

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15083

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたミトコンドリアDNA維持機構の破綻と神経変性への関与

研究課題名(英文) Evaluation of involvement in neurodegeneration by collapse of mitochondrial DNA maintenance mechanism using iPS cells

研究代表者

森野 豊之(Morino, Hiroyuki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：10397953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはPerrault症候群の新規原因遺伝子としてTWNK(C10orf2)を同定した。TWNKはミトコンドリアDNA(mtDNA)のヘリケースをコードしておりミトコンドリアの維持機構に関与している。本研究の目的は、TWNKの変異がmtDNAの維持機構を障害し神経細胞死にいたる過程を培養細胞レベルで再現することである。iPS細胞を樹立する際にmtDNAの異常が初期化されることを利用して、iPS細胞から分化させた神経細胞にmtDNA異常が蓄積される過程を経時的に観察した。ミトコンドリア異常を最小化した細胞株が得られ、遺伝子異常によってmtDNA異常が蓄積されることが示された。

研究成果の概要(英文)：We identified TWNK (C10orf2) as a new causative gene of Perrault syndrome. TWNK encodes mitochondrial DNA (mtDNA) helicase and is involved in mitochondrial maintenance mechanism. The purpose of this study is to reproduce the process of mutations of TWNK damaging the maintenance mechanism of mtDNA and leading to neuronal death by patient-derived iPS cells. Using the fact that mtDNA mutation is initialized when iPS cells are established, we observed the accumulation of mtDNA mutations in neurons differentiated from iPS cells. A cell-line that minimized mitochondrial abnormality was obtained and it was shown that mtDNA mutations accumulated due to TWNK mutations.

研究分野：神経内科

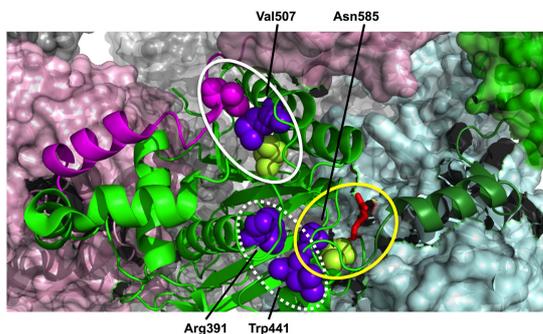
キーワード：遺伝子 脳神経疾患 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1) われわれは神経変性疾患の原因遺伝子を同定し、その変異から病態機序を解明する研究を行ってきた。これまでに家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子 *optineurin* (Nature, 2010) や家族性脊髄小脳変性症の原因遺伝子 *CACNA1G* (Mol Brain, 2015), Perrault 症候群の原因遺伝子 *TWNK* (*C10orf2*) (Neurology, 2014) などを同定してきた^{1,2)}。

(2) 核および mtDNA にコードされているミトコンドリア蛋白質の遺伝子異常により起こるミトコンドリア異常症をはじめとして、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、痙性対麻痺といった神経変性疾患でミトコンドリア機能異常が発症に関与することが知られている。Perrault 症候群は感音性難聴や小脳失調、原発性無月経を呈する遺伝性疾患で、*TWNK* はミトコンドリア DNA (mtDNA) のヘリケースをコードしており、ミトコンドリアの品質管理に深く関与している (図 1)。われわれが同定した変異は複合ヘテロ接合性に発症し、劣性遺伝形式を取ることから機能喪失型の変異によって病態が引き起こされると推定される。*TWNK* に変異が生じると mtDNA の維持機構が破綻し、DNA の欠失、数的減少、点変異の増加が起こることが報告されており、Perrault 症候群だけでなく慢性進行性外眼筋麻痺や先天性小脳変性症など異なる病態も惹起される。しかし、本症候群を含めてミトコンドリア機能異常に起因して神経細胞障害が起こる正確なメカニズムは依然として不明な点が多いのが現状である。

図 1. Perrault 症候群の原因変異



2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、ミトコンドリアの恒

常性維持に関わる分子を解析することで、培養細胞レベルでミトコンドリア異常に伴う神経変性を再現することである。

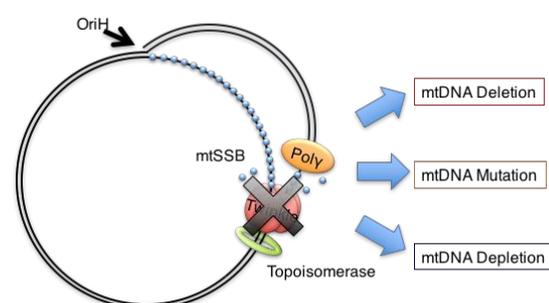
(2) Perrault 症候群の患者から提供していただいた線維芽細胞を用いて iPS 細胞を樹立し、神経細胞に分化させることによって mtDNA の欠失や数的減少、点変異の蓄積を経時的に評価することで、神経変性における mtDNA の恒常性維持が果たす役割を解明する。iPS 細胞を樹立する際に mtDNA の異常が不均等に分配されるため、得られた細胞株の中から mtDNA 異常の少ないものを選択することによって mtDNA 異常を初期化することができる。一方、核 DNA にコードされた *TWNK* の変異は保たれるため、mtDNA の維持機構の障害に起因する mtDNA 異常の経時的な変化を観察するシンプルなモデルが構築される。このモデルを iPS 細胞から神経細胞に分化させた状態に適応することによって、神経変性における mtDNA 維持機構の破綻が及ぼす影響を評価することが可能になる。

3. 研究の方法

(1) 患者由来 iPS 細胞の樹立

Perrault 症候群の患者から得られた皮膚線維芽細胞を用いて Yamanaka 法に準じて iPS 細胞を樹立した。具体的には pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL, pCXWB-EBNA1 などのプラスミドを培養細胞に導入し、得られたコロニーをピックアップして複数の細胞株を得た。患者由来 iPS 細胞には *TWNK* 遺伝子変異が複合ヘテロ接合性に含まれており、mtDNA の異常が通常よりも多く存在することが推測されたため、変異の少ない細胞株を得るために十分量のコロニーをピックアップした。

図 2. mtDNA 異常



(2) mtDNA 異常の評価と細胞株の選別

mtDNA 維持機構が破綻した際に生じる遺伝子変異のパターンには、mtDNA の欠失、数的減少、点変異があり、それぞれを評価するために long-range PCR、定量 PCR、次世代シーケンサを用いて解析を行った(図2)。その結果、遺伝子異常の少ない細胞株を選択して以下の実験に用いた。

(3) 患者由来 iPS 細胞から神経細胞への分化

iPS 細胞を FSEBq 法によって培養し embryoid body を形成させたのち、FGF-2 などの成長因子とともにマウス胎仔から得られた rhombic lip の細胞と共培養することによって小脳プルキンエ細胞への分化誘導を行った。

(4) 経時的な mtDNA 異常の蓄積の評価

患者由来 iPS 細胞から神経細胞への分化誘導を行ったのちに培養を継続し、時間経過とともに mtDNA 異常の蓄積を評価した。前述したように遺伝子変化のパターンは mtDNA の欠失、数的減少、点変異の3つがある。欠失は約 16.5kbp ある mtDNA を4つのプライマーセットで増幅し、それぞれ 6kbp, 9kbp, 11kbp, 14kbp のアンプリコンをアガロースゲル電気泳動によって検出した。mtDNA のコピー数は qPCR を用いて行った。内部コントロールとして核 DNA にコードされている APP 遺伝子を用い、mtDNA に存在する CytB 遺伝子を相対的に定量した。点変異は次世代シーケンサを用いて解析した。Variant をコールしたのちに注釈をつけ、総数及び新規のもので正常対照との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 患者由来 iPS 細胞の樹立は正常対照からよりも効率が低かった。免疫組織学的評価や形態学的評価でも未分化能が低く、神経細胞への分化効率も低値だった。十分量の細胞株を得るために通常よりも多い施行を繰り返し、その後の検討に必要な細胞株を得ることができた。

(2) 患者由来 iPS 細胞から分化した神経細胞で mtDNA の異常を評価した。数的減

少について解析した結果、核 DNA に存在する APP の遺伝子量との相対的定量化にて正常対照で約 120 倍、患者由来 iPS 細胞で約 80 倍となり、患者由来 iPS 細胞で mtDNA のコピー数が有意に減少していることが示された(図3)。欠失は4つのアンプリコンに分けて解析したが(図4)、患者由来 iPS 細胞から分化した神経細胞も正常対照を用いたものも欠失は検出されなかった。点変異に関しては総数で比較すると正常対照で約 35 個、患者由来 iPS 細胞で 33 個の変異を認めたが有意差はなく、新規の変異で比較すると正常対照で 11 個、患者由来 iPS 細胞で 6 個認めたが、こちらも統計学的に有意差は見られなかった(図5)。

図3. mtDNA のコピー数

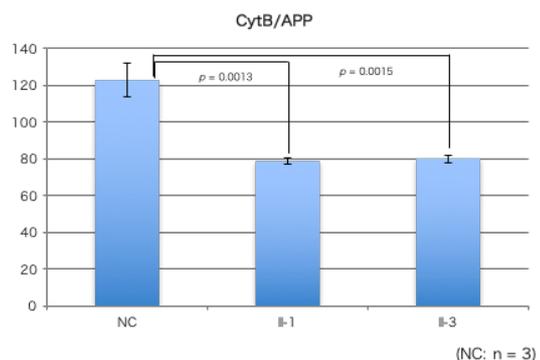
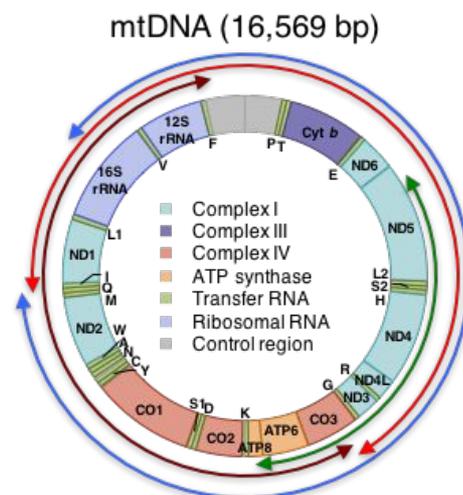
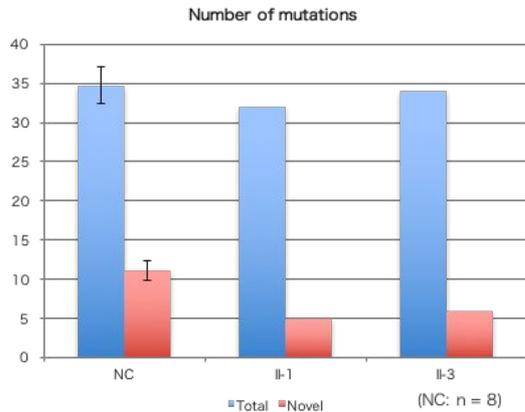


図4. mtDNA の long-range PCR



(3) mtDNA 維持機構に障害のある患者由来 iPS 細胞から分化させた神経細胞で mtDNA 異常が蓄積されるモデルを構築した。今後、この系が神経細胞内で mtDNA 維持機構がどのように細胞傷害に関与しているかを明らかにする上で有用なツールとなりうることを期待される。

図 5. mtDNA の点変異



<引用文献>

- 1: Maruyama H, Morino H, Ito H, et al. Nature. 2010 May 13;465(7295):223-6.
- 2: Morino H, Pierce SB, Matsuda Y, et al. Neurology. 2014 Nov 25;83(22):2054-61.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1: Miyamoto T, Akutsu SN, Fukumitsu A, Morino H, Masatsuna Y, Hosoba K, Kawakami H, Yamamoto T, Shimizu K, Ohashi H, Matsuura S. PLK1-mediated phosphorylation of WDR62/MCPH2 ensures proper mitotic spindle orientation. Hum Mol Genet. 2017 Nov 15;26(22):4429-4440. 査読あり

2: Naito H, Takahashi T, Kamada M, Morino H, Yoshino H, Hattori N, Maruyama H, Kawakami H, Matsumoto M. First report of a Japanese family with spinocerebellar ataxia type 10: The second report from Asia after a report from China. PLoS One. 2017 May 19;12(5):e0177955. 査読あり

3: Morino H, Matsuda Y, Muguruma K, Miyamoto R, Ohsawa R, Ohtake T, Otobe R, Watanabe M, Maruyama H, Hashimoto K, Kawakami H. A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. Mol Brain. 2015 Dec 29;8:89. 査読あり

4: Saji N, Kawarai T, Miyamoto R, Sato T, Morino H, Orlicchio A, Oki R, Kimura K, Kaji R. Exome sequencing identifies a novel intronic mutation in ENG that causes recurrence of pulmonary arteriovenous malformations. J Neurol Sci. 2015 May 15;352(1-2):29-33. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

1: 森野 豊之, 低電位活性化型 Ca チャンネル CACNA1G の変異は脊髄小脳変性症の原因である, 第 39 回日本神経科学大会, 2016

2: 森野 豊之, 優性遺伝性脊髄小脳変性症の新規原因遺伝子 CACNA1G の同定, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

原爆放射線医科学研究所 分子疫学研究分野
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/epidem/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

森野 豊之 (MORINO, Hiroyuki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号: 10397953