

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860831

研究課題名(和文) MELAS患者由来のiPS細胞から分化誘導した神経細胞でのmtDNA修復の試み

研究課題名(英文) Development of site-specific nuclease to control mutated mtDNA in MELAS iPS cell-derived neuronal cells

研究代表者

松本 祐嗣 (MATSUMOTO, Yuji)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：50726651

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)：ミトコンドリア病の一つであるMELAS(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)は、ミトコンドリアDNA(mtDNA)の変異が原因で発症する。MELASの治療法の開発を目指し、MELASの原因となる変異mtDNAの存在率を変化させる為のツールとなるTALENの開発を試みた。変異あるいは正常mtDNAをそれぞれ優先的に切断するTALENを設計し構築を行った。SSA(single strand annealing)アッセイによりDNA切断活性を評価し、選別を行った。正常mtDNA切断TALENを細胞内ミトコンドリアに発現させたところ、mtDNAコピー数減少を誘導した。

研究成果の概要(英文)：MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), one of mitochondrial diseases, is associated with mitochondrial DNA (mtDNA) mutations. For clinical application, we tried to generate mtDNA-specific TALENs (Transcription activator-like effector nucleases) to control mtDNA heteroplasmy levels. We designed and constructed TALEN plasmids to introduce double strand breaks into mutated or wild-type mtDNA, respectively. The activity and specificity of TALENs were evaluated by SSA (single strand annealing) assay. Wild-type mtDNA-specific TALEN localized in mitochondria decreased mtDNA copy numbers in cell lines.

研究分野：小児科学

キーワード：MELAS

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らが現在研究対象としている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) は母系遺伝をするミトコンドリア病の一つで、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の変異 m.3243A>G, m.3271T>C, m.3252A>G, m.13513G>A 等に強く関連してい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、感音性難聴、低身長、心筋症、筋力低下等の神経・筋症状や糸球体病変、糖尿病が見られることもあり、多様な臨床像を反映する病態メカニズムは推測の域を出ないことから、確立された治療法が存在していない。

近年、様々な生物種において目的の遺伝子を改変する「ゲノム編集」技術が注目されている。部位特異的ヌクレアーゼを用いて、標的遺伝子上に特異的に DNA 二本鎖切断を導入することで、標的遺伝子の破壊や外来遺伝子の挿入を可能にする技術である。1996 年に初めて報告された Zinc-finger nuclease (ZFN) に続き、標的配列の選択性が高い transcription activator-like effector nuclease (TALEN) が開発された。TALEN は 2010 年に初めて報告され (*Genetics* **186**, 757-761, 2010)、作製が簡便であることから、この数年の短い期間に既に多くの生物での遺伝子破壊が成功している。

TALEN を含むゲノム編集の技術は、基本的に核ゲノムの編集に用いられているが、近年、この TALEN 技術を使うことで、変異のある mtDNA を認識し、DNA 二本鎖切断を導入することで、変異ミトコンドリア DNA を減少させ、ミトコンドリアの機能回復を誘導できるということが報告された (*Nature Med.* **19**, 1111-13, 2013)。この報告では、変異や欠損のある mtDNA を認識して、二本鎖切断を起こすことで、その mtDNA が欠失し、かつその後ミトコンドリアの呼吸鎖複合体の活性が回復することを培養細胞で示している。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では、MELAS を含む mtDNA 変異が原因で発症する疾患の治療法開発に向けて、MELAS に関連する変異 mtDNA (あるいは正常 mtDNA) を特異的に切断する TALEN を構築し、実際の MELAS 患者細胞において、構築した TALEN を導入することで、変異 mtDNA の存在率を変化させることができるかを検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 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 Golden Gate 法 (*Genes Cells.* **18**, 315-26, 2013) などの、分子生物学的手法を駆使して、2 ステップで行う。

(2) 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 TALEN の切断活性を評価する。変異配列、あるいは正常配列に対する切断活性をそれぞれ算出し、活性の強さおよび特異性を評価する。

(3) SSA アッセイにより選別した TALEN 配列を用い、ミトコンドリア移行シグナルおよびエピトープタグを N 末端に連結したプラスミドを作製する。さらに、改変した TALEN (mtTALEN) がミトコンドリアに局在しているかについて免疫細胞染色によって確認する。

(4) 実際に mtTALEN が mtDNA を切断する能力を有するかについて、正常 mtDNA を切断する TALEN を用いて確認する。HEK293T 細胞に mtTALEN プラスミド導入し、共発現させた GFP を基準に mtTALEN 導入/非導入

細胞をそれぞれセルソーターにより分取する。各細胞から DNA を抽出し、mtDNA コピー数の定量を行い、正常 mtDNA の切断活性を評価する。

(5) 変異 mtDNA を有した MELAS-iPS 細胞に mtTALEN を導入し、変異 mtDNA の存在率（ヘテロプラスミー率）の変動を ARMS qPCR 法 (*Methods Mol Biol.* **837**, 313-26, 2012)等により算出する。

(6) 変異 mtDNA を有した MELAS iPS 細胞を SFEBq 法 (*Cell Stem Cell* **12** 487-496, 2013)により大脳皮質神経細胞へと分化誘導する。そこへ mtTALEN を導入し、変異 mtDNA の存在率（ヘテロプラスミー率）の変動を ARMS qPCR 法等により算出する。

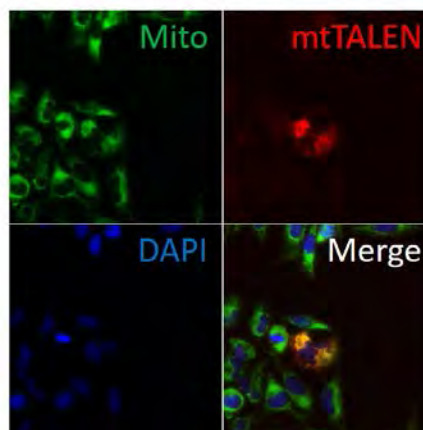
#### 4. 研究成果

(1) 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、および正常 mtDNA を選択的に切断する TALEN を作製し、SSA アッセイにより切断活性および特異性を評価した。変異 mtDNA あるいは正常 mtDNA をより優先的に切断する TALEN 配列が見出された。正常 mtDNA を認識する TALEN については特異性の高いものが得られた。一方、変異 mtDNA を選択的に認識する TALEN については、正常配列の切断活性もある程度検出された。より選択性の高い TALEN 配列の選定は今後の課題とした。

(2) 正常配列のみを選択的に切断する TALEN について、ミトコンドリア移行シグナルおよびエピトープタグを N 末端に連結したプラスミドを作製した。HeLa 細胞等にプラスミドを導入し、改変した mtTALEN の細胞内局在を免疫細胞染色によって観察したところ、ミトコンドリアマーカーとの共局在が確認できたことから、ミトコンドリアに主に局在していることが示された (図 1)。

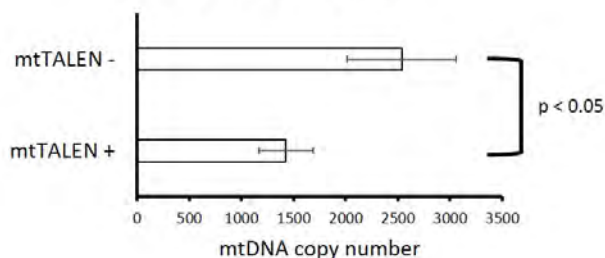
(3) 正常 mtDNA 切断 mtTALEN を HEK293T

図1 mtTALENの細胞内局在



細胞に導入し、1日後共発現させた GFP を基準に mtTALEN 導入細胞/非導入細胞をセルソーターにより分取した。それぞれの mtDNA コピー数を算出したところ、mtTALEN 導入細胞において、mtDNA コピー数が減少していた。これにより mtTALEN の細胞内での mtDNA 切断活性が示された (図 2)。

図2 mtTALEN導入によるHEK293T細胞の mtDNAコピー数の変化 (トランスフェクション後1日目)



(4) 変異 mtDNA を有した MELAS 患者由来 iPS 細胞、および MELAS-iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞にて、正常 mtDNA 切断 mtTALEN の効果検証を試みようとしてきたが、細胞への TALEN 導入効率が劇的に低く、解析に足る条件に最適化することが出来なかった。現在も遺伝子導入ツールおよび細胞処理等についての最適化を進めており、これらの点については、今後の課題とした。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕（計 1件）

八幡直樹、松本祐嗣、吉川哲史、秦龍二  
MELAS患者由来iPS細胞の樹立 第14回日本  
再生医療学会、2015年3月19日、パシフィ  
コ横浜（神奈川県）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 祐嗣 (MATSUMOTO, Yuji)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号：50726651

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし