



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	佐々木, 大輔
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2608 他
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/2115/81508
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Sasaki_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

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)

2021 年3月

北 海 道 大 学

佐 々 木 大 輔

学 位 論 文 (要 約)

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)

2021 年3月

北 海 道 大 学

佐 々 木 大 輔

【背景と目的】虚血性心疾患を中心とした心不全は高齢化、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、根本的に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が多数あり一般的な治療として患者に提供されることは難しいと考えられている。その中で、幹細胞移植療法は虚血性心疾患、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、心不全にはミトコンドリアの機能障害があるとされる報告がみられている。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活性酸素の増生に伴い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、およびミトコンドリア障害の抑制を行うことは、心不全の発症および進行を抑制し、心機能改善に寄与するのではないかと考えられている。そこで、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。しかしながら、細胞のミトコンドリア機能を効率よく向上させるための薬剤の報告は乏しく、実用に至っていない。ミトコンドリアの機能向上を行うためには、細胞内のミトコンドリアに直接薬剤を送達するための技術が必要だと考えられる。現在、北海道大学薬学部薬剤分子設計学研究室において、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(DDS: drug delivery system)の開発を進めている。独自に開発されたミトコンドリア標的型ナノカプセル(MITO-Porter)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。このミトコンドリア標的型DDS技術を用い北海道大学小児科学教室における、豊富な臨床経験および、臨床検体を用いて共同研究を行うこととなった。北海道大学薬学部薬剤分子設計学研究室と北海道大学小児科学教室の共同研究の一つとして、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を調製し、取り込み機能の向上などを目指し改良をおこなっている。本研究では機能性素子をもたないMITO-Porter、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MITO-Porter、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を追加修飾させる二重修飾法を採用したMITO-Porter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-Porterによってミトコンドリアを強化した心筋幹細胞に対し、我々はMITO cellと名付けた。先

行研究において薬剤性心不全モデルであるドキソルビシン心筋症モデルマウスを作成し、S2 ペプチドを修飾した MITO-Porter 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。二重修飾法を採用した MITO-Porter を用いて、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、マウス心筋幹細胞(cardiac progenitor cells:CPCs)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。さらに、臨床応用のために、ヒトの心筋組織から心筋前駆細胞の単離をおこなった。単離したヒト心筋前駆細胞に対して MITO-Porter を用い、ミトコンドリア活性化ヒト心筋前駆細胞の作成をおこなった。

【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用いて、1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine (DOPE)とスフィンゴミエリン(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 レスベラトロールを封入した MITO-Porter の作成をおこなった。そのレスベラトロール封入 MITO-Porter に対し、機能性素子をもたない DOPE/SM-LP (RES)を作成した。細胞内取り込みの上昇のために 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 アプタマーを追加修飾させる二重修飾法を用いて RP/S2-MITO-Porter (RES)を作成した。

移植用の細胞としてマウスから CPCs を単離培養した。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 の CPCs への取り込みを共焦点レーザー走査型顕微鏡および、フローサイトメーターを用いて評価をおこなった。CPCs 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、マウスを用いて虚血再灌流モデルマウスを作成し、CPCs および、MITO cell 移植を行い、虚血再灌流の亜急性期の心筋の活性酸素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。

また、手術検体から得られたヒトの心筋組織から、心筋前駆細胞の単離を行なった。単離した細胞の表面抗原の確認を行い心筋前駆細胞の確認をおこなった。その単離した心筋前駆細胞に対して、MITO-Porter を作用させ細胞内への取り込みおよび、ミトコンドリア機能を調べた。

【結果】 MITO-Porter の CPCs 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。二重修飾を採用した 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。細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能評価において、RP/S2-MITO-Porter (RES)をもちいて作成した MITO cell は CPCs と比較し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、CPCs 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左室収縮率の改善を示し、さらに組

組織的な心筋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 ROS 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。また、ヒト心筋前駆細胞において、MITO-Porter の細胞内取り込みを確認し、かつ細胞実験においてミトコンドリアの活性の向上を確認することができた。

【考察】RP/S2-MITO-Porter (RES) がもっとも CPCs 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。移植細胞のミトコンドリア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 ROS 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。ヒト心筋幹細胞でもマウス CPCs と同様の細胞実験の結果が得られていた。動物実験は現時点では行うことができていないが、今後実験を進めていくことで臨床応用へ広げていくことができる可能性が高いと考えられる。

【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。さらに、ヒト心筋前駆細胞にも取り込み、ミトコンドリア機能の向上が確認できたことは、将来の臨床応用に大きなきっかけとなる可能性がある。