

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ミトコンドリア病 iPS 細胞の樹立と病態解析  
(英語) Disease modeling of mitochondria disease with human iPSCs.

研究開発実施期間: 令和2年8月25日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 魚崎 英毅  
(英語) Hideki UOSAKI

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部 准教授  
(英語) Division of Regenerative Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University.  
Associate Professor

## II 研究開発の概要

本研究では遺伝的にミトコンドリア機能が障害され発症するミトコンドリア病の疾患特異的 iPS 細胞の樹立とその病態解析を行った。特にミトコンドリア病のなかでも発症すると生存率が特に低いミトコンドリア心筋症を標的とし、代表研究者の魚崎は疾患 iPS 細胞の樹立、心筋細胞への分化誘導・成熟、そしてそこでのような病態が見られるかについて解析を行った。また、分担研究者の村山・小坂は全国でミトコンドリア病・ミトコンドリア心筋症を疑われた患者の生化学的解析および遺伝学的解析を行った。

### ミトコンドリア病の診断および遺伝子解析状況

村山班では2020年8月から2022年度にかけて、全国の施設から634症例の診断依頼を受け生化学診断を行った。さらに遺伝子診断のためおよそ300検体の遺伝子パネル解析を実施した。このうち酵素活性低下を確認した42例中、肥大型心筋症を呈していたものが7例であった。また遺伝学的検査による原因遺伝子確定例が114例(ミトコンドリアDNAの異常が58例、核遺伝子の異常が56例)であった。ミトコンドリアDNAの異常を同定した58例中6例に肥大型心筋症を認めた。一方核遺伝子の異常を認めた56例では、肥大型心筋症を6例、拡張型心筋症を3例、たこつぼ型心筋症・心筋緻密化障害をそれぞれ1例に認めた。他の事業とも連携し、2004～2019年にかけて原因遺伝子が同定されたミトコンドリア病223症例に対して、その遺伝

的基盤および心筋症の詳細な病型などの臨床的特徴、長期予後について論文報告した。心筋症は全体の 22% に合併しており、心筋症を認めない症例より明らかに生命予後が悪いことを明らかにした (Imai-Okazaki A, Int J Cardiol. 341:48-55. 2021)。

#### 疾患 iPS 細胞の樹立・寄託

魚崎を中心として疾患 iPS 細胞の樹立を行った。健常者 4 名 (うち 3 名は理研 BRC に寄託のあった線維芽細胞)、ミトコンドリア病 (心筋症) 患者 26 名の線維芽細胞から樹立を行った。iPS 細胞はまず Cytotune を用いて樹立を行ったが、sendai virus が樹立した iPS 細胞株に長期的に残存した。そこで miRNA により除去することができる SRV iPSC-1 Vector を用いて再度樹立を行い、1 症例を除きすべての症例で iPS 細胞の樹立を完了した。後述する 2 症例をのぞくミトコンドリア心筋症 23 症例 68 株および健常者 4 名 12 株、合計 80 株を理化学研究所バイオリソースセンターへと寄託した。なお、樹立したすべての株で SRV の消失を確認し、未分化マーカーの発現を確認した。

ミトコンドリア DNA に変異を有する 6 症例では樹立した iPS 株において変異率 (ヘテロプラスミー率) を計測し、最も変異率の高い 3 株ずつを寄託株とした。ただし、MT-ATP6/8 に変異を有する症例 (ヘテロプラスミー率約 50%) では iPS 細胞自体は樹立できたものの、樹立株に変異を含まなかった。再度樹立を試みたところ、変異を 100% 有する iPS 細胞株が得られたが、得られた株が非常に不安定であったため、寄託は行わないこととした。また X 染色体に小さな欠失を有する症例では iPS 細胞は樹立できたものの、樹立した株すべてで変異 mRNA が発現しておらず、不活性化されている染色体側に変異があると考えられ、疾患 iPS 細胞として適切ではないと考えられた。これら 2 症例に関しては樹立した疾患 iPS 細胞の寄託を行わなかった。

#### 疾患 iPS 細胞の遺伝子変異を修復するための塩基編集技術の開発

疾患 iPS 細胞の変異修復にはゲノムを切断した上で相同組み換えにより修復するゲノム修復および切断せずにデアミナーゼを用いて塩基を置換する塩基編集技術が存在する。魚崎は塩基編集効率を評価できるゲノム編集 iPS 細胞株を作出し、各種塩基編集ツールの評価を行った。さらに他の事業とも連携し、疾患 iPS 細胞に塩基編集を応用する研究にも携わった (Hiramoto, Commun Med, 2023)。

#### 疾患 iPS 細胞の増殖低下とそれを回復させる化合物の同定

樹立に際し、一部の症例において疾患 iPS 細胞の増殖が低いことが明らかとなってきた。最も増殖の低いものでは 2 週間の累積増殖が野生型に対し 1/10 から 1/100 であった。そこで、これまでミトコンドリア病に有効であると報告のある化合物について、特に増殖の低い症例 (#8, #9 など) で検討したところ、ある遺伝子 K に変異を有する疾患 iPS 株 (#9) に対して、化合物 T を投与することで増殖を回復させることを見出した。さらに検討を進めたところ、#9 ではミトコンドリアの呼吸鎖複合体が大幅に減少し、酸素消費速度 (OCR) が低下していた。一方、化合物 T の投与はこれらを回復させており、遺伝子 K の変異に対し化合物 T が有用である可能性を見出した。

#### 疾患 iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導

樹立した iPS 細胞全 80 株について心筋細胞へと分化誘導を行った。健常者由来の株は 10 日間の心筋細胞分化誘導により、平均で 10-50% が cardiac troponin T 陽性となった。一方疾患 iPS 細胞では、3 株が 10% 以下であったが、それ以外の株は 15-70% であった。各症例について樹立した株がすべて分化しないということはなく、ミトコンドリア心筋症の原因遺伝子を有することは、心筋細胞へ分化に大きく影響はしないと考えられた。

### 分化心筋細胞の純化法の開発

本研究では多くの疾患 iPS 細胞から心筋細胞へと分化誘導し、その心筋細胞を用いた解析を行う必要がある。100%が心筋細胞とはならないため何らかの方法により純化する必要がある。我々のグループは以前、心筋細胞に特異的に発現する細胞表面抗原を同定しているが、同時に多数の株から心筋細胞を純化するのには適していない。また、以前より薬剤耐性遺伝子をノックインないしトランスジェニックとして発現させる手法が使われているが、すべての株でこうした遺伝子改変を行うことは現実的ではない。心筋細胞のミトコンドリア機能が高いことを利用し、無グルコース培地で心筋細胞のみを選抜する方法も開発されているが、本研究ではミトコンドリア心筋症を対象疾患としており、ミトコンドリア機能に依存する手法も適していないと考えられた。そこで新しい純化手法の開発に取り組んだ。

分化心筋細胞に対しアデノ随伴ウイルス(AAV)はほぼ 100%感染することが可能である。そこで、AAV 内に心筋細胞特異的プロモーターである cardiac troponin T プロモーター下にブラストサイジン耐性遺伝子を導入したベクターを構築した。AAV の感染時期・感染量を検討し、心筋細胞が出現し始める分化 9 日目より AAV を感染させ、分化 11 日目からブラストサイジンにより選択することで、安定して心筋細胞のみ (95%以上) を得ることが可能になった (Ahmed, J Vis Exp 169:e62129, 2021)。

### 分化心筋細胞の特性評価

ミトコンドリア心筋症の患者では多くの場合、肥大型心筋症となることが報告されている。そこで、分化 15 日目に純化した心筋細胞を再播種し、分化 21 日目の心筋細胞形態を評価した。健常者と比べ、多くの株で、患者の表現型と一致し肥大することが明らかとなった。心筋細胞の収縮基盤であるサルコメアを染色すると、症例によっても異なるが、肥大が強いものではサルコメアパターンの破綻し、点状であったり、スミア状となるものが観察された。また、ミトコンドリア形態にも異常が見られ、ミトコンドリア傷害時に見られる膨潤したミトコンドリアが観察された。一方で、一部の症例では患者は肥大型心筋症であるにも関わらず、心筋細胞は肥大していなかった。これは分化早期の心筋細胞では成熟しておらず、疾患遺伝子が十分発現していないことが予想される。

続いて分化 23 日目にタンパクを抽出し、呼吸鎖複合体のウェスタンブロットを行った。少なくとも一部の症例では呼吸鎖複合体の量が大幅に減少していることが明らかとなった。また、分化 25 日目に細胞内のカルシウム動態を評価したところ、特に肥大した心筋細胞では電気刺激に対し細胞内のカルシウム濃度の上昇が観察されなかった。

### 分化心筋細胞の成熟法の開発

iPS 細胞より分化誘導した心筋細胞は未成熟であることがよく知られている。それでは心筋細胞の成熟を促進した場合に、疾患 iPS 細胞由来分化心筋細胞の病態がどのような変化を見せるのかは明らかではない。そこで我々はまず成熟法の開発を進め、新しい成熟法に基づき分化心筋細胞が何らかの病態を示すのかを検討した。これまでの研究で心筋細胞の成熟に核内受容体が重要であることを見出していたため、核内受容体のアゴニストの組み合わせを検討し、トランスクリプトーム、ミトコンドリア機能、生理学的機能などの観点から心筋細胞の成熟が進む核内受容体アゴニスト 3 剤の組み合わせを 2 種類同定した。続いて、比較的心筋細胞肥大の程度が軽い症例(#21)に対して、分化誘導後 16 日目から 2 週間に渡ってアゴニスト処理をおこなった。コントロールである健常者由来のものでは、心筋細胞が伸長し、より成熟した表現型を見せた一方で、#21 由来の心筋細胞は著名な肥大を起こし、さらに 3 核以上の心筋細胞が 10%程度まで増加した。この結果は心筋細胞の成熟を促すことで、病的な心筋細胞肥大を再現できることを示唆している。

### CoQ10 酸化還元状態の測定系の確立

CoQ10 は呼吸鎖における電子供与体であるだけでなく、細胞死の一種であるフェロトーシスの主要防御系を形成し、CoQ10 の酸化還元状態はミトコンドリアの代謝状態を反映するマーカーである。しかし、これまでミトコンドリア病患者の皮膚繊維芽細胞や iPS 細胞で還元型・酸化型 CoQ10 に着目した報告はない。そこで、将来的に疾患 iPS 細胞や iPS 細胞由来心筋細胞で CoQ10 の酸化還元状態を測定することを目指し、小坂班では、皮膚繊維芽細胞で、還元型・酸化型 CoQ10 を個別に定量する系を構築した。具体的には細胞から CoQ10 を抽出し、重水素で標識した 2H9-CoQ10 を内部標準として、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (HPLC-MS/MS) で測定した。CoQ10 実測値をクエン酸シンターゼ活性量で補正し、総 (還元型+酸化型) CoQ10 値と還元型 CoQ10/総 CoQ10 比を求め、CoQ10 欠乏と細胞内 CoQ10 還元状態を評価した。還元型 CoQ10/総 CoQ10 比について、原発性 CoQ10 欠乏症 (n=5)、複合体 I 異常 (n=7)、複合体IV・V異常 (n=3)、その他のミトコンドリア病 (n=9)、対照 (n=10) において測定した。原発性 CoQ10 欠乏症では、対照と比較して比の変化がみられなかったが (p=0.95)、複合体IV・V異常では比は増加した (p=0.0028)。一方、複合体 I 異常では比が低下した (Watanabe, Mol Genet Metab Rep, 34:e100951, 2023)

### その他

ミトコンドリア病に関する特集号である小児内科「症例から学ぶミトコンドリア病」(第 54 巻第 4 号) および実験医学「ミトコンドリア疾患治療の新時代」(増刊・第 41 巻第 5 号) において、ミトコンドリア病の診断、治療、研究の視点から魚崎、村山、小坂がそれぞれ総説を執筆し、ミトコンドリア研究者だけでなく、小児科医から医学・生物系研究者まで幅広くミトコンドリア病の啓蒙活動に努めた。また、村山、小坂はミトコンドリア病患者会フォーラムなどでの活動を通じて、患者やその家族に対しても診断、治療、研究の現状について継続的に共有している。

### Summary of Project

For this project, we aimed to establish iPS cell lines from mitochondrial cardiomyopathy (MCM) patients to study pathophysiology of the disease. Dr. Murayama led the patient recruitment, biochemical diagnosis, and genetic tests. Overall, genetic tests were completed for 114 patients, including 16 MCM patients. We also reported long-term prognosis of 223 MCM patients (Imai-Okazaki A, Int J Cardiol. 341:48-55.2021).

Dr. Uosaki lead to establish iPS cell lines from fibroblasts of 26 patients and 4 healthy donors and examine their phenotypic analysis in iPS cells and cardiomyocytes. Excluding some lines due to unable to establish, unstable to maintain, or X chromosome inactivation of mutated allele, we established and deposited 68 lines from 23 MCM patients and 12 lines from 4 healthy donors to RIKEN bioresource center.

MCM-iPS cell lines with a few genotypes displayed reduced cumulative cell numbers at 1/10 to 1/100 of healthy lines for 14 days. Among them, we identified a compound that rescue the phenotype of #9. In addition to the reduced cell growth, #9 showed reduced oxygen consumption rate and respiratory chain complex, which were also rescued by the compound.

Eleven out of 12 Healthy iPS cell lines and four out of 68 MCM-iPS lines differentiated to cardiomyocytes at least 10%, suggesting that the mutations related MCM did not affect cardiac differentiation.

To purify cardiomyocytes from many iPS lines with reduced mitochondrial activity simultaneously, we needed a novel method that does not require mitochondrial activity like low glucose metabolic selection method or transgenic/knock-in. To this end, we developed an adeno-associated virus

(AAV) method to transduced cardiac promoter-driven blasticidin resistant gene cassette (Ahmed, J Vis Exp 169:e62129. 2021). With this method, we achieved more than 95% in cardiomyocyte purity. Next, we examined purified MCM-iPS cell-derived cardiomyocytes (MCM-iPSC-CMs). More than half of MCM-iPSC-CMs displayed hypertrophic morphology-increased cell size and multinucleation, which may reflect that majority of MCM patients manifest hypertrophic cardiomyopathy. Moreover, some line displayed disrupted sarcomere patterns. In addition to the morphological changes, their physiological activities were altered. Most notably, hypertrophic cells were unlikely to respond to electrical stimulation in calcium transient experiments.

Although we observed hypertrophic phenotypes in MCM-iPSC-CMs, iPSC-CMs are generally immature in culture, and enhanced maturation may further exaggerate their phenotypes. To this end, we identified nuclear receptor agonist cocktails that induce iPSC-CM maturation in physiological aspects, such as calcium transient and mitochondrial activity. With the maturation culture, we observed elongated morphology in healthy iPSC-CMs, in contrast, MCM-iPSC-CMs from #21 displayed enlarged cell size without elongation and multinucleation-more than 10% of cells had more than 3 nuclei in a single cardiomyocyte, suggesting pathological hypertrophy.

Coenzyme Q10 (CoQ10) is well known for an electron acceptor/donor in respiratory chain complex. It also regulated ferroptosis, a form of cell death, and the oxidative/reductive status is a marker for mitochondria metabolism. Dr. Osaka led to establish a quantitative measurement for total and reductive CoQ10 (Watanabe, Mol Genet Metab Rep, 34:e100951. 2023). Reductive to total CoQ10 ratio was reduced in complex I disease, while it was increased in complex IV and V disease.