



Title	ミトコンドリア活性化心筋前駆細胞の樹立とマウス虚血性心筋への細胞移植による治療効果に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐々木, 大輔
Description	配架番号 : 2608
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14515号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81507
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Sasaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(医学) 氏名 佐々木大輔

学位論文題名

ミトコンドリア活性化心筋前駆細胞の樹立とマウス虚血性心筋への細胞移植による治療効果に関する研究

(Studies on mitochondrion-activated cardiac progenitor cells and the therapeutic efficacy of their transplantation in an ischemia reperfusion mouse model)

要 旨

【背景と目的】虚血性心疾患を中心とした心不全は高齢化、不規則な生活習慣に伴う高血圧、糖尿病の有病率の増加などに伴い、世界中で罹患率が上昇しており、増加の一途をたどっている。また、心不全治療は薬物療法の近年のめざましい発展などもあり治療法の幅は広がってきているが、根本的な有効な治療法は確立されていない。重症な心不全に対しては心臓移植などの外科的加療が選択されるが、適応が限られていることやドナーの不足などの問題点がある。その中で、幹細胞移植は虚血性心疾患、拡張型心筋症や先天性心疾患などの心不全に対する有望な治療法として臨床試験が多数行われており、その有用性が認められている。しかし、その一方で、移植した細胞の均一な心筋細胞への分化誘導、移植後の不整脈の発生、移植方法の選択、疾患重症度における治療介入の時期の適正化、持続的な心筋幹細胞の移植効果の維持が困難とされ、心臓への細胞移植療法の克服すべき課題の一つとなっている。また、心筋梗塞などによって引き起こされる心不全は虚血に伴うミトコンドリア障害があるとされる。虚血に伴う細胞内ミトコンドリアへのエネルギー供給の不足、ミトコンドリア内での ROS 増生にともなう細胞機能の低下が起こるため心機能の低下が起こるとされる。ミトコンドリア機能を強化することは、心筋梗塞等による心臓への酸化ストレスを軽減し心不全の発症を抑制し、心機能改善に寄与するのではないかと考えられる。そこで、心不全に対する細胞移植療法において、移植細胞自体のミトコンドリア機能を上昇させることで移植効率を高め、さらに活性ミトコンドリアによる心不全改善効果を高めることができるのではないかと考えた。当研究室ではミトコンドリアを標的としたドラッグデリバリーシステムの開発(MITO-Porter)を行なっている。そのナノカプセルには低分子から DNA などの高分子まで様々な分子の封入が可能であり、その MITO-Porter による細胞実験および動物実験において、有効性を報告している。当研究において、MITO-Porter の技術を応用し、ナノカプセル内に抗酸化効果をもつレスベラトロールを封入した MITO-porter 調整し、取り込み機能の向上などを目指し改良をおこなった。一つは修飾素子をもたない DOPE/SM-LP (RES)、細胞内取り込みを上昇させるために S2 ペプチドを修飾した S2-MITO-Porter (RES)、さらに取り込みを上昇させるために S2ペプチドに加えて RP aptamer を追加修飾させる Dual ligand system を採用した RP/S2-MITO-Porter (RES)を作成した。これらを用いて単離培養した心筋幹細胞のミトコンドリアに対してレスベラトロールを送達したミトコンドリア強化細胞を作成した(MITO cell)。先行研究において薬剤性心不全モデルであるドキシソルビシン心筋症モデルマウスを作成し、S2-MITO-Porter (RES)によって作成された MITO cell を心筋に対し細胞移植を行い、その予防効果を実証している。Dual ligand system を採用した、RP/S2-MITO-Porter (RES)をもいちいて、心筋幹細胞への取り込みを従来よりも増加させることに挑戦した。その新しい MITO cell を用いた細胞移植の治療効果の証明のために、心筋虚血再灌流モデルマウスを作成し、CPC および MITO cell 用いた心筋幹細胞移植療法による治療効果の比較検討をおこなった。

【材料と方法】リポソームの一般的な作成方法である単純水和法をもちいて、1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine (DOPE)と Sphingomyelin (SM)を主成分とする脂質二重膜からなるリポソームを作成した。そのリポソーム内に抗酸化剤である Resveratrol を封入した MITO-Porter の作成をおこなった。その Resveratrol 封入 MITO-Porter に対し、一つは修飾素子をもたない DOPE/SM-LP (RES)を作成した。細胞内取り込みを上昇させるために S2 ペプチドを修飾した S2-MITO-Porter (RES)を作成した。さらに取り込みを上昇させるために S2ペプチドに加えて RP aptamer を追加修飾させる dual ligand system を採用した RP/S2-MITO-Porter (RES)を作成した。

C57BL/6 ♂ 6 週齢の心臓から移植用の細胞としてマウス心筋幹細胞(cardiac progenitor cell: CPC)を単離培養した。マウスの心筋から単離した CPCs のミトコンドリアに対し MITO-Porter を用いてレスベラトロールを導入した MITO cell を作成した。MITO-porter を細胞に取り込ませる際に、既報の MITO-Porter では有血清培地は凝集するため無血清培地を用いて細胞に添加し、細胞への取り込みを行なっていたが、改良した MITO-porter では有血清培地を用いて取り込みをおこなった。MITO-Porter の CPC への取り込みを走査型レーザー顕微鏡および、フローサイトメーターをもちいて評価おこなった。CPC および、MITO cell のミトコンドリア機能について細胞外フラックスアナライザーを用いて評価を行なった。また、C57BL/6 ♀ 8-12 週齢のマウスを用いて虚血再灌流モデルマウスを作成し、CPC および、MITO cell 移植を行い、虚血再還流の亜急性期の心筋における活性酸素の産生およびミトコンドリア膜電位評価を行った。また、30 日後に心臓エコー検査および、病理組織切片を作成し評価を行い細胞移植による治療効果を判定した。

【結果】MITO-Porter の CPC への取り込みは、DOPE/SM-LP (RES)と比較し S2-MITO-Porter (RES)の方が良好であった。Double ligand system を採用した RP/S2-MITO-Porter (RES)は S2-MITO-Porter (RES)と比較しより取り込み効率が上昇した。RP/S2-MITO-Porter (RES)をもちいて作成した MITO cell は CPC にくらべてミトコンドリア機能の向上が見られた。心筋虚血再灌流モデルマウスに対する虚血心筋への MITO cell 移植は、非移植群、CPC 群と比較し術後の体重増加を認め、心臓超音波検査による心機能評価では改善を示し、さらに組織学的な線維化の抑制を認めた。さらに MITO-Cell 移植群では、虚血再還流の亜急性期の心筋における活性酸素の産生を抑制し、ミトコンドリア膜電位の保持する傾向が見られた。

【考察】RP/S2-MITO-Porter (RES)がもっとも CPC への細胞取り込みを上昇させミトコンドリア機能の向上を認めていた。これまで当研究室で作成してきた MITO-Porter は細胞取り込みを行う際に無血清培地を用いていたが、改良した RP/S2-MITO-Porter (RES)は血清存在下での細胞取り込みを可能とした。この点は移植細胞の強化を行う視点から克服すべき問題点であった。血清存在下で細胞内へのリポソームの取り込みを行うことが可能となったことは、臨床応用を行う上で必要な条件と考えられた。こうして作成した MITO cell を用いた心臓幹細胞移植療法は既存の幹細胞移植療法に比べより良い治療効果を認めた。移植細胞の Mt に対し選択的に抗酸化剤を導入することで細胞移植効果が増強したと考えられる。MITO cell は心筋への移植細胞定着が増加し MITO cell 自身が心筋などに分化したことに加え、虚血に対するストレスに対し活性酸素の発生抑制を引き起こし、ミトコンドリア 膜電位の保持が示されたことは、心筋内の微小環境の改善を認めていると考えられた。

【結論】MITO cell は移植細胞の生存率、増殖率、生着率を高めることができる可能性を示唆しており、細胞移植療法自体の問題点を解決できる可能性がある。