



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	白石, 真大
Description	配架番号 : 2831
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15897号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/92095">https://hdl.handle.net/2115/92095</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	SHIRAIISHI_Masahiro_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 白石 真大

### 学位論文題名

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)

【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 Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>)を選択し、ヒト心筋前駆細胞の血清含有培養液に CoQ<sub>10</sub> を封入した MITO-Porter(CoQ<sub>10</sub>)を添加した。MITO-Porter(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)はヒト心筋前駆細胞に取り込まれていた。MITO-Porter(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)投与 24 時間で活性化された。さらにヒト由来 MITO cell(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)を移植して治療効果を調べたところ、ヒト由来 MITO cell(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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と、ヒト由来 MITO cell(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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(CoQ<sub>10</sub>)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。