

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06848

研究課題名（和文）ゲノム編集技術を駆使したミトコンドリアDNA変異iPS細胞病態モデルの確立

研究課題名（英文）Establishment of iPSC disease models with mitochondrial DNA mutations using genome editing technology.

研究代表者

八幡 直樹（Yahata, Naoki）

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：60450607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ミトコンドリア病の病態解明を目指し、種々の変異 mtDNA 比率を有する MELAS-iPS細胞から骨格筋細胞を誘導した。これらの培養上清代謝産物を LC-MSにて解析したところ、変異 mtDNAの有無で代謝プロファイルに違いが見られた。また、薬剤添加で転写因子 NGN2の発現が誘導できる iN-iPS細胞を作製し、神経への分化誘導を試みたところ、変異 mtDNAを有する iN-iPS細胞からも、活動電位を生じる神経細胞が得られた。加えて、最新塩基編集ツールを用いて、薬剤投与依存的に mtDNA変異を導入できる iPS細胞を作製した。薬剤投与後、短期間で ND4遺伝子に点変異を導入することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、分化誘導が難しい、ミトコンドリア病の原因となる変異 mtDNAを有する iPS細胞から、骨格筋細胞および神経細胞への分化誘導に成功した。さらに、塩基編集技術を用いることで、正常 iPS細胞に変異 mtDNAを導入することに成功した。本研究で作製したこれらの iPS細胞モデルは、今後ミトコンドリア病の病態解析、さらには治療法の開発に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the cellular phenotypes of skeletal myocytes and neuronal cells differentiated from MELAS-iPSCs with mtDNA mutation in order to elucidate the pathophysiological mechanism of mitochondrial diseases. Skeletal myocytes were differentiated from MELAS-iPSCs containing various proportions of mutant mtDNA. Metabolic profiles in the culture supernatants were analyzed using a LC-MS, revealing differences in their profiles depending on the presence or absence of mutant mtDNA. We also generated iN-iPSCs in which the expression of NGN2 could be induced by the addition of Doxycycline (Dox). Neuronal cells capable of generating action potentials could be obtained from iN-iPSCs with mutant mtDNA. We tried to create iPSCs in which mtDNA mutation could be introduced in a drug-dependent manner using the latest base editing tool. By adding Dox, we could introduce a point mutation into the ND4 gene in normal iPSCs.

研究分野：幹細胞創薬生命科学

キーワード：mtDNA iPS細胞 TALEN ミトコンドリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの働きが低下することが原因で発症する病気を総称してミトコンドリア病と呼ぶが、ミトコンドリアの機能低下の要因は様々である。遺伝的原因としては、いわゆる核ゲノムにコードされた遺伝子変異によるものと、ミトコンドリアが独自に持つ、1細胞当たり数百～数千個存在するミトコンドリア DNA (mtDNA)の変異によるものに大別される。このうち mtDNA の変異によって生じるミトコンドリア病の多くは、1つの細胞の中に正常 mtDNA と変異 mtDNA が混在する状態(ヘテロプラスミー)で発症する。そして、変異 mtDNA の割合が一定以上になると機能障害を起こすことが知られている。

ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群(MELAS) はミトコンドリア病の一つで、mtDNA の A3243G, T3271C, G13513A 等の変異が原因で発症することが知られている。臨床症状は、乳酸アシドーシス、脳卒中様発作、てんかん、認知症、筋力低下、頭痛、難聴、糖尿病等非常に多様であり、根本的治療法が存在しない。

MELAS を含む mtDNA 変異に由来するミトコンドリア病の病態解明および治療法の開発に際して、これまで、患者由来線維芽細胞や Cybrid/ミトマウスといったモデル細胞/モデル動物等が使われているが、てんかんや知的障害、精神症状など多様な中枢神経症状を含む複雑な病態の多くは再現されておらず、その発症機構はほとんど明らかになっていない。また、mtDNA の DNA 配列を操作する技術が未成熟であり、疾患モデルを作出すること自体が容易ではない。2007年に初めて報告されたヒト iPS 細胞は、疾患患者細胞をリプログラミングすることで得られ、さらに分化多能性を有することから、実際に病状が出現するヒトの細胞へ分化誘導することにより、病態を細胞レベルで再現できる可能性があり、当疾患群に対する新たな研究手段を提示した。

2012年を皮切りに mtDNA 変異が原因のミトコンドリア病患者由来 iPS 細胞が樹立され、病態解析に関する報告が続いているが、その中で、神経細胞や心筋細胞等への分化や成熟過程が阻害されることが分かってきた。研究代表者らも独自に樹立した G13513A 変異 MELAS 患者由来 iPS 細胞の胚様体形成実験において、変異 mtDNA 比率が高い iPS 細胞は誘導 16 日目で平滑筋マーカー SMA 陽性細胞が観察されないこと、神経細胞マーカーである TUBB3 陽性細胞において神経突起の伸張が観察されない等の違いがあることを明らかにした(*Mol Ther Methods Clin Dev.*, 20, 54-68, 2021)。これらは、乳児期～小児期に多く発症するミトコンドリア病の病態の一側面を反映している可能性があるが、幅広い年齢で発症する本疾患群の病態を理解するためには、成熟した分化細胞での細胞表現型を明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、mtDNA 変異に由来するミトコンドリア病の病態を iPS 細胞から誘導した骨格筋細胞・神経細胞で再現することを目指した。さらに変異 mtDNA の割合と細胞表現型との因果関係をゲノム編集技術(TALEN・DdCBE)を駆使して明らかにし、本疾患群の発症機構の理解および治療法開発に寄与することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(情報公開できる範囲で記載しております。)

### 4. 研究成果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoki Yahata and Ryuji Hata
2. 発表標題 Development of mutant mtDNA-targeted TALENs and their application to iPSC-based mitochondrial disease model.
3. 学会等名 Euromit2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八幡 直樹、大熊 真人、秦 龍二
2. 発表標題 ミトコンドリア病患者由来iPS細胞の神経細胞への分化誘導
3. 学会等名 第55回藤田医科大学医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八幡 直樹、帽田 仁子、秦 龍二
2. 発表標題 ミトコンドリア病iPS細胞の変異mtDNA比率を改変するPlatinum TALENの改良
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第6回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡 直樹、秦 龍二
2. 発表標題 ミトコンドリア病患者由来iPS細胞の骨格筋細胞への分化誘導
3. 学会等名 第53回藤田医科大学医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡 直樹
2. 発表標題 変異mtDNAを標的としたTALENの開発とミトコンドリア病iPS細胞モデルへの応用
3. 学会等名 第20回日本ミトコンドリア学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 TALエフェクターヌクレアーゼ対およびその利用	発明者 八幡 直樹、秦 龍二	権利者 学校法人藤田学園
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-217626	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大熊 真人 (Ohkuma Mahito) (50329710)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究分担者	中嶋 和紀 (Nakajima Kazuki) (10442998)	岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・准教授 (13701)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	秦 龍二 (Hata Ryuji)	藤田医科大学・医学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------