

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891032

研究課題名(和文) 欠失型mtDNAの蓄積による気分障害発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) The role of deleted-mtDNA accumulation in the molecular mechanism underlying the pathogenesis of mood disorders

研究代表者

澤田 知世 (Sawada, Tomoyo)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90708471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：気分障害の発症に関わる分子メカニズムの一つとして、POLG1(ミトコンドリアDNA合成酵素)変異によるmtDNAのクローナルな蓄積に伴うミトコンドリア異常が引き起こす特定神経回路の機能障害について明らかにするため、(1)マウス脳切片よりレーザーマイクロダイセクションで単離回収した神経細胞における欠失型mtDNA定量法の確立、(2)POLG1変異細胞作製のためのヒトiPS細胞樹立および神経細胞分化誘導系の確立を行った。

研究成果の概要(英文)：Clonal accumulation of deleted-mtDNA caused by POLG1 mutation in the specific neural circuit is thought to be one of the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of mood disorders. To analyze the neuronal dysfunction caused by the accumulation of deleted-mtDNA, we established a method for the quantification of deleted-mtDNA in cells dissected from mouse brain by qPCR. We also generated induced-pluripotent stem (iPS) cells from human peripheral blood mononuclear cells using episomal vectors, and successfully differentiated them into neurons, to generate PLOG1 mutant iPS cells using genome editing methods.

研究分野：精神医学、細胞生物学

キーワード：mtDNA 双極性障害

1. 研究開始当初の背景

精神疾患は、その患者数が近年増加の一途をたどり、大きな社会問題となっている。その中でも、うつ病や双極性障害（躁うつ病）は、自殺の主な要因となるなど、社会生活への影響がきわめて大きく、原因解明と診断法・根本的治療法の開発が強く望まれる疾患である。遺伝性筋疾患である慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO）ではしばしば双極性障害やうつ病を伴うことが知られているが、このような患者では、筋肉だけでなく脳にも欠失型ミトコンドリア DNA (mtDNA) の蓄積が認められること (Suomalainen et al., 1992) に加え、双極性障害患者の死後脳でも、一部に mtDNA 欠失の増加が観察されており (Kato et al., 1997)、双極性障害の少なくとも一部に mtDNA 変異によるミトコンドリア機能障害が関与する可能性が示唆された。

そこで申請者の所属する研究チームでは、CPEO の原因遺伝子である *Polg1* (ミトコンドリア DNA 合成酵素) 変異体 (D181A) の神経細胞特異的トランスジェニック (Tg) マウス (Kasahara et al., 2006) を作製し解析を行ったところ、このマウスでは情動を司る神経系への mtDNA および呼吸鎖複合体 IV サブユニット I 陰性細胞の選択的な蓄積 (図 1) に伴い、平均して半年に 1 回、2~3 週間継続する反復性のうつ病様エピソードが観察されることを見出した (未発表データ)。双極性障害は躁状態とうつ状態の再発を繰り返す疾患であり、病相を繰り返すごとに再発の間隔が短縮することが知られているが、同様の傾向が、変異 *mPolg1* Tg マウスでも観察される。しかしながら、なぜ情動に関わる神経系だけに mtDNA が蓄積するのかは全くの謎である。

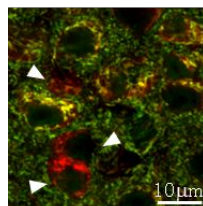


図1 変異 *Polg1* Tg マウス脳切片の蛍光免疫染色。緑:ミトコンドリア呼吸鎖複合体IVサブユニットI (MTCO1)、赤:ミトコンドリア呼吸鎖複合体II (SDHA)、矢頭はMTCO1陰性細胞

近年、神経変性疾患における進行性の神経変性のメカニズムとして「蛋白癌仮説」が提唱されている。これは、異常タンパク質が増殖し、がん細胞が転移するように、シナプスを介してほかの細胞に広がることで神経変性が進行するという仮説であり、実際にパーキンソン病における α -Synuclein (α -Syn)、アルツハイマー病における tau などの神経細胞から神経細胞への伝播が確認されている (Kostanzo et al., 2013)。これを踏まえ、申請者は、双極性障害患者や変異 *mPolg1* Tg マウスで認められるうつ状態の出現と病相再発の間隔短縮に、 mtDNA の特定神経回路へのクローナルな蓄積が関与しているのではないかと考えた (図 2)。 mtDNA が α -Syn のように神経ネットワークなどを介してほかの細胞に伝播することで、互いに密接な線維連絡のある情動神経回路に蓄積

し、これによるミトコンドリア機能不全が引き金となって生じる神経機能障害によりうつ状態の発症と反復に至る可能性が考えられる。

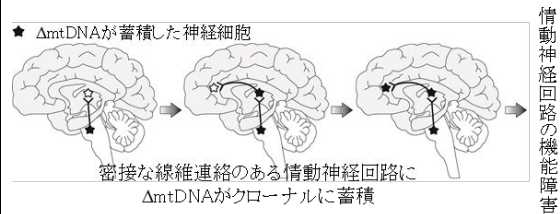


図2 本研究の仮説

2. 研究の目的

本研究の目的は、

- (1) mtDNA の神経細胞間伝播
- (2) mtDNA の蓄積およびこれによるミトコンドリア機能障害

について培養神経細胞を用いて検討し、気分障害の発症にかかわる分子メカニズムのひとつとしての ' mtDNA のクローナルな蓄積に伴うミトコンドリア機能障害が引き起こす特定神経回路の機能障害 ' について明らかにすることである。

3. 研究の方法

マウス初代神経細胞に mtDNA および変異 *Polg1* を導入し、 *Polg1* 変異による継時的な mtDNA の蓄積、 遺伝子導入された細胞から、遺伝子導入されなかった周辺細胞への mtDNA の伝播について検討する。また CRISPR/Cas9 システムを用いたヒト iPS 細胞のゲノム編集により、変異 *POLG1* 細胞を作製し、ヒト細胞においても同様の検討を行う。加えて、ミトコンドリア膜電位や ATP 産生能、解糖系活性等の測定により、 mtDNA の蓄積が神経細胞のミトコンドリア機能におよぼす影響について検討する。神経細胞の形態や機能についても解析を行い、最終的には、 mtDNA の蓄積と神経細胞機能障害との関連を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 欠失型 mtDNA (mtDNA) の定量

mtDNA および変異 *Polg1* を導入したマウス初代神経細胞や、ゲノム編集により *POLG1* に変異を導入したヒト iPS 細胞由来神経細胞における mtDNA の定量法を確立するため、レーザーマイクロダイセクションによりマウス脳切片から単離回収した神経細胞を用いてリアルタイム PCR 解析を行った。 mtDNA を多く含む神経細胞と正常神経細胞とを比較するため、 mtDNA の蓄積が観察される高齢 (>100 週齢) 変異 *Polg1* Tg マウスの脳切片を作製し、COX 活性染色およびニッスル (チオニン) 染色を行った。COX は mtDNA にコードされていることから、この活性が低下した細胞では、COX 領域を含む mtDNA 配列の少なくとも一部が欠失していると考えられる。レーザーマイクロダイセクションにより単離、

回収した COX 活性陽性細胞、陰性細胞それぞれ100個からDNAを抽出し、mtDNA上の *D-loop* 配列 (mtDNA に残存するコントロール領域として使用) と COX サブユニット (*MTCO1*) 配列内に設計したプライマーおよび Taq Man プローブを用いたマルチプレックスリアルタイム PCR により、 mtDNA の定量を試みた (図3)

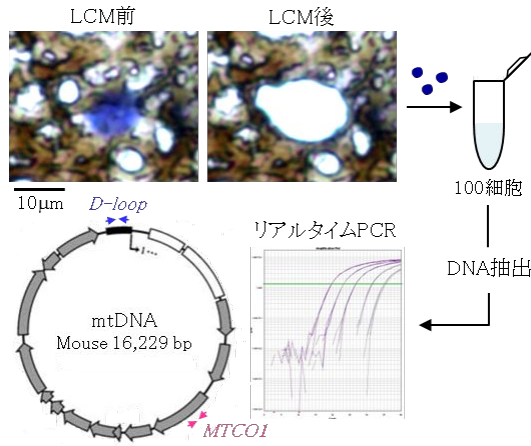


図3 欠失型mtDNAの定量法 (上段)変異*Polg1* Tgマウス脳切片のCOX活性染色。茶:COX活性染色、青:チオニン染色 (下段)リアルタイムPCRに用いたプライマーの標的部位

8週齢の若齢野生型マウス脳より単離回収したCOX活性陽性神経細胞と比較して、高齢マウス脳由来のCOX活性陽性神経細胞では *MTCO1/D-loop* の値が小さく、COX活性陰性神経細胞においては、その差がより顕著であった (図4)。 *MTCO1/D-loop* の低下は *MTCO1* 配列を欠失した mtDNA の増加を意味している。高齢マウスのCOX活性陽性細胞と陰性細胞におけるこの値には、統計学的に優位な差が認められ、本解析法により mtDNA の定量が可能であることが確認できた。レーザーマイクロダイセクションとリアルタイムPCRを組み合わせるこの方法により、mtDNAの蓄積した神経細胞から、周囲の神経細胞へのmtDNAの伝播を継時的・定量的に評価することが可能となった。

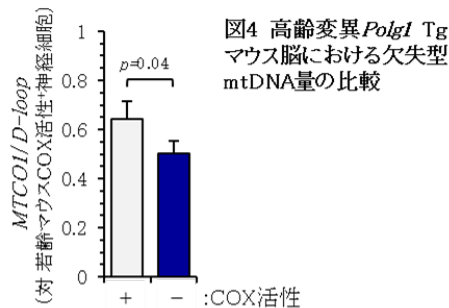


図4 高齢変異*Polg1* Tgマウス脳における欠失型mtDNA量の比較

(2) 末梢血単核球からのヒト iPS 細胞樹立と神経分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞の樹立

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により変異 *POLG1* 細胞を作製するため、末梢血単核球に OCT3/4、SOX2、KLF4、L-Myc、LIN28 および p53 shRNA を組み込んだエピソーマル

ベクターを導入し、iPS 細胞を樹立した。未分化マーカーの発現および多能性については、免疫染色、qRT-PCR、三胚葉分化誘導実験 (図5) により確認した。また、ミトコンドリア関連遺伝子に複数の変異を有する双極性障害患者からも iPS 細胞を樹立し、品質確認実験を行った。

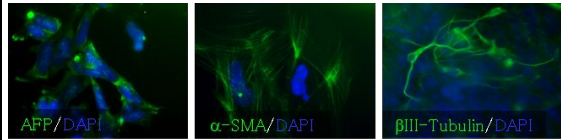


図5 三胚葉分化誘導実験。内胚葉:αフェトプロテイン(AFP)、中胚葉:平滑筋アクチン(αSMA)、外胚葉:βIIIチューブリン、

変異 *POLG1* 細胞作製にむけた CRISPR/Cas9 ベクターの構築

iPS 細胞に挿入する *POLG1* 変異として、変異 *Polg1* Tg マウスに導入した D181A に相当する D198A、および気分障害を併発する CPE0 患者家系において認められる Y955C を選択し、それぞれの変異につき、異なる single guide RNA 配列を含む3通りのベクターを作製した。用いたベクターには緑色蛍光タンパク (GFP) の遺伝子配列が組み込まれており、Gas9 発現細胞の FACS による選別が可能のため、*POLG1* 変異細胞の効率的なスクリーニングが可能である。

ヒト iPS 細胞からの神経分化誘導

無血清凝集浮遊培養法を用いて iPS 細胞の神経分化誘導を行った (図6)。

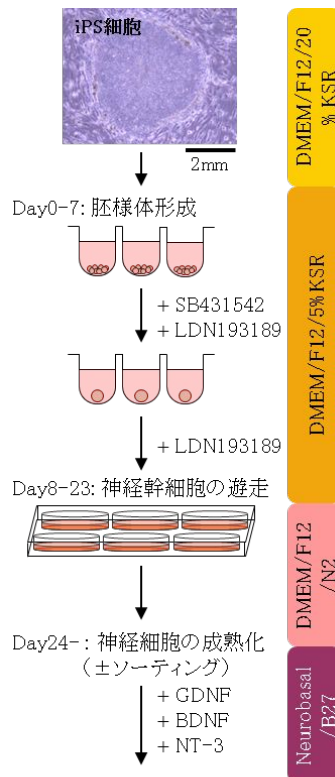


図6 iPS細胞からの神経分化誘導法

Koyanagi-Aoi, et al. に従い、誘導開始14日後の細胞を、神経前駆細胞マーカーである PSA-NCAM の抗体で染色し、FACS によりその

陽性率を評価した。複数の iPS 細胞クローンについて解析を行った結果、ミトコンドリア関連遺伝子変異を有する双極性障害患者由来 iPS 細胞では、コントロール細胞と比較して PSA-NCAM 陽性率が低く、神経分化過程における何らかの異常が示唆された(図 7)。

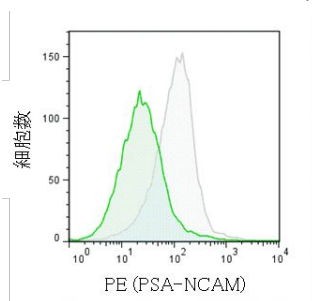


図7 神経分化誘導14日目におけるPSA-NCAM陽性率 緑:ミトコンドリア関連遺伝子に変異を有する双極性障害患者、グレー:健康者

また、図6に示した方法で分化誘導した iPS 細胞は、誘導開始から 80 日後には 80%近くが III-チューブリン陽性の神経細胞となることを確認した(図 8)。

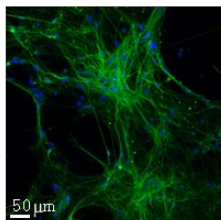


図8 iPS細胞から分化誘導した神経細胞 緑:βIIIチューブリン、青:核(Hoechst33342)

図6に示す方法では、グルタミン作動性神経細胞優位の大脳皮質神経細胞が誘導可能であるが、このほか中脳ドーパミン作動性神経細胞、GABA 作動性介在神経細胞への分化誘導についても検討し、方法を確立した。変異 *POLG1* iPS 細胞からさまざまな神経細胞種を誘導することにより、mtDNA の蓄積に対して脆弱な神経細胞種の特特定が可能になると考えられる。

<引用文献>

Suomalainen A, et al., Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Invest.* 1992; 90:61- 66.

Kato T, et al., Increased levels of a mitochondrial DNA deletion in the brains in patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 1997; 42: 871-875

Kasahara T, et al., Mice with neuron-specific accumulation of mitochondrial DNA mutations show mood disorder-like phenotypes. *Mol Psychiatry.* 2006; 11(6):577-93, 523.

Kostanzo M, et al., The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochem J.* 2013; 452(1):1-17.

Koyanagi-Aoi M, et al., Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 17;110(51):20569-74.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤田 知世 (SAWADA, Tomoyo)
独立行政法人理化学研究所・
脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：90708471

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし