

【トピックス】

ミトコンドリア病診断マーカー GDF15 の同定と老年医学への応用

藤田 泰典

東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム

キーワード：ミトコンドリア病、GDF15、高齢者、疫学研究、総死亡

1. はじめに

ミトコンドリア病は、ミトコンドリア DNA または核 DNA の変異・欠失によるミトコンドリア機能障害を原因とする遺伝性疾患である [1]。一方、加齢に伴いミトコンドリア DNA 変異が蓄積することやミトコンドリア呼吸活性などが低下することが報告されている。近年、マイトファジー、慢性炎症、幹細胞機能などと老化・老化関連疾患との関係が注目されており、それらとミトコンドリアとの関係も示唆されている [2]。しかしながら、ミトコンドリア機能障害が老化・老化関連疾患に関与する分子メカニズムは十分には明らかにされていない。そのため、ミトコンドリア機能障害を有する細胞の解析は、ミトコンドリア病だけでなく老化・老化関連疾患の研究においても重要であると考えられる。そこで、我々は、ミトコンドリア病患者の細胞から樹立されたサイブリッドと呼ばれる細胞株のトランスクリプトーム及びメタボローム解析を行ってきた。最近、これらサイブリッドの解析から、ミトコンドリア病の診断マーカーとして GDF15 を同定した。また、この成果をもとに、高齢者における血中 GDF15 の意義の解明を目的とした研究にも取り組んでいる。今回は、これらミトコンドリア病の基礎・臨床研究と、GDF15 に着目した疫学研究の内容について紹介する。

2. ミトコンドリア病の診断マーカー GDF15 の同定

1) ミトコンドリア病のバイオマーカー

ミトコンドリア病では、主にエネルギー需要の高い脳、骨格筋、心筋で症状が現れるが、多臓器において多彩な臨床症状を呈する [1]。また、患者によって症状が現れる臓器や重症度は様々である。症状を呈する組織では、ミトコンドリア機能障害に伴う ATP 産生の低下により解糖系が亢進し、乳酸が過剰に産生されることから、血

中の乳酸/ピルビン酸比 (L/P 比) はミトコンドリア機能障害を評価するマーカーとして臨床的に利用されている。しかしながら、臨床症状と相関しない場合もあり、診断や治療効果判定に有用な新たなバイオマーカーが求められている。

2) ミトコンドリア病研究に有用なサイブリッド

サイブリッド (cybrid) は、ミトコンドリア DNA を除去した細胞と、細胞核を除いた患者由来の細胞を融合して樹立した細胞株であり、核 DNA が同一でミトコンドリア DNA が異なる [3]。そのためサイブリッドは、ミトコンドリア DNA 変異・欠失がミトコンドリアの呼吸鎖活性や細胞機能に与える影響を調べるために広く使用されてきた。我々は、ミトコンドリア病の一種である Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes (MELAS) 患者由来の細胞から樹立された 2SD 細胞と 2SA 細胞を用いて研究を行ってきた。2SD 細胞は、約 90% のミトコンドリア DNA に MELAS の原因となる mt.3243A>G 変異があり、ミトコンドリアの呼吸鎖活性が低下している。一方、2SA 細胞は、野生型のミトコンドリア DNA だけを有し、ミトコンドリアの機能は正常である。

3) サイブリッドに対するピルビン酸投与と乳酸曝露の影響

我々は、これらサイブリッドのメタボローム解析から、ピルビン酸投与が 2SD 細胞のエネルギー代謝障害を改善し、乳酸曝露がエネルギー代謝障害を増悪することを明らかにした [4]。具体的には、ピルビン酸投与によりミトコンドリア機能障害に伴う NADH/NAD⁺ 比の上昇が抑えられ、解糖系での ATP 産生が維持された。一方、乳酸曝露は NADH/NAD⁺ 比の上昇を促進し、解糖系での ATP 産生を低下させた。このように、ピルビン酸投与はピルビン酸療法によりエネルギー代謝が改善された状態を、乳酸曝露は高乳酸血症を呈するほどエネルギー代謝障害が増悪した状態を反映するモデルとして有用であると考えられた。

連絡先：藤田泰典 〒173-0015

東京都板橋区栄町 35-2

TEL：03-3964-3241

FAX：03-3579-4776

E-mail：yfujita@tmig.or.jp

4) 網羅的遺伝子発現解析によるバイオマーカー探索

我々は、ミトコンドリア病の診断や治療効果判定に有用な新規バイオマーカーを探索するために、ピルビン酸投与または乳酸曝露を行ったサイブリッドの網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、乳酸を曝露した2SD細胞でGrowth Differentiation Factor 15 (GDF15)の遺伝子発現が顕著に増加していた。このGDF15の遺伝子発現上昇は、2SA細胞では認められなかった。また、遺伝子発現変化と一致して、GDF15の分泌量は、2SA細胞よりも2SD細胞の方が多く、乳酸曝露によりさらに増加することがわかった。これらの結果から、GDF15はミトコンドリア機能障害によるエネルギー代謝障害を反映し、ミトコンドリア病の診断、治療効果判定に有用なバイオマーカー候補になることが示唆された[5]。

5) ミトコンドリア病の診断における血中GDF15の有用性

GDF15の臨床的有用性を検証するために、ミトコンドリア病患者の血中GDF15濃度を調べた結果、健康者と比較して約6倍に増加していた[6]。また、血中GDF15濃度はミトコンドリア病の重症度スコアと相関がみられた(相関係数 $r = 0.76$, $p < 0.001$)。さらに、ROC解析を行った結果、GDF15とL/P比の曲線下面積(AUC)が0.997、0.919であり、GDF15がよりも高い診断精度を示した。今後、診断薬の開発が進み、臨床研究が広く実施されることで、ミトコンドリア病における血中GDF15の臨床的意義が確立されるものと期待される。

3. GDF15の老年医学への応用

1) GDF15の発現と機能

GDF15はTGF- β スーパーファミリーに属する分泌タンパクであり、前立腺、腸、腎臓、脈絡叢、胎盤などで顕著に発現している。また、他の組織・細胞においても、

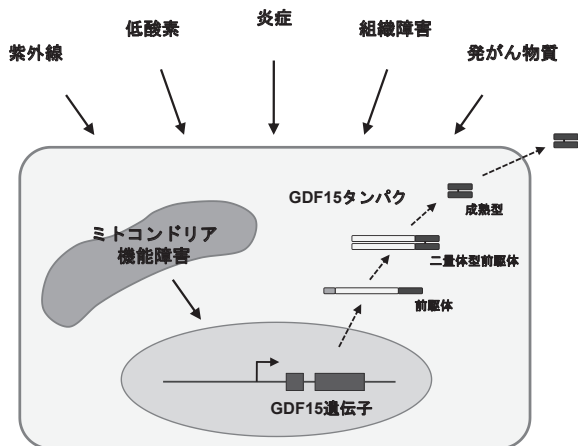


図1 GDF15の遺伝子発現誘導と細胞外分泌

GDF15は炎症、低酸素、紫外線、組織障害、発がん物質などに加え、ミトコンドリア機能障害により遺伝子発現が誘導される。通常、GDF15タンパクは前駆体、二量体型前駆体を経て成熟型となり細胞外に分泌される。

低酸素、炎症、UV曝露、組織傷害などのストレスに反応してGDF15の遺伝子発現が誘導される(図1)[7]。このような発現制御に関与する転写因子として、p53、Egr-1、NF- κ B、ATF3、HIF-1 α などが報告されている。我々が行った網羅的遺伝子発現解析では、ミトコンドリア機能障害で発現誘導された遺伝子の中に、p53とATF3の下流の遺伝子が多数見られたことから、ミトコンドリア機能障害によるGDF15の遺伝子発現誘導には、p53やATF3が関与している可能性が考えられた。一方、GDF15タンパクの機能として、抗炎症、心筋保護、神経保護、食欲・代謝調節作用などが報告されている[7, 8]。また、癌細胞の増殖、転移、治療耐性などに関与することも明らかにされている(図2)[9]。

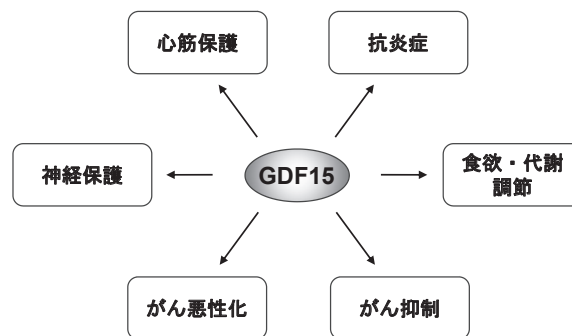


図2 GDF15の機能

GDF15タンパクは、抗炎症、心筋保護、神経保護作用を有する。また、食欲・代謝を調節する働きがある。一方、がんの悪性化に関与することが知られているが、がん抑制的に機能することも報告されている。

2) 血中GDF15と疾患・病態との関連

血中GDF15濃度に注目した臨床研究の報告は多数あり、癌、心血管疾患、腎疾患、貧血などの疾患・病態と血中GDF15との関連性が示唆されている[7]。また興味深いことに、近年の研究により、血中GDF15濃度が高齢者の認知機能障害と関連し、将来の認知機能低下の予測因子となることが報告された[10]。さらに、MRIによる高齢者の脳構造を解析した研究では、血中GDF15濃度が高いほど灰白質体積が低く、白質線維の統合性と関連する異方性度が低いことが示されている[11, 12]。今後、GDF15の認知機能低下、認知症との関連およびそのメカニズムの解明が期待される。

3) 高齢者の血中GDF15濃度と総死亡との関連

近年、高齢者の血中GDF15濃度が将来の総死亡の予測因子となることが報告されている[13, 14]。しかしながら、身体機能、栄養状態、心理・社会的機能などの交絡要因を調整した上での、血中GDF15濃度と総死亡の独立した関連性は明らかにされていない。そこで、地域在住高齢者1832人を対象に、血中GDF15濃度と身体機能、栄養状態、心理・社会機能との横断的な関連性及び将来の総死亡との関連性を検討した。その結果、血中GDF15濃度が高いほど身体機能が低く、炎症マーカー

が高いことがわかった。さらに、対象者を血中 GDF15 濃度により四分位に分けた場合、最高値群は最低値群と比較して将来の総死亡の発生リスクが約 2 倍高いことが明らかになった。

4. おわりに

ミトコンドリア機能障害を有する細胞が分泌するタンパクや、それらが周囲の細胞に与える影響に関する報告は限られている。老化・老化関連疾患のメカニズムの解明において、ミトコンドリア機能障害を有する細胞から分泌されるタンパクが、新たな標的になるかも知れない。今後、GDF15 に着目した基礎研究に加え、臨床・疫学研究も推進していきたいと考えている。

謝辞

本研究の実施にあたり多大なご協力を頂きました伊藤雅史研究部長、新開省二副所長、谷口優氏（東京都健康長寿医療センター研究所）、田中雅嗣部長（東京都健康長寿医療センター）、小島俊男氏（豊橋技術科学大学）、古賀靖敏氏、八ッ賀秀一氏（久留米大学小児科）に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Vafai SB, Mootha VK: Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 2012, 491 (7424) :374-383.
2. Sun N, Youle RJ, Finkel T: The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell* 2016, 61 (5) :654-666.
3. Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH: Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrial pathologies. *Redox Biol* 2014, 2C:619-631.
4. Kami K, Fujita Y, Igarashi S, Koike S, Sugawara S, Ikeda S, Sato N, Ito M, Tanaka M, Tomita M et al: Metabolomic profiling rationalized pyruvate efficacy in cybrid cells harboring MELAS mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion* 2012, 12 (6) :644-653.
5. Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S, Koga Y, Tanaka M: GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 2015, 20:34-42.
6. Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A, Fukumoto Y, Arahata H, Kakuma T, Kojima T, Ito M, Tanaka M, Saiki R et al: Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann Neurol* 2015, 78 (5) :814-823.
7. Unsicker K, Spittau B, Kriegstein K: The multiple facets of the TGF-beta family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013, 24 (4) :373-384.
8. Fujita Y, Taniguchi Y, Shinkai S, Tanaka M, Ito M: Secreted growth differentiation factor 15 as a potential biomarker for mitochondrial dysfunctions in aging and age-related disorders. *Geriatr Gerontol Int* 2016, 16 Suppl 1:17-29.
9. Wang X, Baek SJ, Eling TE: The diverse roles of nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1/GDF15) in cancer. *Biochem Pharmacol* 2013, 85 (5) :597-606.
10. Fuchs T, Trollor JN, Crawford J, Brown DA, Baune BT, Samarasinghe K, Campbell L, Breit SN, Brodaty H, Sachdev P et al: Macrophage inhibitory cytokine-1 is associated with cognitive impairment and predicts cognitive decline - the Sydney Memory and Aging Study. *Aging Cell* 2013, 12 (5) :882-889.
11. Jiang J, Trollor JN, Brown DA, Crawford JD, Thal-amuthu A, Smith E, Breit SN, Liu T, Brodaty H, Baune BT et al: An inverse relationship between serum macrophage inhibitory cytokine-1 levels and brain white matter integrity in community-dwelling older individuals. *Psychoneuroendocrinology* 2015, 62:80-88.
12. Jiang J, Wen W, Brown DA, Crawford J, Thal-amuthu A, Smith E, Breit SN, Liu T, Zhu W, Brodaty H et al: The relationship of serum macrophage inhibitory cytokine-1 levels with gray matter volumes in community-dwelling older individuals. *PLoS One* 2015, 10 (4) :e0123399.
13. Wiklund FE, Bennet AM, Magnusson PK, Eriksson UK, Lindmark F, Wu L, Yaghouyfam N, Marquis CP, Stattin P, Pedersen NL et al: Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) : a new marker of all-cause mortality. *Aging Cell* 2010, 9 (6) :1057-1064.
14. Daniels LB, Clopton P, Laughlin GA, Maisel AS, Barrett-Connor E: Growth-differentiation factor-15 is a robust, independent predictor of 11-year mortality risk in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Circulation* 2011, 123 (19) :2101-2110.