

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860623

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたミトコンドリア病の解析および治療薬開発

研究課題名(英文) Disease Modeling for Mitochondrial Disease Using MELAS Specific Induced Pluripotent Stem Cells

研究代表者

小平 真幸 (Kodaira, Masaki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70464865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：難治性疾患であるミトコンドリア病の一病型であるMELASの患者より多分化能を有するiPS細胞の樹立に成功した。樹立したiPS細胞では各々のラインで変異率は異なり、低いものは3.6%から高いものは99.4%と広く分布していた。未分化iPS細胞から分化した線維芽細胞について変異率やミトコンドリア機能について解析した。解析した変異率の高いラインでは電子伝達系複合体での機能低下を認め、変異率が低いラインでは機能低下を認めなかった。これはMELAS患者の臨床的特徴として報告されているが、ここまでの研究において我々はMELASにおける病態モデルを構築することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We successfully established iPSCs from MELAS- fibroblasts. MELAS is one of the most common mitochondrial disease and there are no effective ways to cure the disease at the moment. MELAS-iPSC lines ranged from 3.6% to 99.4% of m.3243A>G heteroplasmy levels. The enzymatic activities of mitochondrial respiratory complexes indicated that MELAS-iPSC-derived fibroblasts with high heteroplasmy levels showed a deficiency of complex I activity but MELAS-iPSC-derived fibroblasts with low heteroplasmy levels showed normal complex I activity. Our data indicate that MELAS-iPSCs can be models for MELAS but we should carefully select MELAS-iPSCs with appropriate heteroplasmy levels and respiratory functions for mitochondrial disease modeling.

研究分野：人文

キーワード：ミトコンドリア病 iPS細胞 疾患解析

1. 研究開始当初の背景

昨今の医療技術の向上にも関わらず、難治性致死疾患が依然として多数存在する。

その課題を克服し得る手段として、山中らが開発した人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem :iPS cells) 技術があげられる (Takahashi K. et al. Cell 131:861-727, 2007)。

ミトコンドリア異常によって筋と中枢神経におもに症状があらわれる疾患を総称してミトコンドリア脳筋症とよぶ。

2. 研究の目的

難治性遺伝疾患であるミトコンドリア脳筋症から iPS 細胞を樹立し、心筋細胞へ分化誘導する。

・樹立された iPS 細胞でのミトコンドリア DNA の変異率を調べる

・患者の遺伝子異常を反映した生きた病的な心筋を解析できる唯一の実験系である利点を生かし、解析結果から導かれた病態を改善し得る薬剤のスクリーニングや遺伝子操作を行い、新しい治療薬の開発や病態解明に直結する研究の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の樹立法は複数報告されているが、我々は最も安定的で再現性の高い山中法を選択した。まず一カ月生検皮膚組織を培養し、皮膚線維芽細胞を樹立後、レトロウイルスベクターを用いて転写因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、±cMYC) を同細胞に導入し、フィーダー細胞であるマウス線維芽細胞 (SNL 細胞) 上で basic FGF を添加したヒト ES 細胞用培地で約 1 カ月間培養した後、出現した ES 細胞様コロニーを 20 個程度ピックアップし、継代培養を経て iPS 細胞株が樹立することとした。

(2) 樹立した iPS 細胞は①免疫染色 (Oct3/4、Nanog、SSEA3・4、TRA1-60・81 の未分化マーカーの発現の確認) ②奇形腫形成能の確認 (SCID マウスへの移植実験) で多分化能が示すこととした。

(3) MELAS の患者から樹立されたそれぞれのラインについて継代数 10 の段階で DNA を抽出する。Real time PCR 法を用いてそれぞれ

のミトコンドリア DNA の変異率 (ヘテロプラスミー) を解析し、変異率の分布を解析する。

(4) 継代を重ねる過程でさまざまな修飾が加わり変異率が変化する可能性があり、継代数 40 で再度変異率を解析し、継代数 10 と継代数 40 で変異率の比較をおこなう。

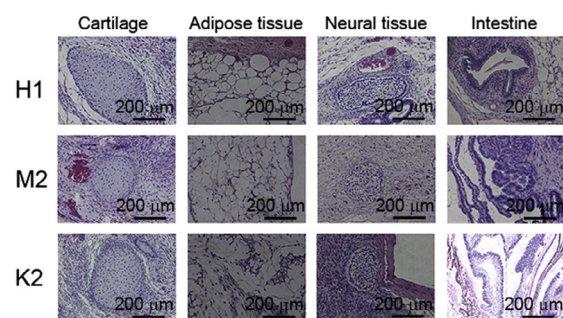
(5) 浮遊培養法を用いて胚様体を形成し、胚様体から iPS 細胞由来の分化細胞、線維芽細胞を形成する。この iPS 細胞由来の線維芽細胞の変異率を解析する。

(6) iPS 細胞由来の線維細胞の電子伝達系複合体 I から IV 機能について 4 ラインで解析する。

4. 研究成果

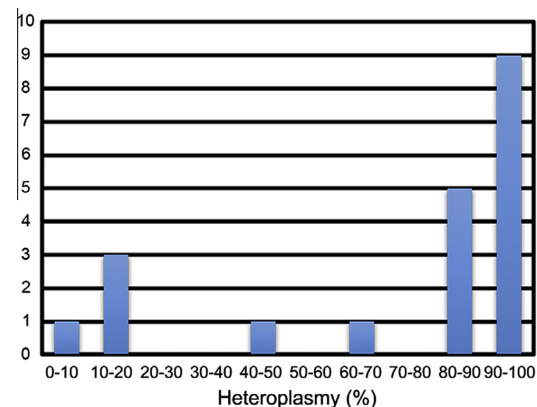
- (1) MELAS 患者から iPS 細胞を樹立することに成功し、20 ライン以上作成した。
- (2) 免疫染色および奇形腫形成 (図 1) において樹立された iPS 細胞の多分化能が証明された。

図 1 奇形腫形成



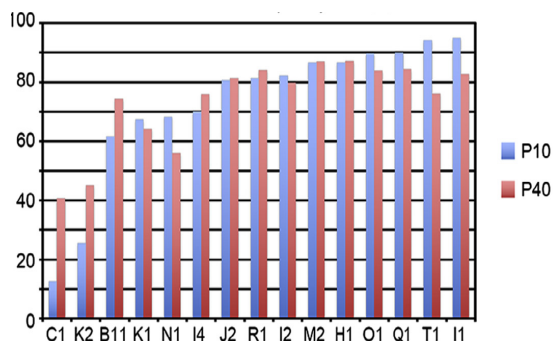
- (3) 継代数 10 の段階における変異率は 4% から 100% と広く分布を認めた。(図 2)

図 2 MELAS iPS 細胞変異率分布



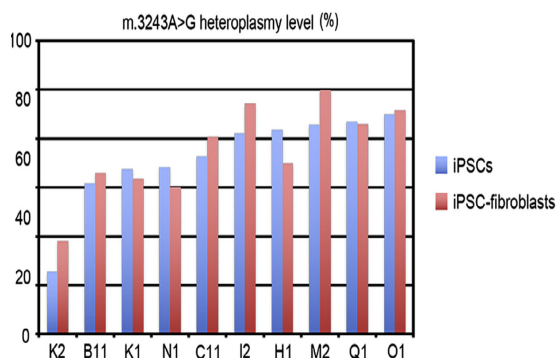
- (4) 継代数 10 と継代数 40 で変異率の大きな差は認めなかった。(図 3)

図3 継代数による変異率の変化



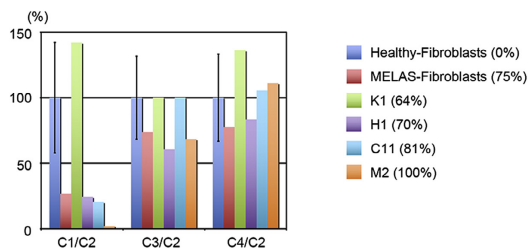
(5) iPS細胞とiPS細胞由来の線維芽細胞で変異率に大きな差を認めなかった。

図4 iPS細胞と分化した線維芽細胞での変異率の変化



(6) 変異率が高い H1 (70%) M2 (100%) C11 (81%) では複合体 I での酵素活性低下を認めたが、変異率 64% の K1 では複合体 I の酵素活性低下を認めなかった。

図5 iPS由来の分化した線維芽細胞におけるミトコンドリア機能(複合体 I、III、IVの複合体 II を基準とした酵素活性)



ここまでの研究において我々は MELAS の病態モデルを構築することに成功した。今後の研究としてドラッグスクリーニングをおこなうことが可能になった。また、将来的には変異率が低いラインを選択して MELAS 患者に細胞移植することで有効な治療法となる可能性がある。

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 1 件)

1. Impaired respiratory function in MELAS-induced pluripotent stem cells with high heteroplasmy levels

Kodaira M, Hatakeyama H, Yuasa S, Seki T, Egashira T, Tohyama S, Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Hashimoto H, Kusumoto D, Kunitomi A, Takei M, Kashimura S, Suzuki T, Yozu G, Shimojima M, Motoda C, Hayashiji N, Saito Y, Goto Y, Fukuda K.  
FEBS Open Bio. 2015 Mar 20;5:219-25.

査読あり

doi: 10.1016/j.fob.2015.03.008.

eCollection 2015.

[学会発表] (計 1 件)

1. 発表者: 小平真幸  
表題: Disease Modeling for Mitochondrial Disease Using MELAS Specific Induced Pluripotent Stem Cells  
学会名: 第 78 回日本循環器学会学術集会  
発表年月日: 2014 年 3 月 22 日

発表場所: 東京都千代田区・東京国際フォーラム

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小平 真幸 (KODAIRA, Masaki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 70464865

### (2) 研究協力者

湯浅 慎介 (YUASA, Shinsuke)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号： 90398628

江頭 徹 (EGASHIRA, Toru)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 10465023

橋本 寿之 (HASHIMOTO, Hisayuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 90528390

楠本 大 (KUSUMOTO, Dai)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 70571727

國富 晃 (KUNITOMI, Akira)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 30570882

榎村 晋 (KASHIMURA Shin)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 90571125