



Title	ドキソルビン心筋症に対するミトコンドリアドラッグデリバリーシステムを用いた心筋前駆細胞移植の有効性検証
Author(s)	阿部, 二郎
Description	配架番号 : 2274
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12533号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12533
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67734
Type	doctoral thesis
File Information	Jiro_Abe.pdf



学 位 論 文

ドキソルビシン心筋症に対するミトコンドリア
ドラッグデリバリーシステムを用いた心筋前駆
細胞移植の有効性検証

(Validation of cardiac progenitor cell
therapy using mitochondrial drug delivery
system for doxorubicin-induced
cardiomyopathy)

2017年3月

北海道大学

阿部 二郎

学 位 論 文

ドキソルビシン心筋症に対するミトコンドリア
ドラッグデリバリーシステムを用いた心筋前駆
細胞移植の有効性検証

(Validation of cardiac progenitor cell
therapy using mitochondrial drug delivery
system for doxorubicin-induced
cardiomyopathy)

2017年3月

北海道大学

阿部 二郎

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	7 頁
実験方法	8 頁
実験結果	1 8 頁
考察	3 5 頁
総括および結論	3 8 頁
謝辞	3 9 頁
引用文献	4 0 頁

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。

1. Abe, J., Yamada, Y. & Harashima, H. Validation of a Strategy for Cancer Therapy: Delivering Aminoglycoside Drugs to Mitochondria in HeLa Cells. *J. Pharm. Sci.* 105, 734-740(2016).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 阿部 二郎

ミトコンドリア薬物送達システムを用いた心筋炎に対する新たな治療戦略

日本小児循環器学会 第52回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2016年7月8日・東京

2. 阿部 二郎

Innovative strategy to manage myocarditis using mitochondrial drug delivery system (DDS)

The 6th Congress of Asia-pacific Pediatric Cardiac Society, 2016年10月22日・上海

本研究の一部で国内特許を申請した。

発明の名称:心不全の治療及び／又は予防に用いるための心筋幹細胞の製造方法

出願番号 特願2016-223069

出願日 平成28年(2016年)11月16日

北海道大学管理番号 P2016-029-JP01

緒言

心臓は循環の中枢であり、その機能失調により全身臓器の循環バランスにおいて需要に対して供給が不足した病態が心不全と定義される。世界的に高齢化が進行していることと相まって、心不全の頻度は増加の一途を辿り、本邦では心不全は癌に次ぐ主要死因となっている²⁰。病期ステージ D の段階で5年生存率は20%であり、心臓移植以外に有効な治療法はない。心不全の治療としては1970年代までジキタリスなどの強心薬治療が、80年代から心腎連関に注目が集まり利尿薬治療が、90年代に入ると心筋リモデリングに着目したアンジオテンシン変換酵素阻害薬や β 遮断薬治療が、2000年代後半には世界各地で様々な幹細胞を用いた心筋細胞移植療法が臨床で開始されてきた^{18,19,30,43}。

2003年にAnversaらが、心筋組織内に分裂可能な心筋幹・前駆細胞の存在を同定したことに始まり^{33,37}、2009年にBergmannらが、ヒトの心筋再生能を実証したことで裏付けられた⁷。現在では心筋傷害時にこれらの幹細胞が一部では骨髄や心筋組織ニッチより誘導されて修復の一助を担っていることも証明されている^{28,29}。また、1998年ThomsonらのヒトES (Embryonic Stem) 細胞の樹立、2006年にYamanakaらのマウスiPS (induced Pluripotent Stem) 細胞の開発により、現在は様々な細胞種よりプログラミングされた心筋細胞が開発され⁴¹、2015年には虚血性心筋症に対してヒトES細胞由来心筋前駆細胞の臨床応用がPhillipeらにより開始されている³⁵。心筋細胞移植に関して、ES、iPS細胞のような胚性幹細胞^{8,11}が適しているのか、心筋前駆細胞^{3,46}のような体性幹細胞が優れているかは結論が出ていないが、双方に長所と短所が存在している¹⁴。本邦では、2013年にOhらが左心低形成症候群のノーウッド術後の乳児に対して心筋前駆細胞移植を行っており、8.9%の右室駆出率改善を報告している²³。また、2016年以降でSawaらがiPS細胞由来心筋シートを用いて臨床研究を開始する予定である。

重症心不全患者に対する細胞移植療法の臨床応用は基礎研究の進展とともに進んできている³²。*In vivo*研究の材料としては虚血モデルを用いたデータが主であり、2009年にTakeharaらはブタ虚血再灌流モデルにおいてbFGF (basic Fibroblast Growth Factor) シートを用いた心筋前駆細胞移植の有効性を証明したが、移植細胞の虚血後心筋での生着効率の低さを指摘した⁴⁵。また虚血心以外の病態モデルで細胞移植の有効性を示した研究は少ないが、2010年にDe

Angelis らによるラットドキソルビシン心筋症モデルを用いた心筋前駆細胞移植の生存期間延長を示した報告がある¹²。ドキソルビシン心筋症は代表的な薬剤性心筋症の1つであり、世界的に汎用されているアントラサイクリン系抗癌剤であるドキソルビシン（商品名アドリアマイシン）により心不全を発症するが、有効な治療法はない。ドキソルビシンは1967年に Arcamone らによって発見され、悪性腫瘍の化学療法剤の中心としてこれまで世界中で汎用されてきている。心毒性については1979年に Von Hoff らによって報告されて以降多数の報告がある。ドキソルビシンによる心筋組織傷害はその治療が終了した後も心血管イベントのリスクとして残る。多くの Cancer survivor が寛解後に社会復帰している時代において、小児癌でも長期生存が見込まれるようになり、アントラサイクリン系抗癌剤の心血管毒性は予後に多大な影響を及ぼし^{4,36}、その治療法の開発が急務である。

ドキソルビシン心筋症において細胞移植療法は有用であると考えられるが、De Angelis らの報告¹²にあるように心筋前駆細胞はそもそもドキソルビシン耐性が低いため、有効性を上げるためにはミトコンドリア由来の酸化ストレスが増大した心筋組織内での移植後生着率の向上が求められている^{38,39,42}。北海道大学薬学研究院薬剤分子設計学研究室の Yamada らはミトコンドリアへの薬物送達の研究から、これまでアプローチが困難であったミトコンドリアに対してミトコンドリア高膜融合性の脂質組成を探索し、膜融合を介したリポソーム型 Drug Delivery System (DDS) である MITO-Porter system^{50,51}を開発した。MITO-Porter system は送達分子サイズを問わず、*in vitro* から *in vivo* まで様々な分子を細胞内ミトコンドリアに送達することで、優れた薬理効果を発揮することが実証されている。この MITO-Porter system を用いてミトコンドリア保護分子を移植予定細胞ミトコンドリアに送達することは、ドキソルビシン心筋症の新たな心筋細胞移植治療に大きく寄与すると考えた。また、この方法は広範な酸化ストレスを病態とする重症心不全に対する心筋細胞移植療法の応用に繋がる可能性がある。そこで、今日に至るまで、薬剤分子設計学研究室と筆者が所属する北海道大学大学院医学研究科小児科教室は議論を重ね、新たな心筋幹細胞移植療法を基礎研究レベルから立ち上げることになった。2014年度よりミトコンドリア作動薬として有名なゲンタマイシン分子を MITO-Porter に封入することで、ミトコンドリア DDS を用いた細胞改変が可能であることを検証し、低用量のゲンタマイシンでヒト癌細胞に細胞死を誘導できることを証明した²。

こうして MITO-Porter system がミトコンドリア DDS として有効であることを確認した後に、本論に詳述したミトコンドリア作動性分子の選定、キャリアの構築、移植細胞選定、疾患モデル選定、実験系の構築などに着手していった。

ドキソルビシン心毒性軽減のため現在のコンセンサスとして、ドキソルビシンの用量制限、ドキソルビシンリポソーム製剤の代替使用、デクスラゾキサン（サビーン）の併用が有用とされている。ドキソルビシンの用量制限が最も有用とされており、400 mg/m² までの使用で心毒性発症率は 5% まで抑えることが可能になるが、低用量での発症の報告は多数存在し、用量制限を行った小児例においても心血管障害が経年的に発症する可能性がある^{4,24,36}。心筋毒性軽減のためのドキソルビシンリポソーム製剤（ドキシル）の使用は高価であることや適応疾患が限定されていることなどの問題がある。鉄キレート剤であるデクスラゾキサンは併用すると心筋毒性軽減に有用とされているが、その使用はドキソルビシン自体の抗腫瘍効果を阻害する可能性があり、その適応については議論の余地がある。他にドキソルビシンの心筋細胞障害の機序に関わるトポイソメラーゼ II β の遺伝子発現レベルに基づいた、ドキソルビシン用量制限や代替薬剤使用が心毒性発症予防に役立つ可能性があるが実現には至っていない。

ドキソルビシンの心筋組織障害機序は複合的とされているが、これまでの報告でその機序は大きく 2 つに分類される。1 つは心筋細胞トポイソメラーゼ II β （Top II β ）を介した DNA ダメージ、2 つ目はミトコンドリア膜障害を介したミトコンドリア内への鉄の過剰蓄積であるが、いずれの機序においても最終的には心筋細胞ミトコンドリア傷害につながり、心筋組織に過剰な酸化ストレスをもたらすことで病態を発症することが想定されている^{22,53}。

これまでの基礎研究により、多くの抗酸化剤がドキソルビシン心筋傷害抑制の可能性を示してきたが、臨床研究ではその有用性は否定的である。この要因の 1 つとして、ドキソルビシンにより心筋組織に広範な酸化ストレスが発生している状態では、心筋細胞ミトコンドリアが進行性に傷害されているため、抗酸化剤のような低分子薬剤単剤ではミトコンドリア移行性の問題があり、酸化ストレスを制御することは困難であると考えられる⁴⁷。

ミトコンドリアは古細菌由来のオルガネラであり、真核細胞は共生することで電子伝達系を介した効率的な細胞内エネルギーを獲得することが可能になっている反面、その傷害は細胞死につながる。心筋細胞はその仕事量に見合うため、ほ乳類細胞において最も多くのミトコンドリアを有しており、心筋細胞の

発生・分化においてもエネルギー需要増大とともにその細胞内数と容積は増え、成熟心筋細胞内の 50%以上を占めるといわれている。何らかの原因による心筋傷害は心筋細胞ミトコンドリアを破綻させることになり、心筋エネルギー産生障害と多大な活性酸素発生につながる²⁶。従って近年ミトコンドリアが心不全に対する治療ターゲットとして注目されている^{6,9}。ミトコンドリアの増成はミトコンドリア生合成やミトコンドリア新生 (mitochondrial biogenesis) とも言われている。細胞内エネルギー基質の低下に伴って NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) の低下が生じ、それをトリガーとしてサーチュイン分子の活性化が起こり、PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α) と呼ばれる平時は不活化状態である転写共役因子の脱アセチル化が促進される。PGC1 α は核ゲノムにコードされたミトコンドリア酸化リン酸化関連タンパク質 (OXPHOS) や抗酸化タンパク質 (Mn-SOD; manganese-superoxide dismutase, Mitochondrial catalase) など配列のプロモーター上流に移動し、ミトコンドリア新生に関連する多数の遺伝子群の転写が促進される^{5,21,27,48,49}。ドキシソルビシンは Top II β 阻害から心筋細胞核内 DNA damage response (DDR) を誘起し、PGC1 α を介したミトコンドリア新生シグナル上流を選択的に阻害することが報告されている³¹。また、PGC1 α 阻害によるミトコンドリア傷害以外にもドキシソルビシンはミトコンドリア外膜に存在する ABCB8 (ATP-binding cassette, sub-family B) ポンプに作用してミトコンドリア内に鉄の蓄積をもたらすことで、直接的なミトコンドリア傷害から細胞死を誘導していることも報告されている⁶。ミトコンドリア新生は、融合と分裂を繰り返している細胞内共生オルガネラであるミトコンドリアにとって、品質管理の機構の側面もあり、病的ミトコンドリアを排除する機構に繋がっている。従ってドキシソルビシンの心筋細胞毒性を軽減するにはミトコンドリア新生を促進し、ミトコンドリア機能を回復することが有効であると考えられる¹⁰。

レスベラトロールは 1930 年に北海道帝国大学 (現北海道大学) の Takaoka らが発見したスチルベン誘導体であり、PGC1 α 経路の上流にあるサーチュインタンパク質を介してのミトコンドリア活性化作用があるとされるミトコンドリア作動薬である。これまで線虫の寿命促進、肥満マウスの延命効果など様々な脂質代謝改善を介した有効性の報告があるが、その機序としてサーチュインタンパク質や AMPK (AMP-activated protein kinase) の活性化、ミトコンドリア呼吸鎖複合体への直接作用^{13,16}、Phosphodiesterases; PDEs 阻害作用³⁴ など

が想定されている。これまでの数多くの基礎研究からミトコンドリア新生を促進する薬剤と考えられているが、臨床試験ではこれまで有用性を示すに至っていない。その原因は、レスベラトロールがヒトで薬理効果を示すには不十分な薬物動態であることに加え、単体での細胞内への取り込みや細胞内動態に問題がある可能性が考えられる。筆者はコエンザイム Q_{10} やゲンタマイシンなどミトコンドリア作動薬である低分子薬剤を、ミトコンドリア DDS の手法を用いて標的細胞ミトコンドリアに送達し、優れた薬理効果が発揮されることを報告してきた^{52, 2)}。

本研究においては、レスベラトロールを細胞内ミトコンドリアに送達することで、ミトコンドリア新生の賦活化やそれに付随する抗酸化効果を期待できると考えた。まずレスベラトロールのミトコンドリア DDS 化の可能性について検証に取り組んだ。次に心筋前駆細胞ミトコンドリアに送達してその動態や機能を確認した。実験モデルとしてドキソルビシン心筋症を作製し、共培養による *in vitro* 移植効果の検証結果を行った後に、*in vivo* 細胞移植療法を行った (Fig. 1)。本研究では、レスベラトロールを単離心筋前駆細胞ミトコンドリアに DDS の技術を用いて導入し、それを移植ソースとして使用することにより、既報の細胞移植療法より有効な移植手段と成りうることを検証した世界で初めての報告である。

略語表

ABCB	ATP-binding cassette, sub-family B
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CPC	cardiac progenitor cell
DDS	drug delivery system
DHE	dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DOX	doxorubicin
DOPE	dioleoylphosphatidylethanolamine
EE	encapsulation efficiency
EF	ejection fraction
ES	embryonic stem
ESRRa	estrogen related receptor α
FACS	fluorescence-activated cell sorter
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
iPS	induced pluripotent stem
MACS	magnetic cell sorting
MFI	mean fluorescence intensity
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NBD-DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazole-4-yl)
SM	sphingomyelin
Top	topoisomerase
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
PA	phosphatidic acid
PDI	polydiversity index
PGC1 α	peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α
ζ -p	zeta potential

実験方法

1. 実験材料
2. 実験機器
3. 試薬調製
4. 一般操作

1. 実験材料

脂質関連

レスベラトロール：Wako (#184-02771, Tokyo)

DOPE：AVANTI POLAR LIPIDS (Alabaster, AL)

SM：AVANTI POLAR LIPIDS

NBD-DOPE：AVANTI POLAR LIPIDS

S2-peptide (STR-DArg-Dmt-Lys-Phe-DArg-Dmt-Lys-Phe-NH₂)：TORAY Research Center (Tokyo, Japan)

染色関連

Hoechst33342：DOJINDO (Kumamoto, Japan)

MitoTracker FarRedFM：Invitrogen (Carlsbad, CA)

JC-1 dye：Invitrogen (Carlsbad, CA)

DHE dye：Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)

Blue Native PAGE

ゲル：Native PAGE™ 3-12% BT 1.0 (Thermo, #11121681-0326)

Native PAGE 20x Cathode Buffer Additive (# 1154224)

Native PAGE 20x Running Buffer (#1162067)

Native PAGE 5% G-250 Sample Additive (#917755)

5% Digitonin (#917758)

キット

Sca-1 MACS sorting: Miltenyi Biotec (Cologne, Germany)

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein: Sigma (St. Louis, MO)

Cell Vue Claret FARRED: Sigma (St. Louis, MO)

緩衝液・成長因子

ダルベッコ PBS (・) : TAKARA (Shiga, Japan)

DMEM High Glucose : Wako

DMEM F-12 : Wako

Mouse basic FGF : R&D (Minneapolis, MN)

抗体関連

CD11b antibodies human and mouse FITC : Miltenyi Biotec 130-098-085

CD45 antibodies, mouse FITC : Miltenyi Biotec 130-102-778

CD29 antibodies, mouse FITC : Miltenyi Biotec 130-102-975

CD106 (VCAM-1) antibodies, mouse PE : Miltenyi Biotec 130-104-759

CD117 antibodies, mouse PE : Miltenyi Biotec 130-102-795

Rat IgG2b isotype control antibodies FITC : Miltenyi Biotec 130-103-088

Monoclonal Anti- α -Actinin (Sarcomeric) antibody : A7811 Sigma

F(ab')₂ Fragment of Goat Anti-Mouse IgG : A11017 Thermo

その他

c57BL/6 マウス (8-10 週齢, 雄) : SLC (Shizuoka, Japan)

2. 実験機器

顕微鏡関連

共焦点イメージシステム (A1Rsi, Nikon)

顕微鏡 (TiE, Nikon)

対物レンズ (Plan Apo VC60x 1.20 PFS WI, Nikon)

レーザー (Diode Laser 405nm 36mW, Ar Laser 457/488/514 40mW, DPSS

Laser 561 nm 10mW, Diode Laser 640nm 10mW, Nikon)

ダイクロイックミラー (405/488/561/640, Nikon)

フィルターセット (450/50, 525/50, 595/50, 700/75, Nikon)

遠心関連

マイクロ冷却遠心機 (3700, Kubota)

測定機器

Zeta Sizer (Nano-ZS, Malvern)

NanoDrop (ND-2000, Thermo)

発光・吸光プレートリーダー (En Spire, Perkin Elmer)

サーマルサイクラー (C1000 Touch Thermal Cyclers, BIORAD)

リアルタイム PCR システム (Light Cycler 480, Roche Applied Science)

動物実験関連

小型動物麻酔器 (ニューロサイエンス社)

人工呼吸器 (KN-58, 夏目製作所)

吸入麻酔剤 イソフルレン (ファイザー)

超音波検査機器 (福田電子)

その他

アガロースゲル電気泳動槽 (Mupid ミニゲル電気泳動槽, アドバンス)

卓上型超音波洗浄機 (AU-25C, アイワ医科工業)

ボルテックスミキサー (VORTEX-GENIE 2, Scientific Industries)

pH メーター (Docu-pH Meter, Sartorius)

トランスイルミネーター (ImageQuant LAS4000, GE ヘルスケア)

3. 試薬調製

リポソーム関連

DOPE, SM, NBD-DOPE, DiI, レスベラトロール溶液

それぞれ目的の濃度となるように 100% EtOH 溶液に溶解し、-20℃で保管。

S2-peptide 溶液は 2 mg/ml となるように DDW に溶解し、-80℃で分注して保管。

脂質は実験開始前 30 分に室温に戻し、ボルテックスで攪拌後に使用。

バッファー関連

HEPES buffer (pH 7.4) : DOJINDO (Kumamoto, Japan)

HEPES 238.31 mg を DDW で溶解し、1 N NaOH で pH 7.4 に調製した後、DDW を加え全量 100 ml とした。続いて、0.2 μ m フィルター (ADVANTEC) による濾過滅菌を行った。

PBS (-) (pH 7.4) : ダルベッコ PBS (-) 粉末 日水製薬 (Tokyo, Japan)

ダルベッコ PBS (-) 粉末 4.8g を DDW に溶解し、500 ml にメスアップしてオートクレープした。

FACS buffer: 1xPBS (-) with 1 mM EDTA+0.1% sodium azide+2% Albumin

MACS buffer: 1x PBS (-) with 2 mM EDTA+0.5% Albumin

4. 一般操作

マウス心筋前駆細胞の単離

移植ソースとして、臨床研究で既に用いられている心筋前駆細胞 (Cardiac progenitor cell, 以下 CPC) を準備した。c57BL6/J♂ 8-10w 齢 2 匹より CPC をパーコール密度勾配法で $5 \cdot 20 \times 10^4$ cells 程度取得した。Basic FGF の存在下で培養し、数回継代した後に、Sca-1 (Stem cell antigen-1) 抗体を用いて MACS ソーティングを行った。単離した細胞群を本実験で使用する CPC とし、その表面マーカーと発現遺伝子について既報との一致を確認した。

細胞表面マーカー蛍光定量

CPC の細胞混濁液を作製し、cell count 後 PBS で洗浄してペレットを作製した。細胞数が 10^7 未満の場合 MACS buffer 100 μ l+各種抗体 1 μ l を添加して 10min 氷冷静置した。Buffer 1 ml を加えて 4°C, 1500 rpm, 5 min で遠心後 500 μ l の Buffer に混濁して Flow cytometry (Gallios Flowcytometers, Indianapolis, IN) で標識 FITC または PE の蛍光定量を行った。

単純水和法によるリポソーム調製

試験管に 1 mM DOPE 溶液 112.5 μ l と 1 mM SM 溶液 25 μ l を加え、NBD で蛍光標識する際は NBD 溶液を 1 mol% になるように加えた。脂質溶液が 250 μ l になるように CHCl_3 を加え、デシケーターで溶媒を留去し、脂質フィルムを調製した。脂質濃度が 0.55 mM となるように HEPES buffer を 250 μ l 加えて室温で 15 min インキュベーション後、1 min ソニケーションを行った。S2-peptide 修飾する際は 2 mg/ml STR-S2 溶液を脂質の 10 mol% となるように添加し、室

温で 30 min インキュベーションした。

粒子物性測定

粒子径は小容量石英セル (DTS2145) にリポソームを 50 μ l 加え、Zeta Sizer を用いて測定した。ゼータ電位は HEPES buffer で 10 倍希釈してキャピラリーセル (DTS1060) に加えて測定した。

共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いた細胞内動態観察

キャリアを添加する 24 hr $\pm$ 3 hr 前に 3.5 cm glass base dish (IWAKI) に 1×10^5 cells/dish で Sca-1 positive CPC 細胞を播種し、前培養を行った (37°C、5% CO₂)。DMEM F-12 (FBS-) 1 mL にサンプルを適量添加し、3 hr インキュベート (37°C、5% CO₂) した。DMEM を除去後、DMEM F-12 (FBS+) に培地を交換した。観察前に 100 nM に合わせた Mitotracker FarRed FM で 30 min インキュベート (37°C、5% CO₂) し、ミトコンドリアを染色した。DMEM F-12 (FBS+) 1 mL で洗浄した後、DMEM F-12 (FBS+) 2 mL に培地を交換し CLSM を用いて観察を行った。

CLSM 画像輝度解析

Image Pro Plus 7.0 software (Media Cybernetics, Rockville, MD) を使用した。画像を明視野あり、なしで保存 (任意で 30-50 cells count できる枚数) し、LUTS、レーザー強度は固定して計測を行った。明視野画像を開き自由曲線 AOI で細胞を囲み、暗視野画像を開き、色調をヒストグラム設定 (RGB) 後に面積 (min 10 pixels) をカウントした。

フローサイトメトリー (FACS) を用いた細胞内取り込み評価

サンプルを添加する 24 hr $\pm$ 3 hr 前に Sca-1 positive 細胞を 1×10^5 cells/well で 6 well dish に播種し、前培養を行った (37°C、5% CO₂)。DMEM F-12 (FBS-) にサンプルを適量混合して 1 mL とし、PBS (-) 1 mL で洗浄した後に細胞に添加した。1 hr インキュベート (37°C、5% CO₂) した後に PBS (-) 1 mL で洗浄し、ヘパリン溶液 (20U/ml) 500 μ L で2回洗浄し、0.05%トリプシン溶液 500 μ L を添加して 3 min インキュベート (37°C、5% CO₂) した。DMEM F-12 (FBS+) 1 mL を加えエッペンドルフチューブに全量回収した。遠心分離 (700g、3 min、4°C) 後に上清を取り除き、

FACS buffer (0.5% BSA) を 1 mL 添加して再度遠心 (700g、3 min、4°C) した。上清を取り除き、FACS buffer 500 μ 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た。測定は BD FACS Calibur HG フローサイトメトリーシステム4カラータイプを使用した。

動物実験

国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定を遵守して実施した（「In vivo 核酸デリバリーシステム」 北海道大学薬学部承認番号 13-0062）。

細胞移植

イソフルランによる全身麻酔と頸部切開による気管展開後に気管内挿管し人工呼吸管理を行った。左鎖骨中線上に皮膚切開を加え、大胸筋・小胸筋をより分けて、胸郭を露出した。鏡視下に肋間を切開し、心膜を露出し、鈍的に脂肪組織を剥離後、左室自由壁を確認した。心筋層3カ所に 10 μ l ずつ合計 1×10^6 cells を筋注し、閉胸し、麻酔を中止して自発呼吸の出現後に抜管した。

ドキソルビシン心筋症モデルマウス作製

25 mg/kg となるように PBS (-) で 10 mg/ml のドキソルビシン溶液 (Wako) を 200 μ l に希釈し、マウスに腹腔内投与を行った。

BCA assay

標準液

1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.03125 mg/ml, 0 mg/ml (2 mg/ml/vial のものを系列希釈した)

試薬 A : 試薬 B=50:1 で 1 サンプル当たり 200 μ l 使用した

プレートリーダー用 96-well dish の 1-well 当たり 希釈したサンプル 25 μ l + 試薬 200 μ l $\rightarrow$ 37°C, 30 min 反応させた。

吸光度測定 (Abs.562) 後、標準液の検量線をひきサンプルのタンパク濃度を定量した。

Blue-Native PAGE

心筋サンプルを 2-3 mm (=1-2 mg 程度) 片に必要なサンプル分トリミングした。

0.6% ジギトニン 60 μ l に浸け、バイオマッシャーでホモジナイズし、30 min 氷上静置する。4°C, 20,000g, 30 min 遠心した。ゲルをミニ泳動装置にセットし、Cathode Buffer を泳動装置の陰イオン電極側に入れ、Anode Buffer を陽イオン電極側に入れた。BCA assay によりタンパク定量（1 サンプル 10 μ g/ μ l 程度の収量）し、8 連チップに各サンプルをタンパク濃度 1 μ g/ μ l になるように Stock solution を加えて全量 60 μ l に希釈（Digitonin を用いて Detergent/Protein ratio=6）した。Coomassie 45 μ g（1% digitonin として 4.5 μ l）を 60 μ l に加え（D/C=8）。10 μ l/well として 150 V で電気泳動し、30 min で Cathode buffer を light cathode buffer に変更し、1 hr で PAGE を終了した。引き続き Western blotting を行った。

Western blotting

PVDF 膜 1 枚および厚紙 6 枚を BN-PAGE ゲル用に 8 x 6 cm に用意し、PVDF 膜を 100%メタノールに 30 sec つけ、DDW で 2 回リンスした。トランスファーバッファー（Transfer Buffer 20x, #1095841, Invitrogen）200 ml に厚紙と膜をそれぞれ 10 min 浸透させた。ハイレッドサプライをバッファーで濡らしてその上に厚紙 3 枚ずつをのせ、ゲル、PVDF 膜の順番で加え、厚紙 3 枚でサンドし、25 V, 1 hr 転写を行った。

転写後の膜を 8%酢酸 100 ml に浸して 15 min 振盪し、転写された膜を位置がわかるように角をきっておいた。DDW で 5 min 洗浄後風乾（抗原性の安定化）、転写終了後の洗浄によりゲル染色は消えた。100% MeOH 1 min x 2、DDW x 2 リンスし、Blocking と 2 次抗体染色に進んだ。

マウス心臓からの RNA 抽出

心臓を摘出してミンチにした後、組織 30 mg を 1.4 mm ジルコニアビーズとともにエッペンドルフチューブに入れて Precellys24 (Berti)を用いて 5000 rpm, 20 sec で 2 回ホモジネートした。サンプルに TRIzol 500 μ l 入れボルテックスし、4°C, 12000 rpm, 15 min で遠心し、水相を 200 μ l 回収した。イソプロピルアルコール 200 μ l と混合し、4°C, 12000 rpm, 10 min で遠心後、上清を除去した。4°C, 70%エタノールを 500 μ l 添加し、4°C, 7500 rpm, 5 min で遠心した。上清を除去し 70%エタノールを 300 μ l 添加し、3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を 3 μ l 加えて 4°C, 15000 rpm, 5 min で遠心した。上清を除去後 100%エタノール 1 ml

加え、4℃, 15000 rpm, 3 min で遠心し、上清を除去して風乾し、Ultra Pure Water (Thermo) 85 µl を加え、DNase 処理を続けて行った。

DNase I 処理

粗 RNA 抽出液 85 µl に対して 10x buffer 10 µl, DNase I 4 µl, RNase inhibitor 1 µl を添加し、37℃, 30 min インキュベーションした。Ultra Pure Water 100 µl, Phenol/CHCl₃=5:1 (pH 4.5) を 200 µl 添加して攪拌した後、25℃, 10000 rpm, 5 min で遠心した。上清を回収し、CHCl₃ 200 µl 添加し、25℃, 10000 rpm, 5 min で遠心した。上清を回収し 100%エタノール 500 µl と 5 M NaCl 15 µl を添加し、-80℃で 1 時間冷却してから、4℃, 13000 rpm, 10 min で遠心して上清を除去した。70%エタノール 500 µl を添加し、4℃, 13000 rpm, 5 min で遠心後上清を除去した。100%エタノール 500 µl を添加し、4℃, 13000 rpm, 5 min で上清を除去し、風乾後 Ultra Pure Water 20 µl を加え、RNA 純度と濃度を Nano Drop で計測した。

逆転写反応

Ultra Pure Water を用いて Template RNA 1 µg を含んだ RNA 溶液 4.5 µl と 2x RT buffer 5 µl を順に添加し、サーマルサイクラー (65℃/5 min→4℃) にかけて、4℃のまま 20x RT enzyme Mix を添加し、サーマルサイクラー (25℃/5 min→42℃/60 min→95℃/5 min→4℃) で反応させ、cDNA を得た。RT enzyme Mix を入れない陰性コントロールを含め、duplicate で行った。

PCR

GoTaq Green Maser Mix (Promega) を用いた。20 ng/µl に調製した template cDNA 1 µl、10 µM forward primer 1 µl、10 µM reverse primer 1 µl、2x Master Mix 10 µl、Ultra Pure Water 7 µl を混ぜ、サーマルサイクラー (95℃/10 min→95℃/30 sec 変性→58℃/30 sec アニール→72℃/60 sec 伸長、以下変性に戻り 30 cycles, final 72℃/7 min 伸長→4℃/∞) で反応させ、電気泳動で DNA バンドを確認した。

定量的 PCR

cDNA template 2 µl に対して、10 µM Forward Primer 0.1 µl、10 µM Reverse

Primer 0.1 μ l、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 2.5 μ l、Ultra Pure Water 0.3 μ l を混ぜて、Light cycler 480 (Roche) で反応させて、target gene と reference gene (Gapdh) との Ct 値を用いて、 $\Delta\Delta$ Ct 法により相対定量を行った。

Primer 配列

<i>αMHC</i>	Fr: GGAAGAGTGAGCGGCCATCAAGG Re: CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG
<i>βMHC</i>	Fr: GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC Re: TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC
<i>MLC2a</i>	Fr: CAGACCTGAAGGAGACCT Re: GTCAGCGTAAACAGTTGC
<i>MLC2v</i>	Fr: GCCAAGAAGCGGATAGAAGG Re: CTGTGGTTCAGGGCTCAGTC
<i>Cardiac actin</i>	Fr: CTGAGATGTCTCTCTCTCTCTTAG Re: ACAATGACTGATGAGAGATG
<i>Nkx2.5</i>	Fr: CAGTGGAGCTGGACAAAGCC Re: TAGCGACGGTTCTGGAATTT
<i>GATA4</i>	Fr: CTGTCATCTCACTATGGGCA Re: CCAAGTCCGAGCAGGAATTT
<i>Mef2c</i>	Fr: GGCCATGGTACACCGAGTACAACGAGC Re: GGGGATCCCTGTGTTACCTGCACTTGG
<i>Pgc1α</i>	Fr: TCGAGCTGTACTTTTGTGGACGGA Re: TGCTCTTGGTGGAAGCAGGGT
<i>Esrra</i>	Fr: CAAGAGCATCCCAGGCTT Re: GCACTTCCATCCACACACTC
<i>Sdha</i>	Fr: CTTGAATGAGGCTGACTGTG Re: ATCACATAAGCTGGTCCTGT
<i>Cox1</i>	Fr: TCGGAGCCCCAGATATAGCA Re: TTTCCGGCTAGAGGTGGGTA
<i>Atp5a1</i>	Fr: CATTGGTGATGGTATTGCGC

Gapdh Re: TCCCAAACACGACAACCTCC
Fr: AGCAAGGACACTCAGCAAG
Re: TAGGCCCTCCTGTTATTATG

心筋生組織酸化ストレス評価

4°C PBS (-) で全身灌流後マウス心臓を摘出し、素早く 4°C PBS (-) で洗浄後 OCT に包埋し液体窒素で急速凍結する。8 μ m スライスで切片を作製し、DHE (終濃度 50 μ M) に 15 分遮光下 4°C で静置後、Hoechst33342 染色 (終濃度 5 μ g/ml) し、終了後すぐに CLSM 観察を行った。

心筋凍結切片作製

右房切開後心尖部より 4% PFA を注入し、全身の灌流固定を行った。4% PFA につけ 4°C で一晩置換した。4°C のまま、10% スクロースに続いて、20%、30% と、スクロース溶液に 4 時間以上つけて脱水した。OCT に包埋し 4°C で 10 分静置しなじませた。OCT を液体窒素により急速凍結した。クライオトームを用いて 10 μ m で切片作製した。

免疫組織染色

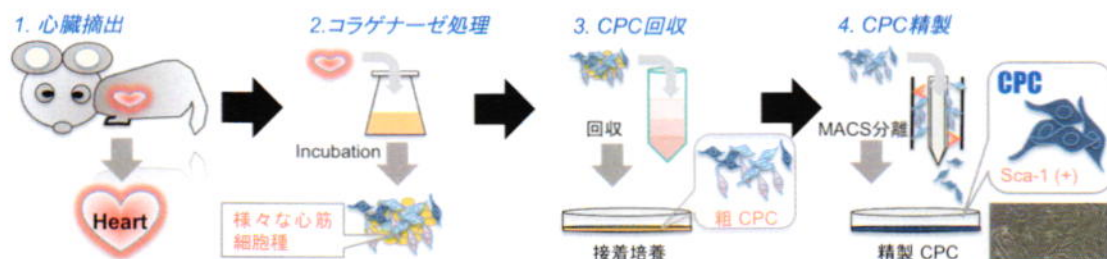
PBS (-) で 5min x 2 洗浄した。サンプル周囲を拭い、5% BSA in 0.05% Tween in PBS で 45 min blocking を開始した。PBS (-) で 5 min x 2 洗浄した後、100 倍希釈の Ms monoclonal anti-sarcomeric α actinin Ab を載せ一晩反応させた。PBS (-) で 5 min x 3 洗浄し、200 倍希釈の Alexa Fluor 488 Goat F (ab') 2 anti-Ms IgG を載せ 1 時間室温で遮光した。PBS (-) で 5 min x 3 洗浄し、50 倍希釈した Hoechst 33342 で 10 min 染色し、PBS (-) で 5 min x 3 洗浄した。封入し、カバーガラスをかけ顕微鏡観察を行った。

実験結果

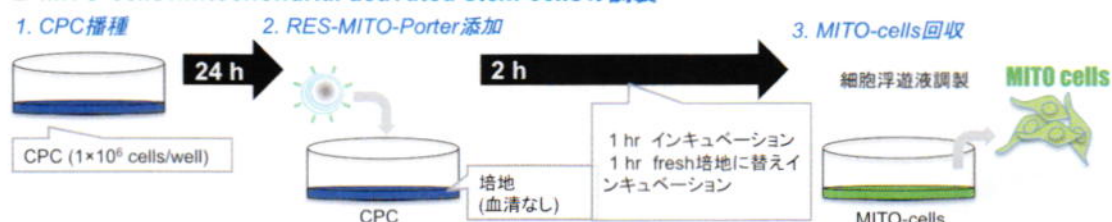
はじめに本実験の全体像を概説する (Figure 1)。若齢マウスより心臓を摘出し、心室筋から、コラゲナーゼ処理とパーコールを用いた密度勾配法を経て CPC の初代培養を確立した。磁気ビーズを用いたソーティング法 (MACS system) により Sca-1 抗原陽性 CPC を選択的に回収し、継代することで細胞移植用の CPC を準備した (Fig.1A)。MITO-Porter system によりレスベラトロールを Mt に送達し、細胞移植用の MITO-cell を作製した (Fig.1B)。マウス心臓に CPC を細胞移植した後、ドキソルビシン投与によって心筋傷害を起こし、MITO-cell を含めた CPC 細胞移植の効果を様々な角度 (生存率、心機能、分子機序) から解析した (Fig.1C)。以下の 1-3 に基づいて実験結果を記載する。

1. キャリア調製と *in vitro* 評価
2. ドキソルビシン心筋症モデルの構築と延命効果
3. ミトコンドリア機能評価

A 心筋幹(前駆)細胞 (CPC) の調製



B MITO-cells: mitochondrial activated stem cells の調製



C MITO-cells の心筋移植 & 治療効果判定

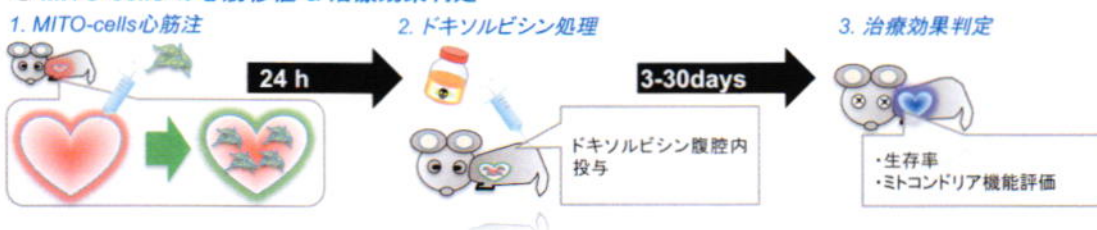


Figure 1 実験概念図

Fig.1A: 若齢マウスより心臓を摘出し、心室筋より CPC の初代培養を確立した。Sca-1 抗原陽性 CPC を回収し、継代することで細胞移植用の CPC を準備した。

Fig.1B: MITO-Porter system によりレスベラトロールをミトコンドリアに送達し、細胞移植用の *MITO-Cell* を作製した。

Fig.1C: マウス心臓に CPC を細胞移植した後、ドキソルビシン投与によって心筋傷害を起こし、*MITO-Cell* を含めた CPC 細胞移植の効果を様々な角度 (生存率、心機能、および分子機序) から解析した。

1. キャリア調製と *in vitro* 評価

心筋前駆細胞の単離とその品質評価

マウスからの心筋前駆細胞(CPC)単離は Oh らのコラゲナーゼ処理による分散法をもとに^{6, 1}、パーコール密度勾配処理により CPC 層を抽出し、初代培養した後に、Sca-1 MACS system によりソーティングをかけて選択的に Sca-1 陽性 CPC を抽出し、継代後に使用した(Figure 2)。CPC 細胞は図のようなコロニー形成能を示す形態をとり(Fig.3A)、細胞表面マーカーで CD29 (GP II a)/CD106 (VCAM-1) 陽性かつ CD11b (Integrin α M)、CD45 (Leukocyte common antigen)、CD117 (C-kit) は陰性を示し (Fig.3B)、心筋初期転写因子 (GATA4/Mef2c) が発現していた (Fig.3C)。構造タンパク質の発現は認めず、これらの結果で既報と一致をみた^{6, 1}。

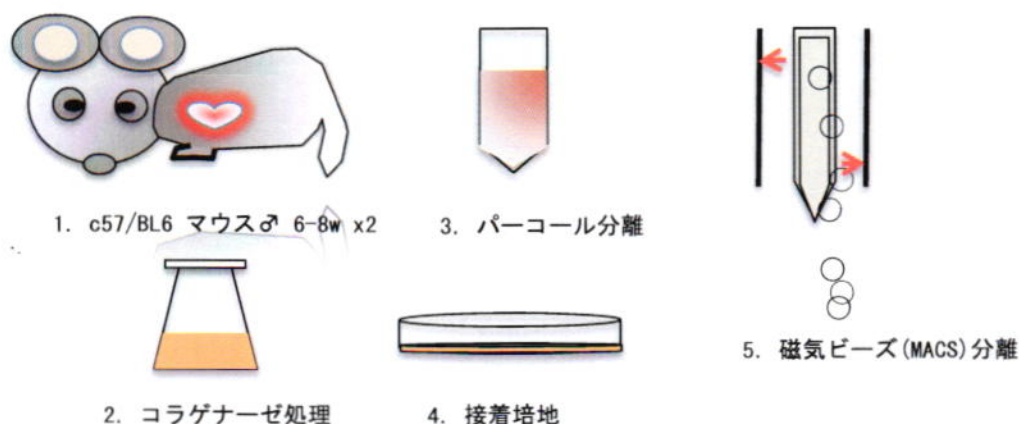


Figure 2 CPC の単離と初代培養法

8 週齢相当の c57BL6/J 雄マウス 2 匹より CPC をコラゲナーゼ処理とパーコール処理により単離し、10cm dish まで継代によるスケールアップ後、MACS システムを用いて Sca-1 陽性 CPC を確立した。

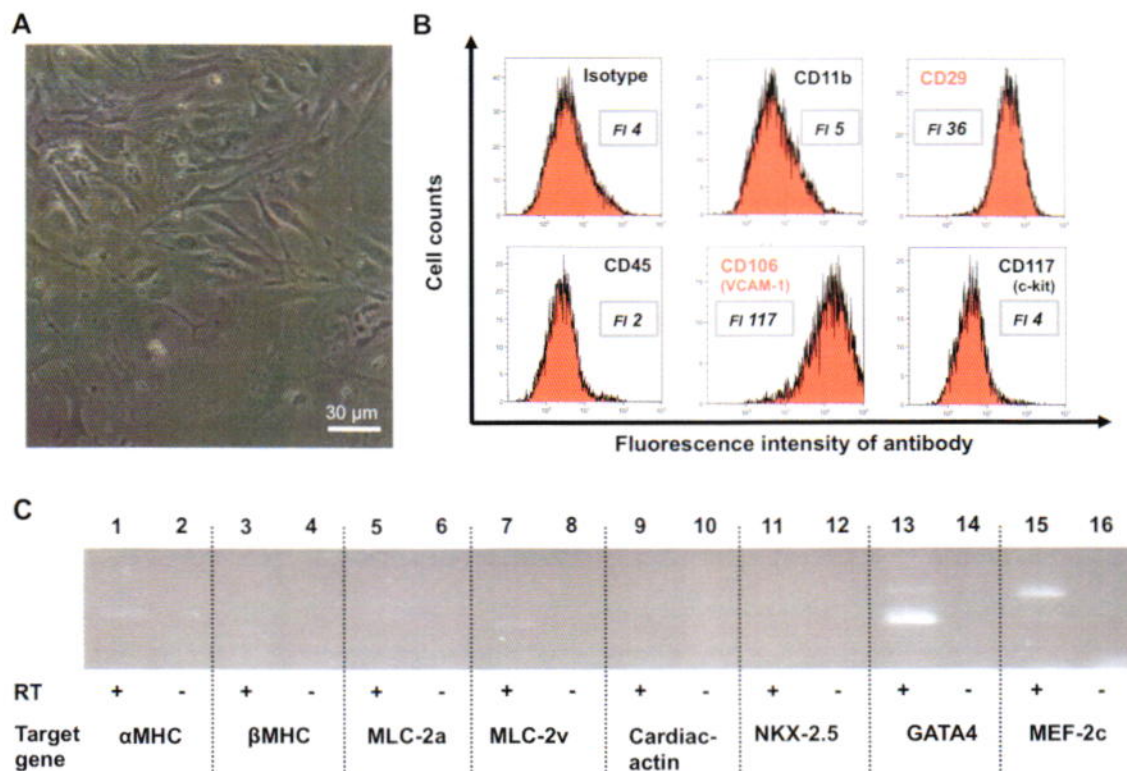


Figure 3 CPC プロファイル

初代培養 Sca-1 陽性 CPC 位相差形態 (Fig.3A)、細胞表面マーカー (Fig.3B)、心筋転写因子発現の有無 (Fig.3C) を確認した。

MITO-Porter system を用いたミトコンドリア DDS の創製

北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室の Yamada らはリポソーム型 DDS として MITO-Porter system を開発している⁵⁰。本研究で用いたミトコンドリア DDS では、基本脂質として DOPE、ヘルパー脂質として SM を用い、レスベラトロールを搭載し、表面に細胞膜突破能及びミトコンドリア指向能をもつとされる S2-peptide (SS-31)^{44,54} を使用し、モル比換算で DOPE : SM : S2 peptide = 9 : 2 : 1 となるように粒子を調製した。レスベラトロールをミトコンドリア親和性脂質二重膜内に封入した後に、MITO-Porter 表層に S2 peptide を修飾し (Fig.4A)、粒子の物性を動的光散乱法により確認した (Table. 1)。粒子径は 120nm 前後で、粒子のバラツキの指標である PDI が 0.34 ± 0.07 程度と比較的均一かつ、 ζ -potential が 48.8 mV と粒子表面が正に帯電したりポソームであり、レスベラトロールの封入率は $87 \pm 4\%$ と良好で、かつ 4℃ の HEPES buffer (pH=7.4) 溶液中で物性を経時的に測定しところ 1ヶ月間の安定性を確認でき

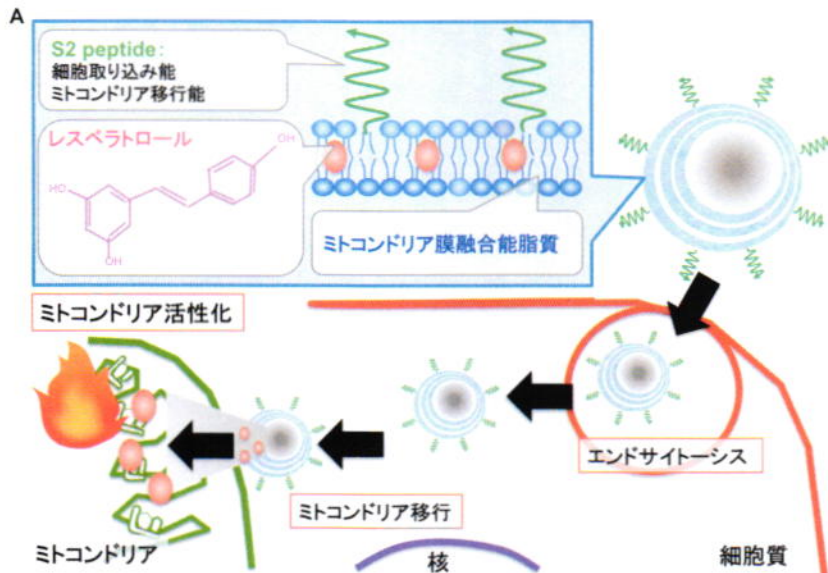
た (Fig. 4B)。以下レスベラトロール封入 MITO-Porter を RES-MITO-Porter と呼ぶ。RES-MITO-Porter は細胞内にエンドサイトーシス経路で取り込まれ、エンドソーム脱出後にミトコンドリアに近接してから膜融合を介して、最終的に薬理効果が発揮できるように設計した (Fig. 4A)。調製した粒子を蛍光修飾し、Sca-1 陽性 CPC に対する取り込みをフローサイトメトリーで確認したところ、未修飾体に比較して 4 倍の取り込み能を示した (Fig. 4C)。また RES-MITO-Porter を蛍光修飾 (緑色) して CPC 内での細胞内動態観察を共焦点レーザー走査型顕微鏡で行ったところ、MITO-Porter がミトコンドリア (赤色) と共局在した黄色のドットを多数確認できたので、RES-MITO-Porter は CPC ミトコンドリアに送達されたことが推察できた (Fig. 4D)。

Table.1 RES-MITO-Porter の物性

単純水和法で調製された RES-MITO-Porter の物性を動的光散乱法で測定し、封入率を計算した。標準誤差を使用, N=6

Properties (Simple hydration method)		PDI	ζ -P(mV)	Encapsulation efficiency(%)
	Size(nm)			
Resveratrol- DOPE/SM/ SS-31=9/2/1	120.8 $\pm$ 6.7	0.34 $\pm$ 0.07	48.8 $\pm$ 1.3	87 $\pm$ 4

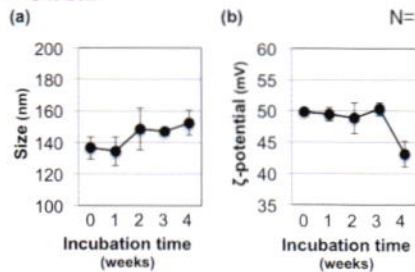
概念図



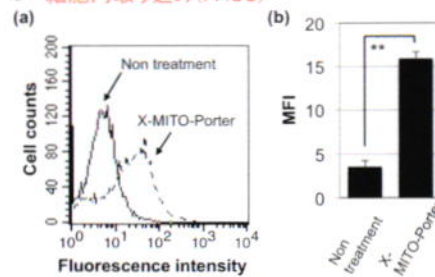
物性と細胞内動態評価

物性 (単純水和法)	サイズ (nm)	バラツキ (PDI)	電荷 (Z-P) (mV)	封入率 (%)
RES-DOPE/SM/ SS-31=9/2/1	120.8±6.7	0.34±0.07	48.8±1.3	87±4

B 安定性



C 細胞内取り込み (FACS)



D 細胞内動態観察 (CLSM)

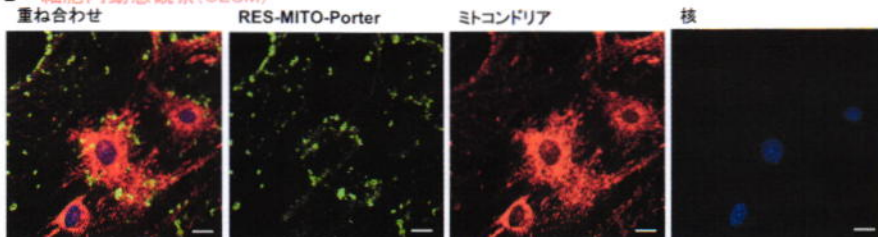


Figure 4 RES-MITO-Porter の創製

RES-MITO-Porter の構造および細胞内動態についての概念図 (Fig. 4A)、調製した粒子の安定性試験 (Fig. 4B, N=6)、粒子の細胞内取り込み能 (Fig. 4C) について評価し、細胞内動態を共焦点走査型レーザー顕微鏡で確認した (Fig. 4D Scale bar=50 μ m)。

Fig.4C(b) Student's *t* 検定, **:P<0.01, N=6

2. ドキソルビシン心筋症モデル構築と延命効果

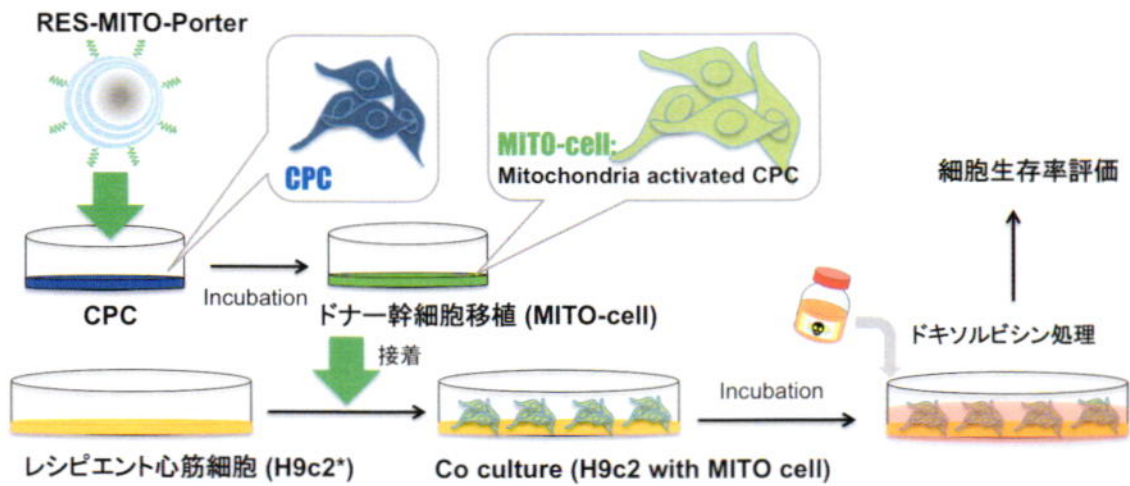
MITO-cell の開発

RES-MITO-Porter を導入した CPC を我々は MITO-cell と命名し、以下の実験では MITO-Cell の名称を使用した。

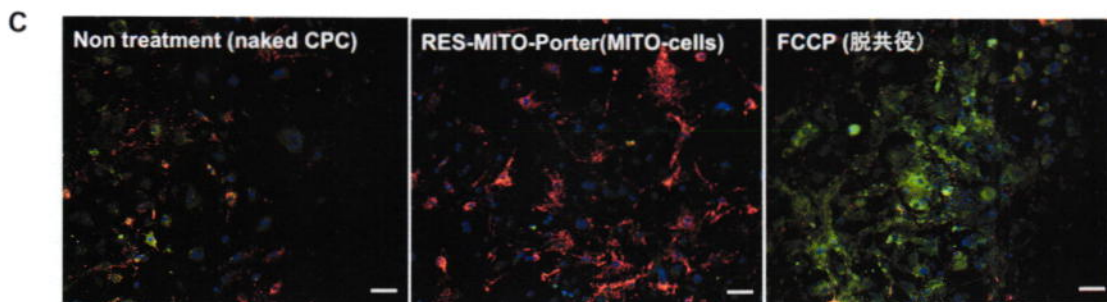
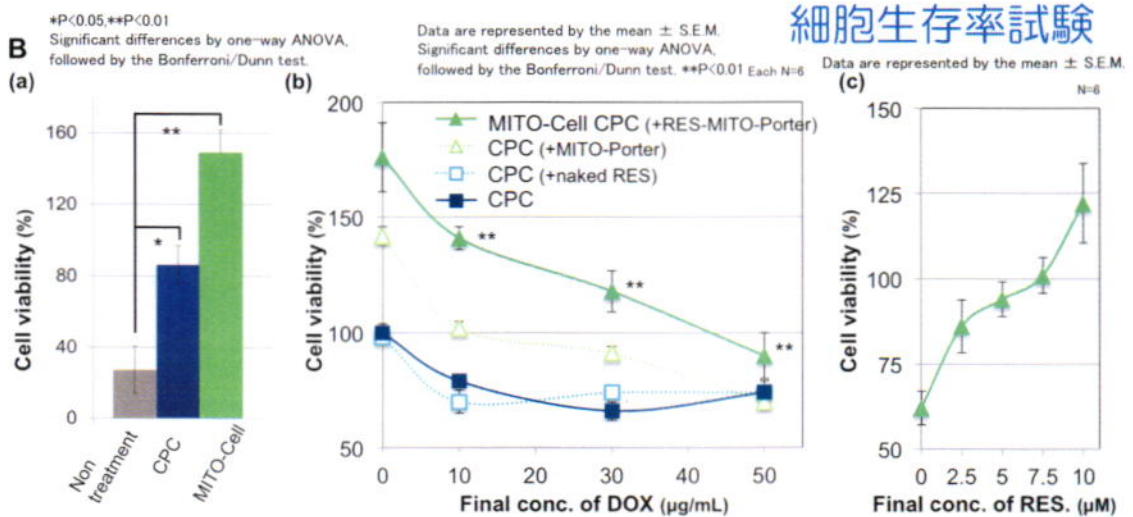
ドキソルビシン心筋症の *in vitro* モデルを想定し、実験系を作製した (Figure 5A)。心筋細胞に対する心筋前駆細胞の共培養系については既報を参考に系を構築した¹。ラット心筋細胞 (H9c2 cell line) と MITO-cell との共培養系を最適化し、ドキソルビシンで傷害を与えた。評価系は WST-1 試薬を用いた細胞生存率試験で行い、MITO-cell との共培養は有意にラット心筋細胞生存率を高めた (Fig. 5B (a))。またこの効果は、高濃度のドキソルビシン投与下でも持続し、レスベラトロールを封入しない空キャリア群 CPC (+MITO-Porter) やレスベラトロール単剤で処理した群 CPC (+RES) より有意に生存率の向上を示していた (Fig. 5B (b))。一方 MITO-cell ではレスベラトロールの濃度依存的に細胞生存率が上昇したが (Fig. 5B (c))、使用していた単純水和包法による MITO-Porter system 調製では飽和してしまうこと、封入量を上げた場合の脂質毒性などを考慮して、レスベラトロールの濃度は終濃度として 10 μ M の組成で以下の実験を行うこととした。

CPC ミトコンドリアへの RES-MITO-Porter の導入効果をミトコンドリア膜電位の変化で確認した。JC-1 色素を用いて CLSM 観察したところ、JC-1 色素で膜電位の上昇 (緑→赤) が示唆され (Fig.5C)、画像上の蛍光強度で検証したところ、約 4 倍の蛍光上昇が確認された (Fig.5D)。MITO-cell は通常のカPCと比較し、ミトコンドリア膜電位が有意に活性化されていることを確認し、心筋幹細胞移植療法用の細胞ソースとして国内特許を出願した (特願 2016-223069)。

A



*H9c2 cell : a permanent cell line derived from rat cardiac tissue (ATCC)



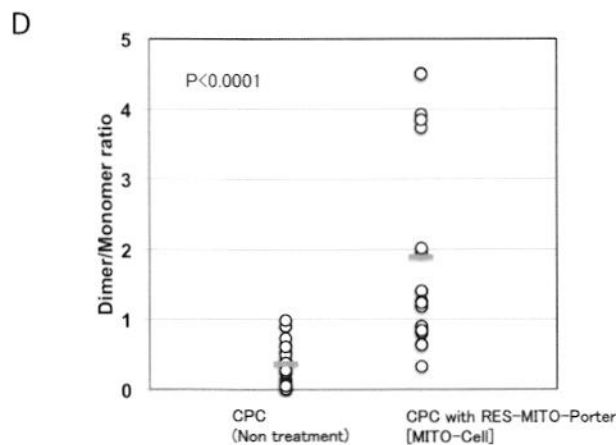


Figure 5 心筋細胞 (H9c2 cell) と CPC の共培養下でのドキソルビシン投与の影響

ラット心筋細胞 (H9c2 cell line) と MITO-cell との共培養系を最適化し、ドキソルビシンで傷害を与えた (Fig. 5A)。評価系は WST-1 試薬を用いた細胞生存率試験で行った (Fig. 5B (a)・(b))。MITO-cell の細胞生存率に対するレスベラトロール濃度の影響を確認した (Fig. 5B (c))。また MITO-cell の膜電位について JC-1 色素を用いて CLSM 観察し (Fig. 5C)、Image Pro を用いて画像から輝度を計測して膜電位の定量を行った (Fig. 5D)。

Fig. 5B: データは標準誤差を使用, Bonferroni/Dunn 検定. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 各群 $N = 6$

Fig. 5D: Student's t 検定, $N = 20$

ドキソルビシン心筋症モデルマウスに対する CPC 移植の生存率検証

8 週齢マウスを全身麻酔下に開胸し、鏡視下に CPC を移植した。移植細胞は未処理 CPC 群 (CPC)、MITO-cell 群 (MITO cell)、細胞移植を行わず PBS を心筋注射した群 (None) の 3 群と、開胸のみを施し DOX 投与未施行群 (Healthy control) の 4 群を設定した。移植後 24 時間経過した時点でドキソルビシン心筋症モデルマウスを Sui Zhang らの報告に従って作製した²⁸。

ドキソルビシン心筋症モデルマウス生存率について Kaplan-Meier 曲線を作成し、log-rank 解析により治療による生存率への影響について統計処理を行ったところ (Fig. 6)、Healthy control 群では 6 匹全例生存し、MITO-cell 群も 1 ヶ月の時点で半数の生存を認めたものの、他の 2 群では 2 週間以内に全例死亡し、MITO-cell 移植は従来の未処理 CPC 移植よりも延命効果が優れていることが示唆された。

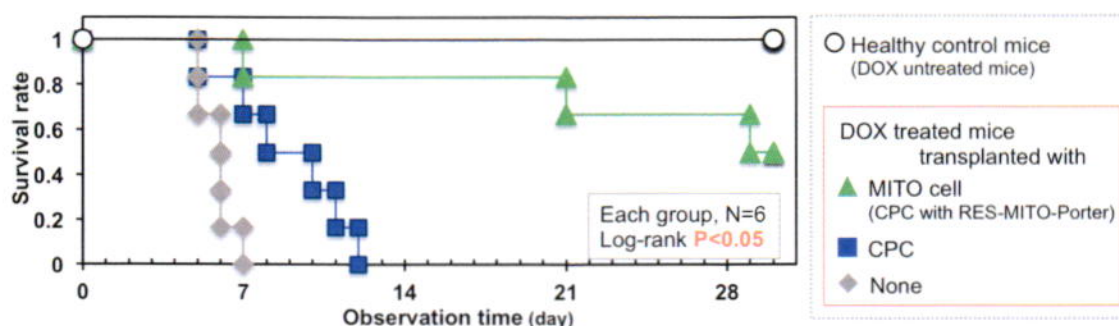


Figure 6 ドキソルビシン心筋症モデルマウスの生存率

8 週齢の c57BL6/J 雄マウスに対して DOX 投与前日に、未処理 CPC を心筋細胞移植した群 (CPC)、MITO cell を心筋細胞移植した群 (MITO cell)、細胞移植を行わず PBS を心筋注射した群 (None) の 3 群と、開胸のみを施し DOX 投与をしない群 (Healthy control) を設定した。

設定した 4 群に対して Kaplan-Meier 法を用いて生存率曲線を作成し log-rank 検定

ドキシソルビシン心筋症モデルの CPC 移植後病態評価

ドキシソルビシン心筋症における MITO-cell 移植後の病態評価として、マウスの体重推移 (Fig. 7) を評価した。体重差で統計学的有意差は認めなかったものの、MITO-cell 投与群において、投与後 7 日で体重の回復傾向を認めた。

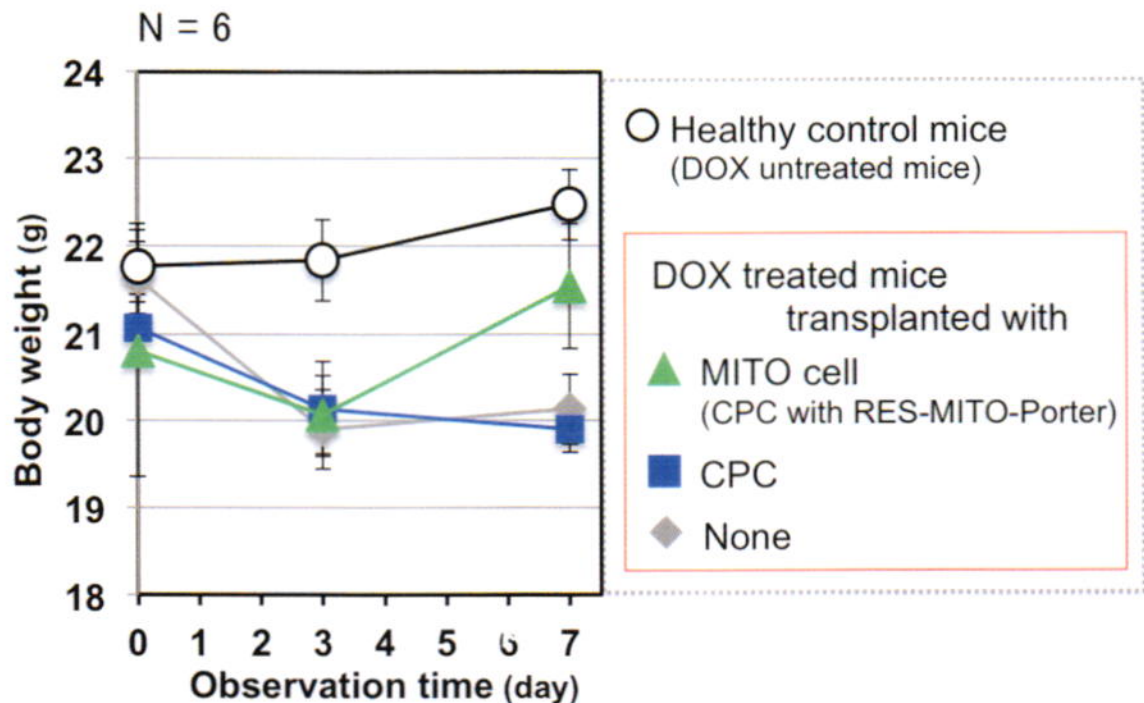


Figure 7 ドキシソルビシン心筋症モデルマウスの体重推移

DOX 25 mg/kg を腹腔内投与した時点を 0 日とし、0、3、7 日目の体重推移を評価した。

データは標準偏差を使用, Bonferroni/Dunn 検定. $P > 0.05$, N.S., 各群 N=3

CPC 移植後の心筋組織評価

CPC を移植前に赤く標識することで、移植後心筋における移植細胞生着について確認を行った。移植細胞を予め膜染色した後に、速やかに対象マウス心筋に移植した。その後に、プロトコールに沿ってドキシソルビシン心筋症モデルマウスを作製し、7 日目のマウス心筋組織で確認したところ、MITO-cell 移植群のみににおいて移植細胞の生着が確認された (Fig. 8)。

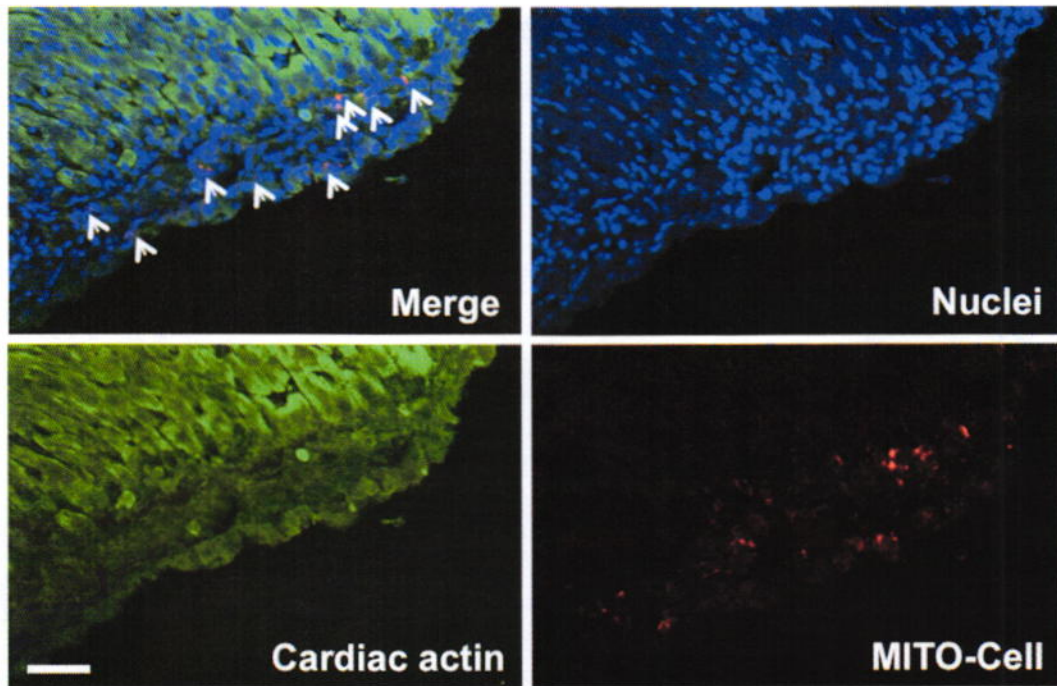
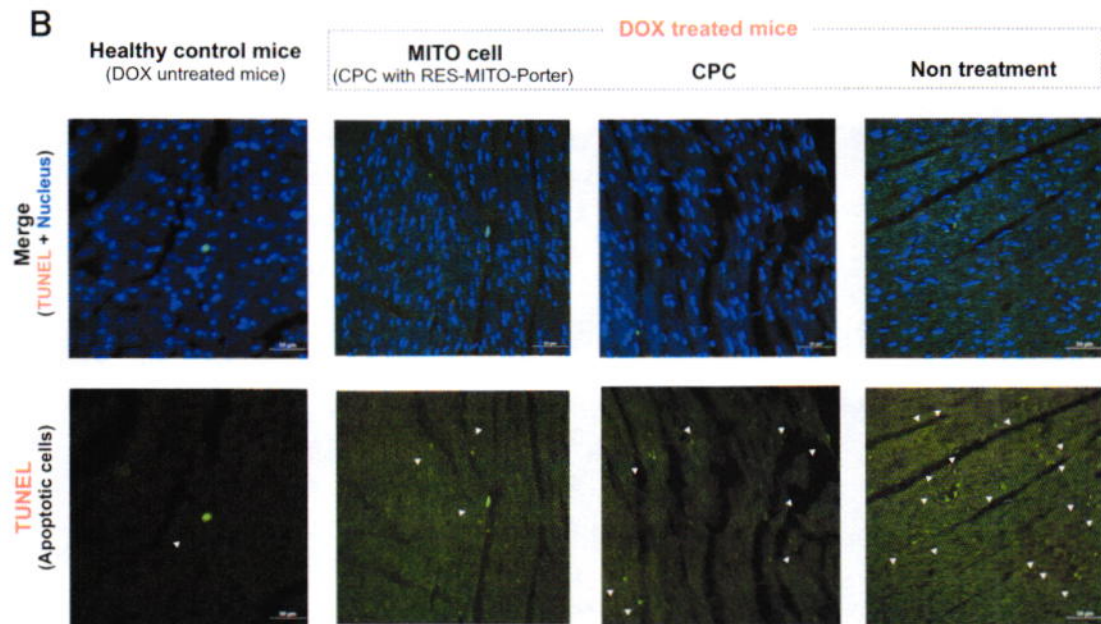
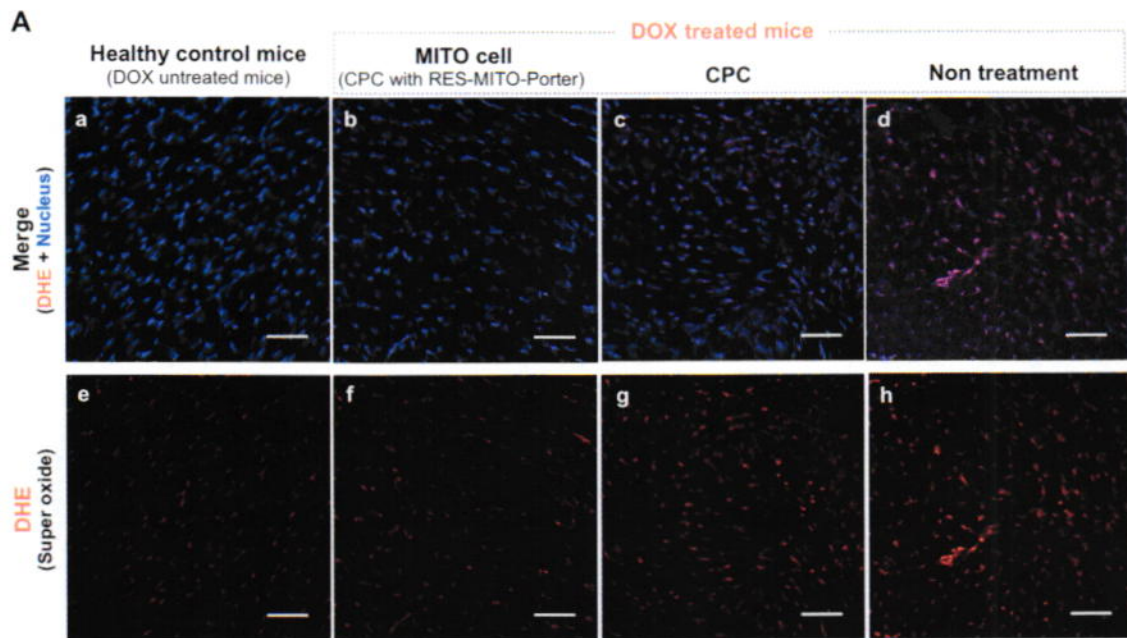


Figure 8 MITO-cell 移植後の生着評価

MITO-cell の細胞膜表面染色 (CellVue Claret, 赤色) を行った後に、移植を施行してドキシソルビシン心筋症モデルマウスを作製した。作製後 7 日目に心臓を摘出し、心筋アクチニン抗体 (緑色) で免疫組織染色を行い、細胞核は Hoechst33342 (青色) で観察前に染色した。Scale bar=100 μ m

また細胞移植による酸化ストレスへの影響を心筋生組織の DHE 染色観察で行い、また固定標本については TUNEL 染色によるアポトーシス評価を行った。ドキシソルビシン心筋症モデルマウス作製後、3 日目に心臓を摘出し、生組織を速やかに DHE 染色して心筋組織内酸化ストレスの程度を活性酸素種であるスーパーオキシドを検出することで評価した (Fig. 9A)。Healthy 群や MITO-cell 群に比べ、CPC 群や Non treatment 群では赤く染色される DHE 陽性細胞が多数確認された。

また組織固定後に TUNEL 法により免疫組織染色を行った (Fig. 9B)。Healthy 群や MITO-cell 群に比べ、CPC 群や Non-treatment 群ではアポトーシス陽性細胞 (緑色) が多数確認された。任意の視野で定量したところ、Healthy 群と MITO-cell 群に比し、CPC 群や Non-treatment 群では有意に DHE 陽性細胞数 (Fig. 9C) およびアポトーシス細胞数 (Fig. 9D) の増加を認めた。



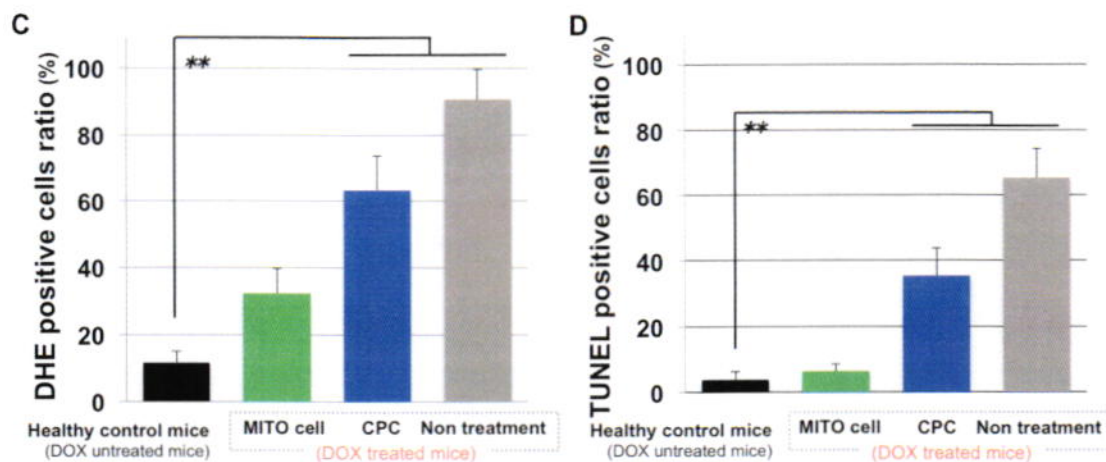


Figure 9 細胞移植による酸化ストレスへの影響と TUNEL 染色によるアポトーシス定量評価

ドキソルビシン心筋症モデルマウス作製後、3 日目に心臓を摘出し、生組織を速やかに DHE 染色して心筋組織内酸化ストレスの程度を評価した (Fig. 9A)。スーパーオキシドが発生している細胞核は赤く染色される (DHE 陽性細胞)。組織固定後に TUNEL 法により免疫組織染色を行った (Fig. 9B)。アポトーシス細胞は輝度の高い緑を呈する。いずれの実験でも核を Hoechst33342 (青色) で染色している (Scale bar = 100 μ m)。任意の視野で DHE 陽性細胞 (Fig. 9C)、TUNEL 陽性細胞 (Fig. 9D) について定量した。

Figure. 9C-D データは標準誤差を使用, Bonferroni/Dunn 検定. **P<0.01, 各群 N>180

3. ミトコンドリア機能評価

MITO-cell 移植後の心機能評価

ドキソルビシン心筋症モデルマウスの心機能評価として、断層心エコー法により左室短縮率 (Fraction Shortening) で評価を行った (Fig. 10)。ドキソルビシン治療後 30 日目で心筋症モデルマウス Healthy 群と MITO-cell 群の 2 群で比較を行ったところ、両群間において左室短縮率では統計学的有意差は認めなかったものの MITO-cell 群ではやや短縮率は低下していた。

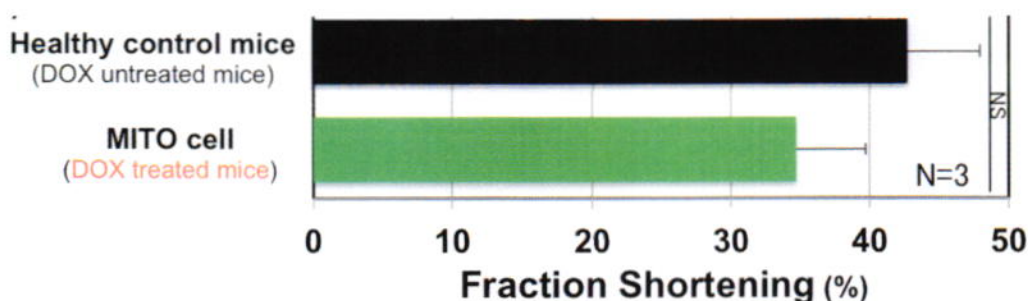


Figure 10 心臓超音波検査法による心機能評価

生存したドキソルビシン心筋症モデルマウスについて、初回 DOX 投与から 30 日目に経胸壁心臓エコー評価により左室短縮率を求めた。

Student's *t* 検定, NS: $P > 0.05$, $N = 3$

ミトコンドリア関連遺伝子発現レベル評価およびミトコンドリア呼吸鎖複合体評価

移植心筋組織のミトコンドリア関連遺伝子発現レベルについて、心筋組織から RNA を抽出し、逆転写反応後に real time PCR 法により mRNA を半定量することで確認した。PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α) や ESRR α (Estrogen Related Receptor α) などのミトコンドリア新生についての遺伝子、および OXPHOS (ミトコンドリア酸化的リン酸化) に関連する SDHA (呼吸鎖酵素複合体 II)、Cox1 (複合体 IV)、ATP5a1 (複合体 V) といった遺伝子群について組織内 mRNA 発現レベルを測定した。MITO-cell 前投与により、PGC1 α /ESRR α の発現レベルは有意に保たれており、ミトコンドリア新生が遺伝子レベルで維持されていることが示唆されており、また OXPHOS 遺伝子群も有意に維持されていた (Fig. 11A)。Blue-Native PAGE を用いて、ドキ

ソルビシンによるミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖酵素複合体 complex I の高次構造への影響についてもタンパク質レベルで確認した。MITO-cell を移植することで、心筋組織内ミトコンドリア呼吸鎖複合体 complex I は有意に保持されていた (Fig. 11B)。

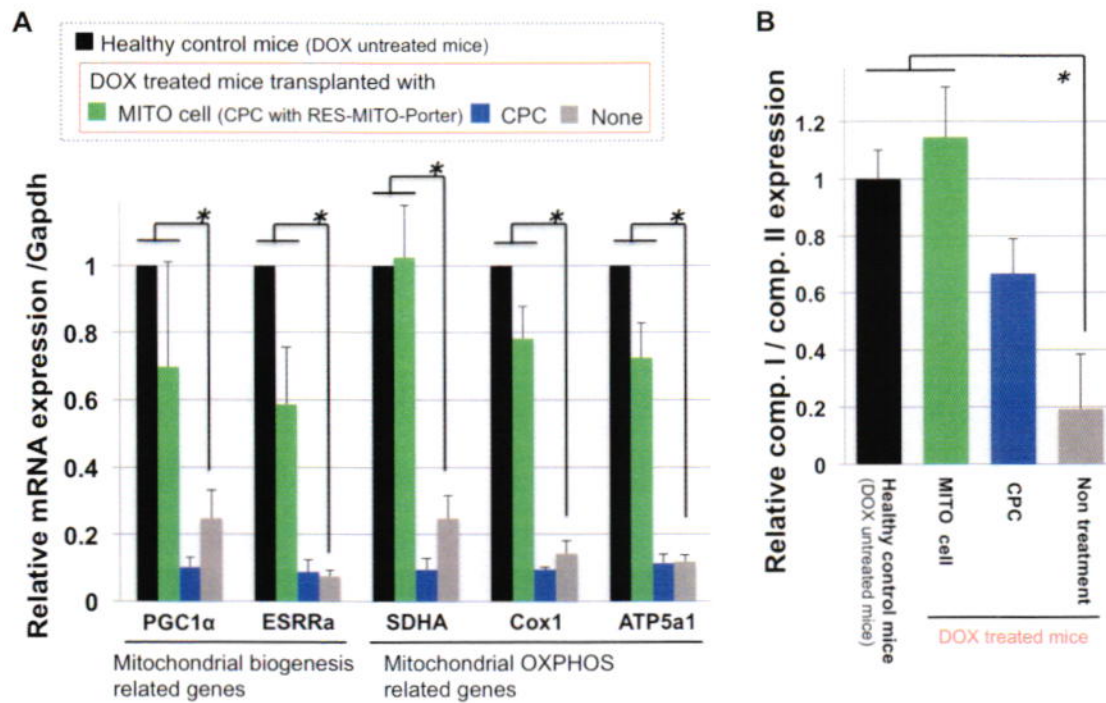


Figure 11 心筋組織内ミトコンドリア関連遺伝子と呼吸鎖酵素複合体タンパク質についての解析

ドキソルビシン心筋症モデルマウス作製後、3 日目に心臓を摘出して RNA とミトコンドリアタンパク質抽出を行い、Real time PCR (Fig. 11A) と Blue-Native PAGE (Fig. 11B) を行った。定量的 PCR によるミトコンドリア新生関連および OXPHOS 関連遺伝子発現レベルについての解析と、Blue-Native PAGE によるミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体タンパク質 (complex I) バンド定量を行った。

データは標準誤差を使用, Bonferroni/Dunn 検定. * $P < 0.05$, 各群 $N = 6$

考察

これまで CPC のみの細胞移植法の有用性^{12, 23, 32, 45}、CPC に対する遺伝子導入¹や DDS を用いない低分子薬剤処理のみ¹⁵での有用性を示した報告は存在する。北海道大学薬学研究院薬剤分子設計学研究室ではこれまでミトコンドリア DDS を用いて様々な病態モデルを対象に研究してきた成果があり、細胞内ミトコンドリアに核酸、タンパク質、低分子薬などを選択的に送達することで様々な細胞機能の変化が得られることを報告してきた^{50, 51}。そこで今回ミトコンドリア DDS により機能を高めた移植細胞ソース MITO-cell を作製し、有効な治療のないドキソルビシン心筋症を対象として、*in vitro*系から *in vivo*系まで実験を行った（実験 1-3）。

まず移植用細胞を既存の方法を用いて準備し、細胞表面マーカーや発現遺伝子について確認した。移植細胞ミトコンドリアにレスベラトロールを送達するためのリポソーム型ミトコンドリア DDS (RES-MITO-Porter) を、単純水合法を用いて調製することに成功した。これまでの MITO-Porter はミトコンドリア膜との融合に適するように、メイン脂質を DOPE で、ヘルパー脂質を SM または PA で最適な比率となるように調製し、リポソーム表面修飾をオクタアルギニン (R8) で行い、細胞膜突破およびミトコンドリア移行能をもたせていた。RES-MITO-Porter は当研究室で実績のある S2-peptide を細胞膜突破素子およびミトコンドリア移行素子として表面修飾した²⁵。S2-peptide はミトコンドリア移行能のみならず、優れたミトコンドリア内膜保護作用があると考えられており、膜融合を介した際に薬理効果作用を発揮する可能性がある^{44, 54}。RES-MITO-Porter によりレスベラトロールがミトコンドリアに送達された CPC は膜電位が上昇し、ドキソルビシン毒性が軽減することが示唆されたが、WST-1 試薬（ホルマザン色素）を用いた細胞生存率試験であり、細胞内ミトコンドリアでの Succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA)（呼吸鎖酵素複合体 II）を主にしたミトコンドリア酵素活性を測定している点で、ミトコンドリア内の代謝がレスベラトロールによりドキソルビシンのミトコンドリア毒性から保護されている可能性が示唆された。

MITO-cell は CPC と比較すると H9c2 細胞との共培養において、細胞生存率を有意に改善させた。この結果を踏まえて、マウス病態モデルを用いた *in vivo* 実験を開始した。マウス心臓に MITO-cell を移植したところ、ドキソルビシン

による毒性は軽減し、個体生存率の有意な上昇を確認することができた(実験 2)。MITO-cell の効果を検証したところ、心臓組織ではドキソルビシンによる酸化ストレスが軽減しており、アポトーシス細胞についても大幅な減少を認めた。また心臓超音波検査により心筋壁運動を計測したところ、短縮率改善については有意差を認めなかった。計測日が投与日より間もなかったので有意差がみられなかった可能性があり、左室拡張末期径計測など他のパラメーターで計測することやcardiac MRIなどの別のモダリティの使用も今後検討している。分子機序についてミトコンドリア呼吸鎖複合体タンパク質 (complex I/complex II ratio) と遺伝子発現レベルについて検討したところ、MITO-cell を移植することで、電子伝達系 complex I タンパク質レベルは比較的維持されており、ドキソルビシンにより傷害を受けることが予測される²⁸、PGC1- α や ESRR α などのミトコンドリア新生に関与する遺伝子群の発現も維持されていることが確認された(実験 3)。遺伝子発現レベルを保つことがミトコンドリア呼吸鎖複合体タンパク質の高次構造維持につながっていることが示唆された。

これまでのCPC移植療法ではDe Angelisらがドキソルビシンモデルラットで治療効果治療効果の有効性を生存率の改善で示しており¹²、また最近ではAonumaらが虚血再灌流モデルマウスで梗塞層の縮小と左室駆出率の改善で有効性を示している¹。De Angelisらの実験ではドキソルビシン投与法が少量の分割投与投与で行われており、また長期的な生存率の差でのみ比較している点が大きく本研究とは異なり、Aonumaらの研究では抗酸化遺伝子であるApe-1遺伝子が導入されたCPCを使用している点、および病態モデルが大きく異なる点で直接は比較できない。いずれの筆者もCPC移植の有用性は認めるものの、未処理のナイーブなCPC移植では病的な心筋組織内で有効性が限定されることを述べている点は見逃せない。また、レスベラトロールをCPCに投与する報告は既に存在するが¹⁵、虚血ラットモデルを用いている点、DDSを使用していない点、移植細胞のin vitro機能評価が全く行われず、エンドポイントが長期的な移植後生着率の改善と左室短縮率の改善についての評価に留まっている点などで、本研究とは大きく異なる。

本研究では MITO-cell についてミトコンドリア膜電位の上昇を確認しているが、CPC ミトコンドリアにレスベラトロールを送達することで何らかの遺伝子発現に変化が出ている可能性があり、現在 RES-MITO-Porter が CPC の遺伝子発現にどのような影響を及ぼしているかについて確認実験を進めている。また

本研究ではマウス CPC を使用しているが、今後 MITO-cell の臨床応用化を見越して、小児開心術で得られる余剰心筋から CPC を樹立する方法を確立するため、循環器外科と共同で倫理委員会への申請準備を行っている。また本研究では、MITO-cell の予防的投与により、細胞生存率、個体生存率の改善を認めたが、ドキソルビシン投与後の状態で MITO-cell を移植して予後改善を検証する、いわゆる治療的効果については確認していない。今後我々は治療的効果の有効性についても確認する予定である。また、心筋に直接送達可能な DDS が確立されていないため細胞移植療法を介して DDS の有効性を証明したが、心筋親和性を有したキャリアを開発することができれば汎用性やコストの面でも有望であり^{17,31,40}、現在当研究室では心筋 DDS の開発を勢力的に進めている。

治療法のないドキソルビシン治療関連の心筋症に苦しむ小児 cancer survivor に新たな治療法が提供できるように、大型動物を用いた *in vivo* 実験や、毒性評価、更なる機序解明などを目指して、本研究をいっそう推進していく。そして心筋症に限らず世界の主要な死因である重症心不全に対して、細胞移植療法が DDS などの技術と合わさることで一層の改良がなされ、できるだけ速やかに臨床応用されるように尽力を尽くしたい。

総括および結論

- ・ ミトコンドリア作動薬レスベラトロールと MITO-Porter system を用いて、ミトコンドリア DDS により心筋前駆細胞ミトコンドリア活性を高めることに成功し、MITO-cell と命名した。
- ・ MITO-cell を用いた細胞移植療法により、ドキソルビシン心筋症モデルマウスの生存率を、従来の心筋前駆細胞による移植法よりも有意に延長することができた。
- ・ MITO-cell を移植した心筋組織内では、ドキソルビシンの標的となるミトコンドリア新生遺伝子や OXPHOS 関連遺伝子の発現が比較的保たれており、呼吸鎖酵素複合体タンパク質レベルも一部保持されていることが確認された。
- ・ ミトコンドリア新生の亢進が MITO-cell 移植の生存率への寄与に影響していることが示唆された。

ミトコンドリア病は、ミトコンドリアや核ゲノムの異常を起因とする代謝性疾患であり、発症頻度は 1/5,000 程度で心筋罹患率は 10%を超える。近年分子生物学の進歩により、生命維持を司るミトコンドリア異常そのものが心不全、癌、糖尿病、神経変性疾患などヒトの主要な死因の病態に大きく関与し、研究対象としたドキソルビシン心筋症では薬剤が心筋ミトコンドリアを傷害し、心筋症を発症することがわかってきている。病態の解明は進んできているものの、最も重要な治療法に関しては、細胞内ミトコンドリアの複雑な heterogeneity や薬物送達の難しさのため有効な治療法がないままである。北海道大学薬学研究院薬剤分子設計学研究室の Yamada らは DDS を用いたミトコンドリア治療法開発の世界的なパイオニアであり、これまで数々の成果を上げてきたことは既に本論で述べている。彼らとの共同研究をより強力に推進し、札幌から新たなミトコンドリア治療法を世界に発信し、かつ臨床研究を通して多くの患者にとっての希望となるような新薬を開発できるように、更なる努力を続けていきたい。

謝辞

博士課程の4年にわたって原島研究室に席を置かせていただき、数多くの指導と最高の実験環境を与えてもらいながら研究に専念することができた。DDS創薬を目指して実験と議論を繰り返しながら日夜奮闘する学生や先生方の姿が何よりも大きな自分自身のモチベーションにつながり、本研究成果に繋がった。

異分野出身の実績がない私を暖かく迎え入れ、成長させていただいた薬剤分子設計学研究室の原島 秀吉教授、山田 勇磨准教授、教官の先生方、多くの学生の皆様にこの場を借りて感謝を申し上げたい。そして、大学病院の業務を外して研究に専念できる環境をいただいた、小児科教室の有賀 正教授、武田 充人助教、循環器班の諸先生方に感謝を申し上げて筆を置きたい。

引用文献

- 1 Aonuma, T., Takehara, N., Maruyama, K., Kabara, M., Matsuki, M., Yamauchi, A., Kawabe, J. & Hasebe, N. Apoptosis-Resistant Cardiac Progenitor Cells Modified With Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/ Redox Factor 1 Gene Overexpression Regulate Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Stem Cells Trans. Med.* 5, 1–12 (2016).
- 2 Abe, J., Yamada, Y. & Harashima, H. Validation of a Strategy for Cancer Therapy: Delivering Aminoglycoside Drugs to Mitochondria in HeLa Cells. *J. Pharm. Sci.* 105, 734–740(2016).
- 3 Anversa, P., Kajstura, J., Leri, A. & Bolli, R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 113, 1451–1463(2006).
- 4 Armenian, S. H., Hudson, M. M., Mulder, R. L., Chen, M. H., Constone, L. S., Dwyer, M., Nathan, P. C., Tissing, W. J. E., Shankar, S., Sieswerda, E., Skinner, R., Steinberger, J., van Dalen, E. C., van der Pal, H., Wallace, W. H., Levitt, G. & Kremer, L. C. M. Recommendations for cardiomyopathy surveillance for survivors of childhood cancer: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. *The Lancet Oncology* 16, 123–136(2015).
- 5 Baur, J. A., Ungvari, Z., Minor, R. K., Le Couteur, D. G. & de Cabo, R. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11, 443–461(2012).
- 6 Bayeva, M., Gheorghiade, M. & Ardehali, H. Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61, 599–610(2013).
- 7 Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S. & Frisen, J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98–102(2009).
- 8 Blin, G., Nury, D., Stefanovic, S., Neri, T., Guillevic, O., Brinon, B.,

- Bellamy, V., Rucker-Martin, C., Barbry, P., Bel, A., Bruneval, P., Cowan, C., Pouly, J., Mitalipov, S., Gouadon, E., Binder, P., Hagege, A., Desnos, M., Renaud, J. F., Menasche, P. & Puceat, M. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* 120, 1125-1139(2010).
- 9 Brown, D. A., Sabbah, H. N. & Shaikh, S. R. Mitochondrial inner membrane lipids and proteins as targets for decreasing cardiac ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Ther.* 140, 258-266(2013).
 - 10 Cheung, K. G., Cole, L. K., Xiang, B., Chen, K., Ma, X., Myal, Y., Hatch, G. M., Tong, Q. & Dolinsky, V. W. Sirtuin-3 (SIRT3) Protein Attenuates Doxorubicin-induced Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Respiration in H9c2 Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 290, 10981-10993(2015).
 - 11 Chong, J. J., Yang, X., Don, C. W., Minami, E., Liu, Y. W., Weyers, J. J., Mahoney, W. M., Van Biber, B., Cook, S. M., Palpant, N. J., Gantz, J. A., Fugate, J. A., Muskheli, V., Gough, G. M., Vogel, K. W., Astley, C. A., Hotchkiss, C. E., Baldessari, A., Pabon, L., Reinecke, H., Gill, E. A., Nelson, V., Kiem, H. P., Laflamme, M. A. & Murry, C. E. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510, 273-277(2014).
 - 12 De Angelis, A., Piegari, E., Cappetta, D., Marino, L., Filippelli, A., Berrino, L., Ferreira-Martins, J., Zheng, H., Hosoda, T., Rota, M., Urbanek, K., Kajstura, J., Leri, A., Rossi, F. & Anversa, P. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. *Circulation* 121, 276-292(2010).
 - 13 Desquirit-Dumas, V., Gueguen, N., Leman, G., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Chupin, S., Chevrollier, A., Vessieres, E., Ayer, A., Ferre, M., Bonneau, D., Henrion, D., Reynier, P. & Procaccio, V. Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. *J. Biol. Chem.* 288, 36662-36675(2013).

- 14 Garbern, J. C. & Lee, R. T. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell* 12, 689-698(2013).
- 15 Gorbunov, N., Petrovski, G., Gurusamy, N., Ray, D., Kim, D. H. & Das, D. K. Regeneration of infarcted myocardium with resveratrol-modified cardiac stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 174-184(2012).
- 16 Gueguen, N., Desquirit-Dumas, V., Leman, G., Chupin, S., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Vessieres, E., Ayer, A., Henrion, D., Lenaers, G., Reynier, P. & Procaccio, V. Resveratrol Directly Binds to Mitochondrial Complex I and Increases Oxidative Stress in Brain Mitochondria of Aged Mice. *PLoS One* 10, e0144290(2015).
- 17 Hastings, C. L., Roche, E. T., Ruiz-Hernandez, E., Schenke-Layland, K., Walsh, C. J. & Duffy, G. P. Drug and cell delivery for cardiac regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 84, 85-106(2015).
- 18 Hayashi, E. & Hosoda, T. Therapeutic application of cardiac stem cells and other cell types. *Biomed. Res. Int.* 2013, 736815(2013).
- 19 Heldman, A. W., DiFede, D. L., Fishman, J. E., Zambrano, J. P., Trachtenberg, B. H., Karantalis, V., Mushtaq, M., Williams, A. R., Suncion, V. Y., McNiece, I. K., Ghersin, E., Soto, V., Lopera, G., Miki, R., Willens, H., Hendel, R., Mitrani, R., Pattany, P., Feigenbaum, G., Oskoue, B., Byrnes, J., Lowery, M. H., Sierra, J., Pujol, M. V., Delgado, C., Gonzalez, P. J., Rodriguez, J. E., Bagnoli, L. L., Rouy, D., Altman, P., Foo, C. W., da Silva, J., Anderson, E., Schwarz, R., Mendizabal, A. & Hare, J. M. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA* 311, 62-73(2014).
- 20 Heusch, G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *The Lancet* 381, 166-175(2013).
- 21 Hofer, A., Noe, N., Tischner, C., Kladt, N., Lellek, V., Schauss, A. & Wenz, T. Defining the action spectrum of potential PGC-1alpha activators on a mitochondrial and cellular level in vivo. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2400-2415(2014).
- 22 Ichikawa, Y., Ghanefar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Naga Prasad, S. V., Mutharasan, R. K., Naik, T. J. & Ardehali, H.

- Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J. Clin. Invest.* 124, 617-630(2014).
- 23 Ishigami, S., Ohtsuki, S., Tarui, S., Ousaka, D., Eitoku, T., Kondo, M., Okuyama, M., Kobayashi, J., Baba, K., Arai, S., Kawabata, T., Yoshizumi, K., Tateishi, A., Kuroko, Y., Iwasaki, T., Sato, S., Kasahara, S., Sano, S. & Oh, H. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP prospective phase 1 controlled trial. *Circ. Res.* 116, 653-664(2015).
 - 24 Kalam, K. & Marwick, T. H. Role of cardioprotective therapy for prevention of cardiotoxicity with chemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer* 49, 2900-2909(2013).
 - 25 Kawamura, E., Yamada, Y. & Harashima, H. Mitochondrial targeting functional peptides as potential devices for the mitochondrial delivery of a DF-MITO-Porter. *Mitochondrion* 13, 610-614(2013).
 - 26 Kwong, J. Q. & Molkenin, J. D. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.* 21, 206-214(2015).
 - 27 Lee, C. F. & Tian, R. Mitochondrion as a Target for Heart Failure Therapy- Role of Protein Lysine Acetylation. *Circ. J.* 79, 1863-1870(2015).
 - 28 Li, X., Yu, X., Lin, Q., Deng, C., Shan, Z., Yang, M. & Lin, S. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 295-303(2007).
 - 29 Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A. & Ogawa, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 103, 697-705(1999).
 - 30 Makkar, R. R., Smith, R. R., Cheng, K., Malliaras, K., Thomson, L. E. J., Berman, D., Czer, L. S. C., Marbán, L., Mendizabal, A., Johnston, P. V., Russell, S. D., Schuleri, K. H., Lardo, A. C., Gerstenblith, G. & Marbán, E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective,

- randomised phase 1 trial. *The Lancet* 379, 895-904(2012).
- 31 Mason, D., Chen, Y. Z., Krishnan, H. V. & Sant, S. Cardiac gene therapy: Recent advances and future directions. *J. Control Release* 215, 101-111(2015).
 - 32 Matsuura, K., Honda, A., Nagai, T., Fukushima, N., Iwanaga, K., Tokunaga, M., Shimizu, T., Okano, T., Kasanuki, H., Hagiwara, N. & Komuro, I. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 2204-2217(2009).
 - 33 Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H. & Komuro, I. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 11384-11391(2004).
 - 34 Maurice, D. H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J. & Manganiello, V. C. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 290-314(2014).
 - 35 Menasche, P., Vanneaux, V., Hagege, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., Trouvin, J. H., Fabreguettes, J. R., Bellamy, V., Guillemain, R., Suberbielle Boissel, C., Tartour, E., Desnos, M. & Larghero, J. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* 36,2011-2017(2015).
 - 36 Mulrooney, D. A., Armstrong, G. T., Huang, S., Ness, K. K., Ehrhardt, M. J., Joshi, V. M., Plana, J. C., Soliman, E. Z., Green, D. M., Srivastava, D., Santucci, A., Krasin, M. J., Robison, L. L. & Hudson, M. M. Cardiac Outcomes in Adult Survivors of Childhood Cancer Exposed to Cardiotoxic Therapy: A Cross-sectional Study. *Ann. Intern. Med.* 164, 93-101(2016).
 - 37 Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L. H., Behringer, R. R., Garry, D. J., Entman, M. L. & Schneider, M. D. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12313-12318(2003).
- 38 Orogo, A. M., Gonzalez, E. R., Kubli, D. A., Baptista, I. L., Ong, S. B., Prolla, T. A., Sussman, M. A., Murphy, A. N. & Gustafsson, A. B. Accumulation of Mitochondrial DNA Mutations Disrupts Cardiac Progenitor Cell Function and Reduces Survival. *J. Biol. Chem.* 290, 22061-22075(2015).
 - 39 Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A. & Ruggiero, F. M. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ. Res.* 94, 53-59(2004).
 - 40 Pascual-Gil, S., Garbayo, E., Diaz-Herraez, P., Prosper, F. & Blanco-Prieto, M. J. Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic biomaterials. *J. Control Release* 203, 23-38(2015).
 - 41 Quijada, P., Salunga, H. T., Hariharan, N., Cubillo, J. D., El-Sayed, F. G., Moshref, M., Bala, K. M., Emathingier, J. M., De La Torre, A., Ormachea, L., Alvarez, R., Jr., Gude, N. A. & Sussman, M. A. Cardiac Stem Cell Hybrids Enhance Myocardial Repair. *Circ. Res.* 117, 695-706(2015).
 - 42 Rosca, M. G., Vazquez, E. J., Kerner, J., Parland, W., Chandler, M. P., Stanley, W., Sabbah, H. N. & Hoppel, C. L. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 80, 30-39(2008).
 - 43 Soukiasian, H. J., Czer, L. S., Avital, I., Aoki, T., Kim, Y. H., Umehara, Y., Pass, J., Tabrizi, R., Magliato, K., Fontana, G. P., Cheng, W., Demetriou, A. A. & Trento, A. A novel sub-population of bone marrow-derived myocardial stem cells: potential autologous cell therapy in myocardial infarction. *J. Heart Lung Transplant.* 23, 873-880(2004).
 - 44 Szeto, H. H. & Schiller, P. W. Novel therapies targeting inner mitochondrial membrane--from discovery to clinical development. *Pharm. Res.* 28, 2669-2679(2011).
 - 45 Takehara, N., Tsutsumi, Y., Tateishi, K., Ogata, T., Tanaka, H., Ueyama, T., Takahashi, T., Takamatsu, T., Fukushima, M., Komeda,

- M., Yamagishi, M., Yaku, H., Tabata, Y., Matsubara, H. & Oh, H. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 1858-1865(2008).
- 46 Tateishi, K., Ashihara, E., Takehara, N., Nomura, T., Honsho, S., Nakagami, T., Morikawa, S., Takahashi, T., Ueyama, T., Matsubara, H. & Oh, H. Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration. *J. Cell. Sci.* 120, 1791-1800(2007).
- 47 Vejpongsa, P. & Yeh, E. T. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 938-945(2014).
- 48 Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res.* 79, 208-217(2008).
- 49 Winnik, S., Auwerx, J., Sinclair, D. A. & Matter, C. M. Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Eur. Heart J.* 36, 3404-3412(2015).
- 50 Yamada, Y., Akita, H., Kamiya, H., Kogure, K., Yamamoto, T., Shinohara, Y., Yamashita, K., Kobayashi, H., Kikuchi, H. & Harashima, H. MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778, 423-432(2008).
- 51 Yamada, Y. & Harashima, H. Delivery of bioactive molecules to the mitochondrial genome using a membrane-fusing, liposome-based carrier, DF-MITO-Porter. *Biomaterials* 33, 1589-1595(2012).
- 52 Yamada, Y., Nakamura, K., Abe, J., Hyodo, M., Haga, S., Ozaki, M. & Harashima, H. Mitochondrial delivery of Coenzyme Q via systemic administration using a MITO-Porter prevents ischemia/reperfusion injury in the mouse liver. *J. Control Release* 213, 86-95(2015).
- 53 Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L. S., Lyu, Y. L., Liu, L. F. & Yeh, E. T. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced

- cardiotoxicity. *Nat. Med.* **18**, 1639-1642(2012).
- 54 Zhao, K., Zhao, G. M., Wu, D., Soong, Y., Birk, A. V., Schiller, P. W. & Szeto, H. H. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **279**, 34682-34690(2004).