

5-アミノレブリン酸とクエン酸第一鉄による ミトコンドリア病に対する酵素強化療法の開発

令和元年 7月 23日
千葉県こども病院
千葉県がんセンター(研究所)
埼玉医科大学
順天堂大学

千葉県こども病院遺伝診療センター・代謝科/千葉県がんセンター研究所の研究グループ、埼玉医科大学、順天堂大学は、2007年から共同で、創薬を見据えたミトコンドリア病の診断・研究を進めてきました。

これまでミトコンドリア病には根本的治療法はなく、対症療法しかありませんでしたが、今回、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) 及びクエン酸第一鉄 (SFC) がミトコンドリア病の患者由来皮膚線維芽細胞において、ミトコンドリア機能を改善させることを世界で初めて明らかにしました。

現在国内では本グループを中心に、ミトコンドリア病の1つである Leigh 脳症患者に対する 5-ALA/SFC を用いた医師主導治験も進められています。

この度、本研究成果が Nature Publishing Group の科学雑誌『Scientific Reports』に掲載されましたので報告いたします。

論文発表日：令和元年 7月 22日 (月) 18時 (現地時間 7月 22日午前 10時)
(Scientific Reports)

■概要■

ミトコンドリア病は、遺伝子異常によりミトコンドリア呼吸鎖酵素の働きが低下し、その結果体の中でエネルギーとなる ATP の産生が低下する疾患です。

5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は鉄と結合することで、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II, III, IV, およびシトクローム C の構成要素であるヘムになります。動物を対象として行われた実験では、COX 活性や ATP 産生量の増加、呼吸鎖酵素複合体の発現量を増加させることなどが報告されており、5-ALA + 鉄剤は、ミトコンドリア病の治療薬としてその効果が期待されていました。

我々は、AMED 村山班によって構築されたミトコンドリア病診断システムによりミトコンドリア病と診断された患者由来皮膚線維芽細胞を用いて、5-ALA 及びクエン酸第一鉄ナトリウム (SFC) の効果を検証した結果、5-ALA+SFC により呼吸鎖複合体 I~IV 及びヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現亢進、ミトコンドリア酸素消費量や ATP 産生量、mtDNA コピー数の有意な増加が起こることを明らかにしました。

HO-1 はミトコンドリアの品質管理や生合成にも関与することが知られており、HO-1 の発現亢進がミトコンドリア生合成を促すことで mtDNA コピー数が増加し、直接ヘムがその構成に関与しない呼吸鎖複合体 I も含め各呼吸鎖複合体の発現が亢進したものと推測されました。

今回の研究結果は、ミトコンドリア病において、残存するミトコンドリア呼吸鎖酵素を強化することでミトコンドリア機能を改善させる「酵素強化療法」、すなわち根本治療としての有用性を示唆するものです。現在、ミトコンドリア病である Leigh 脳症を中心として、本薬剤(5-ALA+SFC)を用いた医師主導治験が進行中であり、ミトコンドリア病の新しい治療薬として大いに期待されます。

■発表のポイント■

•ミトコンドリア病*¹ の患者由来皮膚線維芽細胞を用いて、5-アミノレブリン酸(5-ALA)*² とクエン酸第一鉄ナトリウム(SFC)*³ の効果を検証し、ミトコンドリア機能を改善させることを世界で初めて証明し、科学雑誌『Scientific Reports』に報告しました。

•5-ALA+SFC によりミトコンドリア呼吸鎖複合体*⁴Ⅰ~Ⅳの発現亢進、ミトコンドリア酸素消費量や ATP 産生量の有意な増加、および酸化ストレスの軽減に關与するヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)*⁵ の発現が亢進しました。さらにミトコンドリア DNA(mtDNA)*⁶ のコピー数が増加することも確認されました。

•今回の研究結果は、5-ALA+SFC がミトコンドリア病において、残存するミトコンドリア呼吸鎖酵素を強化することでミトコンドリア機能を改善させる、「酵素強化療法」としての有用性を示唆するものです。

•5-ALA+SFC は既にミトコンドリア病の一病型である Leigh 脳症の患者さんを中心に医師主導型治験が進行しており、その成果が期待されます。

■研究の背景■

千葉県こども病院遺伝診療センター・代謝科/千葉県がんセンター研究所の研究グループ(代表 村山圭)は、2007 年から埼玉医科大学小児科(大竹明 教授)、順天堂大学難病の診断と治療研究センター(岡崎康司 教授・センター長)と共同で、創薬を見据えたミトコンドリア病の診断・研究を進めてきました。我々はミトコンドリア病の生化学的診断だけでなく、新規病因遺伝子を多数同定・報告し、それらのレジストリシステムを構築することで、本邦におけるミトコンドリア病診療の基盤構築に寄与してきました。しかしながら治療に関しては、これまで十分なエビデンスをもつ根本的治療法はなく、対症療法しかありませんでした。

5-ALA はもともと生体内に存在する天然のアミノ酸の一種であり、生体においてはポルフィリンの前駆体として働いています。外因性に投与された 5-ALA は全身の細胞内に取り込まれ、いくつかの酵素反応を経て代謝されると最終的にヘムとなり、ミトコンドリア呼吸鎖複合体活性を上昇、ATP 産生量を増加させることが、各種動物実験で証明されています。また癌細胞においては 5-ALA がヘムにまで代謝されず、その前駆物質が蓄積しやすいという性質を利用して、癌の診断領域では既に実用化がされています。

今回我々は AMED 村山班の構築した診断システムより診断された、ミトコンドリア病の患者由来皮膚線維芽細胞を用いて、5-ALA および SFC の効果を検証し、ミトコンドリア酸素消費量や ATP 産生量等を指標としたミトコンドリア機能を改善させることを明らかにしました。

■概要■

ミトコンドリア病は、遺伝子異常によりミトコンドリア呼吸鎖酵素の活性が低下し、その結果、体の中でエネルギーとなるATPの産生量が低下し、多彩な臨床症状を呈する疾患です。5-ALAはSFCと結合することで、ミトコンドリア呼吸鎖複合体II, III, IV、およびシトクロームCの構成要素となるヘムになります(図1)。

動物を対象とした実験では、5-ALA+SFCがCOX活性やATP産生量の増加、呼吸鎖複合体の発現量を増加させるなど、ミトコンドリア機能を改善させることや、抗酸化・抗炎症作用を有するヘムの分解酵素であるHO-1の発現も亢進させることが報告されていました。それゆえ、5-ALA+SFCはミトコンドリア病の治療薬としてその効果が期待されていました。

今回我々は、ミトコンドリア病の患者由来皮膚線維芽細胞を用いて、5-ALA、SFC単独投与および5-ALA+SFCの効果を検証しました。5-ALA+SFCは、5-ALA、SFC単独投与と比較し、有意に呼吸鎖複合体I~IV、HO-1の発現を亢進させ、ミトコンドリア酸素消費量、ATP産生量を増加させることが明らかになりました。さらにmtDNAのコピー数が増加することも確認されました。本研究結果をNature Publishing Groupの科学雑誌『Scientific Reports』に報告いたしました。

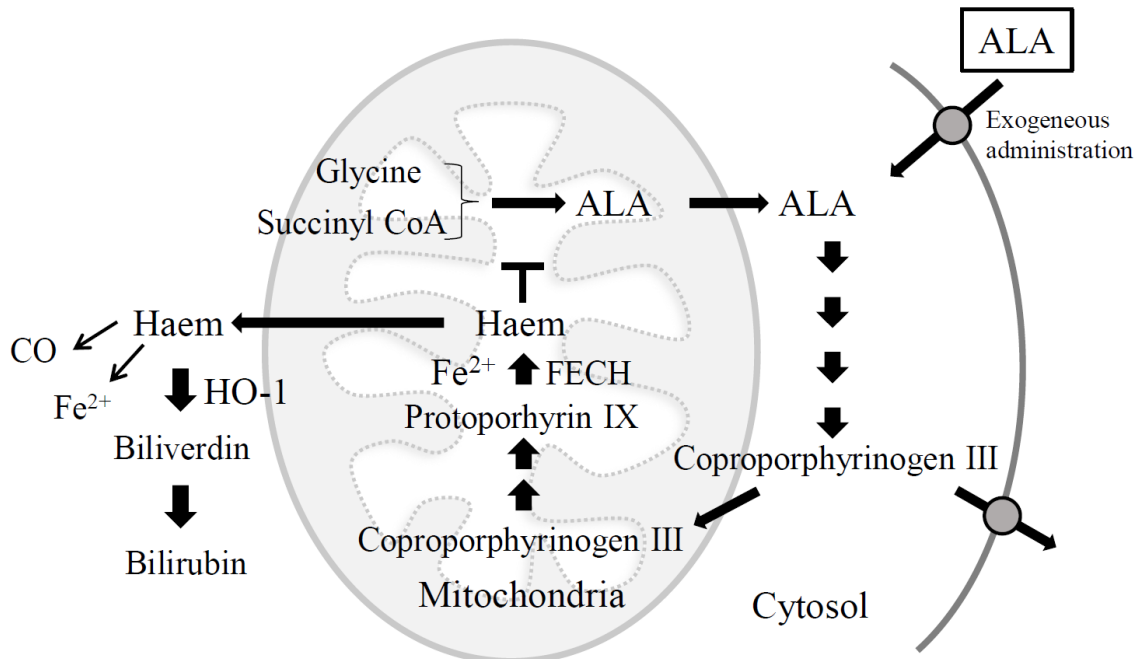


図1. ヘム合成経路

■対象・方法■

正常皮膚線維芽細胞と、以下の 8 例のミトコンドリア病患者由来線維芽細胞を対象とした (表 1)。まず始めに、正常細胞において 5-ALA (50, 100, 200 μ M)、SFC (25, 50, 100 μ M) および 5-ALA+SFC (50/25, 100/50, 200/100 μ M) を添加した培地を用いて 2 日毎に培地交換、計 10 日間培養を行い、OXPHOS 関連蛋白・遺伝子発現、ミトコンドリア酸素消費量、ATP 産生量、HO-1 発現、mtDNA コピー数の解析を行いました。ミトコンドリア病患者由来細胞は 5-ALA+SFC 含有培地 (50/25, 100/50, 200/100 μ M) で、同様の培養を行った後に各解析を行いました。

表 1 ミトコンドリア病の患者プロフィール

No.	ID	性別	発症年齢	臨床診断	障害酵素	原因遺伝子
1	Pt25	女	5 ヶ月	IMD	I	<i>ACAD9</i>
2	Pt27	男	1 歳	LS	IV	<i>SURF1</i>
3	Pt67	男	0 日	IMD	I	<i>NDUFB11</i>
4	Pt100	男	8 ヶ月	ND	I	<i>NDUFV2</i>
5	Pt101	男	11 ヶ月	LS	I	<i>NDUFAF6</i>
6	Pt276	男	1 歳 11 ヶ月	MH	I+IV	<i>MRPS23</i>
7	Pt346	女	0 日	IMD	I	<i>ECHS1</i>
8	Pt1177	女	9 ヶ月	LS	I	<i>NDUFV2</i>

IMD: 乳児ミトコンドリア病, LS: Leigh 脳症, ND: 神経変性疾患, MH: ミトコンドリア肝症

■正常線維芽細胞における 5-ALA, SFC, 5-ALA+SFC の効果の検証■

正常線維芽細胞を用いて、5-ALA、SFC、5-ALA+SFC が OXPHOS 関連蛋白・遺伝子に与える効果を検証しました。NDUFB8 (complex I), UQCRC2 (complex III), MTCO1 (complex IV) の蛋白の発現は、5-ALA+SFC 含有培地でのみ亢進していました (図 2)。NDUFB8 (complex I), SDHB (complex II), UQCRC2 (complex III), COX7A2 (complex IV) 遺伝子発現量は 5-ALA+SFC の濃度依存性に増加していました。

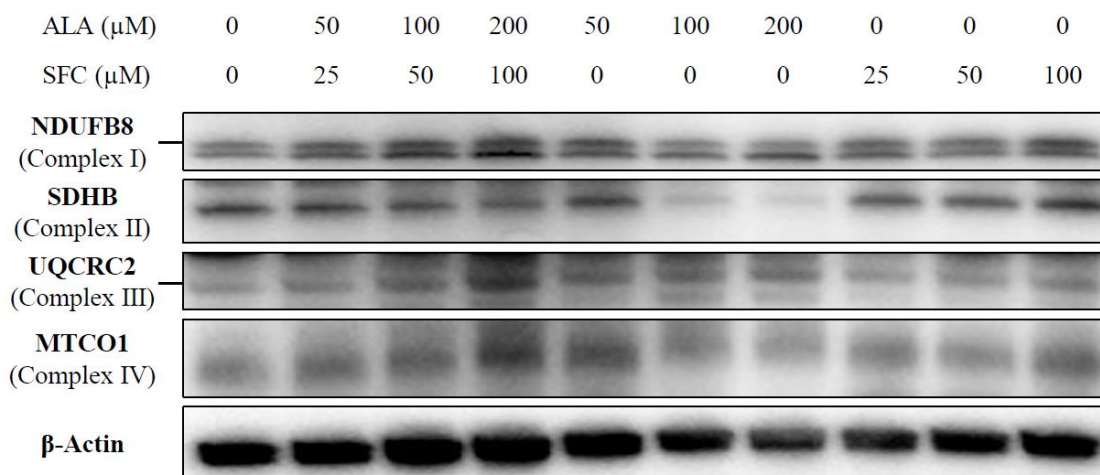


図 2. 正常細胞における OXPHOS 関連蛋白の発現

続いて、5-ALA、SFC、5-ALA+SFC 含有培地で培養した正常細胞におけるミトコンドリア酸素消費量、ATP 産生量を測定しました。酸素消費量は全ての培地において、コントロール (5-ALA、SFC、5-ALA+SFC 添加なし) と比較して上昇を認めましたが、最大酸素消費量 (MRR) で比較してみると、5-ALA+SFC 含有培地 (200/100μM) で最も有意に酸素消費量が増加することが分かりました (図 3)。また、ATP 産生量は SFC 単独では増加せず 5-ALA+SFC (200/100μM) において最も増加することが確認されました。

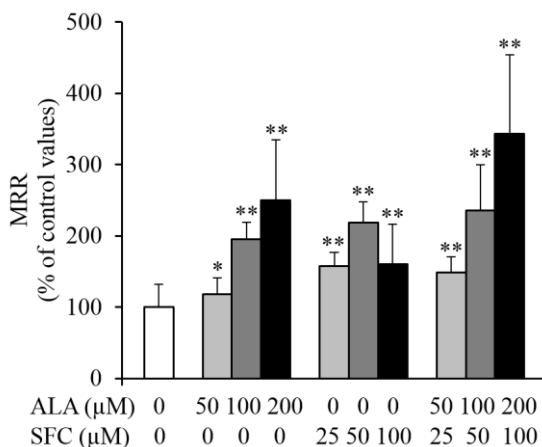
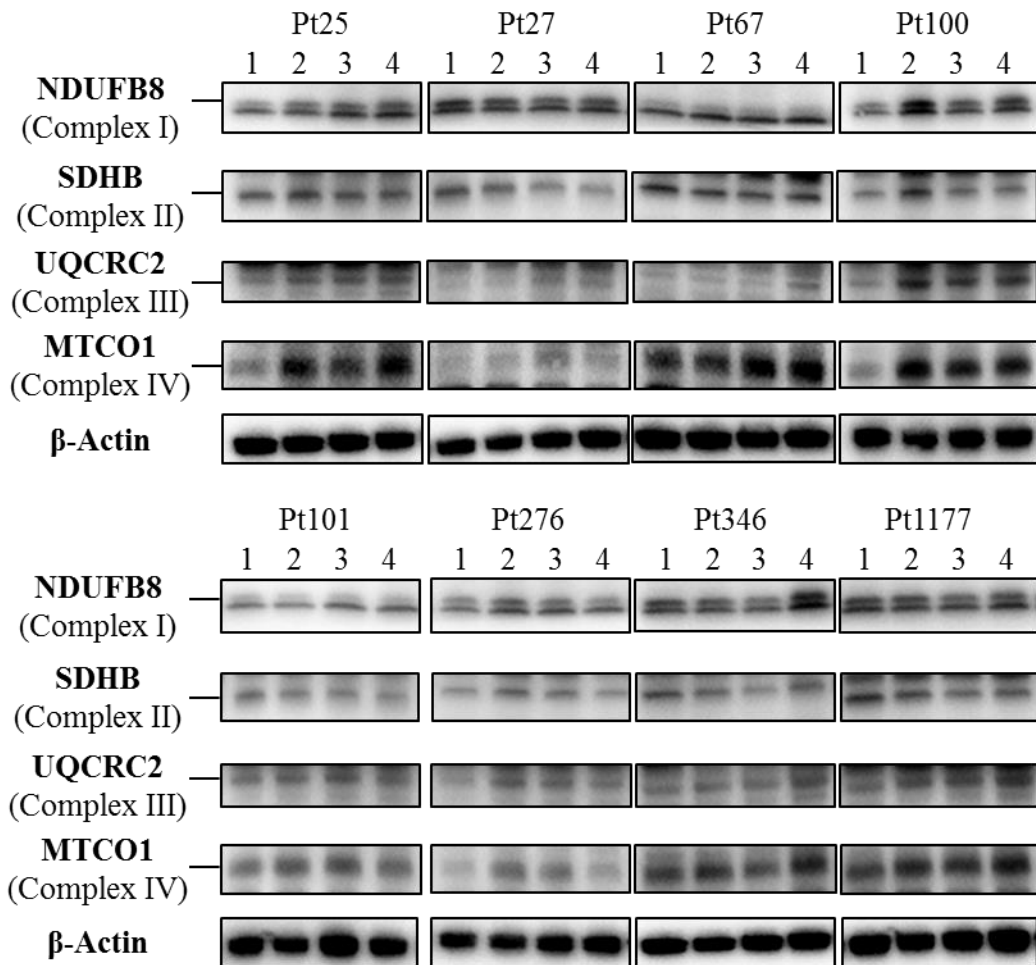


図 3. 正常細胞におけるミトコンドリア酸素消費量 (MRR)

■患者由来細胞における5-ALA+SFCの効果の検証■

ミトコンドリア病の患者由来皮膚線維芽細胞における、5-ALA+SFCのOXPHOS関連蛋白の発現への効果を検証しました。UQCRC2 (Complex III), MTCO1 (Complex IV)は全ての患者細胞において発現が亢進していました。NDUFB8 (Complex I)は5/8症例 (Pt25, Pt100, Pt101, Pt276, Pt346)、SDHB (Complex II)は2/8症例 (Pt100, Pt276)において発現の増加が確認されました。(図4)。



Lane	1	2	3	4
ALA (μM)	0	50	100	200
SFC (μM)	0	25	50	100

図4. 患者細胞におけるOXPHOS関連蛋白の発現

5-ALA+SFC 含有培地で培養された患者由来皮膚線維芽細胞を用いてミトコンドリア酸素消費量を解析したところ、全ての症例で最大酸素消費量の有意な上昇を認めました（図5a）。また、ATP 産生量は 7/8 症例で有意な増加を認めました。

以上より、正常細胞だけでなく、ミトコンドリア病患者由来の皮膚線維芽細胞においても、酸素消費量、ATP 産生量を指標としたミトコンドリア機能を改善させることが確認されました。

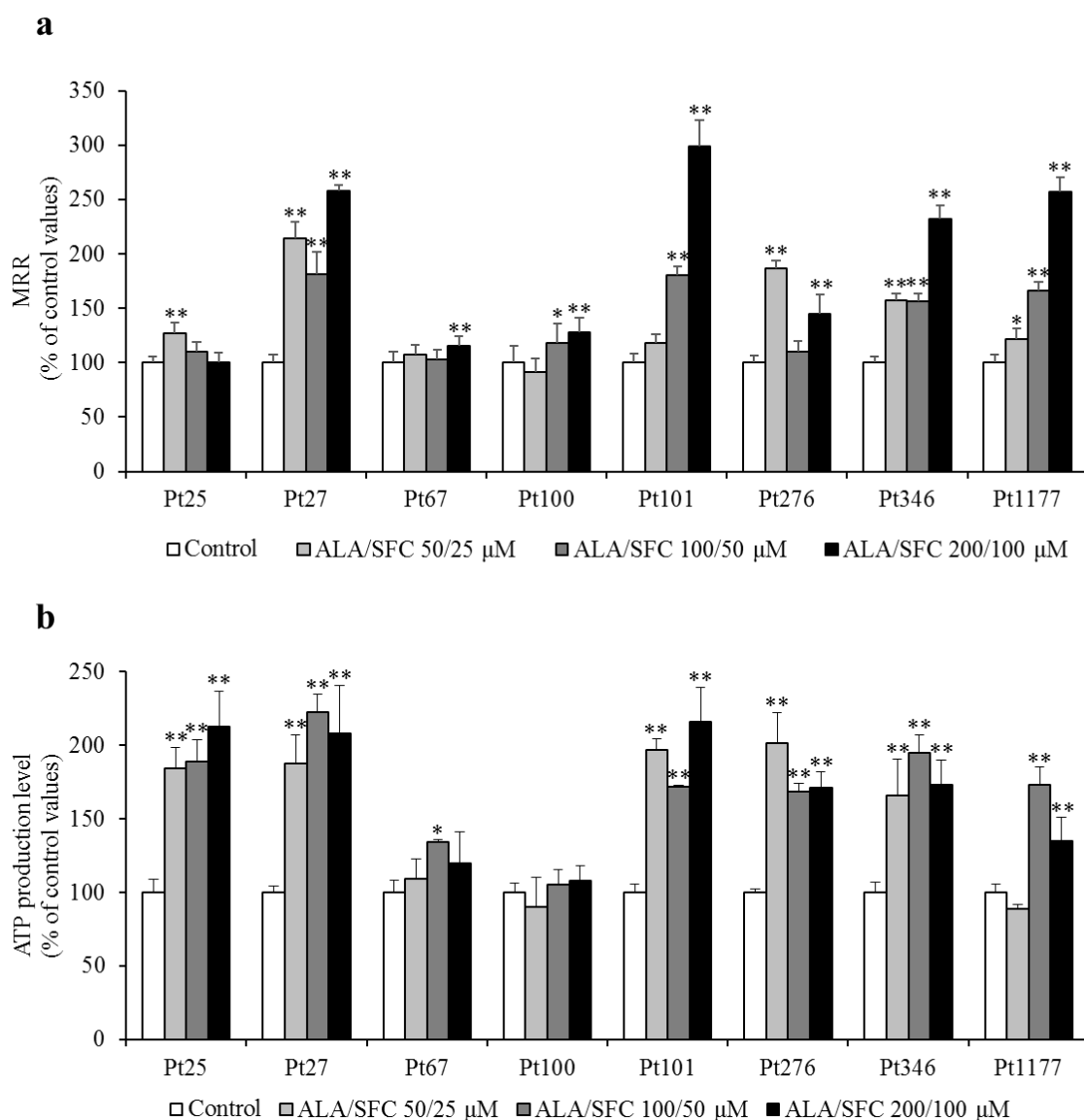


図5. 患者細胞におけるミトコンドリア酸素消費量、ATP 産生量

■HO-1 蛋白と遺伝子の発現■

5-ALA, SFC が HO-1 蛋白の発現に与える影響を検証しました。5-ALA, SFC、および 5-ALA+SFC 含有培地それぞれで培養した正常細胞においては、5-ALA+SFC 含有培地でのみ HO-1 蛋白の発現が増加していました。

HO-1 遺伝子の発現量は、5-ALA+SFC 含有培地でのみ濃度依存性の上昇を認めました。同様に患者由来細胞においても、HO-1 蛋白の発現は 5-ALA+SFC の濃度依存性に増加することが分かりました (図 6)。

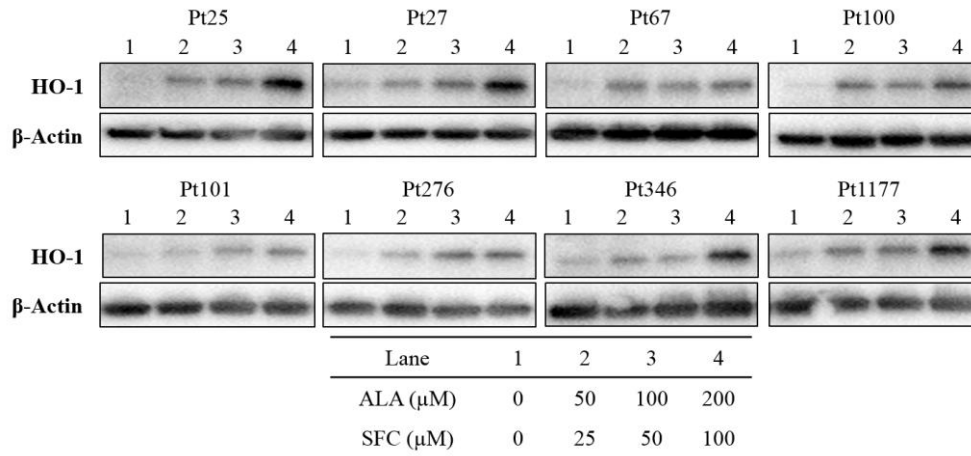


図 6. 患者細胞における HO-1 蛋白の発現

■mtDNA コピー数の変化■

HO-1 はミトコンドリアの品質管理、融合と分裂やミトコンドリアの生合成を促すことが報告されています。正常細胞、患者由来細胞において、5-ALA+SFC による mtDNA コピー数の変化 (mtDNA/nDNA) を解析しました。正常細胞においては 5-ALA+SFC (200/100 μM) により、約 3.5 倍 mtDNA コピー数が増加することが確認されました。患者由来細胞においては、5/8 症例で有意に mtDNA コピー数が増加していました (図 7)。

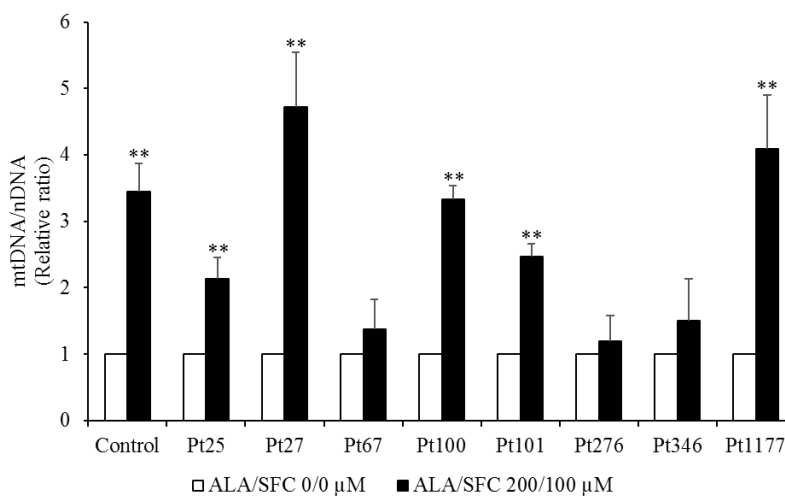


図 7. mtDNA コピー数の変化

■まとめ■

今回我々は、世界で初めてミトコンドリア病の患者由来細胞に対する5-ALA+SFCの効果を検証しました。5-ALA+SFCは呼吸鎖複合体II, III, IV、およびシトクロームCの構成蛋白であるヘムの合成を促すだけでなく、HO-1の合成を促進することでmtDNAコピー数も増加させ、呼吸鎖複合体Iを含む全ての呼吸鎖複合体の発現を促し、ミトコンドリア酸素消費量、ATP産生量を増加させることが明らかになりました。

今回の研究結果は、5-ALA+SFCが残存するミトコンドリア呼吸鎖酵素を強化することでミトコンドリア機能を改善させる、「酵素強化療法」、すなわち根本治療としての有用性を示唆するものです。現在、Leigh脳症に対する5-ALA+SFCの医師主導治験も進行中であり、ミトコンドリア病の新しい治療薬として大いに期待されます。

《本研究に係わる学会発表》

• M Shimura, Y Okazaki, A Ohtake, K Murayama, et al. Novel therapy for mitochondrial diseases: 5-aminolevulinic acid and sodium ferrous citrate as an enzyme enhancement therapy. SSIEM, 2019, Sep 3-6, Rotterdam, Netherland.

• 志村優, 岡崎康司, 大竹明, 村山圭, 他. ミトコンドリア病新規治療薬の開発: 5-アミノレブリン酸とクエン酸第一鉄ナトリウムによる酵素強化療法. 第61回日本先天代謝異常学会総会, 2019年10月24-26日, 秋田.

• A Ohtake, M Shimura, Y Okazaki, K Murayama et al. 5-Aminolevulinic acid and Fe can bring a permanent cure for mitochondrial diseases: Basic experiments and an investigator initiated clinical trial. Mitochondrial Medicine 2019, 2019, June 26-29, Washington DC, USA.

《用語解説》

*1 ミトコンドリア病

ミトコンドリア病とは、ミトコンドリアの働きが低下することが原因で起こる病気の総称。エネルギー代謝系の先天代謝異常症です。出生5,000人に1人の割合で発症し、いかなる症状、いかなる臓器・組織、何歳でも、いかなる遺伝形式でも発病します。特に幼少時期発症例は症状が多彩で重篤致死の症例が多いです。根治的治療がなく、対症療法にとどまります。

*2 5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid)

5-ALAは天然のアミノ酸の一種であり、高い水溶性を呈し細胞毒性が低いため、サプリメントとして広く利用されています。生体内ではグリシンとサクシニルCoAから合成され、ポルフィリン代謝経路を経てヘムが生成されます。外因性に取り込まれた5-ALA

も同様の代謝経路を辿り、ヘムとなり呼吸鎖複合体の構成要素となります。5-ALA は癌細胞においては鉄が不足しているため、ヘムの前駆体であるプロトポルフィリン IX が蓄積し、その光感受性を利用して癌の診断領域では既に実用化されています。

*3 クエン酸第一鉄ナトリウム (SFC; sodium ferrous citrate)

鉄欠乏性貧血の治療に広く用いられている鉄剤です。投与されたクエン酸第一鉄ナトリウム (Fe^{2+}) は小腸上部から吸収されて、ヘモグロビン合成に利用されます。またポルフィリン代謝経路においては、 Fe^{2+} がプロトポルフィリン IX に導入されることでヘムが合成されます。

*4 ミトコンドリア呼吸鎖複合体

ミトコンドリアではエネルギー源であるATP を合成しており、ミトコンドリア呼吸鎖複合体のI~V までがその合成に関わっています。複合体I~IV は、酸化還元反応を利用し、ミトコンドリア内膜を介してプロトン(H^+)を輸送します。複合体Vは逆向きのプロトンの流れを利用してATPを作り出します。

*5 ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1)

ヘムを一酸化窒素 (CO)、ビリベルジン、 Fe^{2+} に分解する酵素です。HO-1 だけでなく、CO (一酸化炭素)、ビリベルジンの代謝産物であるビリルビンは抗炎症・抗酸化作用を有しています。また、HO-1、CO は mtDNA コピー数を増加させることが報告されています。

*6 ミトコンドリア DNA (mtDNA)

ミトコンドリア DNA は 16,569 塩基対を有し、13 個の呼吸鎖のサブユニットを含む 37 個の遺伝子をコードします。各ミトコンドリアには 2~10 コピーのミトコンドリア DNA があります。