

千葉県がんセンター/千葉県こども病院
小児ミトコンドリア病の新規病因遺伝子の発見について
～黒毛和種牛における虚弱子牛症候群との関連～

概要

先天代謝異常症の1つである小児ミトコンドリア病の症例を対象に、網羅的なゲノム解析と候補遺伝子の機能解析を行いました。その結果、これまでヒトでは知られていなかった新たな病因遺伝子として、*IARS* 遺伝子を同定しました。また、よく似た症状を呈する *IARS* 異常症の小児例がドイツ及びオーストリアでも発見され、これまで培ってきた希少疾患の国際連携によって、3カ国の共同論文として米国人類遺伝学会雑誌に発表されました。

研究の背景

千葉県こども病院/千葉県がんセンター（村山圭 部長）、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター（岡崎康司 所長）、埼玉医科大学小児科（大竹明 教授）を中心とする共同研究グループは、2007年から新生児・小児を中心としたミトコンドリア病の診断を手がけてきました。2014年度から厚生労働科学研究委託、2015年度から日本医療研究開発機構（AMED）による難治性疾患実用化研究事業において「ミトコンドリア病診療の質を高める、レジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイドラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究」を日本ミトコンドリア学会のバックアップのもと、進めてきました。この研究において、①ミトコンドリア病の診療マニュアルの策定、②小児ミトコンドリア病のレジストリ構築、③特殊診断システム整備、を行い、③に関しては、生化学診断からエクソーム解析を含めた包括的遺伝子診断を速やかに行うシステムの構築を行ってきました。2016年1月には、3つの新規遺伝子の同定を含む、小児ミトコンドリア病142例の包括的遺伝子解析の論文を *PLOS Genetics* に発表しました。さらに2016年度からはAMEDによる難治性疾患実用化研究事業において「創薬を見据えた、ミトコンドリア病の新規病因遺伝子の発見とその病態解明」研究をスタートさせ、ミトコンドリア病の新規病因遺伝子の発見及び病態解明の研究を重点的に進めているところです。こうした中で今回、構築してきた特殊診断システムによって診断された日本人の小児期発症ミトコンドリア病患者において、*IARS* 遺伝子（*IARS*; イソロイシル tRNA 合成酵素）を新しい病因遺伝子として報告するに至りました。

ヒト *IARS* 異常症の特徴

IARS 遺伝子異常は、子宮内発育遅延、乳児期から肝障害（脂肪肝）、低身長などの成長障害、難聴、糖尿病などの症状を引き起こします。3カ国の3症例の症状の内訳は、周産期の成長障害（3/3）、知的障害（3/3）、亜鉛欠乏（3/3）、筋緊張低下（2/3）、肝臓の脂肪変性や繊維化（2/3）、糖尿病・難聴（1/3）、易感染性（1/3）となっています。

特に新生児期からの脂肪肝を伴う肝障害（ミトコンドリア肝症）はヒト *IARS* 異常症の特徴です（図1; 日本の症例）。オーストリアの症例は感染を契機に胆汁うっ滞、凝固障害が進行し、肝不全に陥っています（のちに改善）。

また、下記のようにミトコンドリア呼吸鎖酵素活性の低下を線維芽細胞、筋肉、肝臓などで認めます。

ミトコンドリア呼吸鎖酵素活性：

日本症例：線維芽細胞；呼吸鎖酵素複合体 I, IV の低下（クエン酸合成酵素比でそれぞれ 37, 41%）

ドイツ症例：筋肉；呼吸鎖酵素複合体 I, IV, ピルビン酸脱水素酵素（PDH）の低下（正常コントロール比でそれぞれ 77, 52, 64%）

オーストリア症例：呼吸鎖酵素複合体 I の低下（正常コントロール比で 46%）

図1 肝臓の組織像（日本人症例）

全体的に脂肪変性と門脈域の線維化を認めるが、炎症細胞浸潤や胆汁うっ滞、銅の沈着等は認めない。

(A：HE 染色)

肝細胞の胞体は明るく、軽度の架橋形成（bridging fibrosis）を認める。

(B：鍍銀染色)

局所的に門脈域線維化、架橋形成を認める。

(C：PAS + ヘマトキシリン染色)

大小の脂肪滴を認め細胞質のグリコーゲンを圧排している（矢印）。Kupffer 細胞の中にセロイド色素を認める。

(D：抗マクロシアリン/CD-68 免疫染色)

(C) に一致して Kupffer 細胞のクラスターを認め、細胞死や貪食反応が示唆される。

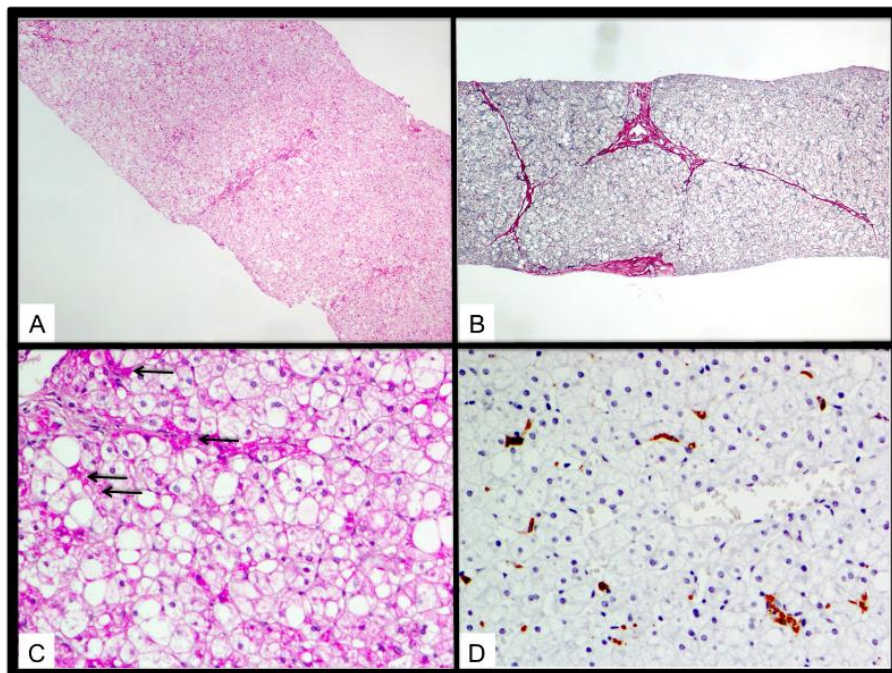


図2 IARS 異常症の成長曲線

3 症例とも子宮内発育遅延を認めている。その後の成長障害（低身長や体重増加不良など）も認められた。いずれも血中の亜鉛欠乏が認められ、亜鉛投与により成長障害の改善が確認された症例があった。

ドイツ症例（亜鉛の投与（赤矢印）により成長障害の改善がみられる）

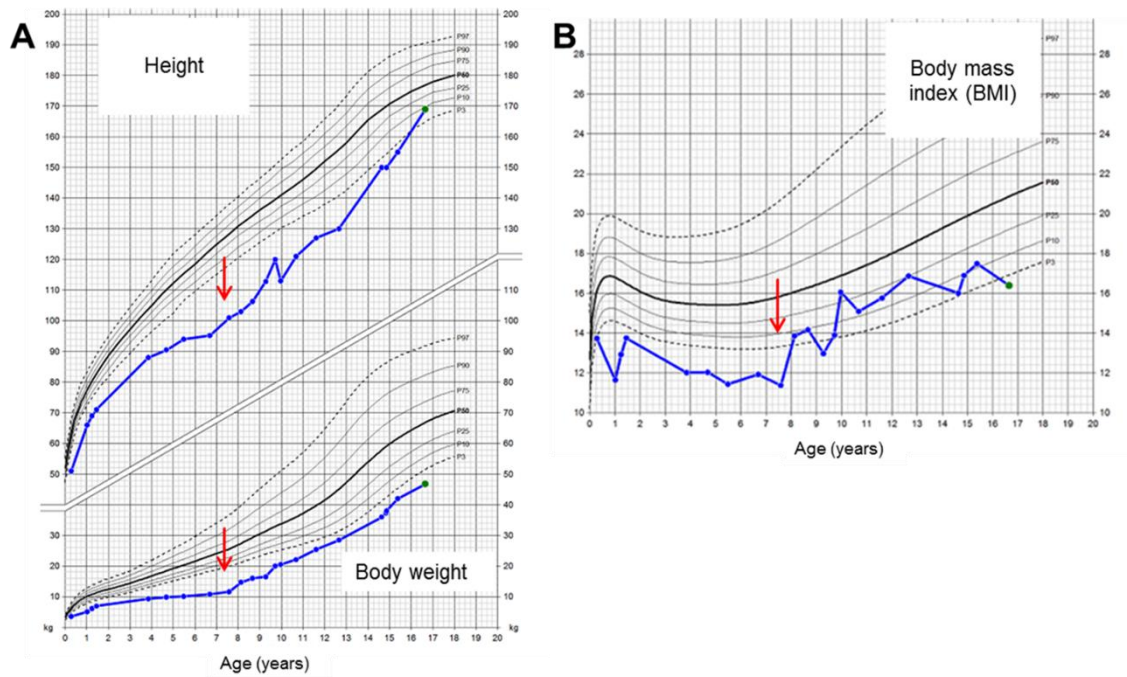


図3 ヒト及び牛 IARS 異常症で見出された変異の病原性確認実験

ヒト (I1174N, R418*, R254*, P437L, V370G, N992D) 及び牛 (V79L) IARS 異常症で見出された変異を酵母に導入し、ドキシサイクリン添加 ($50 \mu\text{g/mL}$) 条件下で培養し、その成長を野生型 *IARS* (wt) を導入した酵母と比較した。

- (A) 横軸は固形培地に蒔く酵母の個数を示す。ドキシサイクリン添加下では *IARS* を導入しない (empty vector) と酵母は増殖できない。野生型 *IARS* (wt) を導入すると少ない個数 (5×10^3) でも酵母は増殖できるのに対し、変異導入細胞 (ヒト、牛とも) では野生型に比して蒔く酵母の個数を減らすとすぐに増殖不能となる。
- (B) 液体培地にドキシサイクリンを添加し一晚培養を行い、変異導入細胞の成長状況を OD600 で評価した。変異導入細胞は明らかに成長が鈍化している。

図3-A

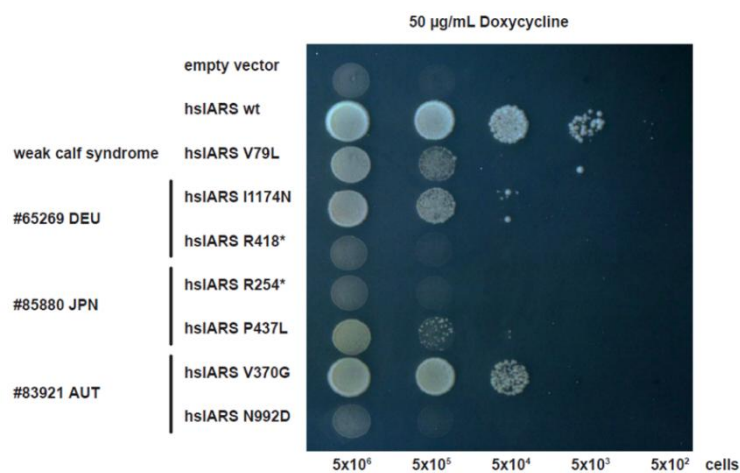


図 3-B

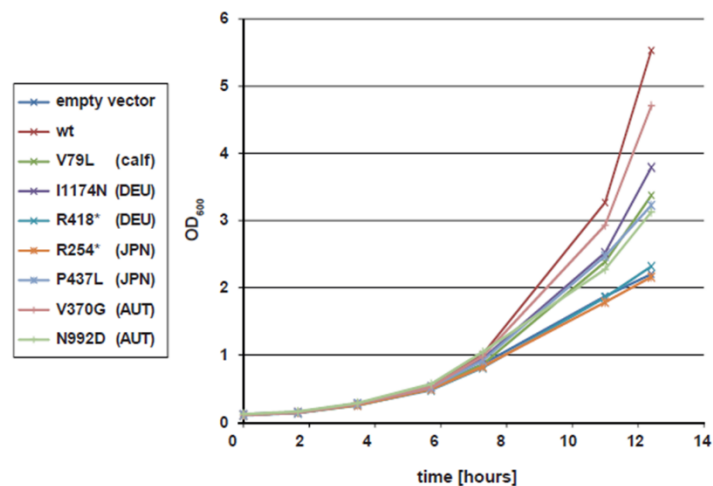


図 4 ゼブラフィッシュを用いた IARS の *in situ* hybridization と モルフォリノ (MO) ノックダウン実験

IARS はゼブラフィッシュにも存在しており、ヒト蛋白と 74% の相同性を有する。IARS は、初期胚の時にはゼブラフィッシュの組織・臓器全体に発現し、次第に体節や原腸陥入後の脳に発展していく領域、特に脳の被蓋領域、松果体、後脳に局在していく。IARS のノックダウンにより、成長障害、脳の形成不全が生じる。

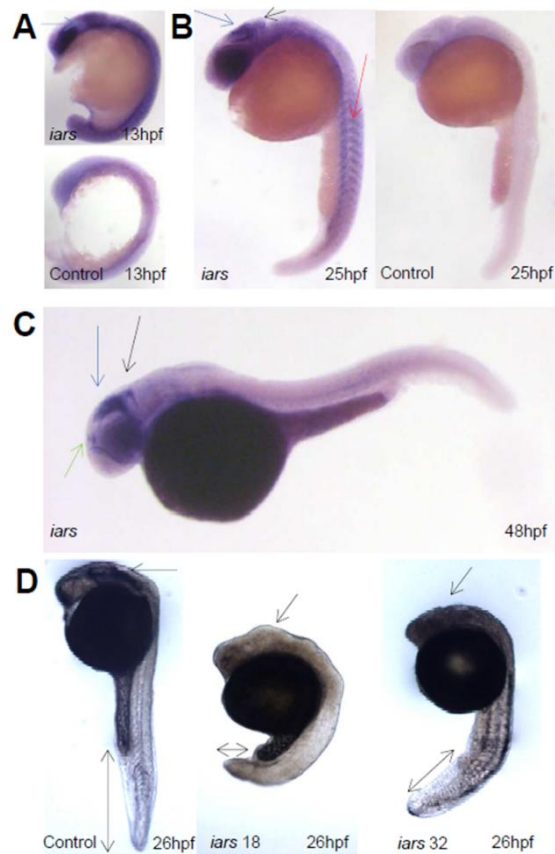
(A) ～ (D) はゼブラフィッシュの発達段階の側面像

(A) 受精後 13 時間 (13hpf) での *in situ* hybridization した IARS mRNA とセンス RNA コントロール。IARS の発現は体節や脳になる領域に局在している。矢印は中脳。

(B) 受精後 25 時間。IARS は被蓋 (青矢印)、小脳 (黒矢印)、体節 (赤矢印) に局在している。センスコントロール (右図) は、シグナルが消失している。

(C) 受精後 48 時間。IARS は脳の被蓋領域 (青矢印) だけでなく、松果体 (緑矢印)、後脳 (黒矢印) に特異的に発現している。

(D) ゼブラフィッシュ胚に MO を注入して受精後 26 時間後 (Exon18 (中図), 32 (右図) をターゲットにした)。IARS ノックダウンにより発達障害、脳の形成不全を生じた (矢印は中脳と大幅に短くなった体軸を示す)。左図はコントロール。



黒毛和種牛における IARS 異常症

IARS 異常症はこれまで黒毛和種（黒毛和牛）において、虚弱子牛症候群（低出生体重、哺乳困難、免疫不全、貧血、低栄養、発育不全などを呈する）を来す常染色体劣性遺伝病として知られており（写真 1）、保因牛同士の交配によりその子牛の 1/4 が発症、その約半数は早期に胚死滅し、出生した発症子牛も生後 10 ヶ月齢までにその約 80%は死亡あるいは淘汰されます。黒毛和種牛の虚弱子牛症候群のうち約 30%が IARS 異常症であり、2014 年には農林水産省の指定遺伝病となり、保因種雄牛が公表されています。近年の調査でも繁殖雌牛の約 10%、種雄牛の約 5%と高い頻度で原因遺伝子を保有しており、保因牛同士の交配を避けることで IARS 異常症の発症は減少しつつあるものの、依然として畜産農家の経営を圧迫する重要な疾患です。

写真 1 IARS 遺伝子異常を有する黒毛和種牛



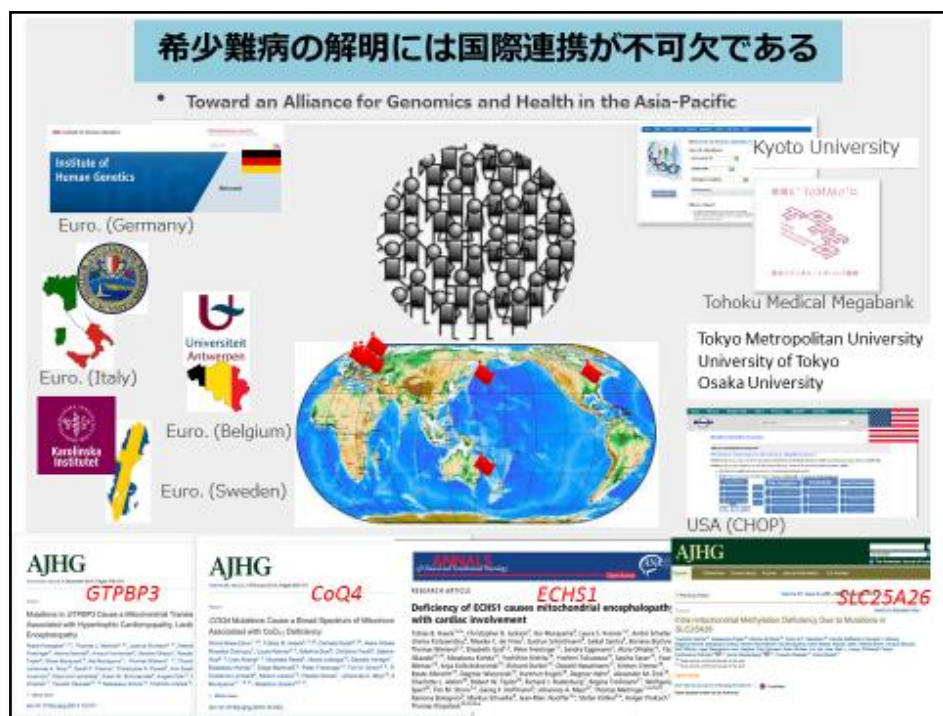
ヒト・牛 IARS 異常症に共通した症状

ヒト及び黒毛和種牛の IARS 異常症に共通した症状は、子宮内発育遅延、出生後の成長障害、易感染性です。また 3 カ国の症例とも亜鉛欠乏を認めており、亜鉛の投与を行うと成長障害が改善されている症例もありました。しかし黒毛和種牛では亜鉛欠乏は認めておらず、ヒト IARS 異常症のみの特徴と思われます。また、呼吸鎖酵素活性の低下も黒毛和種牛の線維芽細胞、筋肉、肝臓において認められず、ヒト IARS 異常症のみの特徴と思われます。IARS 異常症は、核の遺伝情報をもとに蛋白合成を行う過程において、トランスファーRNA (tRNA) にイソロイシンを結合させる酵素 (IARS ; イソロイシル tRNA 合成酵素) の働きが低下することに起因します。これによって遺伝情報の翻訳が進まず蛋白合成が低下し様々な組織障害・臓器障害を引き起こします。

まとめ

今回の研究成果は、黒毛和種牛で問題となっている **IARS** 異常症が、ヒトでもミトコンドリア障害を伴って発症することを示した世界初の報告です。特に黒毛和種牛を有する我が国で、**IARS** 異常症は畜産業界やその食文化に多大な影響を及ぼす重要な問題でもあります。ヒトでも似た症状を呈する **IARS** 異常症が発見されたのを契機に、本症は、医師、獣医師、研究者と、それを取り巻く医療、畜産業界がそれぞれ知恵を出し合いながらオールジャパン体制で克服しなければならない問題であり、今後更なる病態解明及び創薬研究へ発展させていく必要があります。

最後に、希少難病は日本だけで解決していくことは難しい現状があります。今回は、医師、獣医師、研究者の国際連携によって、似たような症状を有する症例が同じ遺伝子異常を有しているということをきっかけにして、**IARS** 遺伝子が病因遺伝子であるとの解明につながりました。これまでも私たちのグループは、ミトコンドリア病を引き起こす新しい病因遺伝子を、国際連携することにより報告してきており、国際連携の重要性は増してきています。



本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）の難治性疾患実用化研究事業の研究費を用いて行われました。この研究成果は日本時間 7 月 15 日に米国人類遺伝学誌(The American Journal of Human Genetics)に発表されます。

なお本研究成果は、東京慈恵医科大学小児科、北里大学獣医学部大動物臨床学研究室、ハイデルベルグ大学病院小児科、ミュンヘン・ヘルムホルツ研究所、インスブルック医科大学等の協力のもと実現されました。