

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11248

研究課題名(和文)ミトコンドリアの適合性の機構解析と治療法開発に関する基盤研究

研究課題名(英文) Study for the mechanism of mitochondrial-nuclear compatibility and the development of therapeutic methods

研究代表者

遠藤 仁司 (Endo, Hitoshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50221817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアDNA(mtDNA)は個々に多型が存在する。生殖医療において第三者のミトコンドリアを移入する治療が報告されているが、mtDNAと核遺伝子との適合性に関する研究は極めて少ない。本研究では第一に、同一核型に亜種mtDNAを置換したコンプラステック疾患マウスを独自に作製し、その病態を解析した。第二に、これらマウスからB6マウスと亜種マウスmtDNAが混在するヘテロプラスミーのES細胞を作製した。第三に、ミトコンドリアを標的する複数のタンパク質を連結したTALEN改変ベクターを作製してミトコンドリア標的への最適化を試み、一方のmtDNAを特異的に切断し除去することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生殖医療において、ミトコンドリア遺伝子異常症の遺伝子治療法として受精卵への前核置換法が用られるが、二者のmtDNAが混在するヘテロプラスミーの状態となる。しかし、mtDNAと核遺伝子との適合性に関する研究は極めて少ない。本研究では、疾患モデルマウスをベースにした疾患コンプラステックマウスを作製し、ミトコンドリアと核の適合性により症状の変動を示したことは、学術的意義がある。また、mtDNAのヘテロプラスミーを解消する遺伝子治療法を開発することは非常に重要で社会的意義がある。複数のミトコンドリア標的シグナルおよびタンパク質を検討し、TALENのmtDNAへの標的を最適化した意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial DNA (mtDNA) is individually polymorphic. Recently, the mitochondrial transfer from other people to embryos has been reported in reproductive medicine, but there have been very few studies on the compatibility of mtDNA with nuclear genes. In this study, firstly, we originally generated conplastic mice with subspecies mtDNA in the same karyotype, established a disease mouse model with altered phenotype, and analyzed the pathogenesis. Secondly, we generated heteroplasmic ES cells with a mixture of both B6 and subspecies mtDNAs. Thirdly, we generated TALEN-modified vectors linked to mitochondrial proteins for optimization to mitochondrial targeting, and confirmed the effect of mitochondrial genome editing that specifically removes one mtDNA.

In conclusion, we generated a conplastic mouse model of nuclear-mitochondrial incompatibility showing exacerbation of the disease, and demonstrated that specific mtDNA can be removed by the TALEN using heteroplasmy model cells.

研究分野：病態生化学

キーワード：ミトコンドリア 遺伝子治療 ミトコンドリア遺伝子異常 ヘテロプラスミー ゲノム編集 ミトコンドリア適合性 TALEN

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアは核以外に独自の DNA を有する細胞内小器官であり、細胞の大部分のエネルギーを供給し、細胞全体の活性の調節に機能する。近年、ミトコンドリア研究が多くの生命現象で注目されており、特に、ミトコンドリアの代謝物や活性酸素等が細胞内シグナルとして注目され、転写因子の活性調節や DNA・ヒストンのエピジェネティクス調節を介した細胞増殖、分化、癌化、肥満などへの関与が明らかになりつつある。最近の生殖医療では、ヒトのミトコンドリア DNA 異常症に対する前核置換(PNT)による第三者のミトコンドリアの移植治療が臨床試験として英国で試みられている (Nature, 534:383, 2016)。しかしながら、外来性のミトコンドリアと核の適合性に関する議論は少ない。その理由は、ミトコンドリア 核の適合性を検討する良い実験系が少ないことに起因する。

(2) 同一核を有しミトコンドリアのみが置換されるコンプラステックマウスは、ミトコンドリアの影響を如実に検討できる良いモデルである。最近、老年期におけるコンプラステックマウスの加齢抑制効果が報告されたが、これまで若年期における形質に明らかな差の報告はなかった (Nature, 535: 561, 2016)。一方、疾患表現型に変化が認められるコンプラステックマウスの報告はまだない。このようなモデルマウスの確立は、ミトコンドリア 核遺伝子の適合性の分子機構を研究する上で非常に重要であり、生殖医療における第三者ミトコンドリア移入治療を考察する有用な基礎データを提供可能である。

(3) 近年、ゲノム編集による治療法の開発が多く報告されている。核 DNA と異なり mtDNA に対する遺伝子治療は困難であったが、最近ミトコンドリア標的シグナルを付加した TALEN (Mito-TALEN) を用いる方法が開発された (Cell, 161:459, 2015)。本研究で作製したコンプラステックマウスは、この治療法の開発するための治療モデルに最適であり、ベクターの最適化を検討可能である。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究を踏まえ、かつ近年の生殖医療におけるミトコンドリア移植の臨床応用によりミトコンドリア 核の適合性の検討が喫緊の課題である点を鑑み、ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子との適合性が病態に影響を与えることを示し、ヘテロプラスミーを解消する遺伝子治療法を最適化する検討を目的とした。

具体的には、(1) mtDNA を置換したコンプラステックマウスの確立と表現形解析、(2) コンプラステックマウスから樹立した ES 細胞を用いた適合性の機能解析、(3)ヘテロプラスミーから特定の mtDNA を除去する遺伝子治療法の開発で構成する。

3. 研究の方法

(1) コンプラステックマウスの確立と表現形解析

亜種マウスとのコンプラステックマウスをバッククロスや前核置換法 (PNT) を用いて独自に作製した。核は C57BL/6 (B6) マウス由来であり、ミトコンドリアは亜種の MSM または SHH マウス由来である。mtDNA 系統樹を図 1 に示す。

疾患モデルマウスのコンプラステックマウスを作製する。糖尿病モデルマウス (KK) と BALB^{mtSHH} の受精卵から前核置換法によって核型が KK で mtDNA が SHH のコンプラステックマウス (KK^{mtSHH}) を作製した。強い糖尿病症状を示す KK-Ay を核型としたコンプラステックマウス (KK-Ay^{mtSHH}) を作製した。

表現形の解析として、体重増加曲線、腹部 CT、呼気ガス酸素消費モニター、行動解析、血糖などの生化学検査、グルコース負荷テスト、インスリン負荷テストを行う。さらに、インスリン、レプチンなどのアディポカインを測定した。また、各臓器を採取し、病理組織学的解析を行った。

各臓器の mtDNA の量を qPCR にて検討する。肝臓ミトコンドリアを単離し、呼吸調節率、電子伝達系の酵素活性および複合体解析を行った。以上から、表現型の差異と mtDNA 量およびミトコンドリア活性との相関を検討した。さらに、核性因子の遺伝子発現量を検討し、病態の分子機構を解析した。

(2) ヘテロプラスミー mtDNA を有する ES 細胞の樹立

B6 マウスおよび B6^{mtSHH} の受精卵から前核置換によりヘテロプラスミー受精卵を作製し、ここから ES 細胞を作製した。それぞれの細胞を mtDNA の配列を検討し、mtDNA 型が混在する ES 細胞を確立した。

(3) ヘテロプラスミー mtDNA の遺伝子治療法の開発

B6 と SHH の mtDNA を別々に認識して切断する TALEN ベクターを作製した。さらに、TALEN の N 末端にミトコンドリア移行シグナル配列を連結したベクターを作製した。また、mtDNA 結合タンパク質である TFAM を N 末端に連結する改良型ベクターを作製した。

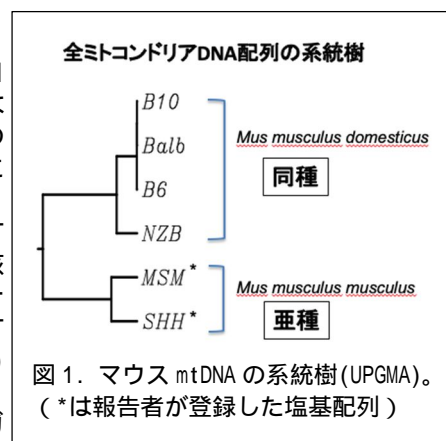


図 1. マウス mtDNA の系統樹 (UPGMA)。 (*は報告者が登録した塩基配列)

前述のヘテロプラスミーの ES 細胞に、それぞれの TALEN ベクターを遺伝子導入し、残存した mtDNA の型と残存率を PCR 産物の RFLP にて検討した。

4. 研究成果

(1) コプラスミックマウスの確立と表現形解析疾患モデルでのミトコンドリア適合性を検討するために、核型が糖尿病モデルマウス KK-Ay 由来で、ミトコンドリアが亜種 SHH マウス由来であるコプラスティックマウス (KK-Ay^{mtSHH}) を作製し、表現形解析を実施した。KK-Ay マウスに比べ KK-Ay^{mtSHH} マウスにおいて、体重が優位に減少し (図 2) 随時血糖、空腹時血糖および糖化アルブミンが有意に上昇し (図 3) インスリン負荷テストにてインスリン抵抗性が上昇することを明らかにした。病理組織学的検討では膵臓ランゲルハンス島は KK-Ay^{mtSHH} にて萎縮していた。また蛍光免疫染色ではグルカゴンの染色性は保たれていたが、インスリンの染色性は低下した傾向にあった。以上から、この萎縮は 2 型糖尿病の膵疲弊の結果と推察された。腹部 CT にて KK-Ay^{mtSHH} の脂肪率は低下し、解剖時では精巣周囲白色脂肪組織の重量は低下していた。酸素消費モニターでは脂肪燃焼の増加が示されており、脂肪酸の燃焼の亢進が示された。

各臓器の mtDNA 量の定量 PCR では、KK-Ay^{mtSHH} の肝臓の mtDNA 量が増加する有意な差を認めた (図 4) KK-Ay^{mtSHH} の肝臓における遺伝子発現では、PGC-1a の高発現を認め、PEPCK や G6Pase の高発現から糖新生系の亢進を確認した。また、各マウスより採取した肝臓初代培養細胞にてグルカゴン反応性を検討したところ、ミトコンドリア関連転写因子の PGC-1a、NRF1、TFAM などグルカゴン応答性は高かった。さらに、糖新生系酵素である PEPCK や G6Pase などの応答性も高かった。以上から、肝臓での糖新生が促進することにより、2 型糖尿病増悪を惹き起こしたものと考えられる。

KK-Ay および KK-Ay^{mtSHH} の mtDNA の全塩基配列を同定し、塩基配列の置換の比較検討を行ったところ、電子伝達系の複合体 I におけるアミノ酸置換率が最も高かった。単離肝臓ミトコンドリアを用いたフラックスアナライザーによる electron flow 解析でも、KK-Ay^{mtSHH} において複合体 I の活性の低下が認められた。以上より、亜種マウスとのミトコンドリアの置換により糖尿病の症状の増悪が認められ、核-ミトコンドリアの不適合性により、病態に影響を与えることを初めて明らかにした。

(2) ヘテロプラスミー mtDNA を有する ES 細胞の樹立
ミトコンドリア異常症における治療法において、前核置換法 (PNT) を用いた受精卵でのミトコンドリア置換が近年実施されているが、変異 mtDNA の持ち込みがあり、ヘテロプラスミーの状態となることが指摘されている。本研究では、亜種ミトコンドリアとのヘテロプラスミーの細胞を作製する目的で、前核置換法により B6 マウスおよび B6mtSHH の受精卵から 2 つの mtDNA が混在するヘテロプラスミーの ES 細胞を樹立した (図 5)。制限酵素の RFLP により、亜種 mtDNA が区別できる。以上から、ゲノム編集を用いた遺伝子治療へのモデル細胞を樹立した。

(3) ヘテロプラスミー mtDNA の遺伝子治療法の開発

近年、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療法が報告されている。ヘテロプラスミー状態を解消するために、TALEN 法を用いた効率の良い mtDNA 消去するベクターの検討を行った。具体的には、ミトコンドリア移行シグナル部分を、ミトコンドリア DNA 結合因子である TFAM や mSSB に改変した TALEN ベクターを作製した。さらに、TALEN 部分は B6 と SHH 由来の mtDNA を別々に認識して切断する各々二種のベクターを作製した。これらのベクターをヘテロプラスミー ES 細胞に導入したところ、一方の mtDNA を特異的に切断するゲノム編集の効果が認められた。一般的な問題点の一つに、非特異的な塩基認識による mtDNA の非特異的除去がある。目的ではない mtDNA が一定の割合で非特異的に切断されると、全体的な mtDNA の量が低下することがある。胚の発生初期

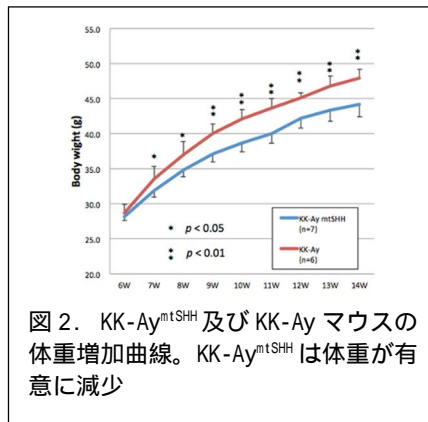


図 2. KK-Ay^{mtSHH} 及び KK-Ay マウスの体重増加曲線。KK-Ay^{mtSHH} は体重が有意に減少

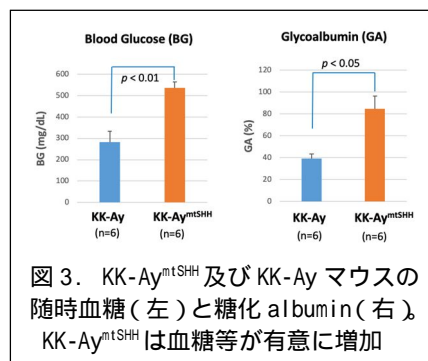


図 3. KK-Ay^{mtSHH} 及び KK-Ay マウスの随時血糖 (左) と糖化 albumin (右)。KK-Ay^{mtSHH} は血糖等が有意に増加

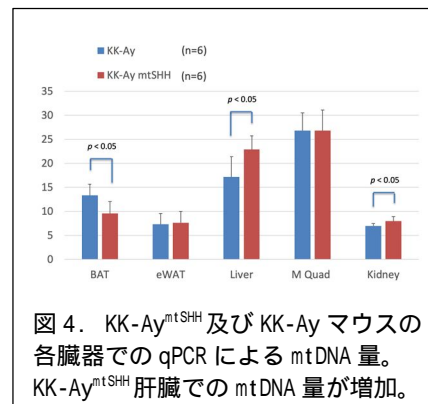


図 4. KK-Ay^{mtSHH} 及び KK-Ay マウスの各臓器での qPCR による mtDNA 量。KK-Ay^{mtSHH} 肝臓での mtDNA 量が増加。

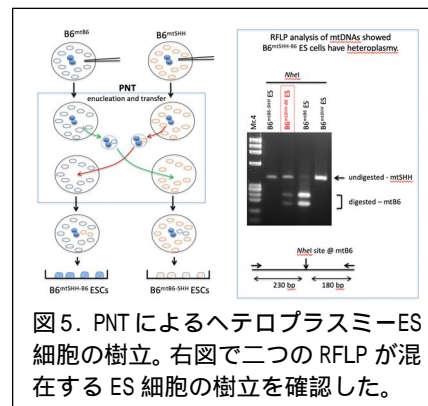


図 5. PNT によるヘテロプラスミー ES 細胞の樹立。右図で二つの RFLP が混在する ES 細胞の樹立を確認した。

において mtDNA 量が減少すると適切な胚発生過程が得られないため、非特異的な切断を回避することは重要な点である。本研究においては TAL 部分に 3 塩基の置換があったため、特異性が高い TAL を設計することができた。また、一方の mtDNA を切断して消去しても、全体的な mtDNA の量にさほど変化がなかったことから、TAL の非特異的認識はほぼなかったものと考えられた。以上から、本ベクターは高い特異性と除去効率を有することが示され、mtDNA 遺伝子治療の基礎的なデータを提供すると思われる。

本研究では、亜種マウスを用いた核 ミトコンドリア不適合のモデルを作成し、不適合が病態の増悪に関与すること、ミトコンドリア標的 TALEN の最適化を試み、ヘテロプラスミーのモデル細胞を用いて特定の mtDNA が除去可能であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Byambaa S, Uosaki H, Ohmori T, Hara H, Endo H, Nureki O, Hanazono Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Non-viral ex vivo genome-editing in mouse bona fide hematopoietic stem cells with CRISPR/Cas9.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 451-462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2021.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasufumi Kawasaki, Kazuya Sato, Kiyomi Mashima, Hirofumi Nakano, Takashi Ikeda, Kento Umino, Kaoru Morita, Junko Izawa, Norihito Takayama, Hiroko Hayakawa, Kaoru Tominaga, Hitoshi Endo, Yoshinobu Kanda	4. 巻 27
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells inhibit aerobic glycolysis in activated T-cells by negatively regulating hexokinase II activity through PD-1/PD-L1 interaction.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 231.e1-231.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtct.2020.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyata Satsuki, Tominaga Kaoru, Sakashita Eiji, Urabe Masashi, Onuki Yoshiyuki, Gomi Akira, Yamaguchi Takashi, Mieno Makiko, Mizukami Hiroaki, Kume Akihiro, Ozawa Keiya, Watanabe Eiju, Kawai Kensuke, Endo Hitoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Comprehensive Metabolomic Analysis of IDH1R132H Clinical Glioma Samples Reveals Suppression of -oxidation Due to Carnitine Deficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9787.1-9787.11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46217-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sumitani Megumi, Kondo Mari, Kasashima Katsumi, Endo Hitoshi, Nakamura Kaoru, Misawa Toshihiko, Tanaka Hiromitsu, Sezutsu Hideki	4. 巻 608
2. 論文標題 Characterization of Bombyx mori mitochondrial transcription factor A, a conserved regulator of mitochondrial DNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 103 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2016.12.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠嶋 克巳, 遠藤 仁司
2. 発表標題 新規ミトコンドリア膜タンパク質CCDC51の機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会、第42回
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤仁司、黒岩憲二、笠嶋克己、猪木豊泰、坂下英司、富永薫、浜本敏郎、長尾恭光、佐久間哲史、山本卓
2. 発表標題 TALENを用いたマウスミトコンドリア遺伝子のヘテロプラスミー遺伝子治療モデルの開発
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第3回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笠嶋 克巳、炭谷 めぐみ、遠藤 仁司
2. 発表標題 保存された TFAMの dimer化とその様式および細胞内の役割について
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長尾 恭光、富永 薫、坂下 英司、阿部 朋行、秋本 千鶴、花園 豊、遠藤 仁司
2. 発表標題 微小環境を用いた再樹立法による多能性幹細胞の高品質化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富永 薫、宮田 五月、坂下 英司、澤口 武尊、黒田 林太郎、川合 謙介、遠藤 仁司
2. 発表標題 変異型イソクエン酸脱水素酵素1 (IDH1) を持つグリオーマは、低カルニチンにより 酸化が抑制されている
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂下 英司、秋本 千鶴、遠藤 仁司
2. 発表標題 細胞外酸性 pH応答による A-to-I RNA編集の亢進
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 遠藤仁司	4. 発行年 2018年
2. 出版社 エルゼビア・ジャパン	5. 総ページ数 18
3. 書名 第68章 糖質代謝とATP, 第70章 タンパク質代謝、In ガイトン生理学 原著第13版 (石川義弘、岡村康司、尾仲達史、河野憲二 総監訳)、p767-777, p792-798	

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 一時処理培地、処理キット、胚発生停止抑制方法、発生工学産物作製方法、移植方法、治療方法、及び発生工学産物	発明者 長尾恭光、遠藤仁司、坂下英司、大森司、早川盛禎	権利者 自治医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-052748	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 関節リウマチの再燃を予測する方法及びそれに用いるバイオマーカー群	発明者 蓑田清次、永谷勝也、遠藤仁司、坂下英司	権利者 自治医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-054438	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 治療剤、腫瘍予後予測方法、及び治療方法	発明者 遠藤仁司、富永薫、宮田五月、坂下英司	権利者 学校法人自治医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2017-076484	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 幹細胞を再樹立する方法	発明者 遠藤仁司、長尾恭光、花園豊、富永薫、大森司	権利者 学校法人自治医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/04883	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------