

【目的】本研究では、mtDNA の A3243G 変異を有する疾患 iPS 細胞から誘導した骨格筋細胞を用いて、*in vitro* でミトコンドリア機能と骨格筋細胞機能の関連を評価できる系を確立することを目的とする。ミトコンドリア DNA はホストの核 DNA とは異なり、細胞毎にヘテロプラスミーを持ち、その変異率は細胞毎に異なる。我々の以前の検討では、mtDNA の A3243G 変異を有するミトコンドリア病患者の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立した場合、大部分が変異ミトコンドリアで占められる iPS クローンと、変異ミトコンドリアを有さない iPS クローンに二極化する現象を報告している。すなわち、我々は同一の患者より大部分のミトコンドリアが A3243G 変異を持つ iPS クローンと変異ミトコンドリアを検出できない iPS クローンの両者を樹立することに成功している。これら核遺伝子背景は共通しているがミトコンドリア遺伝子異常の有無のみが異なる iPS クローンから誘導した骨格筋細胞を用いて、その細胞機能の違いを比較解析することにより、ミトコンドリア機能が骨格筋細胞機能に及ぼす影響を *in vitro* で詳細に解析する。また、この系を用いて、ミトコンドリア機能低下が骨格筋代謝におよぼす負の影響を治療する薬剤の開発にも応用を目指す。

【方法】2名のミトコンドリア病患者から樹立した Mt1 iPS 細胞、Mt2 iPS 細胞を用い、それぞれ変異が検出されないクローン (Mt1-1、Mt1-2) (Mt2-3、Mt2-8) と変異の比率が 70%を超えるクローン (Mt1-3、Mt1-4) (Mt2-5、Mt2-6) を用いて、解析を行った。骨格筋への誘導は、既報の方法に準じて行った。骨格筋マーカーの蛍光免疫染色および RT-PCR で骨格筋への分化を確認し、XF24 Extracellular Flux Analyzer を用いてミトコンドリア機能の解析を行った。

【結果】Mt1、Mt2、どちらの患者の iPS 細胞から、mtDNA の A3243G 変異の程度に関わらず骨格筋への分化誘導が行えた。誘導した骨格筋細胞においても、Invader アッセイにて変異ミトコンドリアの比率は大きく変化せず、2名の患者より変異 (－) の骨格筋細胞と変異 (＋) の骨格筋細胞を誘導することができた。細胞外フラックスアナライザーを用いた解析にて、変異 (＋) と (－) の骨格筋細胞で Basal OCR、Maximal Respiration、ATP production、Proton Leak などに差異を認めたにもかかわらず、Non-Mitochondrial Oxygen Consumption には差異を認めなかった。今後、両群での糖代謝機能の解析を行い、ミトコンドリア機能が骨格筋の糖代謝機能に与える影響を明らかにする。

本研究の概念図

