

[PRESS RELEASE]



令和3年5月27日
京都府立医科大学

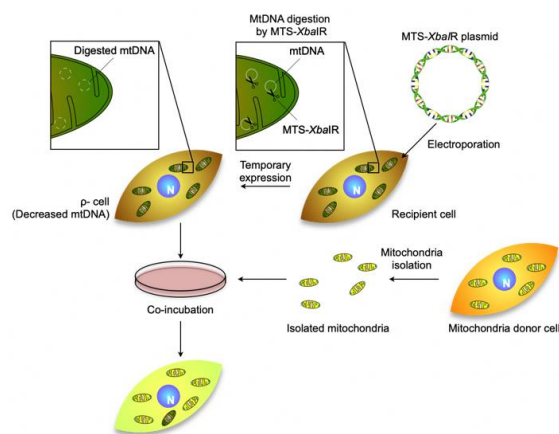
ミトコンドリア機能不全治療に向けた体細胞における ミトコンドリア DNA 置換技術の開発

京都府立医科大学大学院医学研究科 人工臓器・心臓移植再生医学講座 及び 循環器内科学らの研究グループは、体細胞において臨床応用可能な手法を用いて、ミトコンドリア DNA (注1) を置換する技術を開発し、本研究に関する論文が2021年5月25日午前10時(英国時間、日本時間:午後5時)に科学雑誌“Scientific Reports”に掲載されましたので、お知らせを致します。

ミトコンドリア DNA の変異によって起こるミトコンドリア病(注2)は、希少疾患で根治療法はなく進行性の難病であり、治療の開発が切望されていました。本研究は、その原因に直接介入する技術を開発したもので、今後、本技術の臨床応用が期待されます。

本研究成果のポイント

- 特定の遺伝子配列を認識切断する制限酵素を細胞に導入し、ミトコンドリア DNA を減少させ、外来ミトコンドリアを内在化させる技術を開発した。
- 本技術により、内在性ミトコンドリア DNA は外来性ミトコンドリア DNA によって置換され、長期間安定して機能することが確認された。
- ミトコンドリア病患者由来細胞に対し、健常者からの外来ミトコンドリアを用いることで作出されたミトコンドリア DNA 置換細胞は、ミトコンドリア病により失われていた呼吸機能・増殖機能を回復した。
- 外来性ミトコンドリア DNA は細胞内でバクテリア間での水平移行と同様な様式で移動し、外来性ミトコンドリア蛋白成分は分解された。



論文名

Generation of somatic mitochondrial DNA-replaced cells for mitochondrial dysfunction treatment

邦訳: 体細胞ミトコンドリア機能不全に対するミトコンドリア DNA 置換細胞の作出

掲載雑誌

Scientific Reports : 2021年5月25日(火)午前10時(英国時間) オンライン速報版

参照 URL: www.nature.com/articles/s41598-021-90316-1

研究背景

ミトコンドリアは全ての細胞に存在するエネルギー供給器官として広く認識されていますが、細胞死を支配し、炎症・免疫のハブとしての役割を果たす等の機能を通して様々な疾患に関与しています。細胞内小器官で唯一遺伝情報：ミトコンドリア DNA を有しており、この遺伝情報の変異は重篤な機能不全：ミトコンドリア病を引き起こします。変異部位によって様々な症候群を有しており、その経過・予後すら十分に予測できない希少難病であり、現在まで、ミトコンドリア病には根治療法は存在していません。

研究内容

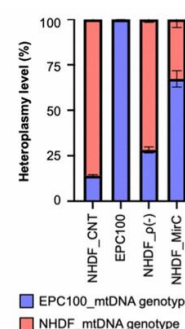
1) ヒト線維芽細胞を用いたミトコンドリア DNA 置換細胞(Mitochondrial DNA-Replaced Cells: MirCs)の作出

ヒト線維芽細胞にミトコンドリア DNA の特定の配列を認識して切断する制限酵素と細胞内に存在するとミトコンドリアに運搬されるタンパク配列を融合したタンパク質をコードする遺伝子配列を導入することで、ミトコンドリア DNA を削減した。これにより、細胞は食食能を亢進し、外来性単離ミトコンドリアの共培養による内在化を、今までの方法では実現することが出来なかったレベルにまで向上させることができた。

加えて、内在するミトコンドリアには外来性ミトコンドリア DNA を受け入れるニッチが形成され、短期間でミトコンドリア DNA が元来の量に回復し、そのほとんどが外来性に由来する DNA で占められた(図 1: NHDF; 正常ヒト皮膚線維芽細胞; レシピエントとして使用、EPC100: ヒト株化細胞; ミトコンドリアドナーとして使用)。当該細胞をミトコンドリア DNA 置換細胞 Mitochondrial DNA-Replaced Cells: MirCs と呼称することとした。

作出された MirCs は、ミトコンドリア DNA 削減により低下した増殖能力及び呼吸機能を回復することが認められた。

図 1



2) ミトコンドリア病患者由来線維芽細胞を用いた MirCs はミトコンドリア呼吸機能を回復した

ミトコンドリア DNA がコードする呼吸鎖複合体 I (注 3) に変異を有するミトコンドリア病患者由来皮膚線維芽細胞を用いて、変異を持たない細胞からの単離ミトコンドリアをドナーとして MirCs を作成した。細胞のミトコンドリア DNA の変異を有している割合：ヘテロプラスミー (注 4) は 90%以上であったが、健全なミトコンドリア DNA が 75%を占めるほどに置換された。MirCs の増殖停止までの期間は、分裂回数にしてほぼ 2 倍に延長していた (図 2: DT: 倍化時間、PDL: 累積倍化数、 $\rho(-)$: ミトコンドリア DNA を削減した細胞)。

MirCs はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の機能不全が、ミトコンドリアドナー細胞に匹敵する位に改善した。加えて、オリジナルの細胞では自然免疫に深く関与している炎症性サイトカインが上昇しているが、MirCs は健常者の線維芽細胞と差がないレベルにまで低下した (図 3: 左図 7S CNT: ミトコンドリア病患者細胞、右図 IL-6: インターロイキン-6)。

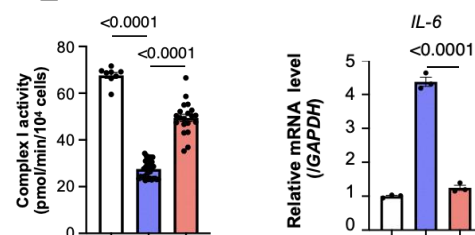
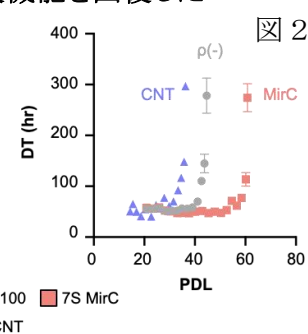


図 3

3) 外来性ミトコンドリア DNA は長期に渡ってヘテロプラスミーを変化させず機能した

生殖補助医療において、第三者からのミトコンドリアでミトコンドリア病の発症を予防できることが示されているが、残存する数少ない内在性ミトコンドリア DNA が再び優勢となるほどにヘテロプラスミーを変化させる現象：

Reversion が、懸念材料である。

ミトコンドリア病患者由来細胞からの健常ミトコンドリア DNA で置換した MirCs を用いて、iPS 細胞を作成し半年に及ぶ長期間培養を行なったところ、ヘテロプラスミーは変化せず安定していた (図 4: 作出された iPS におけるヘテロプラスミー)。このことは、この研究で確立した体細胞におけるミトコンドリア DNA 置換技術は、Reversion が起こらないことを示唆するものである。

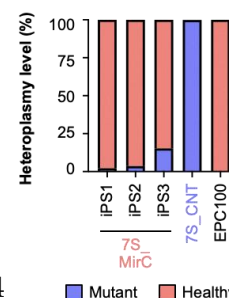


図 4

4) ヒト細胞内での遺伝子の水平移動

MirCs 作出の中で、ミトコンドリア DNA がどのように細胞内に生着するのかを確認するために、外来ミトコンドリアのタンパク成分及びミトコンドリア DNA と複合体を形成している蛋白成分に蛍光標識を行ない、超精細顕微鏡で経時的に観察をした。外来ミトコンドリアは内在ミトコンドリアと短時間接触し、ミトコンドリア DNA は内在ミトコンドリアにこの接触時に移動する。ミトコンドリア DNA を失った外来ミトコンドリアは短時間で崩壊することを確認した。

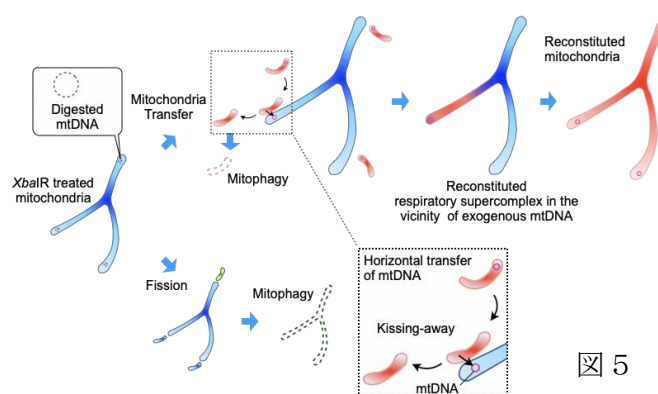


図 5

この Kissing-Away の如き現象は、原核生物における遺伝子水平移行が真核生物の細胞質内で起こっている現象と思われる (図 5: 概念図)。

まとめと今後の展開

今回の研究は、ミトコンドリア DNA 変異によるミトコンドリア病の根治治療の構築につながる可能性があると考えています。本成果は 2019 年 8 月に国際特許に出願・登録され、共同研究を行なっているボストンの Imel Biotherapeutics, Inc.により、ミトコンドリア病患者への臨床試験が計画されています。

加えて、ミトコンドリアは免疫老化と極めて深い関係にあり、本技術は T 細胞へ応用できることは既に第三者により再現性が確認され、GMP 対応 SOP は作成済みです。現在、Imel Biotherapeutics, Inc.の子会社として Imel Therapeutics Japan によって、免疫疾患・癌治療への展開が計画されています。

研究グループ

京都府立医科大学 大学院医学研究科

人工臓器・心臓移植再生医学講座 教授 五條理志、講師 上大介

循環器内科学

研修員 前田英貴、前田遼太郎、大学院生 志熊明

用語説明

注1：ミトコンドリア DNA

細胞内小器官で唯一遺伝情報を有しているミトコンドリアの内部に存在する環状で 16.6 k塩基対の大きさのゲノムです。重要な呼吸鎖構成タンパク質やリボソーム RNA やトランスファーRNA はミトコンドリア DNA によってコードされています。

注2：ミトコンドリア病

ミトコンドリアを構成するタンパク質は核とミトコンドリア DNA にコードされていますが、どちらの変異によってもミトコンドリアの機能異常が生じ、その病態をミトコンドリア病と総称します。その病態は極めて多彩で、今まではミトコンドリア代謝に介入することで病態を改善しようとする試みが行われてきましたが、根治療法の戦略はありませんでした。核にコードされているタンパク質に関しては、遺伝子治療が今後の選択肢になると考えられていますが、ミトコンドリア DNA にコードされているものに関しては選択肢もない状態でした。

注3：呼吸鎖複合体

酸素とミトコンドリア内膜の電位差・水素濃度勾配を利用して生体内エネルギーの供給体である ATP を産生するための巨大な蛋白複合体です。この複合体が機能不全に陥ること、活性酸素が過剰な酸化反応、炎症反応の惹起を引き起こします。

注4：ヘテロプラスミー

細胞の中のミトコンドリアは、その名(糸と顆粒)が示す通り、ネットワークを形成して複数のミトコンドリア DNA を有しています。そのゲノムは均一ではなく異質性を持っており、病的な変異を有するミトコンドリア DNA の割合をヘテロプラスミート呼びます。

【お問い合わせ先】

京都府立医科大学 大学院医学研究科人工臓器・心臓移植再生医学講座 五條理志
E-mail : gojos@koto.kpu-m.ac.jp

【広報関係】

事務局企画広報課 土屋
電話 : 075-251-5804 E-mail : kouhou@koto.kpu-m.ac.jp