

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08289

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた、ミトコンドリア分裂障害によるLeigh症候群の機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of Leigh syndrome caused by impaired mitochondrial division using iPS cells

研究代表者

松本 浩(Matsumoto, Hiroshi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・小児科学・講師)

研究者番号：00536229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNM1Lはミトコンドリア分裂を制御するDRP1をコードする核遺伝子である。DNM1Lに変異を有する線維芽細胞では、ミトコンドリアおよびペルオキシソームの形態異常を呈することが知られているが、神経細胞における形態や機能については分かっていない。私達はDNM1Lに遺伝子変異をもつLeigh症候群の患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、神経細胞に分化誘導し、神経細胞におけるミトコンドリアの形態および機能を電子顕微鏡および酸素消費速度の測定により評価した。結果として、DNM1Lに変異を持つ神経細胞では、ミトコンドリアの異常な伸長および酸素消費速度の低下を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNM1Lはミトコンドリア分裂を制御する核遺伝子であり、その片アレル変異により種々の中枢神経障害が生じる事が報告されています。DNM1Lに変異を有する線維芽細胞では、ミトコンドリアの形態異常を呈することが知られていますが、神経細胞においてどうなるかは分かっていませんでした。私達はiPS細胞を神経細胞に分化誘導し、ミトコンドリアの形態および機能異常が神経細胞においても見られることを示しました。

研究成果の概要(英文)：Dynamin 1-like (DNM1L) is a nuclear gene encoding DRP1, which regulates intracellular mitochondrial fission. It is known that fibroblasts with heterozygous DNM1L mutation exhibit an abnormal mitochondrial and peroxisomal morphology, however, the morphology and function of mitochondria in neuronal cells have not been reported so far. We obtained iPS cells from patient with Leigh syndrome caused by heterozygous DNM1L mutation, and differentiated to neuronal cells. The differentiated neuronal cells were served for analysis of mitochondrial morphology and function by electron microscopy and oxygen consumption rate. The results exhibited that DNM1L mutant neuronal cells have abnormally elongated mitochondria and reduced oxygen consumption rate.

研究分野：小児科学、神経科学

キーワード：iPS細胞 DNM1L ミトコンドリア Leigh症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Leigh 症候群は、乳児期から筋緊張低下、発達遅滞、けいれん、呼吸障害などの症状がみられ、神経学的・生命予後ともに不良な疾患である。臨床上的特徴として、神経病理や脳 MRI で大脳基底核・脳幹部に(亜急性)壊死性病変がみられることが挙げられる。また呼吸鎖酵素複合体に異常があることが多いため、代償性に嫌気性代謝が盛んとなり、その結果血液・髄液中の乳酸が上昇するという特徴がある。

我々は乳児期早期から重度の筋緊張低下、発達遅滞、脳波上 suppression-burst を伴う難治性てんかん、進行性の脳萎縮を呈した予後不良の症例を経験し、剖検後の神経病理および筋組織の呼吸鎖酵素複合体活性の低下から Leigh 症候群と診断した。さらに原因精査を行ったところ、全エクソーム解析でミトコンドリア分裂に關与する *DNM1L* の central domain に *de novo* のミスセンス変異を認め、この *DNM1L* 変異が dominant negative に DRP1 (*DNM1L* にコードされる蛋白) の機能障害およびミトコンドリアの分裂障害を生じ、脳神経細胞を始め全身の細胞機能障害から重症の Leigh 症候群を呈したと考えた (Zaha et al. Clin Genet 2016)。

*DNM1L* 変異によるヒトの疾患については、Waterham らが小頭症、筋緊張低下、乳酸アシドーシスを呈し、生後 1 か月で死亡した小児例を報告したのが最初である (Waterham et al. NEJM 2007)。その後我々の報告を含めて 8 例の報告があるが(うち 2 例は同胞例)ほとんどが DRP1 の central domain にミスセンス変異を持ち、筋緊張低下、発達遅滞を示し、乳児期~幼児期に死亡している。しかし脳波で suppression-burst を伴うてんかん性脳症や、神経病理や脳 MRI で Leigh 症候群を証明した症例は、我々の症例が唯一のものであった。ミトコンドリア分裂障害を来す DRP1 異常は、どのような機序により神経障害を生じるのか、という機序については、明らかとなっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 患者由来 iPS 細胞の樹立、2) iPS 細胞を用いた Leigh 症候群発症のメカニズムの解明、である。DRP1 異常症の患者由来 iPS 細胞による病態解析はこれまでに報告がない。

### 3. 研究の方法

#### (1) 疾患由来 iPS 細胞から神経細胞への分化誘導とその証明

患者由来 iPS 細胞は、京都大学 iPS 細胞研究所との共同研究により患者由来皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立した。コントロールとして、アジア人由来健常人 iPS 細胞 (Phenocell SAS, Grasse) を使用した。神経細胞への分化誘導は、Sendai Virus (SeV) を用いて、iPS 細胞に分化遺伝子を導入することで行った (Elixirgen Scientific)。分化神経細胞を 4% のパラホルムアルデヒドで固定した後、TUBB-1 抗体による免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で神経細胞に分化していることを確認した。

#### (2) 分化神経細胞におけるミトコンドリア形態解析

*DNM1L* 変異を有する皮膚線維芽細胞は、管状に伸長したミトコンドリアの形態異常を示す。iPS 細胞から分化誘導させた神経細胞の観察においては、ミトコンドリアが同様の形態異常を示すことを認めた。コントロール神経細胞との差を明らかにするため、電子顕微鏡による定量的な解析を試みた。

電子顕微鏡による観察として、4well の Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Thermo Fisher Scientific, Waltham) 上に播種した分化神経細胞を 2% パラホルムアルデヒドおよび 2.5% グルタルアルデヒド混合液により 2 時間の前固定を行い、さらに 1% オスミウムによる 1 時間の後固定により試料作製を行った。電子顕微鏡 JEM-1400Plus (日本電子、東京) を用い、ミトコンドリアを 2000 - 3000 倍で平面方向において観察した。測定した全ミトコンドリア長径の比較を Kruskal-Wallis 検定で行った。

#### (3) 分化神経細胞におけるミトコンドリア酸素消費速度 (OCR) の測定

ミトコンドリアは酸化的リン酸化の過程で、内膜に存在する  $\text{Complex I}$  ~  $\text{Complex V}$  の呼吸鎖酵素複合体を用いて ATP 産生を行っている。複合体 I, III, IV は ATP 産生に必要な大部分の  $\text{H}^+$  を産生し、その  $\text{H}^+$  と酸素の消費により複合体 II, V で ATP が産生される。そこで、複合体 I, III, IV の基質や阻害剤投与により経時的なミトコンドリア酸素消費量の変化、つまり OCR 変化を起こすことで、複合体 I, III, IV でのミトコンドリアにおける ATP 産生量を観察できる。*DNM1L* 変異によりミトコンドリア機能に異常を来した場合、OCR に変化を来すことが予想されるため、その測定を試みた。

OCR の測定には、OROBOROS Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck) を用

いた。剥離した神経細胞を専用の測定用 buffer に溶解し、OROBOROS により経時的に測定室内の酸素消費速度をモニターしながら、負荷薬剤を投与した。負荷薬剤として Rotenone、Antimycin A を投与し、complex & の OCR 測定を行い、 $1 \times 10^6$  細胞数当たりで算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 疾患由来 iPS 細胞から神経細胞への分化誘導とその証明

疾患由来 iPS 細胞に神経分化遺伝子を導入した結果、10日間で神経突起様構造物の伸長が見られた。免疫染色を行った結果、疾患由来及び健常人由来細胞のいずれにおいても、神経細胞で特異的に発現する TUBB-III が確認され、神経細胞への分化が確認された(図 1)。

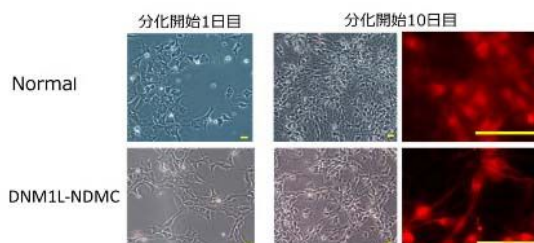


図1 iPS細胞から神経細胞への分化誘導  
分化開始1日目と10日目の位相差顕微鏡像(左、中央)と分化開始10日目の蛍光顕微鏡像(TUBB-III染色、右)。スケールバー：左・中央：10  $\mu$ m、右：50  $\mu$ m

##### (2) 分化神経細胞におけるミトコンドリア形態解析

疾患由来神経細胞および健常人由来神経細胞において、電子顕微鏡によるミトコンドリアの形態解析を行った結果、疾患由来神経細胞のミトコンドリア長径の中央値は  $0.604 \mu\text{m}$  (最大  $7.656 \mu\text{m}$ ) であり、正常の中央値  $0.491 \mu\text{m}$  に比して有意に長径が長かった(図 2)。また、疾患由来神経細胞における長径  $1.74 \mu\text{m}$  以上の伸長したミトコンドリアの個数は 12.2% であり、健常人由来神経細胞の 5.3% に対して有意に多かった。

疾患由来神経細胞では、健常人由来神経細胞よりも有意に伸長したミトコンドリアが多いことが示された。

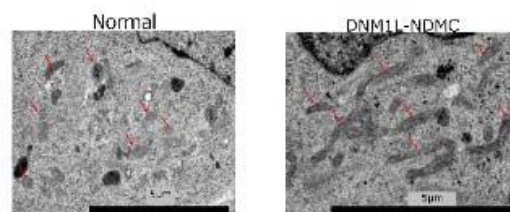


図2 分化神経細胞におけるミトコンドリアの形態  
健常人由来神経細胞(左)および患者由来神経細胞(右)のミトコンドリア(矢印)。スケールバー：5  $\mu$ m

##### (3) 分化神経細胞におけるミトコンドリア酸素消費速度(OCR)の測定

OROBOROS を用いて OCR 測定を行った結果、ミトコンドリア複合体 I 及び II での酸素消費速度の平均は、健常人由来神経細胞が  $31.38 \pm 6.74 \text{ pmol/sec} \cdot \text{Million}$  (N=4) であったのと比較して、疾患由来神経細胞では  $15.75 \pm 9.54 \text{ pmol/sec} \cdot \text{Million}$  (N=3) であり、ミトコンドリア複合体 I, II の酸素消費速度が有意に低下していた。疾患由来神経細胞のミトコンドリアでは、複合体 I, II の酸素消費速度が低下していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植松賢司、座波清誉、松本浩、野々山恵章、松本直通、齋藤潤、伊藤正孝、松本志郎、藤田泰典、大澤郁郎
2. 発表標題 DNM1L変異による早期乳児てんかん性脳症患者由来iPS細胞から分化誘導した神経細胞におけるミトコンドリア形態の解析
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------