

第5回ミトコンドリア病研究公開フォーラム  
2021年1月23日（土）

# ミトコンドリア病を起こす遺伝子

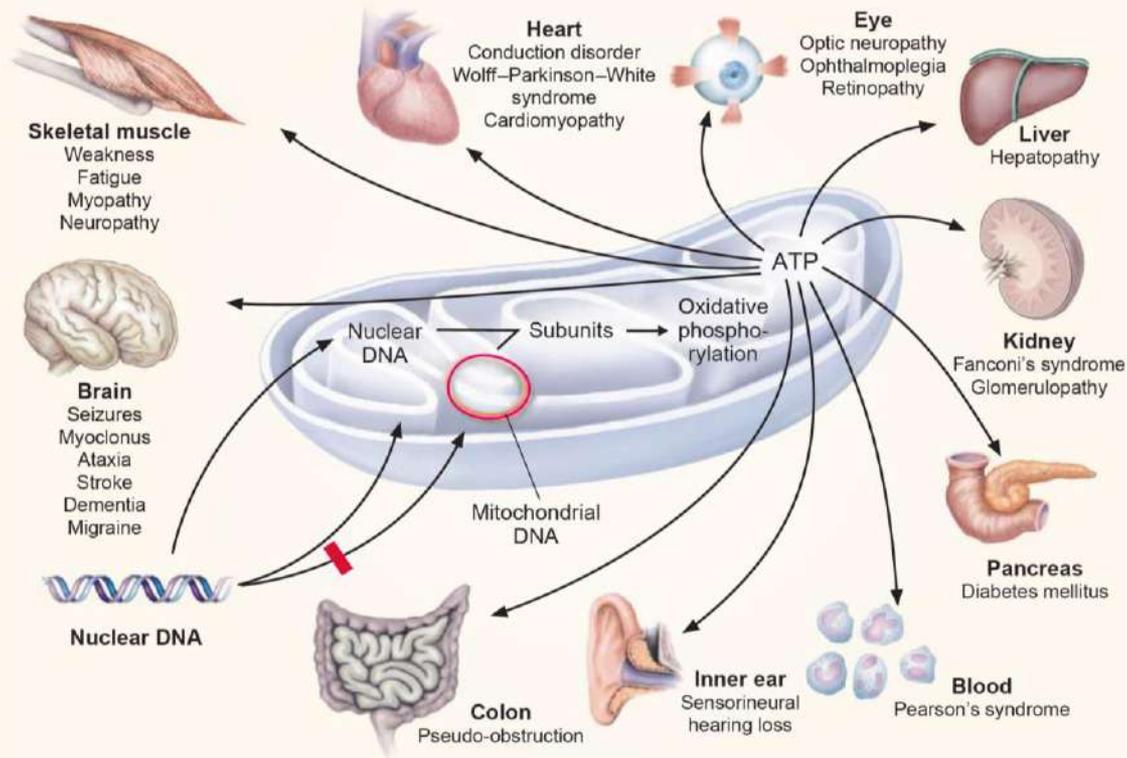
順天堂大学 医学研究科  
難病の診断と治療研究センター  
センター長

岡崎康司



# 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



Johns DR, *N Engl J Med.* 1995

- 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得る
- エネルギー代謝系（ミトコンドリア呼吸鎖）の先天代謝異常症である
- 出生 5,000人に 1人の割合で発症する
- 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
- 根治的治療法がなく、対症的治療法にとどまる

# ミトコンドリア病の遺伝

(20,000 遺伝子)

ミトコンドリアゲノム

核ゲノム

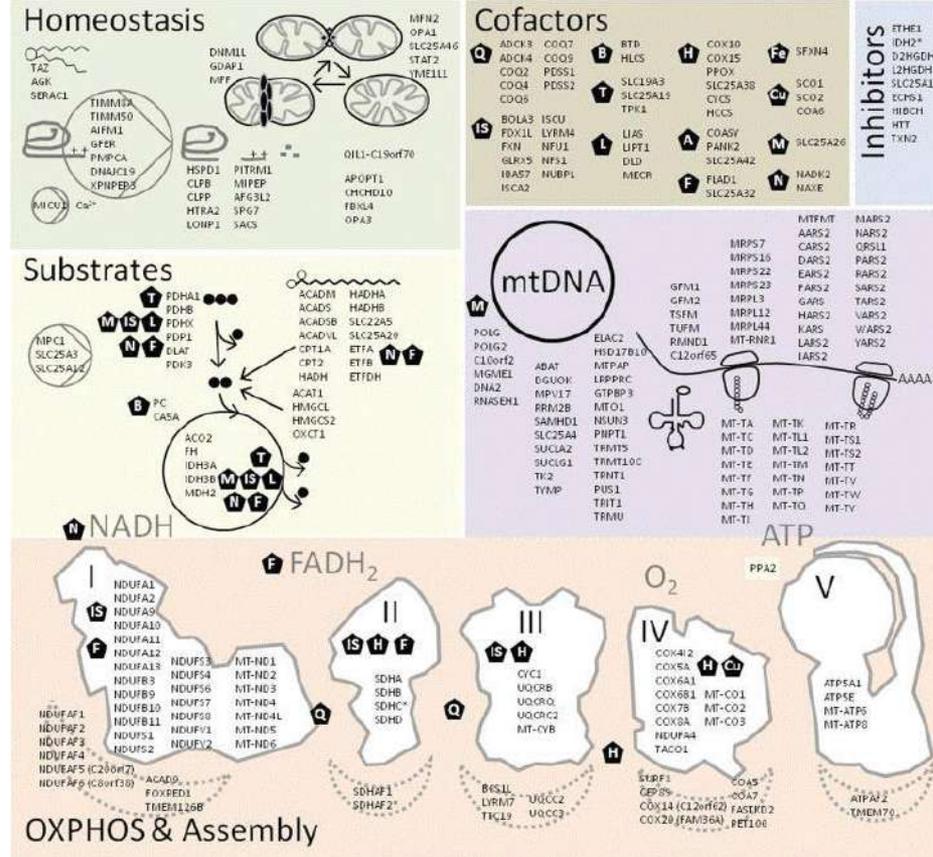
ミトコンドリア病の原因遺伝子



13 proteins

22 tRNA  
2 rRNA

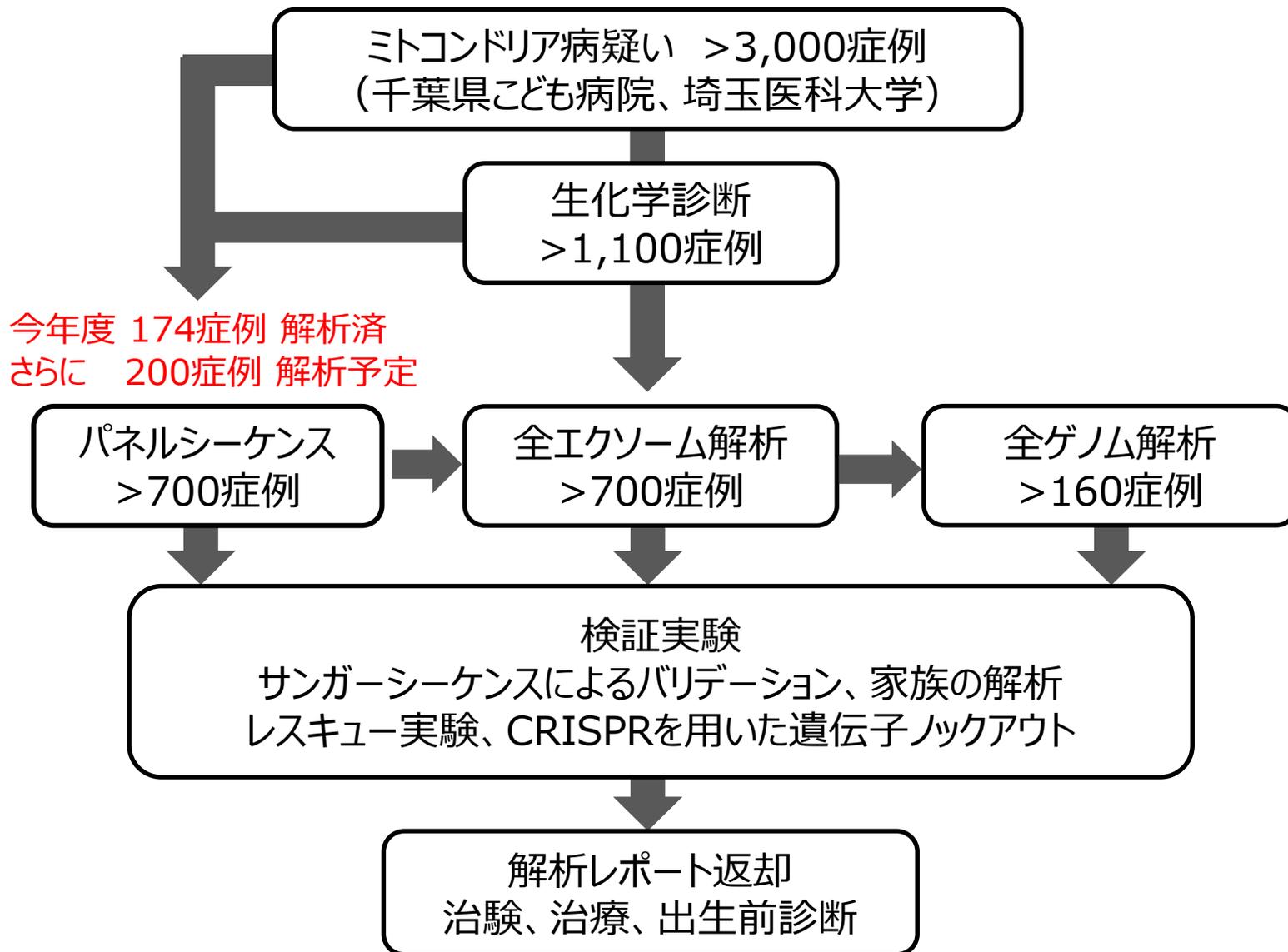
~ 1,500 proteins



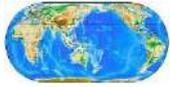
ミトコンドリアゲノムおよび核ゲノムの異常で疾患が発症するが、小児領域では20-30%がミトコンドリアゲノムの異常によると考えられている。

現在までに350以上の原因遺伝子が同定され、ほとんどが劣性（潜性）遺伝形式をとる。

# 当研究グループのミトコンドリア病研究体制



# ミトコンドリア病研究拠点として世界から認識



## Toward an Alliance for Genomics and Health in the Asia-Pacific

### ドイツ

Helmholtz Zentrum München  
Technische Universität München

### オーストリア

Paracelsus Medical University Salzburg  
Medical University of Innsbruck

### イギリス

Newcastle University  
MRC Mitochondrial Biology Unit  
University of Cambridge

### オランダ

Antwerp University

### スウェーデン

Karolinska Institutet

### イタリア

University of Bari

### アメリカ

The Children's Hospital of Philadelphia  
Broad Institute of MIT and Harvard  
Columbia University Medical Center

### オセアニア

Royal Children's Hospital and Department of Paediatrics  
University of Melbourne

### 日本

京都大学

### 東北メディカルメガバンク

東京大学  
首都大学東京  
大阪大学  
九州大学

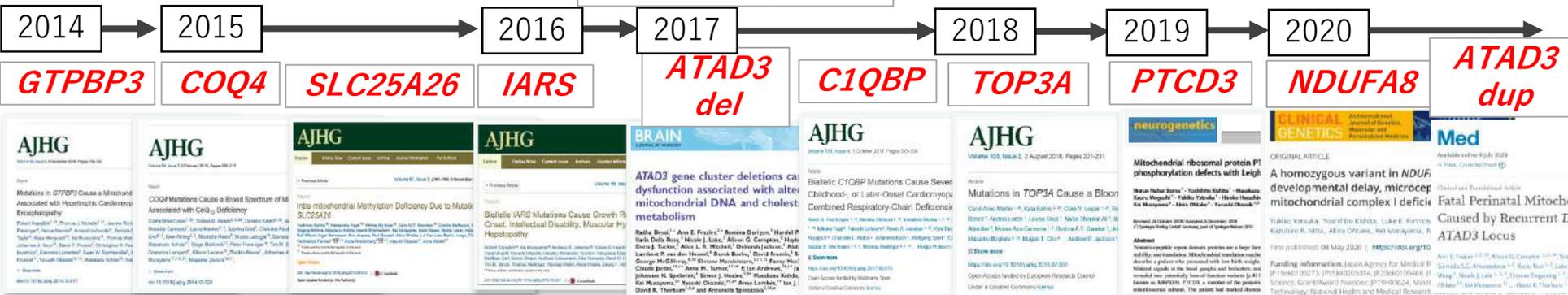
Kohda, Kishita, Okazaki et al.  
*PLOS Genet* 2016



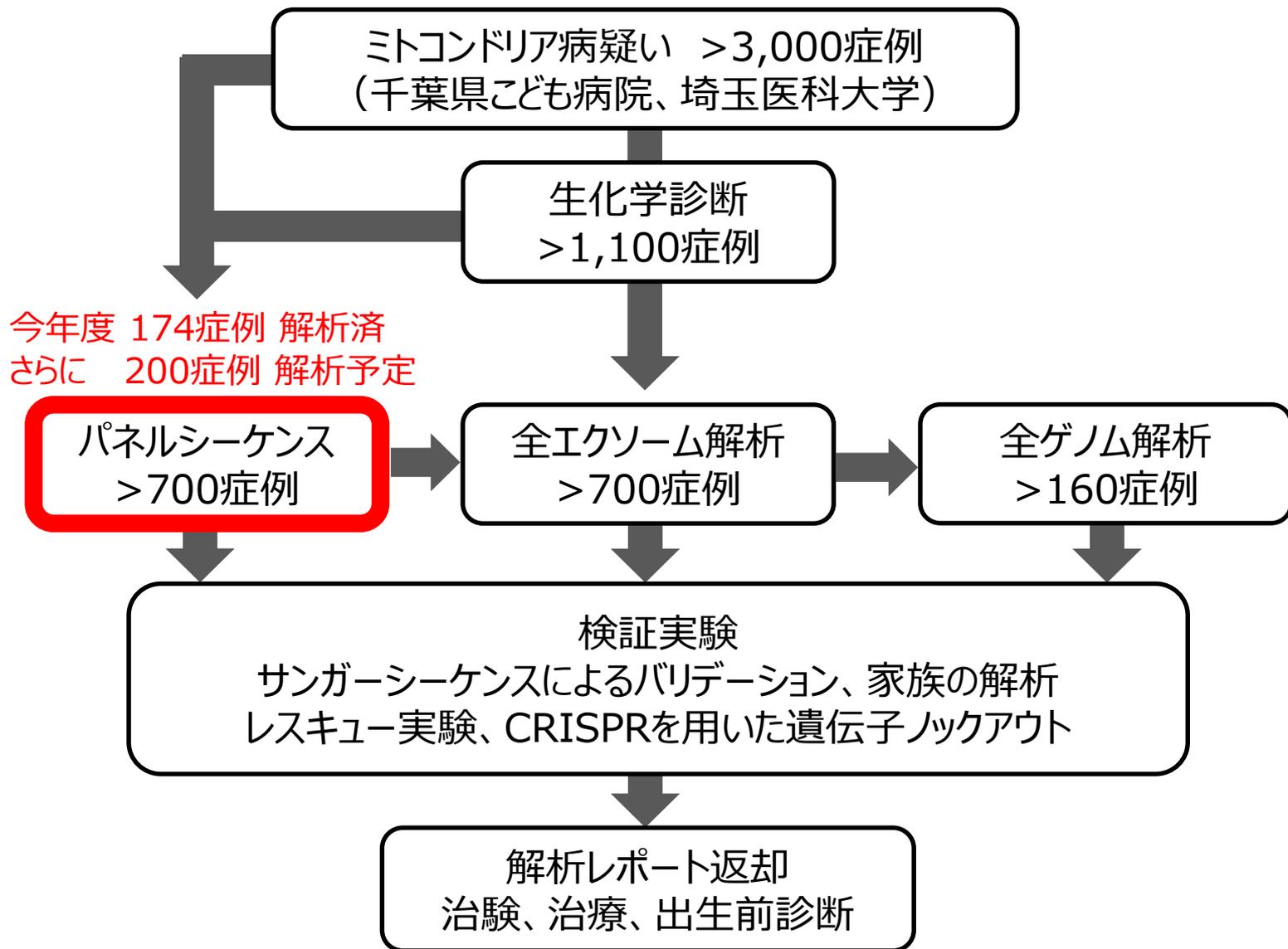
## AMED・難治性疾患実用化事業 村山班



## 東北メガバンクのデータが疾患の解析に使われた第1号として共同プレスリリース



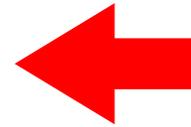
# 当研究グループのミトコンドリア病研究体制



# 次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断

## 遺伝子パネル

- およそ30%の診断率
- 既知遺伝子の異常を調べる
- 臨床の現場に素早く結果を返却する



## 全エクソームシーケンス (WES) / 全ゲノムシーケンス(WGS)

- 診断率を上げるためには、新規の遺伝子の同定が必要
- 機能解析実験が必要 (レスキュー、モデル生物)
- 患者データの集積 (同じ遺伝子に異常をもち、同じ症状を呈する患者)

## RNAシーケンス (RNA-seq)

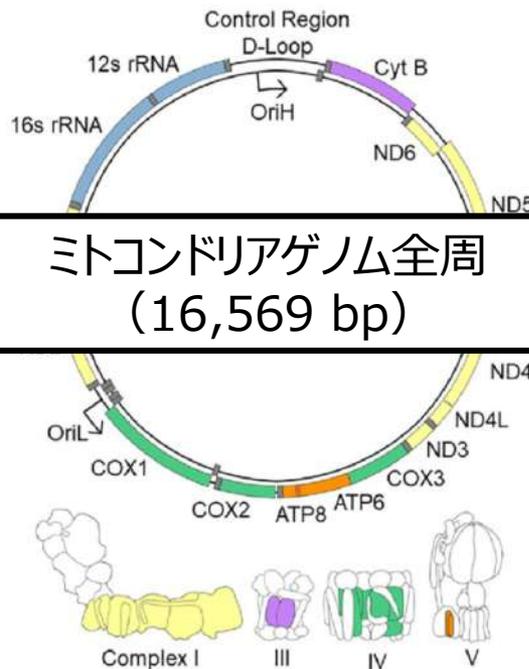
- WESや遺伝子パネルで遺伝子異常が見つからなかった症例に対して、RNAから異常を明らかにする
- 発現異常、スプライシング異常、モノアレルック発現を同定することができる

# ミトコンドリア病パネルの対象遺伝子

AARS2 (57505)	CARKD (55739)	DGUOK (1716)	HADHA (3030)	MICU2 (221154)	NDUFB11 (54539)	PNPLA4 (8228)	SLC25A19 (60386)	SPATA5 (166378)	TK2 (7084)	TXN2 (25828)
ABAT (18)	CARS2 (79587)	DHTKD1 (55526)	HADHB (3032)	MIEF2 (125170)	NDUFB3 (4709)	PNPLA8 (50640)	SLC25A20 (788)	SPG20 (23111)	TMEM126A (84233)	TYMP (1890)
ABCB6 (10058)	CEP89 (84902)	DIABLO (56616)	HARS2 (23438)	MIEP (4285)	NDUFB8 (4714)	PNPT1 (87178)	SLC25A21 (89874)	SPG7 (6687)	TMEM126B (55863)	UQC22 (84300)
ABCB7 (22)	CHCHD10 (400916)	DIAPH1 (1729)	HCCS (3052)	MPC1 (51660)	NDUFB9 (4715)	POLG (5428)	SLC25A22 (79751)	SSBP1 (6742)	TMEM65 (157378)	UQCRB (7381)
ACAD9 (28976)	CHKB (1120)	DLAT (1737)	HIBCH (26275)	MPV17 (4358)	NDUFS1 (4719)	POLG2 (11232)	SLC25A24 (29957)	STAT2 (6773)	TMEM70 (54968)	UQCRC2 (7385)
ACADM (34)	CISD2 (493856)	DLD (1738)	HLCS (3141)	MRPL12 (6182)	NDUFS2 (4720)	POP1 (10940)	SLC25A26 (115286)	STXBP1 (6812)	TOP3A (7156)	UQCRRS1 (7386)
ACADS (35)	CLPB (81570)	DNA2 (1763)	HMGCL (3155)	MRPL3 (11222)	NDUFS3 (4722)	PPA2 (27068)	SLC25A3 (5250)	SUCLA2 (8803)	TPK1 (27010)	UQCRCQ (27089)
ACADSB (36)	CLPP (8192)	DNAJA3 (9093)	HMGCS2 (3158)	MRPL38 (64978)	NDUFS4 (4724)	PPOX (5498)	SLC25A32 (81034)	SUCLG1 (8802)	TRAK1 (22906)	USMG5 (84833)
ACADVL (37)	CLPX (10845)	DNAJC19 (131118)	HSD17B10 (3028)	MRPL44 (65080)	NDUFS6 (4726)	PTCD3 (55037)	SLC25A38 (54977)	SURF1 (6834)	TRAP1 (10131)	VARS2 (57176)
ACAT1 (38)	COA3 (28958)	DNM1L (10059)	HSPA9 (3313)	MRPS14 (63931)	NDUFS7 (374291)	PTRH2 (51651)	SLC25A4 (291)	TACO1 (51204)	TRIT1 (54802)	WARS2 (10352)
ACO2 (50)	COA5 (493753)	DTYMK (1841)	HSPD1 (3329)	MRPS16 (51021)	NDUFS8 (4728)	PUS1 (80324)	SLC25A42 (284439)	TANGO2 (128989)	TRMT10C (54931)	WFS1 (7466)
ADCK3 (56997)	COA6 (388753)	EARS2 (124454)	HSPE1 (3336)	MRPS2 (51116)	NDUFV1 (4723)	PYCR1 (5831)	SLC25A46 (91137)	TARS2 (80222)	TRMT5 (57570)	XPNPEP3 (63929)
ADCK4 (79934)	COASY (80347)	ECHS1 (1892)	HTRA2 (27429)	MRPS22 (56945)	NDUFV2 (4729)	QARS (5859)	SLC33A1 (9197)	TAZ (6901)	TRMU (55687)	XRCC4 (7518)
AFG3L2 (10939)	COQ2 (27235)	ECSIT (51295)	HTT (3064)	MRPS23 (51649)	NFS1 (9054)	QRSL1 (55278)	SLC39A8 (64116)	TIMM22 (29928)	TRNT1 (51095)	YARS2 (51067)
AGK (55750)	COQ4 (51117)	ELAC2 (60528)	IARS (3376)	MRPS25 (64432)	NFU1 (27247)	RARS2 (57038)	SLC44A1 (23446)	TIMM50 (92609)	TSFM (10102)	YME1L1 (10730)
AIFM1 (9131)	COQ5 (84274)	EMC1 (23065)	IARS2 (55699)	MRPS28 (28957)	NME3 (4832)	RMND1 (55005)	SLC52A2 (79581)	TIMM8A (1678)	TTC19 (54902)	
AK2 (204)	COQ6 (51004)	ERAL1 (26284)	IBA57 (200205)	MRPS34 (65993)	NNT (23530)	RNASEH1 (246243)	SLC52A3 (113278)	TIMMDC1 (51300)	TUFM (7284)	
ALAS2 (212)	COQ7 (10229)	ETFA (2108)	IDH2 (3418)	MRPS5 (64969)	NSUN3 (63899)	ROBO3 (64221)				
ALDH18A1 (5832)	COQ9 (57017)	ETFB (2109)	IDH3A (3419)	MRPS7 (51081)	NUBPL (80224)	RRM2B (50484)				
ALDH1B1 (219)	COX10 (1352)	ETFDH (2110)	IDH3B (3420)	MSTO1 (55154)	OGDH (4967)	RTN4IP1 (84816)				
ANO10 (55129)	COX14 (84987)	ETHE1 (23474)	ISCA1 (81689)	MTFMT (123263)	OPA1 (4976)	SACS (26278)				
APOA1BP (128240)	COX15 (1355)	FA2H (79152)	ISCA2 (122961)	MTO1 (25821)	OPA3 (80207)	SAMHD1 (25939)				
APOPT1 (84334)	COX20 (116228)	FARS2 (10667)	ISCU (23479)	MTPAP (55149)	OXAL1 (5018)	SARS2 (54938)				
APTX (54840)	COX4I1 (1327)	FASTKD2 (22868)	KARS (3735)	NADK2 (133686)	OXCT1 (5019)	SCO1 (6341)				
ATAD3A (55210)	COX4I2 (84701)	FBXL4 (26235)	KIF1A (547)	NARS2 (79731)	PAM16 (51025)	SCO2 (9997)				
ATAD3B (83858)	COX5A (9377)	FDX1L (112812)	KIF5A (3798)	NDUFA1 (4694)	NDUFA1 (4694)	SDHA (6389)				
ATAD3C (219293)				NDUFA10 (4705)	PARS2 (25973)	SDHAF1 (644096)				
ATP5A1 (498)				NDUFA11 (126328)	PC (5091)	SDHAF2 (54949)				
ATP5D (513)				NDUFA12 (55967)	PDE12 (201626)	SDHB (6390)				
ATP5E (514)				NDUFA13 (51079)	PDHA1 (5160)	SDHC (6391)				
ATPAF2 (91647)				NDUFA2 (4695)	PDHB (5162)	SDHD (6392)				
BCS1L (617)				NDUFA4 (4697)	PDHX (8050)	SECISBP2 (79048)				
BDH1 (622)				NDUFA6 (4700)	PDK3 (5165)	SELRC1 (65260)				
BOLA3 (388962)				NDUFA8 (4702)	PDP1 (54704)	SEPPPCS (51091)				
BTD (686)				NDUFA9 (4704)	PDPR (55066)	SERAC1 (84947)				
C10orf2 (56652)				NDUFAF1 (51103)	PDSS1 (23590)	SFXNA4 (119559)				
C11orf83 (790955)				NDUFAF2 (91942)	PDSS2 (57107)	SLC19A2 (10560)				
C12orf65 (91574)				NDUFAF3 (25915)	PET100 (100131801)	SLC19A3 (80704)				
C17orf89 (284184)				NDUFAF4 (29078)	PET117 (100303755)	SLC22A5 (6584)				
C19orf12 (83636)				NDUFAF5 (79133)	PITRM1 (10531)	SLC25A1 (6576)				
C19orf70 (125988)				NDUFAF6 (137682)	PLA2G6 (8398)	SLC25A10 (1468)				
C1QBP (708)				NDUFAF7 (55471)	PMPCA (23203)	SLC25A12 (8604)				
CA5A (763)				NDUFB10 (4716)	PMPCB (9512)	SLC25A13 (10165)				

核コードの原因遺伝子  
(合計367)

ミトコンドリアゲノム全周  
(16,569 bp)



- Rahman *et al.* Review, *Lancet*. 2018 Jun 23;391(10139):2560-2574.
- Stenson *et al.* Review, *Essays Biochem*. 2018 Jul 20;62(3):399-408. など

# 低コスト化と搭載遺伝子追加を達成

昨年まで

Amplicon-seq, IonS5 (Thermo)

80,000 yen / sample @32-plex

**A** Nuclear Gene  
**241 genes**  
Total 3,900 amplicons

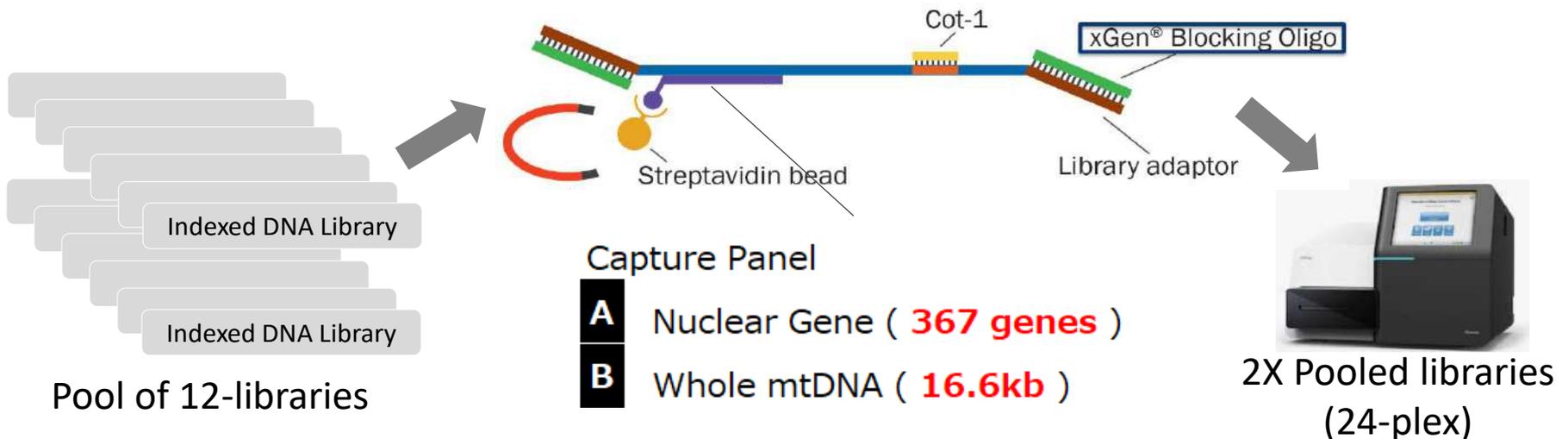


**B** Whole mtDNA  
**16.6kb**  
Total 162 amplicons

現在

Target-capture (IDT), MiSeq (Illumina)

15,000 yen / sample @24-plex



# 新規原因遺伝子の発見

# MedにATAD重複例を報告

Med

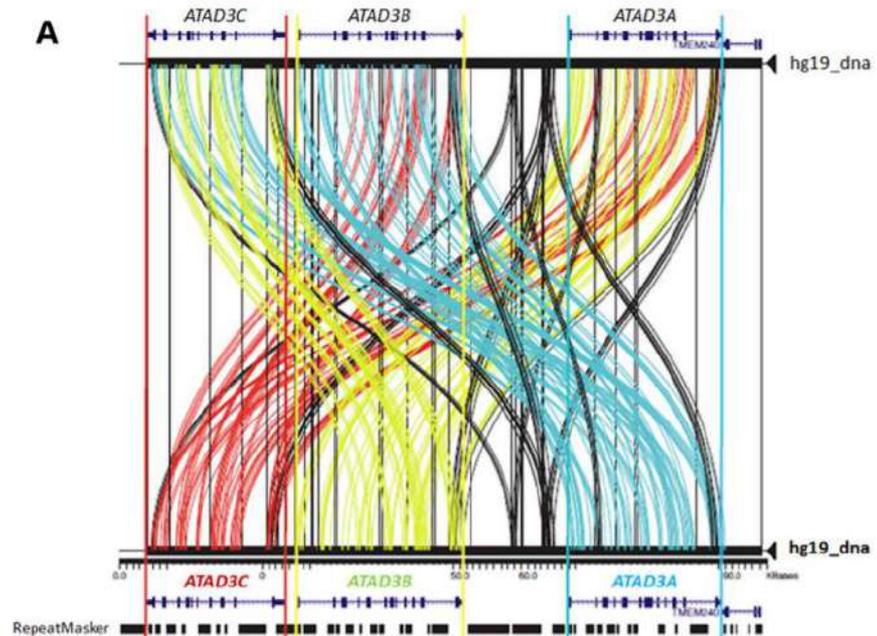
CellPress

Clinical and Translational Article

## Fatal Perinatal Mitochondrial Cardiac Failure Caused by Recurrent *De Novo* Duplications in the *ATAD3* Locus

Ann E. Frazier,<sup>1,2,34</sup> Alison G. Compton,<sup>1,2,34</sup> Yoshihito Kishita,<sup>3</sup> Daniella H. Hock,<sup>4</sup> AnneMarie E. Welch,<sup>1</sup> Sumudu S.C. Amarasekera,<sup>1,2</sup> Rocio Rius,<sup>1,2</sup> Luke E. Formosa,<sup>5</sup> Atsuko Imai-Okazaki,<sup>3,6</sup> David Francis,<sup>7</sup> Min Wang,<sup>1</sup> Nicole J. Lake,<sup>1,2,8</sup> Simone Tregoning,<sup>1,7</sup> Jafar S. Jabbari,<sup>9</sup> Alexis Lucattini,<sup>9</sup> Kazuhiro R. Nitta,<sup>3</sup> Akira Ohtake,<sup>10</sup> Kei Murayama,<sup>11</sup> David J. Amor,<sup>1,2</sup> George McGillivray,<sup>7</sup> Flora Y. Wong,<sup>12</sup> Marjo S. van der Knaap,<sup>13,14</sup> R. Jeroen Vermeulen,<sup>15</sup> Esko J. Wiltshire,<sup>16</sup> Janice M. Fletcher,<sup>17</sup> Barry Lewis,<sup>18</sup> Gareth Baynam,<sup>19,20</sup> Carolyn Ellaway,<sup>21,22</sup> Shanti Balasubramaniam,<sup>21</sup> Kaustuv Bhattacharya,<sup>21,22</sup> Mary-Louise Freckmann,<sup>23</sup> Susan Arbuckle,<sup>24</sup> Michael Rodriguez,<sup>25</sup> Ryan J. Taft,<sup>26</sup> Simon Sadedin,<sup>1,7</sup> Mark J. Cowley,<sup>27,28,29</sup> André E. Minoche,<sup>29</sup> Sarah E. Calvo,<sup>30,31,32</sup> Vamsi K. Mootha,<sup>30,31,32</sup> Michael T. Ryan,<sup>5</sup> Yasushi Okazaki,<sup>3</sup> David A. Stroud,<sup>4</sup> Cas Simons,<sup>1,33,\*</sup> John Christodoulou,<sup>1,2,7,22,\*</sup> and David R. Thorburn<sup>1,2,7,35,\*</sup>

ATAD3A, ATAD3B, ATAD3Cの間には相同配列が多く存在するため、組換えにより欠失(Desai et al, Brain, 2016; Harel et al, Am J Hum Genet, 2016)や重複(Fraizier et al, Med, 2020; Gunning et al, Am J Hum Genet, 2020)が生じる。ゲノム配列が非常に複雑なため、正確な構造異常を明らかにするには、ロングリードシーケンスが非常に有効となる。



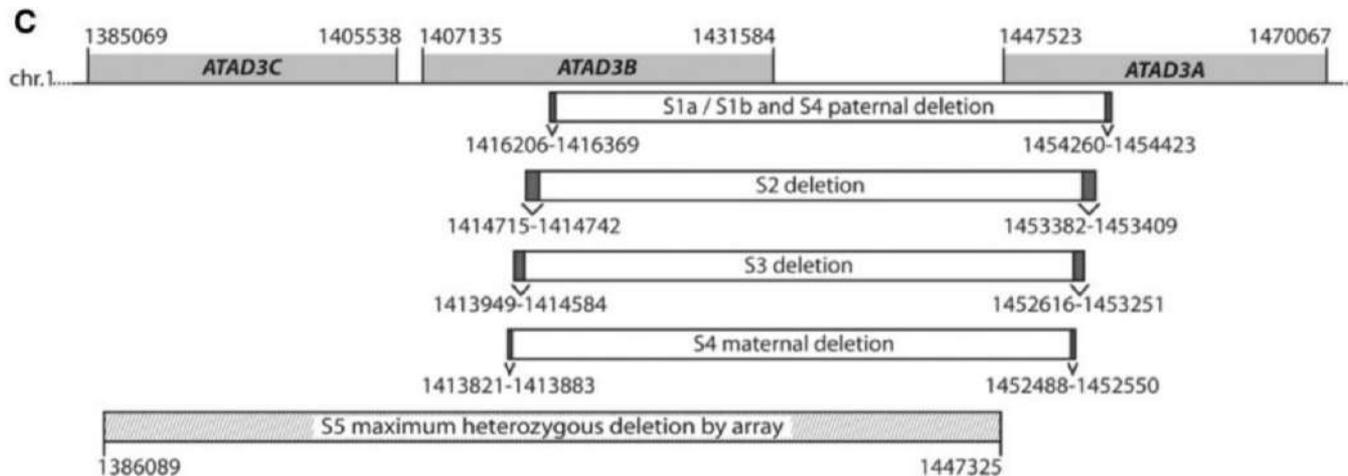
Harel et al, Am J Hum Genet, 2016

# 2017年に欠失例を報告した



## ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism

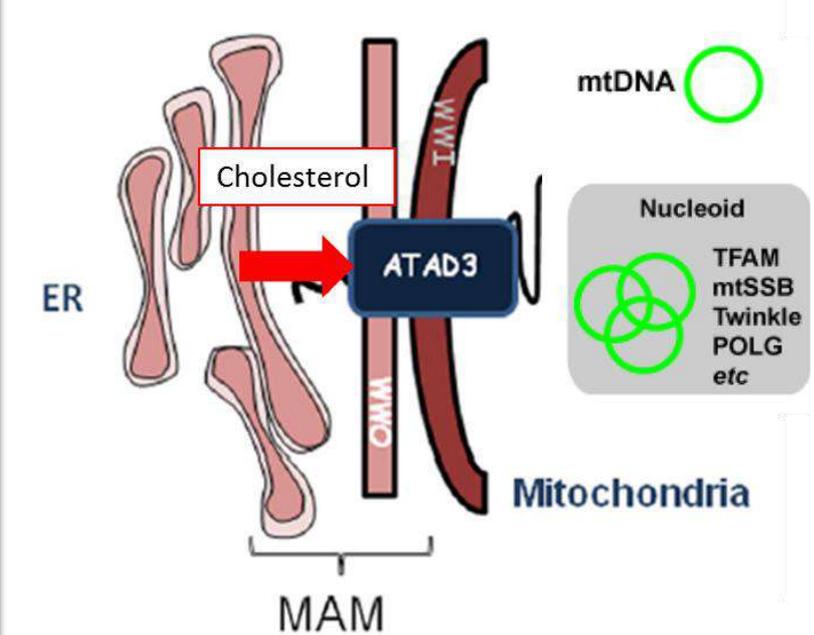
Radha Desai,<sup>1,\*</sup> Ann E. Frazier,<sup>2,\*</sup> Romina Durigon,<sup>3</sup> Harshil Patel,<sup>4</sup> Aleck W. Jones,<sup>3</sup> Ilaria Dalla Rosa,<sup>3</sup> Nicole J. Lake,<sup>2</sup> Alison G. Compton,<sup>2</sup> Hayley S. Mountford,<sup>2,1</sup> Elena J. Tucker,<sup>2</sup> Alice L. R. Mitchell,<sup>3</sup> Deborah Jackson,<sup>4</sup> Abdul Sesay,<sup>4</sup> Miriam Di Re,<sup>5</sup> Lambert P. van den Heuvel,<sup>6</sup> Derek Burke,<sup>7</sup> David Francis,<sup>8</sup> Sebastian Lunke,<sup>8,9</sup> George McGillivray,<sup>8,10</sup> Simone Mandelstam,<sup>2,11,12</sup> Fanny Mochel,<sup>13,14</sup> Boris Keren,<sup>14,15</sup> Claude Jardel,<sup>15,16</sup> Anne M. Turner,<sup>17,18</sup> P. Ian Andrews,<sup>18,19</sup> Jan Smeitink,<sup>6</sup> Johannes N. Spelbrink,<sup>6</sup> Simon J. Heales,<sup>7,20</sup> Masakazu Kohda,<sup>21</sup> Akira Ohtake,<sup>22</sup> Kei Murayama,<sup>23</sup> Yasushi Okazaki,<sup>21,24</sup> Anne Lombès,<sup>16</sup> Ian J. Holt,<sup>1,3,25,#</sup> David R. Thorburn<sup>2,8,#</sup> and Antonella Spinazzola<sup>3,26,#</sup>



ATAD3領域のdeletionを追加で3例同定すると共に、新たにduplicationの症例を4例発見した

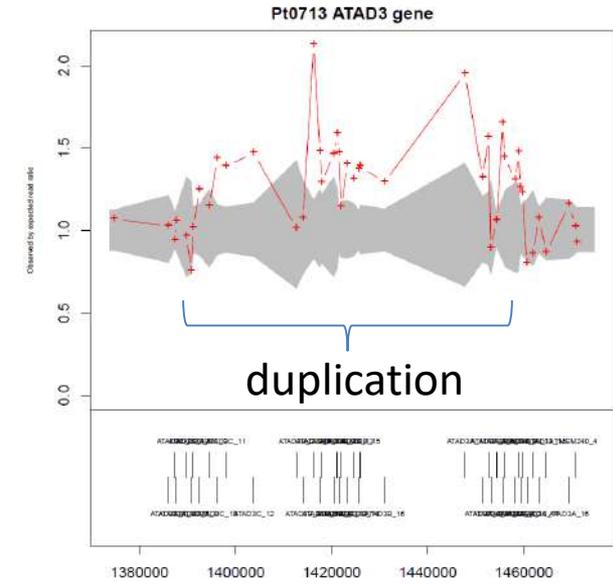
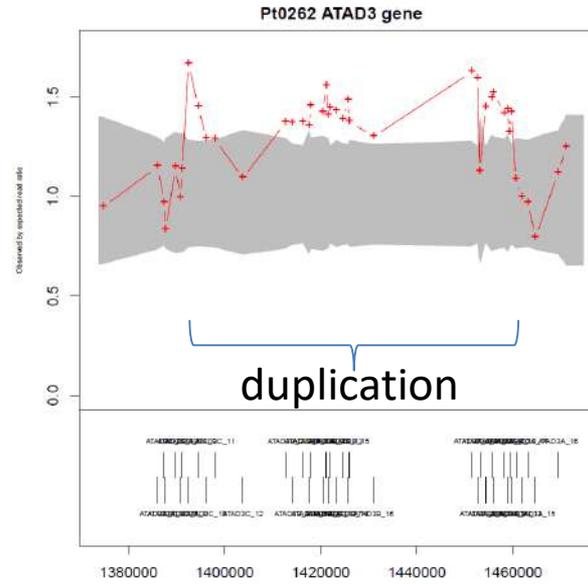
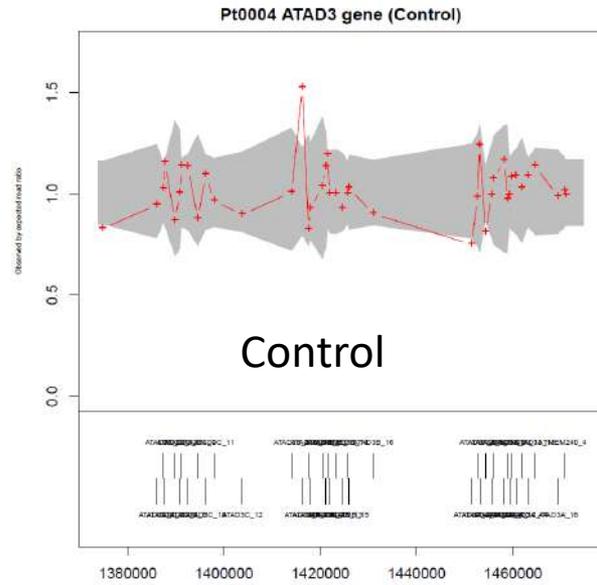
# ATAD3の機能・病態

- コレステロール代謝の変化
- コレステロールは粗面小胞体と接するミトコンドリア内膜へ運ばれる。ATAD3はmtDNAとコレステロールの豊富なmt内膜のドメインに関与。
- ミトコンドリアはATAD3とともに細胞内コレステロールの恒常性に重要な役割を果たす。

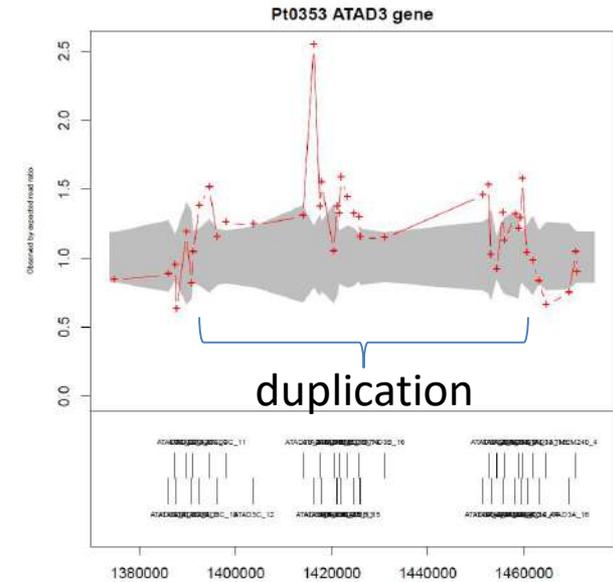
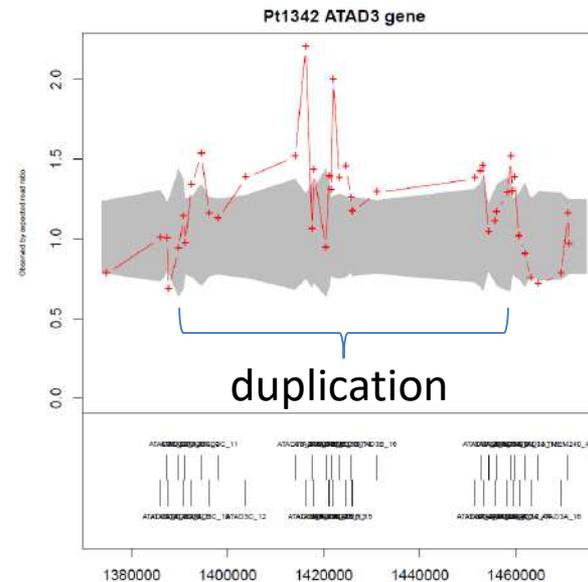


MAM (mitochondria-associated membrane)

# 4症例でATAD3C-ATAD3B-ATAD3A領域のATAD3 duplicationを同定

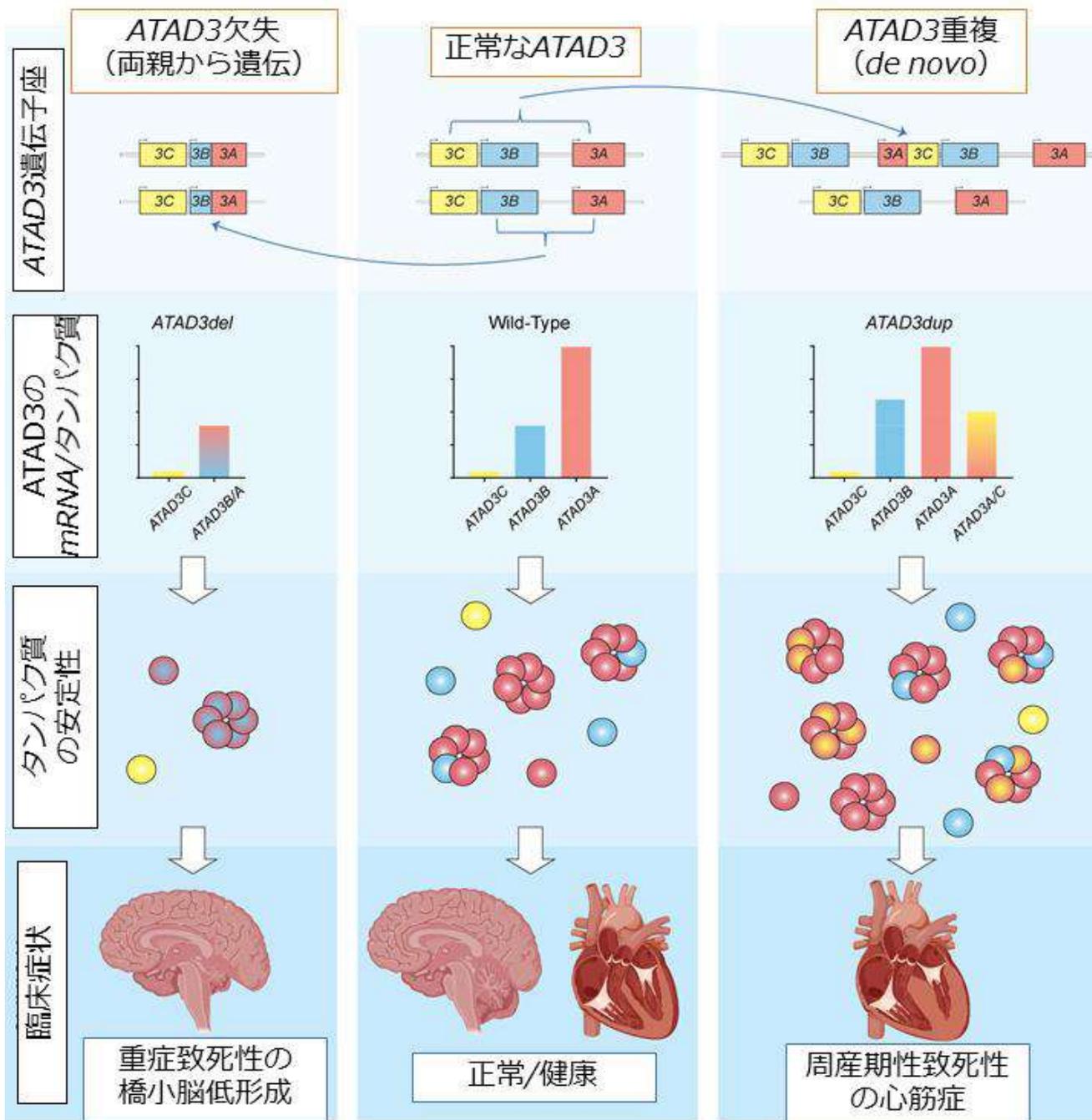


## WES data (Exome Depth)



Patient	
Pt0262	HCM, died at 2 months, cloudy cornea
Pt0713	HCM, died at 1 month
Pt1342	Heart failure, died at 1 month, cloudy cornea
Pt0353	HCM, died at 10 days

早期発症かつ、心筋症(+角膜混濁)



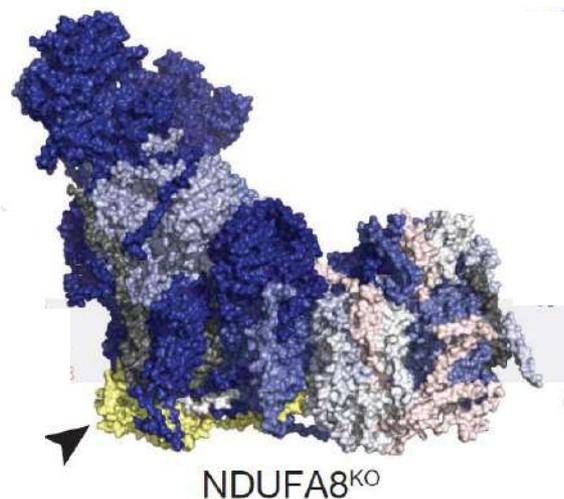
# NDUFA8(世界で未報告症例)



症例 (Pt1753)

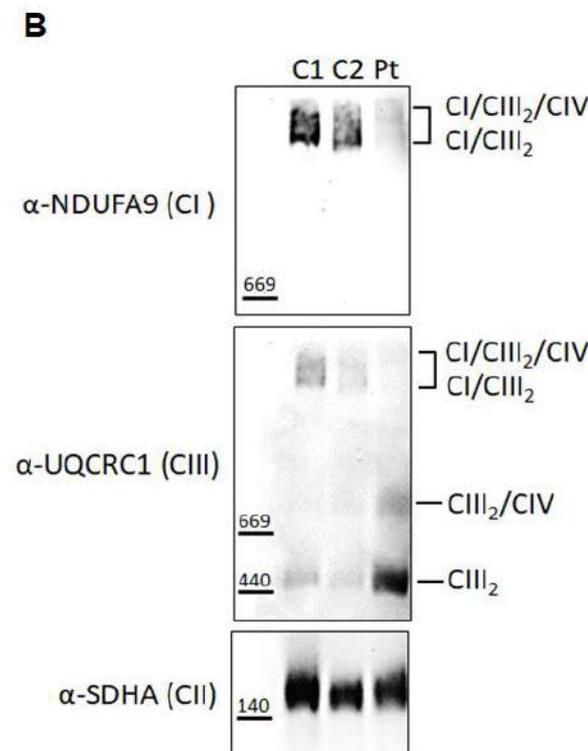
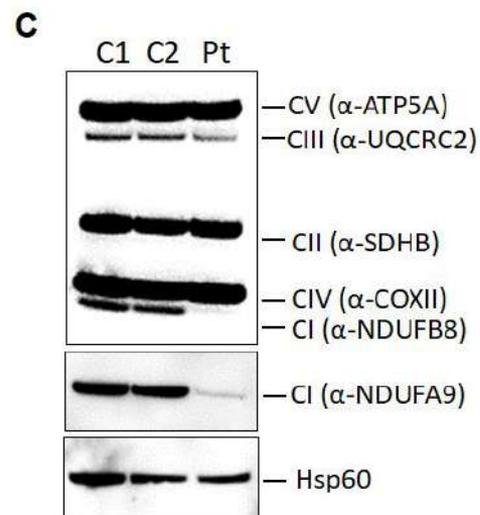
- 臨床診断: ミトコンドリア細胞症
- 主症状: 発達遅滞、低身長、小頭症、てんかん、高乳酸血症

ミトコンドリア呼吸鎖診断:  
線維芽細胞における呼吸鎖 I

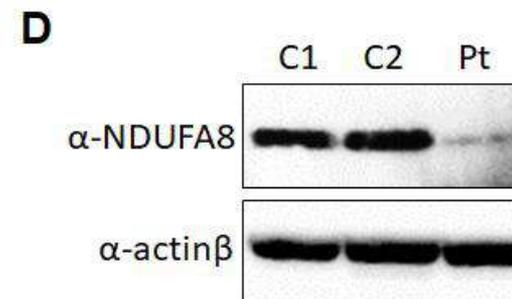
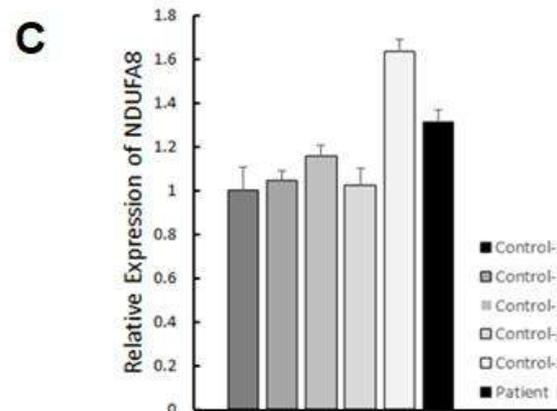
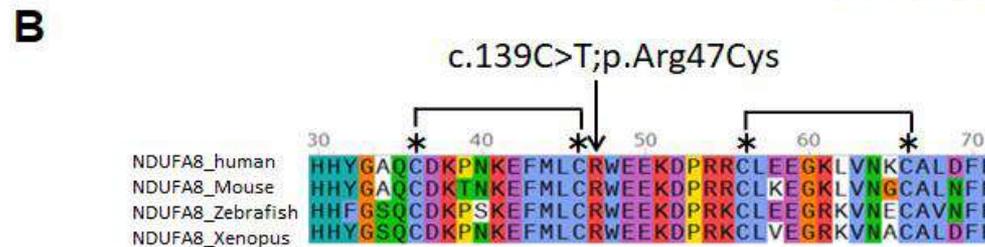
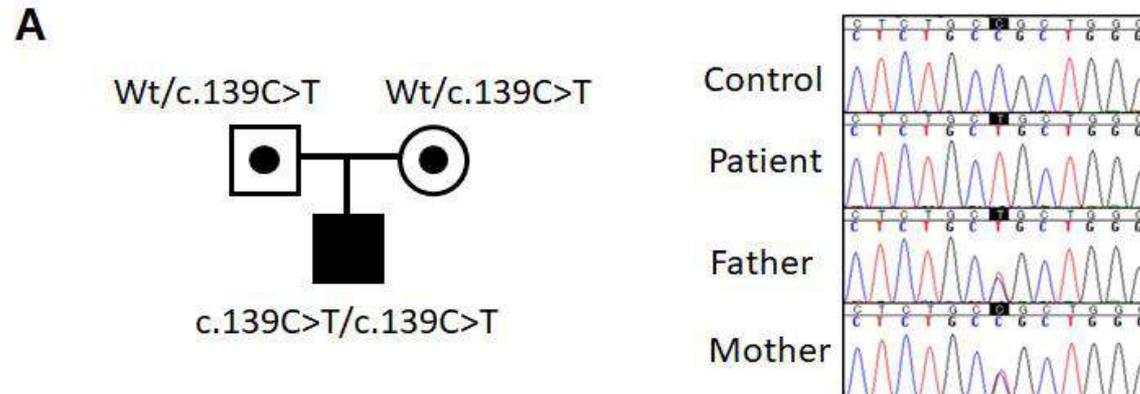


**A**

OXPPOS activity / CS activity	%
Complex I / CS	28
Complex II / CS	110.1
Complex III / CS	139.9
Complex IV / CS	111.3



# NDUFA8 homozygous mutation causes protein loss



QLifePro > 医療ニュース > 医療 > 日本人ミトコンドリア病症例から新規原因遺伝子NDUFA8を同定 – 千葉県こども病院ほか

# 日本人ミトコンドリア病症例から新規原因遺伝子NDUFA8を同定 – 千葉県こども病院ほか

読了時間 : 約 2分55秒

28

いいね! 1

シェア BIブックマーク 送る ツイート

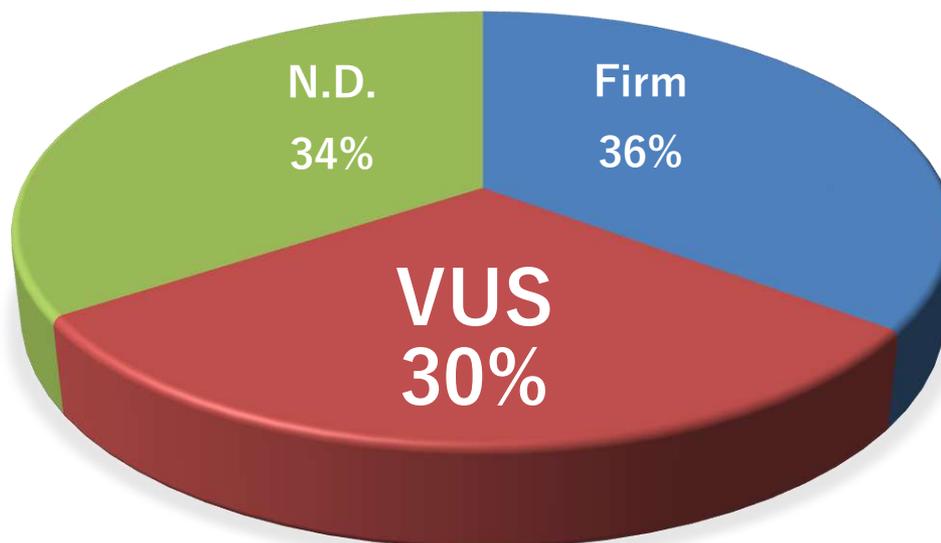
2020年07月07日 PM12:00

## ミトコンドリア病の原因遺伝子はmtDNAにも核DNAにも複数存在

千葉県こども病院は7月6日、発達遅滞・小頭症・てんかんを併発する日本人のミトコンドリア病の新たな病因遺伝子としてNDUFA8遺伝子を同定したと発表した。この研究は、千葉県こども病院 遺伝診療センター・代謝科の村山圭部長らのグループが、順天堂大学 難病の診断と治療研究センターの岡崎康司教授、埼玉医科大学 小児科の大竹明教授らとの共同研究として行ったもの。研究成果は、「Clinical Genetics」の8月号に掲載予定 (in press) だ。

診断率向上を目指した新たな展開

遺伝子解析の内訳 (N=690)



- これまでは、家族解析やウエスタンブロット、レスキュー実験、個別の検証実験等を経て、VUSをPathogenicと判定していた。
- 現在は症例数が増え、検証は数ヶ月から数年かかることもあり、VUSの解決は診断の大きな律速過程となってきた。

C-2分野

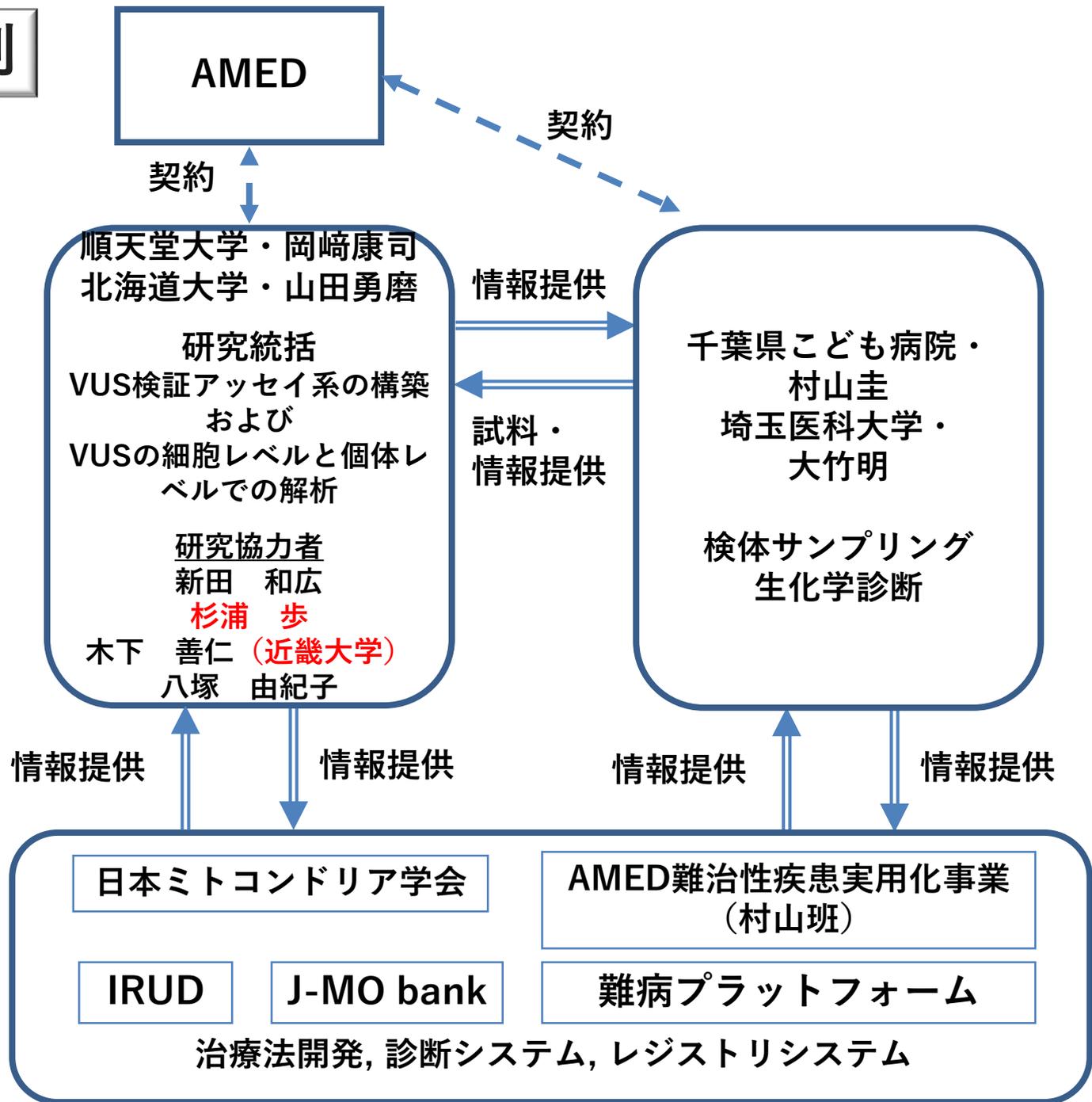
遺伝性疾患のゲノム解析で得られたVUS (Variants of Unknown Significance; 臨床的意義が不明なバリエーション) への機能的アノテーションに資する基盤研究

研究開発課題名	所属機関名	研究開発代表者
日本人小児ミトコンドリア病の固有VUSに対する網羅的な機能的アノテーション	順天堂大学	岡崎 康司

## 日本人小児ミトコンドリア病の固有VUSに対する 網羅的な機能的アノテーション

	申請数	書面審査通過数	採択数
B-2分野：RNA標的医薬の創出に資するRNA統合データベース（スプライシングバリエーションや非コードRNA等を包含）の構築のための基盤研究	1	1	1
C-1分野：ファーマコゲノミクスにより効果的・効率的薬剤投与を実現する基盤研究	14	5	1
C-2分野：遺伝性疾患におけるVUSへの機能的アノテーションに資する基盤研究	15	8	1

# 実施体制



公共データ  
核遺伝子VUS



核遺伝子VUS

細胞での核遺伝子  
VUS評価

細胞：KO細胞 (HEK293)  
ベクター導入：遺伝子 (VUS)  
アッセイ：ATP, pH, OCR,  
GFP強度(GFP融合遺伝子)

ゼブラフィッシュでの  
核遺伝子VUS評価

遺伝子導入：CRISPRによる遺伝  
子欠損およびmRNA(VUS)  
アッセイ：初期発生における形態  
変化、ミトコンドリア機能

ゲノム解析

ミトコンドリア  
遺伝子VUS

細胞でのVUS検証  
ミトコンドリア遺伝子  
(mt-tRNA)

細胞：患者線維芽細胞  
ベクター導入：MITO-Porter +  
mt-tRNA(VUS)  
アッセイ：ATP, pH, OCR

細胞でのVUS検証  
ミトコンドリア遺伝子  
(タンパクコード)

細胞：患者線維芽細胞  
ベクター導入：MTS+遺伝子  
(VUS)  
アッセイ：ATP, pH, OCR

遺伝子診断の  
迅速化

治療方針への  
展開

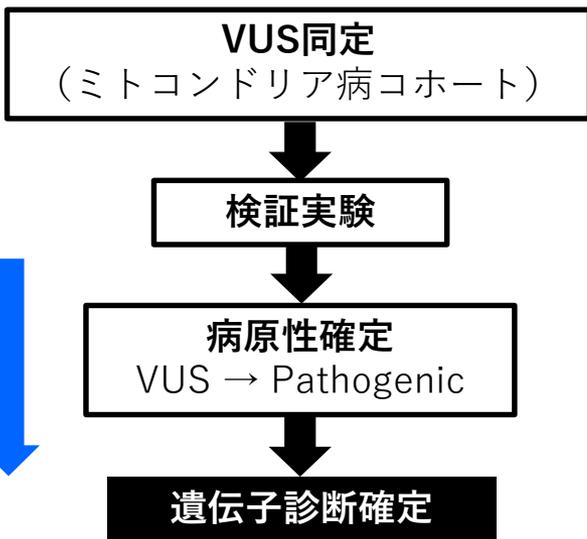
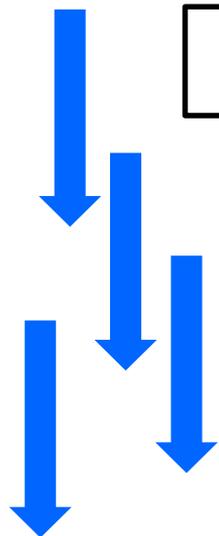
公共データ  
ベースへの  
還元

## 通常の流れ

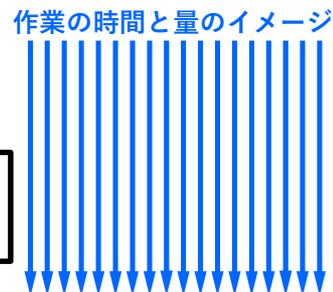
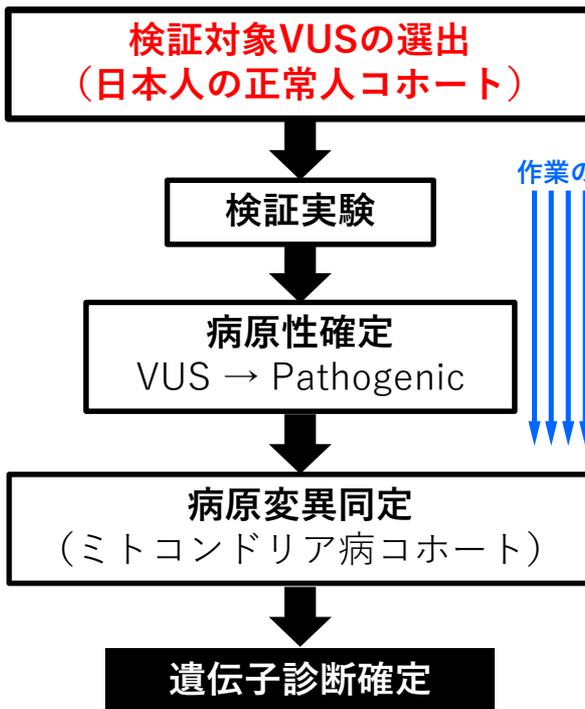
VUS同定から遺伝子診断に至るまで

2ヶ月以上の検証実験が並列に進行するため多くの時間と労力が掛かっていた。

作業の時間と量のイメージ



## 本研究のストラテジー



時間短縮



ハイスループットアッセイにより同時に100以上のVUSを先回りで解決してしまう。

## 核遺伝子

症例数	遺伝子
17	<i>PDHA1</i>
11	<i>NDUFAF6</i>
10	<i>ECHS1</i>
8	<i>SURF1</i>
7	<i>BOLA3</i>
5	<i>DNM1L, RARS2, TAZ</i>
4	<i>ACAD9, AIFM1, DGUOK, POLG</i>
3	<i>GTPBP3, FBXL4, IARS, NDUFB11, NDUFV2, QRSL1, SLC25A4, SUCLA2</i>

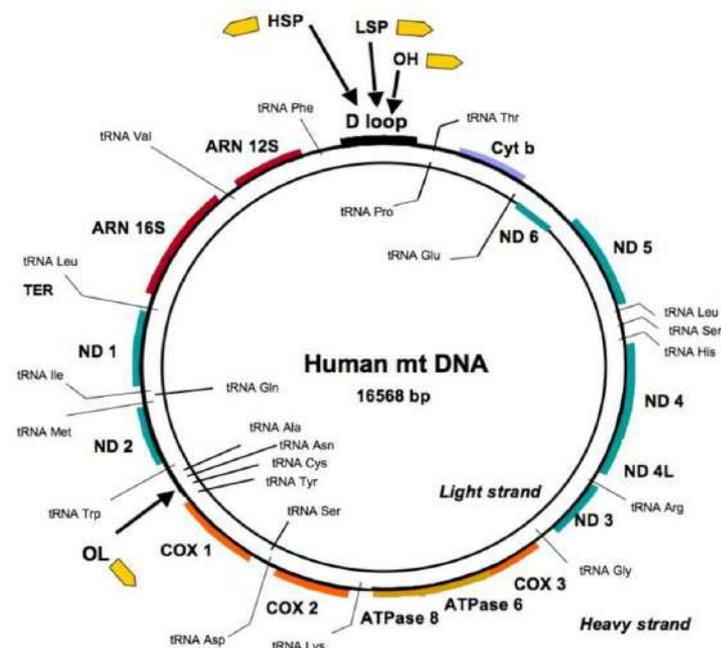
約600のVUS (20遺伝子)



### KO細胞 (HEK293) 作製

*NDUFAF6, ECHS1, SURF1, BOLA3, DNM1L, TAZ, ACAD9, SLC25A4*などの作製済みあるいは作製中。  
*SURF1, BOLA3, DNM1L*についてはノックアウト取得済み。

## ミトコンドリア遺伝子



約100のVUS

(タンパクコードx70, mt-tRNAx30)

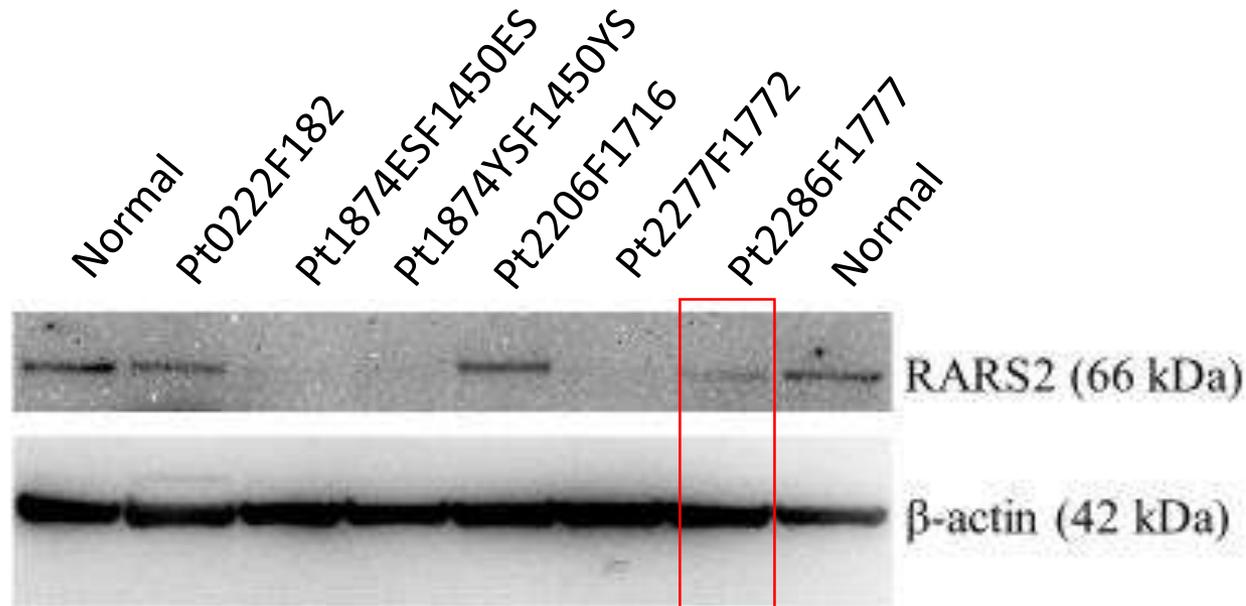


### 患者皮膚線維芽細胞バイオバンク

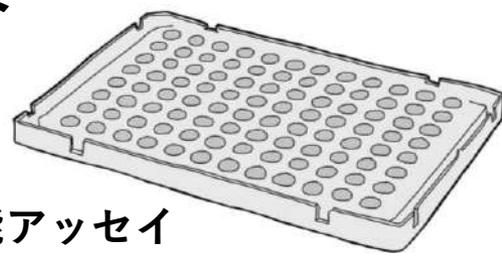
これまでに約2000のストックを蓄積、  
上記の遺伝子異常をもつ細胞を網羅。

# ゲノム解析により同定された *RARS2* のVUS

Pt No.	AA change	3.5KJPNv2.20180625.MAF	
Pt0222	RARS2:NM_001350505:exon16:c.1321C>T:p.L441F	NA	} 論文報告済み (Kohda et al, 2016)
Pt0222	RARS2:NM_001350505:exon16:c.1306G>T:p.D436Y	NA	
Pt1874	RARS2:NM_001350505:exon18:c.1558C>T:p.H520Y	NA	
Pt1874	RARS2:NM_001350505:exon1:c.9C>A:p.C3X	NA	
Pt2206	RARS2:NM_001350505:exon11:c.944G>C:p.R315P	NA	
Pt2286	RARS2:NM_001350505:exon7:c.463G>A:p.A155T	NA	
Pt2286	RARS2:NM_001350505:exon1:c.16C>T:p.R6C	0.0003	



Tommo(jmorph)に登録のあったp.R6Cは病的変異と考えられる



## 96 ウェルマルチプレートを用いたミトコンドリアの機能アッセイ

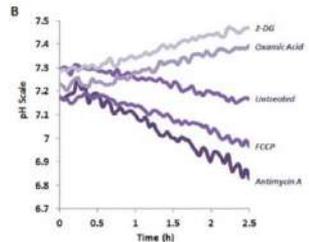
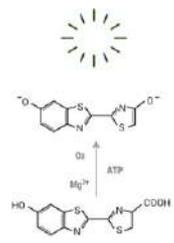
**ATPアッセイ**：ATP 変化(ルシフェラーゼを利用したアッセイ)

**pHアッセイ**：乳酸増加に伴うpH 変化(pH 応答プローブによるアッセイ)

**OCRアッセイ**：酸素消費量(Oxygen consumption rate: OCR)

### ATPアッセイ・pHアッセイ

発光および蛍光をマルチプレートリーダー(PerkinElmer Nivo)で測定し、96穴マルチプレートのそれぞれのウェルで定量値を算出する。

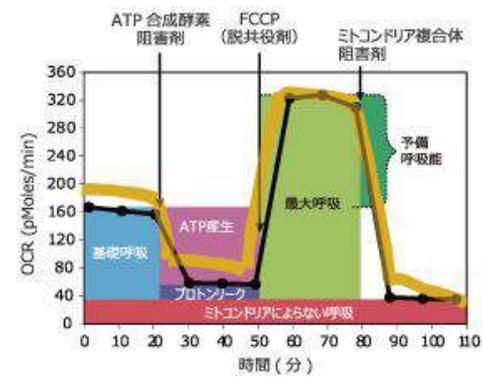


Mito-ID®  
細胞外pHセンサー  
プローブ

CellTiter-Glo® 2.0

### OCRアッセイ

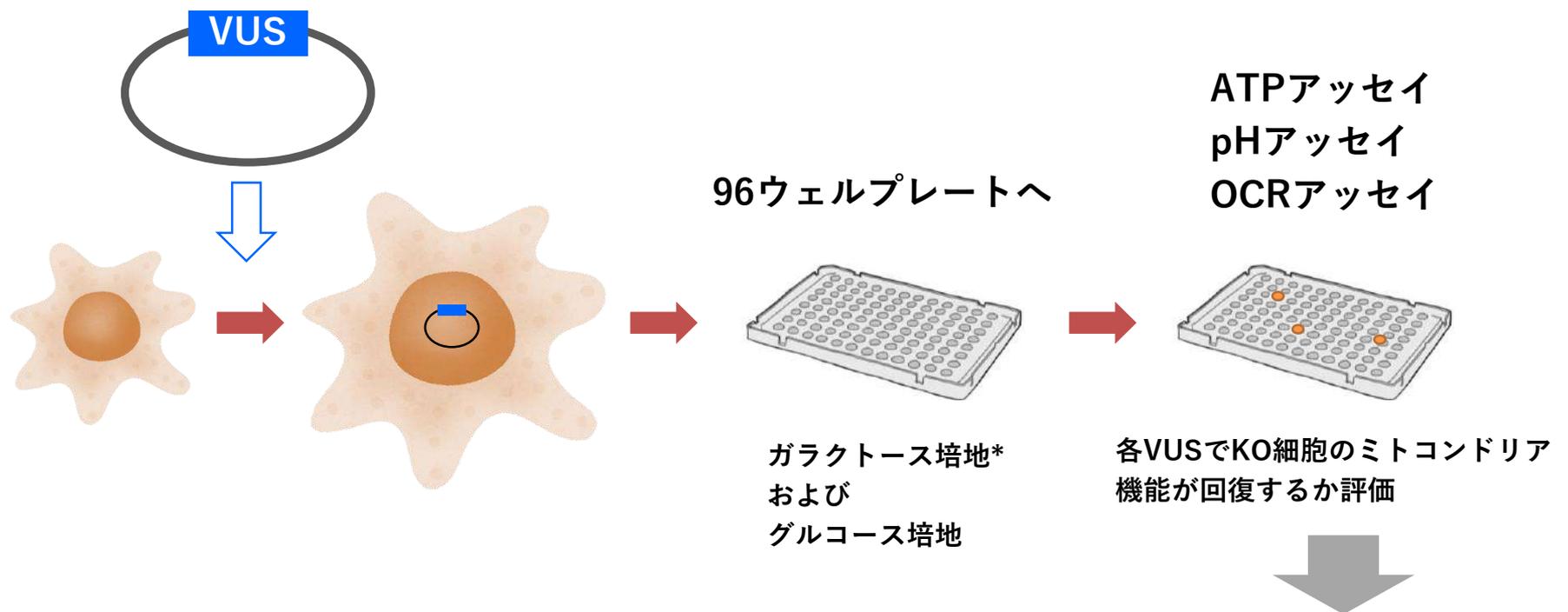
細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies XFe24/XFe96) を用いて96穴マルチプレートで各ウェルの値を算出する。



# 研究計画・方法

核遺伝子（日本人症例に多い20の原因遺伝子; ~600VUS）

細胞（HEK293）	ベクター	遺伝子導入	検証項目
KO細胞	VUSを導入した遺伝子/正常遺伝子	リポフェクション	VUSの有害性
正常細胞			VUSのドミナントネガティブ効果
正常細胞	VUSを導入した遺伝子+GFP/正常遺伝子+GFP		VUSのタンパク質発現への影響



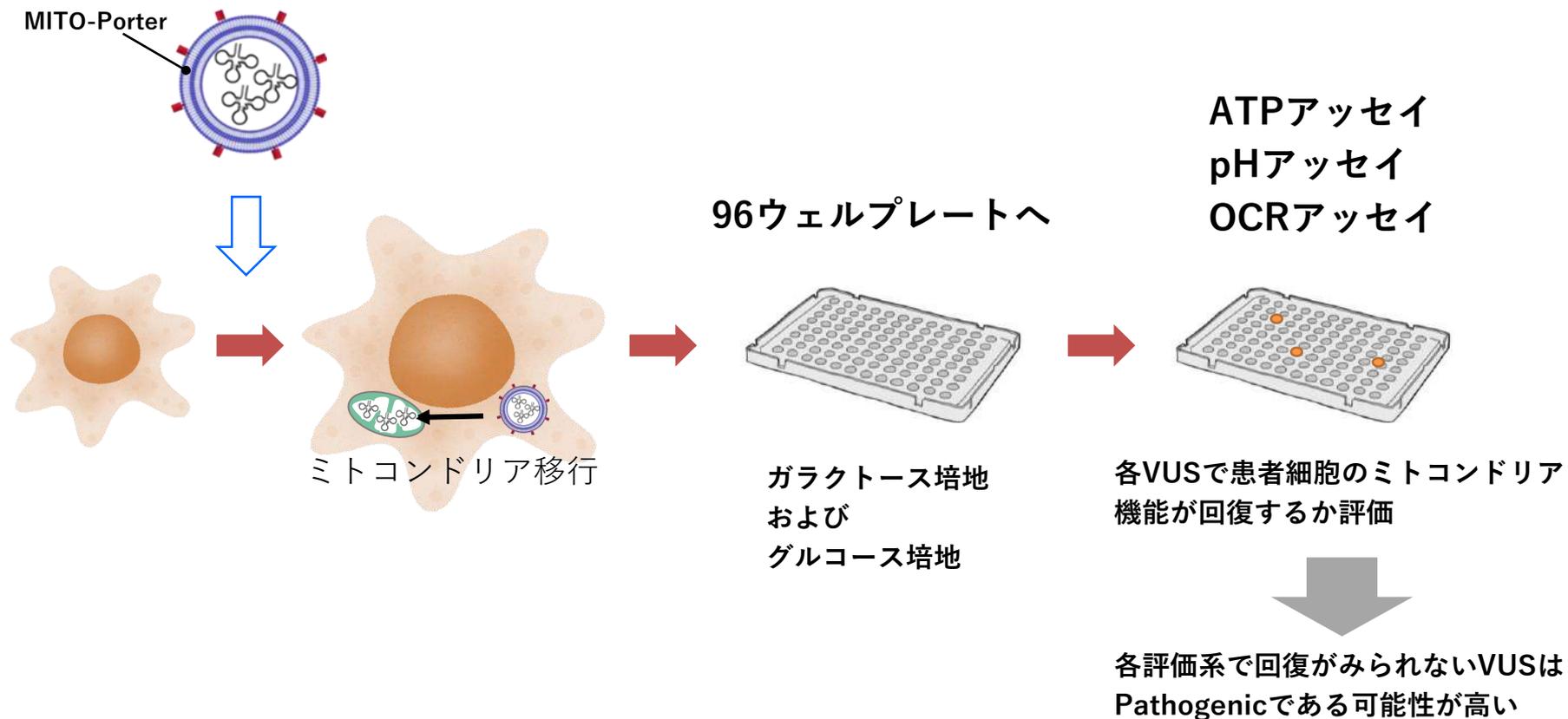
\*ミトコンドリア呼吸はグルコースを主なリソースとするため、これをガラクトースに置き換えることで、細胞にミトコンドリア機能の負荷を与え、ミトコンドリア異常を顕在化できる

各評価系で回復がみられないVUSは Pathogenicである可能性が高い

# 研究計画・方法

## ミトコンドリア遺伝子 (mt-tRNA, ~30/100VUS)

細胞 (線維芽細胞)	ベクター	遺伝子導入	検証項目
患者細胞	MITO-PorterでパックしたVUSを導入した tRNA遺伝子/正常遺伝子	MITO-Porter	VUSの有害性
正常細胞			VUSのドミナントネガティブ効果

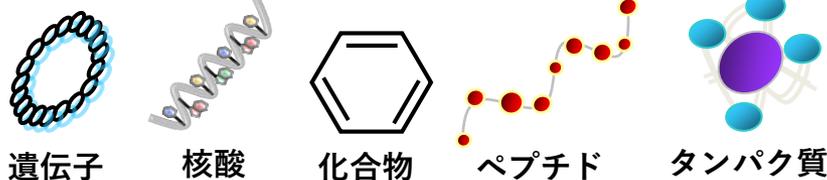


mt-tRNAのVUS評価に対するMITO-Porterを用いた遺伝子導入



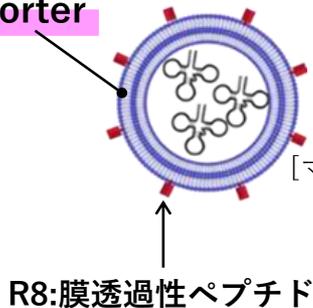
北海道大学 山田勇磨 准教授

送達分子候補



パッケージング

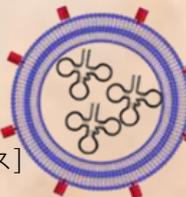
MITO-Porter



1. 細胞導入

[マクロピノサイトーシス]

R8:ミトコンドリア結合素子



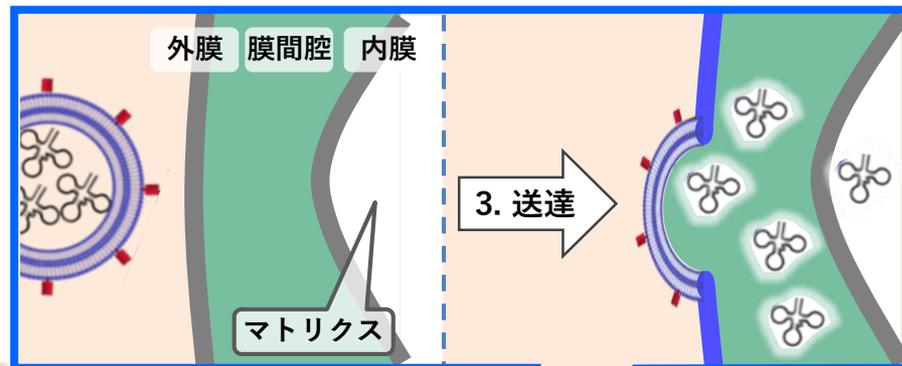
2. ミトコンドリア結合

[静電的相互作用]

細胞質

核

3. ミトコンドリア送達 [膜融合]

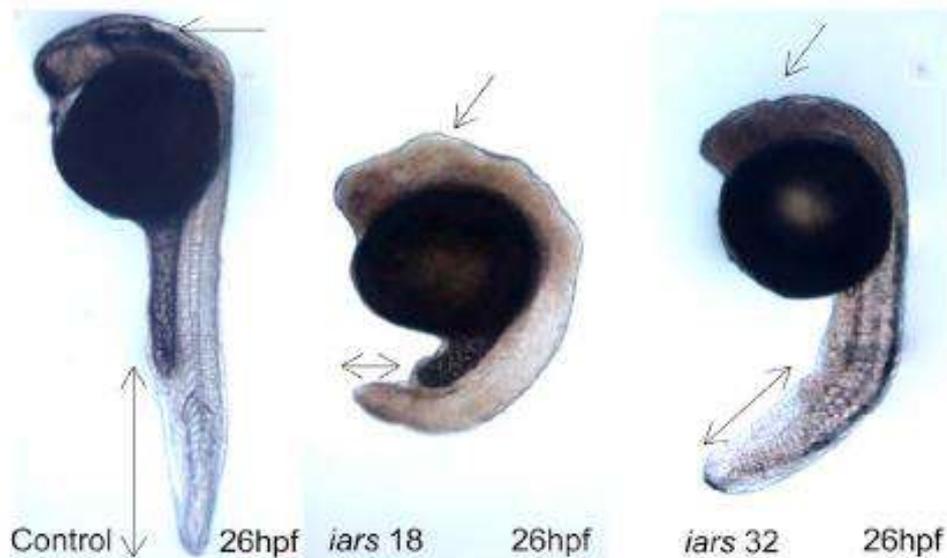


MITO-Porterは膜融合を介してミトコンドリア内へ送達分子を導入するため、送達分子の物性やサイズを制限しないDDSになりえる

## ゼブラフィッシュの利点

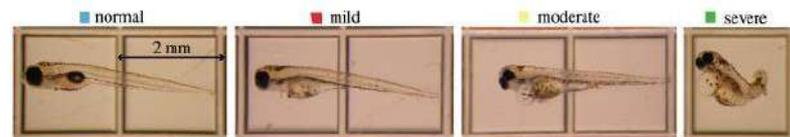
- ・ハイスループットアッセイ系に対応
- ・組織学的なアッセイが簡便
- ・胚発生が早く、発生初期に異常を検出しやすい

申請者らの研究を含め、多くのミトコンドリア病モデルゼブラフィッシュでは発生初期の異常を呈する



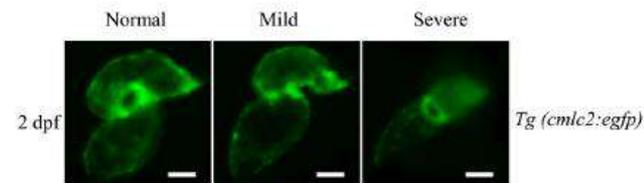
IARS欠損モデル 発生異常と脳の奇形

Murayama, Okazaki et al, AJHG, 2017



SURF1欠損モデル 発生異常

Baden et al, JBC, 2007



GTPBP3欠損モデル 心臓の形成異常

Chen et al, NAR, 2019

# 本研究から期待される効果・医学への貢献

- VUSを先回りして解決することでミトコンドリア病の診断を迅速化できる
- 本研究で得られたバリエーションの評価を公開することにより、他機関で同定されたVUSを解決へと導く
- 原因遺伝子解決から治療への展開を加速する
- 本アッセイ系が、他の疾患研究へ波及することが期待される

# Acknowledgements

研究にご協力頂いた患者様ならびに、連携各病院の主治医に感謝いたします。

## **Juntendo Univ.**

Atsuko Okazaki  
Kazuhiro Nitta  
Ayumu Sugiura  
Yoshihito Kishita  
Yukiko Yatsuka  
Nurun Nahar Borna

## **Saitama Med. Univ.**

Akira Ohtake  
Hiroko Harashima  
Rie Takeuchi  
Megumi Saito

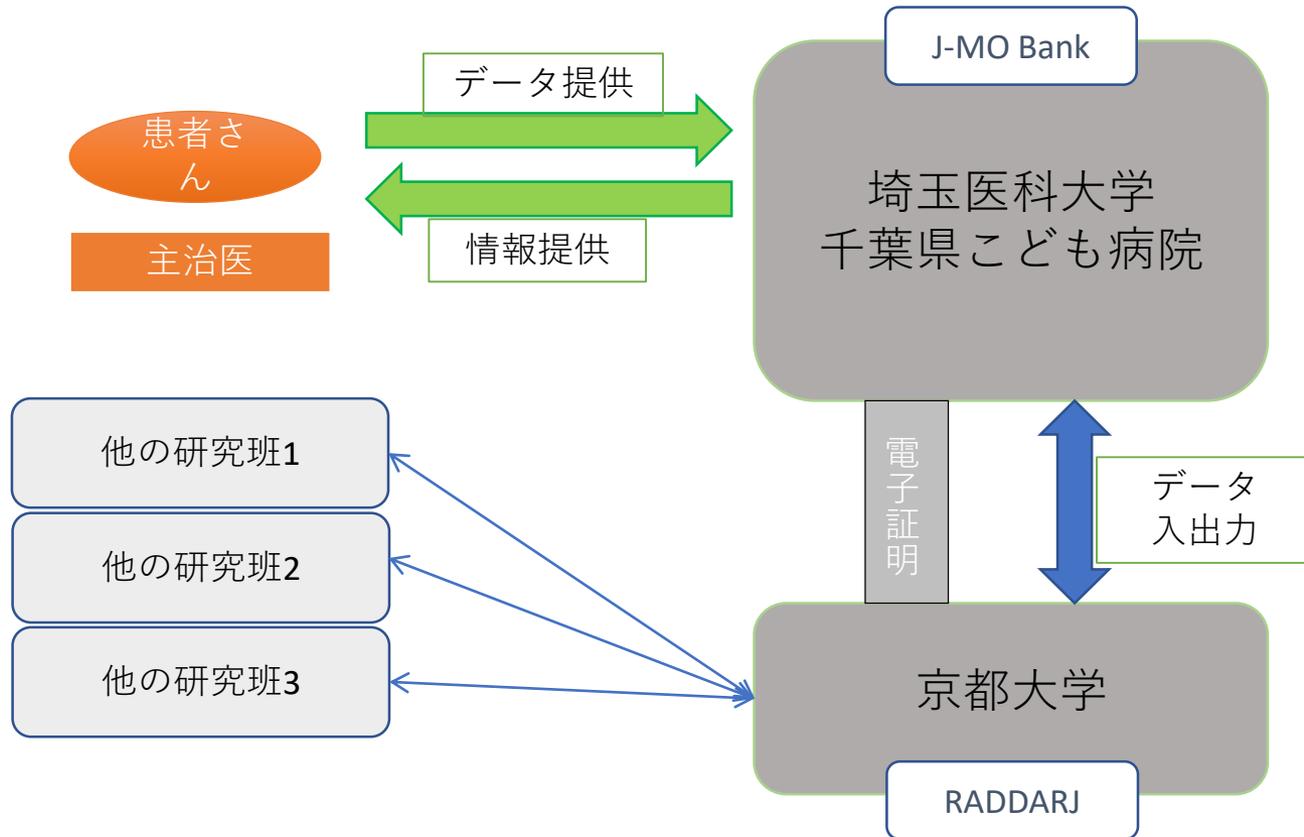
## **Chiba Children's Hospital**

Kei Murayama  
Ayako Matsunaga  
Masaru Shimura  
Takuya Fushimi  
Makiko Tajika  
Keiko Ichimoto  
Minako Tominaga  
Nana Akiyama

## [質 問]

ミトコンドリア病には、いくつかの遺伝子異常が知られており、また、それぞれに病態が異なり、進行度合いも異なります。このような病態の実態を把握するためにも、患者家族会のメンバーが増えることで、病態の実態を知るアンケート調査などが行えると思います。このようなアンケート調査は医学的に有効であるかどうかをお聞きしたい。

# これからのJ-MO Bank/RADDARJ

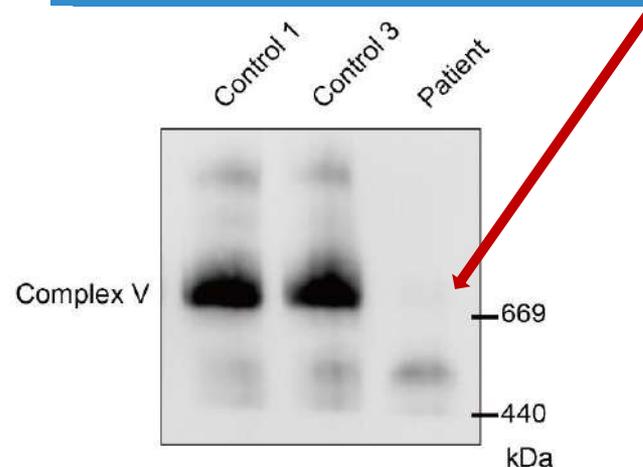
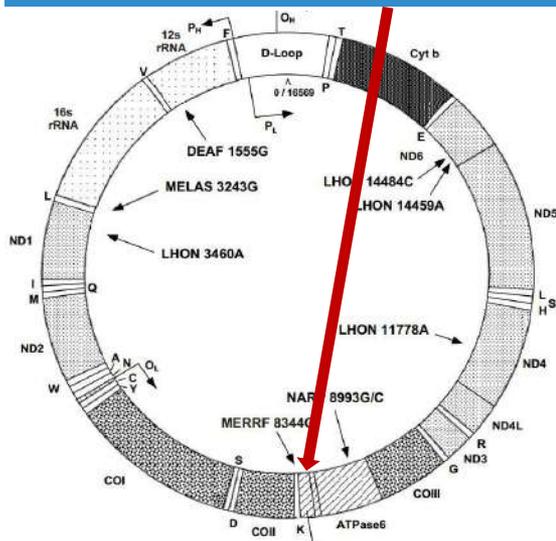


# 進行する肥大型心筋症により死亡した5カ月女児



8528番目の塩基に点変異  
=ATPase6と8の重複領域

患者心筋で  
ATP合成酵素が消失



# 本論文により変異が確定し患者さんへも発信

## MITOMAP: Reported Mitochondrial DNA Base Substitution Diseases: Coding and Control Region Point Mutations

We will be happy to change the status of 8528C. The studies are very convincing, and the variant itself is quite interesting, being in the the ATP8/6 overlap region.

Position	Locus	Disease	Allele	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Homoplasmy	Heteroplasmy	Status	GB Frequency	References
8528	MT-ATP8 / 6	Infantile cardiomyopathy	T8528C	T-C	W-R (ATP8); M(start)-T (ATP6)	+	+	Confirmed	0	3
8529	MT-ATP8 / 6	Apical HCM	G8529A	G-A	W-X (ATP8); M-M (ATP6)	+	-	Reported	0	1

確定

報告

### MITOMAP References for Mutation T-C at 8528

- Imai, A., Fujita, S., Kishita, Y., Kohda, M., Tokuzawa, Y., Hirata, T., Mizuno, Y., Harashima, H., Nakaya, A., Sakata, Y., Takeda, A., Mori, M., Murayama, K., Ohtake, A., Okazaki, Y. (2016) [Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATPase 6 and 8 protein](#) International Journal of Cardiology . 207 ( ): 203-205 .
- Pereira, L., Soares, P., Radivojac, P., Li, B., Samuels, D. C. (2011) [Comparing phylogeny and the predicted pathogenicity of protein variations reveals equal purifying selection across the global human mtDNA diversity](#) American Journal of Human Genetics . 88 (4): 433-439 .
- Ware, S. M., El-Hassan, N., Kahler, S. G., Zhang, Q., Ma, Y. W., Miller, E., Wong, B., Spicer, R. L., Craigen, W. J., Kozel, B. A., Grange, D. K., Wong, L. J. (2009) [Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes](#) Journal of Medical Genetics . 46 (5): 308-314 .

## 本論文によりm.8528T>Cは心筋症の“確定”変異として登録

Hi,

I just read your publication on the above mentioned mutation. My daughter is patient 1 in the 2009 publication of this mutation by Dr Ware , she is now 12 yrs old and we travel to the US of A every 6 months for her cardio check up at Cincinnati Childrens Hospital , we live in Trinidad . I am interested in any information you may have on this mutation.

Thank you,



論文を読んだ患者の母親から治療法に関する問い合わせ