



Title	ミトコンドリア活性化ヒト心筋前駆細胞を用いた細胞移植療法の確立
Author(s)	白石, 真大
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15897号
Issue Date	2024-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k15897
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/92099
Type	theses (doctoral)
File Information	SHIRAISHI_Masahiro.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

ミトコンドリア活性化ヒト心筋前駆細胞を用いた
細胞移植療法の確立

(Human cardiosphere-derived cells with activated mitochondria
for better myocardial regenerative therapy)

2024年3月

北海道大学

白石真大

学位論文

ミトコンドリア活性化ヒト心筋前駆細胞を用いた
細胞移植療法の確立

(Human cardiosphere-derived cells with activated mitochondria
for better myocardial regenerative therapy)

2024年3月

北海道大学

白石真大

目次

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
要旨.....	3
略語表.....	5
緒言.....	9
方法.....	15
1. 実験試薬・材料.....	16
細胞培養関連.....	16
粒子調製関連.....	16
顕微鏡関連.....	17
酸素消費速度関連.....	17
動物実験関連.....	17
その他.....	18
2. 実験機器.....	19
細胞培養関連.....	19
粒子調製関連.....	19
顕微鏡関連.....	19
測定機器関連.....	19
動物実験関連.....	19
その他.....	19
3. 試薬調製.....	21
細胞培養関連.....	21
粒子調製関連.....	21
酸素消費速度関連.....	22
その他.....	22
4. 実験操作・方法.....	23
細胞培養関連.....	23
粒子調製関連.....	26
フローサイトメトリー関連.....	26
顕微鏡関連.....	27
酸素消費速度測定関連.....	27
H ₂ O ₂ 負荷による酸化ストレス耐性評価関連.....	28
動物実験関連.....	29
メタボローム解析関連.....	31

結果.....	33
1. MITO-Porter(CoQ ₁₀)の調製および細胞への投与.....	34
1-1. MITO-Porter(CoQ ₁₀)の調製	34
1-2. MITO-Porter(CoQ ₁₀)の細胞取り込み解析	36
1-3. MITO-Porter(CoQ ₁₀)の細胞内動態評価	38
2. ヒト由来 MITO cell(CoQ ₁₀)の機能評価.....	40
2-1. ヒト由来 MITO cell(CoQ ₁₀)のミトコンドリア機能解析.....	40
2-2. ヒト由来 MITO cell(CoQ ₁₀)の酸化ストレス耐性評価.....	42
3. ヒト由来 MITO cell(CoQ ₁₀)の治療効果検証.....	44
3-1. ヒト由来 MITO cell(CoQ ₁₀)心筋内投与による治療効果の検証.....	44
3-2. ヒト由来 MITO cell(CoQ ₁₀)静脈内投与による治療効果の検証.....	46
4. ヒト由来 MITO cell(CoQ ₁₀)投与による心筋メタボローム解析.....	50
4-1. ヒト由来 MITO cell(CoQ ₁₀)心筋内投与による心筋メタボローム解析.....	50
4-2. ヒト由来 MITO cell(CoQ ₁₀)静脈内投与による心筋メタボローム解析.....	52
4-3. 補足データ.....	54
考察.....	55
結論.....	61
謝辞.....	63
利益相反.....	65
引用文献.....	67

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Masahiro Shiraishi, Daisuke Sasaki, Mitsue Hibino, Atsuhito Takeda, Hideyoshi Harashima, Yuma Yamada

“Human cardiosphere-derived cells with activated mitochondria for better myocardial regenerative therapy”

Journal of Controlled Release. 2024 Feb 3; 367:486-499. (online ahead of print)

DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.01.058

本研究の一部は以下の学会で発表した。

白石真大、山田勇磨、佐々木大輔、日比野光恵、真栄城正寿、渡慶次学、武田充人、原島秀吉

「ミトコンドリア活性化ヒト由来心筋幹細胞を用いた細胞移植療法の検証」

第 38 回 日本 DDS 学会学術集会 2022/6/29-30 (web)

白石真大、山田勇磨、佐々木大輔、武田充人、原島秀吉

「ミトコンドリア活性化心筋幹細胞移植療法の臨床応用に向けた取り組み」

第 58 回日本小児循環器学会学術集会 2022/7/21-23 (札幌)

白石真大、山田勇磨、佐々木大輔、日比野光恵、武田充人、原島秀吉

「心筋再生治療用ミトコンドリア活性化ヒト由来心筋幹細胞の開発」

遺伝子・デリバリー研究会 第 21 回シンポジウム 2022/8/25 (東京)

白石真大、山田勇磨、佐々木大輔、日比野光恵、武田充人、原島秀吉

「ミトコンドリア活性化ヒト由来心筋幹細胞を用いた心筋再生治療の検討」

第 43 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2022/10/6-7 (札幌)

Masahiro Shiraishi, Daisuke Sasaki, Atsuhito Takeda, Mitsue Hibino, Hideyoshi Harashima, Yuma Yamada

“Human cardiosphere-derived cells with activated mitochondria for better myocardial regenerative therapy”

56th Annual Meeting of the Association for European Pediatric and Congenital Cardiology (2023/4/26-29 Dublin, Ireland), Young Investigator Award Session

白石真大、佐々木大輔、日比野光恵、武田充人、原島秀吉、山田勇磨
「抗酸化能を有した心筋再生治療用ミトコンドリア活性化ヒト由来心筋前駆細胞の開発」
第 76 回日本酸化ストレス学会学術集会 2023/5/24-25 (神戸)

Masahiro Shiraishi, Daisuke Sasaki, Atsuhito Takeda, Mitsue Hibino, Hideyoshi Harashima, Yuma Yamada
“Myocardial regeneration therapy using human cardiosphere-derived cells with activated mitochondria”
Euromit 2023 (2023/6/11-15 Bologna, Italy), Poster

白石真大、佐々木大輔、日比野光恵、武田充人、原島秀吉、山田勇磨
「メタボローム解析を用いたミトコンドリア活性化ヒト心筋前駆細胞移植療法の効果検証」
第 59 回日本小児循環器学会総会・学術集会 (2023/7/6-8 横浜)
シンポジウム 12 オミックス解析がもたらす小児心血管疾患研究の新たな展開

要旨

【背景と目的】細胞移植療法は心筋再生医療の選択肢として期待されている。しかし、その臨床応用には、治療効果を向上させる必要性、治療効果発現のメカニズムの解明、治療にどの細胞を使用すべきかなど、多くの課題がある。我々は細胞移植療法の治療効果を高めるため、移植用心筋前駆細胞のミトコンドリア機能を高める培養液添加剤の開発を進めている。これまでにミトコンドリア標的薬物送達システム(MITO-Porter システム)を用いて、ミトコンドリア活性化分子をマウス由来の心筋前駆細胞に送達することに成功している。マウス由来のミトコンドリア機能を活性化させた移植用細胞(MITO cell)はドキシソルビシン心筋症および虚血再灌流モデルマウスに対する心不全発症の予防および治療効果を認めた。本研究では MITO-Porter のヒトへの臨床応用を目指し、ヒト由来心筋前駆細胞のミトコンドリア機能を活性化できるかどうかを検討した。さらに、臨床応用において重要な MITO cell の最適な投与経路(心筋内投与、静脈内投与)についても検討した。

【材料と方法】ヒト心筋前駆細胞は先天性心疾患根治術時の切除心筋から単離し、MITO cell の調製に用いた。MITO-Porter に搭載するミトコンドリア活性化分子には抗酸化物質・ミトコンドリア電子伝達系補酵素である coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀)を選択し、ヒト心筋前駆細胞の血清含有培養液に CoQ₁₀ を封入した MITO-Porter(CoQ₁₀)を添加した。MITO-Porter(CoQ₁₀)のヒト心筋前駆細胞への細胞取り込みについてフローサイトメーターを用いて解析した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて MITO-Porter(CoQ₁₀)の細胞内動態を評価した。続いて細胞外フラックスアナライザーで測定した酸素消費速度をもとに細胞のミトコンドリア機能を評価した。細胞機能の評価として過酸化水素負荷に対する活性酸素の発生も評価した。また、心筋虚血再灌流モデルラットを作成し、未処理のヒト心筋前駆細胞移植群とヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)移植群での治療効果を心筋内投与および静脈内投与で比較した。さらに、作用機序の解析のため細胞移植をした心筋のメタボローム解析を行った。

【結果】フローサイトメーターで評価したところ MITO-Porter(CoQ₁₀)はヒト心筋前駆細胞に取り込まれていた。MITO-Porter(CoQ₁₀)の投与時間を変えて取り込み量を評価したところ、取り込み量は投与 24 時間で最大となった。さらに MITO-Porter(CoQ₁₀)投与 24 時間の条件で共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内動態を評価したところ、MITO-Porter(CoQ₁₀)はヒト心筋前駆細胞のミトコンドリアと共局在していた。細胞外フラックスアナライザーの評価ではヒト心筋前駆細胞のミトコンドリア機能は MITO-Porter(CoQ₁₀)投与 24 時間で活性化された。さらに

ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)は過酸化水素暴露に対して、細胞内の活性酸素産生を抑制した。心筋虚血再灌流モデルラットにヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を移植して治療効果を調べたところ、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)は従来の細胞移植と比較して心機能の改善と心筋線維化の抑制を示した。それらの治療効果は、心筋内投与だけでなく静脈内投与でも観察された。また細胞移植後 4 週の心筋をメタボローム解析したところ、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の心筋内投与では従来の細胞移植と比較して TCA サイクルに関連するアミノ酸合成が亢進し、解糖系代謝産物の濃度も高かった。しかし、それらの心筋代謝変化は、静脈内投与では観察されなかった。

【考察】ヒト心筋前駆細胞のミトコンドリア機能は、血清含有培養液に MITO-Porter(CoQ₁₀)を 24 時間投与することで活性化された。細胞への過酸化水素負荷の結果に基づく、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)は、ミトコンドリア損傷により活性酸素が生成される心不全や虚血再灌流環境下においても、生存率が向上する可能性が示唆された。心筋虚血再灌流モデルラットにヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を移植すると、心筋内投与だけでなく静脈内投与でも心機能の改善と心筋線維化の抑制が認められた。これらの結果は、移植細胞から分泌されるパラクラインまたはエンドクライン因子が特定の治療効果を達成するために重要であるという仮説を裏付けており、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)におけるミトコンドリア機能の活性化がパラクライン効果の強化に寄与していることが示唆された。もう一つの可能性は、移植細胞のミトコンドリアが損傷した組織細胞に移動して細胞内環境を調整するミトコンドリアトランスファーである。ミトコンドリアトランスファーが起こったとすると、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の活性化されたミトコンドリアが損傷した細胞に対してより高い治療効果を示した可能性がある。メタボローム解析の結果からは、心筋が障害された急性期にヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を心筋内投与すると、慢性期においても心筋が TCA サイクルを効果的に利用できる可能性が示唆された。一方でヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の静脈内投与は心筋の代謝動態に影響を与えなかった。これは移植細胞の投与経路により作用機序が異なる可能性を示唆しており、静脈内投与はパラクライン効果によって心機能の低下を抑制する一方、心筋内投与はパラクライン効果に加えてミトコンドリアトランスファーを引き起こし、心筋代謝を変化させた可能性がある。

【結論】

ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の心筋内投与は、従来の細胞移植に比べ心機能を改善し、心筋線維化を抑制した。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)は静脈内投与でも同様の効果を示した。本研究は、機能性化合物のミトコンドリア送達が生体心筋前駆細胞移植治療の成績向上に寄与することを検証した初めての試みである。

略語表

略語表

ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CDC	cardiosphere-derived cell
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CoQ ₁₀	coenzyme Q ₁₀
COX1	cytochrome c oxidase 1
DDW	deionized distilled water
DHE	dihydroethidium
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMG-PEG2000	1,2-dimyristoyl-rac-glycerol, methoxy polyethylene glycol 2000
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylethanolamine
EF	ejection fraction
EGF	endothelial growth factor
ESRR α	estrogen related receptor α
EtOH	ethanol
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum
FCCP	carbonylcyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine
FGF-2	fibroblast growth factor-2
FS	fractional shortening
HE	hematoxylin-eosin
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HMT	human metabolome technologies
iPSC	induced pluripotent stem cell
LAD	left anterior descending coronary artery
LP	liposome
LVAWd	left ventricular diastolic anterior wall diameter
LVDd	left ventricular end-diastolic diameter
LVDs	left ventricular end-systolic diameter
LVPWd	left ventricular diastolic posterior wall diameter
NBD-DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazole-4-yl)
OCR	oxygen consumption rate

OXPHOS	oxidative phosphorylation
PBS	phosphate-buffered saline
PDI	polydispersity index
PGC1 α	peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α
PVC	premature ventricular contraction
RES	resveratrol
RET	reverse electron transport
ROS	reactive oxygen species
SDH	succinate dehydrogenase
SDHA	succinate dehydrogenase complex subunit A
SM	sphingomyelin
STR-R8	stearylated octaarginine
TCA	tricarboxylic acid
VF	ventricular fibrillation
VT	ventricular tachycardia
5-ALA	5-aminolevulinic acid

緒言

緒言

「心不全」は「なんらかの心臓機能障害、すなわち心臓に器質的および/あるいは機能的異常が生じて心ポンプ機能の代償機転が破綻した結果、呼吸困難・倦怠感や浮腫が出現し、それに伴い運動耐容能が低下する臨床症候群」と定義される(筒井ほか, 2017; 筒井ほか, 2021)。心不全は発症すると増悪・寛解を繰り返しながら徐々に重症化する経過をたどる。重度心不全患者への薬物治療は限定的な効果しか示すことができないのが現状であり、薬物治療以外の新たな治療戦略が必要とされる(Eschenhagen et al, 2017; Fernandez-Aviles et al, 2017)。細胞移植療法は心不全に対する有望な治療法として、障害心筋の再生効果が期待されている。しかし、その開発は、治療効果を向上させる必要性、治療効果発現のメカニズムの解明、治療にどの細胞を使用すべきかなど、多くの問題に直面している(Banerjee et al, 2018; Wysoczynki et al, 2018; Bolli et al, 2022)。

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS 細胞)は細胞移植に応用されており、心筋再生用細胞への応用が期待されている(Yoshida and Yamanaka, 2017)。未分化 iPS 細胞は主に解糖代謝経路を通じてエネルギーを生成するが、心筋細胞は発達したミトコンドリアトリカルボン酸(tricarboxylic acid: TCA)サイクルを効率的に利用して、酸化リン酸化(oxidative phosphorylation: OXPHOS)を介して大量の ATP を生成する(Tohyama et al, 2013)。したがって、心筋細胞のエネルギー代謝を考慮した培養液を調整することで iPS 細胞から未分化細胞の増殖を抑制し心筋細胞の精製を行うことや、iPS 細胞由来心筋細胞の機能を強化することが可能であると報告されている(Tohyama et al, 2013; Feyen et al, 2020)。

我々はこの心筋細胞のエネルギー代謝に着目し、心筋細胞のミトコンドリア機能を活性化する培養液添加剤を開発できれば、細胞移植療法の治療効果向上につながると思った。これまでに、ミトコンドリア標的薬物送達システム(MITO-Porter システム)を用いて、マウス由来の心臓前駆細胞にミトコンドリア活性化分子を送達することに成功している(Abe et al, 2018; Sasaki et al, 2022)。ミトコンドリア活性化マウス由来心臓前駆細胞(マウス由来 MITO cell)の心筋注射は、従来の細胞移植と比較して、ドキシソルビシン心筋症モデルマウスにおいて心不全発症の予防効果を示し(Abe et al, 2018)、心筋虚血再灌流モデルマウスにおいて心不全の治療効果を認めた(Sasaki et al, 2022)。

本研究では、MITO-Porter のヒトへの臨床応用を目指し、MITO-Porter を用いてヒト由来の心筋前駆細胞(cardiosphere-derived cell: CDC)のミトコンドリア機能を活性化できるかどうかを検討した。ヒト由来心筋前駆細胞は先天性心疾患の手術中に切除された余剰心筋から単離した(臨床研究番号 016-0507、北海道大

学病院) (図 1A)。心筋をコラゲナーゼで処理し、遠心分離によって心筋前駆細胞を単離し、続いてヒト FGF-2(fibroblast growth factor-2) およびヒト EGF(endothelial growth factor)とともに培養。約 2 週間培養後、cardiosphere の形成を確認した(図 1B)。細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで分析したところ(図 1C)、精製された細胞は CD105/CD90/CD73/CD71 に対して陽性、c-kit/CD45/CD34/CD-31 に対して陰性であり、報告されているヒト心筋前駆細胞の表現型と一致していた(Tateishi et al, 2007)。

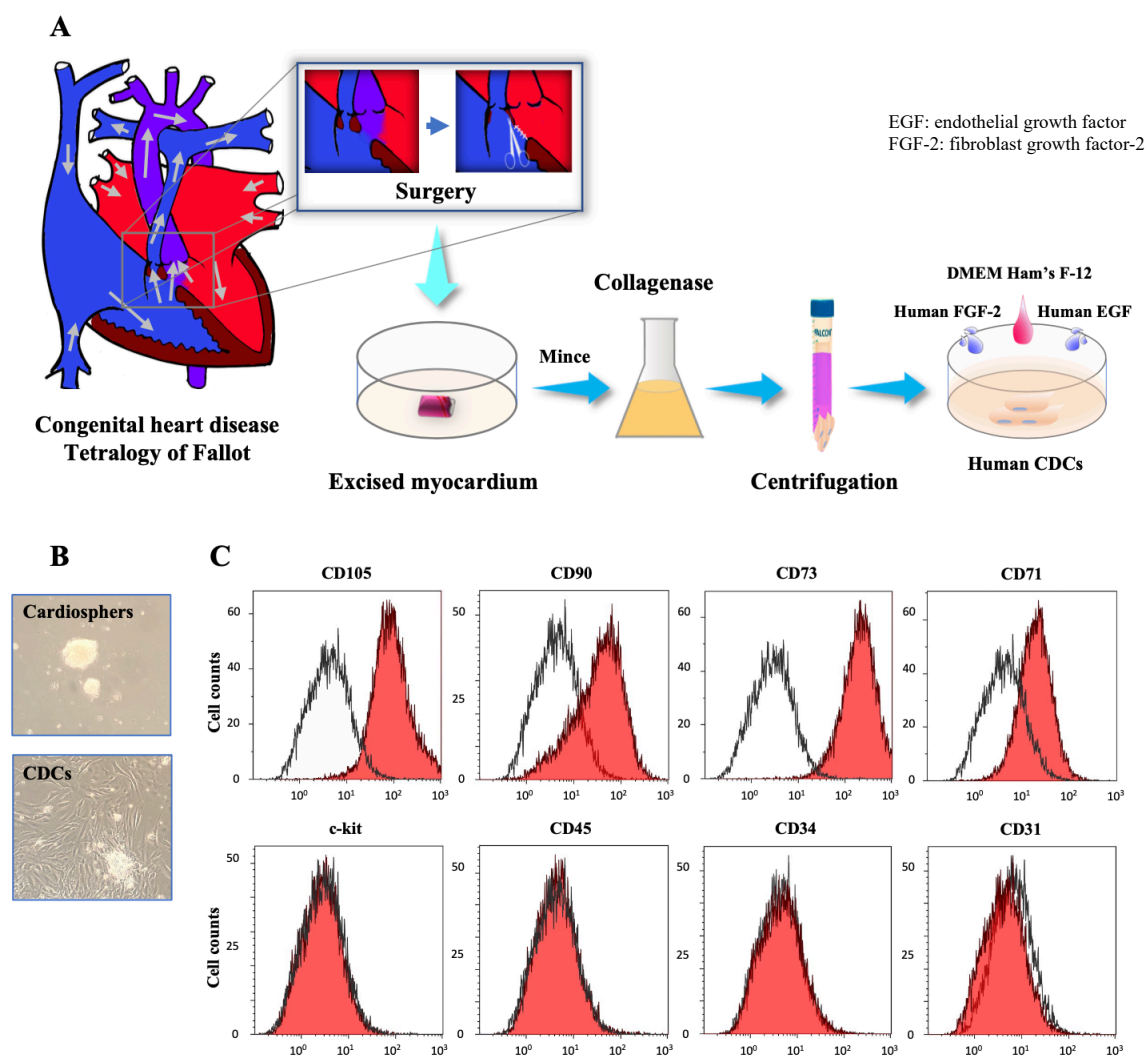


図 1 ヒト心筋前駆細胞の単離と培養

本研究の概略図を図 2 に示す。ミトコンドリア活性化分子には抗酸化物質でありミトコンドリア電子伝達系の補酵素である coenzyme Q₁₀(CoQ₁₀)を選択した。

CoQ₁₀ をヒト心筋前駆細胞のミトコンドリアに送達し、細胞移植用のヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を調製。調製したヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を虚血再灌流モデルラットに投与し、治療効果を体重変化、心機能、心筋線維化および心筋メタボローム解析を用いて評価した。

まず初めに、MITO-Porter(CoQ₁₀) (Hibino et al, 2019)のヒト心筋前駆細胞への細胞取り込みについて MITO-Porter(CoQ₁₀)を蛍光標識し、フローサイトメーターを用いて解析した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて MITO-Porter(CoQ₁₀)がヒト心筋前駆細胞のミトコンドリアに送達されているかを評価した。

次に、MITO-Porter(CoQ₁₀)を用いてヒト心筋前駆細胞のミトコンドリア機能を活性化できるかを検討した。ミトコンドリア機能の指標である酸素消費速度(oxygen consumption rate: OCR)に基づいて、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を調製するプロトコール(曝露時間、培養条件)の最適化を目指した。また、調製した MITO cell(CoQ₁₀)に過酸化水素(H₂O₂)を投与し、酸化ストレスへの耐性を評価した。

さらに心筋虚血再灌流モデルラットに対するヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を用いた細胞移植療法の治療効果を検証した。臨床応用において重要な MITO cell の最適投与経路(心筋内投与、静脈内投与)についても検討した。

最後にヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の移植によって誘発される心筋代謝変化をメタボローム解析で評価した。心不全慢性期における心筋代謝変化を評価するために、細胞移植後 4 週間の心筋を用いてメタボローム解析を実施した。慢性心不全の心筋では代謝変化が起きており、これらの代謝変化を詳細に特定することは治療効果のメカニズムの検証につながると考えた。

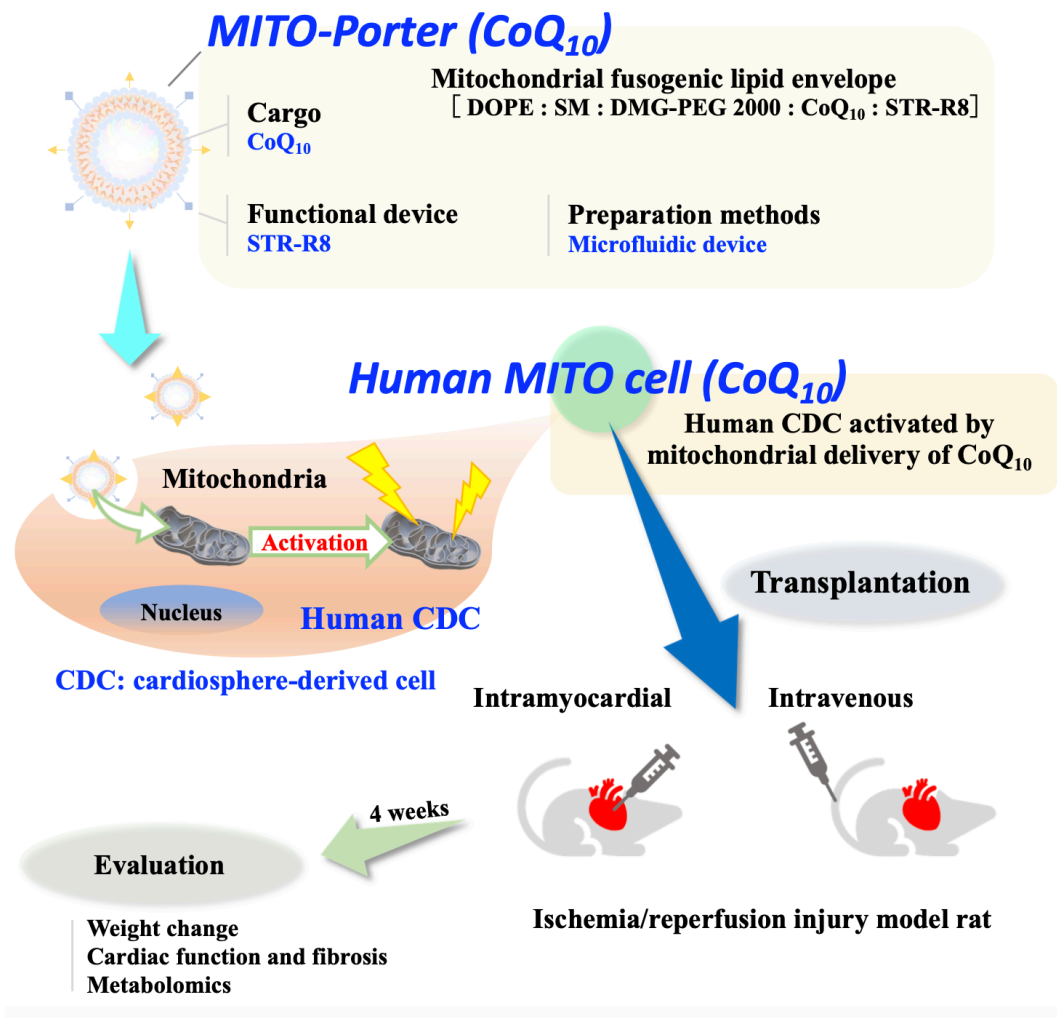


图 2 实验概略图

方法

1. 実験試薬・材料

細胞培養関連

DMEM Ham's F-12	ナカライテスク (Kyoto, Japan)
FBS	SIGMA-ALDRICH (St, Louis, MO, USA)
ペニシリン G カリウム	明治製菓株式会社 (Tokyo, Japan)
硫酸ストレプトマイシン	明治製菓株式会社 (Tokyo, Japan)
0.25% Trypsin	Gibco (Massachusetts, USA)
PBS	TAKARA Bio Inc. (Shiga, Japan)
HEPES	Dojindo Laboratories
PBS	TAKARA Bio Inc.
Human FGF-2	R&D System (Minneapolis, USA)
Human EGF	R&D System (Minneapolis, USA)
3.5 cm glass bottom dish	IWAKI (Tokyo, Japan)
10 cm dish	Corning (NY, USA)
6 well plate	Corning (NY, USA)
96 well plate	Corning (NY, USA)
15 cm dish	Thermo Fisher SCIENTIFIC (Massachusetts, USA)

粒子調製関連

DOPE	日油株式会社 (Tokyo, Japan)
SM	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
Ethanol	ナカライテスク (Kyoto, Japan)
HEPES	同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan)
STR-R8	TORAY (Tokyo, Japan)
DMG-PEG 2k	NOF Co. (NY, USA)
CoQ ₁₀	富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan)
DiI	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
ハミルトンガスタイトシリンジ (1000 シリーズ)	Hamilton Company (Nevada, USA)
シリンジ用コネクター	マイクロ化学技研 (Kanagawa, Japan)
Spectra/Por4 dialysis membrane (MWCO 12k-14k)	Spectrum Laboratories (CA, USA)
Spectra/Por closures	Spectrum Laboratories (CA, USA)

顕微鏡関連

Mito Tracker Deep Red FM	Invitrogen molecular probes (Oregon, USA)
NBD-DOPE	Invitrogen molecular probes (Oregon, USA)
DHE	Invitrogen molecular probes (Oregon, USA)

酸素消費速度関連

Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Primetech Co. (Tokyo, Japan)
FluxPak-XFp 用	Primetech Co. (Tokyo, Japan)
XF 用 DMEM 培地	Primetech Co. (Tokyo, Japan)
XF 1.0 M グルコース溶液	Primetech Co. (Tokyo, Japan)
XF 100 mM ピルビン酸塩溶液	Primetech Co. (Tokyo, Japan)
XF 200 mM グルタミン溶液	Primetech Co. (Tokyo, Japan)

動物実験関連

Slc: Wister ラット(雄性, 9 週齢)	日本 SLC 株式会社 (Shizuoka, Japan)
塩酸メデトミジン	共立製薬株式会社 (Tokyo, Japan)
ミダゾラム(10 mg)	サンド株式会社 (Tokyo, Japan)
酒石酸ブトルファノール	明治製菓株式会社 (Tokyo, Japan)
生理食塩水	扶桑薬品株式会社 (Osaka, Japan)
固形飼料 MF	オリエンタル酵母工業株式会社 (Tokyo, Japan)
パルソフト	オリエンタル酵母工業株式会社 (Tokyo, Japan)
リドカイン(2%シリンジ)	テルモ株式会社 (Tokyo, Japan)
アンピシリンナトリウム(0.5 g)	明治製菓株式会社 (Tokyo, Japan)
ポピドンヨード製剤(10%)	吉田製薬株式会社 (Tokyo, Japan)
塩酸アチパメゾール	共立製薬株式会社 (Tokyo, Japan)
メロキシカム(0.5%)	ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルス ジャパン株式会社 (Tokyo, Japan)
イソフルラン	マイラン製薬株式会社 (Tokyo, Japan)
エンプ糸付縫合針 M10-50B2	株式会社秋山製作所 (Yamanashi, Japan)

その他

OxiSelect™ Intracellular ROS assay	コスモバイオ株式会社 (Tokyo, Japan)
1.5 mL sampling tubes, round bottom	ワトソン株式会社 (Tokyo, Japan)
50 mL コニカルチューブ	Corning (NY, USA)
15 mL コニカルチューブ	Corning (NY, USA)

2. 実験機器

細胞培養関連

オートクレーブ	LBS-325 (TOMY)
CO ₂ インキュベーター	MCO-19AIC (SANYO)、MCO-175 (SANYO)
クリーンベンチ	NS-13B (BIOLABO)、MCV-710ATS (SANYO)
安全キャビネット	VH-1300BH-2B (日本医化機械製作所)

粒子調製関連

バス型ソニケーター	AU-25C (Aiwa)
シリンジポンプ	YSP-301 (YMC)
マイクロ流体デバイス	iLiNP (北海道大学工学研究院生物計測化学研究室)

顕微鏡関連

顕微鏡	FV-10 (Olympus)
対物レンズ	UPlanSApo 60×/NA. 1.2 (Olympus)
ダイクロイックミラー	DM405/473/559/635 (Olympus)

測定機器関連

pH メーター	Docu-pH Meter (Sartorius)
粒子径・ゼータ電位分析装置	Zetasizer Nano ZS (Malven Instrument)
紫外可視吸光光度計	DU730 (Beckman Coulter)
可変波長マイクロプレートリーダー	VersaMax (Molecular Devices Corp.)
Seahorse XFp extra cellular flux analyzer	(Agilent Technologies, Inc)

動物実験関連

人工呼吸器	HARVARD small animal ventilator model 683 (Harvard)
心電図	LabChart Pro (AD Instruments)
超音波画像診断装置	Vivid S6 (GE Medical System)

その他

小型冷却遠心機	AX-511 (TOMY)、3700 (Kubota)
ボルテックスミキサー	VORTEX-GENIE2 (SCIENTIFIC INDUSTRY)
マイクロ流体デバイス	iLiNP (北海道大学工学研究院生物計測化学研究室)

3. 試薬調製

細胞培養関連

- 非働化 FBS
FBS を 37 °C の温浴で解凍し、56 °C の温浴中で 30 min 加熱を行った後、50 mL ずつ分注した(-20 °C 保存)。
- DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS)
DMEM Ham's F-12 (antibiotics (-), FBS (-)) 450 mL に解凍した非働化 FBS 50 mL と抗生剤 5 mL (ペニシリン G カリウム 8.3 mg, ストレプトマイシン 50 mg) を加えた(4 °C 保存)。
- 4 µg/mL human FGF-2 溶液
human FGF-2 10 µg を DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 2.5 mL に溶解した(-80 °C 保存)。
- 2 µg/mL human EGF 溶液
human EGF 10 µg を DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 5 mL に溶解した(-80 °C 保存)。
- PBS (-)
PBS 粉末 4.8 g を DDW 500 mL に溶解し、オートクレーブ滅菌を行った(4 °C 保存)。

粒子調製関連

- 10 mM HEPES buffer (pH 7.4)
HEPES 119 mg を DDW に溶解後、NaOH で pH 7.4 に調製し、50 mL にメスアップした後にフィルター濾過滅菌を行った(4 °C 保存)。
- 7.5 mM DOPE 溶液、7.5 mM SM 溶液
DOPE 55.8 mg、SM 54.8 mg をそれぞれ EtOH 10 mL に溶解した(-20 °C 保存)。
- 7.5 mM DMG-PEG 2k 溶液
DMG-PEG 2k 18.9 mg を EtOH 1 mL に溶解した(-20 °C 保存)。
- 20 mg/mL STR-R8 溶液
STR-R8 4 mg を EtOH 200 µL に溶解した(-20 °C 保存)。

酸素消費速度関連

- ランニング培地
XF 1.0 M グルコース溶液 397 μ L、XF 200 mM グルタミン溶液 200 μ L、XF 100 mM ピルビン酸溶液 125 μ L に XF 用 DMEM 培地を加えて 10 mL にメスアップした(4 °C保存)。
- 50 μ M Oligomycin ストック溶液
XFp 用 Mito Stress Test Kit 内の Oligomycin にランニング培地 288 μ L を加えて溶解した(4 °C保存)。
- 50 μ M FCCP ストック溶液
XFp 用 Mito Stress Test Kit 内の FCCP にランニング培地 252 μ L を加えて溶解した(4 °C保存)。
- 25 μ M Rotenone/Antimycin ストック溶液
XFp 用 Mito Stress Test Kit 内の Rotenone/Antimycin にランニング培地 216 μ L を加えて溶解した(4 °C保存)。
- 20 μ M Oligomycin 溶液
50 μ M Oligomycin ストック溶液 80 μ L をランニング培地 120 μ L で希釈した。
- 15 μ M FCCP 溶液
50 μ M FCCP ストック溶液 60 μ L、XF 100 mM ピルビン酸溶液 40 μ L とランニング培地 100 μ L を混合した。
- 5 μ M Rotenone/Antimycin 溶液
25 μ M Rotenone/Antimycin ストック溶液 40 μ L をランニング培地 160 μ L で希釈した。

その他

- FACS buffer
0.5%BSA 250 mg、0.1%アジ化ナトリウム 50 mg を PBS(-)50 mL で混合した(4 °C保存)。
- 動物実験用三種混合麻酔
塩酸メデトミジン 3 mL、ミダゾラム 8 mL、酒石酸ブトルファノール 10 mL をメスシリンダーに採取して混合した後に生理食塩水を加えて全量 50 mL にメスアップした。

4. 実験操作・方法

細胞培養関連

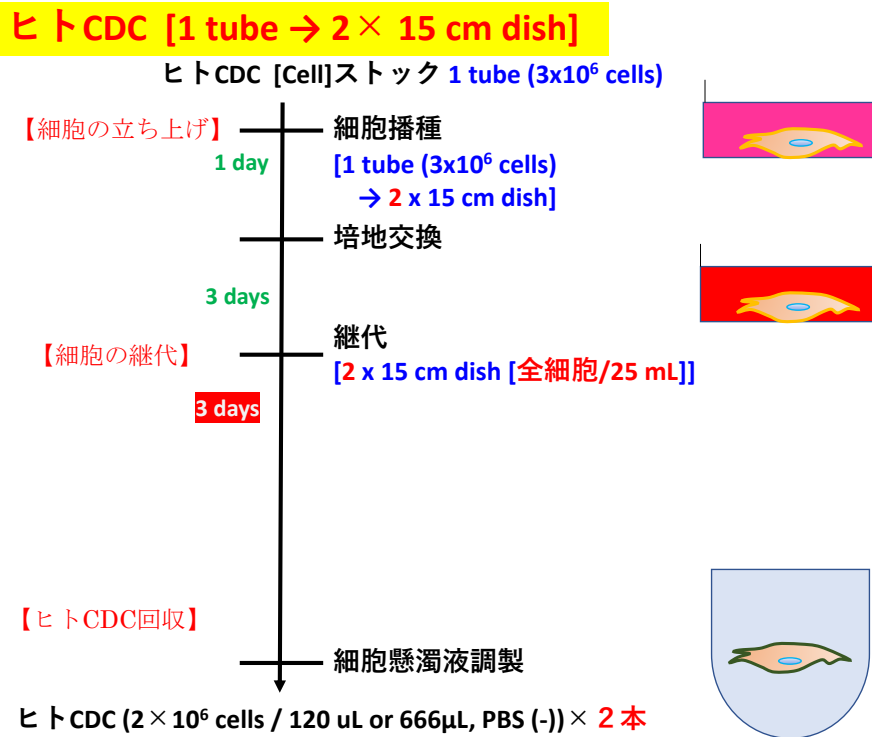
● ヒト心筋前駆細胞

ヒト心筋前駆細胞は先天性心疾患の手術中に切除された余剰心筋から単離した（臨床研究番号 016-0507、北海道大学病院）。ヒト心筋前駆細胞セルストック 1 mL を 37 °C に温めた DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 9 mL で溶解しながら回収し、マイクロ冷却遠心機で遠心分離した(4 °C, 300 g, 3 min)。上清をアスピレーターで除去し、DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 10 mL で再懸濁した後に全量を 10 cm dish に移してインキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。継代は 80-90%コンフルエントになった際に行った。培地を除去してから dish を PBS(-) 5 mL で洗浄後、0.25%トリプシン溶液 2 mL を加えて 2-3 min インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 8 mL を加えて細胞懸濁液を回収した後にマイクロ冷却遠心機で遠心分離し(4°C, 300 g, 3 min)、上清を除去後、DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 10 mL、4 µg/mL human FGF-2 溶液 80 µL、2 µg/mL human EGF 溶液 40 µL を混合した培地で再懸濁した。セルカウントを行い、必要量を 10 cm dish に播種した。

● 移植用ヒト心筋前駆細胞の培養およびヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の調製(図3)

ヒト心筋前駆細胞セルストック 1 mL を 37 °C に温めた DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 9 mL で溶解しながら回収し、マイクロ冷却遠心機で遠心分離した(4 °C, 300 g, 3 min)。上清をアスピレーターで除去し、DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 50 mL で再懸濁した後に全量を 15 cm dish に 25 mL ずつ移して一晩インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。翌日に新しい培地に交換し、インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂, 3 days)。継代は 80-90%コンフルエントになった際に行った。培地を除去してから dish を PBS (-) 10 mL で洗浄後、0.25%トリプシン溶液 6 mL を加えて 2-3 min インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 24 mL を加えて細胞懸濁液を回収した後にマイクロ冷却遠心機で遠心分離し(4 °C, 300 g, 3 min)、上清を除去後、DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 10 mL、4 μg/mL human FGF-2 溶液 80 μL、2 μg/mL human EGF 溶液 40 μL を混合した培地 25 mL で再懸濁した。全量を 15 cm dish に播種し、インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂, 3 days)。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)はインキュベーション 2 日目(移植の 24 hr 前)に培地を除去してから新たに培地 22.5 mL と MITO-Porter(CoQ₁₀) 2.5 mL を加えてインキュベーションした(37 °C, 5%CO₂, 1 day)。培養 3 日目にヒト心筋前駆細胞およびヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)ともに DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 10 mL を加えて細胞懸濁液を調製後、セルカウントして 2×10⁶ cells の細胞懸濁液を調製し、マイクロ冷却遠心機で遠心分離した(4 °C, 300 g, 3 min)。上清を除去後、心筋内投与用は PBS(-)120 μL を加えて、静脈内投与用は PBS(-)666 μL を加えて再懸濁し、移植用ヒト心筋前駆細胞溶液およびヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)溶液とした。

A



B

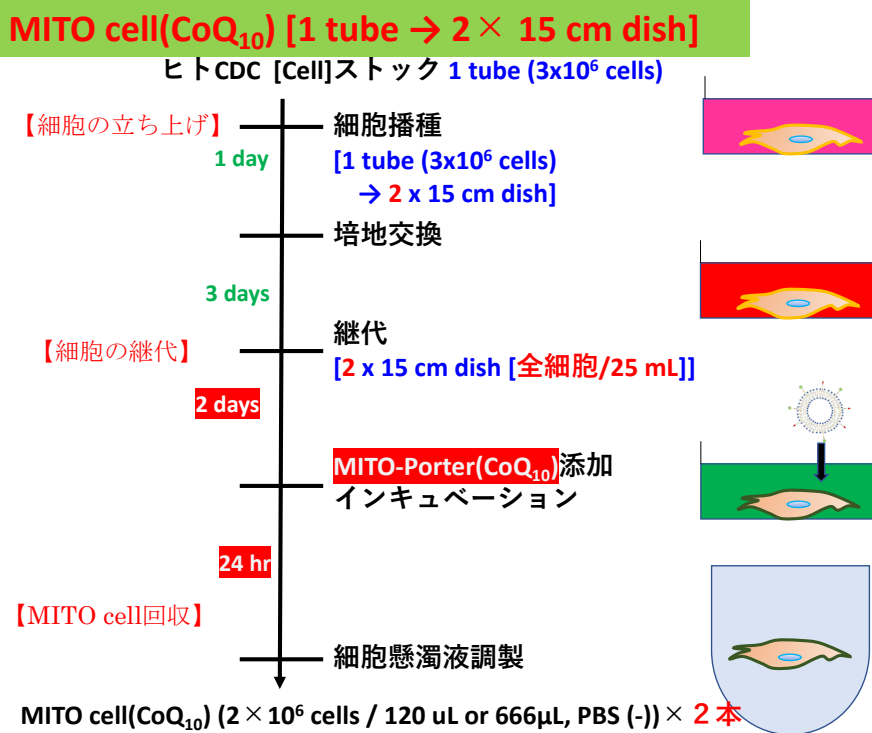


図 3 移植用細胞の培養および調製

粒子調製関連

● MITO-Porter(CoQ₁₀)の調製

1.5 mL sampling tube に以下の組成で各溶液を加えて脂質溶液を調製した。

7.5 mM DOPE 溶液	180 μ L
7.5 mM SM 溶液	40 μ L
7.5 mM DMG-PEG 2k 溶液	12.6 μ L
20 mg/mL STR-R8 溶液	6.6 μ L

脂質溶液を 1 mL ガラスシリンジに、EtOH を 2.5 mL ガラスシリンジにそれぞれ適当量だけ充填し、シリンジポンプでマイクロ流体デバイス内を流した(総流量=500 μ L/min, 流速比=4)。リポソーム溶液は透析膜に移して透析し(PBS(-), 25 $^{\circ}$ C, 2 hr)、透析後に回収した。

● 粒子の物性測定

粒子径および PDI は測定用のセルにサンプル 50 μ L を注入し、粒子径・ゼータ電位分析装置により測定した。ゼータ電位はサンプル 50 μ L と 10 mM HEPES Buffer (pH 7.4) 450 μ L を混合した溶液を測定用のセルに注入し、粒子径・ゼータ電位分析装置により測定した。

フローサイトメトリー関連

● FACS を用いた細胞内取り込み評価

粒子を添加する 24 hr 前にヒト心筋前駆細胞を 3.0×10^5 cells/well (DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 1.8 mL で懸濁)6 well dish に播種し、前培養を行った(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。DiI で標識した粒子を 200 μ L/well 加えた後 24 hr インキュベーションした(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)後に PBS(-)1 mL で洗浄した後にヘパリン溶液(20 U/mL) 500 μ L で 2 回洗浄し、0.25%トリプシン溶液 200 μ L を添加して 2-3 min インキュベーションした(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 500 μ L を加えて 1.5 mL sampling tube に全量回収し、遠心分離(700 g, 4 min, 4 $^{\circ}$ C)後に上清を取り除き、FACS buffer を 1 mL 添加して再度遠心(700 g, 4 min, 4 $^{\circ}$ C)した。上清を取り除き、FACS buffer を 500 L で懸濁してナイロンメッシュに通しプラスチック試験管に移し、測定を行った。

顕微鏡関連

- CLSM を用いた細胞内動態観察

粒子を添加する 24 hr 前にヒト心筋前駆細胞を 1.0×10^5 cells/well (DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 1.8 mL で懸濁) 3.5 cm glass bottom dish に播種し、前培養を行った(37 °C, 5%CO₂)。NBD-DOPE で標識した粒子を 200 μL/well 加えた後 24 hr インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。観察前に 100 nM に合わせた Mito Tracker Deep Red FM で 30 min インキュベーションし(37 °C, 5%CO₂)、ミトコンドリアを染色した。DMEM F-12 透明培地(antibiotics (-), 10%FBS) 2 mL に培地を交換し CLSM を用いて観察した。

酸素消費速度測定関連

- Seahorse XFp extra cellular flux analyzer を用いた酸素消費速度測定

XFp extra cellular flux cartridge の外周の各 well にキャリブ rant 溶液 400 μL ずつ、内側の well に 200 μL ずつ添加し、CO₂ 非存在下で 12 hr インキュベーションした(37 °C, CO₂ free)。粒子を添加する 24 hr 前に XFp cell culture miniplates の外周の各 well に PBS (-)400 μL ずつ添加し、A、H well に DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 90 μL を添加、B から G well にヒト CDC を播種し(1.2×10^4 cells/90 μL/well) 、前培養を行った(37 °C, 5%CO₂)。粒子を 10 μL/well 加えた後 24 hr インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。培地をランニング培地 180 μL に交換し、CO₂ 非存在下で 1 hr インキュベーションした(37 °C, CO₂ free)。20 μM Oligomycin、15 μM FCCP、5 μM Rotenone/Antimycin 溶液をそれぞれ 20 μL ずつセンサーカートリッジの各ポートに注入し、作成したプロトコルを使用して酸素消費速度を測定した(Tsujioka et al, 2021)。

H₂O₂ 負荷による酸化ストレス耐性評価関連

- CLSM を用いた評価

粒子を添加する 24 hr 前にヒト心筋前駆細胞を 5.0×10^4 cells/well (DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 1.8 mL で懸濁) 3.5 cm glass bottom dish に播種し、前培養を行った(37 °C, 5%CO₂)。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)群には MITO-Porter(CoQ₁₀)を 200 μL 投与して 24 hr インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)、未処置のヒト心筋前駆細胞に 0.5 mM H₂O₂ を投与し、3 時間インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。観察 30 分前に細胞内 ROS を DHE で染色し、CLSM を用いて観察を行った。

- ROS assay を用いた評価

OxiSelect™ Intracellular ROS assay を使用した。粒子を添加する 24 hr 前にヒト CDC を 1.2×10^4 cells/well (DMEM Ham's F-12 (antibiotics (+), 10%FBS) 90 μL で懸濁) 96 well plate に播種し、前培養を行った(37 °C, 5%CO₂)。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)群には MITO-Porter(CoQ₁₀)を 10 μL 投与して 24 hr インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)、未処置のヒト心筋前駆細胞に 1 mM DCF を投与し、1 時間インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)。培地を 0.1 mM H₂O₂ 含有培地に交換し、1 時間インキュベーションした(37 °C, 5%CO₂)後に蛍光度をマイクロプレートリーダーで測定した(480 nm/530 nm)。

動物実験関連

動物実験は日精バイリス株式会社に委託した。ラットの使用は、日精バイリス株式会社の施設内動物管理および研究諮問委員会によって承認された（日付：2021年12月1日、登録番号2021-141）。

- 実験動物の群分け

体重および左室駆出率(EF)を指標にして各投与群均等になる様に振り分けた。

- 心筋虚血再灌流障害モデルラットの作成

ラット(Slc : Wistar, 雄性, 10-11 週齢)に三種混合麻酔を 2.5 mL/kg の容量で皮下投与して麻酔した。麻酔後、仰臥位に固定し、気管チューブを経口挿管し、人工呼吸を施した(換気量: 1.5-2.0 mL/stroke, 呼吸回数: 70 strokes/min)。リドカインを適量皮下投与し、胸部側壁を開胸して心臓を露出し、糸付縫合針で左冠動脈前下行枝(left anterior descending coronary artery: LAD)を結紮し、30 min 閉塞した。この時以下の項目を観察した。

LAD 結紮直後の LAD 周辺心筋の白色化

LAD 結紮直後の心電図モニタリングにおける ST 上昇

LAD 結紮直後の心室性期外収縮(premature ventricular contraction: PVC)、心室頻拍 (ventricular tachycardia: VT) および心室細動 (ventricular fibrillation: VF)

なお VF が出現した場合はリング鑷子で心臓を直接刺激することで VF が消失した場合は採用した。閉塞 30 min 後に結紮を解除し血流を再灌流させることにより心筋虚血再灌流モデルを作成。心筋内投与ではヒト心筋前駆細胞溶液またはヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀) 溶液 1.5×10⁶ cells/90 μL または PBS (-) 90 μL を再灌流する 1 分前に白色化した LAD 周辺心筋に 3 分割して投与した。静脈内投与ではヒト心筋前駆細胞溶液またはヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀) 溶液 1.5×10⁶ cells/500 μL または PBS (-) 500 μL を再灌流する 1 分前に尾静注した。その後閉胸して切開部を縫合した。この際に、感染予防のために注射用アンピシリンナトリウム 2 mg/mL を切開部に適量滴下し、縫合後にポピドンヨード製剤で消毒した。その後、塩酸アチパメゾールを 0.15 mg/kg の用量で皮下投与した。心筋虚血再灌流モデル作成から 2 日間、鎮痛剤メロキシカムを皮下投与した。心筋投与の Sham 群は開胸手術のみ行い縫合及び消毒した。静脈投与の Sham 群は麻酔のみ行い非開胸とした。いずれの群も実験終了まで死亡例は認めなかった。

- 心エコー検査

超音波画像診断装置を用いて心エコーを行った。ラットの胸部にプローブ (リニアプローブ 12 MHz) を当て、左心室を短軸断面で描出して M-mode で左室拡張末期径(left ventricular end diastolic diameter: LVDD)、左室収縮末期径 (left ventricular end systolic diameter: LVDS)、拡張末期左室前壁厚(left ventricular anterior wall thickness in diastole: LVAWd)、拡張末期左室後壁厚(left ventricular posterior wall thickness in diastole: LVPWd)、EF および左室内径短縮率(%FS)を 3 心拍分測定し、平均値を算出した。

- 解剖

麻酔下放血法により安楽死させて心臓を摘出した。摘出した心臓は重量測定後に液体窒素で凍結した。臓器サンプルは-64.5 °C以下で凍結保存した。心臓(左心室)は 10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬させて固定した。左心室は結紮直下から心尖部にかけて長軸方向の長さが 3 等分になるよう短軸方向に 3 分割した。3 分割した組織片のそれぞれ心底側を包埋面とし、パラフィンブロックを作製後、薄切し、HE 染色及び Masson trichrome 染色を行った。

メタボローム解析関連

メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(Human metabolome technologies: HMT)株式会社に委託した。

● 代謝物の抽出

約 20~40 mg の凍結組織を zirconia beads(5 mmφ および 3 mmφ)とともにホモジナイズチューブに入れた。次に 50% acetonitrile/Milli-Q 1,500 μL をチューブに添加し、ビーズシェーカー(Shake Master NEO, Bio Medical Science, Tokyo, Japan) (1,500 rpm, 4 °C, 60 sec)を用いて組織を完全にホモジナイズした。次に、ホモジネートを遠心分離し(2,300 g, 4 °C, 5 min)、上層の水層 800 μL を Millipore 5-kDa カットオフフィルター (UltrafreeMC-PLHCC、HMT)を通し遠心濾過(9,100 g, 4 °C, 180 min)して高分子を除去した。濾液を真空下で蒸発乾固し、メタボローム分析のために 50 μL の Milli-Q を加えた。

● メタボローム解析(C-SCOPE)

メタボローム解析は、HMT の C-SCOPE パッケージに従って、陽イオン分析にはキャピラリー電気泳動 time-of-flight 質量分析法(CE-TOFMS)、陰イオン分析には CE-タンデム質量分析法(CE-MS/MS)を使用して(Ohashi et al, 2008; Ooga et al, 2011)、実行した。CE-TOFMS および CE-MS/MS 分析は、Agilent 6210 質量分析計(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) および Agilent 6460 Triple を備えた Agilent CE キャピラリー電気泳動システムを使用した。システムは CE(Agilent Technologies)用の Agilent G2201AA ChemStation ソフトウェア バージョン B.03.01 によって制御され、電解質として市販の電気泳動バッファ(陽イオン用の H3301-1001 および陰イオン用 I3302-1023)を用いて溶融シリカキャピラリー(内径 50 μm×全長 80 cm)に接続した。time-of-flight 質量分析計は m/z50 から 1,000 (Ohashi et al, 2008)までスキャンし、triple quadrupole 質量分析計を使用してダイナミック MRM モードで化合物を検出した。m/z、ピーク面積、移動時間などのピーク情報を取得するために、MasterHand 自動統合ソフトウェア(Keio University, Tsuruoka, Yamagata, Japan) (Sugimoto et al, 2010) および MassHunter Quantitative Analysis B.04.00(Agilent Technologies)を使用した。各代謝産物のピーク面積を内部標準に対して正規化し、代謝産物濃度を各標準化合物で使用した 3 点校正による標準曲線によって評価した。階層クラスター分析(HCA)と主成分分析(PCA) (Yamamoto et al, 2014)は、それぞれ HMT 独自の MATLAB および R プログラムによって実行された。検出された代謝物は、VANTED ソフトウェア(Junker et al, 2006)を使用して代謝経路マップ上にプロットした。

結果

結果

1. MITO-Porter(CoQ₁₀)の調製および細胞への投与

1-1. MITO-Porter(CoQ₁₀)の調製

ヒト心筋前駆細胞のミトコンドリア機能を活性化するために、CoQ₁₀ を内封した MITO-Porter(CoQ₁₀)を調製した (図 2)。CoQ₁₀ は広く知られた抗酸化物質であり、10 個のイソプレレン単位に結合したベンゾキノン環を有するミトコンドリア電子伝達補酵素である (Greenberg et al, 1990; Ratnam et al, 2006)。CoQ₁₀ は疎水性が高く、負に帯電しているため、同じく負に帯電した細胞内ミトコンドリアへの直接的な送達は難しいと考えられる。本研究では、ミトコンドリア融合性脂質を主な素性とする MITO-Porter に CoQ₁₀ を内封し、MITO-Porter の表面にカチオン性ペプチドであるステアリル化オクタアルギニン (stearylated octaarginine: STR-R8) (Futaki et al, 2001) を修飾した。したがって、CoQ₁₀ を細胞内ミトコンドリアに効率的に送達できると考えた (Yamada et al, 2015)。MITO-Porter(CoQ₁₀) はマイクロ流体デバイスを使用して調製され、以前の研究では CoQ₁₀ の回収率は 72% だった (Hibino et al, 2019)。MITO-Porter(CoQ₁₀) の物性を表 1 に示す (mean±S.D., n=3-4)。さらに調整した MITO-Porter(CoQ₁₀) を一定期間 4°C で冷蔵保存した後の物性を評価したところ、粒子径 (図 4A) やゼータ電位 (図 4B) 等の物性は安定していた (n=1)。

表 1 粒子の物性

Carrier type	Lipid composition (molar ratio)	Diameter (nm)	PDI	ζ -potential (mV)
DOPE/SM-LP	DOPE:SM:DMG-PEG2000 (9:2:0.33)	66 ± 9.0	0.30 ± 0.06	-1.8 ± 0.3
MITO-Porter	DOPE:SM:DMG-PEG2000:STR-R8 (9:2:0.33:1.1)	84 ± 10	0.30 ± 0.09	9.3 ± 2.8
MITO-Porter (CoQ ₁₀)	DOPE:SM:DMG-PEG2000:STR-R8:CoQ ₁₀ (9:2:0.33:1.1:2.1)	76 ± 7.8	0.25 ± 0.02	14 ± 1.9

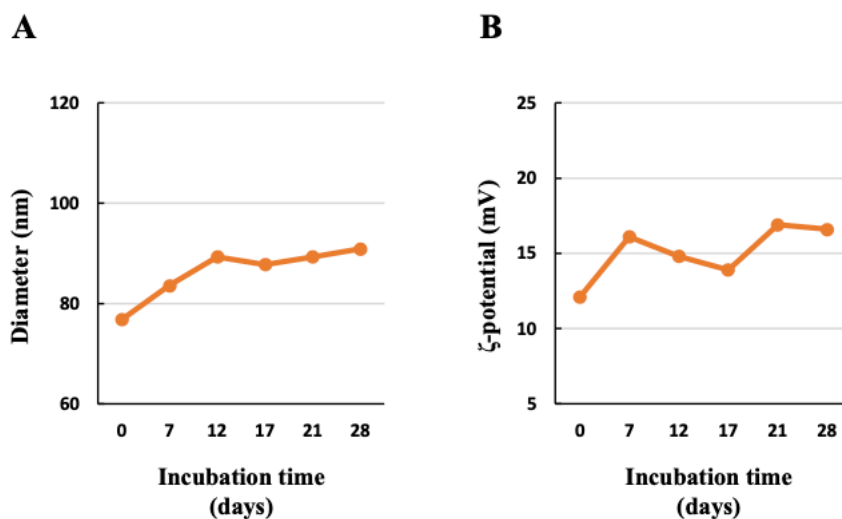


図 4 MITO-Porter(CoQ₁₀)の保存安定性

1-2. MITO-Porter(CoQ)の細胞取り込み解析

ヒト心筋前駆細胞への MITO-Porter (CoQ₁₀)の細胞取り込みをフローサイトメトリー分析によって評価した。ヒト心筋前駆細胞に取り込まれた MITO-Porter (CoQ₁₀)の蛍光強度は、DiI 色素で標識した MITO-Porter (CoQ₁₀)を血清含有培地に 24 時間投与した後に評価した (図 5(a, b))。図 5(a)は Histogram plot を示し、図 5(b)は蛍光強度を mean fluorescent intensity で評価した(mean±S.D., n=3, one-way ANOVA followed by SNK test, *p < 0.05, **p < 0.01)。その結果、MITO-Porter および MITO-Porter (CoQ₁₀)の取り込みは、STR-R8 を修飾していない DOPE/SM-LP と比較して大幅に増加した。

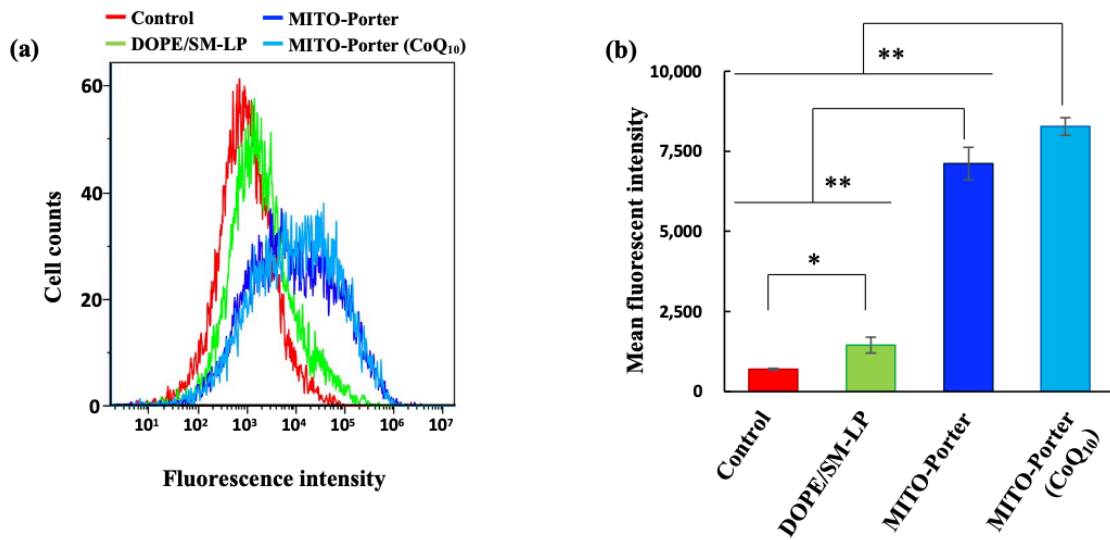


図 5 粒子の細胞取り込み評価

図 6 に血清含有培地への MITO-Porter(CoQ₁₀)の各投与時間における細胞取り込みに関するデータを示す。相対平均蛍光強度は、対照値(control 値)の相対値として計算した。その結果、MITO-Porter(CoQ₁₀)の投与時間が 24 時間未満の場合、細胞への取り込みが少ないことがわかった(mean±S.D., n=3, one-way ANOVA followed by SNK test, **p < 0.01)。

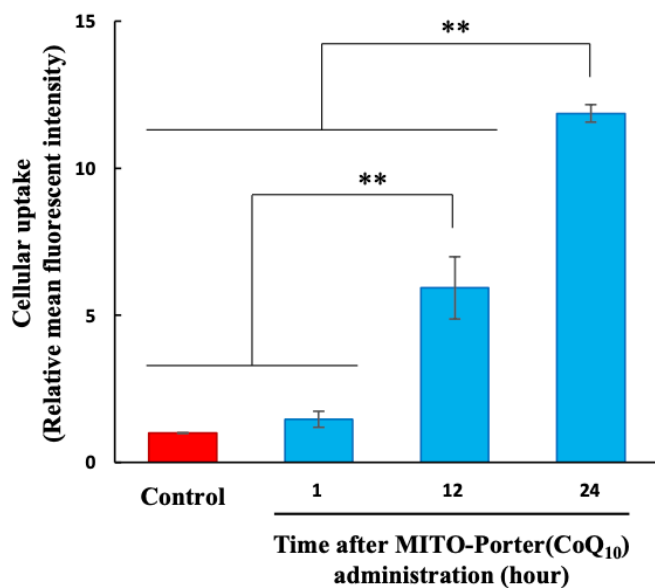


図 6 MITO-Porter(CoQ₁₀)取り込みの経時変化

1-3. MITO-Porter(CoQ)の細胞内動態評価

共焦点レーザー走査型顕微鏡(confocal laser scanning microscopy: CLSM)を用いた MITO-Porter(CoQ₁₀)の細胞内動態観察を図 7 に示す(scale bars: 20 μm)。ミトコンドリアは Mito-Tracker deep red で赤色に染色し、キャリアは NBD-DOPE で緑色に標識した。ミトコンドリアと MITO-Porter(CoQ₁₀)が黄色シグナルとして共局在していることが観察され、これらの結果は、MITO-Porter システムが膜融合を介してヒト心筋前駆細胞のミトコンドリアに CoQ₁₀ を送達できることを示唆している。

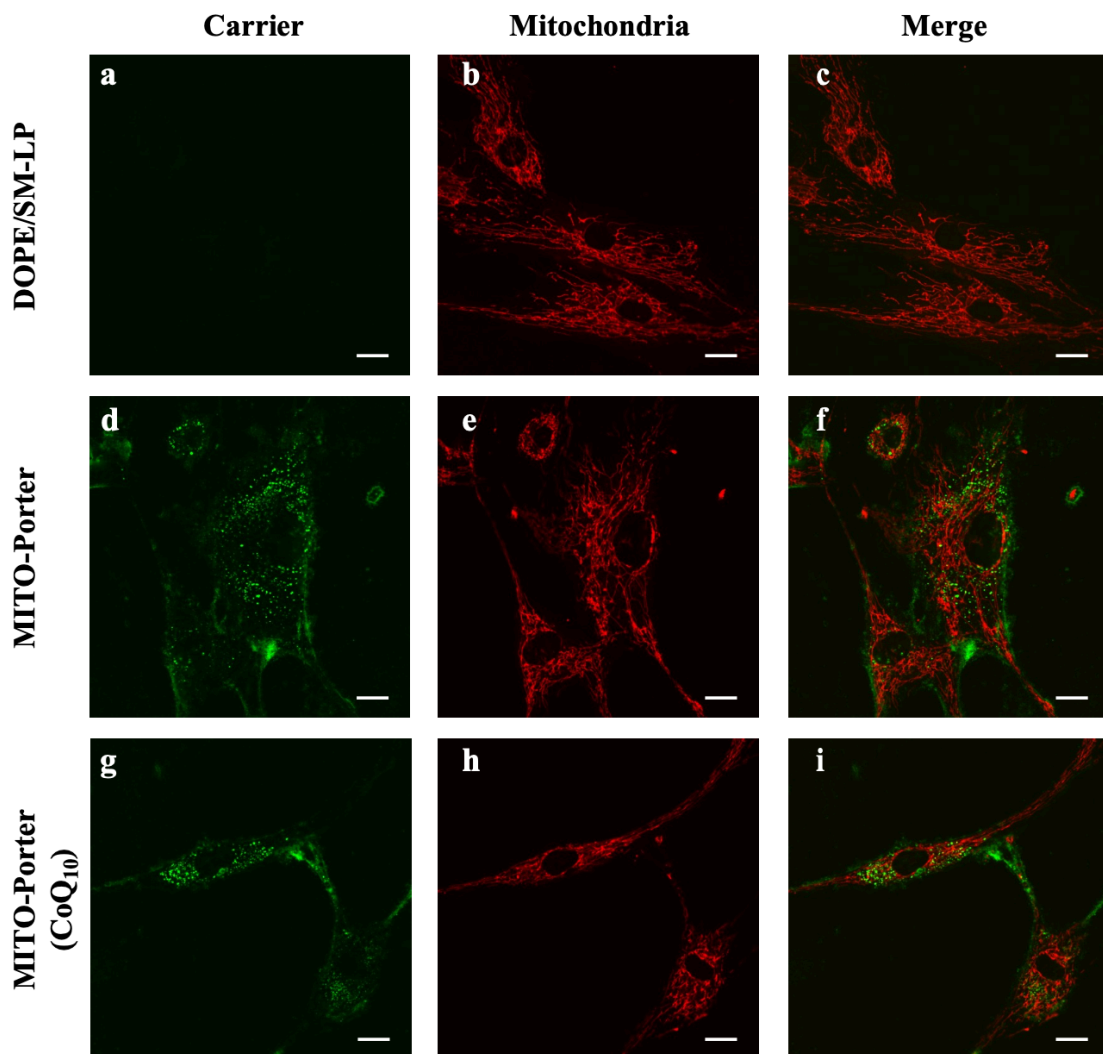


図 7 粒子の細胞内動態評価

2. ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の機能評価

2-1. ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)のミトコンドリア機能解析

未処理のヒト心筋前駆細胞(対照群)および MITO-Porter(CoQ₁₀)を投与したヒト心筋前駆細胞(ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)群)のミトコンドリア機能を、細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリア OCR を測定することにより評価した。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)群では第一章で示した結果より MITO-Porter(CoQ₁₀)を血清含有培地に 24 時間投与した (図 8(a))。

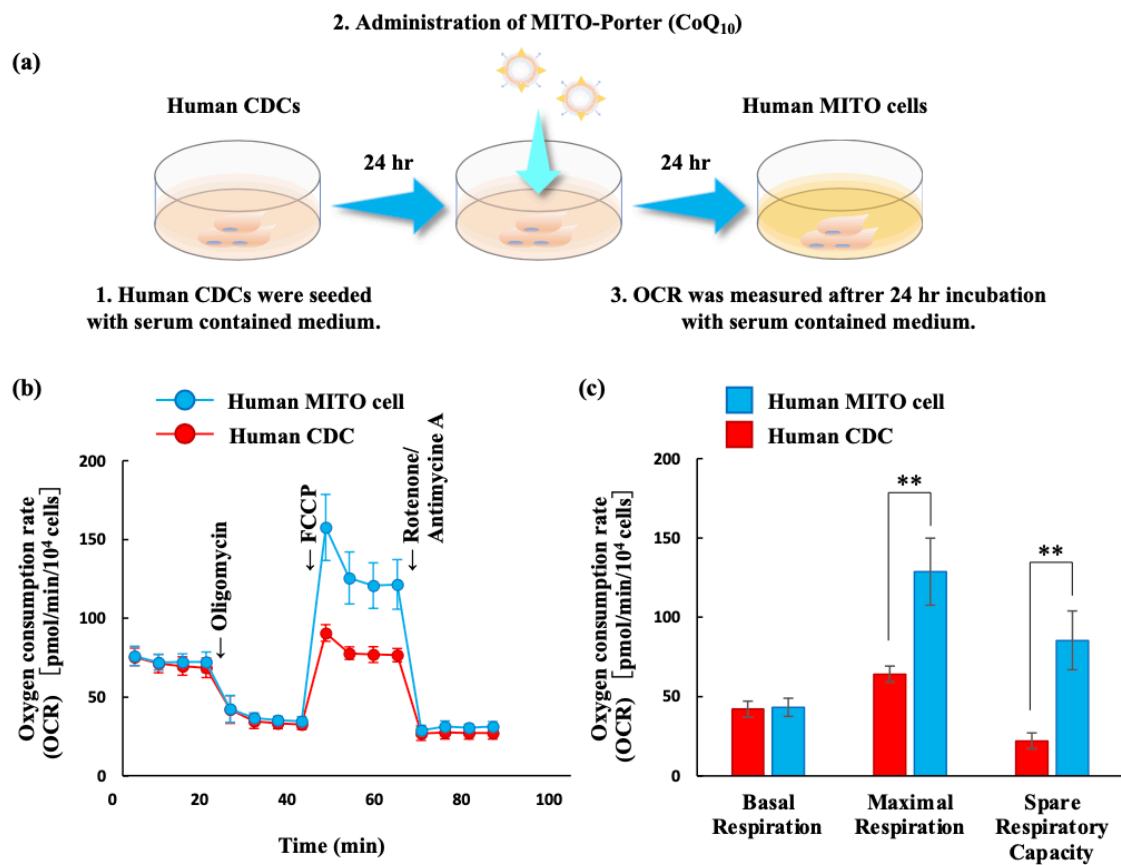


図 8 細胞のミトコンドリア機能評価

対照群とヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)群の間に基礎呼吸量(basal respiration)に差は認めなかったが、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)群は対照群と比較して最大呼吸量(maximal respiration)と予備呼吸能力(spare respiratory capacity)が有意に上昇した(図 8(b, c)) (mean±S.D., n=5-6, Student's t-test, **p < 0.01)。これらの結果から、ヒト由来 MITO cell のミトコンドリア機能が、特に最大呼吸時に活性化されたことが示唆された。

図 9 は、血清含有培地に対する MITO-Porter(CoQ₁₀)の各投与時間における相対最大呼吸量に関するデータを示している(mean±S.D., n=3-5, one-way ANOVA followed by SNK test, **p < 0.01)。相対最大呼吸量は、対照値(control 値)を 100%とした際の相対値(%)として計算した。その結果、MITO-Porter(CoQ₁₀)を 24 時間以上投与すると、ヒト心筋前駆細胞のミトコンドリア機能が亢進することがわかった。

以降の実験ではヒト由来 MITO cell (CoQ₁₀)の調製プロトコルとして、ヒト心筋前駆細胞の血清含有培地内に MITO-Porter(CoQ₁₀)を 24 時間投与することとした。

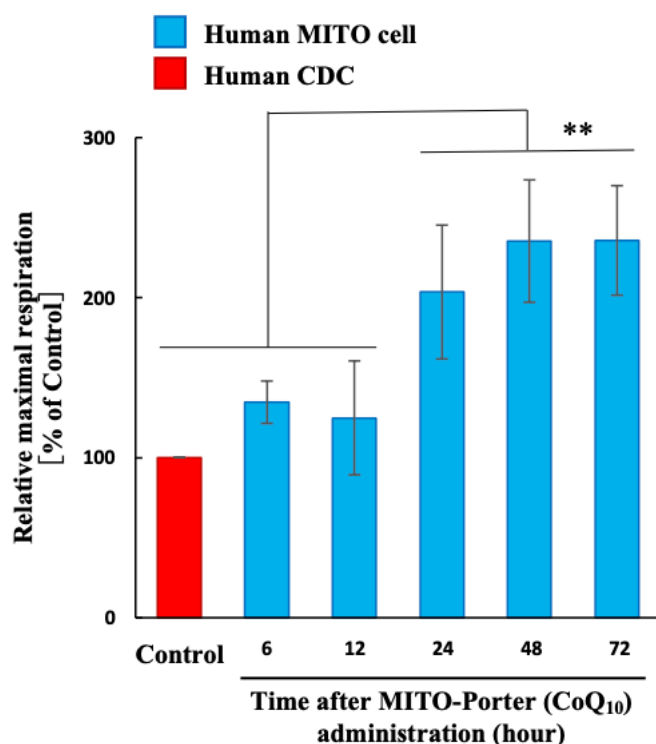


図 9 MITO-Porter(CoQ₁₀)によるミトコンドリア最大呼吸能の経時変化

2-2. ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の酸化ストレス耐性評価

虚血条件下でのヒト MITO cell の有効性を H₂O₂ に曝露することにより *in vitro* で評価した。CLSM を用いた観察では、活性酸素種(reactive oxygen species: ROS) の指標である DHE 染色が、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)よりも未処理のヒト心筋前駆細胞でより顕著だった(図 10A) (scale bars, a–d 100 μm and e–h 20 μm)。さらに ROS assay を用いて細胞内 ROS 産生量を評価した(図 10B)。細胞内 ROS 産生は H₂O₂ 曝露後に増加したが、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)では未処理のヒト心筋前駆細胞と比較して有意に低かった(mean±S.D., n=4, one-way ANOVA followed by SNK test, **p < 0.01)。

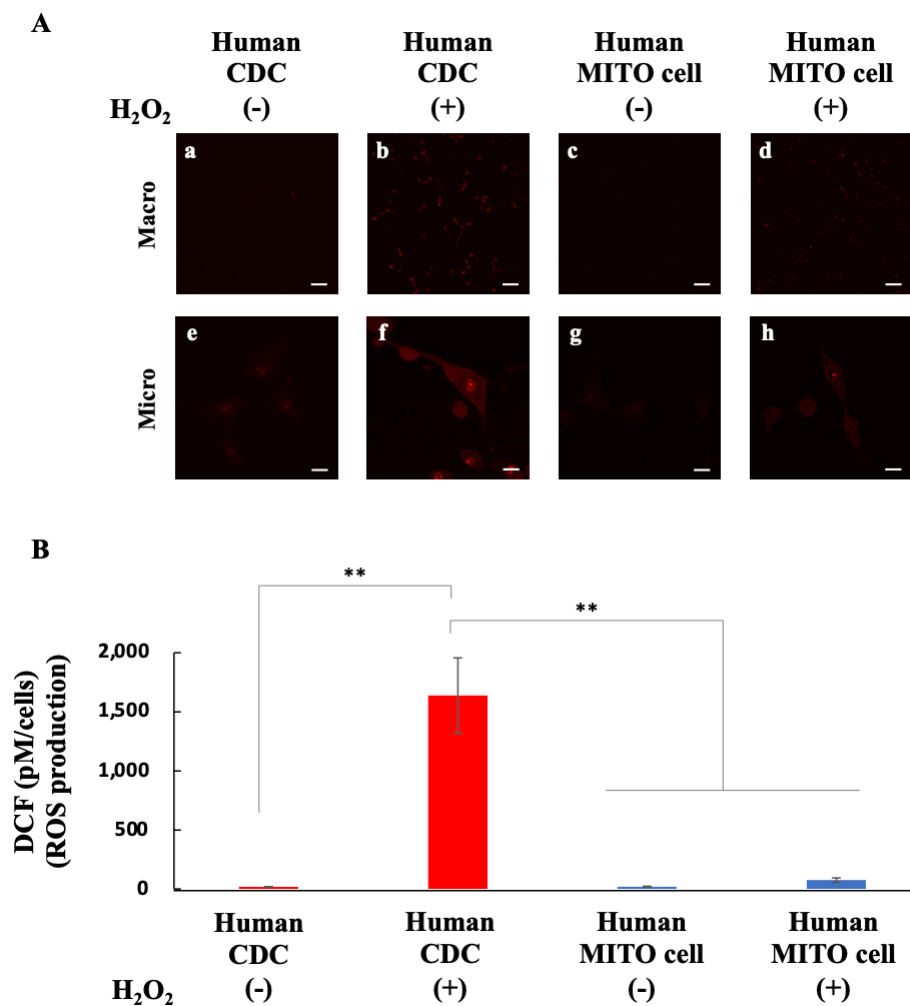


図 10 H₂O₂ 負荷による細胞内 ROS 評価

3. ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の治療効果検証

3-1. ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)心筋内投与による治療効果の検証

治療効果の比較のため、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与群に加えて、未処理のヒト心筋前駆細胞投与群(ヒト CDC 群)、PBS 投与群(PBS 群)、開胸のみの群(sham 群)の 3 群も用意した。心筋内投与では、投与 4 週時の体重は 4 群間で有意差を認めなかったが(図 11(a))、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)群では心機能が有意に改善した(図 11(b, c), 表 2) (mean±S.D., n=6-7, one-way ANOVA followed by SNK test, **p < 0.01)。

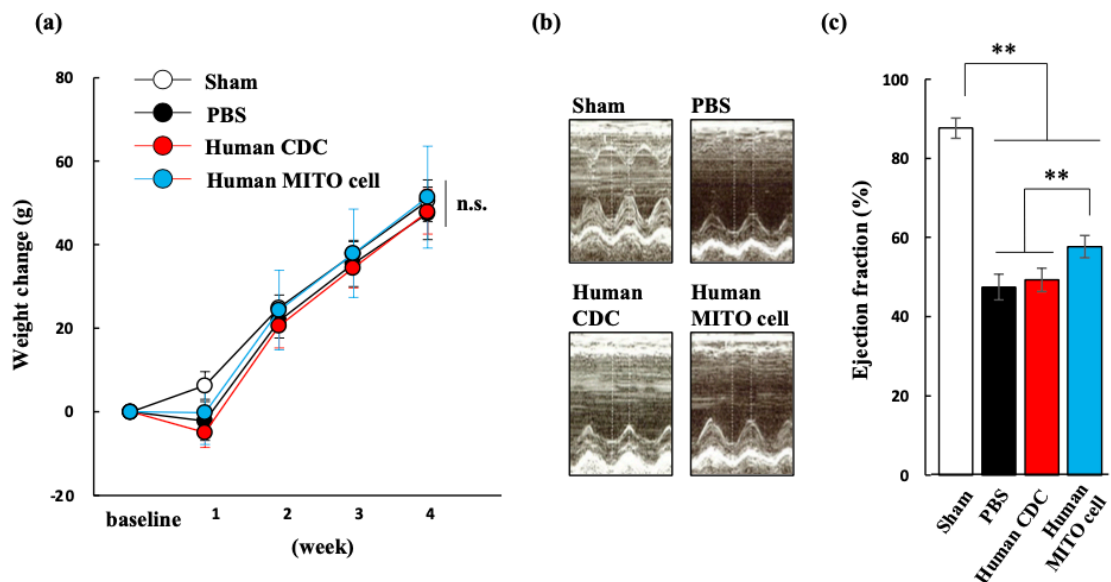


図 11 心筋内細胞移植後の治療効果

表 2 心筋内細胞移植後の心機能

Intramyocardial administration	Sham	PBS	Human CDC	Human MITO cell
%FS	50 ± 3.3	19 ± 1.7	20 ± 1.5	25 ± 1.7
EF (%)	88 ± 2.6	48 ± 3.3	49 ± 3.0	58 ± 2.8

組織病理学的評価のために、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与の 4 週間後に心臓を切除し、組織切片を HE(図 12(a))および Masson trichrome(図 12(b))で染色した。図 12(b)に示す画像を解析し、Image-pro Plus 7.0 を用いて線維化の程度を評価した(図 12(c)) (mean±S.D., n=6-7, one-way ANOVA followed by SNK test, *p < 0.05,

**p < 0.01)。心筋投与により、ヒト CDC 群では PBS 群と比較して左室前壁の線維化が抑制され、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)群ではヒト CDC 群と比較して線維化はさらに抑制された。

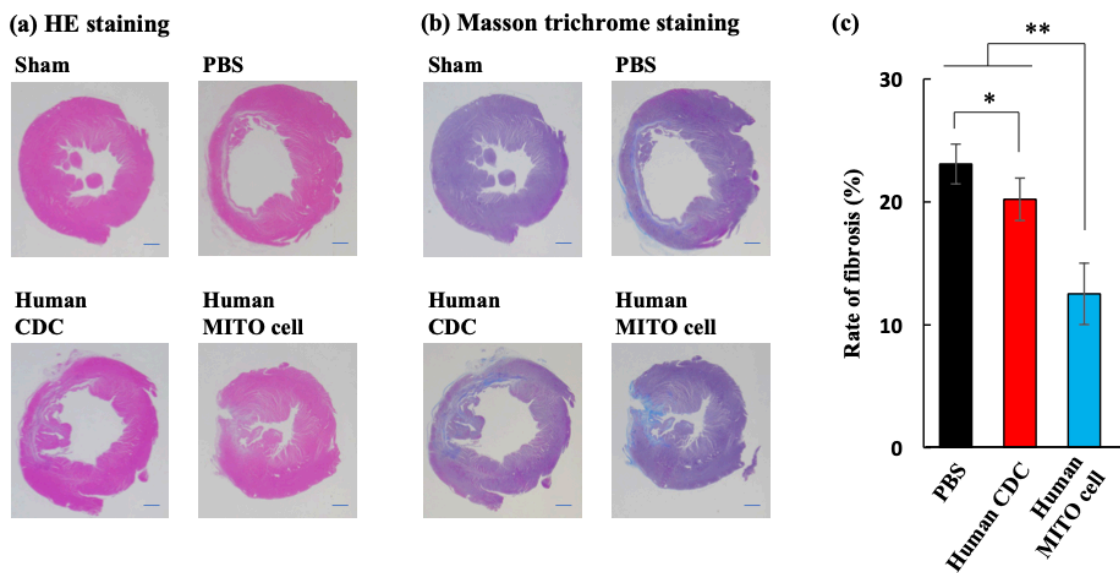


図 12 心筋内細胞移植後の組織病理学的評価

3-2. ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)静脈内投与による治療効果の検証

ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の静脈内投与についても心筋内投与と同様に評価した。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の静脈内投与により、体重が有意に増加し(図 13(a))、心機能も改善した(図 13(b, c), 表 3) (mean±S.D., n=6-7, one-way ANOVA followed by SNK test, *p < 0.05, **p < 0.01)。ヒト CDC 投与群は、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与群よりも体重増加が少なかった。

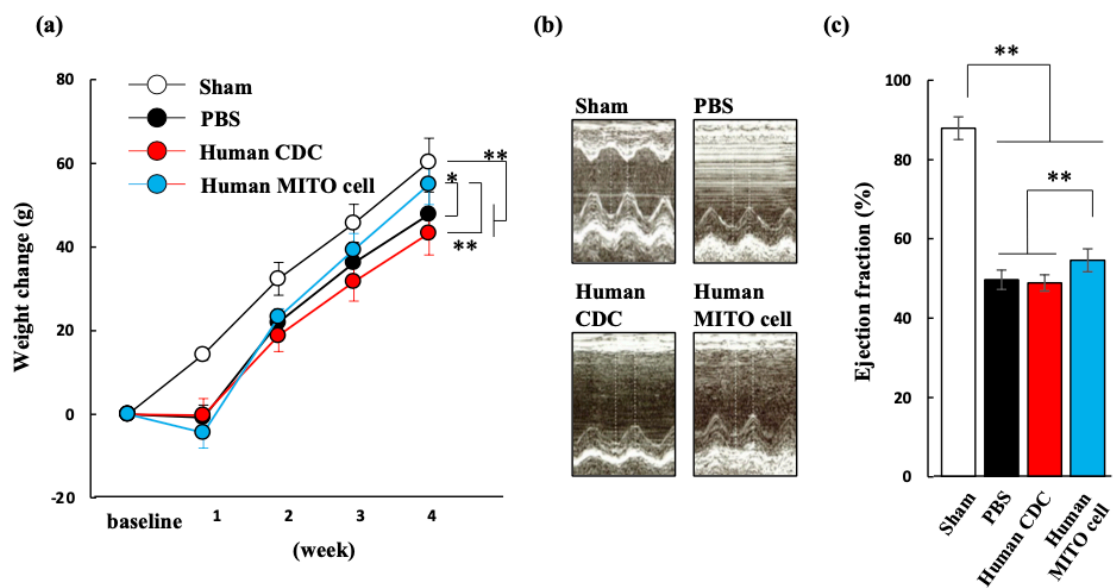


図 13 静脈内細胞移植後の治療効果

表 3 静脈内細胞移植後の心機能

Intravenous administration	Sham	PBS	Human CDC	Human MITO cell
%FS	51 ± 3.8	21 ± 1.3	20 ± 1.1	23 ± 1.6
EF (%)	88 ± 2.9	50 ± 2.4	49 ± 2.1	55 ± 2.9

線維化の程度に関しても心筋内投与同様に評価した。静脈内投与した場合、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与群は他の群よりも心筋線維化を抑制したが、ヒト CDC 投与群と PBS 投与群の間に有意差は認めなかった(図 14(c)) (mean±S.D., n=6-7, one-way ANOVA followed by SNK test, **p < 0.01)。

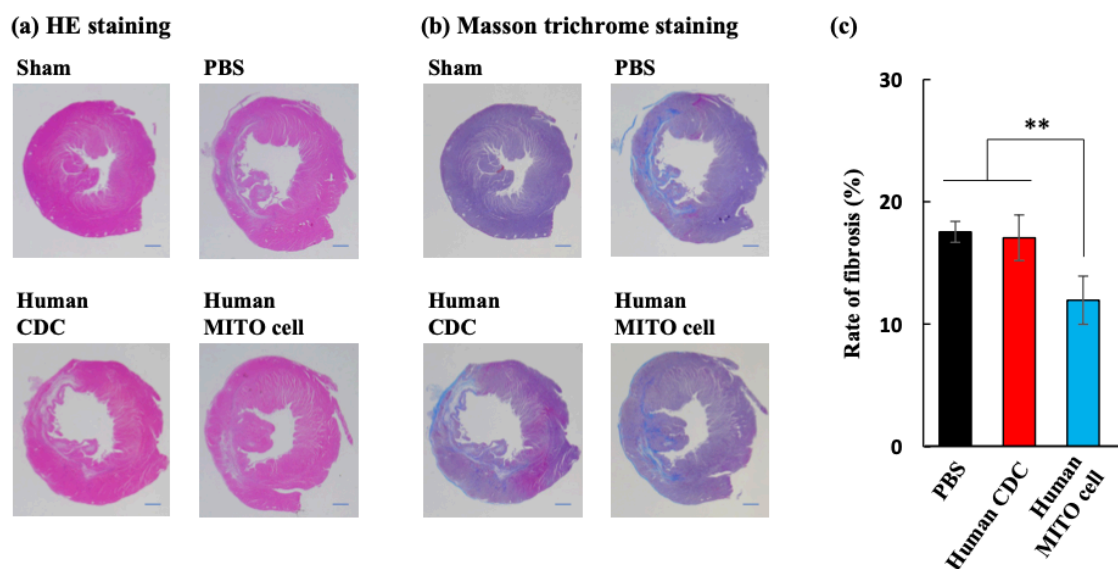


図 14 静脈内細胞移植後の組織病理学的評価

心エコー検査で得られた他の指標について表 4 に示す(mean±S.D., n=6-7)。

表 4 心エコー検査結果

Intramyocardial administration	Sham	PBS	Human CDC	Human MITO cell
LVDd (mm)	6.8 ± 0.1	8.9 ± 0.5	8.8 ± 0.5	8.9 ± 0.7
LVDs (mm)	3.4 ± 0.2	7.2 ± 0.5	7.1 ± 0.4	6.7 ± 0.6
LVAWd (mm)	1.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.1
LVPWd (mm)	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Intravenous administration	Sham	PBS	Human CDC	Human MITO cell
LVDd (mm)	6.8 ± 0.1	8.6 ± 0.3	8.7 ± 0.5	8.8 ± 0.4
LVDs (mm)	3.4 ± 0.3	6.8 ± 0.3	6.9 ± 0.5	6.8 ± 0.5
LVAWd (mm)	1.8 ± 0.1	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.0
LVPWd (mm)	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1

4. ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与による心筋メタボローム解析

4-1. ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)心筋内投与による心筋メタボローム解析

比較のため、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与群に加えて、未処理のヒト心筋前駆細胞投与群(ヒト CDC 群)、開胸のみの群(sham 群)の 2 群も用意した。心筋内投与では、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与群で TCA サイクルに関連するアミノ酸合成が亢進していた。特に、TCA サイクルの基質として機能する 2-オキソグルタル酸に変換されるグルタミンとグルタミン酸は、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を投与した心筋で有意に高かった(図 15(a, b)) (mean±S.D., n=3, one-way ANOVA followed by SNK test, *p < 0.05, **p < 0.01)。今回の実験ではサクシニル CoA は検出できなかったが、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与群ではサクシニル CoA 関連のアミノ酸生合成が亢進する傾向があり、サクシニル CoA 以降の TCA サイクル代謝物の濃度も高い傾向が見られた。さらに、グルコース 1-リン酸、グルコース 6-リン酸、フルクトース 6-リン酸などの解糖系代謝産物の濃度もヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与群で有意に高かった。

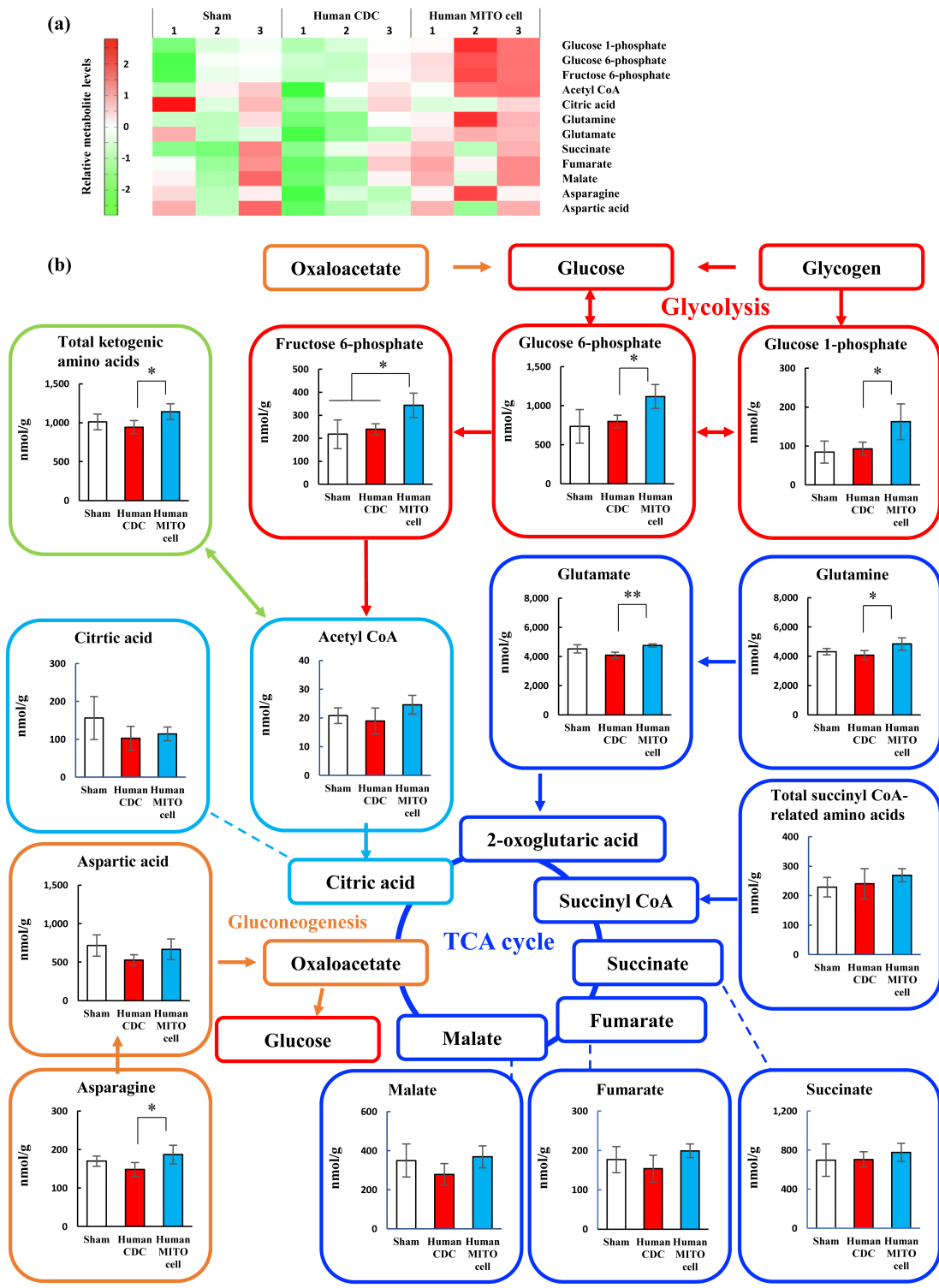


図 15 心筋内細胞移植をした心筋のメタボローム解析

4-2. ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)静脈内投与による心筋メタボローム解析

ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の静脈内投与についても心筋内投与と同様に評価した。心筋内投与で認められた各種代謝変化は静脈内投与では観察されなかった(図 16(a, b)) (mean±S.D., n=3, one-way ANOVA followed by SNK test)。

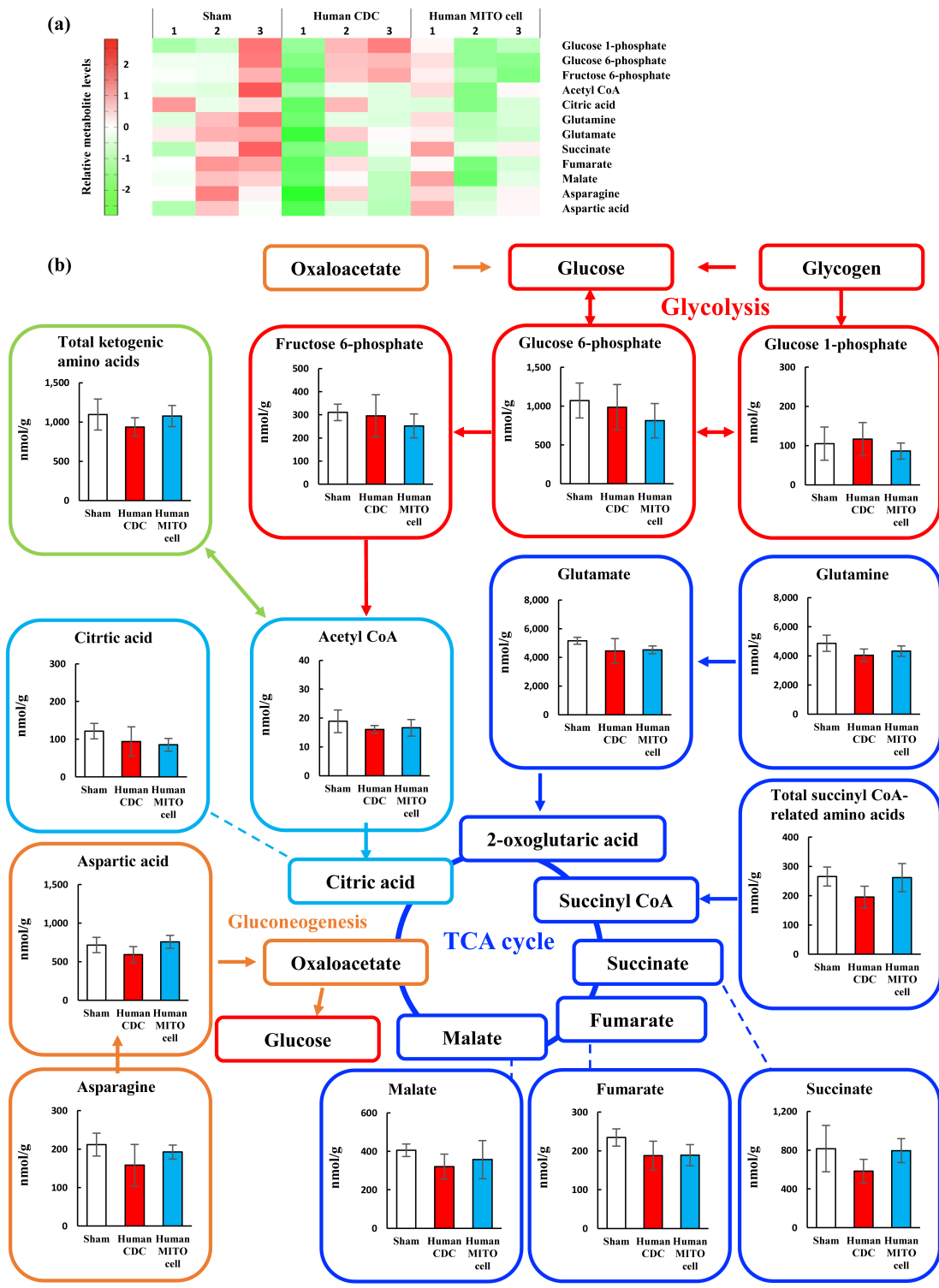


図 16 静脈内細胞移植をした心筋のメタボローム解析

4-3. 補足データ

メタボローム解析に関する補足データを提示する。グルタチオンは体内で最多のチオール化合物であり、抗酸化物質である。以下の反応で合成されるが、抗酸化能だけでなく、一酸化窒素サイクルの制御や DNA 合成および修復、タンパク合成、プロスタグランジン合成、アミノ酸の輸送、酵素活性などに関与している。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の心筋内投与でグルタチオンの濃度が高い傾向を認めたが(図 17)、静脈内投与ではその傾向は観察されなかった(図 18)(mean±S.D., n=3, one-way ANOVA followed by SNK test)。

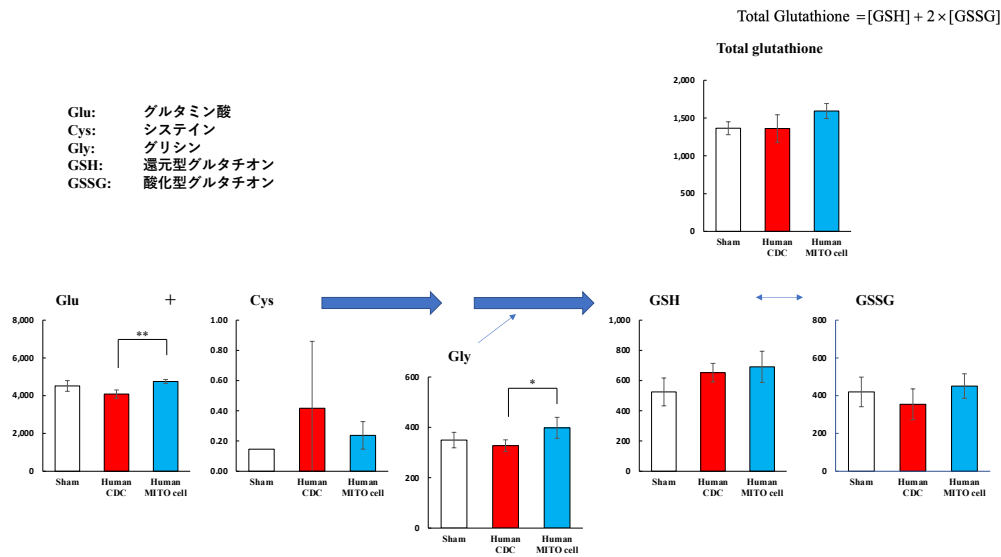


図 17 心筋内細胞移植をした心筋のグルタチオン評価

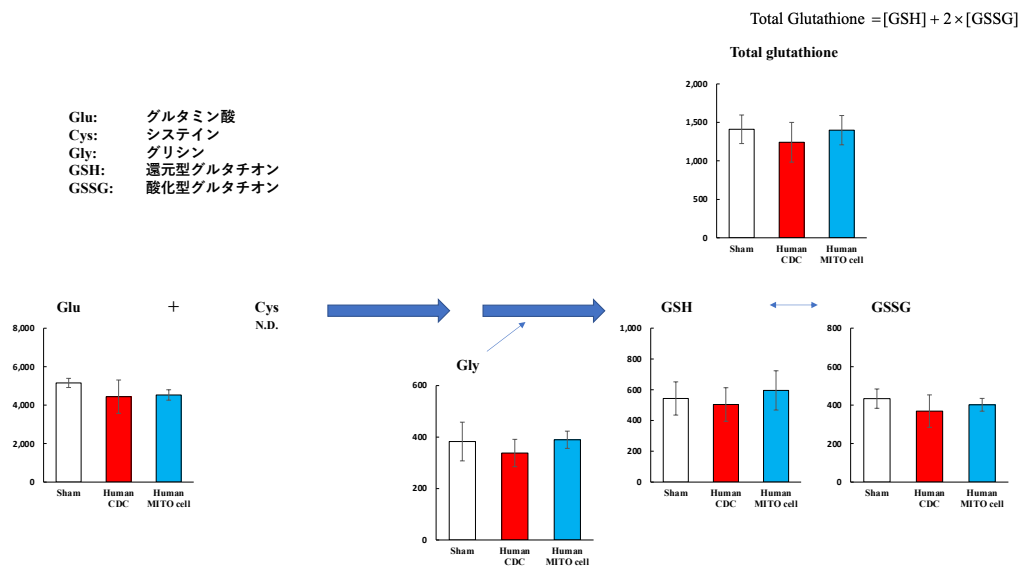


図 18 静脈内細胞移植をした心筋のグルタチオン評価

考察

考察

心筋細胞のミトコンドリアは細胞体積の 22-37%以上を占める(Hom et al, 2011; Barth et al, 1992)。体積比率は種によって異なるが、今回の実験に用いた種ではヒトで 25%、ラットで 32%と報告されている(Barth et al, 1992)。心筋細胞内には複雑なミトコンドリアネットワークが存在し、基質と ATP は糸状のミトコンドリアを通じた拡散によって細胞内に伝達される(Skulachev, 1992)。心筋細胞は、発達したミトコンドリア TCA サイクルを効率的に利用して、グルコース、アミノ酸、脂肪酸、乳酸、ケトン体などのいくつかの基質から OXPHOS を介して大量の ATP を生成する。不全心筋は、代謝に必要な基質を上手く利用できず、心筋が需要する ATP を産生することができない状態となり、“engine out of fuel” と表現される(Neubauer, 2007; Murashige et al, 2020)。心不全における心筋細胞のミトコンドリアには、構造的およびエネルギー的異常があることが報告されている(Kumar et al, 2019)。病態として ROS 産生の増加に伴うミトコンドリア損傷の増加が関連していると考えられ、ATP の産生供給と需要のアンバランスが、心臓リモデリング、炎症、機能不全を引き起こす下流のシグナル伝達経路を活性化することにつながる (Dai et al, 2011)。

細胞移植療法において、移植用心筋細胞のミトコンドリアエネルギー代謝に焦点を当てた報告も存在する(Tohyama et al, 2013; Feyen et al, 2020)。Tohyama(Tohyama et al, 2013)は、低グルコースおよび高乳酸培地で iPS 細胞を培養することにより、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を大量精製する方法を報告した。これは、心筋細胞はミトコンドリアの OXPHOS を介して乳酸からエネルギーを生成できるのに対し、未分化 iPS 細胞は主に解糖代謝経路を通じてエネルギーを生成するためである。Feyen(Feyen et al, 2020)は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の成熟を促進する高酸化基質培地を開発し、心筋細胞の電気生理学および機械的特性が改善したと報告している。今回、我々の研究では、心筋細胞のミトコンドリア機能を活性化し、心筋虚血再灌流障害に対する細胞療法の有効性を向上させる培養液添加剤(MITO-Porter(CoQ₁₀))を使用した。ヒト心筋前駆細胞のミトコンドリア機能は、血清含有培地に MITO-Porter(CoQ₁₀)を 24 時間投与することで活性化された(図 8)。

本研究の新規性は、ヒト由来細胞を使用したことに加え MITO cell の静脈内投与の効果を検証したことである。我々はこれまでに、MITO-Porter システムを用いて、ミトコンドリア活性化分子である resveratrol(RES) (Machado et al, 2019) をマウス由来の心筋前駆細胞に送達することに成功している(Abe et al, 2018; Sasaki et al, 2022)。今回の研究では、ヒト心筋前駆細胞のミトコンドリア機能を

活性化する分子として CoQ₁₀(Greenberg et al, 1990; Ratnam et al, 2006)を選択した。MITO-Porter(CoQ₁₀)はマイクロ流体デバイスを使用して大量に調製でき(Hibino, et al 2019)、CoQ₁₀ はその生体エネルギー特性と抗酸化能により心血管疾患患者の補助療法としてより臨床的に使用されている(Sue-Ling et al, 2022)。ただし、CoQ₁₀をミトコンドリアに効率よく送達するためには、今回のようなドラッグデリバリーシステムを利用する必要がある。MITO-Porter(CoQ₁₀)の表面は、カチオン性ペプチドである STR-R8 で修飾した (Futaki et al, 2001)。これまで STR-R8 修飾 MITO-Porter は、血清含有培地では細胞に取り込まれる能力が大幅に低下すると考えられ、無血清培地で使用されていた(Sasaki et al, 2022)。実際、STR-R8 修飾 MITO-Porter(CoQ₁₀)は1時間投与では細胞への取り込みが低かったが(図 6)、投与時間を調整することで血清含有培地でも細胞への取り込みを高めることができ、その効果も確認された(図 8)。無血清培地で細胞を培養すると、細胞飢餓が誘発され、細胞毒性が引き起こされる可能性がある。血清含有培地に投与できるプロトコルを確立したことで、移植細胞の機能維持に寄与すると考えられる。

心筋虚血再灌流モデルラットにヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を移植すると、心筋内投与だけでなく静脈内投与でも心機能の改善と心筋線維化の抑制が認められた(図 9-12)。これらの結果は、移植細胞から分泌されるパラクラインまたはエンドクライン因子が特定の治療効果を達成するために重要であるという仮説を裏付けている(Banerjee et al, 2018; Wysoczynki et al, 2018; Bolli et al, 2022)。細胞から分泌される主要な因子はまだ十分に解明されておらず、その特定は非常に困難な作業であると考えられている(Bolli et al, 2022)。しかし、静脈内投与では細胞を心臓に直接送達する必要がなくなるため、細胞治療がより簡便かつ安価でより安全なものとなり、外来患者でもより広く利用できるようになる(Wysoczynki et al, 2018; Bolli et al, 2022)。さらに、この投与経路は反復投与を容易にし、反復投与は単回投与よりも効果的であることが報告されている(Tokita et al, 2016; Tang et al, 2018)。たとえ投与される細胞の総数が同じであっても、複数回投与の方が単回投与より効果的であるため、静脈内細胞療法の効果は用量依存性よりも反復依存性が高いと報告されている(Tang et al, 2018)。今後、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を反復投与することで治療効果が高まるかどうかを確認したいと考えている。

20年におよぶ様々な研究にも関わらず、細胞移植が不全心の機能と構造を改善する機序は依然として不明のままである(Bolli et al, 2022)。これまでの研究(Hong et al, 2014; Tang et al, 2016; Zhu et al, 2018)に基づくと、移植した細胞が生着し、心筋細胞に分化することはほとんどないと考えられている。これらの結果は、移植細胞は心筋に分化・再生することなく心臓の機能と構造を改善することを

意味する。したがって、細胞移植の治療効果は、細胞から分泌される因子による心筋線維化・炎症・アポトーシスの減少、および血管新生の促進によるものと考えられている(Banerjee et al, 2018; Wysoczynki et al, 2018; Bolli et al, 2022)。この点を考慮すると、我々の今回の結果は、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)におけるミトコンドリア機能の活性化がパラクライン効果の強化に寄与していることを示唆している。もう一つの可能性は、移植細胞のミトコンドリアが損傷した組織細胞に移動して細胞内環境を調整するミトコンドリアトランスファーである(Paliwal et al, 2018; Islam et al, 2012; Torralba et al, 2016; Koyanagi et al, 2005; Sinha et al, 2016)。酸化ストレスや炎症状態で細胞から放出される ROS も、ミトコンドリアトランスファーを引き起こすと考えられている。ミトコンドリアトランスファーが起こったとすると、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の活性化されたミトコンドリアが損傷した細胞に対してより高い治療効果を示した可能性がある。移植細胞から損傷細胞へのミトコンドリアトランスファーのさまざまな機序が報告されており、細胞内ナノチューブ、ギャップ結合、細胞融合、微小胞、単離されたミトコンドリアの直接取り込みなどが機序と考えられている(Paliwal et al, 2018; Islam et al, 2012; Torralba et al, 2016; Koyanagi et al, 2005; Sinha et al, 2016)。これらミトコンドリアトランスファーの機序を考慮すると、移植細胞が損傷組織に直接到達することでミトコンドリアトランスファーの効果がより顕著になると考えられる。

我々はこれまでに、マウス由来 MITO cell(RES)の心筋内投与をした心筋を評価することで、MITO cell の作用機序について検討した(Abe et al, 2018; Sasaki et al, 2022)。マウス由来 MITO cell(RES) の心筋内投与は、虚血再灌流モデルマウスにおいて心筋の ROS 産生を抑制し、ミトコンドリア膜電位の低下を抑制した(Sasaki et al, 2022)。さらに、マウス由来 MITO cell(RES) の心筋内投与により、ドキシソルビシン心筋症モデルマウスにおいてミトコンドリア生合成関連遺伝子(PGC1 α 、ESRR α)および OXPHOS 関連遺伝子(SDHA、COX1、ATP5a1)の発現が増加し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体(complex I proteins)の損傷が抑制された(Abe et al, 2018)。これらの研究結果から、MITO cell は、ミトコンドリア損傷による ROS 産生の増加を特徴とする心不全または虚血再灌流環境下においても生存率が向上する可能性がある。レシピエントの心筋ミトコンドリア損傷が MITO cell によってどのように抑制されるかは、今後の研究課題である。しかし、MITO cell 移植は従来の細胞移植療法よりも高い治療効果を示すことは、従来の細胞移植療法が十分な治療効果を発揮できない原因の一つに移植細胞のミトコンドリア機能不全が挙げられる可能性が示唆された。MITO cell のさらなる研究は、細胞移植療法の治療メカニズムの解明につながる可能性があると考えられる。

さらに、細胞への H₂O₂ 負荷の結果(図 10)に基づくと、ヒト由来 MITO

cell(CoQ₁₀)は、ミトコンドリア損傷により ROS が生成される心不全や虚血再灌流環境下においても(Murashige et al, 2020)、生存率が向上している可能性があり、生存率の向上がより良い治療効果につながった可能性がある。ミトコンドリアからの ROS 産生は、心筋虚血再灌流傷害に対する重要な急性期反応である。この反応は、再灌流中の酸素と呼吸鎖複合体との相互作用による非特異的な結果であると考えられていた(Yellon and Hausenloy, 2007)。Chauchani(Chauchani et al, 2014)は、ROS 産生には特定のメカニズムがあると考え、メタボローム解析を用いて心不全急性期におけるミトコンドリア ROS 産生メカニズムを検証した。その結果、虚血中にフマル酸が増加し、コハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase : SDH)の逆転(SDH reversal)に伴ってコハク酸が増加し、再灌流中にコハク酸が急速に酸化され、complex I の逆電子輸送(reverse electron transport: RET)によって ROS が生成されると報告した。ミトコンドリア内の CoQ₁₀ プールが減少すると、RET が発生し、complex I からのスーパーオキシドの流入が増加する。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)は RET を抑制している可能性があるが、そのメカニズム解明には更なる検討が必要である。

一方で、慢性心不全にもミトコンドリア機能不全が関与していると考えられているが(Okonko and Shah, 2015)、急性期からどのように変化するのかは十分に解明されていない。慢性心不全患者への CoQ₁₀ の長期投与は、心不全の症状を改善し、重大な心血管イベントを軽減することが報告されている(Mortensen et al, 2014)。この結果は、心筋ミトコンドリア機能の活性化が慢性心不全の治療薬となる可能性があることを示している。従来、慢性心不全におけるエネルギー供給の減少は、心筋エネルギー需要を低下させる治療法すなわち β 遮断薬などで治療されてきた。しかし、ミトコンドリア機能の活性化は、枯渇したエネルギー供給を増強するための新しい治療法となる可能性がある(Brown et al, 2016)。したがって、慢性心不全時のエネルギー代謝を解明することは重要である。Takada(Takada et al, 2022)はメタボローム解析により慢性心不全モデルマウスの心筋における TCA サイクル代謝中間体を定量的に分析した。その結果、慢性心不全時にはサクシニル CoA が減少すると考えられ、低下したエネルギー産生能力の回復には 5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid: 5-ALA)の投与が有効であると結論づけた。心不全における心筋ミトコンドリアのエネルギー代謝変化を解明することは、新たな治療標的の発見につながる可能性がある。

今回の我々の研究でも、メタボローム解析を用いて虚血再灌流モデルラットの心不全慢性期における代謝産物を定量的に分析した。メタボローム解析は、疾患の表現型に近い変化をスクリーニングするのに適しており、種を超えて分析方法を共有できるという点も、本研究の評価に適していると考えた。TCA サイクルに関連するアミノ酸、特にグルタミンとグルタミン酸は、ヒト由来 MITO

cell(CoQ₁₀)を心筋内投与した心筋で有意に高かった (図 8)。さらに、グルコース 1-リン酸、グルコース 6-リン酸、フルクトース 6-リン酸などの解糖系代謝産物の濃度もヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)投与群で有意に高かった(図 15)。解糖系関連代謝産物の濃度増加の正確な原因は不明だが、TCA サイクルの効果的な利用が解糖系の亢進につながった可能性がある。結果からは、心筋が障害された急性期にヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を心筋内投与すると、慢性期においても心筋が TCA サイクルを効果的に利用できる可能性が示唆された(図 15)。これまでに、MITO cell を心筋内投与すると、ROS 生成が抑制され、ミトコンドリア機能が維持されることが示されており (Abe et al, 2018; Sasaki et al, 2022)、今回の結果は、代謝産物の解析に基づいて、心筋におけるミトコンドリア TCA サイクルが実際に効率的に利用されていることを示した。

本研究の **limitation** は、ヒト由来の細胞がラットに投与されたが、ラットに免疫抑制剤を投与していないことである。非自己細胞は免疫原性が高く、免疫拒絶や治療効果の喪失を引き起こす可能性がある。この免疫拒絶反応は、異種細胞が移植された場合に特に強くなる可能性がある。この問題を克服するには、前臨床動物モデルにおいて適切な免疫抑制のレジメンを確立する必要があるが、明確なガイドラインは現在のところ不足している (Demkes et al, 2021)。真の治療効果を検証するために、本研究ではヌードや SCID などのモデル動物の使用や免疫抑制剤の投与が必要だった。未処理の心筋前駆細胞移植群では治療効果がほとんど観察されなかったには免疫拒絶反応の影響による可能性がある。しかし、正常ラットにおいてもヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の治療効果が確認されたことは、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の有効性を示すことには変わりはない。ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)とラットの免疫系との関係は調査できていないが、投与経路によって免疫拒絶の影響も異なり、それが治療効果に影響を与えている可能性がある。

結論

- ミトコンドリア機能が活性化された移植用細胞ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を用いた細胞移植治療の効果を検証した。
- 血清含有培地に MITO-Porter(CoQ₁₀)を添加することにより、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を調製するプロトコルを確立した。
- 調製したヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)を心筋虚血再灌流モデルラットに移植し、治療効果を確認した。
- ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の心筋内投与は心機能を改善し、心筋線維化を抑制した。
- ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)は静脈内投与でも同様の効果を示し、体重が大幅に増加した。
- メタボローム解析からヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の心筋内投与により心不全慢性期においても TCA 回路を効果的に利用できている可能性が示唆された。

本研究は、移植用細胞ミトコンドリアへの機能性化合物の送達が、ヒト心筋前駆細胞移植治療の成績向上に寄与することを検証する初めての試みである。今後も MITO cell がヒト心筋再生療法に応用できる様に研究を継続していきたい。本研究ではヒトへの応用に向けてヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の静脈投与の有効性を検討した。

ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)はより強力なパラクライン効果や、効果的なミトコンドリアトランスファーを引き起こす可能性があり、これらが治療効果の向上につながる可能性がある。一方でヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の静脈内投与は心筋の代謝動態に影響を与えなかった。この結果は、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の作用機序が投与経路により異なることを示唆している。その理由として、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の静脈内投与はパラクライン効果によって心機能の低下を抑制する一方、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の心筋内投与はパラクライン効果に加えてミトコンドリアトランスファーを引き起こし、心筋代謝を変化させた可能性がある。PGC1 α の亢進はミトコンドリアトランスファーで起こることが報告されている。以前の研究では、マウス由来 MITO 細胞の心筋移植によって PGC1 α が増加した。これは、心筋投与によってミトコンドリアトランスファーが起こる可能性を示唆している。さらに、OXPHOS 活性はミトコンドリアトランスファーによって増強されることが報告されている。これは、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の心筋投与によって TCA サイクルが効果的に利用されたことを示すメタボロミクス結果と一致している。一方、静脈内に投与された細胞の大部分

は肺に捕捉され、心臓に到達する細胞はほんのわずかである。前述のミトコンドリアトランスファーのメカニズムを考慮すると、移植細胞が損傷組織に到達すると、ミトコンドリア転移はより効果的になると考えられる。ミトコンドリアトランスファーの無効性が、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の静脈内投与が代謝変化を引き起こさない理由の1つである可能性がある。

最適な投与経路を決定するには、ヒト由来 MITO cell(CoQ₁₀)の各投与経路に関する作用機序をさらに解析する必要がある。

謝辞

本研究の一部は、
北海道大学 DX 博士人材フェローシップ(JST SPRING Grant Number JPMJSP2119)
の助成を受けたものである。

本研究を遂行するにあたり、御指導・ご鞭撻を賜りました、
北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室教授・山田勇磨先生
北海道大学大学院薬学研究院未来創剤学研究室教授・原島秀吉先生
北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室の教官の先生方、学生の
皆様
に感謝を申し上げます。

研究に専念する環境を頂いた、小児科学教室の
真部淳教授
武田充人講師
循環器班の諸先生方
に感謝を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

引用文献

Abe J, Yamada Y, Takeda A and Harashima H (2018) Cardiac progenitor cells activated by mitochondrial delivery of resveratrol enhance the survival of a doxorubicin-induced cardiomyopathy mouse model via the mitochondrial activation of a damaged myocardium. *J. Control. Release.* **269**:177–188.

Banerjee MN, Bolli R and Hare JM (2018) Clinical studies of cell therapy in cardiovascular medicine: recent developments and future directions. *Circ. Res.* **123**:266–287.

Barth E, Stämmler G, Speiser B and Schaper J (1992) Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol.* **24**:669–681.

Bolli R, Solankhi M, Tang XL and Kahlon A (2022) Cell therapy in patients with heart failure: a comprehensive review and emerging concepts. *Cardiovasc. Res.* **118**:951–976.

Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, Cleland JGF, Colucci WS, Butler J, Voors AA, et al (2016) Expert consensus document: mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* **14**:238–250.

Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, et al (2014) Ischaemic accumulation of succinate

controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. **515**:431–435.

Dai DF, Chen T, Szeto H, Nieves-Cintrón M, Kutuyavin V, Santana LF and Rabinovitch PS (2011) Mitochondrial targeted antioxidant peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. **58**:73–82.

Demkes EJ, Rijken S, Szymanski MK, Hofer IE, Sluijter JPG and de Jager SCA (2021) Requirements for proper immunosuppressive regimens to limit translational failure of cardiac cell therapy in preclinical large animal models *J Cardiovasc Transl Res*. **14**:88–99.

Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, Field LJ, Fleischmann BK, Frisén J, Giacca M, Hare JM, Houser S, Lee RT, et al (2017) Cardiomyocyte regeneration: a consensus statement. *Circulation*. **136**:680–686.

Fernandez-Aviles F, Sanz-Ruiz R, Climent AM, Badimon L, Bolli R, Charron D, Fuster V, Janssens S, Kastrup J, Kim HS, et al (2017) Global position paper on cardiovascular regenerative medicine. *Eur Heart J*. **38**:2532–2546.

Feyen DAM, McKeithan WL, Bruyneel AAN, Spiering S, Hörmann L, Ulmer B, Zhang H, Briganti F, Schweizer M, Hegyi B, et al (2020) Metabolic maturation media improve physiological function of human iPSC-derived cardiomyocytes. *Cell Reports*. **32**:107925.

Futaki S, Ohashi W, Suzuki T, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Harashima H and Sugiura Y

(2001) Stearylated arginine-rich peptides: a new class of transfection systems. *Bioconjug. Chem.* **12**:1005-1011.

Greenberg S and Frishman (1990) Co-enzyme Q₁₀: a new drug for cardiovascular disease. *J. Clin. Pharmacol.* **30**:596-608.

Hibino M, Yamada Y, Fujishita N, Sato Y, Maeki M, Tokeshi M and Harashima H (2019) The use of a microfluidic device to encapsulate a poorly water-soluble drug CoQ₁₀ in lipid nanoparticles and an attempt to regulate intracellular trafficking to reach mitochondria. *J. Pharm. Sci.* **108**:2668–2676.

Hom JR, Quintanilla RA, Hoffman DL, Bentley KLM, Molkentin JD, Sheu SS, Porter Jr GA (2011) The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. *Dev Cell.* **21**:469–478.

Hong KU, Guo Y, Li QH, Cao P, Al-Maqtari T, Vajravelu BN, Du J, Book MJ, Zhu X and Nong Y, et al (2014) c-kit⁺ Cardiac stem cells alleviate post-myocardial infarction left ventricular dysfunction despite poor engraftment and negligible retention in the recipient heart. *PLoS One.* **9**:e96725.

Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, Rowlands DJ, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J (2012) Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med.* **18**:759–

765.

Junker BH, Klukas C and Schreiber F (2006) VANTED: A system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. *BMC Bioinformatics*. **7**:109.

Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM and Dimmeler S (2005) Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res*. **96**:1039–1041.

Kumar AA, Kelly DP, Chirinos JA (2019) Mitochondrial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. **139**:1435–1450.

Machado ND, Fernández MA and Díaz DD (2019) Recent Strategies in Resveratrol Delivery Systems. *Chempluschem*. **84**:951–973.

Mortensen SA, Rosenfeldt F, Kumar A, Dolliner P, Filipiak KJ, Pella D, Alehagen U, Steurer G, Littarru GP; Q-SYMBIO Study Investigators (2014) The effect of coenzyme Q₁₀ on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial. *JACC Heart Fail*. **2**:641–649.

Murashige D, Jang C, Neinast M, Edwards JJ, Cowan A, Hyman MC, Rabinowitz JD, Frankel DS and Arany Z (2020) Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart. *Science*. **370**:364–368.

Neubauer S (2007) The failing heart — an engine out of fuel. *N Engl J Med.* 2007;356:1140–1151.

Ohashi Y, Hirayama A, Ishikawa T, Nakamura S, Shimizu K, Ueno Y, Tomita M and Soga T (2008) Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Mol Biosyst.* 4:135–147.

Okonko DO and Shah AM (2015) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in CHF. *Nat Rev Cardiol.* 12:6–8.

Ooga T, Sato H, Nagashima A, Sasaki K, Tomita M, Soga T, Ohashi Y (2011) Metabolomic anatomy of an animal model revealing homeostatic imbalances in dyslipidaemia. *Mol Biosyst.* 7:1217–1223.

Paliwal S, Chaudhuri R, Agrawal A and Mohanty S (2018) Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer. *J Biomed Sci.* 25:31.

Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK and Kumar MNVR (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J. Control. Release.* 113:189-207.

Sasaki D, Abe J, Takeda A, Harashima H and Yamada Y (2022) Transplantation of MITO cells, mitochondria activated cardiac progenitor cells, to the ischemic myocardium of mouse enhances the therapeutic effect. *Sci. Rep.* 12:4344.

Sinha P, Islam MN, Bhattacharya S and Bhattacharya J (2016) Intercellular mitochondrial transfer: bioenergetic crosstalk between cells. *Curr Opin Genet Dev.* **38**:97–101.

Skulachev VP (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci.* **26**:23–29.

Sue-Ling CB, Abel WM and Sue-Ling K (2022) Coenzyme Q₁₀ as adjunctive therapy for cardiovascular disease and hypertension: a systematic review. *J Nutr.* **152**:1666–1674.

Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T and Tomita M (2010) Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics.* **6**:78–95.

Takada S, Maekawa S, Furihata T, Kakutani N, Setoyama D, Ueda K, Nambu H, Hagiwara H, Handa H, Fumoto Y, et al (2022) Succinyl-CoA-based energy metabolism dysfunction in chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* **119**:e2203628119.

Tang XL, Li Q, Rokosh G, Sanganalmath SK, Chen N, Ou Q, Stowers H, Hunt G, Bolli R (2016) Long-term outcome of administration of c-kit^{POS} cardiac progenitor cells after acute myocardial infarction: transplanted cells do not become cardiomyocytes, but structural and functional improvement and proliferation of endogenous cells persist for at least one year. *Circ Res.* **118**:1091–1105.

Tang XL, Nakamura S, Li Q, Wysoczynski M, Gumpert AM, Wu WJ, Hunt G, Stowers

H, Ou Q, Bolli R (2018) Repeated administrations of cardiac progenitor cells are superior to a single administration of an equivalent cumulative dose. *J Am Heart Assoc.* **7**:e007400.

Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, Takehara N, Nomura T, Takahashi T, Ueyama T, Yamagishi M, Yaku H, Matsubara H, et al (2007) Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* **352**:635-641.

Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, et al (2013) Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell.* **12**:127–137.

Tokita Y, Tang XL, Li Q, Wysoczynski M, Hong KU, Nakamura S, Wu WJ, Xie W, Li D, Hunt G, et al (2016) Repeated administrations of cardiac progenitor cells are markedly more effective than a single administration: a new paradigm in cell therapy. *Circ Res.* **119**:635–651.

Torralba D, Baixauli F and Sánchez-Madrid F (2016) Mitochondria know no boundaries: mechanisms and functions of intercellular mitochondrial transfer. *Front Cell Dev Biol.* **28**:107.

Tsujioka T, Sasaki D, Takeda A, Harashima H and Yamada Y (2021) Resveratrol-

encapsulated mitochondria-targeting liposome enhances mitochondrial respiratory capacity in myocardial cells. *Int J Mol Sci.* **23**:112.

Wysoczynki M, Khan A and Bolli R (2018) New Paradigms in cell therapy: repeated dosing, intravenous delivery, immunomodulatory actions, and new cell types. *Circ. Res.* **123**:138–158.

Yamada Y, Nakamura K, Abe J, Hyodo M, Haga S, Ozaki M and Harashima H (2015) Mitochondrial delivery of coenzyme Q₁₀ via systemic administration using a MITO-Porter prevents ischemia/reperfusion injury in the mouse liver. *J Control Release.* **213**:86–95.

Yamamoto H, Fujimori T, Sato H, Ishikawa G, Kami K and Ohashi Y (2014) Statistical hypothesis testing of factor loading in principal component analysis and its application to metabolite set enrichment analysis. *BMC Bioinformatics.* **15**:51.

Yellon DM and Hausenloy DJ (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* **357**:1121–1135.

Yoshida Y and Yamanaka S (2017) Induced pluripotent stem cells 10 years later: for cardiac applications. *Circ. Res.* **120**:1958–1968.

Zhu K, Wu Q, Ni C, Zhang P, Zhong Z, Wu Y, Wang Y, Xu Y, Kong M, Cheng H, et al (2018) Lack of remuscularization following transplantation of human embryonic stem

cell-derived cardiovascular progenitor cells in infarcted nonhuman primates. *Circ Res.*
122:958–969.

筒井 裕之, 磯部 光章, 伊藤 宏, 伊藤 浩, 奥村 謙, 小野 稔, 北風 政史, 絹川
弘一郎, 木原 康樹, 後藤 葉一, ほか (2017)日本循環器学会. 日本心不全学会.
急性・慢性心不全診療ガイドライン (2017年改訂版) .

http://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2017/06/JCS2017_tsutsui_h.pdf

筒井 裕之, 井手 友美, 伊藤 浩, 絹川 弘一郎, 絹川 真太郎, 木原 康樹, 斎藤
能彦, 坂田 泰史, 清水 渉, 野出 孝一, ほか (2021) 日本循環器学会. 日本心不
全学会. 急性・慢性心不全診療ガイドライン (2021年フォーカスアップデート
版)

https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2021/03/JCS2021_Tsutsui.pdf