

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07782

研究課題名(和文) ミトコンドリア脳筋症に対する最新ゲノム編集技術を用いた革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel gene therapy for MELAS by editing mitochondrial DNA

研究代表者

秦 龍二 (Hata, Ryuji)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：90258153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はゲノム編集法(TALEN pairsの開発)を用いることで、MELAS特異的iPS細胞での変異mtDNAの割合を増加又は減少させることに成功した。本研究では更に効率の良いゲノム編集法(TALEN pairs)の開発を試み成功した。次いで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。そしてDoxを加えて骨格筋への分化誘導が可能かどうかを検討した。その結果変異mtDNAを高頻度(90%以上)持っていたても骨格筋への分化誘導が可能であることが示され、MELASの病態機構の一部が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MELASの原因遺伝子変異の一つであるG13513A変異を標的とした新規のTALEN pairsの開発を行った。その結果MELAS特異的iPS細胞でのmtDNAのcopy数は減らさず、変異mtDNAの割合を、効率よく減らせる新規のTALEN pairsの開発に成功した。この結果はMELASに対する遺伝子治療の可能性を示す基礎的なデータと考えられる。またiPS細胞から骨格筋細胞分化の過程で、変異mtDNAを高頻度(90%以上)持っていたても骨格筋への分化誘導が可能であることが明らかとなり、MELASの病態機構の一部が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We successfully increased or decreased the percentage of mutant mtDNA in MELAS-specific iPS cells by using a novel genome editing method (development of TALEN pairs). In this study, we developed more efficient genome editing methods (TALEN pairs). Moreover, to induce differentiation of MELAS-iPS cells into skeletal muscle cells, we generated iPS cells incorporating the Tet-On MyoD1 system (MyoD-iPSCs). Then, we examined whether the addition of Dox could induce differentiation into skeletal muscle. The results showed that even a high frequency (>90%) of mutant mtDNA could induce differentiation into skeletal muscle, and revealed a part of the pathological mechanism of MELAS.

研究分野：神経科学

キーワード：MELAS iPS細胞 TALEN ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

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) は母系遺伝をするミトコンドリア病の一つで、mtDNA の A3243G, A3252G, G13513A 等の点変異が原因で発症することが知られている。mtDNA は1つの細胞内に数百~数千個存在している。MELAS の場合、細胞内の変異 mtDNA は正常 mtDNA と混在し(= heteroplasmy)、変異 mtDNA の割合がある一定の閾値を超えると発症すると考えられている(= 閾値効果)。MELAS の臨床症状は非常に多様で、乳酸アシドーシス、てんかん、脳卒中様発作といった症状に加えて、糖尿病や心筋症などを併発することが知られている。更に、発症時期や重篤度なども多様であり、その複雑な臨床像を反映する病態メカニズムは推測の域を出ておらず、確立された治療法は存在していない (Metab Brain Dis; 36(8), 2021)。

2. 研究の目的

本研究では変異 mtDNA の割合が 80%以上あり臨床症状が確実に出現すると考えられるものから、変異 mtDNA の割合が 50%以下で臨床症状は出現しないと考えられるものまでの様々な割合の変異 mtDNA を持つ MELAS 特異的 iPS 細胞群を用いる。これらの様々な割合で変異 mtDNA を持つ MELAS 特異的 iPS 細胞群を用いて病態機構の解明と、治療の為に必要な新規のゲノム編集法(TALEN pairs)の開発を目的とする。

3. 研究の方法

1) 変異 mtDNA を特異的に切断する 新規の TALEN pairs の開発

MELAS の原因となる点変異の一つを有する mtDNA を特異的に認識し、切断する TALEN を設計する。また、切断効果を厳密に検証できるように、逆の効果、つまり正常 mtDNA を選択的に切断する TALEN も同時に設計する。続いて、設計した TALEN を発現させるためのプラスミド作製を行う。選定した標的配列に対応するモジュールの連結には Platinum Gate TALEN kit (#1000000043; Addgene)などの、分子生物学的手法を駆使して、2ステップで行う。

G13513A 変異 mtDNA を優先的に認識し、切断する TALEN を SSA アッセイ (HEK293T 細胞に TALEN およびレポータープラスミドを導入し、ルシフェラーゼアッセイにより標的配列切断活性を算出) により探索した。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。

2) MELAS-iPS 細胞の骨格筋細胞への分化誘導

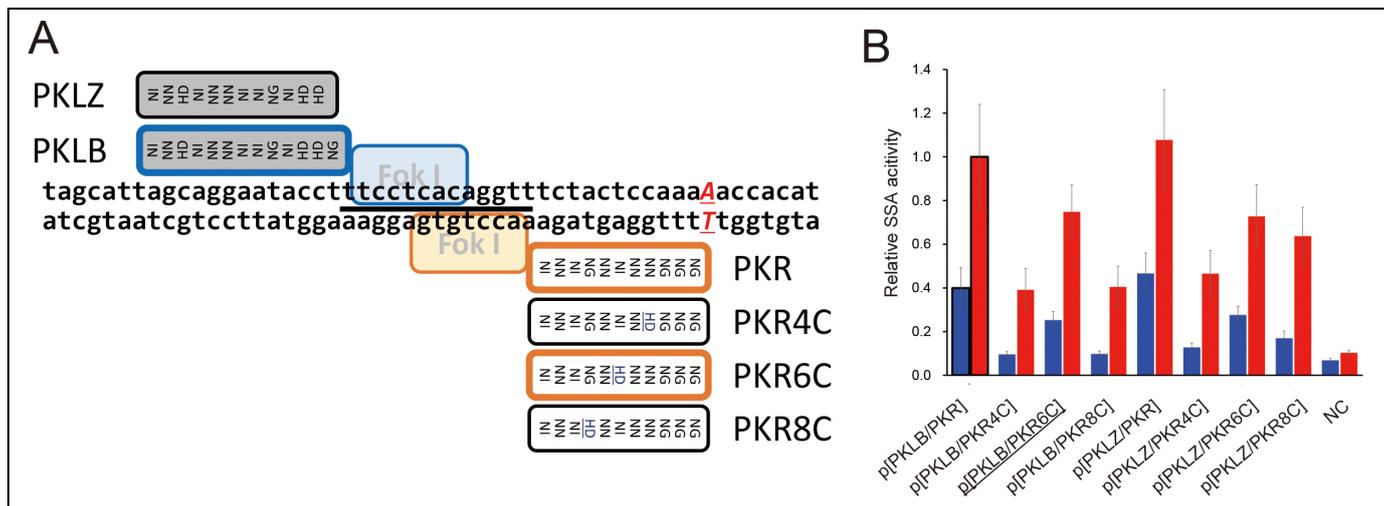
mtDNA に G13513A 変異を有する MELAS 患者由来 iPS 細胞に、疾患標的細胞の一つである骨格筋細胞へ分化誘導を行った。分化誘導を短期間で効率的に行う為に、骨格筋分化に関わる転写因子である MyoD1 の発現をドキシサイクリン(Dox)添加により誘導できるシステム (Tet-On MyoD1) を、ピギーバックトランスポゾンベクターを用いて MELAS-iPS 細胞に導入を行った (Sci. Rep. 5 12831, 2015; PLoS ONE 8 e61540, 2013)。G418 を培地に加えることで、導入された細胞のみを選別し、クローン化を行った。得られた iPS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

1) 変異 mtDNA を特異的に切断する新規の TALEN pairs の開発

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 pairs 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 (図 1A)、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。そして 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 ペアを選択した (図 1B)、

図 1 : TALEN pair と SSA assay



A : TALEN pair のデザイン

B : SSA assay の結果 : 青—m.13513G(正常)配列に対する切断活性 赤—m.13513A(異常)配列に対する切断活性

2) 変異 mtDNA を特異的に切断する TALEN pairs の作用

新規の TALEN ペアである mpTALEN(vPKLB/PKR6C)を MELAS-iPS 細胞に遺伝子導入したところ、効果的に変異 mtDNA の割合を減らすことができた(図 2C, 2D)。しかしながら mpTALEN(vPKLB/PKR6C)では mtDNA コピー数の有意な減少 (図 2E) が観察された。

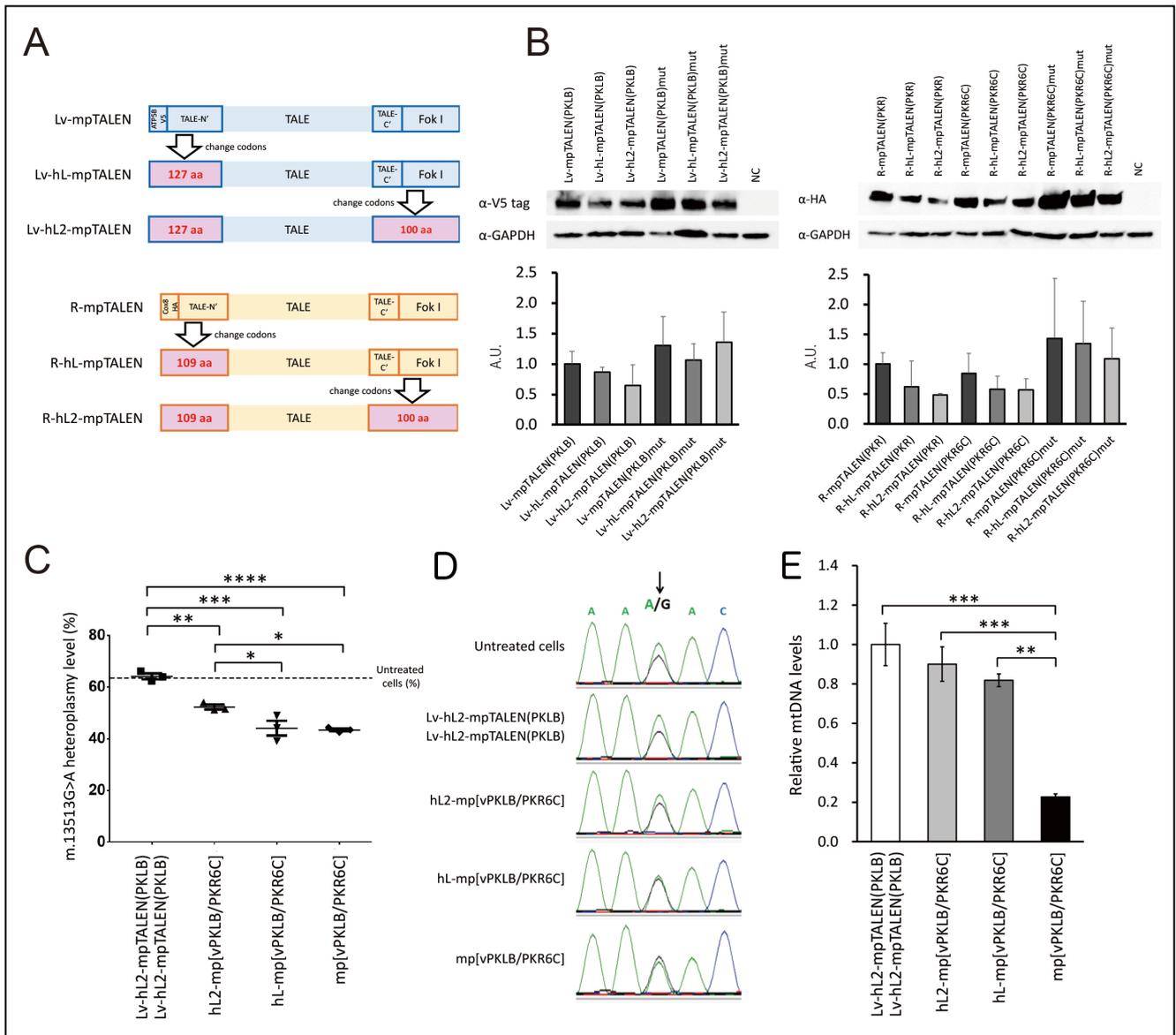
mtDNA コピー数の有意な減少を防ぐ為に、蛋白発現量を減らすことを試みた。一般的にタンパク質を構成する 20 種類の各アミノ酸は mRNA の連続した塩基 3 個 1 組 (triplet) の配列によって規定されており、この 3 個 1 組の塩基配列はコドンと呼ばれている。

メチオニンとトリプトファン以外のアミノ酸は、1 つのアミノ酸に対して複数のコドンが対応する。このことを遺伝暗号の縮重または縮退と呼ばれている。そしてタンパク質発現においては、生物種ごとに、特定のコドンが他のコドンより優先的に翻訳されるというコドンバイアスが生じていることが知られている。具体的には Leu に対応するコドン表は CTT, CTC, CTA, CTG の 4 つあるが、ヒトでは CTA が最も使用され、CTT はあまり使用されていない。そして使用頻度が低い程、発現量が低下することが知られている。

そこで、TALEN の TALE 配列の N 末のコドンをヒトでの使用頻度の高いものから低いものへ (具体例として CTA を CTT へ) 変更したもの (Lv-hl-mpTALEN, Lv-hl2-mpTALEN) と、N 末のと C 末の両方ともに変更したもの (R-hl-mpTALEN, R-hl2-mpTALEN) を作製し (図 2A)、変異 mtDNA 比率を改変する効果があるかを検証した。

その結果、コドンの改変をしなかったもの、N 末のコドンを改変したもの、及び N 末と C 末のコドンを改変したものの順に蛋白発現量の減少を認めた (図 2B)。更にコドンの改変しなかったもの、N 末のコドンを改変したもの、N 末と C 末のコドンを改変したものはいずれも変異 mtDNA の割合を減らすことが出来た(図 2C, 2D)。更に N 末のコドンを改変したもの、N 末と C 末のコドンを改変したものでは mtDNA コピー数の有意な減少 (図 2E) が観察されなかった。

図 2 : mpTALEN の導入結果



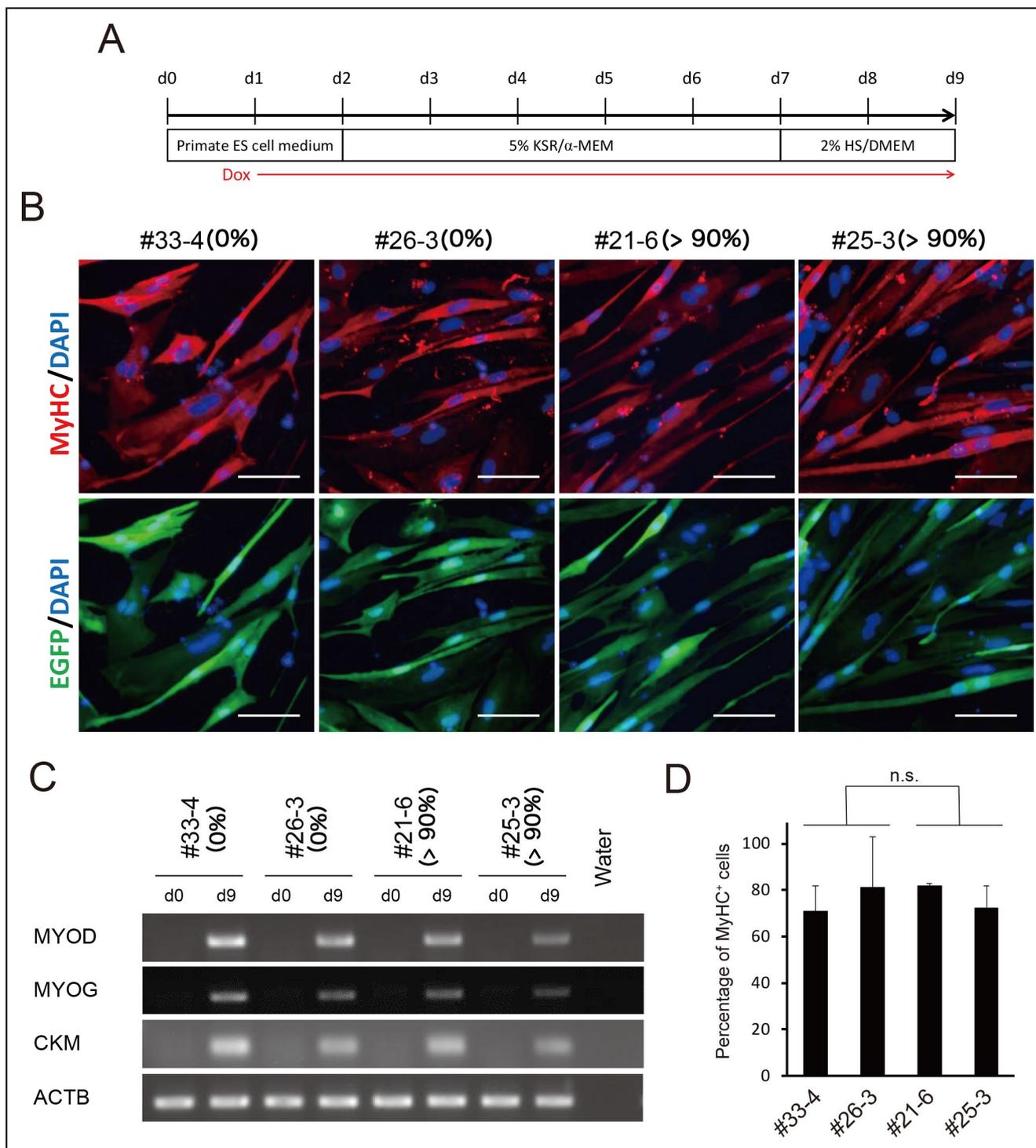
3) MELAS-iPS 細胞の骨格筋細胞への分化誘導と変異 mtDNA の影響

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 (90%以上) を示した。

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 (図 3A)。具体的には G13513A 変異 mtDNA を有した 2 クローン(#21-6 と #25-3: いずれも変異率 90%以上)、正常 mtDNA のみの 2 クローン(#33-4 と #26-3)について、それぞれ骨格筋分化誘導を行なった。

その結果 RT-PCR にて誘導後 9 日目には骨格筋の各種マーカーの発現が全てのクローンで確認された (図 3C)。また、免疫細胞染色により、誘導後 9 日目には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、全てのクローンで 7 割程度観察された (図 3B)。従って G13513A 変異 mtDNA の有無にかかわらず、骨格筋への分化誘導が可能である事が明らかとなった (図 3D)。

図 3 : MELAS-iPS 細胞の骨格筋細胞への分化誘導と変異 mtDNA の影響



以上本研究では、MELAS 患者由来の iPS 細胞を対象に、変異 mtDNA の割合を減少させるだけでなく、mtDNA の copy 数を減少させない、新規の TALEN pair の開発に成功した。この成果は MELAS の遺伝子治療法の開発のための重要な基礎データとなると考えられる。更に変異 mtDNA は iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導には影響を与えないことが明らかとなった。この成果は MELAS の病態解明への足がかりになると考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Naoki Yahata, Hiroko Boda, Ryuji Hata	4. 巻 20
2. 論文標題 Elimination of Mutant mtDNA by an Optimized mpTALEN Restores Differentiation Capacities of Heteroplasmic MELAS-iPSCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 54-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2020.10.017	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 八幡 直樹、帽田 仁子、秦 龍二
2. 発表標題 ミトコンドリア病iPS細胞の変異mtDNA比率を改変するPlatinum TALENの改良
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第6回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡 直樹、秦 龍二
2. 発表標題 ミトコンドリア病患者由来iPS細胞の骨格筋細胞への分化誘導
3. 学会等名 第53回藤田医科大学医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡 直樹
2. 発表標題 変異mtDNAを標的としたTALENの開発とミトコンドリア病iPS細胞モデルへの応用
3. 学会等名 第20回日本ミトコンドリア学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡 直樹
2. 発表標題 変異mtDNAを標的としたTALENの開発とミトコンドリア病iPS細胞モデルへの応用
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yahata, N., Boda, H. and Hata, R.
2. 発表標題 Development of mutant mtDNA-targeted TALENs and their application to iPSC-based mitochondrial disease model.
3. 学会等名 International Meeting on Mitochondrial Pathology (EUROMIT 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hata R, Yahata N , Omi M, and Yoshikawa T
2. 発表標題 Development of novel gene therapy for MELAS by editing mitochondrial DNA
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ミトコンドリア病患者由来iPS細胞の神経細胞への分化誘導
2. 発表標題 八幡 直樹、大熊 真人、秦 龍二
3. 学会等名 第55回藤田医科大学医学会学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 TALエフェクターヌクレアーゼ対およびその利用	発明者 八幡直樹、秦 龍二	権利者 学校法人藤田学園
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-217626	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	尾身 実 (Omi Minoru) (00400416)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究分担者	八幡 直樹 (Yahata Naoki) (60450607)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究分担者	吉川 哲史 (Yoshikawa Tetuji) (80288472)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

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