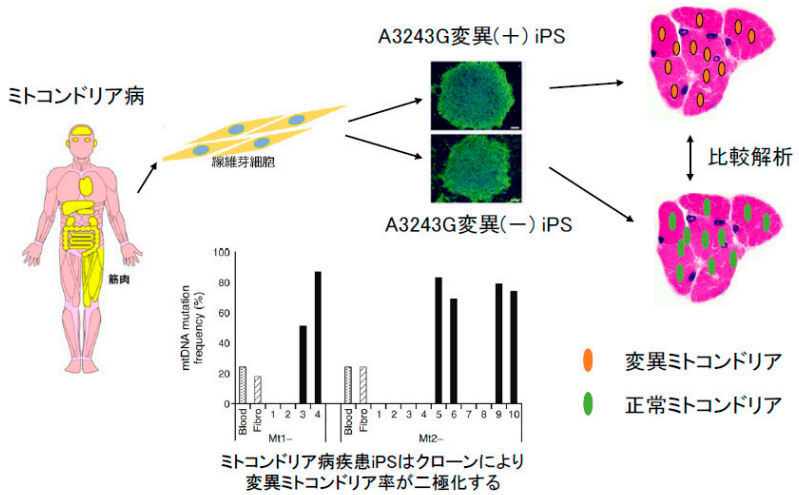
104　疾患iPS細胞を用いた骨格筋のミトコンドリア機能解析	曽根　正勝

【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 細胞からも、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



104. 疾患 iPS 細胞を用いた骨格筋のミトコンドリア機能解析

曽根　正勝

聖マリアンナ医科大学 内科学（代謝・内分泌内科）

Key words：ミトコンドリア，骨格筋，ヒト iPS 細胞

緒　言

ミトコンドリアは真核生物において生体活動に不可欠な代謝とエネルギー産生を担っている細胞内小器官である。ミトコンドリアはブドウ糖・脂肪酸の酸化により ATP を供給し、解糖系、生合成・糖新生、筋収縮、能動輸送、発熱など、生体内の反応系の必須のエネルギー源となる。そのため、ミトコンドリアの機能異常により生じるミトコンドリア病は、中枢神経・骨格筋・心筋・膵β細胞などの好気性代謝によるエネルギーが重要な臓器に様々な異常を生じる。ミトコンドリアの由来は原始地球で酸素を使ってエネルギーを産生する古い好気性細菌の一種であったと考えられており、その当時の酸素を利用できない嫌気性細胞の中に取り込まれた古細菌がミトコンドリアになったとされている。そのために、ミトコンドリアは個々に宿主とは異なる独自のミトコンドリア DNA（mtDNA）を有している。ミトコンドリア蛋白質 のほとんどは核ゲノム由来であるが、13 種類のミトコンドリア蛋白質は mtDNA によってコードされている。ミトコンドリア病には、核 DNA の異常とミトコンドリア DNA（mtDNA）の異常によって起こる場合とがあり、後者については mtDNA の A3243G 変異が最も多く認められ、細胞内に異常ミトコンドリアと正常ミトコンドリアが混在するヘテロプラスミーが認められる。

我々は以前よりヒト ES／iPS 細胞を用いた研究を行ってきており、様々な疾患特異的 iPS 細胞の樹立とその解析に成功している［1〜4］。その中の一つとして、mtDNA の A3243G 変異を有するミトコンドリア病の疾患 iPS 細胞を樹立するのに成功している［1］。一方、骨格筋は、ミトコンドリア病で最も症状が現れやすい臓器の一つであり、代謝面でも重要な働きをしていることが知られている。また、hMyoD1 遺伝子の強制発現系を用いてヒト iPS 細胞から骨格筋を高効率に誘導する方法が、近年、共同研究者である京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）の櫻井英俊らにより確立されている［5］。

そこで、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れば、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* で詳細に解析することができる。また、この系を用いれば、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できると考えられる。

方　法

1. 細胞培養

我々が既報で樹立したミトコンドリア病疾患 iPS 細胞を用いた。患者 1 から樹立した iPS 細胞を Mt1 iPS 細胞、患者 2 より樹立した iPS 細胞を Mt2 iPS 細胞とし、それぞれの Mt1 および Mt2 からクローンを選択した。ミトコンドリア DNA3243 変異解析は、Invader 法を用いた検出法にて測定を行った。iPS 細胞は、iMatrix-511（Matrixome、大阪、日本）でラミニンコートした 6 ウェルプレートを用いて、StemFit AK02N 培地（ReproCELL、横浜、日本）にて培養した。7 日間に 1 度、細胞解離溶液 0.5mM EDTA（PH8.0）により処理を行い、最終濃度 10μM Y-27632（FUJIFILM、日本）を添加した StemFit AK02N 培地で継代を行った。

2. 分化誘導

1μg/μL に調製したプラスミド pHL-EF1a-hcPBase-iP-A、KW879-hMyoD と Opti-MEM を混合した溶液をミトコンドリア異常 iPS 細胞 1×10^6 個に加えて懸濁した。190 V、950μF の条件下でエレクトロポレーション（GenePulser Xcell、BioRad、CA、USA）を行い、Y-27632 を添加した StemFit AK02N 培地入りの 6 ウェルプレート（ラミニンコート済み）に細胞を播種した。翌々日よりピューロマイシン（最終濃度 0.5μg/mL）を含む選択培地に交換し、hiPS-MyoD 細胞を選択・純化した。

10μM Y-27632 を添加した StemFit AK02N 培地入り 6 ウェルプレート（ラミニンコート済み）に hiPS-MyoD 細胞 2.0×10^5 個になるように播種した。翌日、Primate ES 細胞培地（ReproCELL、横浜、日本）に交換し、翌々日、0.3μg/mL doxycycline（DOX、LKT Lab.）入り Primate ES 細胞培地に交換した。更に翌々日に、細胞解離溶液 0.5 mM EDTA（PH 8.0）により 2.0×10^5 個に調製し、Matrigel（BD、New Jersey、USA）でコーティングした 6 ウェルプレートと 24 ウェルプレートに播種を行った。翌々日より 1.0μg/mL doxycycline により 10 日目まで培養し、解析した

3. 免疫染色

骨格筋誘導を行った細胞は 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（FUJIFILM、日本）にて室温で 10 分固定した。PBS で調整した 1% BSA により室温にて 1 時間インキュベートを行い、Anti-Myosin Heavy Chain Mab（MF20；1：200、R&D、Minneapolis、MN）、Anti-Creatine Kinase M、Rabbit-Poly（Y14；1：200、Bioworld、CA、USA）により 4℃で一晩インキュベートを行った。二次抗体は Goat anti-Mouse IgG（H+L）、Alexa Fluor 488（1：500、Thermo Fisher Scientific、MA、USA）および Goat anti-Rabbit IgG（H+L）、Alexa Fluor 488（1：500、Thermo Fisher Scientific、MA、USA）により室温で 1 時間インキュベートを行った。核染色は DAPI（1：10,000、Biotium Inc.、CA、USA）で行った。

4. RT-qPCR 解析

total RNA は TRIzol RNA Isolation Reagents（Thermo Fisher Scientific、MA、USA）により抽出した。更に ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（TOYOBO、大阪、日本）を用いて 100 ng total RNA から cDNA 合成を行った。定量 PCR は TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ（Tli RNaseH Plus）（Takara、Kyoto、Japan）のプロコトールに従い、CKM（forward：5- ACATGGCCAAGGTACTGACC-3、reverse：5-TGATGGGGTCAAAGAGTTCC-3）、MHC（forward：5-GCAGATTGAGCTGGAAAAGG-3、reverse：5-TCAGCTGCTCGATCTCTTCA-3）、myogenin（forward：5-TGGGCGTGTAAGGTGTGTAA-3、reverse：5- CGATGTACTGGATGGCACTG-3）、B-actin（forward：5- CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3、reverse：5- AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3）を測定した。

5. ミトコンドリア機能の解析

OCR（酸素消費速度）の測定は、XF24 Extracellular Flux Analyzer（Seahorse Bioscience、Billerica、MA、USA）を用いて、製造元のプロトコルにしたがって測定した。Matrigel でコーティングした FluxPak-XFe24 アッセイパック（Agilent Technologies、CA、USA）付属の専用プレートに hiPS-MyoD 細胞 0.3×10^5 個になるように播種し、10 日間骨格筋誘導を行った。測定前日に、センサーカートリッジをキャリブラントで水和させた。XF ミトストレスキット（Agilent Technologies、CA、USA）を用いて 2μM Oligomycin（ATP 合成酵素阻害剤）、1.0μM FCCP（脱共役剤）、0.5μM ROT／AA（ミトコンドリア電子伝達系阻害剤）を連続的に添加し OCR を測定した。結果は各ウェル

の総細胞数をカウントし標準化した。

結果および考察

1. 骨格筋の誘導とミトコンドリア変異の解析

骨格筋の誘導は、図 1 の手法で行った。誘導した骨格筋は、図 2 で示すように、MHC（myosin heavy chain）、CKM（muscle-type creatine kinase）陽性で骨格筋特有の形状を示した。分化誘導後のミトコンドリア変異率を invader assay で解析したところ、Mt1-1（1%以下）、Mt1-2（1%以下）、Mt1-3（85%）、Mt1-4（88%）。Mt2-3（1%以下）、Mt2-6（88%）であった。以降の解析では、Mt1-1（1%以下）、Mt1-4（88%）。Mt2-3（1%以下）、Mt2-6（88%）を用いた。

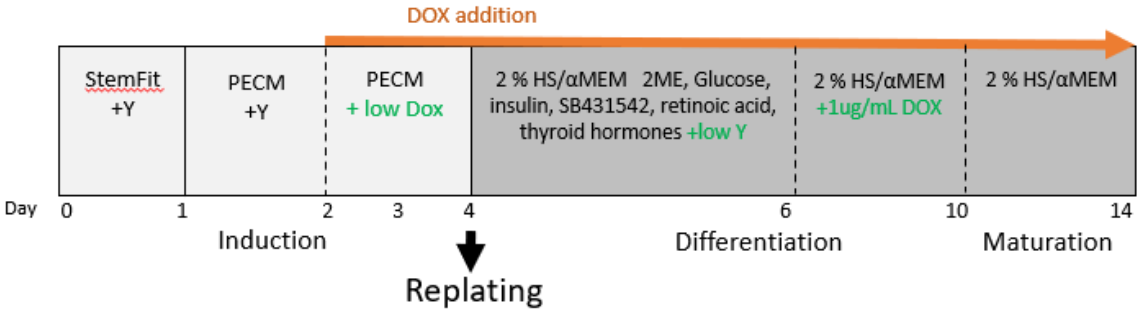


図 1. ヒト iPS 細胞からの骨格筋分化誘導法
骨格筋の分化誘導プロトコルを示す。

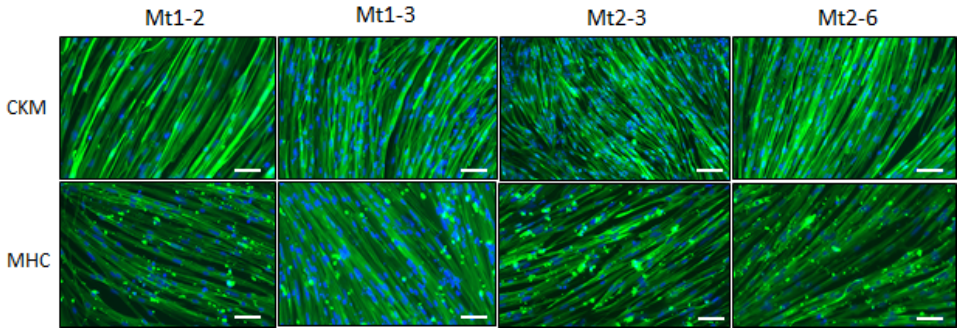


図 2. 誘導骨格筋の免疫染色
上段 CKM（muscle-type creatine kinase）、下段 MHC（myosin heavy chain）（緑）
核染色（青）。Scale bars：100 μm。

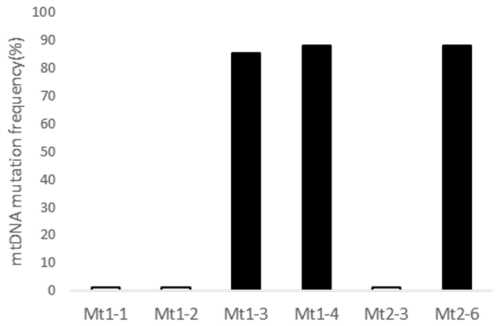


図 3. 誘導骨格筋の変異ミトコンドリア率
mtDNA の A3243G 変異率を invader assay で解析。

2. 誘導骨格筋のミトコンドリア機能の解析

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（−）の骨格筋細胞ではOCRに差異を認めた。Non-Mitochondrial Oxygen Consumptionには明らかな差異を認めなかったが、Basal OCR、Maximal Respiration、ATP production、Proton Leakなどに差異を認めた（図4）。

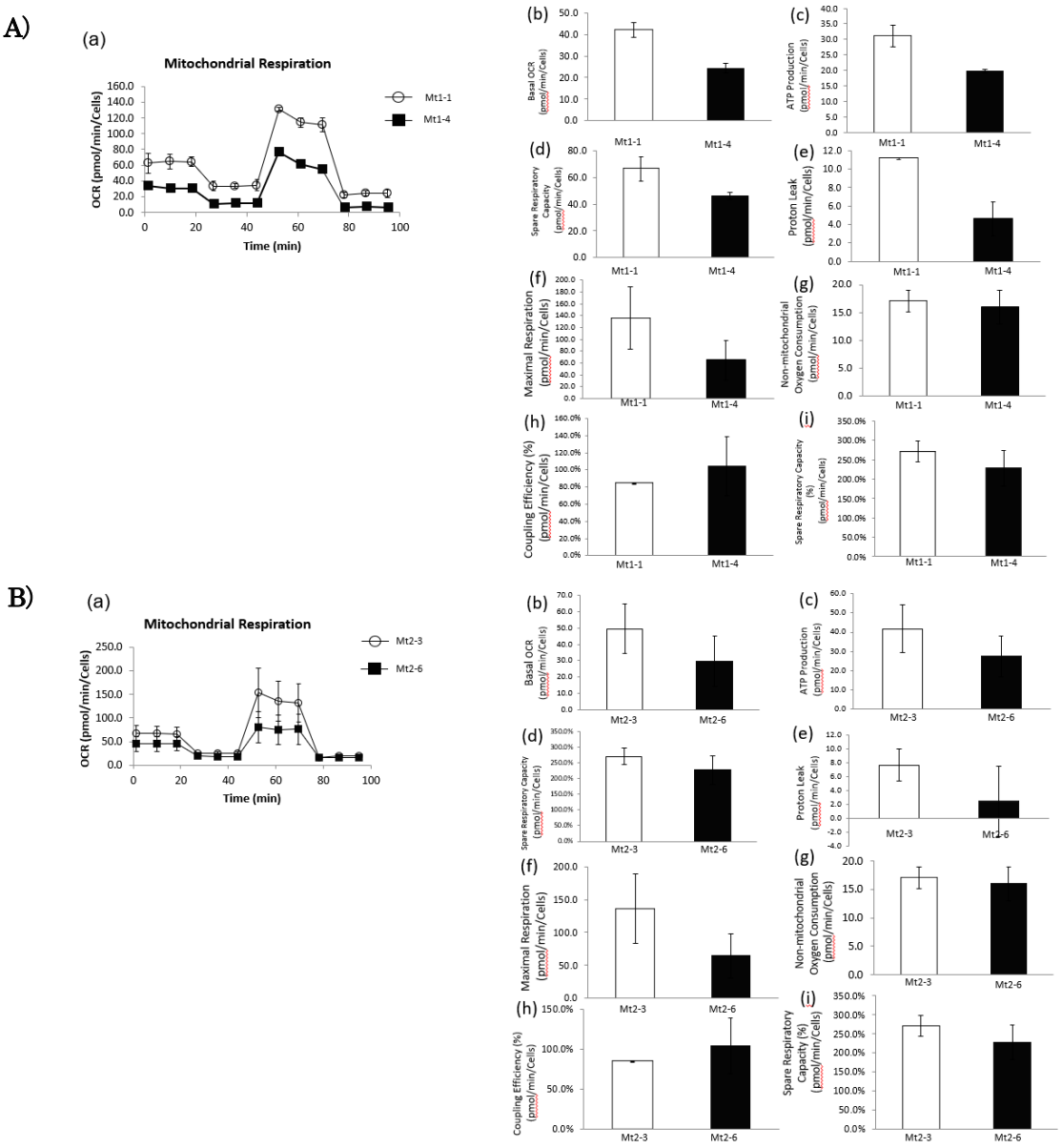


図4. ミトコンドリア機能解析

A） Mt1-1とMt1-4との比較。

B） Mt2-3とMt2-6との比較。

(a) XF24 Extracellular Flux Analyzerによる OCR（酸素消費速度）の測定（time course）、(b) Basal OCR、(c) ATP Production、(d) Spare Respiratory Capacity、(e) Proton Leak、(f) Maximal Respiration、(g) Non-mitochondrial Oxygen Consumption、(h) Coupling Efficiency（%）、(i) Spare Respiratory Capacity（%）。

これまでのところ、実験計画は順調に進行している。今後、両群での糖代謝機能の解析を行い、まずは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していく。

共同研究者・謝辞

本研究は、京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）の櫻井英俊、京都大学糖尿病内分泌栄養内科の藤倉純二などの共同研究者の協力を得て行っている。

文　献

1） 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, Nakao K. Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. Diabetologia. 2012 Jun;55(6):1689-98. doi: 10.1007/s00125-012-2508-2. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22396012

2） Ameku T, Taura D, Sone M, Numata T, Nakamura M, Shiota F, Toyoda T, Matsui S, Araoka T, Yasuno T, Mae S, Kobayashi H, Kondo N, Kitaoka F, Amano N, Arai S, Ichisaka T, Matsuura N, Inoue S, Yamamoto T, Takahashi K, Asaka I, Yamada Y, Ubara Y, Muso E, Fukatsu A, Watanabe A, Sato Y, Nakahata T, Mori Y, Koizumi A, Nakao K, Yamanaka S, Osafune K. Identification of MMP1 as a novel risk factor for intracranial aneurysms in ADPKD using iPSC models. Sci Rep. 2016 Jul 15;6:30013. doi: 10.1038/srep30013. PMID: 27418197

3） Mori E, Fujikura J, Noguchi M, Nakao K, Matsubara M, Sone M, Taura D, Kusakabe T, Ebihara K, Tanaka T, Hosoda K, Takahashi K, Asaka I, Inagaki N, Nakao K. Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutations. Metabolism. 2016 Apr;65(4):543-56. doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.015. Epub 2016 Jan 7 PMID: 26975546

4） Yamamoto Y, Kojima K, Taura D, Sone M, Washida K, Egawa N, Kondo T, Minakawa EN, Tsukita K, Enami T, Tomimoto H, Mizuno T, Kalaria RN, Inagaki N, Takahashi R, Harada-Shiba M, Ihara M, Inoue H. Human iPS cell-derived mural cells as an in vitro model of hereditary cerebral small vessel disease. Mol Brain. 2020 Mar 19;13(1):38. doi: 10.1186/s13041-020-00573-w. PMID: 32188464

5） Shoji E, Woltjen K, Sakurai H. Directed Myogenic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. Methods Mol Biol. 2016;1353:89-99. doi: 10.1007/7651_2015_257. PMID: 25971915