



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 佐々木 大輔

主査 教授 大 場 雄 介
審査担当者 副査 教授 安 斉 俊 久
副査 准教授 岩 永 ひろみ

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)

申請者はミトコンドリアドラッグデリバリーシステム (drug delivery system, DDS) の一つである MITO-Porter を用いて、心筋幹細胞のミトコンドリアにレスベラトロールを送達し、その機能を強化したミトコンドリア活性化心筋前駆細胞を樹立した。in vitro の実験により、この細胞のミトコンドリアの活性が実際に上昇していること証明した。さらに、虚血再還流モデルマウスにおいて、ミトコンドリア活性化心筋前駆細胞移植の治療効果を示し、細胞移植療法の問題点を解決し、細胞治療の臨床応用実現について言及した。

審査にあたり、副査の安斉俊久教授から、心筋虚血再還流モデルの再還流直後に細胞移植を行う実験は、実臨床の治療では実現が難しい治療であるが、なぜ本モデルを選択したのかと質問が出された。申請者は、慢性心疾患を模倣した永久結紮モデルでは回復の余地がないほど心筋ダメージが深刻で、治療効果の評価が不可能であると判断し、急性期心筋を対象とした細胞移植療法を行ったと回答した。また、細胞移植後も薬剤効果が継続している点について質問があった。申請者は、移植後も薬剤が心筋細胞内に残存しているか否かは未検討だが、移植細胞自体のミトコンドリア活性化は継続して認められ、特にミトコンドリアの機能的変化が重要だと回答した。ついで、薬剤投与経路について、レスベラトロールは経口や静脈投与などで効果があるが、本薬剤をミトコンドリアに送達する意義はなにか、また投与した薬剤はミトコンドリアのみに存在するのか、という質問があった。申請者は、レスベラトロールは細胞外でも機能するが、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I に直接作用して膜電位を上昇させる作用があり、この点にミトコンドリア内に送達させる意義があると回答した。また、MITO-Porter は細胞質にも存在するため、細胞質での薬剤効果は除外できない。培養細胞ではミトコンドリアへの送達によりレスベラトロールの作用増強が確認できるため、ミトコンドリア内に移行した一部の MITO-Porter により運ばれたレスベラトロールの作用が重要であると回答した。

次いで、副査の岩永ひろみ教授から、MITO-Porter の細胞への取り込み経路とその後の細胞内代謝について質問が出された。申請者は、MITO-Porter の取り込みは、修飾素子により非修飾のものと比べて向上しており、この修飾素子の存在のため受容体介在型エンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれること、その後、細胞内に放出された MITO-Porter がミトコンドリアと接触すると、ミトコンドリア外膜との膜融合によりミトコンドリア内に薬剤を放出すると回答した。最終的な代謝経路として、MITO-Porter を取り込ませて二週間継代培養した細胞を観察した結果から、リソソームなどに処理されることがレーザー顕微鏡で観察されたと回答した。機能低下したミトコンドリアは、マイトファジーより代謝される。取り込まれた MITO-Porter もリソソームなどで分解されると推測されるが、現時点では機序は不明で今後の研究対象であると回答した。

最後に主査の大場雄介教授から、本学位論文で重要なのは MITO-Porter を使用した利点を、いかに明確に表現するかにあるとのコメントがあった。申請者は、薬剤を MITO-Porter を用いて封入することによる利点を *in vitro* の結果を用いて説明した。その上で記載を確認し訂正すると回答した。*in vivo* において、報告の三群に加え、薬剤のみ投与群を検討するべきではなかったかという質問があった。申請者は *in vitro* 結果に基づき *in vivo* 実験のサンプル選択を行ったと説明したが、*in vivo* 実験においても薬剤のみ投与群の追加検討を行うことで、MITO-Porter の利点を説明できると回答した。ミトコンドリアの機能強化が継続するのか、細胞の教育によるのか、薬剤効果の持続なのか、などを明らかにすることは、MITO-Porter の利点をより明確にできるため、さらに検討を進めてもらいたいとのコメントもあった。続いて、MITO-Porter に用いられている修飾素子のそれぞれの機能と、どのような効果を期待してそれぞれを用いたのかとの質問があった。これに対して申請者は、従前修飾素子として用いたポリアルギニン鎖 (R8) では、有血清培地で MITO-Porter が凝集し、かつ細胞毒性も強いいため、S2 を使用することで凝集と細胞毒性を回避した、S2 のみでは細胞内取り込み効率が R8 に比べ劣るため、アダプターによってそれを補完した。この結果、細胞質からミトコンドリアへの移行性も上昇したが、作用機序は不明な点が多く現在研究中であると返答した。

この論文は、ミトコンドリアへの DDS である MITO-Porter を使用し、心筋幹細胞からミトコンドリア活性化心筋前駆細胞を樹立、虚血再還流モデルマウスに対する細胞移植効率を向上させた。DDS 分野においても基礎医学、臨床医学研究としても大きな成果であると考えられる。今後の臨床応用に向けてさらなる研究成果が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。