

iPS 細胞を用いたミトコンドリア病の病態解析と ゲノム編集ツールの利用

八幡直樹

(藤田医科大学医学部・解剖学 I 講座)

1. はじめに

ミトコンドリア病はミトコンドリアの機能が障害されることによって起こる疾患群であり、核ゲノムにコードされている遺伝子変異が原因である場合と、ミトコンドリア内に存在するミトコンドリア DNA (mtDNA) の遺伝子変異によるものとに大別される。

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) はその名の通り、主に脳と筋肉が障害されて、脳卒中様発作を繰り返すミトコンドリア病の一種であり、mtDNA における A3243G, T3271C, G13513A といった変異が原因で発症することが知られている。根本的な治療法が存在せず、本疾患に対する治療法を開発するために、脳卒中様発作を含む複雑な臨床症状を反映する病態モデルが望まれている。

本稿では MELAS を含む変異 mtDNA が原因となるミトコンドリア病に関する iPS 細胞を用いた病態解析について概説するとともに、近年普及が目覚ましいゲノム編集ツールである部位特異的ヌクレアーゼが mtDNA に対してどのように利用できるのかについて、著者の研究に触れつつ紹介する。

2. iPS 細胞を用いたミトコンドリア病の病態解析

2007 年に複数の初期化因子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* など) を皮膚線維芽細胞に導入することで、ヒトの iPS 細胞が樹立できたことが報告された¹。iPS 細胞は ES 細胞と同様の形態を示し、分化多能性を示すことから、ES 細胞を用いて開発されてきた分化誘導法を適応することで、様々な細胞の作出が可能になった。これまで、疾患患者由来細胞を初期化することにより樹立された、様々な疾患特異的 iPS 細胞を用いて、病態メカニズムの解明や創薬開発への応用が急速に進んできた²。

一方、mtDNA の変異が原因で発症するミトコンドリア病に関しては、2012 年に A3243G 変異を有する糖

尿病患者由来 iPS 細胞が初めて樹立された³。mtDNA はヒトの場合、1 細胞中に数百~数千コピー存在することが知られているが、mtDNA 変異が原因のミトコンドリア病患者由来細胞において、必ずしも全ての mtDNA に変異が導入されているわけではなく、A3243G 変異 mtDNA と正常 mtDNA とが混在した状態 (この状態をヘテロプラスミーと呼ぶ) で存在する。そして、この皮膚線維芽細胞を初期化することで、変異 mtDNA を有する iPS 細胞および変異 mtDNA が検出されない iPS 細胞がそれぞれ樹立できたことが報告された³。これは、変異 mtDNA を有する iPS 細胞と、病態解析を行う際の比較対象として必要な、遺伝的背景グラウンドが同一で正常 mtDNA のみを有する iPS 細胞の両方がゲノム編集操作等を介することなく得られたことになる。Yokota らの詳細な解析によると、1 人の患者由来皮膚線維芽細胞のヘテロプラスミーを細胞ごとに調べた結果、様々なヘテロプラスミーの細胞が混在している場合があり、それらを初期化することで得られた iPS 細胞クローンのヘテロプラスミーも皮膚線維芽細胞と同様の分布を示すことから、初期化される前の線維芽細胞のヘテロプラスミーが樹立直後の iPS 細胞でもある程度保持されていることが分かった⁴。

著者らは、G13513A 変異を有する MELAS 患者由来皮膚線維芽細胞にエピソーマルベクターを用いて初期化因子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, *p53-shRNA*) を導入した。数週間後に出現した iPS 細胞コロニーをピックアップし、各 iPS 細胞クローンの変異 mtDNA 比率を解析したところ、47 クローンのうち 3 クローンにのみ変異 mtDNA が検出された⁵。これは、iPS 細胞誘導前の皮膚線維芽細胞の変異 mtDNA 比率が 2 割程度と低かったことが反映されていると考えられるが、効率が悪いながらも、変異 mtDNA を有した iPS 細胞を樹立することができた。

mtDNA の変異が原因で発症するミトコンドリア病

患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析および創薬開発への応用については、2013 年以降少しずつ報告が増えてきた。例えば、mtDNA の欠失変異により発症するピアソン病患者由来 iPS 細胞は増殖能およびミトコンドリア機能の低下が示され、50% 程度のヘテロプラスミーを示す iPS 細胞の血球分化誘導で鉄芽球の増加が見られた。また、A3243G 変異 MELAS 患者由来神経細胞において、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の機能低下に伴うオートファジーの活性化が観察された⁷。さらに、リー脳症や NARP 症候群の原因となる T9185C 変異を有する iPS 細胞由来神経前駆細胞では、ATP 産生の低下に加え、ミトコンドリア膜電位・カルシウム恒常性などに違いが見られ、さらにミトコンドリア膜電位を指標に薬剤探索が試みられた⁸。加えて、複数の論文で、変異 mtDNA の割合が高いミトコンドリア病患者由来 iPS 細胞について、心筋細胞や神経細胞への分化誘導阻害が報告されている^{9,10}。これらは乳児～小児期に多く発症するミトコンドリア病の病態を反映している可能性も考えられるが、幅広い年齢で発症する本疾患群の臨床症状と iPS 細胞モデルでの病態再現の因果関係を理解するにはさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

3. 変異 mtDNA を標的としたゲノム編集ツールの開発

ゲノム編集技術が進展し、iPS 細胞を用いた疾患研究にも応用されているが、これらは基本的に核ゲノムの編集に関するものであり、mtDNA を含むオルガネ

ラが独自に保持しているゲノムを標的とした編集技術は未成熟である。一方、ヘテロプラスミーを示す哺乳類細胞に、ある一方の mtDNA のみを切断するヌクレアーゼを導入すると、切断された mtDNA が消失することで、その割合を改変できることが知られていた¹¹。その後登場したゲノム編集のツールである ZFN (zinc-finger nuclease) や TALEN (transcription activator-like effector nuclease) といった部位特異的ヌクレアーゼは、DNA 結合領域をある程度自在にデザインでき、さらにミトコンドリア移行シグナルを付加することにより、ミトコンドリア内に送り込むことができる。そこで、変異 mtDNA に特異的なこれらのツールを、実際に変異 mtDNA を有する細胞に導入することで、変異 mtDNA の割合を改変できることが報告された。現在まで、複数のグループによってミトコンドリア病の原因遺伝子変異を有する mtDNA を標的とした部位特異的ヌクレアーゼが開発され、患者由来線維芽細胞などで、その効果が検証されている¹²⁻¹⁵。

著者らは、独自に樹立した G13513A 変異が原因の MELAS 患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析を進めているが、変異 mtDNA 比率と細胞表現型との因果関係を詳細に解析するために、iPS 細胞において変異 mtDNA の比率を改変できないかと考えた。そこで、G13513A 変異 mtDNA を選択的に認識・切断する高活性型 Platinum TALEN の開発を独自に試みた。TALEN は TALE と呼ばれる DNA 結合ドメインと制限酵素 FokI の DNA 切断ドメインからなる人工酵素で

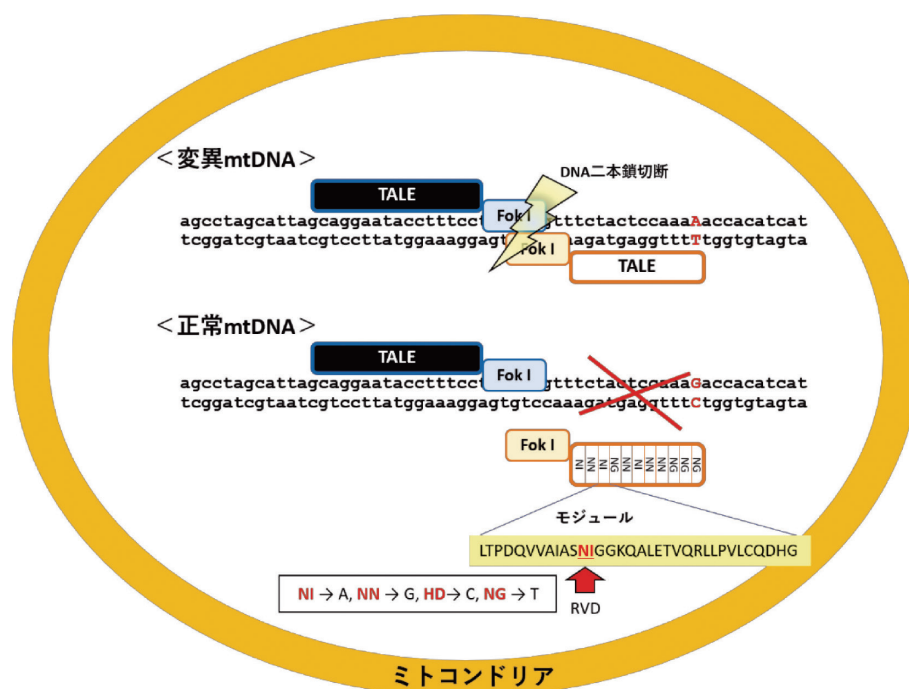


図1 変異ミトコンドリア DNA を標的とした TALEN の開発
TALEN は複数のモジュールが連結した TALE ドメインと FokI の DNA 切断ドメインが融合した人工酵素である。

あるが、2つのTALENモノマーがDNAに結合し、FokIが二量体を形成することで、DNA二本鎖切断を誘導する(図1)。TALEは約34アミノ酸を単位としたモジュールの繰り返し構造であり、各モジュールの12, 13番目のアミノ酸残基(RVDと呼ぶ)がDNAの1塩基を認識する。4種類の塩基にそれぞれ特異性の高いRVDを持つモジュールを選択し、連結することにより、ゲノム上の特定の場所に結合するTALENを作製することが可能になる(図1)。

著者らは、TALENモノマーのTALEの長さ、結合位置、2つのTALENモノマー間の距離等の条件を変えることにより、G13513A変異mtDNAを優先的に認識し、切断するTALENをSSA(single-strand annealing)アッセイにより探索した。SSAアッセイとは、まず、プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を一部オーバーラップした状態で分割し、その間に、標的とする変異部位を含むmtDNA配列を挿入したレポーターベクターを準備する。このベクターと、作製したTALEN発現ベクターをHEK293T細胞に共導入すると、発現したTALENによってレポーターベクターにDNA二本鎖切断が導入され、ルシフェラーゼ遺伝子のオーバーラップ領域を介したSSAによる修復が起こり、分割されたルシフェラーゼ遺伝子が回復する。このルシフェラーゼの発光強度を測定することで、TALENの切断活性を定量化できる、というものである。変異型のmtDNA配列を挿入したレポーターベクターを用いたSSAアッセイで、切断活性を評価し、さらに、正常型のmtDNA配列を挿入したレポーターベクターを用いて行った結果と合わせて、TALENペアの変異配列切断に対する特異性を評価した。

こうして絞り込んだ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、樹立した変異mtDNAを有するMELAS-iPS細胞に導入したところ、短期間で変異mtDNA比率を減少させることに成功した⁵。著者らの報告の後、MELASの原因遺伝子変異の一つである、A3243G変異を標的としたTALENについても、変異mtDNAを有するiPS細胞において変異mtDNA比率を改変できたという論文が報告された¹⁶。今後、これらの技術がmtDNA変異を原因とするミトコンドリア病の病態解明および治療法の開発に寄与すると考える。

4. おわりに

近年、変異mtDNAを有するマウスモデルに対して、変異mtDNAを標的とした部位特異的ヌクレアーゼを組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを投与するこ

とで変異mtDNA比率の減少を誘導できたことが報告された^{17,18}。今後、iPS細胞モデルを用いたミトコンドリア病の病態解明とともに、変異mtDNAを標的とした部位特異的ヌクレアーゼの治療への応用についても、慎重かつ丁寧な研究の進展が期待される。

文 献

- 1) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 ; 131 : 861 – 872.
- 2) Shi Y, Inoue H, Wu JC, and Yamanaka S : Induced pluripotent stem cell technology : a decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2017 ; 16 : 115 – 130.
- 3) Fujikura J, Nakao K, Sone M, Noguchi M, Mori E, Naito M, Taura D, Harada-Shiba M, Kishimoto I, Watanabe A, Asaka I, Hosoda K, and Nakao K : Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia*. 2012 ; 55 : 1689 – 1698.
- 4) Yokota M, Hatakeyama H, Okabe S, Ono Y, and Goto Y : Mitochondrial respiratory dysfunction caused by a heteroplasmic mitochondrial DNA mutation blocks cellular reprogramming. *Hum. Mol. Genet*. 2015 ; 24 : 4698 – 4709.
- 5) Yahata N, Matsumoto Y, Omi M, Yamamoto N, and Hata R : TALEN-mediated shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in MELAS-iPSCs with m.13513G > A mutation. *Sci. Rep*. 2017 ; 7 : 15557.
- 6) Cherry AB, Gagne KE, McLoughlin EM, Baccei A, Gorman B, Hartung O, Miller JD, Zhang J, Zon RL, Ince TA, Neufeld EJ, Lerou PH, Fleming MD, Daley GQ, and Agarwal S : Induced pluripotent stem cells with a mitochondrial DNA deletion. *Stem Cells*. 2013 ; 31 : 1287 – 1297.
- 7) Hamalainen RH, Manninen T, Koivumaki H, Kislin M, Otonkoski T, and Suomalainen A : Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A > G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2013 ; 110 : E3622 – 3630.
- 8) Lorenz C, Lesimple P, Bukowiecki R, Zink A,

- Inak G, Mlody B, Singh M, Semtner M, Mah N, Aure K, Leong M, Zabiegalov O, Lyras EM, Pfiffer V, Fauler B, Eichhorst J, Wiesner B, Huebner N, Priller J, Mielke T, Meierhofer D, Izsvak Z, Meier JC, Bouillaud F, Adjaye J, Schuelke M, Wanker EE, Lombes A, and Prigione A : Human iPSC-Derived Neural Progenitors Are an Effective Drug Discovery Model for Neurological mtDNA Disorders. *Cell Stem Cell*. 2017 ; 20 : 659 – 674.
- 9) Folmes CD, Martinez-Fernandez A, Perales-Clemente E, Li X, McDonald A, Oglesbee D, Hrstad SC, Perez-Terzic C, Terzic A, and Nelson TJ : Disease-Causing Mitochondrial Heteroplasmy Segregated Within Induced Pluripotent Stem Cell Clones Derived from a Patient with MELAS. *Stem Cells*. 2013 ; 31 : 1298 – 1308.
 - 10) Yokota M, Hatakeyama H, Ono Y, Kanazawa M, and Goto YI : Mitochondrial respiratory dysfunction disturbs neuronal and cardiac lineage commitment of human iPSCs. *Cell Death Dis*. 2017 ; 8 : e2551.
 - 11) Srivastava S and Moraes CT : Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum. Mol. Genet*. 2001 ; 10 : 3093 – 3099.
 - 12) Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Peralta S, and Moraes CT : Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat. Med*. 2013 ; 19 : 1111 – 1113.
 - 13) Gammage PA, Gaude E, Van Haute L, Rebelo-Guimar P, Jackson CB, Rorbach J, Pekalski ML, Robinson AJ, Charpentier M, Concordet JP, Frezza C, and Minczuk M : Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. *Nucleic. Acids Res*. 2016 ; 44 : 7804 – 7816.
 - 14) Hashimoto M, Bacman SR, Peralta S, Falk MJ, Chomyn A, Chan DC, Williams SL, and Moraes CT : MitoTALEN : A General Approach to Reduce Mutant mtDNA Loads and Restore Oxidative Phosphorylation Function in Mitochondrial Diseases. *Mol. Ther*. 2015 ; 23 : 1592 – 1599.
 - 15) Reddy P, Ocampo A, Suzuki K, Luo J, Bacman SR, Williams SL, Sugawara A, Okamura D, Tsunekawa Y, Wu J, Lam D, Xiong X, Montserrat N, Esteban CR, Liu GH, Sancho-Martinez I, Manau D, Civico S, Cardellach F, Del Mar O'Callaghan M, Campistol J, Zhao H, Campistol JM, Moraes CT, and Izpisua Belmonte JC : Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell*. 2015 ; 161 : 459 – 469.
 - 16) Yang Y, Wu H, Kang X, Liang Y, Lan T, Li T, Tan T, Peng J, Zhang Q, An G, Liu Y, Yu Q, Ma Z, Lian Y, Soh BS, Chen Q, Liu P, Chen Y, Sun X, Li R, Zhen X, Liu P, Yu Y, Li X, and Fan Y : Targeted elimination of mutant mitochondrial DNA in MELAS-iPSCs by mitoTALENs. *Protein Cell*. 2018 ; 9 : 283 – 297.
 - 17) Bacman SR, Kauppila JHK, Pereira CV, Nissanka N, Miranda M, Pinto M, Williams SL, Larsson NG, Stewart JB, and Moraes CT : MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA (Ala) levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nat. Med*. 2018 ; 24 : 1696 – 1700.
 - 18) Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, Costa ASH, Gaude E, Powell CA, Van Haute L, McCann BJ, Rebelo-Guimar P, Cerutti R, Zhang L, Rebar EJ, Zeviani M, Frezza C, Stewart JB, and Minczuk M : Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nat. Med*. 2018 ; 24 : 1691 – 1695.