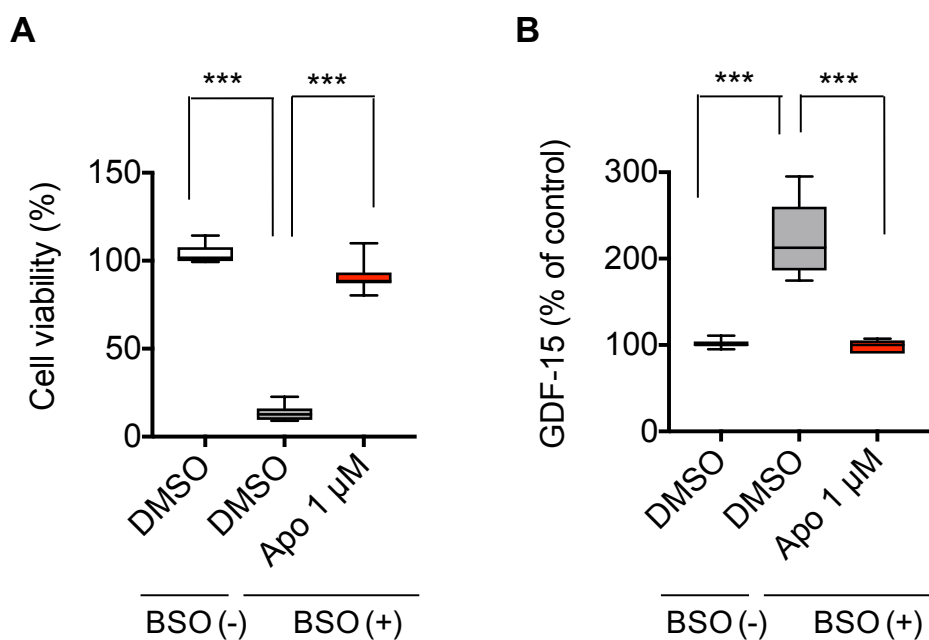
ROS 測定は、DMSO (0.1%) を対照とし、Apomorphine 10 nM、100 nM、および 1 μ M を添加した際の LS 患者線維芽細胞 (LS^{ND3}) の ROS レベルを H₂O₂ 処理下で測定した。Apomorphine は生細胞率アッセイにおける所見と同様に濃度依存性に抗酸化効果を示し、1 μ M の濃度では細胞 ROS レベルを有意に低下させた (図 10A)。一方、GSH を LS 患者線維芽細胞 (LS^{ND3}) に対して BSO 処理下で測定したところ、GSH レベルは BSO 処理下で濃度依存性に減少を示した (図 10B)。さらに、BSO 非添加および添加群 (200 μ M) を作成し、DMSO (0.1%) を添加した場合と、Apomorphine (1 μ M) を添加した際の GSH レベルを比較したところ、DMSO および Apomorphine 添加時の GSH レベルに関しては有意な変化はみられなかった (図 10C)。



(図 10) Apomorphine 添加時の患者細胞における細胞内 ROS および GSH
 (A) DMSO (0.1%) および Apomorphine (10 nM、100 nM、1 μM) を添加時の LS 患者由来の線維芽細胞 (LS^{ND3}) における細胞 ROS レベルを H₂O₂(1mM)処理下で測定した。(B) BSO 処理時 (0 μM、10 μM、100 μM、および 1mM) の患者細胞における GSH レベルを測定した。(C) BSO 非添加および添加 (200μM) 下で、DMSO (0.1%) および Apomorphine (1 μM) による GSH レベルへの影響を評価した。Apo; Apomorphine、** p < 0.01、NS; Not significant。

3.4 GDF-15 による Apomorphine の有効性の予測

ミトコンドリア病の診断および進行や治療効果予測のためのバイオマーカーである GDF-15 について (31)、我々は酸化ストレス負荷試験時の LS 患者の線維芽細胞 (LS^{ND3}) 培養培地中の GDF-15 レベルを測定した。BSO による酸化ストレス負荷により、患者細胞の生細胞率は約 10-20%に低下するが、Apomorphine 添加により生細胞率の改善を認めた (図 11A)。一方 GDF-15 レベルは、酸化ストレス負荷によって 2 倍近くに上昇するものの、Apomorphine の添加により有意に減少した (図 11B)。これらの結果から Apomorphine のミトコンドリア病への有効性が示唆された。



(図 11) GDF-15 に対する Apomorphine の効果

BSO による酸化ストレス負荷試験時の Apomorphine 添加時の患者細胞 (LS^{ND3}) 培養培地中の GDF-15 レベルを測定した。それぞれ BSO なし (左パネル)、BSO および 0.1%DMSO 共添加 (中央パネル)、BSO および Apomorphine 共添加 (右パネル) 群について評価した。(A) 酸化ストレス負荷試験時の生細胞率の比較。(B) 酸化ストレス負荷試験時の培養上清中の GDF-15 レベル。DMSO 群を対照として Student-*t* 検定により統計処理を行った。n = 4、Apo; Apomorphine、*** p < 0.001。

3.5 マイクロアレイによる Apomorphine 投与前後の遺伝子発現解析

これまでの結果から見出された #5: Apomorphine に関して、作用メカニズムを検討するため、Apomorphine 投与前後の遺伝子発現量の変化をマイクロアレイ発現解析により検討した。LS 患者細胞 (LS^{ND3}) に BSO (200 μ M) を添加し酸化ストレスを付与した群と、Apomorphine (1 μ M) を共添加した群を発現解析に用いた。グループ間の発現比率データを元に、シグナル強度に 2 倍以上発現差を認めた遺伝子を抽出した。Apomorphine 添加により発現低下していた遺伝子が 293 個、および発現上昇していた遺伝子が 148 個みられ、計 441 種類の Apomorphine 応答遺伝子が確認された。そのうち、共通して発現変化がみられていたシグナルや経路について検討した。Log₂ ratio は 1 の場合が 2 倍、2 の場合が 4 倍の発現変化を示す。発現が低下している遺伝子の中では、表 2A に示した通り 12 種の炎症や自然免疫に関わるサイトカイン、ケモカインの発現低下を認め、Apomorphine 添加による炎症抑制効果が示唆された。さらに、表 2B および図 12 に示した通り、13 種類の遺伝子発現が mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナル経路に関連する遺伝子であり、これらは mTOR シグナル経路を最終的に抑制する方向の発現変化を認めた。

(A) 炎症・自然免疫に関わるサイトカインやケモカイン関連遺伝子

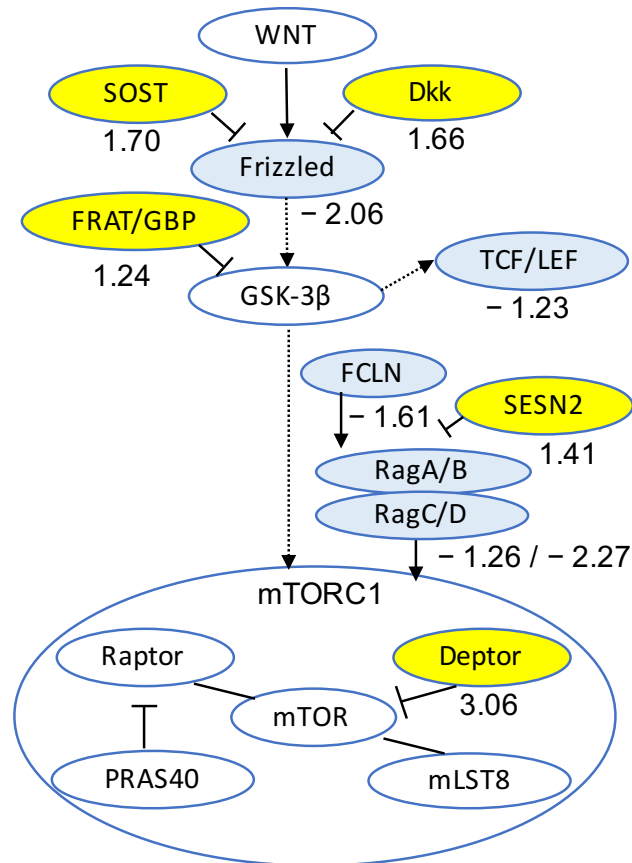
Log2 ratio between two groups	Gene Symbol	KEGG pathway
- 5.58	CSF3	
- 4.34	CXCL8	Autoimmune pathology
- 3.72	CXCL3	Neutrophil recruitment
- 2.68	CXCL2	Immunity to extracellular pathology
- 2.41	CCL7	
- 1.40	MMP1	
- 3.32	LIF	
- 2.98	CCL3	Inflammatory cytokine
- 1.77	IL24	
- 4.92	CCL19	Lymphoid-tissue homing
- 3.25	DUSP6	MARK signaling pathway
- 2.71	IL12A	Proinflammatory effects

(B) WNT-mTOR signaling pathway

Log2 ratio between two groups	Gene Symbol	KEGG pathway
- 1.23	LEF1	
- 2.06	FZD8	
1.66	DKK4	WNT signaling pathway
1.70	SOST	
1.24	FRAT/GBP	
- 1.61	FLCN	
- 1.37	CAB39L	
- 1.22	RPS6KA1	
- 1.26	RRAGC	mTOR signaling pathway
- 2.27	RRAGD	
1.41	SESN2	
3.06	DEPTOR	
4.19	PRR5	

(表 2) Apomorphine 投与前後のマイクロアレイ発現解析結果

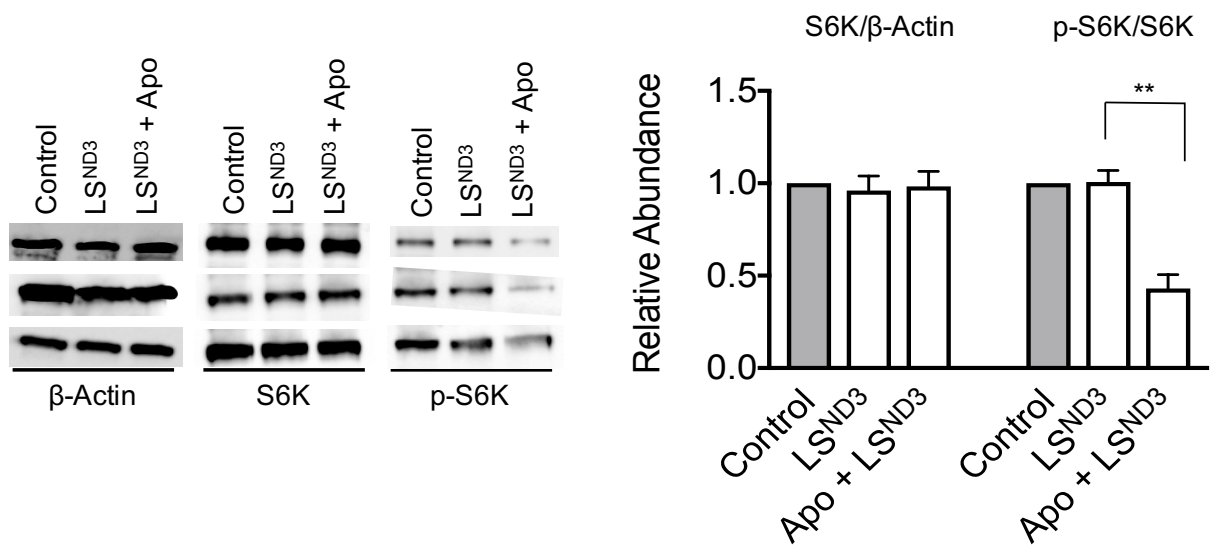
患者細胞 (LS^{ND3}) に Apomorphine 添加した際の遺伝子発現量の変化をマイクロアレイ分析で行った。計 441 種類の応答性遺伝子が同定され、(A) 2 倍以上の発現低下がみられた 12 種類の炎症および自然免疫に関連するサイトカインおよびケモカインに関連する遺伝子、(B) 2 倍以上の発現差を認めた WNT-mTOR シグナル伝達経路中の 13 個の遺伝子。



(図 12) mTOR シグナル伝達経路に関連すると考えられた遺伝子の略図
 数字は 2 つのグループ間の Log2 比の値を示す (Log2 比 1 は遺伝子発現の 2 倍
 の変化を示す)。色は遺伝子発現の増加または減少を表す (青、減少;黄、増
 加)。

3.6 患者細胞における Apomorphine の mTOR 活性への影響

マイクロアレイ解析により示された LS 患者細胞 (LS^{ND3}) における mTOR 活性
 阻害を評価するために、ウェスタンブロッティング法により mTOR 複合体の標的
 あるリボソームタンパク質 S6 キナーゼ (S6K) のリン酸化状態を評価した。ウエ
 スタンブロット法において、Apomorphine を添加した患者細胞における S6K のリ
 ン酸化は、未添加の患者線維芽細胞と比較して有意に減少を認めた (図 13)。これ
 らの結果は、Apomorphine が mTOR1 活性を抑制することを示しており、マイクロ
 アレイ発現分析の結果を支持する内容を示した。



(図 13) Apomorphine 添加時の mTOR 活性への影響

S6K のリン酸化(p-S6K)によって示される mTOR 活性を、LS 患者由来の線維芽細胞 (LS^{ND3}) において、Apomorphine の添加による影響をウエスタンブロット法により評価した。健常皮膚線維芽細胞を Control として使用した。n = 3、Apo; Apomorphine、** p < 0.01。

4. 考察

ミトコンドリア病では細胞内の酸化ストレス増加や ATP 産生の減少が細胞死に関わる (1,33,34)。本研究では、ミトコンドリア病の治療薬探索にしばしば用いられている BSO を使用した細胞生存アッセイを実施した (25,26,30)。これまでにこのアッセイ系で CNS に特化した薬剤ライブラリに対して行われたスクリーニングの報告はない。こうした公知の薬剤からなる本ライブラリは、全ての薬剤が生物学的利用能や安全性がヒトで確認され、脳血液関門を通過できるという利点を持つ。すでにヒトで特性の確認された化合物は、治験が容易であり、開発経費が安価で、臨床薬として承認される可能性が高い (14)。我々はこのライブラリを用い、本研究において、酸化ストレス負荷条件下で細胞保護効果を示す有望な薬剤として 4 つの薬剤 (#5: Apomorphine, #38: Olanzapine, #49: Phenothiazine, #226: Ethopropazine) を見出した。その中では EC₅₀ の値からは Apomorphine が最も有効と考えられ、4 系統の線維芽細胞のいずれに対してもほぼ完全に細胞死からの保護を示した。そして第二次スクリーニングとして、これらの候補薬で処置を行った LS 患者の線維芽細胞 (LS^{ND3}) を使用してミトコンドリア機能を調べた。その中で、#5: Apomorphine のみが細胞外フラックスアナライザーで測定した全 4 種の評価指標の OCR 値の有意な改善を認めた。これらの結果は Apomorphine が酸化ストレスに対する細胞保護効果とともに、細胞内ミトコンドリア呼吸鎖活性を改善することを示唆する。さらにミトコンドリア病のバイオマーカーである GDF-15 が Apomorphine の投与により有意に減少したことからも、ミトコンドリア病に対する有効性が示唆された。

また、Apomorphine が BSO による酸化ストレスの有無にかかわらず、患者細胞

の GSH レベルにほとんど影響を与えなかったことから、Apomorphine が示す細胞保護効果は GSH レベルの改善や維持によるものではないことを示した。

Apomorphine は特にドパミン D2 受容体に親和性を有する広域ドパミンアゴニストとして知られており、パーキンソン病 (Parkinson's Disease: PD) や勃起障害 (Erectile Dysfunction: ED) に対して使用されている治療薬である (35-37)。通常、進行した PD 患者のオフ現象に対するレスキュー薬として単回投与で追加される (35,38)。我々の酸化ストレス負荷テストでは、薬剤ライブラリに含まれる他のドパミンアゴニストである #192: Ropinirole hydrochloride および #243: Pramipexole dihydrochloride は細胞保護効果を示さなかったことから、Apomorphine の酸化ストレスに対する細胞保護効果はドパミンアゴニスト作用とは独立した効果ではないかと推測された。また近年、Apomorphine の持続皮下投与がパーキンソン病の運動症状のみならず、脳グルコース代謝や非運動症状 (認知機能、実行機能や Apathy) をも改善させることが報告されたが、詳細な作用機序については明らかになっていない。一方、ミトコンドリア機能障害はパーキンソン病においても主要な病態生理の一つであり、治療ターゲットとして研究されてきた (39-43)。こうした背景から、ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞に対してみられた細胞保護作用が、PD 患者で報告されている有効性に寄与している可能性がある。

続いて、我々は、マイクロアレイ遺伝子発現分析によってこの新しい生物活性に関連した作用機序を調べた。結果として、多くの炎症性ケモカインとサイトカインが Apomorphine 投与により下方制御されることが示された。さらに、mTOR シグナル経路におけるいくつかの遺伝子の発現で mTOR 活性を抑制する方向への変化が確認され、ウエスタンブロット法による mTOR 活性を標的とした S6K のリン酸化

が抑制される結果が示された。mTOR は酵母からヒトまで保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、Wnt シグナル、サイトカインなどの細胞内情報伝達系で、成長因子やアミノ酸、ストレスなど細胞の内外からのさまざまなシグナルを感知し、細胞の増殖分化、代謝、生存など多彩な機能を担っている(44)。mTOR 経路の特異的阻害剤であるラパマイシンは結節性硬化症などでの腫瘍増殖抑制効果が示されてきた。さらに、ラパマイシンは LS のモデルマウスである *Ndufs4*^{-/-}マウスにおいて、生存期間と疾患進行を改善することが報告され、mTOR 抑制はミトコンドリア病患者に治療的な有益性があることが示されている(45)。mTOR 複合体 1 はリボソームタンパク質 S6 キナーゼや 4E-BP を介して翻訳を促進し、転写因子を介して転写を制御し、オートファジーを抑制している。また mTOR 複合体 1 の下流のタンパク質は、代謝酵素の活性や発現を制御することにより、細胞の増殖分化や糖・脂質代謝、タンパク質の生合成のみならず、ミトコンドリアの形態や活性にも影響を及ぼす (44-46)。このことから、mTOR 活性に対する抑制効果は、Apomorphine の細胞死抑制効果や ATP 産生能上昇を説明しうるが、今後より詳細な分子機構の解明を行いたい。また LS のモデルマウスである *Ndufs4*^{-/-}マウスにおいて、全身性に炎症が惹起され、神経病変の形成にも炎症が関与することが予想されており(47)、我々が見出したマイクロアレイでの炎症性サイトカインや自然免疫に対する抑制効果が、BSO 下の細胞死抑制に関わる可能性がある。また発現低下している分子には ERK-MARK 系の DUSP6 が含まれ、Apomorphine の mTOR 系抑制作用の他、ERK-MARK 系との相互作用も今後の検討課題である(47-49)。また、Apomorphine は、10 μ M 以上の濃度では 6-OHDA によって誘発された細胞死から神経 SH-SY5Y 細胞を保護することや、PD およびアルツハイマー病のモデルマウスにおいて *Nrf2*-

ARE 経路を通して保護作用を持つことが既に示されている (50-52)。しかしながら、我々の行った、BSO によって誘発された酸化ストレス状態の下でのマイクロアレイ発現解析では、Nrf2-ARE シグナリング経路と関連した遺伝子の発現における有意な変化を見いだすことができなかった。先行報告と、我々の検討では使用する細胞や細胞死誘導法が異なっており、異なる経路が細胞死抑制効果の候補として示されたと考えられる。しかしながら我々の見いだした BSO 投与下での保護作用は EC₅₀ は 88 nM であり、強固な効力を示した。

今後は BSO による酸化ストレスに対する保護作用のターゲット分子を、蛋白レベルでの解析により明らかにし Apomorphine によるミトコンドリア病細胞保護機構のメカニズムを見出し、新規のミトコンドリア病治療薬への開発につなげたい。

結論として、我々は、Apomorphine が酸化ストレスの下で細胞死から患者皮膚由来の線維芽細胞を救済すること、およびミトコンドリア呼吸活性を改善することを見出した。Apomorphine は PD における既承認薬であることから、今後臨床治験をへて、LS, MELAS 患者に対する有効性と安全性を検証し、ミトコンドリア病治療薬としての承認につなげたいと考える。

5. おわりに

今回の研究により、有望な薬剤として **Apomorphine** を見出した。酸化ストレス負荷テストおよびミトコンドリア機能の評価試験の結果から、**Apomorphine** は酸化ストレスに対する細胞保護効果を有するとともに、ミトコンドリア機能を改善する薬剤であると考えられた。さらにマイクロアレイおよびウエスタンブロット法の結果から **Apomorphine** の添加によって有意な発現変化を示した炎症免疫や **mTOR** シグナル経路に関与する遺伝子は、ミトコンドリア機能に関連している可能性が示唆された。この薬剤はすでに他の目的で中枢神経治療薬として用いられているため、迅速に治験実施につなげることが可能と考える。既に特許は国内・PCT 出願を終了しており、ミトコンドリア病モデルマウスで POC 検証試験を行ったのち、治験実施を目指す。また **Apomorphine** の結合蛋白とその下流の細胞保護メカニズムを見出すことにより、新しいミトコンドリア病治療薬のターゲットを示したい。

6. 参考文献

1. Vafai, S. B., and Mootha, V. K. (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* **491**, 374-383
2. Chinnery, P. F. (1993) Mitochondrial Disorders Overview. in *GeneReviews((R))* (Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J. H., Stephens, K., and Amemiya, A. eds.), Seattle (WA). pp
3. Pieczenik, S. R., and Neustadt, J. (2007) Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol* **83**, 84-92
4. Elliott, H. R., Samuels, D. C., Eden, J. A., Relton, C. L., and Chinnery, P. F. (2008) Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet* **83**, 254-260
5. Chi, C. S. (2015) Diagnostic approach in infants and children with mitochondrial diseases. *Pediatr Neonatol* **56**, 7-18
6. Koga, Y. (2010) [Diagnosis and treatment of mitochondrial myopathy--update review]. *No To Hattatsu* **42**, 124-129
7. Baertling, F., Rodenburg, R. J., Schaper, J., Smeitink, J. A., Koopman, W. J., Mayatepek, E., Morava, E., and Distelmaier, F. (2014) A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **85**, 257-265
8. Sofou, K., De Coo, I. F., Isohanni, P., Ostergaard, E., Naess, K., De Meirleir, L., Tzoulis, C., Uusimaa, J., De Angst, I. B., Lonnqvist, T., Pihko, H., Mankinen, K., Bindoff, L. A., Tulinius, M., and Darin, N. (2014) A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival. *Orphanet J Rare Dis* **9**, 52

9. El-Hattab, A. W., Adesina, A. M., Jones, J., and Scaglia, F. (2015) MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab* **116**, 4-12
10. Yatsuga, S., Povalko, N., Nishioka, J., Katayama, K., Kakimoto, N., Matsuishi, T., Kakuma, T., Koga, Y., and Taro Matsuoka for, M. S. G. i. J. (2012) MELAS: a nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 619-624
11. Cheldi, A., Ronchi, D., Bordoni, A., Bordo, B., Lanfranconi, S., Bellotti, M. G., Corti, S., Lucchini, V., Sciacco, M., Moggio, M., Baron, P., Comi, G. P., Colombo, A., Bersano, A., and Lombardia, G. c. (2013) POLG1 mutations and stroke like episodes: a distinct clinical entity rather than an atypical MELAS syndrome. *BMC Neurol* **13**, 8
12. El-Hattab, A. W., Zarante, A. M., Almannai, M., and Scaglia, F. (2017) Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Mol Genet Metab* **122**, 1-9
13. Lyseng-Williamson, K. A. (2016) Idebenone: A Review in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Drugs* **76**, 805-813
14. Varbanov, H. P., Kuttler, F., Banfi, D., Turcatti, G., and Dyson, P. J. (2017) Repositioning approved drugs for the treatment of problematic cancers using a screening approach. *PLoS One* **12**, e0171052
15. Streck, E. L., Czapski, G. A., and Goncalves da Silva, C. (2013) Neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 826046
16. Stoilov, P., Lin, C. H., Damoiseaux, R., Nikolic, J., and Black, D. L. (2008) A

- high-throughput screening strategy identifies cardiogenic steroids as alternative splicing modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11218-11223
17. Porotto, M., Orefice, G., Yokoyama, C. C., Mungall, B. A., Realubit, R., Sganga, M. L., Aljofan, M., Whitt, M., Glickman, F., and Moscona, A. (2009) Simulating henipavirus multicycle replication in a screening assay leads to identification of a promising candidate for therapy. *J Virol* **83**, 5148-5155
 18. Polireddy, K., Khan, M. M., Chavan, H., Young, S., Ma, X., Waller, A., Garcia, M., Perez, D., Chavez, S., Strouse, J. J., Haynes, M. K., Bologna, C. G., Oprea, T. I., Tegos, G. P., Sklar, L. A., and Krishnamurthy, P. (2012) A novel flow cytometric HTS assay reveals functional modulators of ATP binding cassette transporter ABCB6. *PLoS One* **7**, e40005
 19. Shrader, W. D., Amagata, A., Barnes, A., Enns, G. M., Hinman, A., Jankowski, O., Kheifets, V., Komatsuzaki, R., Lee, E., Mollard, P., Murase, K., Sadun, A. A., Thoolen, M., Wesson, K., and Miller, G. (2011) alpha-Tocotrienol quinone modulates oxidative stress response and the biochemistry of aging. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 3693-3698
 20. Danhauser, K., Smeitink, J. A., Freisinger, P., Sperl, W., Sabir, H., Hadzik, B., Mayatepek, E., Morava, E., and Distelmaier, F. (2015) Treatment options for lactic acidosis and metabolic crisis in children with mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis* **38**, 467-475
 21. Schaffer, S. W., Jong, C. J., Warner, D., Ito, T., and Azuma, J. (2013) Taurine deficiency and MELAS are closely related syndromes. *Adv Exp Med Biol* **776**, 153-165
 22. Kouga, T., Takagi, M., Miyauchi, A., Shimbo, H., Iai, M., Yamashita, S.,

- Murayama, K., Klein, M. B., Miller, G., Goto, T., and Osaka, H. (2018) Japanese Leigh syndrome case treated with EPI-743. *Brain Dev* **40**, 145-149
23. Miyauchi, A., Osaka, H., Nagashima, M., Kuwajima, M., Monden, Y., Kohda, M., Kishita, Y., Okazaki, Y., Murayama, K., Ohtake, A., and Yamagata, T. (2018) Leigh syndrome with spinal cord involvement due to a hemizygous NDUFA1 mutation. *Brain Dev* **40**, 498-502
24. Hatakeyama, H., Katayama, A., Komaki, H., Nishino, I., and Goto, Y. (2015) Molecular pathomechanisms and cell-type-specific disease phenotypes of MELAS caused by mutant mitochondrial tRNA(Trp). *Acta Neuropathol Commun* **3**, 52
25. Arce, P. M., Khmour, O. M., Goldschmidt, R., Armstrong, J. S., and Hecht, S. M. (2011) A Strategy for Suppressing Redox Stress within Mitochondria. *ACS Med Chem Lett* **2**, 608-613
26. Enns, G. M., Kinsman, S. L., Perlman, S. L., Spicer, K. M., Abdenur, J. E., Cohen, B. H., Amagata, A., Barnes, A., Kheifets, V., Shrader, W. D., Thoolen, M., Blankenberg, F., and Miller, G. (2012) Initial experience in the treatment of inherited mitochondrial disease with EPI-743. *Mol Genet Metab* **105**, 91-102
27. Suzuki, T., Yamaguchi, H., Kikusato, M., Matsubishi, T., Matsuo, A., Sato, T., Oba, Y., Watanabe, S., Minaki, D., Saigusa, D., Shimbo, H., Mori, N., Mishima, E., Shima, H., Akiyama, Y., Takeuchi, Y., Yuri, A., Kikuchi, K., Toyohara, T., Suzuki, C., Kohzaki, M., Anzai, J., Mano, N., Kure, S., Yanagisawa, T., Tomioka, Y., Toyomizu, M., Ito, S., Osaka, H., Hayashi, K.,

- and Abe, T. (2015) Mitochonic Acid 5 (MA-5), a Derivative of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid, Improves Survival of Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Diseases. *Tohoku J Exp Med* **236**, 225-232
28. Pelletier, M., Billingham, L. K., Ramaswamy, M., and Siegel, R. M. (2014) Extracellular flux analysis to monitor glycolytic rates and mitochondrial oxygen consumption. *Methods Enzymol* **542**, 125-149
29. Dranka, B. P., Benavides, G. A., Diers, A. R., Giordano, S., Zelickson, B. R., Reily, C., Zou, L., Chatham, J. C., Hill, B. G., Zhang, J., Landar, A., and Darley-Usmar, V. M. (2011) Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med* **51**, 1621-1635
30. Matsushashi, T., Sato, T., Kanno, S. I., Suzuki, T., Matsuo, A., Oba, Y., Kikusato, M., Ogasawara, E., Kudo, T., Suzuki, K., Ohara, O., Shimbo, H., Nanto, F., Yamaguchi, H., Saigusa, D., Mukaiyama, Y., Watabe, A., Kikuchi, K., Shima, H., Mishima, E., Akiyama, Y., Oikawa, Y., Hsin-Jung, H. O., Akiyama, Y., Suzuki, C., Uematsu, M., Ogata, M., Kumagai, N., Toyomizu, M., Hozawa, A., Mano, N., Owada, Y., Aiba, S., Yanagisawa, T., Tomioka, Y., Kure, S., Ito, S., Nakada, K., Hayashi, K. I., Osaka, H., and Abe, T. (2017) Mitochonic Acid 5 (MA-5) Facilitates ATP Synthase Oligomerization and Cell Survival in Various Mitochondrial Diseases. *EBioMedicine* **20**, 27-38
31. Yatsuga, S., Fujita, Y., Ishii, A., Fukumoto, Y., Arahata, H., Kakuma, T., Kojima, T., Ito, M., Tanaka, M., Saiki, R., and Koga, Y. (2015) Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann Neurol* **78**, 814-823
32. Novoradovskaya, N., Whitfield, M. L., Basehore, L. S., Novoradovsky, A.,

- Pesich, R., Usary, J., Karaca, M., Wong, W. K., Aprelikova, O., Fero, M., Perou, C. M., Botstein, D., and Braman, J. (2004) Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments. *BMC Genomics* **5**, 20
33. Schapira, A. H. (2012) Mitochondrial diseases. *Lancet* **379**, 1825-1834
34. Duchen, M. R., and Szabadkai, G. (2010) Roles of mitochondria in human disease. *Essays Biochem* **47**, 115-137
35. Stacy, M., and Silver, D. (2008) Apomorphine for the acute treatment of "off" episodes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **14**, 85-92
36. Hsieh, G. C., Hollingsworth, P. R., Martino, B., Chang, R., Terranova, M. A., O'Neill, A. B., Lynch, J. J., Moreland, R. B., Donnelly-Roberts, D. L., Kolasa, T., Mikusa, J. P., McVey, J. M., Marsh, K. C., Sullivan, J. P., and Brioni, J. D. (2004) Central mechanisms regulating penile erection in conscious rats: the dopaminergic systems related to the proerectile effect of apomorphine. *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 330-338
37. Millan, M. J., Maiofiss, L., Cussac, D., Audinot, V., Boutin, J. A., and Newman-Tancredi, A. (2002) Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 791-804
38. Jenner, P., and Katzenschlager, R. (2016) Apomorphine - pharmacological properties and clinical trials in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **33 Suppl 1**, S13-S21
39. Franco-Iborra, S., Vila, M., and Perier, C. (2018) Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative Diseases: Focus on Parkinson's Disease and

- Huntington's Disease. *Front Neurosci* **12**, 342
40. Park, J. S., Davis, R. L., and Sue, C. M. (2018) Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep* **18**, 21
 41. Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J. B., and Marsden, C. D. (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* **1**, 1269
 42. van der Walt, J. M., Nicodemus, K. K., Martin, E. R., Scott, W. K., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Haines, J. L., Koller, W. C., Lyons, K., Pahwa, R., Stern, M. B., Colcher, A., Hiner, B. C., Jankovic, J., Ondo, W. G., Allen, F. H., Jr., Goetz, C. G., Small, G. W., Mastaglia, F., Stajich, J. M., McLaurin, A. C., Middleton, L. T., Scott, B. L., Schmechel, D. E., Pericak-Vance, M. A., and Vance, J. M. (2003) Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **72**, 804-811
 43. Hauser, D. N., and Hastings, T. G. (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis* **51**, 35-42
 44. Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274-293
 45. Johnson, S. C., Yanos, M. E., Kayser, E. B., Quintana, A., Sangesland, M., Castanza, A., Uhde, L., Hui, J., Wall, V. Z., Gagnidze, A., Oh, K., Wasko, B. M., Ramos, F. J., Palmiter, R. D., Rabinovitch, P. S., Morgan, P. G., Sedensky, M. M., and Kaeberlein, M. (2013) mTOR inhibition alleviates mitochondrial

- disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science* **342**, 1524-1528
46. Morita, M., Gravel, S. P., Chenard, V., Sikstrom, K., Zheng, L., Alain, T., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., McLaughlan, S., Nouet, Y., Pause, A., Pollak, M., Gottlieb, E., Larsson, O., St-Pierre, J., Topisirovic, I., and Sonenberg, N. (2013) mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab* **18**, 698-711
 47. Jin, Z., Wei, W., Yang, M., Du, Y., and Wan, Y. (2014) Mitochondrial complex I activity suppresses inflammation and enhances bone resorption by shifting macrophage-osteoclast polarization. *Cell Metab* **20**, 483-498
 48. Sliter, D. A., Martinez, J., Hao, L., Chen, X., Sun, N., Fischer, T. D., Burman, J. L., Li, Y., Zhang, Z., Narendra, D. P., Cai, H., Borsche, M., Klein, C., and Youle, R. J. (2018) Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature* **561**, 258-262
 49. Newman, L. E., and Shadel, G. S. (2018) Pink1/Parkin link inflammation, mitochondrial stress, and neurodegeneration. *J Cell Biol* **217**, 3327-3329
 50. Castri, P., Busceti, C., Battaglia, G., Girardi, F., Cavallari, M., Orzi, F., and Fornai, F. (2006) Protection by apomorphine in two independent models of acute inhibition of oxidative metabolism in rodents. *Clin Exp Hypertens* **28**, 387-394
 51. Hara, H., Ohta, M., and Adachi, T. (2006) Apomorphine protects against 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death through activation of the Nrf2-ARE pathway. *J Neurosci Res* **84**, 860-866
 52. Himeno, E., Ohyagi, Y., Ma, L., Nakamura, N., Miyoshi, K., Sakae, N.,

Motomura, K., Soejima, N., Yamasaki, R., Hashimoto, T., Tabira, T., LaFerla, F. M., and Kira, J. (2011) Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid-beta degradation. *Ann Neurol* **69**, 248-256

7. 謝辞

本研究の遂行、論文作成にあたり直接の御指導および御総括を頂きました自治医科大学小児科学主任教授 山形崇倫先生、小児科学教授 小坂 仁先生に深謝致します。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御指導を頂きました。検体収集、細胞培養や RNA 抽出等にご協力頂きました小児科学研究補助員 青木志保様、大美賀成実様、渡邊美有紀様、大山友美様に深謝申し上げます。

また、東北大学大学院医工学研究科・分子病態医工学・病態液性制御学 教授 阿部高明先生には、本研究の遂行、論文作成に加えてミトコンドリア病治療全般の最近の知見について、同 松橋徹郎先生には実験方法に関して御指導を賜りました。

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。

ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞を用いた
中枢神経薬剤ライブラリのスクリーニングと新規候補治療薬の探索

宮内彰彦