

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860732

研究課題名(和文)細胞初期化/分化過程におけるミトコンドリア機能異常の分子遺伝学的・生化学的解析

研究課題名(英文)Genetic and biochemical studies of mitochondrial dysfunction in cellular reprogramming and differentiation

研究代表者

横田 睦美(Yokota, Mutsumi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第二部・科研費研究員

研究者番号：10647415

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): 本研究では、ミトコンドリア病で最も代表的な変異であるミトコンドリアDNA上の3243A>G変異を有する複数の患者由来線維芽細胞からiPS細胞を誘導することにより、ミトコンドリア機能異常が細胞初期化の障壁となることを初めて明らかにした。さらに、患者由来iPS細胞から神経細胞や心筋細胞を誘導することにより、ミトコンドリア機能異常が神経細胞や心筋細胞の生存や分化を阻害することが示された。本研究結果は、ミトコンドリアの生理機能が細胞初期化や分化において重要な役割を担っていることを示唆しており、ミトコンドリア病の発症機構解明や治療法探索につながる重要な知見といえる。

研究成果の概要(英文): I focused on the effects of mitochondrial respiratory dysfunction caused by m.3243A>G heteroplasmy in MT-TL1 gene on cellular reprogramming and differentiation. I found that generation of iPSCs was drastically depressed only by high proportions of m.3243A>G, and these proportions were strongly associated with the degree of induced mitochondrial respiratory dysfunction. Furthermore, I found that patient-derived iPSC lines carrying quite high proportions of m.3243A>G showed both induced neuronal cell death and inhibited cardiac lineage-commitment. Therefore, these findings clearly demonstrate that mitochondrial respiratory dysfunction constitutes a roadblock to cellular reprogramming and inhibits maturation and survival of iPSC-derived neurons and cardiomyocytes. This study also suggests that physiological integrity of mitochondria must be a key factor in cellular fate-determination processes, including reprogramming and differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：m.3243A&gt;G ミトコンドリア機能異常 iPS細胞 細胞初期化 分化

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは固有のゲノム(ミトコンドリア DNA; mtDNA)を一細胞あたり複数コピー保持しており、健常型/変異型 mtDNA の割合(変異率)がある一定以上になると、ミトコンドリア病と総称される全身性の疾患が引き起こされる。mtDNA 変異率とミトコンドリア機能低下との関連性については明らかにされつつあるものの、mtDNA 変異率と組織特異的な病態発症との関連性については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1)そこで、複数のミトコンドリア病患者線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、iPS 細胞での変異率の分布が線維芽細胞での変異率の分布と比較してどのように変化するかを解析することにより、変異型 mtDNA に起因するミトコンドリア機能異常が細胞初期化に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

(2)また、樹立した疾患 iPS 細胞からミトコンドリア病の罹患臓器である神経細胞及び心筋細胞へと分化誘導を行い、それぞれの分化細胞における変異率やミトコンドリア機能等の解析を行う。これにより、臨床で見られる組織特異的な変異率の変動とそれに伴うミトコンドリア機能異常について細胞レベルで検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ミトコンドリア病で最も代表的な変異である m.3243A>G 変異を有する 3 症例のミトコンドリア病患者線維芽細胞をクローニングし、それぞれの患者細胞クローンでの変異率を解析することにより、各患者細胞での変異率の分布について明らかにする。次に、変異率の分布が明らかとなった患者細胞からエピソーマルベクター法を用いて iPS 細胞を誘導し、iPS 細胞での変異率をそれぞれ解析する。患者細胞と患者由来 iPS 細胞での変異率の分布を比較することにより、ミトコンドリア機能異常が細胞初期化に及ぼす影響について明らかにする。

(2)健常者 iPS 細胞を用いて神経及び心筋細胞への分化誘導法の確立を行う。その後、患者 iPS 細胞から神経及び心筋細胞への分化誘導を行い、各分化細胞の m.3243A>G 変異率、ミトコンドリア機能、細胞機能について解析することにより、ミトコンドリア機能異常が及ぼす各分化細胞への影響について検証する。

4. 研究成果

(1)m.3243A>G 変異を有する 3 名の患者由来線維芽細胞株のクローニングを行い、患者線維芽細胞株がどのような変異率の細胞で構成されているかを調べた。その結果、患者線

維芽細胞株は様々な変異率を有する細胞で構成された集団であり、その分布も患者ごとに異なることが明らかになった。

これらの患者線維芽細胞株からそれぞれ iPS 細胞を誘導し、検体ごとに線維芽細胞と iPS 細胞の変異率の分布を比較した。その結果、90%以上の変異率を有する iPS 細胞は誘導されにくい傾向があることを発見した。

続いて、患者線維芽細胞に対して異なる m.3243A>G 変異率を有する 1 細胞由来のクローンを複数単離し、細胞初期化におけるミトコンドリア機能異常の影響を精査した。その結果、90%以上の変異率を有する患者線維芽細胞クローンでのみミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 I、IV の顕著な活性低下を認め、それに伴う iPS 細胞誘導効率の顕著な低下を発見した(図 1)。

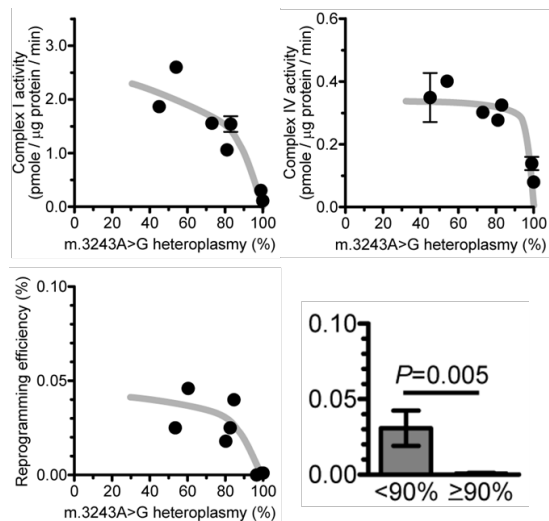


図1. 患者線維芽細胞クローンのミトコンドリア機能(上)と細胞初期化(下)

一方、樹立した iPS 細胞の特性解析の結果、たとえ変異率 100%であっても m.3243A>G 変異患者由来 iPS 細胞は ES 細胞と同等の多能性を維持していた。すなわち、m.3243A>G 変異によるミトコンドリア機能異常は iPS 細胞の多能性維持には影響を及ぼさないと考えられる。

さらに、細胞初期化過程での m.3243A>G 変異率の変動の有無を検証するため、1 細胞由来の患者線維芽細胞クローンから iPS 細胞を誘導し、クローン線維芽細胞と iPS 細胞の変異率の分布を比較した。その結果、m.3243A>G 変異率の分布は細胞初期化過程において大きく変動しないことが明らかとなった。

本研究結果は、ミトコンドリア機能異常により惹起された細胞恒常性維持機構の部分的破綻が細胞初期化における強力な障壁となりうることを示唆する重要な結果であり、ミトコンドリア生理機能が体細胞の多能性獲得の一端を担っていることを示唆して

いる。以上の結果は *Human Molecular Genetics* 誌に投稿し、受理されている (Yokota *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 2015)。

2) 次に、健常者 iPS 細胞を用いてミトコンドリア病の主要な罹患臓器である神経細胞及び心筋細胞への誘導法を確立させた。その後、m.3243A>G 変異を有する同一患者由来のミトコンドリア機能が正常な低変異率 iPS 細胞とミトコンドリア機能が低下した高変異率 iPS 細胞を用いて神経細胞、心筋細胞への分化誘導を行った。分化誘導の結果、低変異率 iPS 細胞からは健常者 iPS 細胞と同様に神経細胞、心筋細胞が正常に誘導されたことが確かめられた。それに対して、高変異率 iPS 細胞からは神経幹細胞から神経細胞への分化過程において細胞死が顕著に引き起こされることが明らかになった。また、高変異率 iPS 細胞からは心筋細胞への分化抵抗性も認められた。この傾向は、別の患者由来高変異率 iPS 細胞を用いた神経細胞、心筋細胞への分化誘導においても同様に認められた。一方、閾値以下の変異率を有する、分化誘導に成功した神経細胞及び心筋細胞は正常なミトコンドリア機能を示した。これらの結果から、閾値以上の m.3243A>G 変異によるミトコンドリア機能異常は神経細胞及び心筋細胞への生存や最終分化を妨げることが見出された。本結果は、細胞分化にミトコンドリア機能が重要な役割を果たしていることを示しただけでなく、ミトコンドリア病患者の脳組織において顕著に認められる神経細胞死を *in vitro* で再現した重要な結果といえる。

また、本研究により、高変異率 iPS 細胞から誘導した神経細胞において変異率が大きく低下した神経細胞コロニーが認められた。さらに、iPS 細胞から神経細胞への分化において mtDNA のコピー数が大きく変動することも明らかになった。これらの詳細なメカニズムを解明することで変異率を変動させる創薬研究にも発展する可能性があり、重要な発見であったといえる。現在、これらの結果をまとめた論文を投稿中である。

本研究により、ミトコンドリアの生理機能が細胞初期化や特定の細胞系譜への分化において重要な役割を担っていることが示唆された(図2)。本研究で得られた結果は、ミトコンドリア病の発症機構解明や治療法探索につながる重要な知見といえる。

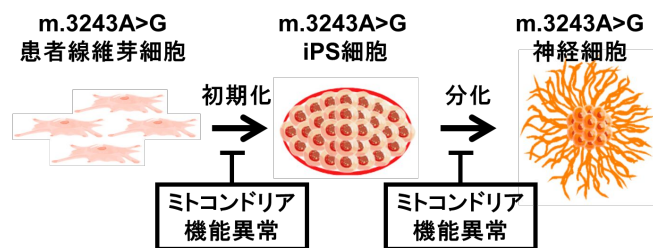


図2. 細胞初期化/分化におけるミトコンドリア機能異常の関与

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 1件)

Yokota M, Hatakeyama H, Okabe S, Ono Y, Goto Y: Mitochondrial respiratory dysfunction caused by a heteroplasmic mitochondrial DNA mutation blocks cellular reprogramming. *Human Molecular Genetics* 24: 4698-4709, 2015 査読有 DOI:10.1093/hmg/ddv201

〔学会発表〕(計 9件)

Yokota M, Hatakeyama H, Ono Y, Kanazawa M, Goto Y: Mitochondrial respiratory dysfunction inhibits maturation and survival of iPSC-derived neurons and cardiomyocytes. CiRA / ISSCR 2016 International Symposia, Kyoto, 3.22-3.24, 2016

横田睦美: ミトコンドリア機能異常は神経・心筋細胞への分化を強く阻害する. AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「疾患特異的 iPS 細胞を活用した筋骨格系難病研究」平成 27 年度骨格筋領域カンファレンス, 東京, 2.26, 2016

Hatakeyama H, Yokota M, Ono Y, Kanazawa M, Goto Y: Generation of patient-derived isogenic iPSCs each carrying "all-or-none" mtDNA mutations toward disease modeling and drug screening. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience "iPS Cells for Regenerative Medicine", Osaka, 1.15-1.17, 2015

畠山英之, 横田睦美, 後藤雄一: ミトコンドリア機能異常は細胞初期化過程における障壁となる. CREST「iPS 細胞」研究領域ミーティング 2014, 淡路, 10.28, 2014

畠山英之, 横田睦美, 後藤雄一: 疾患特異的 iPS 細胞を活用したミトコンドリア病の病態解明・治療法開発研究. JST 戦略的創造研究推進事業「iPS 細胞」研究支援 3 制度合同シンポジウム 2014 ~ iPS 細胞研究の今 ~, 東京, 1.14, 2014

畠山英之, 横田睦美, 後藤雄一: 疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究におけるミトコンドリア病研究班の状況. 厚生労働科学研究費難治性疾患等克服研究事業「ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究」(主任研究者: 後藤雄一) 平成 25 年度班会議, 東京, 11.8, 2013

Yokota M, Hatakeyama H, Okabe S, Ono Y, Goto Y: Mitochondrial dysfunction is the

barrier against cellular reprogramming, but not the maintenance of pluripotency. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, 11.7, 2013

Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y: *in vitro* neuronal modeling of various mitochondrial disorders using patient-derived iPS cells. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, 11.7, 2013

Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y: Molecular pathogenesis and iPS-cell-based disease modeling of MELAS caused by a mutation in anticodon-stem of *MTTW* gene. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, 11.7, 2013

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 睦美 (YOKOTA, Mutsumi)

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第二部・科研費研究員

研究者番号：10647415

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし