

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19675

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたミトコンドリア病病態発症閾値の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathological threshold in mitochondrial disease patient-derived iPSC model.

研究代表者

八幡 直樹 (Yahata, Naoki)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：60450607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：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の点変異が原因で発症することが知られている。本研究はG13513変異を有するMELAS患者由来iPS細胞を用い、変異mtDNAの存在率と病態発症との因果関係を細胞レベルで解析することを目的とした。種々の変異mtDNA比率を有したMELAS-iPS細胞を得るために、変異mtDNAを標的としたTALENを作製し、MELAS-iPS細胞に導入したところ、変異mtDNA比率を改変することができた。さらに、これらのiPS細胞を骨格筋細胞や神経細胞へ分化誘導し、その違いを検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ゲノム編集技術の一つであるTALENを用いて、mtDNA変異を有するMELAS患者由来iPS細胞における変異mtDNA比率の改変に成功した。この技術は、変異mtDNA比率と細胞表現型との関係についての詳細な解析を可能にした。さらに、本研究で作製したiPS細胞モデルを用いることで、今後ミトコンドリア病の治療法の開発に応用できると考える。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) is one of the most common mitochondrial diseases caused by point mutations in mitochondrial DNA (mtDNA). We generated iPSCs from a MELAS patient having a G13513A mutation in mtDNA. To elucidate the relationship between heteroplasmy level and cellular phenotype, the level of mutant mtDNA in MELAS-iPSC was changed using originally established mtDNA-targeted Platinum TALENs, which were transported into mitochondria and preferentially cleaved mutant mtDNA. Furthermore, we tried to analyze these iPSC-derived myocytes and neurons.

研究分野：幹細胞創薬生命科学

キーワード：iPS細胞 ミトコンドリア mtDNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (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原因は様々である。遺伝的原因としては、所謂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が、このうち、mtDNA の異常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な mtDNA と異常な mtDNA が混在する状態(ヘテロプラスミー)で発症する。また細胞や組織によって異常 mtDNA の割合が異なること(= 細胞/組織特異性)、異常 mtDNA の割合が一定以上になると機能障害を起こすこと(= 閾値効果)が知られている(*Nat Rev Genet.* 16, 530-42, 2015)。

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(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: MELAS) はミトコンドリア病の一つで、mtDNA の A3243G, 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、脳卒中様症状が特徴的であるが、てんかん、認知症、乳酸アシドーシス、ミオパチー、頭痛、難聴、糖尿病等非常に多様である。発症年齢の幅も広いが、小児期(~15歳)までに発症する場合が全体の約70%を占める。脳卒中様症状を含め多様な臨床像を反映する病態機構は、適切な病態モデルがないこともあり推測の域をでておらず、その治療法は確立していない。

2007年に報告されたヒト iPS 細胞作製技術(*Cell* 131, 861-72, 2007)によって、体細胞を初期化することにより疾患を有する患者自身の体細胞から、疾患特異的 iPS 細胞を経て、疾患の標的細胞を入手することが可能になった。mtDNA の変異あるいは欠損に由来するミトコンドリア病の研究に関しては、遺伝子工学的手法で直接 mtDNA を改変するというアプローチが困難である為、本疾患の iPS 細胞を用いた病態モデル作出はより大きな意義を持つと考えられた。実際、ミトコンドリア患者由来 iPS 細胞の作製に関する報告は 2012 年を皮切りに少しずつ出始めていた(*Nature* 524, 234-8, 2015; *Stem Cells* 31, 1298-308, 2013; *PNAS* 110, E3622-30, 2013; *Diabetologia* 55, 1689-98 等)。

また、ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 といったゲノム編集の技術が、遺伝子欠損や挿入の導入効率を格段に上げ、iPS 細胞を用いた遺伝性疾患の研究にも非常に有用であることが示されていた(*Trends Biotechnol.* 31, 397-405, 2013)。これらの技術は基本的に核ゲノムの編集が対象であったが、例えば TALEN をミトコンドリア内に送り込むことにより、mtDNA の二本鎖切断を引き起こすことができる。この性質を利用することで、変異 mtDNA 特異的な TALEN を導入することにより、変異 mtDNA の存在率を減少させる方法が提案された(*Nature Med.* 19, 1111-3, 2013)。

### 2. 研究の目的

本研究では変異 mtDNA に由来するミトコンドリア病の一つである MELAS に注目し、患者由来 iPS 細胞を用いて、その病態を細胞レベルで明らかにすることを目的とした。変異 mtDNA の存在率と細胞表現型の因果関係を調べるために、変異 mtDNA を特異的に切断する TALEN を開発し、これを、MELAS-iPS 細胞に導入し、種々の変異 mtDNA 比率を有する iPS 細胞を作製することを目指した。さらに、これらの MELAS-iPS 細胞をそれぞれ神経細胞あるいは骨格筋細胞への分化誘導を行い、細胞表現型の解析を目指した。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 変異 mtDNA を特異的に切断する TALEN の開発

G13513A 変異 mtDNA を選択的に認識・切断する高活性型 Platinum TALEN の開発を独自に試みた。TALEN は TALE と呼ばれる DNA 結合ドメインと制限酵素 FokI の DNA 切断ドメインからなる人工ヌクレアーゼであるが、2つの TALEN モノマーが DNA に結合し、FokI が二量体を形成することで、DNA 二本鎖切断を誘導する。TALE は約 34 アミノ酸を単位としたモジュールの繰り返し構造であり、各モジュールの 12, 13 番目のアミノ酸残基が DNA の 1 塩基を認識する。4 種類の塩基にそれぞれ特異性の高い RVD を持つモジュールを選択し、連結することにより、ゲノム上の特定の場所に結合する TALEN を作製することが可能になる。

G13513A 変異 mtDNA を優先的に認識し、切断する TALEN を SSA アッセイにより探索した。SSA アッセイとは、TALEN の DNA 切断活性を定量化する方法である。プロモーター下流にルッフェラーゼ遺伝子を一部オーバーラップした状態で分割し、その間に、標的とする変異部位を含む

mtDNA 配列を挿入したレポーターベクターを作製する。このベクターと作製した TALEN 発現ベクターを HEK293T 細胞に共導入すると、発現した TALEN によってレポーターベクターに DNA 二本鎖切断が導入され、ルシフェラーゼ遺伝子のオーバーラップ領域を介した SSA による修復が起こり、分割されたルシフェラーゼ遺伝子が回復する。このルシフェラーゼの発光強度を測定することで、TALEN の DNA 切断活性を定量化する。正常型・変異型それぞれの mtDNA 配列を挿入したレポーターベクターを用いた SSA アッセイの結果を統合し、各 TALEN ペアの切断活性、および変異配列切断に対する特異性を評価した。

絞り込んだ TALEN ペアについて、ミトコンドリア内で機能するように、ミトコンドリア移行シグナル等を付加した発現ベクターを作製した。その後、実際の変異 mtDNA を有する MELAS-iPS 細胞において、TALEN の変異 mtDNA 比率の改変効果を検証した。iPS 細胞を継代後、1 日目に TALEN プラスミドを EGFP 発現プラスミドと共導入し、2 日後にセルソーターにて EGFP 陽性細胞を分離し、変異 mtDNA 比率および mtDNA コピー数を解析した。

### 3-2. MELAS-iPS 細胞の分化特性

iPS 細胞の分化多能性を検証する為、胚様体(EB)形成実験を行った。iPS 細胞コロニーを剥離し、浮遊培養を 8 日間行い、その後、形成した EB を接着させ、さらに 8 日間培養を行った。細胞を固定後、免疫細胞染色により、各三胚葉マーカー(外胚葉:Nest in, TUBB3; 中胚葉: SMA, Brachyury; 内胚葉: Sox17) を発現する細胞の同定を行った。

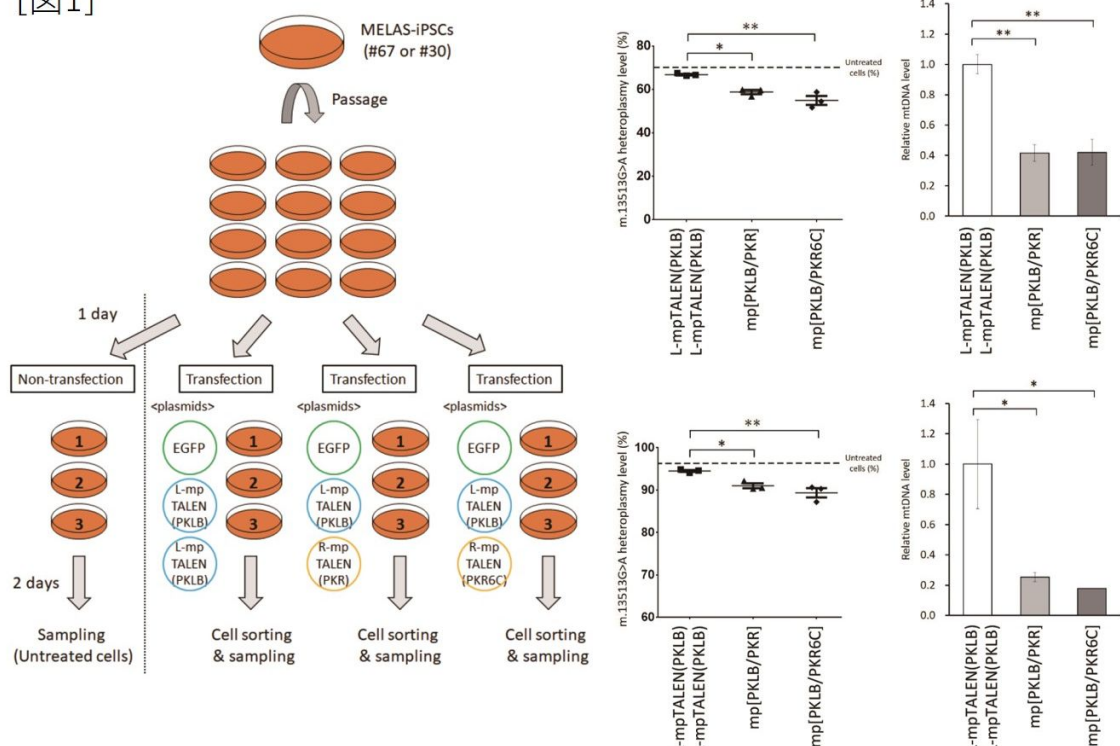
### 3-3. MELAS-iPS 細胞の骨格筋細胞への分化誘導

これまで樹立を行ってきた、mtDNA に G13513A 変異を有する MELAS 患者由来 iPS 細胞について、疾患標的細胞の一つである骨格筋細胞へ分化誘導を行った。分化誘導を短期間で効率的に行う為に、骨格筋分化に関わる転写因子である MyoD1 の発現をドキシサイクリン(Dox)添加により誘導できるシステム(Tet-On MyoD1)を、ピギーバックトランスポゾンベクターを用いて MELAS-iPS 細胞に導入を行った(*Sci. Rep.* 5 12831, 2015; *PLoS ONE* 8 e61540, 2013)。G418 を培地に加えることで、導入された細胞のみを選別し、クローン化を行った。得られた iPS 細胞(MyoD-iPSC)をプレートに播種し、Dox添加により分化誘導を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. 変異 mtDNA を特異的に切断する TALEN の開発

[図1]



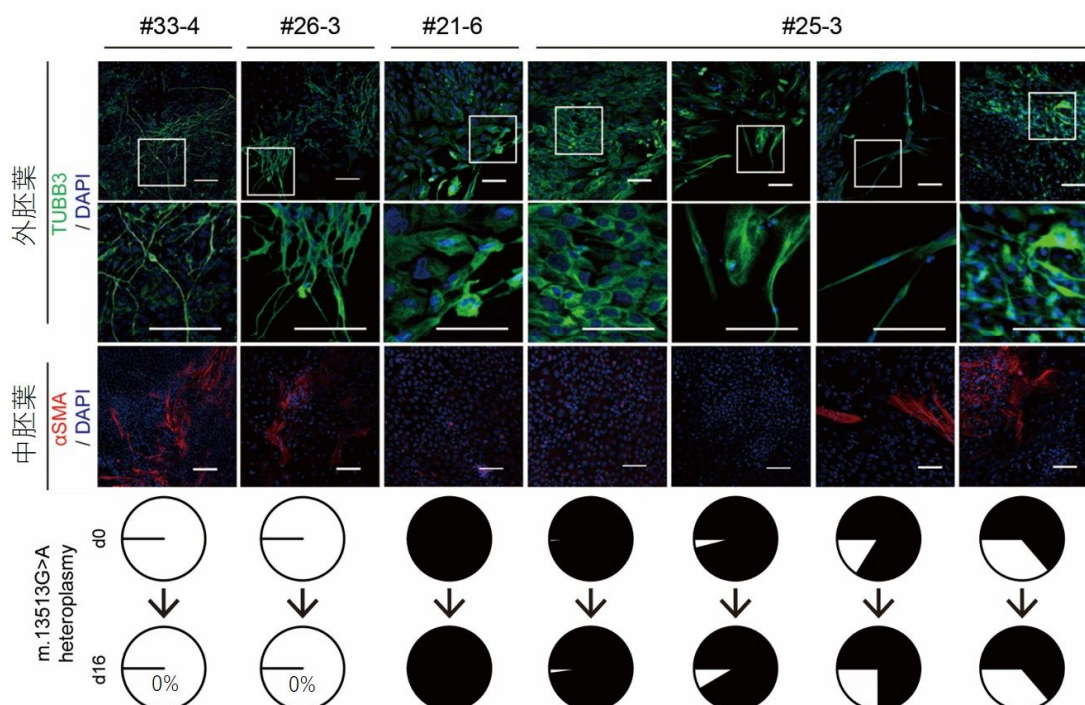
MELAS の原因遺伝子変異の一つである G13513A 変異を標的とした TALEN の開発を行った。DNA 結合ドメインの結合位置や長さを少しずつ変えた TALEN 発現プラスミドを作製し、SSA アッセイにより、様々な TALEN ペアの切断活性および変異 mtDNA に対する特異性を評価した。DNA 切断活性、および変異 mtDNA に対する特異性ができるだけ高い TALEN ペアを選択し、ミトコンドリア移行型に改変した後、実際に樹立した MELAS-iPS 細胞において、変異 mtDNA 比率を改変する効果があるかを検証した。mpTALEN(PKLB/PKR)ペアを導入後、2 日目の細胞について解析したところ、変異 mtDNA 比率の減少がみられ、それと同時に mtDNA コピー数の減少も観察された(図 1)。さらに、SSA アッセイにより、より変異 mtDNA に対して特異性の高い TALEN ペアの探索を続けた。変異部位を認識する TALEN モノマーのモジュールのうち 1 か所に敢えて最適でないモジュールを組み込んでみたところ、TALEN の活性を微細に改変することができた。こうして得られた新たな TALEN ペアである mpTALEN(PKLB/PKR6C)を MELAS-iPS 細胞に導入したところ、mpTALEN(PKLB/PKR)ペアと比べ、より効果的に変異 mtDNA の割合を減らすことができた(図 1)。

#### 4-2. MELAS-iPS 細胞の分化特性および骨格筋細胞への分化誘導

G13513A 変異を有する MELAS-iPS 細胞を骨格筋細胞へ分化誘導する為、Tet-On MyoD1 システムを組み込んだ iPS 細胞(MyoD-iPSC)を作製した。G13513A mtDNA 変異を有した MyoD-iPSC と、正常 mtDNA のみの MyoD-iPSC をそれぞれ 2 クローンずつ得た。変異 mtDNA を有する MyoD-iPSC クローンについては、どちらも高い変異率を示した。

続いて、MELAS-iPS 細胞が分化多能性を有しているかを評価するために、胚様体形成実験を行った。分化誘導 16 日目に細胞を固定し、免疫細胞染色により評価を行ったところ、変異 mtDNA の有無に関わらず、外胚葉マーカー Nestin、中胚葉マーカー Brachyury および内胚葉マーカー Sox17 それぞれの陽性細胞が検出された。よってこれらの iPS 細胞は三胚葉への分化能を有すると考えられるが、一方で、変異 mtDNA 比率が 100% に近い値を示す 2 クローンについては、外胚葉マーカー TUBB3 陽性細胞は観察されるが、神経突起を伸ばした細胞が観察されなかった。さらに、中胚葉のマーカーである SMA 陽性細胞が観察されなかった(図 2)。そこで、開発した G13513A 変異 mtDNA を標的とした TALEN を駆使し、変異 mtDNA 比率を減少させた iPS 細胞について同様の解析を行ったところ、誘導後 16 日目に変異率 75% を示す細胞では、双極性ニューロン様 TUBB3 陽性細胞および SMA 陽性細胞がわずかに観察された。さらに変異率が減少すると、突起が伸長した TUBB3 陽性細胞および SMA 陽性細胞が十分に観察されるようになった(図 2)。これらの結果から、G13513A 変異 MELAS-iPS 細胞は、変異を高い割合で有することで通常とは異なる分化特性を示すが、ある程度変異率が低下していくと、それが次第に解消されていくことが分かった。

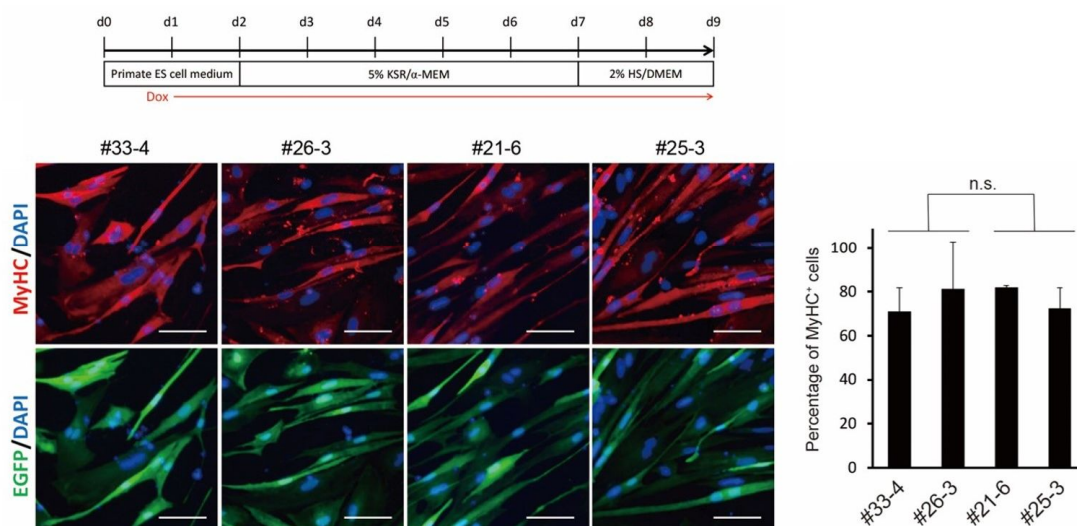
[図2]





続いて、これらMyoD-iPSCクローンについて、Doxを加えることで、骨格筋への分化誘導を行った。誘導後9日目に、骨格筋の各種マーカーの発現をRT-PCRにより確認することができた。また、免疫細胞染色により、骨格筋マーカーの一つである、myosin heavy chain (MyHC)が発現している細胞が7割程度観察された(図3)。G13513A変異mtDNAを有した2クローン、正常mtDNAのみの2クローンについてそれぞれ骨格筋分化誘導を行い、比較・観察したところ、同程度の効率で分化誘導ができていることが分かった(図3)。今後は、誘導した細胞について、さらに詳細な解析を進めていく予定である。

[図3]



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yahata, N., Matsumoto, Y., Omi, M., Yamamoto, N. and Hata, R. TALEN-mediated shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in MELAS-iPSCs with m.13513G>A mutation. (2017) *Scientific Reports*, 7 15557 (査読有)

Yahata, N., Boda, H. and Hata, R. Elimination of Mutant mtDNA by an Optimized mpTALEN Restores Differentiation Capacities of Heteroplasmic MELAS-iPSCs (2021) *Mol Ther Methods Clin Dev.* 20, 54-68 (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

八幡直樹、秦 龍二、MELAS 患者由来 iPSC 細胞の樹立、日本解剖学会第 76 回中部支部学術集会、2016 年

Naoki Yahata and Ryuji Hata. Generation of induced pluripotent stem cells from a MELAS patient with m.13513G>A mutation. The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine and The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, 2016年

八幡直樹、松本祐嗣、尾身 実、山本直樹、秦 龍二、TALEN を用いた MELAS 患者由来 iPSC 細胞における変異ミトコンドリア DNA 比率の改変、第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年

八幡直樹、松本祐嗣、尾身 実、山本直樹、秦 龍二、TALEN を用いた MELAS 患者由来 iPSC 細胞における変異ミトコンドリア DNA 比率の改変、日本ゲノム編集学会 第 3 回大会、2018

八幡直樹、松本祐嗣、尾身 実、山本直樹、秦 龍二、TALEN を用いた MELAS 患者由来 iPSC 細胞における変異ミトコンドリア DNA 比率の改変、第 18 回日本ミトコンドリア学会年会、2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 1 件）

名称：ミトコンドリア病誘発変異型 m t D N A 率の異なる i P S 細胞群

発明者：秦龍二、八幡直樹、尾身実

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第 6463439 号

取得年：2018

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。