

ミトコンドリア病研究公開フォーラム  
2021年1月23日

# ミトコンドリア病の研究最前線

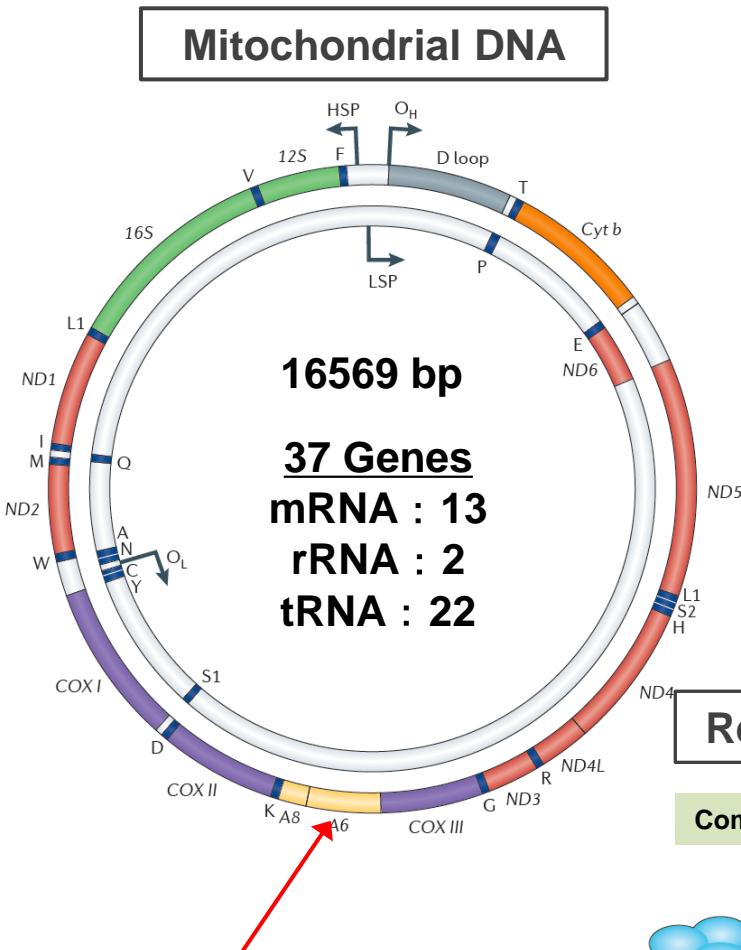
順天堂大学大学院 神経学講座  
IMS三芳総合病院 臨床検査科  
田中 雅嗣



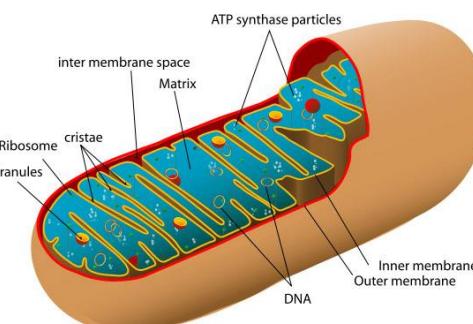
# ミトコンドリア病の診断・治療

1. 制限酵素による治療 (MLS-CoxIV-Smal)
2. ピルビン酸ナトリウムの臨床治験
3. ミトコンドリア病の診断薬開発 (GDF15)
4. 非侵襲的呼気分析 ( $[^{13}\text{C}]\text{-Pyr}$ )
5. 細胞内過還元改善療法 (LOXCAT)
6. ゲノム編集 (CRISPR-Cas9)
7. 新しい遺伝子治療法 (TALE-DddA-UGI)
8. GDF15受容体 (GFRAL) と抗体医薬

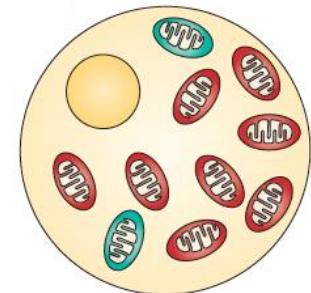
# ミトコンドリアDNA (mtDNA)



**Mitochondria**

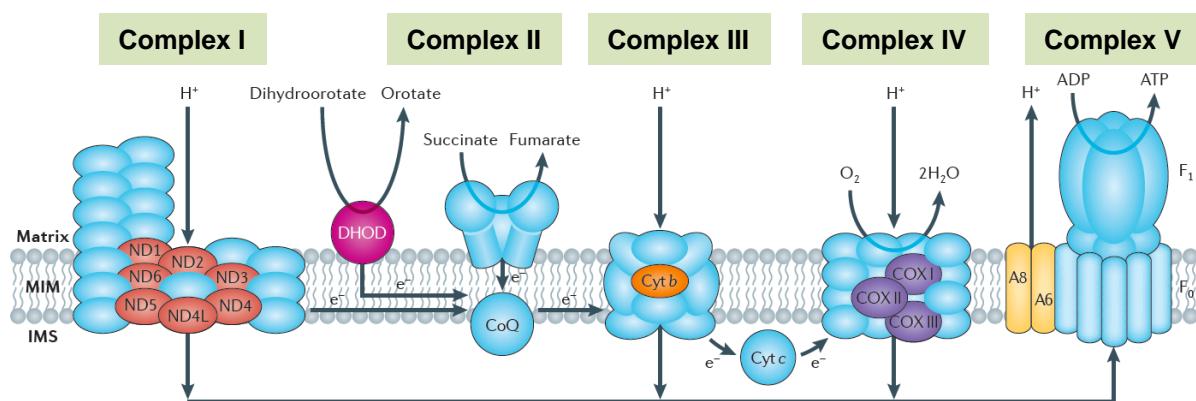


**Cell**



**Heteroplasmy**  
Presence of mutant and wild-type mtDNA in a cell

**Respiratory Chain: Oxidative Phosphorylation System**



**NARP mutation**  
**m.8993T>G**  
**ATP6 p.L156R**

# m.8993T>G変異に基づくNARP病に対する制限酵素を用いた遺伝子治療法

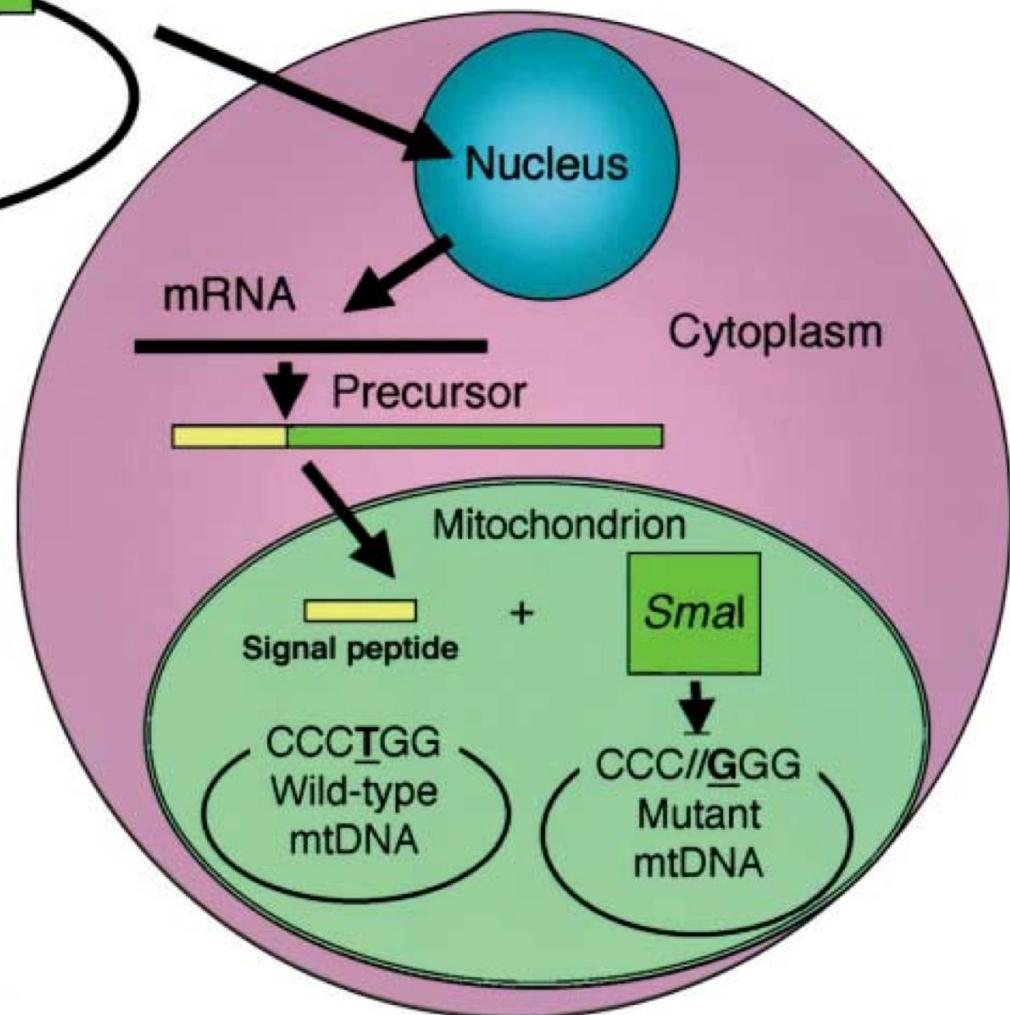
pCoxIV SmaI

Expression vector  
pMACSK<sup>k</sup>II

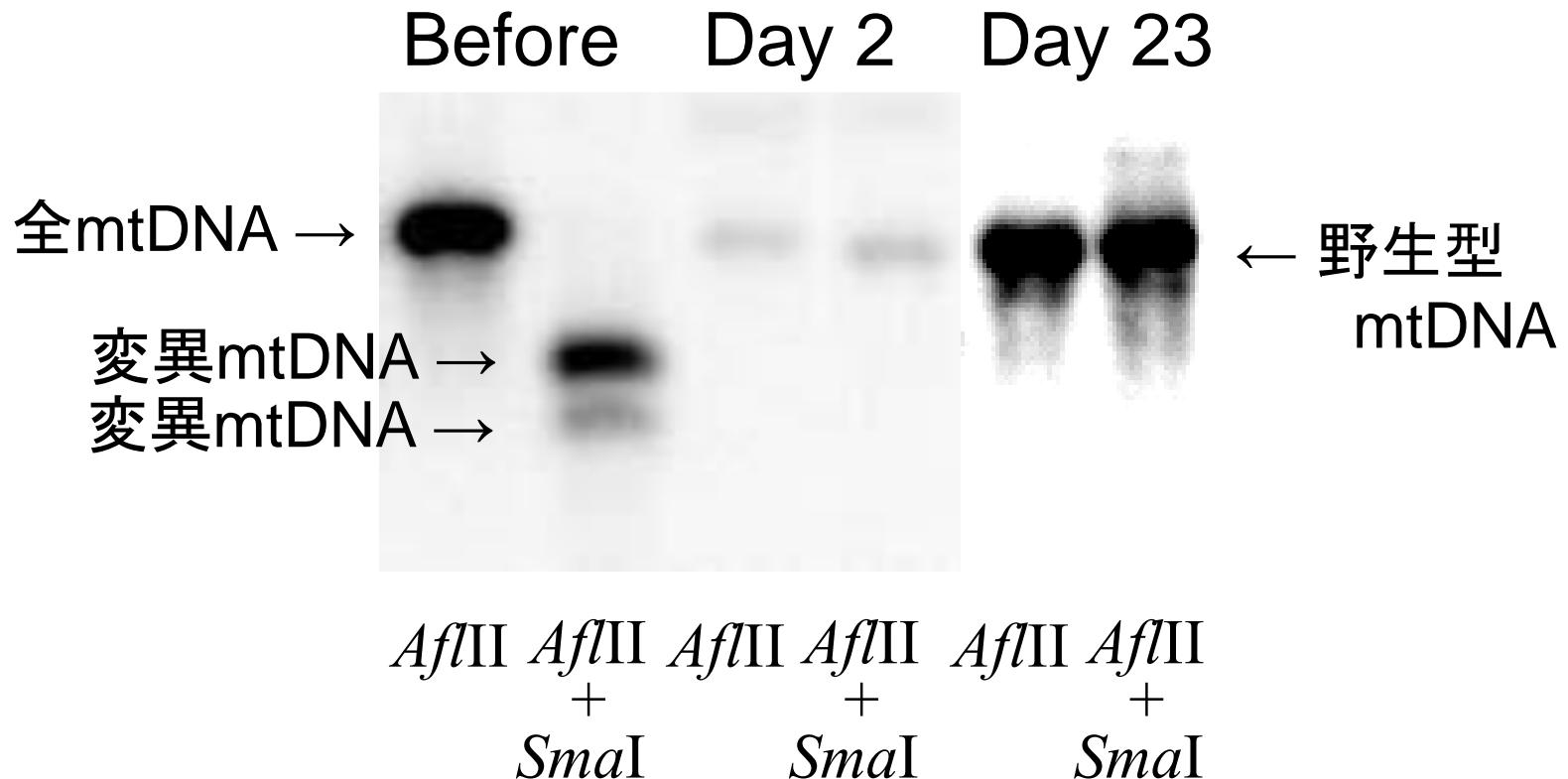
ミトコンドリアに  
**制限酵素を**  
送り込む



完全なる治癒

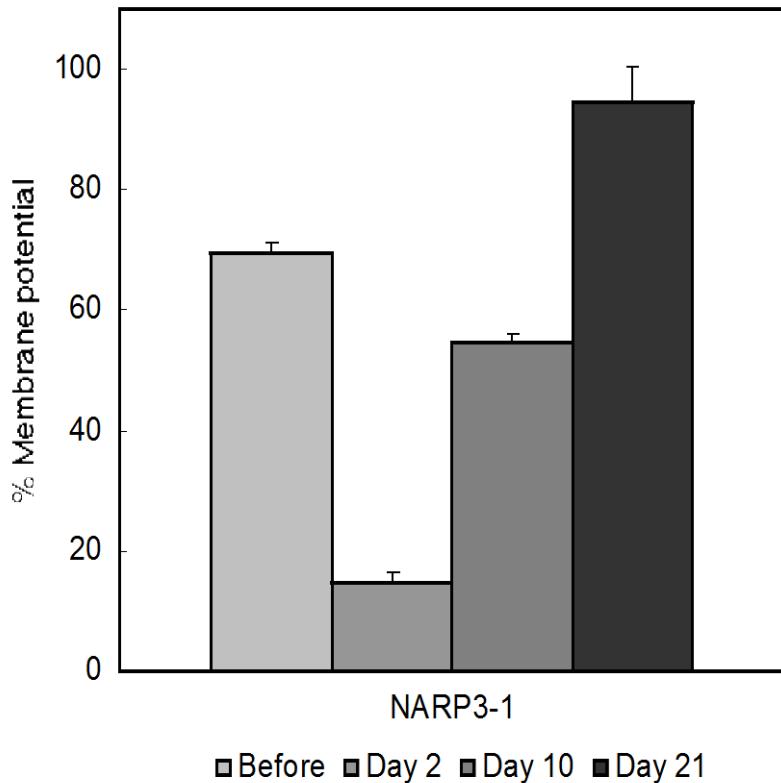


# 変異mtDNAの排除と野生型mtDNAの復権

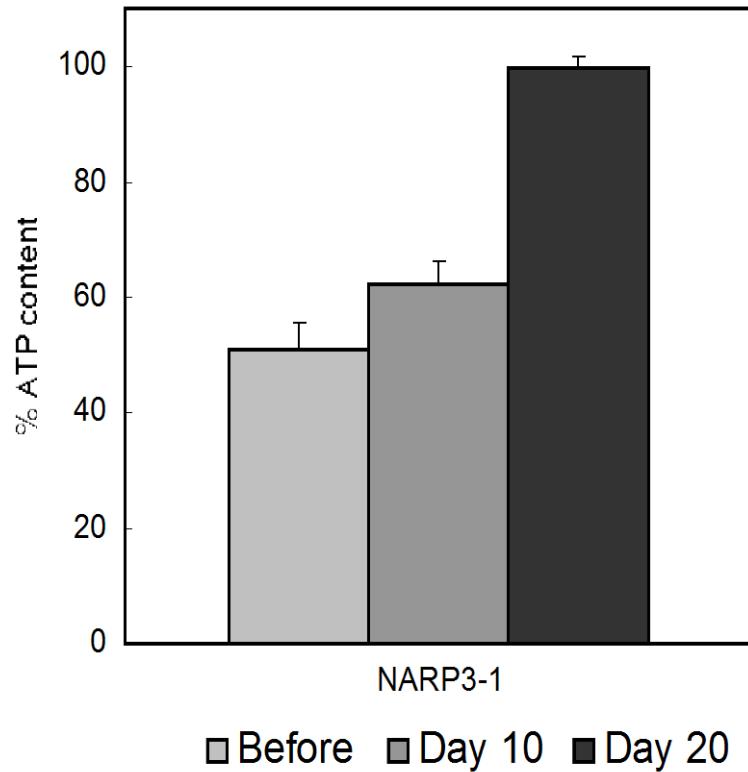


NARP3-1サイブリッドに遺伝子導入し3週間培養した  
サザンプロット解析

# 遺伝子導入後にミトコンドリア膜電位とATPレベルが正常化した

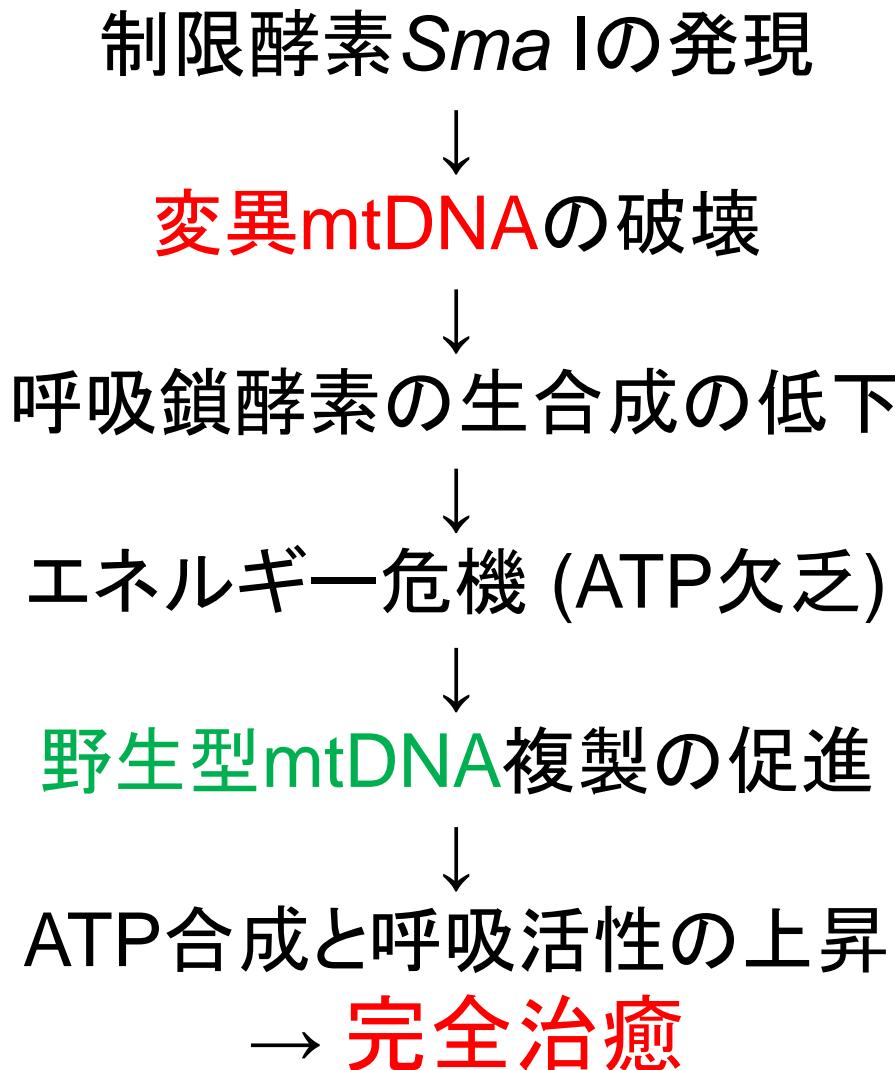


% 膜電位  
細胞の蛍光測定



細胞内ATP含量  
ルシフェラーゼ法

# ミトコンドリア遺伝子治療の過程



# 結論と今後への展望

我々は制限酵素*Sma* Iをミトコンドリアに輸入し  
変異型mtDNAを選択的に除去した

## 解決すべき問題

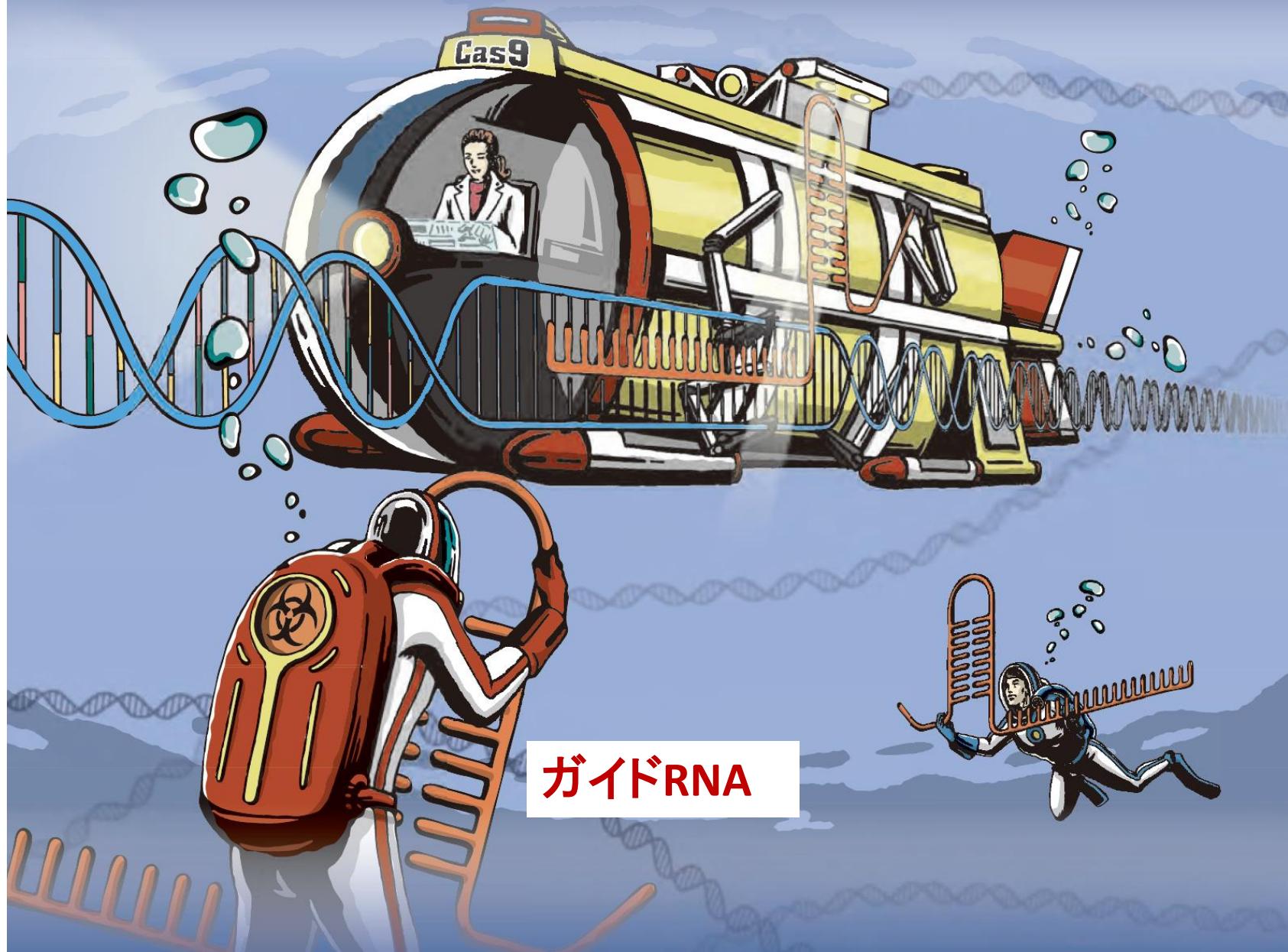
1. どのようにm.3243A>G 変異を特異的に攻撃する酵素を設計できるか？
2. どのように遺伝子を骨格筋・心筋・脳に送り届けることができるか？
3. どのように遺伝子治療の間のエネルギー危機を克服できるか？

2020年 ノーベル化学賞「ゲノム編集」  
生命の設計図を操る最先端技術  
品種改良や病気の治療

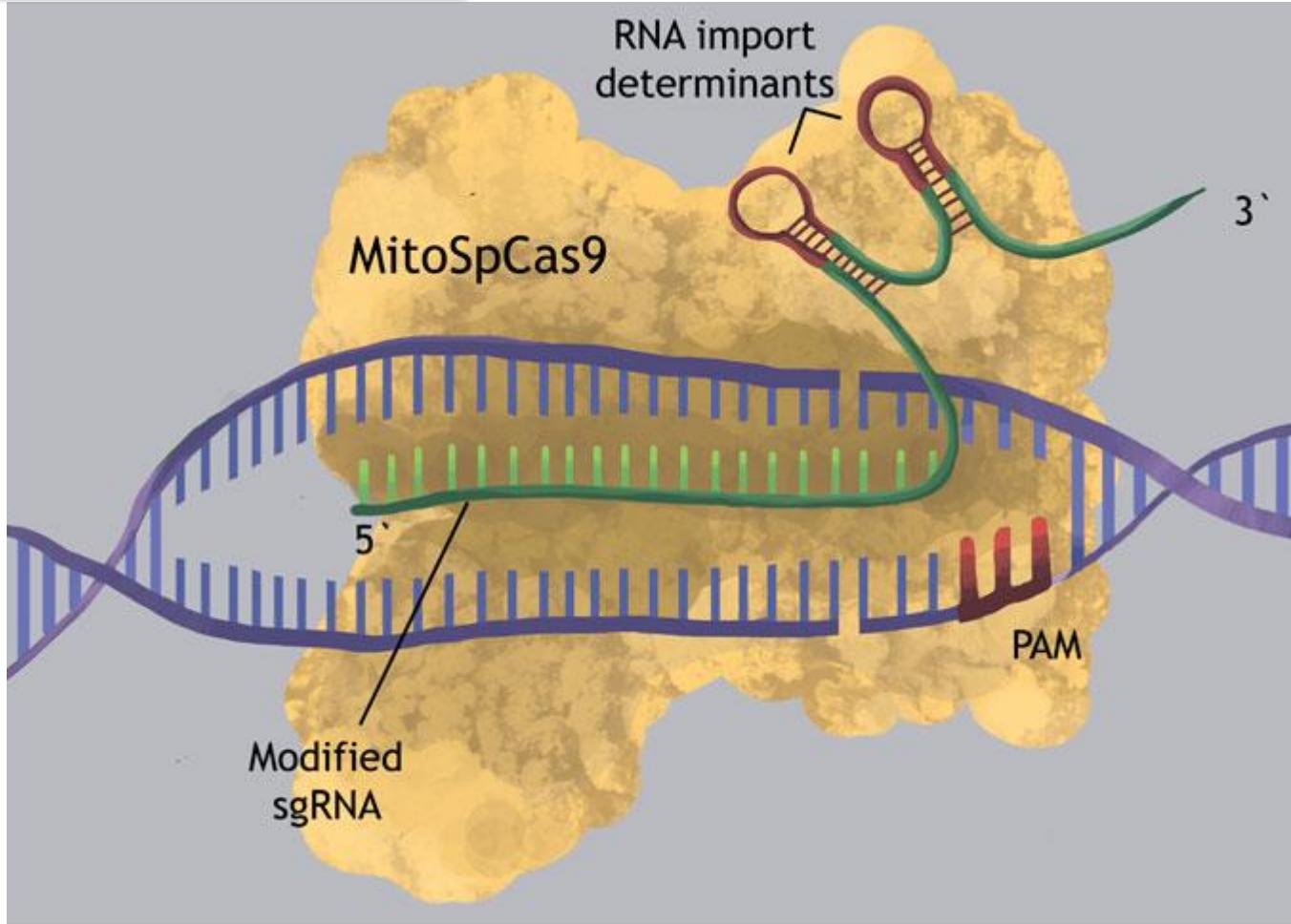


リライティング・ザ・コード・オブ・ライフ  
エマニュエル・シャルパンティエ ジェニファー・ダウドナ

# CRISPR/Cas9によるゲノム編集



# mitoRGGen/SpCas9



ヌクレアーゼにミトコンドリアの標的シグナルを付加する。  
ガイドRNAにRNAインポート決定因子に付加する(現時点ではヒトミトコンドリアへの  
RNAインポートの4つの決定要因: MRP、RP、HDおよびHF)。  
ヘアピン構造をガイドRNAの足場構造(テトラループ・ステムループ)の中に導入する。

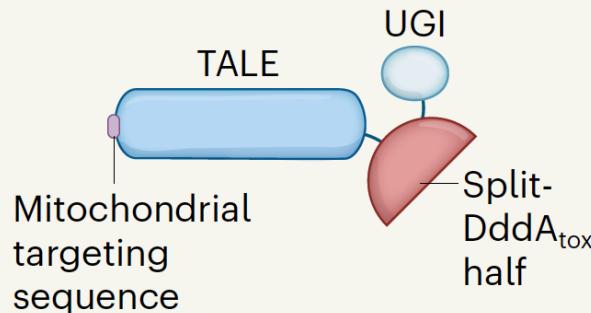
## 問題点

- ◎ ミトコンドリアにCas9を送り込む
- ✗ ミトコンドリアにsgRNAを送り込む

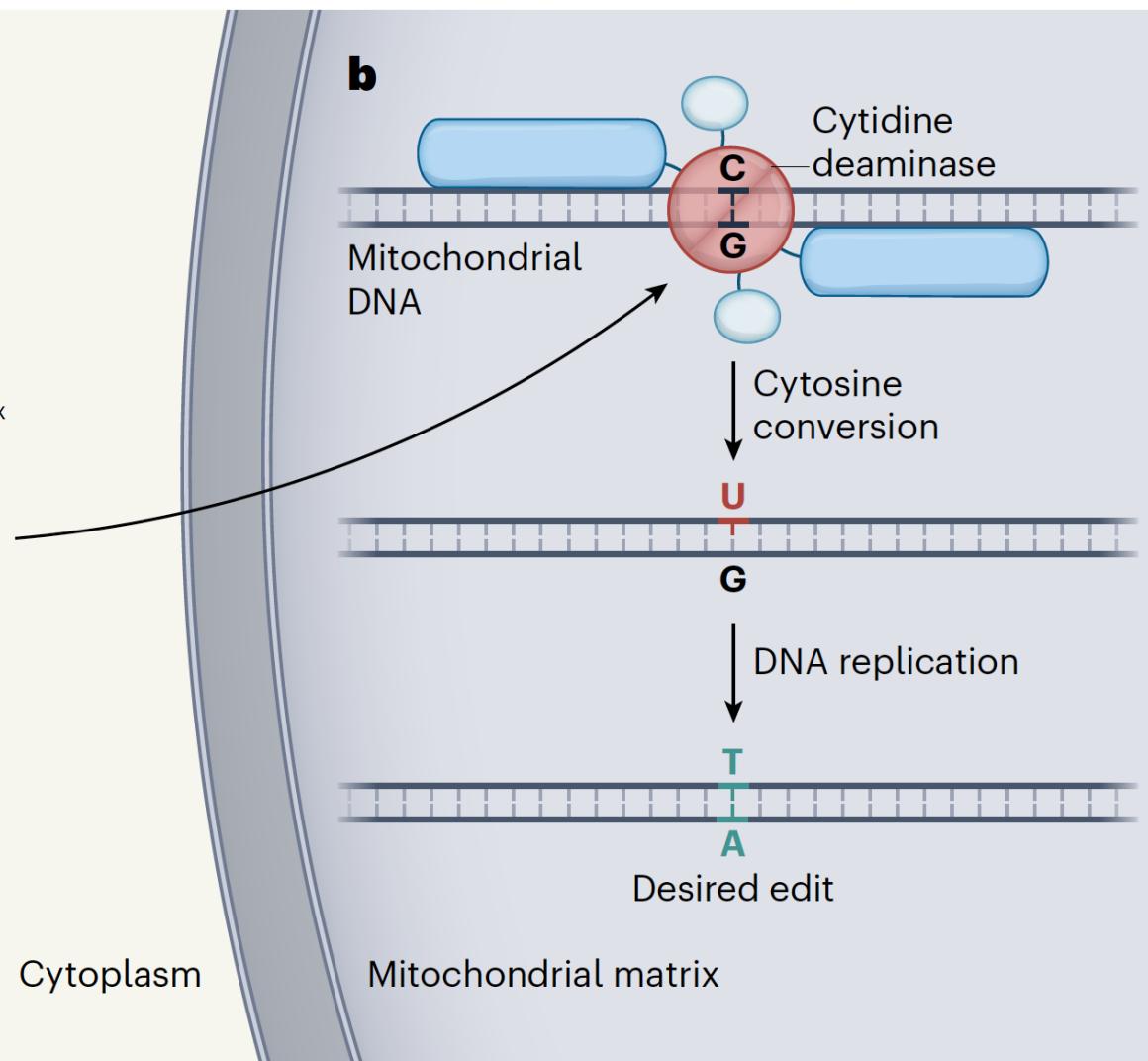
sgRNA (single guide RNA)

# 塩基エディター DdCBE を使ってmtDNA C•G→T•A に修正

a



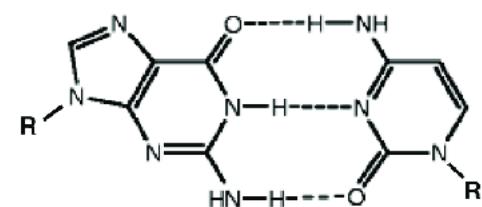
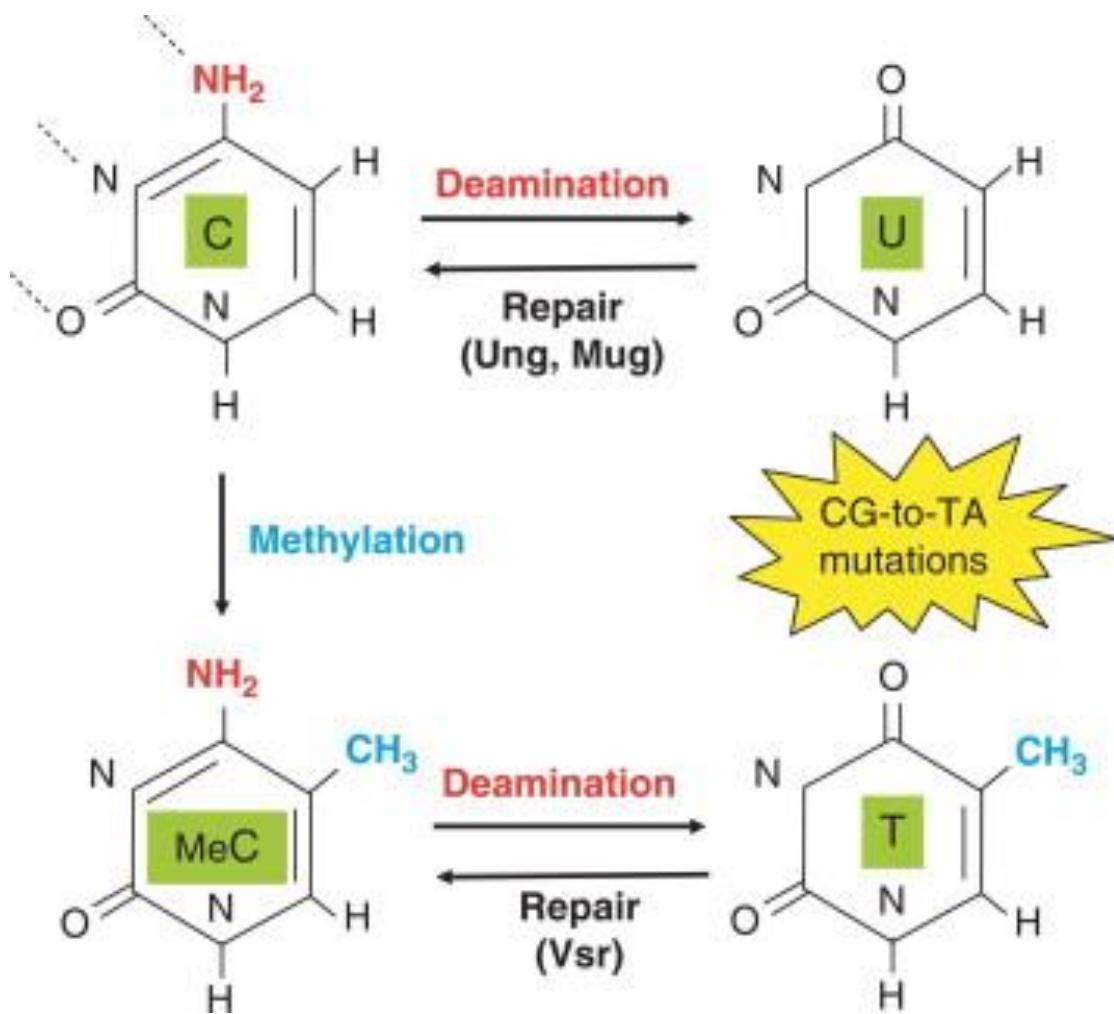
b



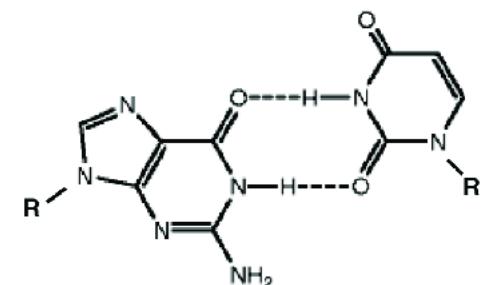
A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing.  
Mok et al. Nature 2020-07-08.

(Mitochondrial genome editing gets precise. Aushev, Herbert. Nature 2020-07-08)

# シトシン(**C**)の脱アミノ反応によって ウラシル(**U**)が生じる



Guanine:Cytosine



Guanine:Uracil

# ミトコンドリア病の新規遺伝子治療法

部位特異的に**C**を**U**に変える酵素**DdCBE**をミトコンドリアに送り込む  
**変異型**の塩基配列

5'-**G****G****G****CCC**-3'

3'-**C****C****GGG****G**-5'

酵素**DdCBE**による塩基変換(**c**→**U**)

5'-**G****G****G****CCC**-3'

3'-**C****U****C****GGG****G**-5'

DNA複製で**U**の反対側に**A**が取り込まれる

5'-**G****A****G****CCC**-3'

3'-**C****U****C****GGG****G**-5'

DNA複製で**A**の反対側に**T**が取り込まれる

5'-**G****A****G****CCC**-3'

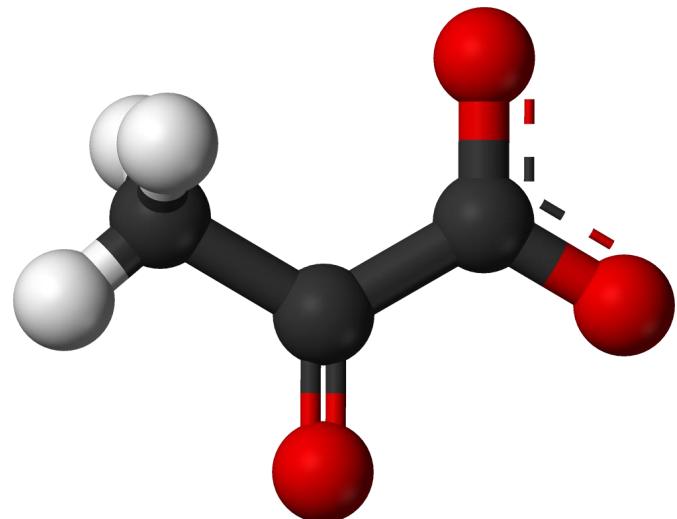
3'-**C****T****C****GGG****G**-5'

これは**野生型**の塩基配列である

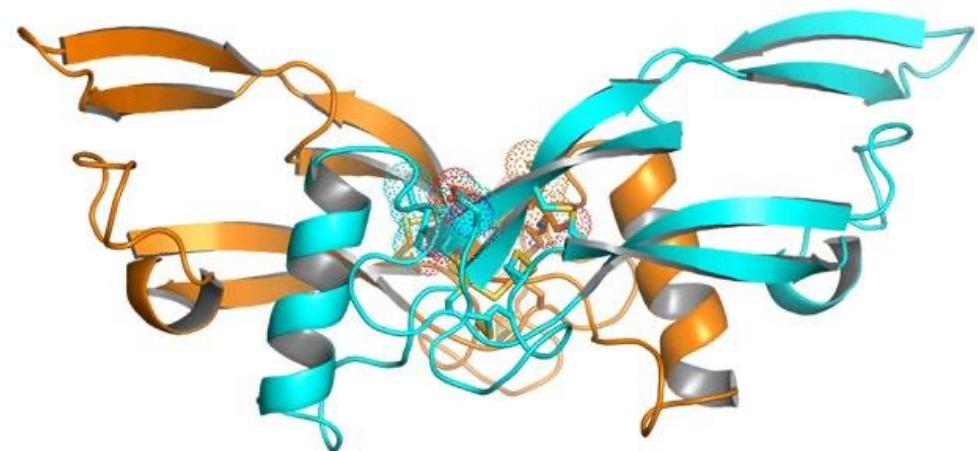
しかし、まだMELASの病因となる  
m.3243**A**>**G**変異は修正できない

# ミトコンドリア病に対する 治療薬・診断薬の同時開発

ピルビン酸



GDF15

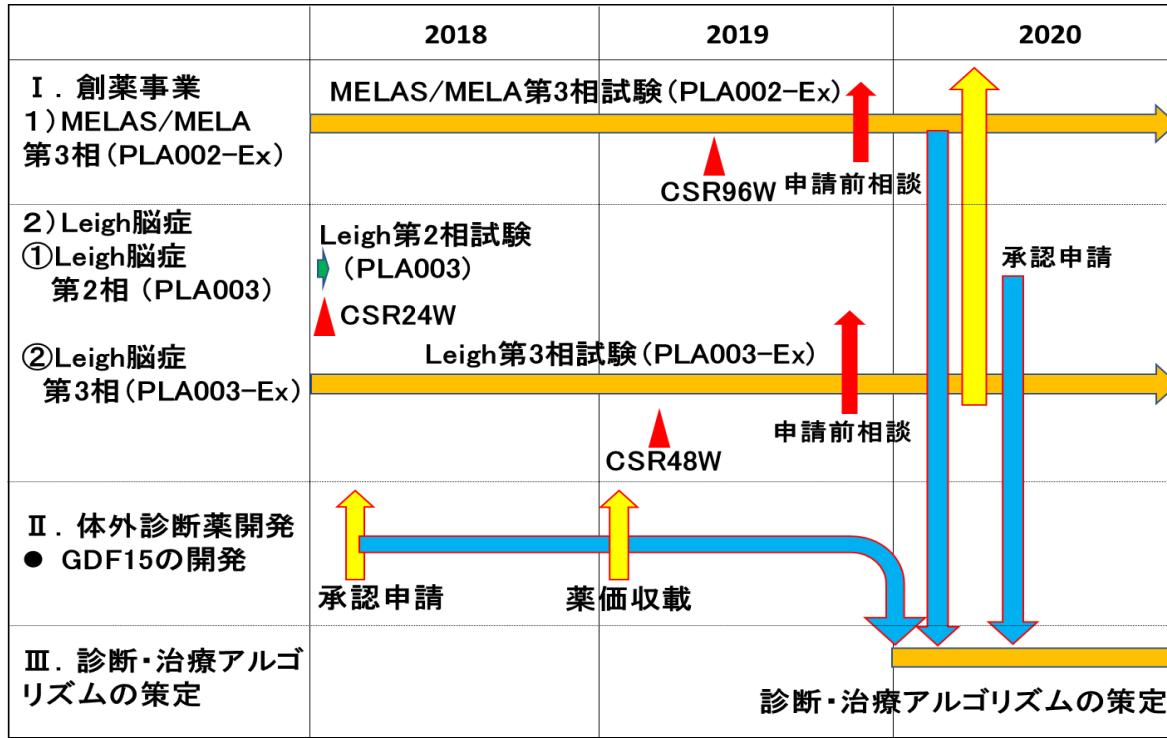


Growth Differentiation Factor 15

平成30年度 日本医療開発研究機構  
 難知性疾患等実用化研究事業  
 ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対する  
**ピルビン酸ナトリウムの臨床治験**  
 —試薬からの希少疾病治療薬開発の試み—  
 GMPに準拠した治験薬製造  
 安全性・安定性・急性毒性  
 第Ⅱ相臨床試験を完了



## 治療薬開発のスケジュール



メイロンに代わる  
新しいアシドーシス補正薬口



ミトコンドリア病  
(リー脳症)

# ヒトがATPを得る方法は2つ

解糖系 vs. 酸化的リン酸化系

ミトコンドリアに期待できないなら

解糖系に頼るしかない

乳酸自体に毒性はない

NADHの過剰が悪者である

解糖系を動かす方法 = ピルビン酸投与

# $\rho^0$ 細胞の培養にピルビン酸添加が必須 (mtDNAを失った細胞 or 呼吸機能を失った細胞)

ブドウ糖



ピルビン酸



乳酸

解糖系における  
水素 (**NADH**) の  
收支はゼロ

細胞はブドウ糖の他に  
アミノ酸などを代謝する

アミノ酸の酸化により  
水素が過剰になる

**NADH**が蓄積し

**NAD<sup>+</sup>**が不足する

乳酸／ピルビン酸 比↑

解糖系が機能停止

# 過剰なNADHが解糖系を停止

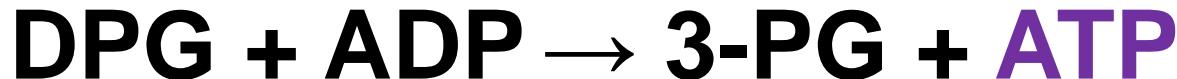
1. GAPDH (グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)



GAP = glyceraldehyde 3-phosphate

DPG = 1,3-diphosphoglycerate

2. PGK (diphosphoglycerate kinase)



これら 2 つの反応は強固に連結されているので  
過剰なNADHは解糖系によるATP産生を阻害する

# NAD<sup>+</sup>不足で解糖系が停止

## 1. GAPDH (グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)



この反応が右向きに進むためには  
自由エネルギー変化が負である必要がある  
このためには[NAD<sup>+</sup>]の濃度は[NADH]  
の 1000倍以上でなくてはならない

L/P比が25.6以上になると  
解糖系によるATP産生が停止する

(Voet and Voet: Biochemistry)

# ピルビン酸はATP合成を回復させる



$$[\text{乳酸}]/[\text{ピルビン酸}] < 25.6$$

$$[\text{乳酸}] = 2.56 \text{ mM} = 23.04 \text{ mg/dL}$$

$$[\text{ピルビン酸}] = 0.1 \text{ mM} = 0.88 \text{ mg/dL}$$

$$[\text{乳酸}] = 25.6 \text{ mM} = 230.4 \text{ mg/dL}$$

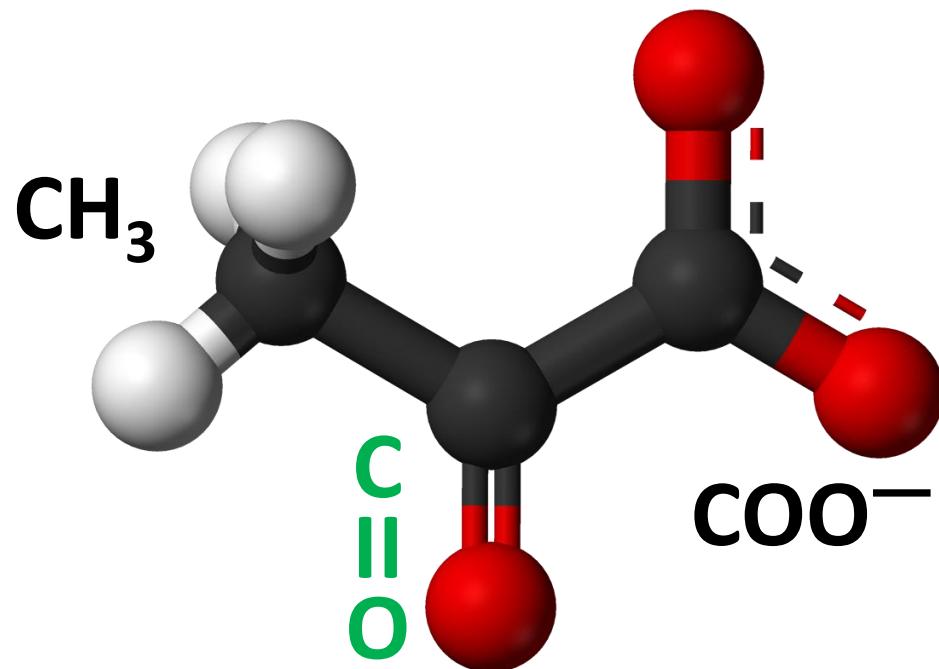
$$[\text{ピルビン酸}] = 1 \text{ mM} = 8.8 \text{ mg/dL}$$

[ピルビン酸]の濃度を上昇させれば  
[乳酸] の濃度が高くてもATPを作り出せる



# ピルビン酸は最小のケト酸

Pyruvate

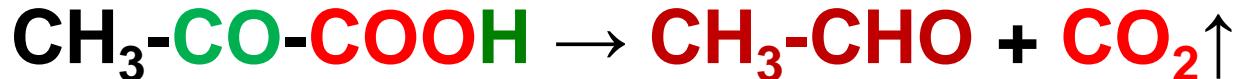


# ピルビン酸はお酒の元

ブドウ糖 → ピルビン酸

ピルビン酸 → エタノール + CO<sub>2</sub>↑

(中間代謝物 = アセトアルデヒド)



日本酒・ビール・ワインの  
醸造過程において

二酸化炭素の泡が出ている時

そこにはピルビン酸が大量に存在

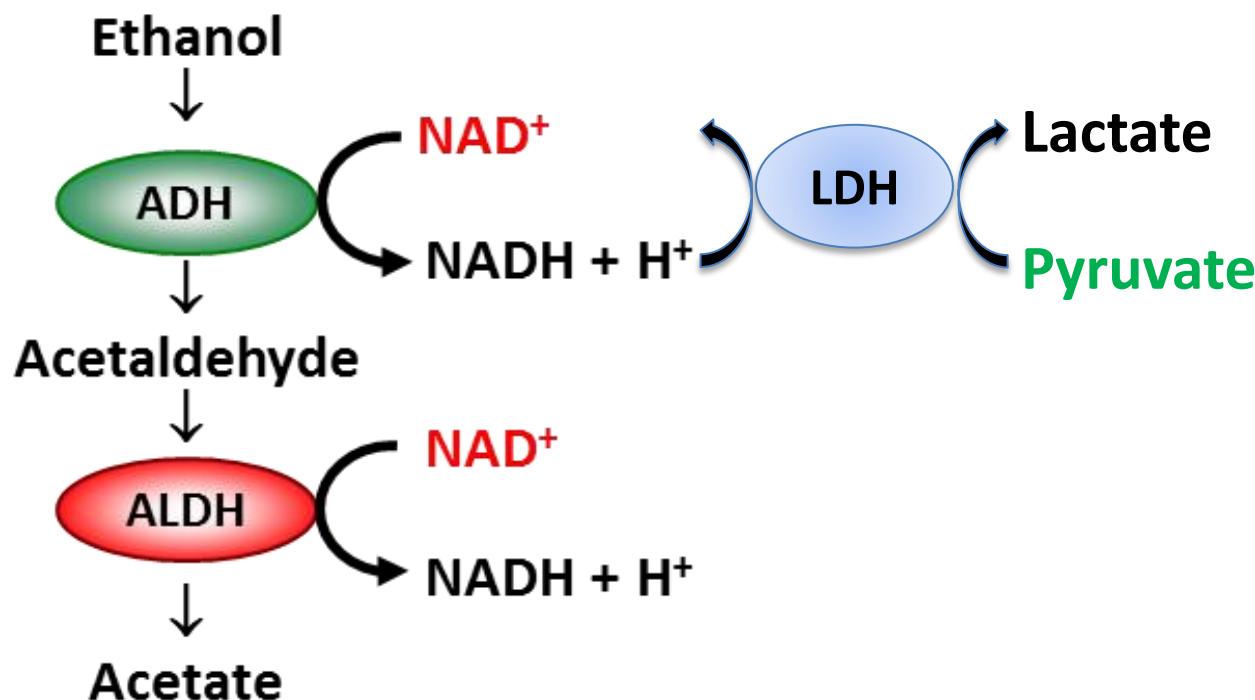
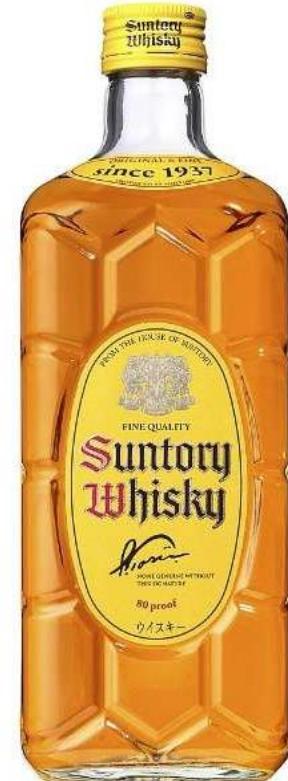


# 自分を実験台にする

09:00 サントリー角 50 mL + H<sub>2</sub>O 50 mL

10:00 ピルビン酸ナトリウム 5 g

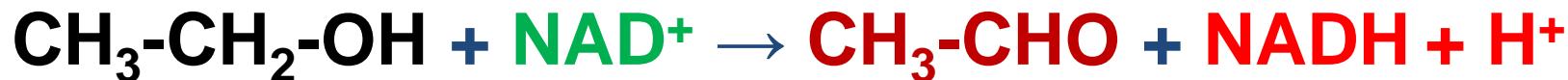
呼気中のアルコール濃度を測定



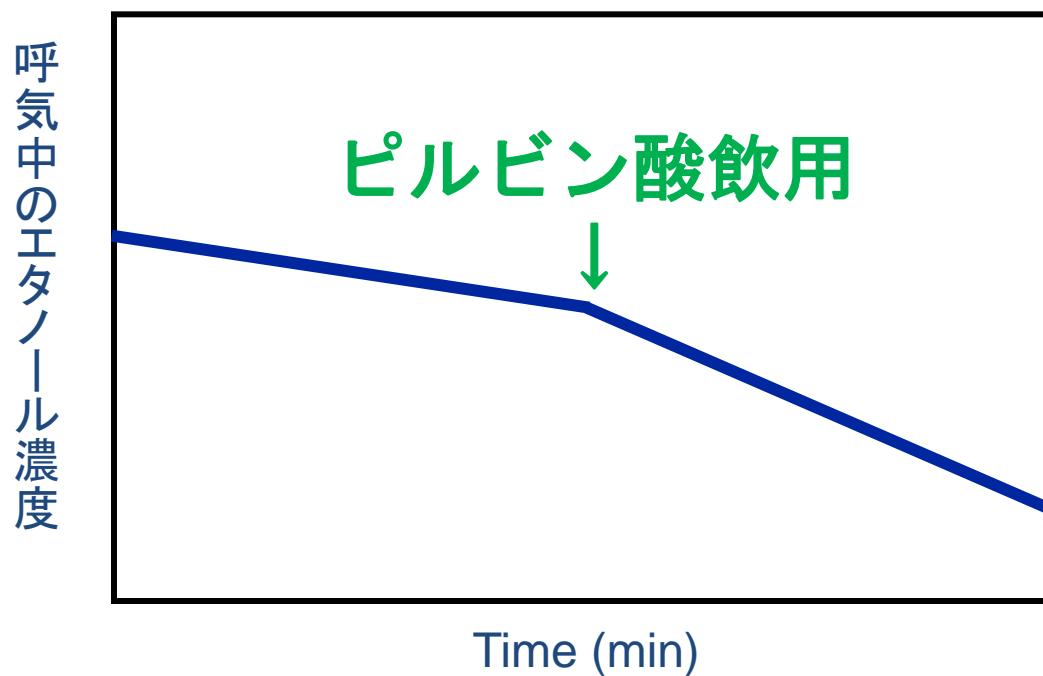
*Effect of pyruvate on alcohol metabolism:* We studied the effect of pyruvate on alcohol metabolism (Fig. 1d). Oral administration of 5 g of sodium pyruvate accelerated alcohol oxidation by 20% (Japan Patent 2000-204038). In subjects with a genetic defect in aldehyde dehydrogenase (ALDH2), pyruvate further elevated the acetaldehyde level, this is because the first reaction by the alcohol dehydrogenase (ADH) from ethanol to acetaldehyde is stimulated by supplementation of NAD<sup>+</sup> by pyruvate, whereas the second reaction from acetaldehyde to acetic acid is blocked by the enzyme defect. To ameliorate the increased level of acetaldehyde, we administered 1440 mg of L-cysteine along with pyruvate, because acetaldehyde reacts with L-cysteine to form a thiazolidine derivative that can be excreted to urine. Combination of pyruvate and L-cysteine accelerated alcohol oxidation by 30% (Japan Patent 2002-187839). These results indicate that orally administered pyruvate can increase intracellular NAD<sup>+</sup>/NADH ratio at least in the liver.

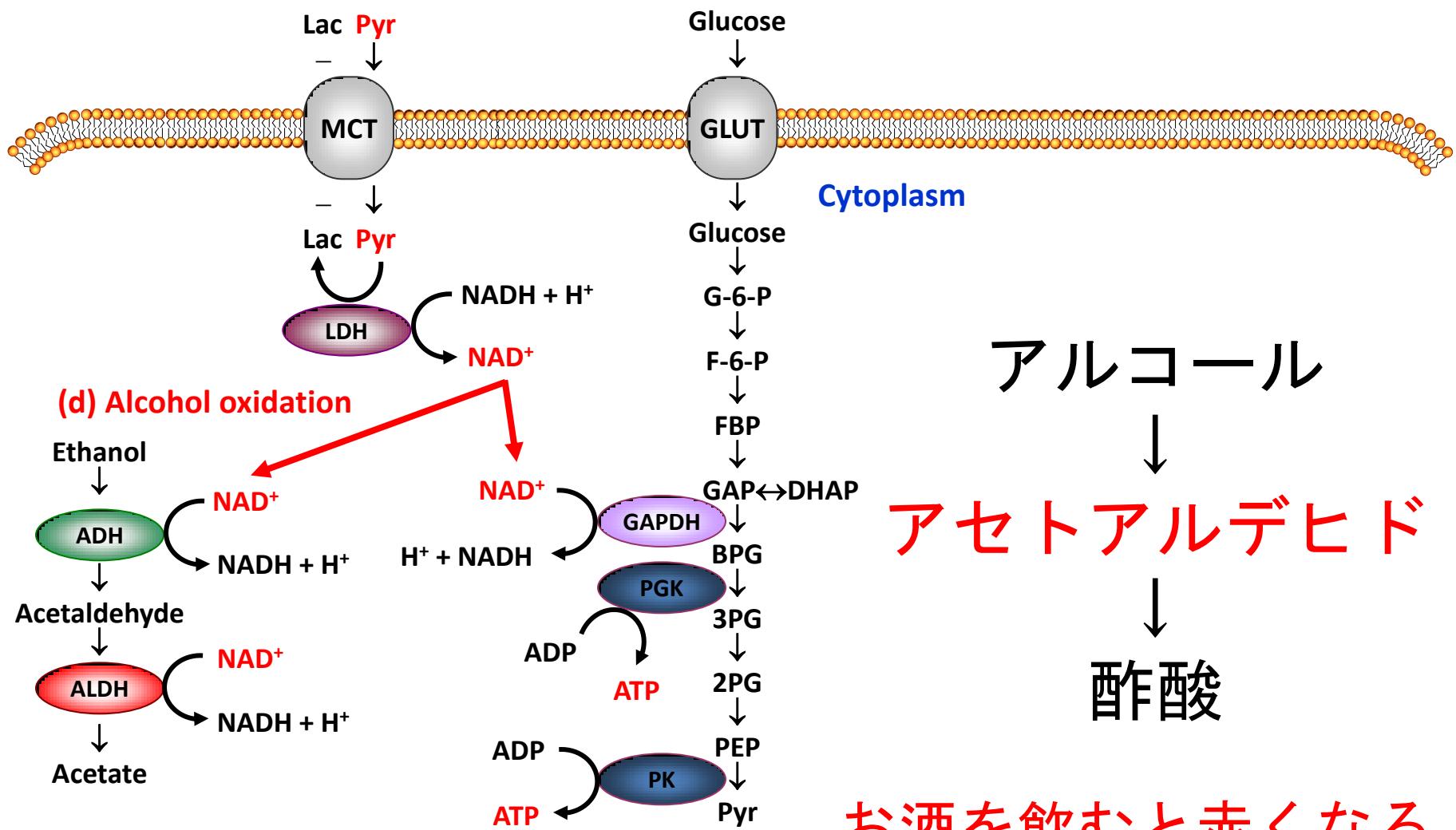
# ピルビン酸はアルコール分解促進

アルコール → アセトアルデヒド → 酢酸



ピルビン酸 + NADH + H<sup>+</sup> → 乳酸 + NAD<sup>+</sup>





アルコール  
↓  
アセトアルデヒド  
↓  
酢酸

お酒を飲むと赤くなる人  
ALHD2\*2 heterozygote  
ピルビン酸投与によって  
アセトアルデヒドが上昇

# ピルビン酸療法の理論的背景



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Mitochondrion 7 (2007) 399–403



[www.elsevier.com/locate/mito](http://www.elsevier.com/locate/mito)

## Letters to the Editor

### Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases

Mitochondrial disorders caused by mutations in the mitochondrial or nuclear genome are devastating diseases resistant to various medications. We propose here that pyruvate has a therapeutic potential for mitochondrial diseases. We have started an open clinical study on the effects of sodium pyruvate on mitochondrial diseases and type II citrullinemia.

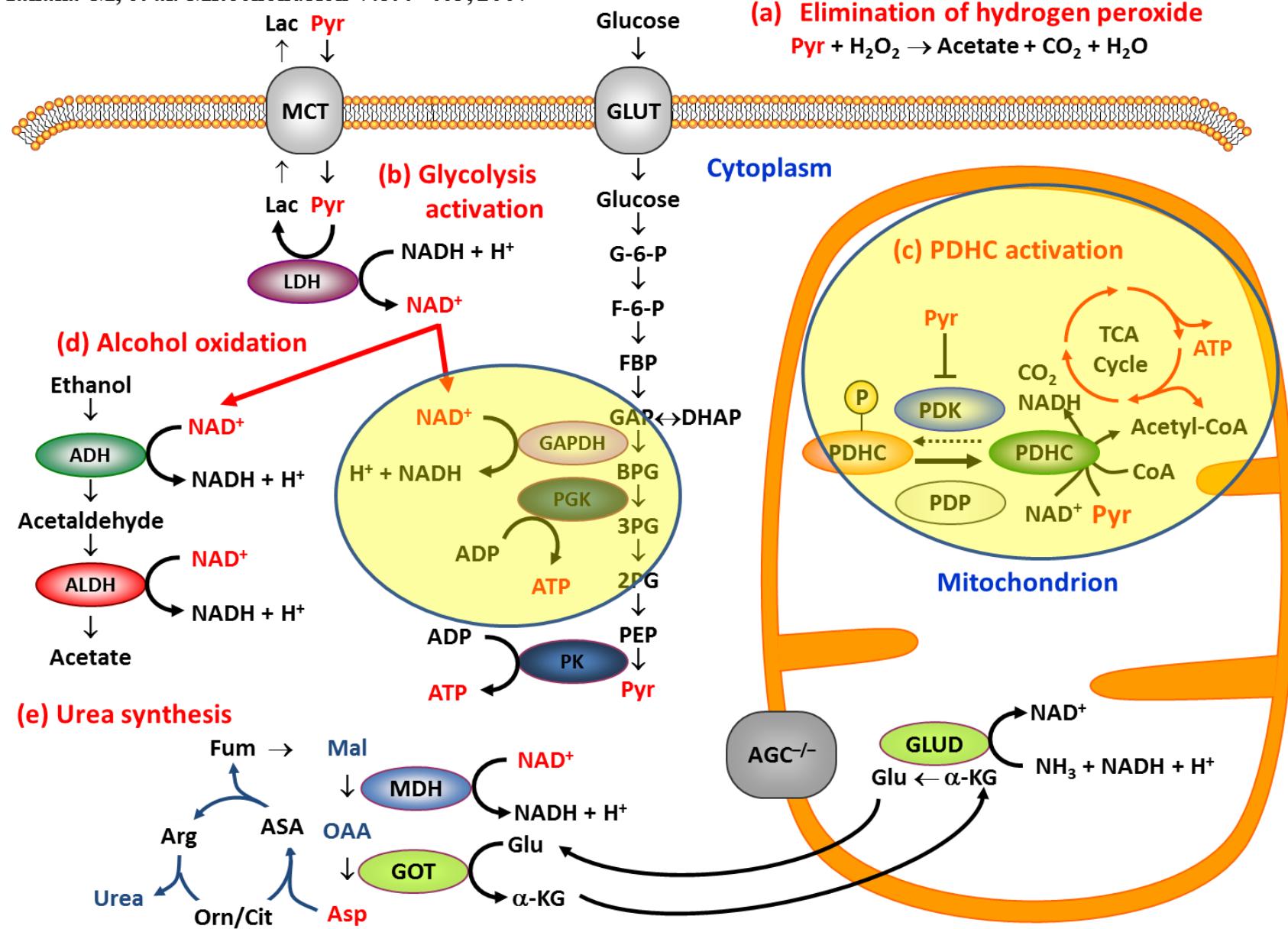
pyruvate added exogenously (and converted to lactate) is replaced by a mole of pyruvate derived from glycolysis (Fig. 1b). Because NAD<sup>+</sup> that has been formed by the action of LDH on the extraneously added pyruvate is then used for the oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate, glycolysis is now able to proceed for production of ATP. Thus, when 1 mol (110 g) of sodium pyruvate is administered, 2 mol (1014 g) of ATP is formed even when oxidative phosphorylation function is null.

*Activation of PDHC by pyruvate:* Pyruvate activates

14年前

# ピルビン酸ナトリウムの作用機序

Tanaka M, et al. Mitochondrion 7:399–403, 2007



# 解糖系によるATP産生

ブドウ糖



2 PEP



2 ピルビン酸



2 乳酸

PEP Kinase  
PEP + ADP →  
Pyruvate + ATP

NAD<sup>+</sup>

NADH + H<sup>+</sup>

NADH + H<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup>

ブドウ糖から

2分子のピルビン酸が生じ  
2分子のATPが得られる

PEP (ホスホエノールピルビン酸)

# 解糖系はNAD<sup>+</sup>不足で停止する

ブドウ糖



GAP



ピルビン酸



乳酸

NAD<sup>+</sup>

NADH + H<sup>+</sup>

NADH + H<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup>

乳酸の過剰蓄積

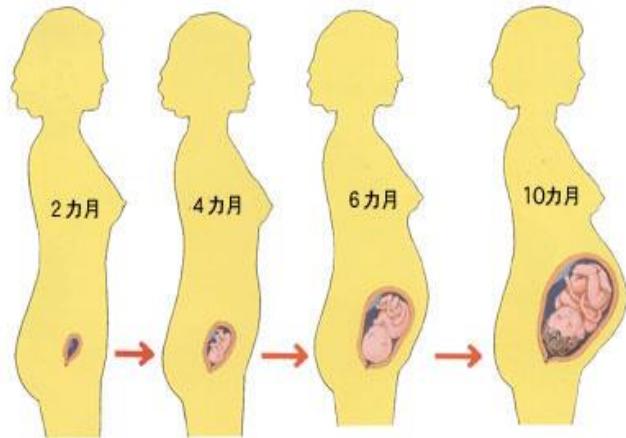
ピルビン酸の絶対的不足

NAD<sup>+</sup>が再生不能

ATPが得られない

ミトコンドリアでも  
解糖系でも  
ATPが作れない

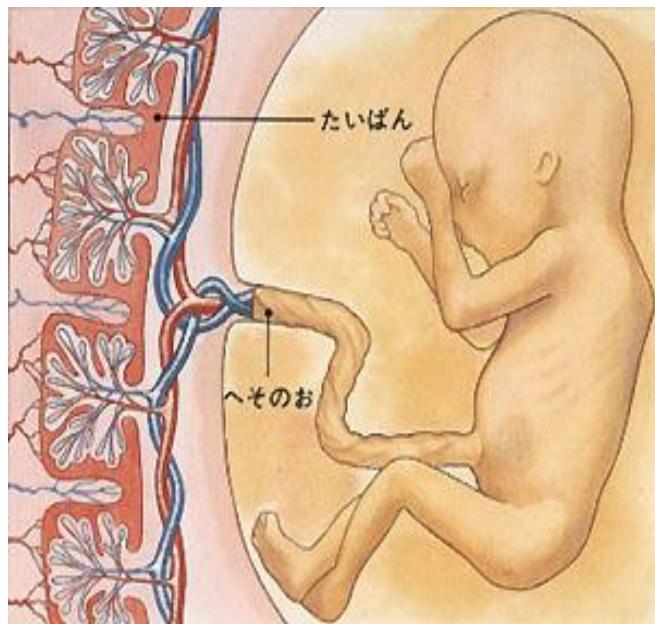
# ミトコンドリア病の赤ちゃん



胎児は臍帯と胎盤によって  
母親とつながっている



出生時体重は 3000 g



母体と切り離されると  
**高乳酸血症**を発症する

胎児は**乳酸**を排出し  
母親は**乳酸**からブドウ糖を  
糖新生系によって再生する

# 透析によって子宮内環境を維持する



母体



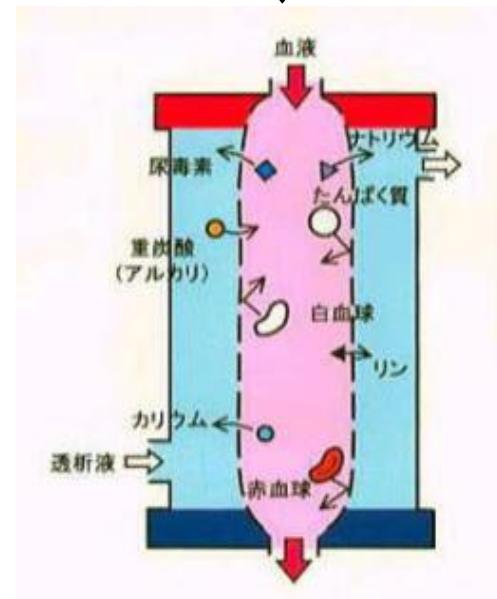
胎盤



臍帶



乳酸  
↓



↓  
ピルビン酸

# 点滴用ピルビン酸ナトリウム



メイロンに代わる新しい  
アシドーシス補正薬  
(製薬企業 募集中)

ピルビン酸Na

150 mM

16.5 g/L

8.25 g/500 mL

点滴

150 mM × 0.5 L

→ 15 mM × 5 L

blood

# ドイツでの臨床試験の報告

特発性心筋症患者8人の冠状動脈に  
**ピルビン酸ナトリウム 150 mM**  
を直接注入

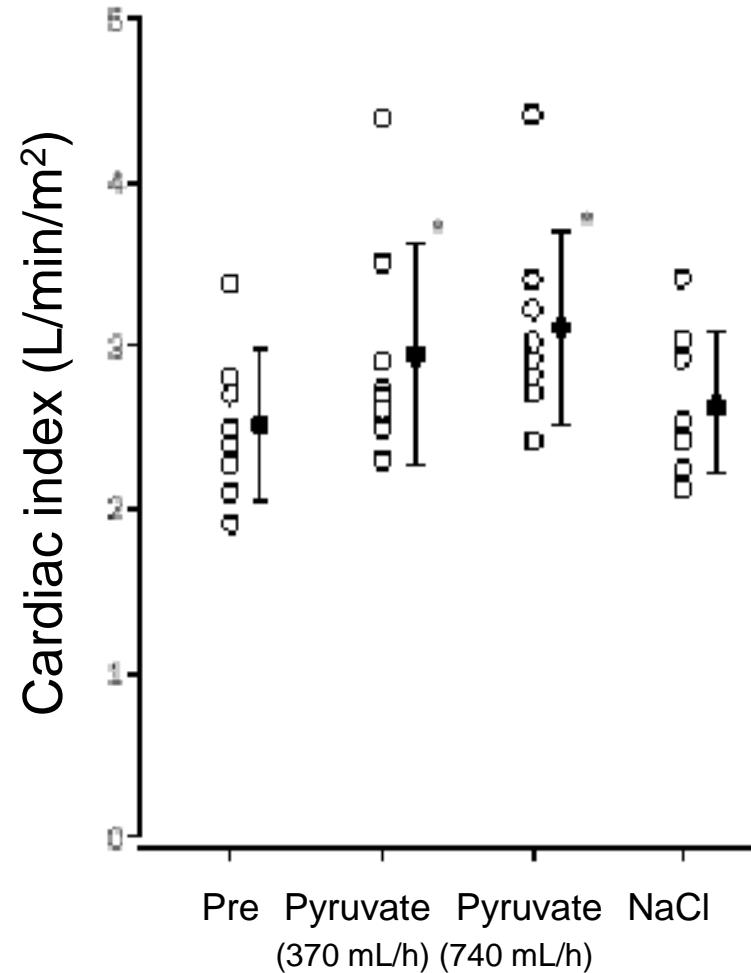
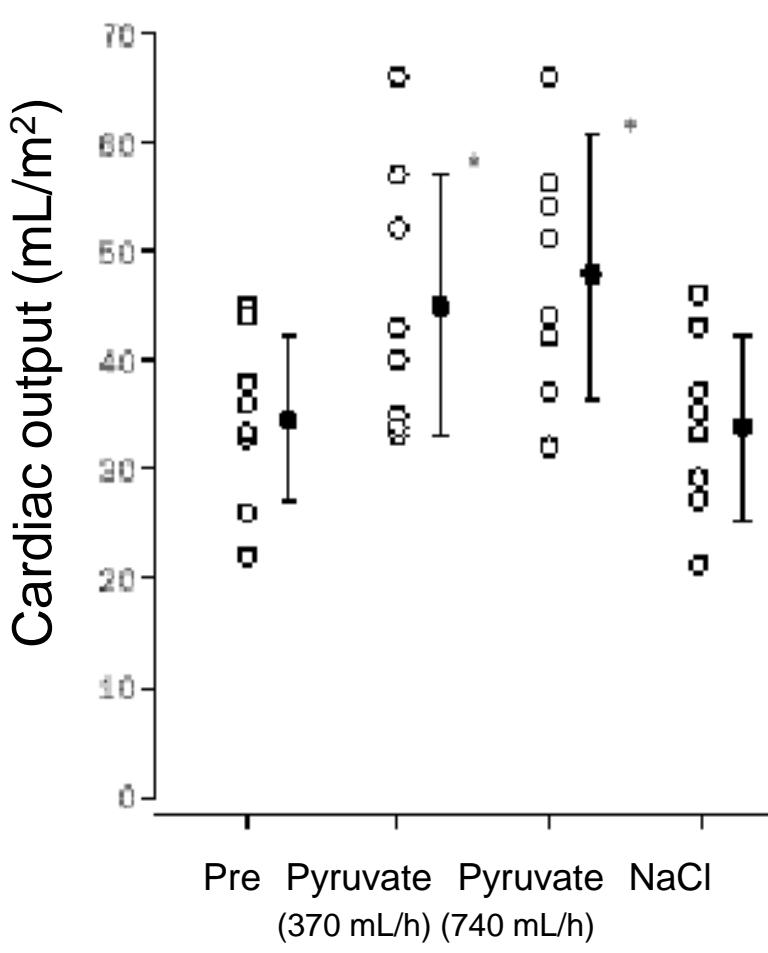


心拍出量の上昇・心拍数の低下  
陽性変力作用

Haemodynamic effects of intracoronary pyruvate in patients with congestive heart failure: an open study

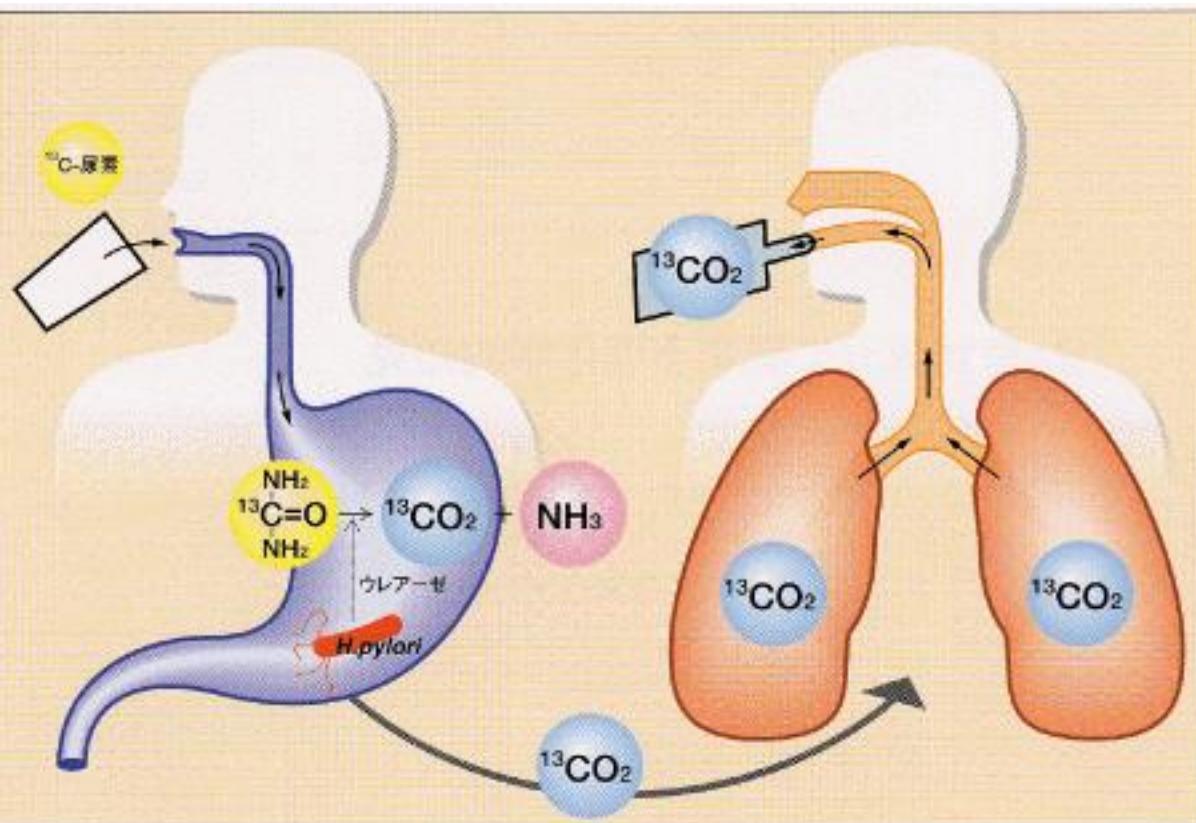
Hermann *et al.* *Lancet* 353: 1321-1323, 1999

# 心拍出量および心係数への ピルビン酸の効果



# ミトコンドリア病の非侵襲的検査 安定同位元素を用いた呼気試験

ピロリー菌 → 除菌 → 胃癌予防



[ $^{13}\text{C}$ ]尿素  
呼気テスト

炭酸ガス  
炭素同位体比分析装置



# 赤外分光法による<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>比の測定

赤外吸光

酸素や窒素は吸収しない

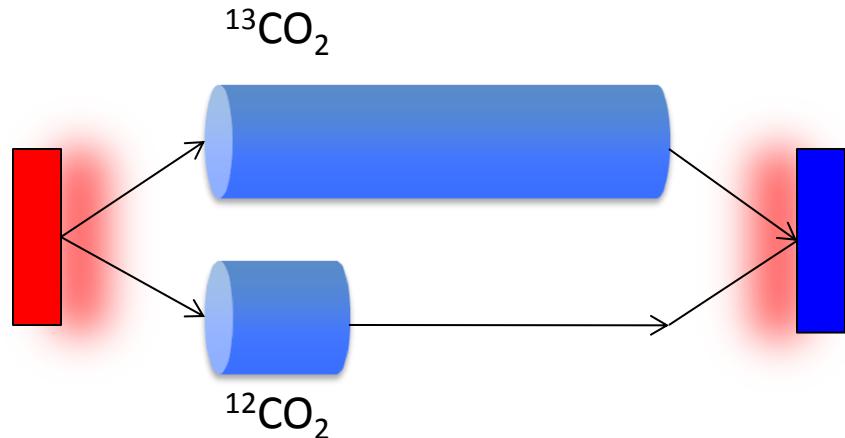
二酸化炭素



<sup>13</sup>CO<sub>2</sub> の波数 = 2280 cm<sup>-1</sup>

<sup>12</sup>CO<sub>2</sub> の波数 = 2380 cm<sup>-1</sup>

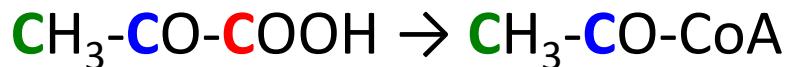
4気圧に圧縮して感度を上げる



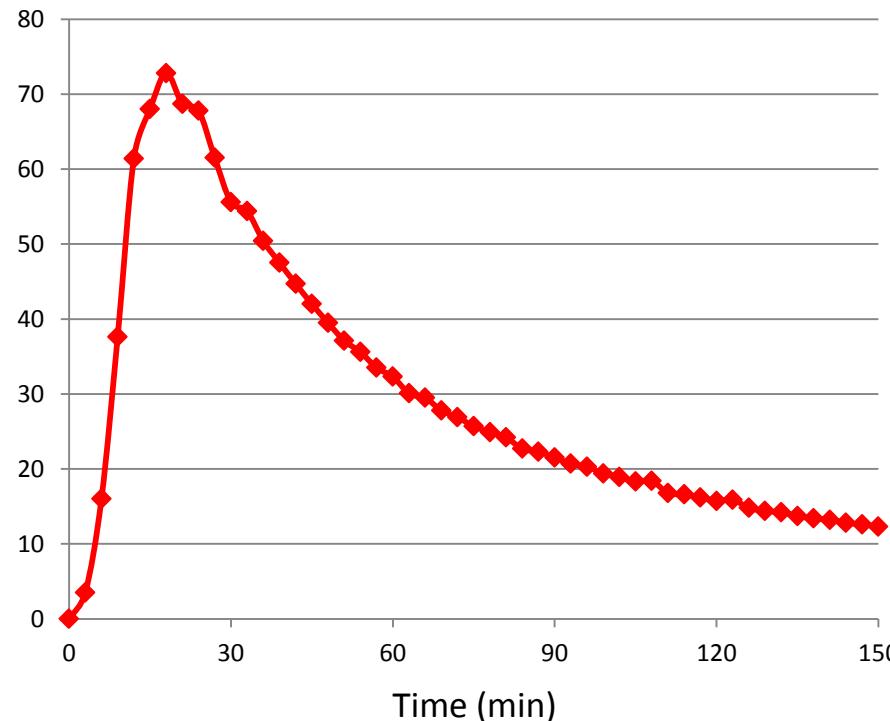
POC One (大塚電子)



# $^{13}\text{C}$ 標識ピルビン酸



[1- $^{13}\text{C}$ ]Pyruvate

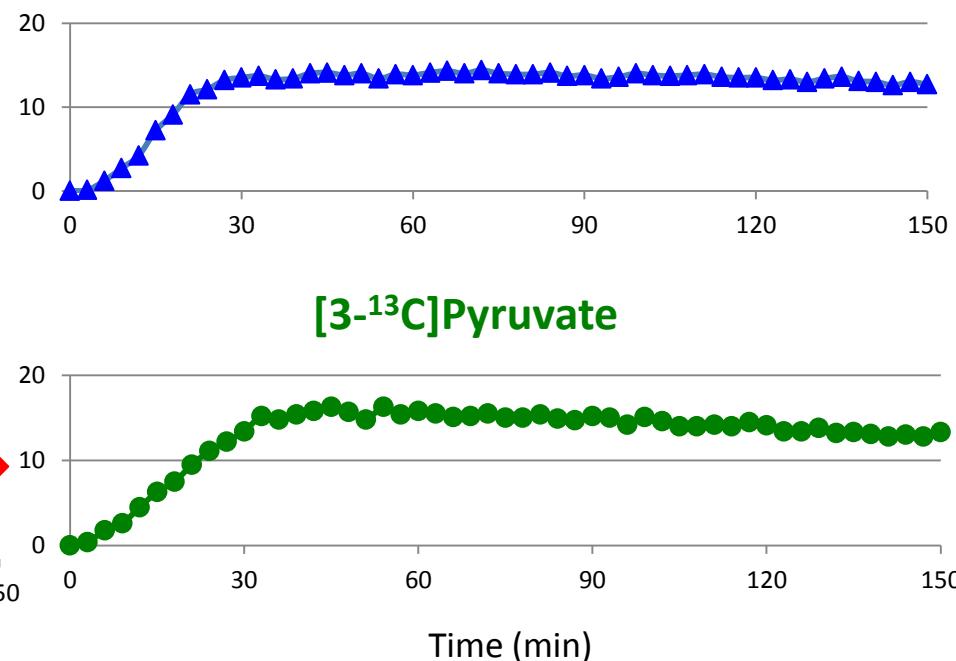


[1- $^{13}\text{C}$ ]Pyruvate  $\rightarrow$  [1- $^{12}\text{C}$ ]Acetyl-CoA

[2- $^{13}\text{C}$ ]Pyruvate  $\rightarrow$  [1- $^{13}\text{C}$ ]Acetyl-CoA

[3- $^{13}\text{C}$ ]Pyruvate  $\rightarrow$  [2- $^{13}\text{C}$ ]Acetyl-CoA

[2- $^{13}\text{C}$ ]Pyruvate



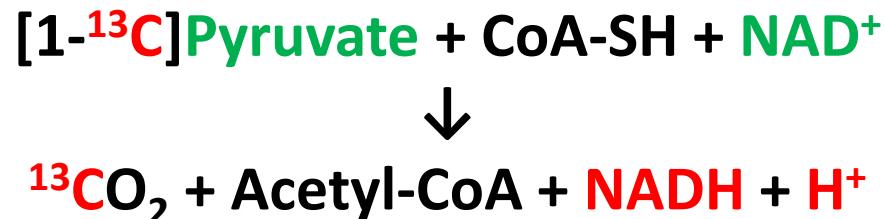
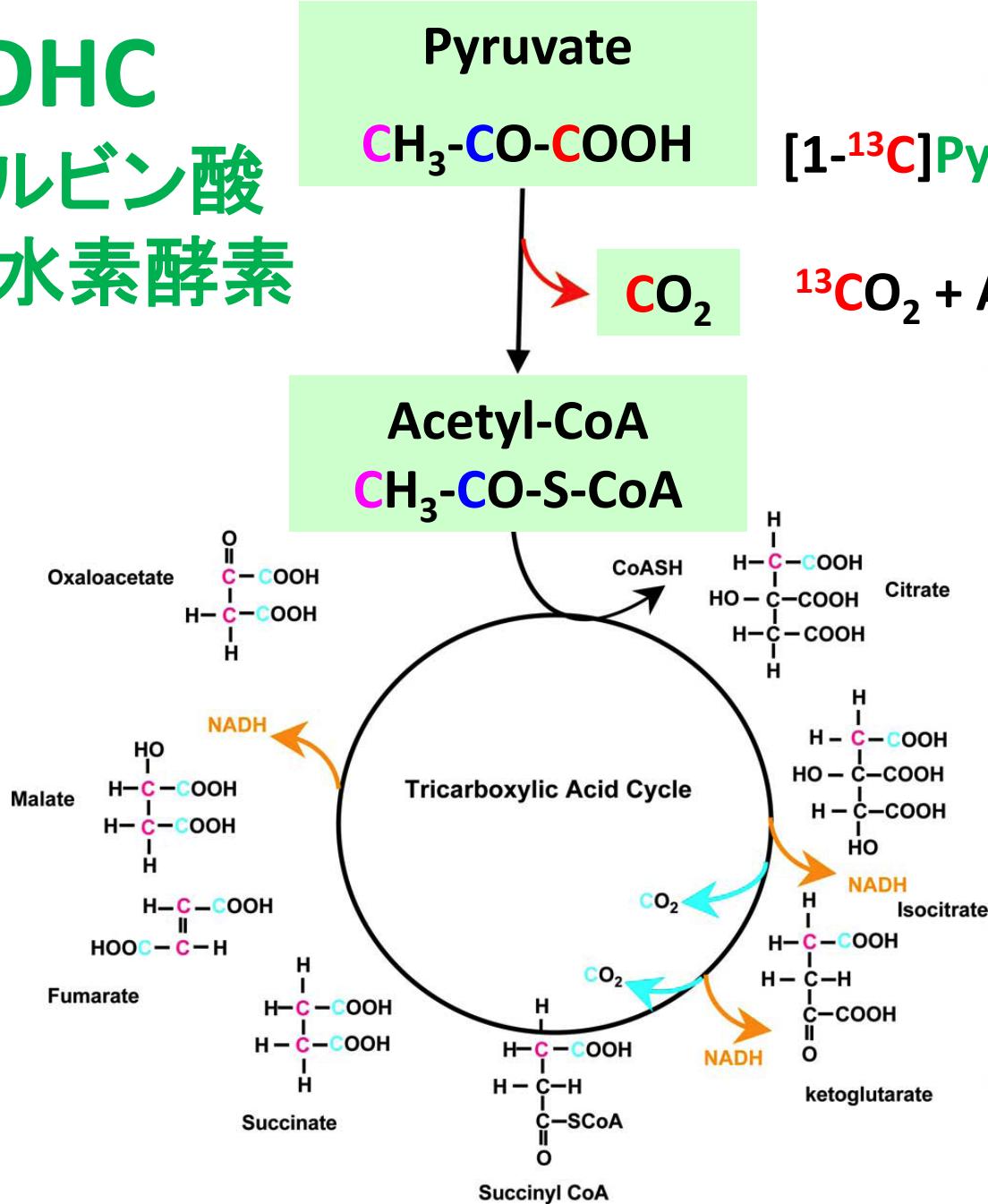
[3- $^{13}\text{C}$ ]Pyruvate

[1- $^{13}\text{C}$ ]ピルビン酸からの $^{13}\text{CO}_2$ の急速な排出は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDHC)の活性を示す。

[2- $^{13}\text{C}$ ]ピルビン酸または[3- $^{13}\text{C}$ ]ピルビン酸を基質として使用した場合、急速な排出は検出されない。

# PDHC

ピルビン酸  
脱水素酵素

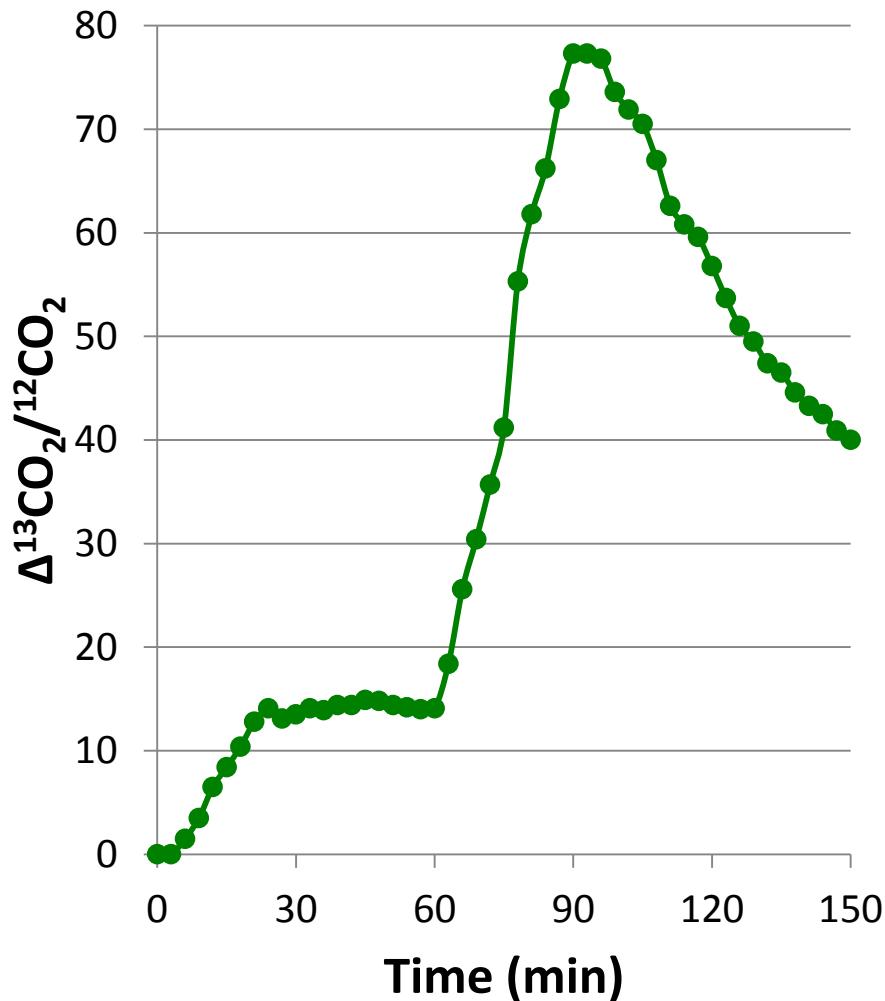


ミトコンドリア機能  
非侵襲的評価  
 $\text{<sup>13</sup>C}$ 標識ピルビン酸  
代謝分析

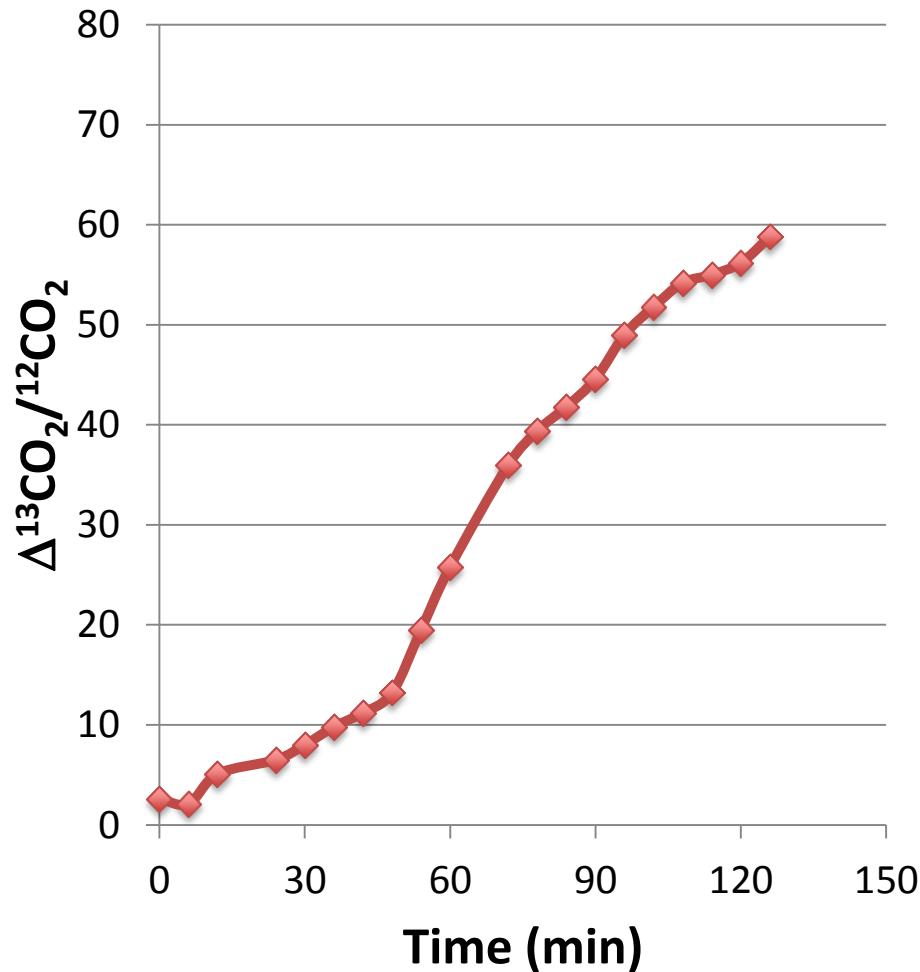
*Wu et al.*  
**Metabolic analysis of  $\text{<sup>13</sup>C}$ -labeled pyruvate for noninvasive assessment of mitochondrial function.**  
*Ann NY Acad Sci*  
 1201: 111–120, 2010

# PDHC欠損症に対する非侵襲的検査 健常成人と10ヶ月児 [p.Ala169Val] の比較

100 mg of [2-<sup>13</sup>C] or [1-<sup>13</sup>C]Pyruvate



20 mg of [2-<sup>13</sup>C] or [1-<sup>13</sup>C]Pyruvate



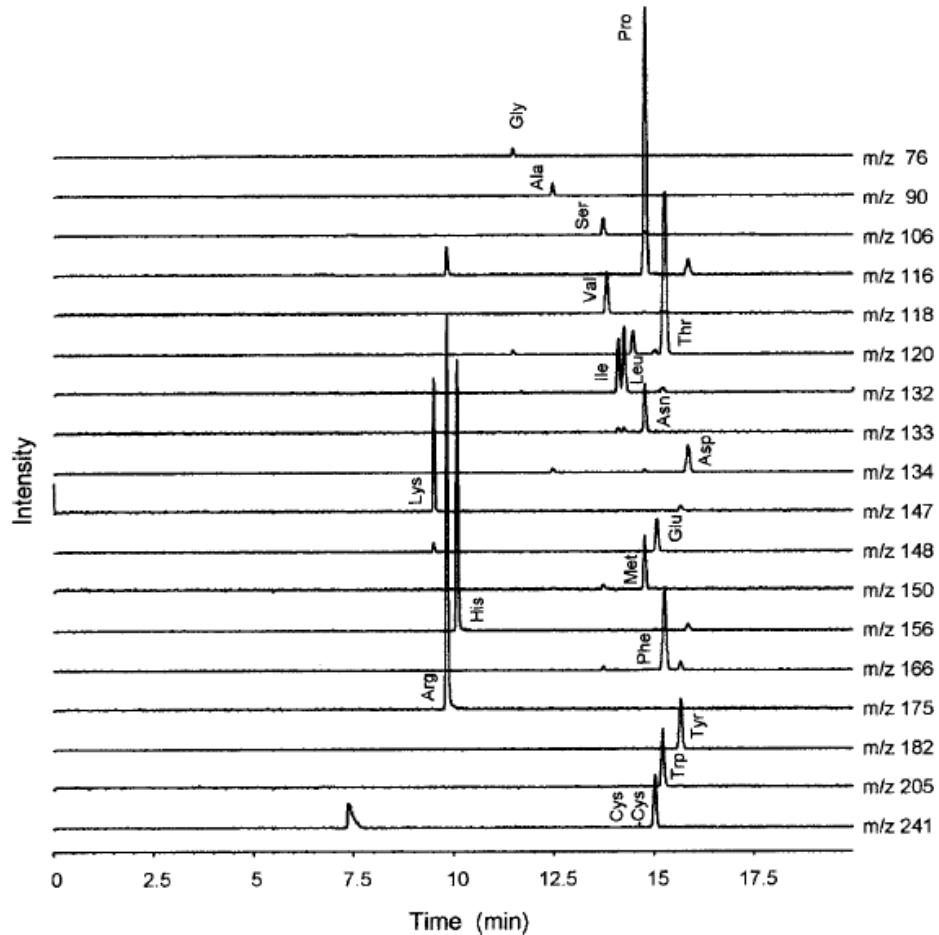
# CE-TOFMSによる細胞内代謝産物の解析

[<sup>13</sup>C]-Labeled Lactate vs  
[<sup>13</sup>C]-Labeled Pyruvate



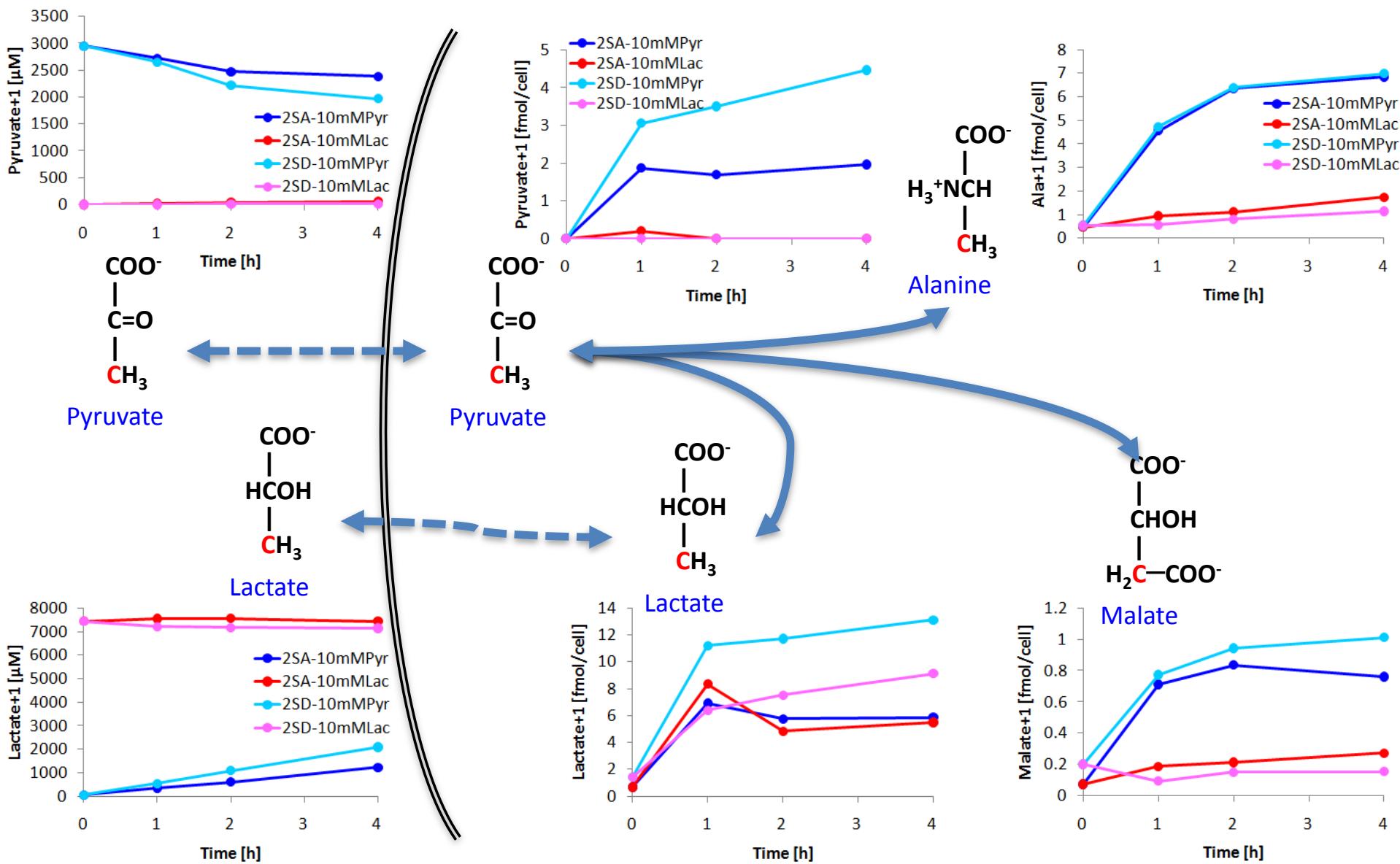
紙健次郎 博士  
曾我朋義 教授  
慶應義塾大学  
鶴岡キャンパス

Capillary Electrophoresis Time  
of Flight Mass-Spectrometry

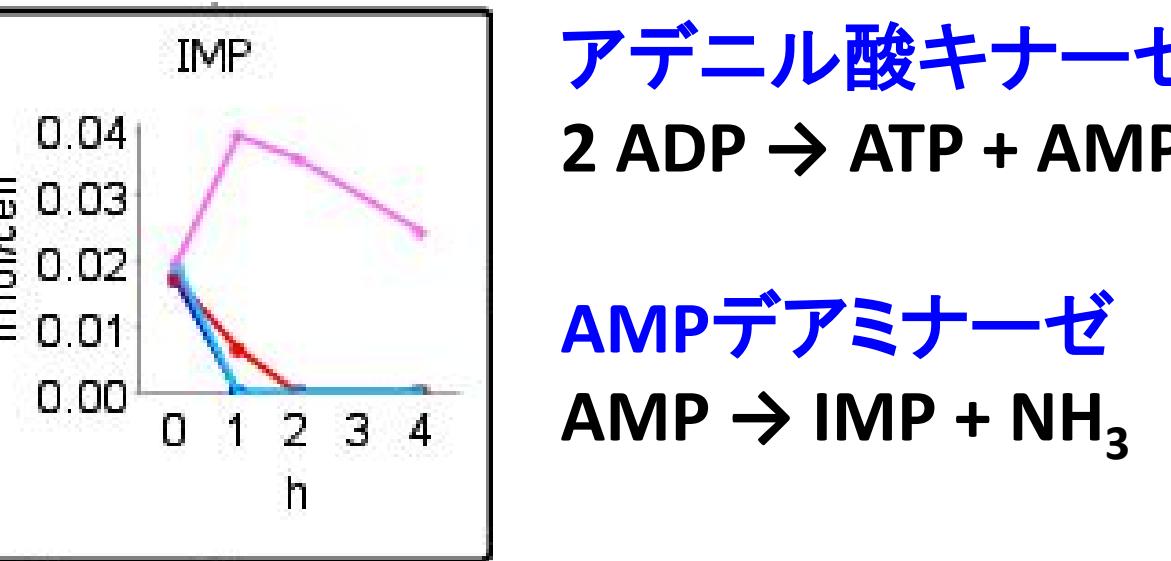
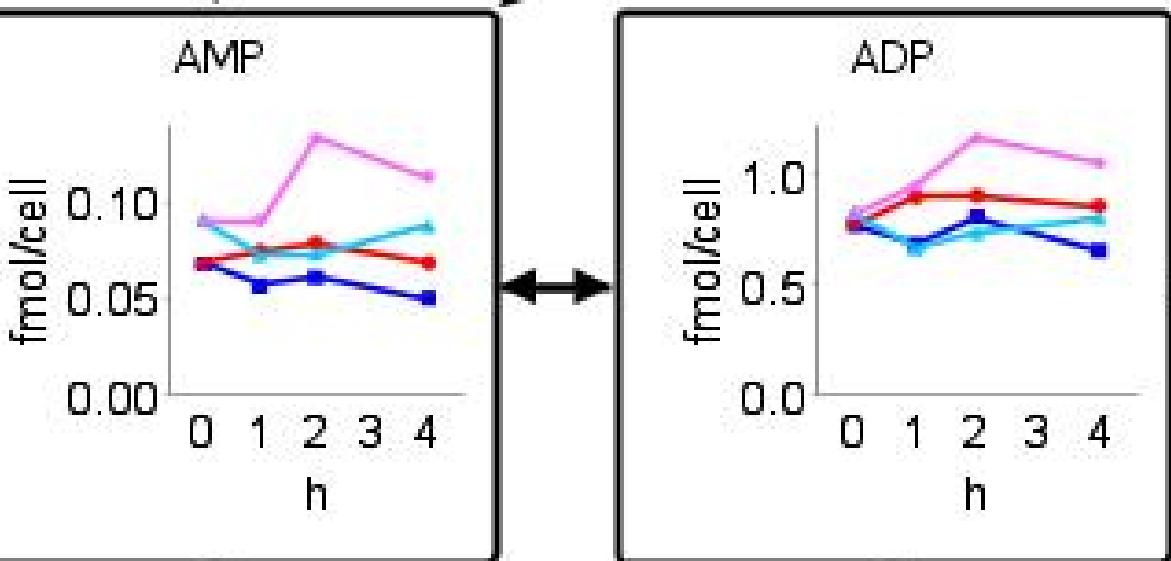
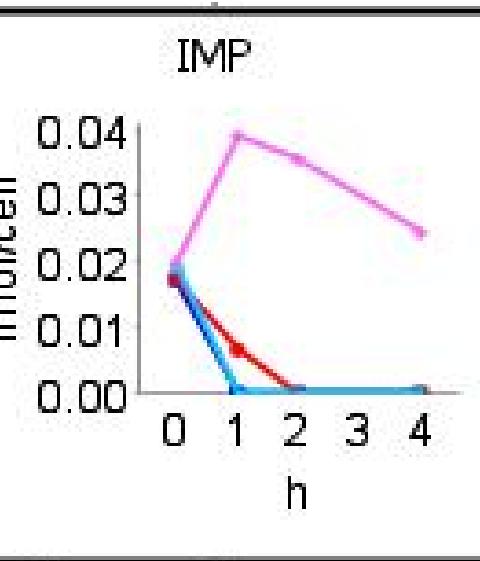
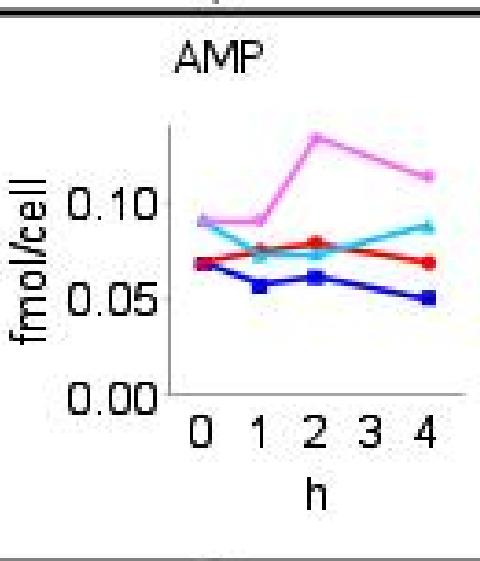


# 細胞内外の $[^{13}\text{C}]$ ピルビン酸と $[^{13}\text{C}]$ 乳酸の交換

細胞内に取り込まれたピルビン酸はアラニン・乳酸・リンゴ酸に転換



# 乳酸の影響 ATP↓, ADP↑, AMP↑, IMP↑



アデニル酸キナーゼ



AMPデアミナーゼ



● 2SA-10mMPyr

● 2SA-10mMLac

● 2SD-10mMPyr

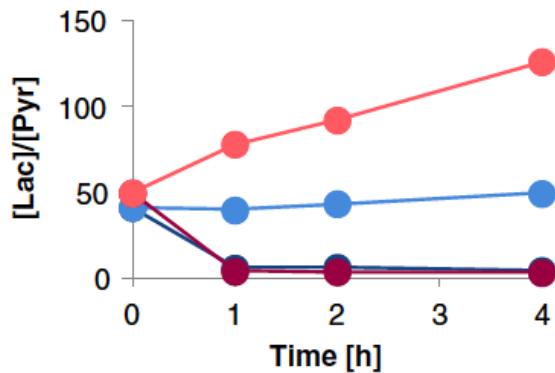
● 2SD-10mMLac

乳酸による  
エネルギー危機

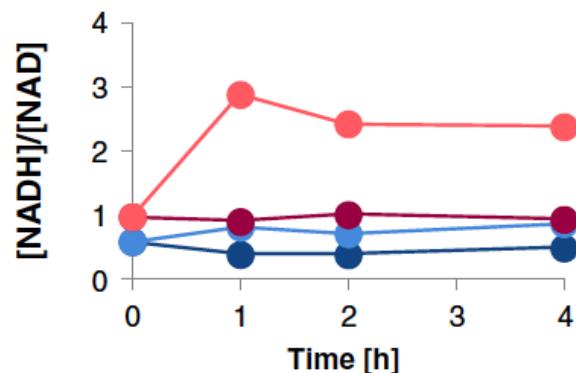
# 2SD 細胞の生体エネルギー的な変化

## 暴露実験 10 mM 乳酸 vs 10 mM ピルビン酸

Lactate/Pyruvate Ratio

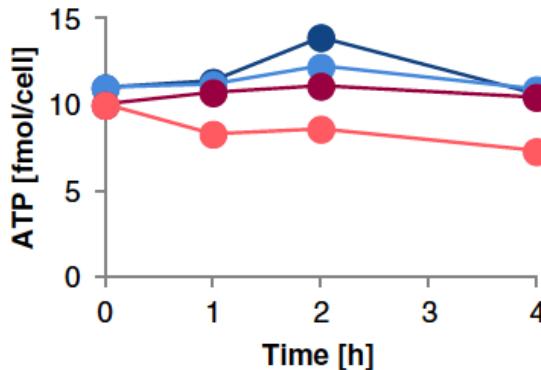


NADH/NAD<sup>+</sup>

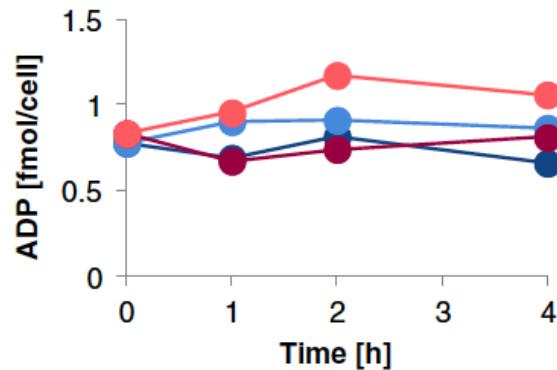


● 2SA cell (10 mM Lactate)  
● 2SA cell (10 mM Pyruvate)  
● 2SD cell (10 mM Lactate)  
● 2SD細胞 (10 mM Pyruvate)

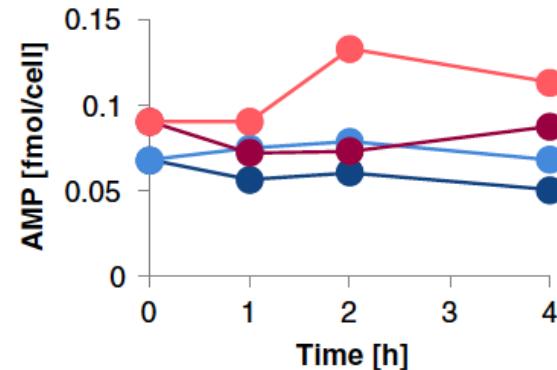
ATP



ADP



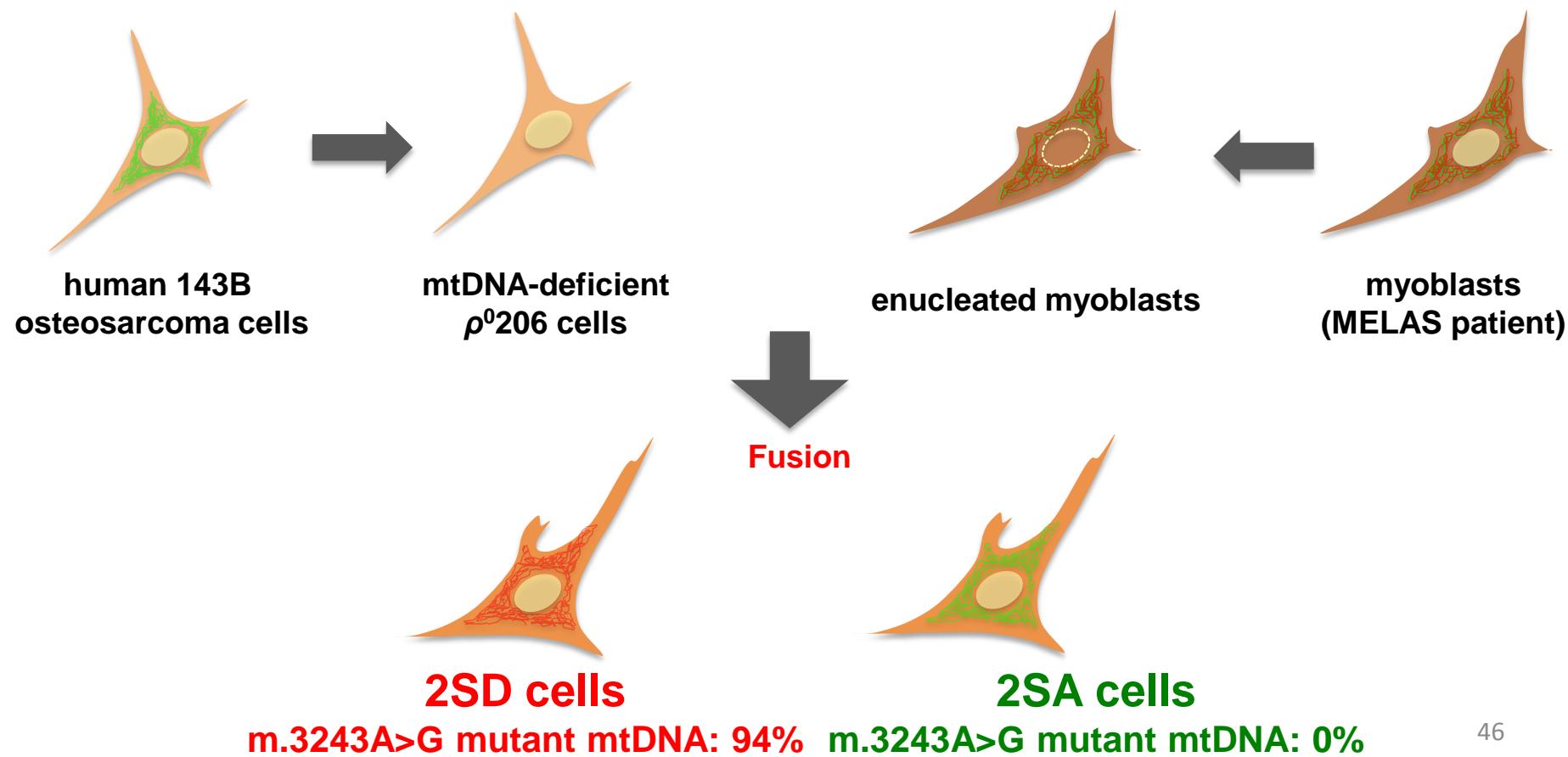
AMP



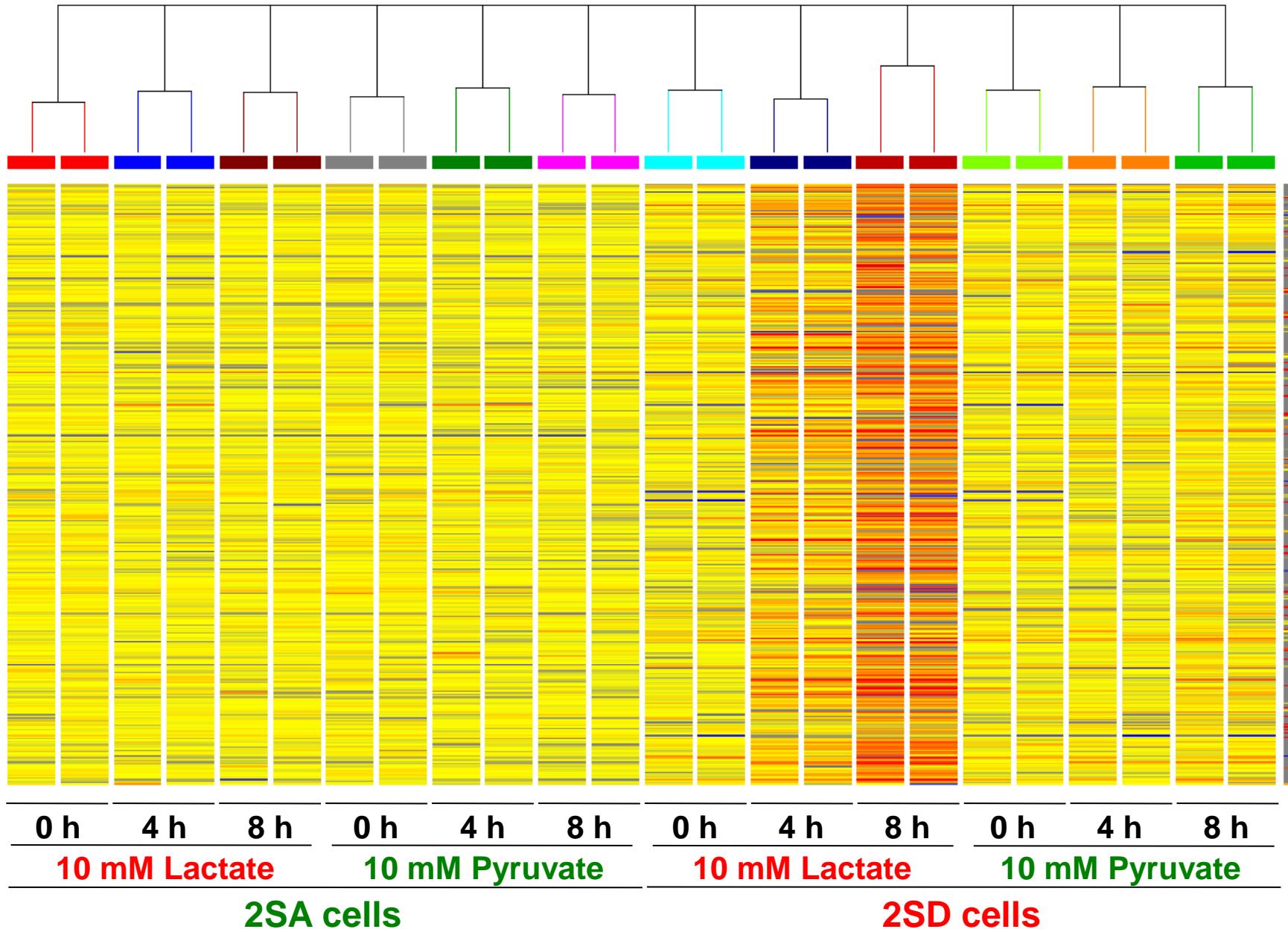
# ミトコンドリア病の体外診断薬の開発

Mitochondrion 20: 34-42, 2015

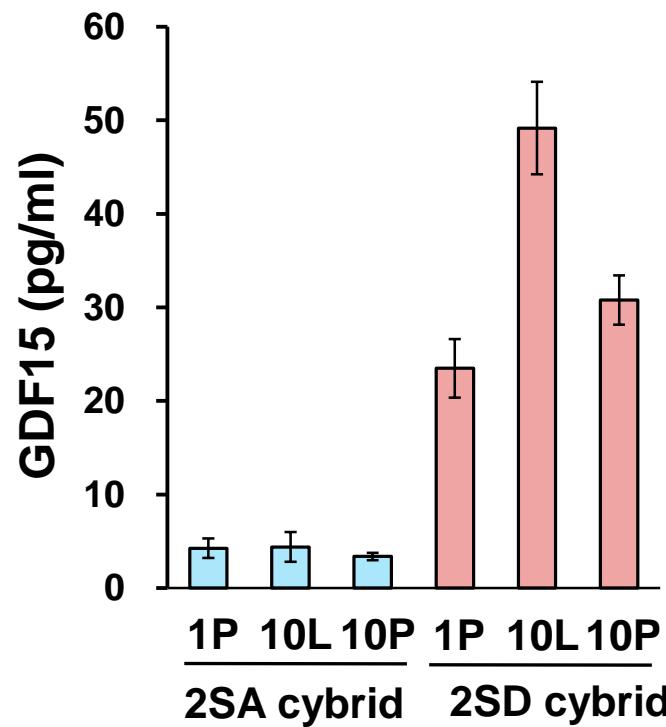
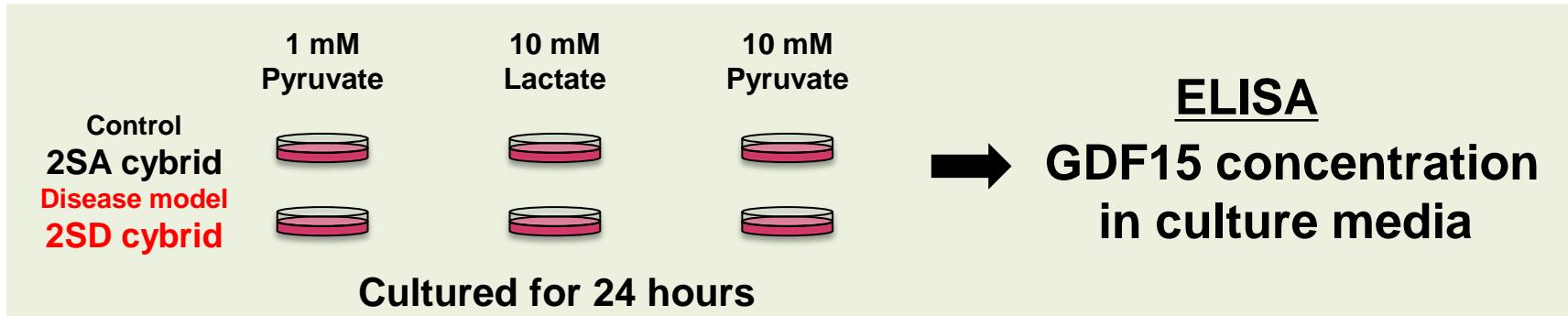
ミトコンドリア病の病因変異を有する細胞モデルで  
乳酸負荷で上昇し、ピルビン酸投与で発現が低下する遺伝  
子産物を同定 → ELISA: 培養上清・患者血清で測定



# 乳酸暴露後の遺伝子発現パターンのクラスター解析

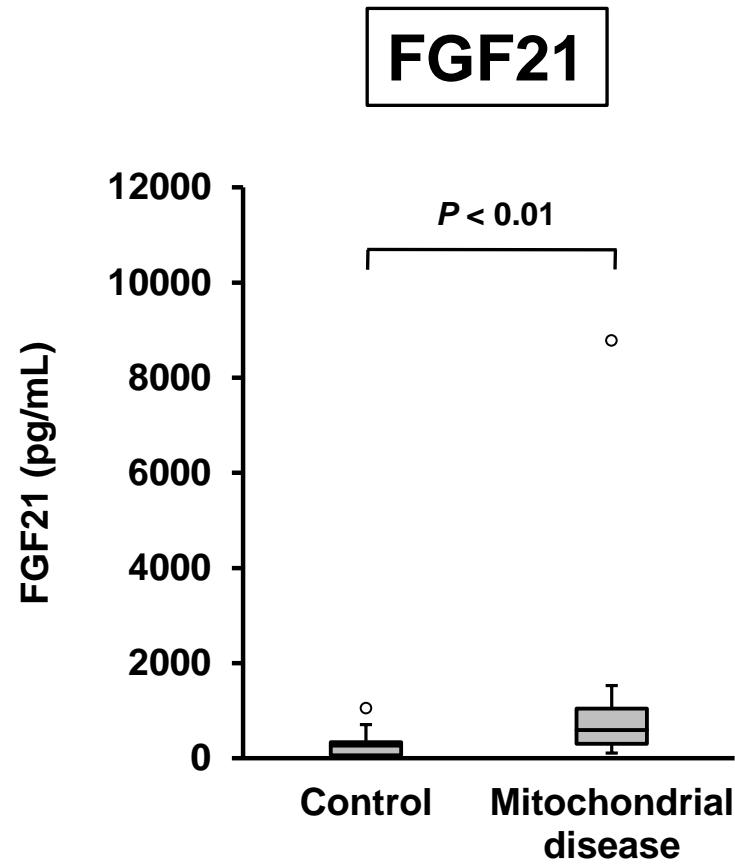
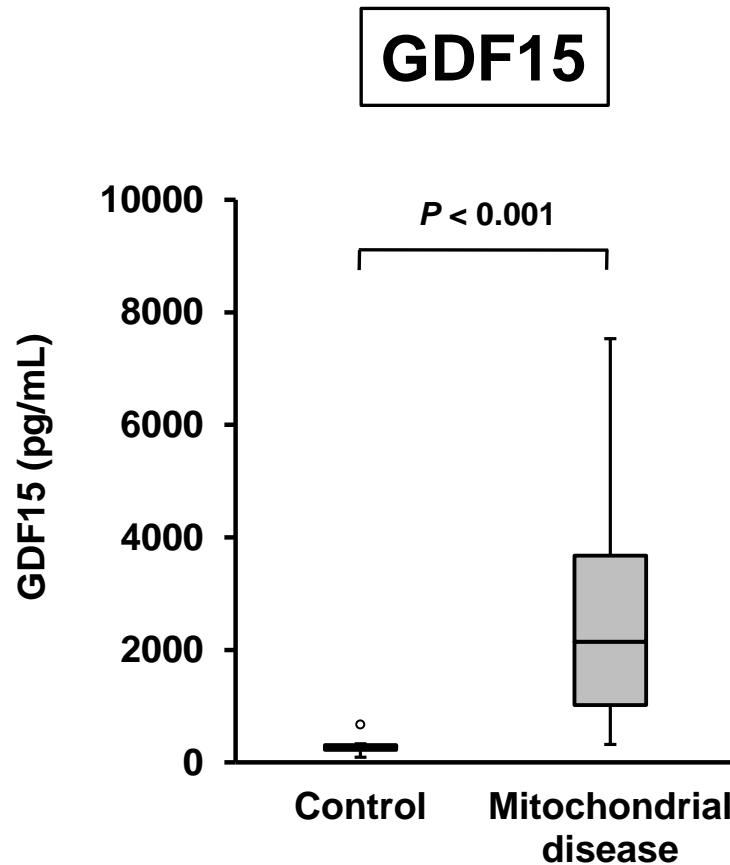


# GDF15は細胞培養液に分泌される



1P : 1 mM Pyruvate  
10L: 10 mM Lactate  
10P: 10 mM Pyruvate

# ミトコンドリア病患者血清 GDF15とFGF21



# ミトコンドリア病の新規体外診断薬

医学生物学研究所に抗体作成依頼

抗GDF15ポリクローナル抗体

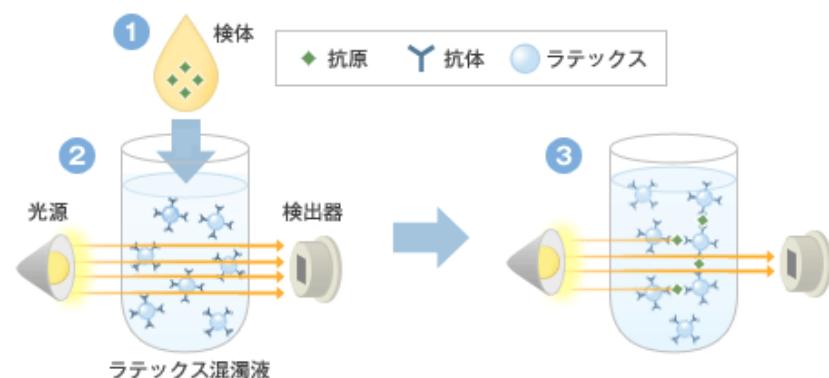
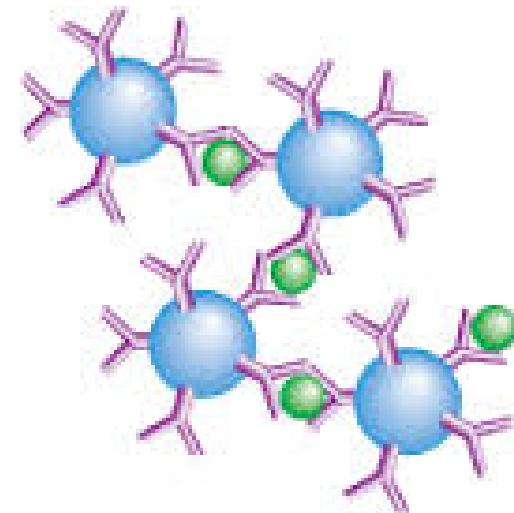
抗GDF15モノクローナル抗体

ELISAによる測定系完成

ラテックス凝集法による測定系開発

薬事承認申請・保険収載を目指す

汎用機（TBA-16000c）での検査



**ピルビン酸ナトリウム  
酸塩基平衡を保つ**

**乳酸アシドーシス治療剤**

# 乳酸アシドーシスの病態

血液が酸性に傾く

細胞内も酸性になる

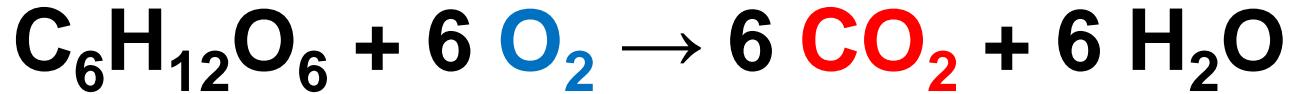
細胞内から「有機酸」を排出できない

細胞内の中間代謝物のバランスが崩れる

細胞がエネルギーを得ることができない

神経細胞が壊死してしまう

細胞内を中性に保つために  
血液を弱アルカリ性に保つ  
肺と腎臓の働き



細胞内で生じた**二酸化炭素**を**肺**から排出する  
細胞内で生じた有機酸を血液に排出する  
腎臓は「酸」を尿に排泄する

# 細胞内を中性に保つために 血液を弱アルカリ性に保つ

血液pHの正常値は7.4

7.0以下 or 7.6以上では長く生存できない

血液pHが弱アルカリ性である理由

- 1) 細胞内で絶えず產生される酸を中和する
- 2) ほぼ中性に保たれている細胞内pHの下では、細胞の中間代謝産物が解離する
- 3) 血液が酸性では有機酸を細胞から排出できない
- 4) 血液が弱アルカリ性なら有機酸を細胞から血液へ排出できる

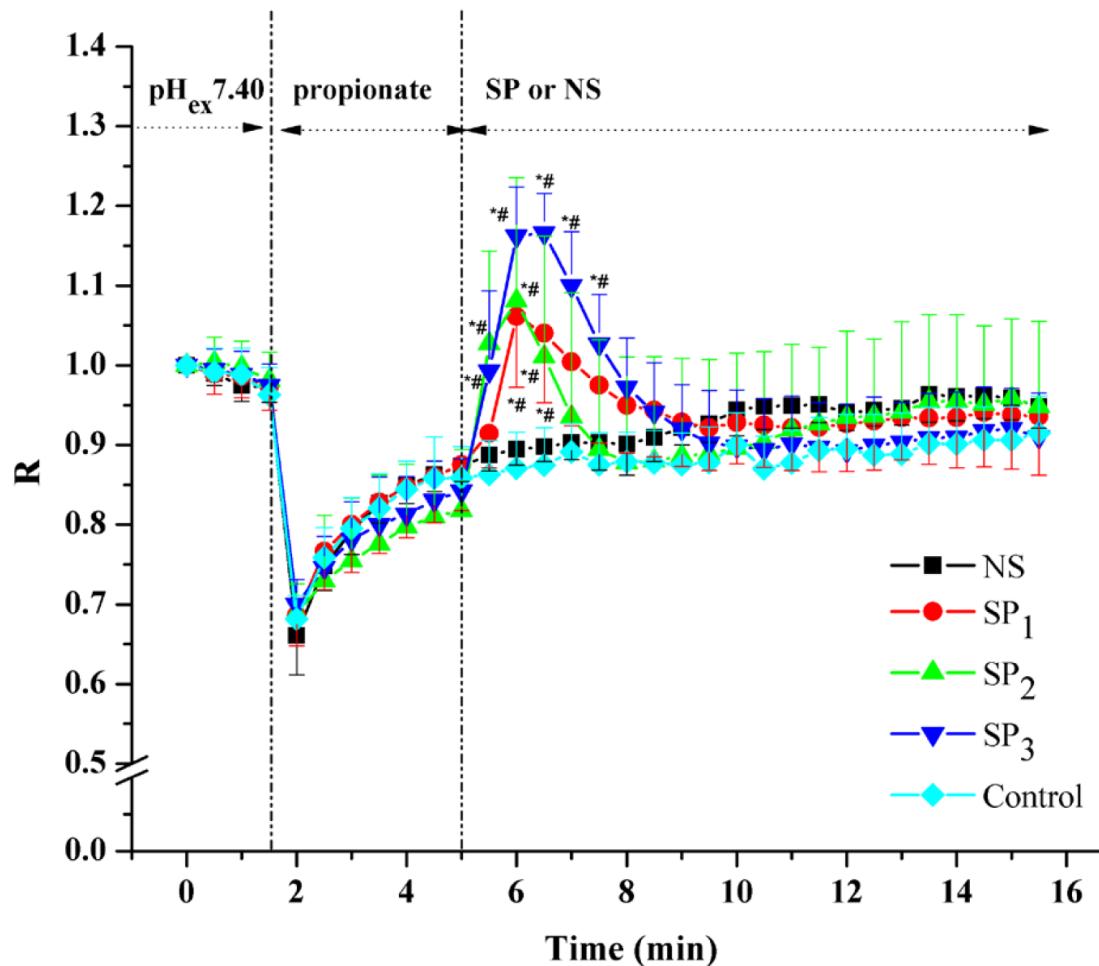


Figure 5. Changes in intracellular pH ( $\text{pHi}$ ) in response to sodium propionate loading and addition of sodium pyruvate (SP)  $33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (SP1 group,  $n = 45$ ),  $66 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (SP2 group,  $n = 45$ ) and  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (SP3 group,  $n = 45$ ). NS addition was performed as negative control group (NS group,  $n = 45$ ). No addition was performed as blank control group (Control group,  $n = 45$ ). There was a positive correlation between BCECF emission ratio ( $R$ ,  $R = F(\text{Ex} = 488\text{nm}/\text{Em} = 535\text{nm})/F(\text{Ex} = 445\text{nm}/\text{Em} = 535\text{nm})$ ) and  $\text{pHi}$ . Data are presented as means (SD). \* $P < 0.05$ , vs. NS; # $P < 0.05$ , vs. control.

## 代謝性アシドーシスの改善に対する ピルビン酸ナトリウムの効果

Yang et al. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2016; 44: 48–55

目的: 代謝性アシドーシスに対するピルビン酸ナトリウム(SP)の効果を調べる。方法: 生体内実験では、塩化アンモニウム( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )誘発高塩素アシドーシスラットモデルに対するSPの効果を評価しました。SPは、SP1、SP2、およびSP3グループに対して、それぞれ2、4、および6  $\text{mmol} / \text{kg} \cdot 1$  の全用量で注入されました。重炭酸ナトリウム(SB)による治療を陽性対照(2  $\text{mmol/kg}$ )として使用し、生理食塩水(NS)による治療を容量対照(2  $\text{mL/kg}$ )として使用しました。注射後のpH、血液ガス、電解質、グルコース、クレアチニン(Cr)、および尿素分析のために、眼静脈叢から血液をサンプリングしました。in vitro実験では、プロピオン酸を適用して、ヒト内皮細胞の細胞内アシドーシスを誘発しました。細胞内pH( $\text{pHi}$ )は、SPの添加後に蛍光測定されました。結果: 生体内研究では、SP1群のpHはNS群のpHと比較して有意な差を示さなかった。SP2およびSP3グループは、NSグループよりも高いpHでした( $P < 0.01$ )。SP3グループは、SBグループ( $P < 0.05$ )およびSP1グループ( $P < 0.05$ )よりも高いpHを示しました。さらに、SP治療はカルシウムの異常を改善し、血中カリウム濃度を低下させました。SP3グループは、SP1グループよりも高い血糖値を示しました( $P < 0.05$ )。血漿Crおよび尿素レベルのすべてのグループ間で有意差は観察されませんでした。in vitro試験では、SPの添加直後に $\text{pHi}$ が上昇しました。結論: データは、SPによる血管内治療が代謝性アシドーシスを改善するための新しい治療戦略であることを示唆しています。

# 最近の基礎研究 (Harvard大学)

## An engineered enzyme that targets circulating lactate to alleviate intracellular NADH:NAD<sup>+</sup> imbalance

細胞内の過還元状態を解消する

Anupam Patgiri<sup>1,2,3</sup>, Owen S. Skinner<sup>1,2,3</sup>, Yusuke Miyazaki<sup>4</sup>, Grigorij Schleifer<sup>4</sup>, Eizo Marutani<sup>4</sup>, Hardik Shah<sup>1,2,3</sup>, Rohit Sharma<sup>1,2,3</sup>, Russell P. Goodman<sup>1,2,3,5</sup>, Tsz-Leung To<sup>1,2,3</sup>, Xiaoyan Robert Bao<sup>1,2,3,6</sup>, Fumito Ichinose<sup>4</sup>, Warren M. Zapol<sup>4</sup> and Vamsi K. Mootha<sup>1,2,3\*</sup>

An elevated intracellular NADH:NAD<sup>+</sup> ratio, or 'reductive stress', has been associated with multiple diseases, including disorders of the mitochondrial electron transport chain. As the intracellular NADH:NAD<sup>+</sup> ratio can be in near equilibrium with the circulating lactate:pyruvate ratio, we hypothesized that reductive stress could be alleviated by oxidizing extracellular lactate to pyruvate. We engineered LOXCAT, a fusion of bacterial lactate oxidase (LOX) and catalase (CAT), which irreversibly converts lactate and oxygen to pyruvate and water. Addition of purified LOXCAT to the medium of cultured human cells with a defective electron transport chain decreased the extracellular lactate:pyruvate ratio, normalized the intracellular NADH:NAD<sup>+</sup> ratio, upregulated glycolytic ATP production and restored cellular proliferation. In mice, tail-vein-injected LOXCAT lowered the circulating lactate:pyruvate ratio, blunted a metformin-induced rise in blood lactate:pyruvate ratio and improved NADH:NAD<sup>+</sup> balance in the heart and brain. Our study lays the groundwork for a class of injectable therapeutic enzymes that alleviates intracellular redox imbalances by directly targeting circulating redox-coupled metabolites.

Our recent work utilizing *LbNOX*, a water-forming NADH oxidase that directly oxidizes intracellular NADH to NAD<sup>+</sup>, demonstrates that reductive stress can cause cellular pathologies, such as impaired proliferation in the face of ETC dysfunction<sup>3</sup>.

The extracellular lactate:pyruvate ratio has classically been used as a marker of intracellular NADH:NAD<sup>+</sup> status<sup>8</sup> due to the high LDH reaction flux and robust transport of lactate and pyruvate across the plasma membrane by monocarboxylate transporters<sup>9</sup>. LDH catalyzes the oxidation of NADH to NAD<sup>+</sup>, while transferring two electrons from NADH to pyruvate to make lactate. Blood lactate:pyruvate levels are often elevated in a variety of diseases, including mitochondrial ETC dysfunction<sup>2,10</sup>, in response to an increased intracellular NADH:NAD<sup>+</sup> ratio. Previously, it was shown that decreasing the extracellular lactate:pyruvate ratio by adding exogenous pyruvate in the medium lowers the intracellular NADH:NAD<sup>+</sup> ratio in cultured cells<sup>11,12</sup>. Sodium pyruvate has also been tested as a therapy for mitochondrial dysfunction<sup>13,14</sup>. However, this approach has been ineffective clinically, in part because it requires administering stoichiometric amounts of the metabolite.

Here, we investigate the possibility of directly targeting the circulating milieu to alleviate intracellular redox imbalance by taking

# 人工的に酵素を連結する **LOXCAT**

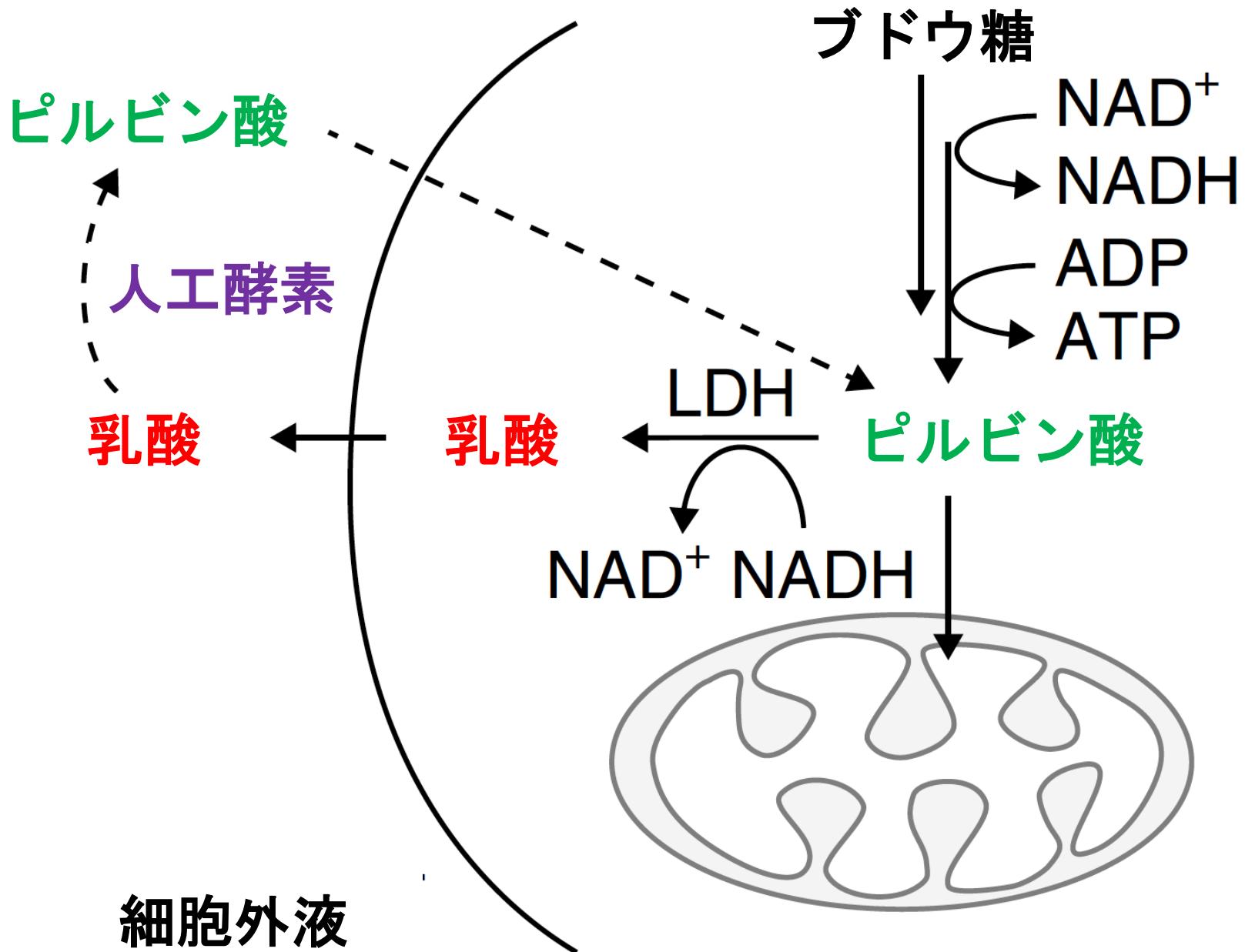
乳酸酸化酵素とカタラーゼ

乳酸をピルビン酸に酸化する

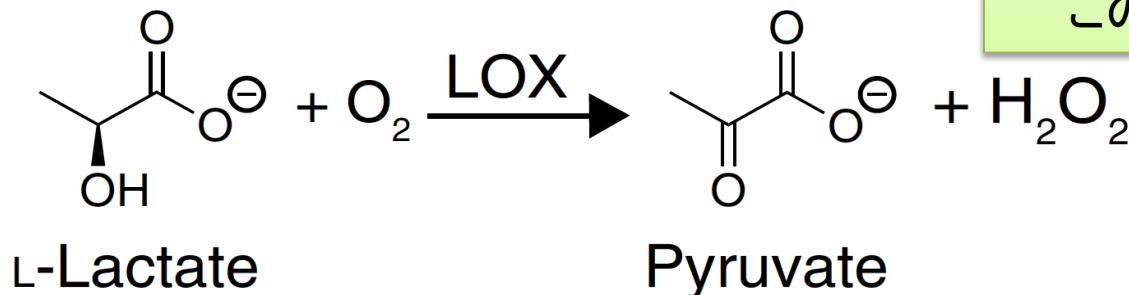


その時に生じた過酸化水素を水と酸素にする





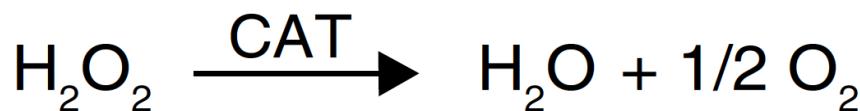
## Enzyme reactions



**LOX = Lactate Oxidase**

乳酸酸化酵素

乳酸を酸化し、ピルビン酸に変換する  
この時、過酸化水素を発生する



**CAT = Catalase**

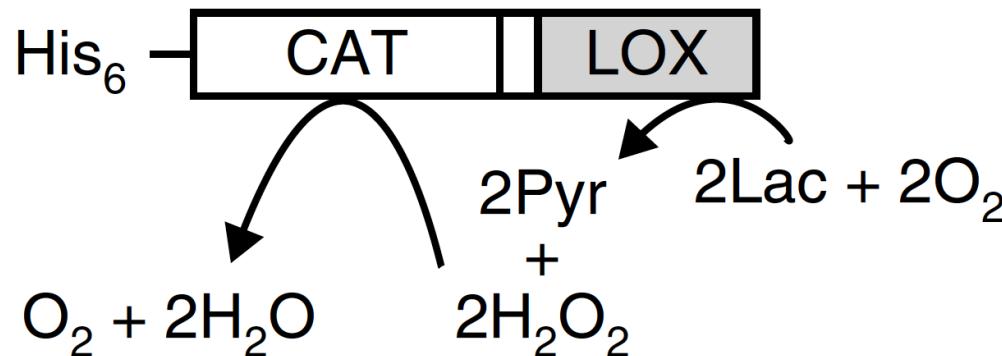
カタラーゼ

過酸化水素を水分子に変換する  
この時、酸素を発生する

LOXCAT construct

N terminus

C terminus



**LOXCAT**

融合酵素

乳酸をピルビン酸に変換  
酸素と水分子を生じる

# ピルビン酸ナトリウムの効能効果

ミトコンドリア研究から新規医薬品を開発  
代謝性アシドーシス改善薬の妥当性

代謝性アシドーシスの原因  
心筋梗塞・溺水・窒息・敗血症  
一酸化炭素中毒・シアン中毒

末梢組織への酸素供給の途絶  
ミトコンドリア酸化的リン酸化系の障害

皆さん、長い間にやあ  
辛りやあことや

ええこともありますで  
がんばってちようだい

おかげさまです

ありがとう

きん

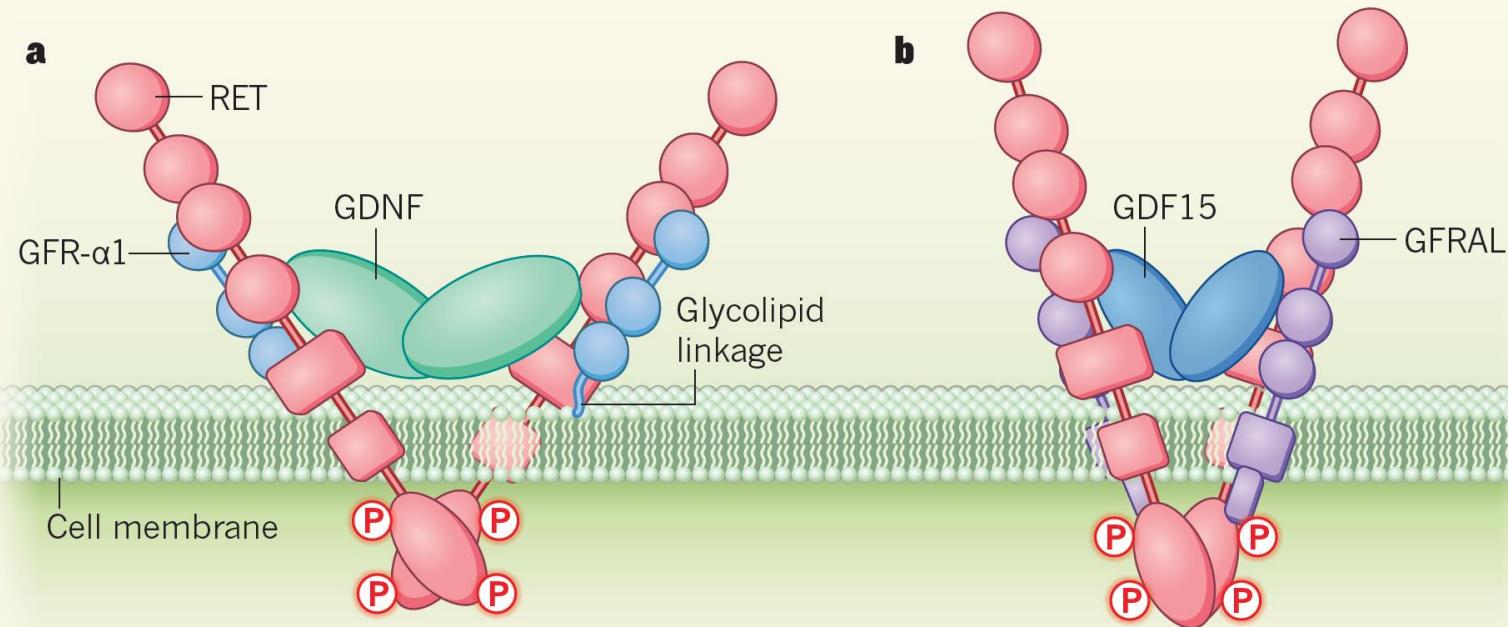


# GFRAL

# GDF15の受容体

# Receptors identified for a weight regulator

*Nature* 550: 195, 2017



GFRAL = GDF15の受容体が、延髄のArea postrema(最後野)とNucleus tractus solitarius(孤束核)にある。ここは嘔吐中枢である。  
血液脳関門が完全ではないので、体の状態を**GDF15**を介してモニターできる。

**GDF15-GFRAL-RET**

# GDF15—From Biomarker to Allostatic Hormone

Stephen O'Rahilly<sup>1,\*</sup>

単なるバイオマーカーからストレス対応ホルモンへ

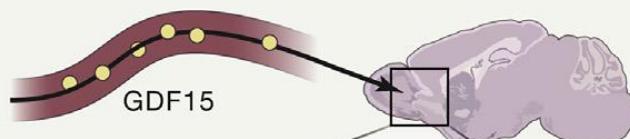
1. Exposure to noxious agent.  
Ingestion of infectious agent or  
poisonous foodstuff.



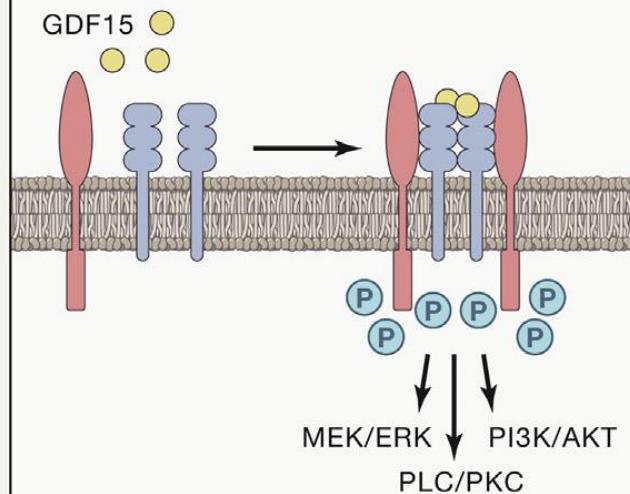
①有害物質への曝露  
感染性物質や有毒な食  
物の摂取

【妊娠初期の悪阻】  
胎盤から分泌された  
GDF15は発達途中  
の胎児が有害物質  
に曝されないよう妊  
婦の食欲を制御

2. Cellular stress causes release of  
GDF15 which travels in the circulation  
to target receptor



3. Action at GFRAL in AP of  
brainstem bring about an aversive  
response; anorexia, nausea and  
reduced movement



②細胞へのストレスに  
よってGDF15が放出さ  
れ、血流によって標的で  
ある受容体に運ばれる

③脳幹の最後核にある  
GFRAL受容体への作用  
によって、嫌悪・忌避の  
応答が惹起される  
(食欲低下・嘔気・寡動)

④行動変化により有害因子  
への曝露が回避される

4. Change in behaviour brings about  
avoidance of further exposure

