



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14515
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96787
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Sasaki.pdf



学 位 論 文

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

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

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 項
要旨	2 項
略語表	5 項
緒言	6 項
方法	9 項
結果	17 項
考察	41 項
結論	44 項
謝辞	46 項
利益相反	47 項
引用論文	47 項

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学会に発表した。

1. 佐々木大輔, 山田勇磨, 阿部二郎, 武田充人 原島秀吉
ミトコンドリア活性化幹細胞を用いた心筋幹細胞移植療法の確立
第12回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2018.9.16 札幌

2. 佐々木大輔, 山田勇磨, 阿部二郎, 武田充人 原島秀吉
ミトコンドリア強化型幹細胞を用いた虚血再灌流モデルマウスにおける細胞移植治療
の検討
第18回 日本ミトコンドリア学会 2018.12.07 久留米

3. 佐々木大輔, 山田勇磨, 阿部二郎, 武田充人 原島秀吉
虚血再灌流モデルマウスを用いた心不全に対するミトコンドリア活性化心筋幹細胞を
用いた細胞移植療法の治療効果の検討
第55回 日本小児循環器学会総会・学術集会 2019.6.29 札幌

4. Daisuke Sasaki, Yuma Yamada, Jiro Abe, Atsuhito Takeda, Hideyoshi Harashima
Examination of cell transplantation treatment in an ischemia reperfusion model
mouse using mitochondrial activated cardiac progenitor cells (MITO-cell).
the 16th Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and 19th
Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine(J-mit) 2019.10.2 in Fukuoka,
Japan

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、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 S 2 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シ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: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。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 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 aptamer 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 CPC を単離培養した。単離した CPC 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 CPC 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。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、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 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。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 CPC 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、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左室収縮率の改善を示し、さらに組織学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 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 CPC 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。

略 語 集

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ATP: adenosine triphosphate
CLSM: confocal laser scanning microscope
CPC: cardiac progenitor cell
DDS: drug delivery system
DHE: dihydroethidium
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DOPE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine
FCCP: carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FGF: fibroblast growth factor
FS: fractional shortening
HEPES: (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
Human CDC: cardiosphere-derived cell
I/R injury: ischemia/reperfusion injury
LP: liposome
LVDD: left ventricular end-diastolic diameter
LVDs: left ventricular end-systolic diameter
MACS: magnetic cell sorting
OCR: oxygen consumption rate
PBS: phosphate buffered saline
PDI: polydispersity index
RES: resveratrol
ROS: reactive oxygen species
RP: cholesterol RP aptamer(RP sequence: 5' -CUCCCUGAGCUUCAGG-3')
S2: SS peptide(Arg-Dmt-Lys-Phe-DArg-Dmt-Lys-Phe-NH₂)
SD: standard deviation
SM: sphingomyelin
SPF: specific pathogen free
TMRM: Tetramethylrhodamine methyl ester

緒 言

【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 (Benjamin et al., 2017)。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 (Miller et al., 2019)。その中で、1990 年代初頭から心房腫瘍由来細胞株、胎児心筋細胞、骨格筋芽細胞株、ES 細胞などの試みから心筋への細胞移植は始まっている。2001 年に自家骨格筋芽細胞移植による動物実験で心機能の改善の報告を行った (Menasche et al., 2001)。それ以降、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 (Orlic et al., 2001) (Meyer et al., 2009; Schachinger et al., 2009) (Malliaras et al., 2014) (Ashur and Frishman, 2018)。臨床試験が多数行われており、有害事象の報告もすくなく (Fernandez-Aviles et al., 2018)、一定の効果をあげていることがあるにもかかわらず、臨床応用として実用化までは至っていない (Sanz-Ruiz et al., 2017)。臨床応用まで至っていない理由として、一定の効果の安定性がないことが挙げられる (Makkar et al., 2012)。効果がある患者がいる一方で、効果の見えない患者の報告が多数見られる。そのなかで、問題点としてあげられていることとして、移植した細胞の均一な心筋細胞への分化誘導がされているのか。移植後の不整脈の発生が危惧されるのではないか。また移植による治療効果を最大限に上げるための移植方法の選択、疾患重症度における治療介入の時期の適正化なども検討の余地がある。また、移植した細胞による持続的な心筋幹細胞の移植効果の維持が困難とされる。これらの点から、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、虚血に伴いミトコンドリアの障害が引き起こされると考えられている (Kuznetsov et al., 2019)。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、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリア内での活性酸素の増生にともなう細胞機能の低下が起こり、アポトーシスの誘導が起こるため心筋線維化をひきお越されると考えられている (Le Page et al., 2016)。それにもとない心機能の低下が起こるとされる。虚血などミトコンドリアのストレス状態を軽減するため、ミトコンドリア自体の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すると考えられる。さらにダメージ心筋におけるミトコンドリア機能を維持する

ことで、組織エネルギーの安定供給をもたらし、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。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。

北海道大学薬学部薬剤分子設計学研究室では、薬剤送達のメカニズム解析、ナノカプセルを用いたドラッグデリバリーシステムの開発を中心に行っている。さらにその中の一つの技術として、細胞内オルガネラであるミトコンドリアを標的としたナノテクノロジーを用いたドラッグデリバリーシステムの開発 (MITO-Porter [ミトコンドリア融合性リポソーム] [特許第 5067733 号] (Yamada et al., 2008)) を進めている。これらの技術をもちいて薬剤をナノカプセル内に封入することが可能としている。こ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 (Yamada and Harashima, 2017)、その MITO-Porter による細胞実験および動物実験において、有効性を多数報告している (Abe et al., 2016) (Yamada et al., 2020)。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 調製、取り込み機能の向上などを目指し改良をおこなった。1, 機能性素子をもたない DOPE/SM-LP (RES)、2, 細胞内取り込みを上昇させるために S2 ペプチド (Zhao et al., 2004) を修飾した S2-MITO-Porter (RES)、3, 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 (dual ligand system) を採用した RP/S2-MITO-Porter (RES)、上記の 3 つの粒子の作成を行った。二重修飾法用いたナノカプセルを作成した目的として、細胞取り込みを向上させるだけではなく、他に機能を持たせることが可能となった。これまでの方法で作成した MITO-Porter を用いて細胞に薬剤を添加する場合は培養液中に血清が存在した状態では、ナノカプセル自体が凝集してしまうために培養液中に結成を含まない無血清培地を用いて細胞取り込みを行っていた。今回、修飾素子を変更することで血清存在下においてもナノカプセルの凝集を起こさずに添加し細胞へのナノカプセルの取り込みを確認した。これらの MITO-Porter 用いてマウスの心臓から単離培養した心筋前駆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 MITO cell を作成した [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 : 特願 2016-223069]。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 (Abe et al., 2016)。二重修飾法を採用した 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。

さらに、北海道大学薬学部および医学部小児科においては、ヒト心筋幹細胞をもちいた心筋幹細胞移植の臨床応用を目指している。MITO-Porter 技術の応用とその臨床応用のために、臨床検体をもちいて、ヒトの心筋組織から心筋前駆細胞の単離をおこなった (Malliaras et al., 2014) (Cheng et al., 2014)。単離したヒト心筋前駆細胞に対して MITO-porter をもちいて、ミトコンドリア活性化ヒト心筋前駆細胞の作成に着手した。図 1 に本研究におけるコンセプト図を示す。

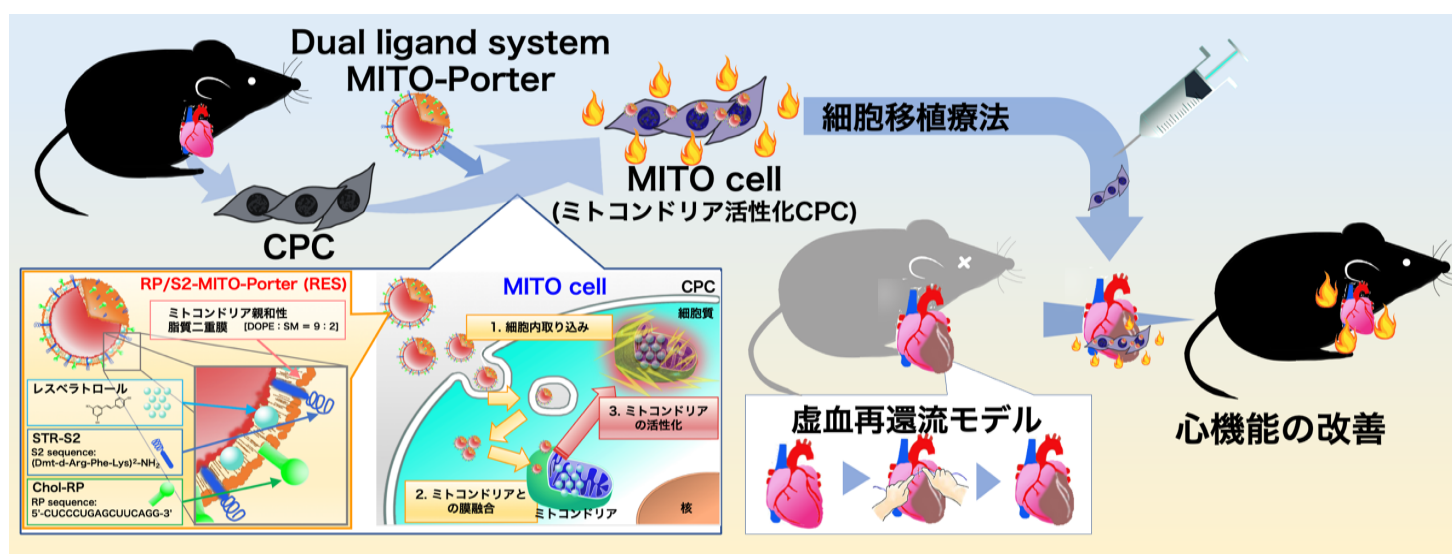


図 1. 本研究におけるコンセプト図

方 法

【材料および使用機器】

■実験一般試薬

0.04 w/v% Phenol Red(Wako, Tokyo, Japan), 1% Eosin Y Solution(Wako), Bouin' s solution(Sigma-Ardrich (St, Louis, USA)), BSA (bovine serum albumin)(Wako), CLS2 collagenase Type II (Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, US)), DMEM Ham' s F-12(Wako and nacalai tesque), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(DOPE) (Avanti Polar Lipids Alabaster, AL) , EDTA-2Na (ethylenediaminetetraacetic acid)(DOJINDO LABORATORIES Kumamoto, Japan), エタノール (Wako), ホルムアルデヒド (Wako), Dihydroethidium(DHE)(Wako), Hydroethidine(Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan), Fatal bovine serum(FBS) (Sigma-Ardrich (St, Louis, MO, USA)), ヘパリン (Wako), HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)(DOJINDO LABORATORIES), isoflurane(Pfizer, Tokyo, Japan), Mayer' s Hematoxylin Solution(Wako), mouse basic Fibroblast growth factor (FGF) (R&D Systems Minneapolis, US), NBD-DOPE(Avanti Polar Lipids), Phosphate Buffered Saline (PBS) (TAKARA Bio inc. Shiga, Japan)), Penicillin G potassium(Meiji Seika Pharma Co. Tokyo, japan), Percoll PLUS(GE healthcare), resveratrol(Wako), S2 peptide(STR-DArg-Dmt-Lys-Phe-DArg-Dmt-Lys-Phe-NH₂) (TORAY), Sodiuaazide(Wako), Softmount(Wako), sphingomyelin(Avanti Polar Lipids), Streptomycin sulfate(Meiji Seika Pharma Co.) Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) (Thermo Fisher Scientific), Trypsin 0.25%(Life Technologies, Tokyo, Japan), Hoechst33342(Thermo Fisher Scientific), MitoTracker® deep red (Thermo Fisher Scientific) WST-1 (takara bio)

■細胞外フラックスアナライザー関連試薬

FluxPak-XFp 用キャリブレーション溶液, XF 用 DMEM 培地, XF 1.0M グルコース溶液, XF 100mM ピルビン酸塩溶, XF 200mM グルタミン溶液, XFp 用ミトストレスキット, XFp 用リアルタイム ATP Rate キット (Primetech Corporation ,Tokyo, Japan))

■MACS(Magnetic cell sorting) 関連試薬

Anti-FITC Microbeads, Anti-Sca-1-FITC mouse, Rat IgG2b isotype control antibodies FITC, MidiMACS™ kit (Miltenyi Biotec ,Cologne, Germany)

■実験機器

flow cytometry (Gallios) (BEKMAN COULTER ,Tokyo, Japan), Zeta Sizer (Nano-ZS) (Malvern), bath type sonicator AU-25C (Aiwa ,Tokyo, Japan), 共焦点レーザー走査型顕微鏡オリンパス FV-10i (OLYMPUS CORPORATION ,Tokyo, Japan), 共焦点レーザー顕微鏡システム A1 HD25 (NICON ,Tokyo, Japan), Seahorse XFp Analyzers (Agilent Technologies, Inc ,California, USA)), EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer, Inc. ,MA, USA)

■動物実験機器

動物用人工呼吸器(KN-58 SLA Ventilator) (NATSUME SEISAKUSHO ,Tokyo, Japan), 動物用麻酔器(NARCOBIT-E(Ⅱ型)) (NATSUME SEISAKUSHO), 余剰麻酔ガス排気装置(卓上) (NATSUME SEISAKUSHO), 動物用心電図(Softron), 超音波検査機器 (Fukuda denshi ,Tokyo, Japan), stereo microscope (STZ-161-TP) (SHIMADZU RIKI CORPORATION ,Tokyo, Japan)), Digital microscope(BA80C-T2) (SHIMADZU RIKI CORPORATION), 8-0 needle-nylon (Kono Seisakusho), PE10(BRC ,Tokyo, Japan)

■実験動物の管理

マウス (J-C57BL/6) は三共ラボサービスから購入した。12 時間の照明サイクルにて概リズムを保ち、給水瓶による水分、標準的マウスフードによる食餌を自由に利用できるようにし、SPF (specific pathogen free) 飼育管理とした。すべての動物プロトコルは、北海道大学の動物実験規則を遵守し行われた (動物実験プロトコル認証日付: 2016 年 3 月 28 日、登録番号 16-0015)。

【実験方法】

〈DOPE/SM-LP (RES) の作成〉

ガラス試験管に以下の組成で脂質溶液と有機溶媒を加えた。1mM DOPE in EtOH 112.5 μ l, 1mM SM in EtOH 25 μ l, 10mM レスベラトロール 5 μ l, CHCl₃ 125 μ l,

蛍光修飾する場合は 0.1 mM NBD-DOPE 6.9 μ l 上記に添加した。デシケーターをもちいて 2 時間異常溶媒除去を行ったのち、HEPES Buffer 250 μ l をガラス管に加えて 15 分静置した。その後バスタイプソニケーターで 1 分間ソニケーションをおこなった。

<S2-MITO-Porter (RES) の作成>

ガラス試験管に以下の組成で脂質溶液と有機溶媒を加えた。1 mM DOPE in EtOH 112.5 μ l, 1 mM SM in EtOH 25 μ l, 10mM レスベラトロール 5 μ l, CHCl₃ 125 μ l.

蛍光修飾する場合は 0.1 mM NBD-DOPE 6.9 μ l 上記に添加した。デシケーターをもちいて 2 時間異常溶媒除去を行ったのち、HEPES バッファー 250 μ l をガラス管に加えて 15 分静置した。その後バスタイプソニケーターで 1 分間ソニケーションをおこなった。S2 を 8.4 μ l 添加(脂質量の 10%)し、15-30 分静置した。

<RP/S2-MITO-Porter (RES) の作成>

ガラス試験管に以下の組成で脂質溶液と有機溶媒を加えた。1mM DOPE in EtOH 112.5 μ l, 1mM SM in EtOH 25 μ l, 10 mM レスベラトロール 5 μ l, CHCl₃ 125 μ l.

蛍光修飾する場合は 0.1 mM NBD-DOPE 6.9 μ l 上記に添加した。デシケーターをもちいて 2 時間異常溶媒除去を行ったのち、HEPES バッファー 250 μ l をガラス管に加えて 15 分静置した。その後バスタイプソニケーターで 1 分間ソニケーションをおこなった。S2 を 8.4 μ l 添加(脂質量の 10%)し、15-30 分静置した。その後 2.0%アプタマー溶液を同量の脂質溶液に添加し 15-30 分静置した。

<マウス心筋前駆細胞の単離>

J-C57BL/6 6-8 週齢(雄)から心臓を摘出し、心室筋からコラゲナーゼ処理とパーコールによる密度勾配法を用いて細胞層を回収した。回収した細胞層をコラーゲンコートディッシュを用いて CPC の初代培養を行った。Mouse basic FGF 存在下 F-12DMEM 培地を用いて継代培養をおこなった。その後 Sca-1 抗体を用いた MACS (Magnetic cell sorting) 法により、Sca-1 抗原陽性 CPC を単離し、実験用 CPC の準備を行った。CPC の培養は、DMEM Ham' s F-12(10%FBS, ペニシリン, ストレプトマイシン, mouse basic FGF 4 μ g/ml)を用いて細胞培養をおこなった。

<MITO cell の作成>

単純水和法で作成したレスベラトロール封入 MITO-Porter を事前に準備した。mouse CPC 10cm ディッシュコンフルエントの状態にした後、レスベラトロール封入 MITO-Porter 溶液

400 μ L を FBS 添加 F-12 DMEM 3.6 ml と合わせ、4 ml としたものを細胞に添加し、1 時間インキュベーションした。

<CPC へ粒子の取り込みの検討>

●フローサイトメトリーによる検討

前日 (24 $\pm$ 3 時間前) に細胞を 6 ウェルプレートに播種し前培養を行った。添加するサンプル(脂質濃度 0.55 mM) 50 μ l + 培地 950 μ l、混合液 1 ml とし準備する。前日に播種したウェルを PBS 1 ml で洗浄する。それぞれのウェルにサンプル 1 ml を添加し、一時間インキュベーションを行う。その後 PBS 1 ml で洗浄しさらにヘパリン溶液 500 μ l で 2 回洗浄を施行した。0.05%トリプシン溶液 500 μ l を添加し、インキュベーションして細胞を剥がし、DMEM FBS(+)700 μ l でウェル毎の細胞をエッペンドルフチューブに回収し氷冷管理とする。遠心分離 4 度/700g/3-5 分を行い上清を除去。その後 FACS バッファー 1 ml 加えて洗浄する。再度、遠心分離 4 度/700g/3-5 分 行い、上清を取り除いたのち FACS バッファー 500 μ l 加える。測定の際にはナイロンメッシュフィルターを用いてフローサイト用試験管に回収し測定をおこなった。測定はフローサイトメトリー (Gallios)BEKMAN COULTER を使用した。

●走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内取り込み評価

前日 (24 $\pm$ 3 時間前) に細胞をガラスベースディッシュに播種し前培養を行った。NBD で蛍光した添加するサンプル(脂質濃度 0.55mM) 50 μ l + 培地 950 μ l、混合液 1 ml とし準備する。前日に播種した培養皿を PBSml 1 で洗浄する。それぞれのウェルにサンプル 1 ml を添加し、一時間インキュベーションを行う。その後 PBS 1ml で洗浄し、染色 (MitoTracker deep red® 1 mM の溶液を調整し 10 分間インキュベーション) し観察した。共焦点レーザー走査型顕微鏡はオリンパス FV-10i 使用した。

<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の機能評価>

測定日の前日に測定用プレートの各ウェルに目的となる細胞数 (150000 細胞/100 μ L) で播種し、5% CO₂ 37 度インキュベーターで一晩静置した。センサーカートリッジの全ウェルにキャリブ rant 液を 200 μ L、外堀に 400 μ L ずつ分注し、蓋をして CO₂ 無しのインキュベーターで一晩静置、水和をおこなった。ランニング培地を DMEM Ham' s F-12 と同様になるようにブドウ糖 17.5 mM、ピルビン酸 0.625 mM、グルタミン 2.5 mM となるように添加した。測定当日、測定用プレートの培地をランニング培地に置換し、脱 CO₂ のために CO₂ 無しのインキュベーターで 1 時間静置した。ATP キット、及びミトストレスキットを調整。各ポートに 20 μ l ずつ装填した。終濃度オリゴマイシン 1.0 μ M、FCCP 1.5 μ M、ロテノン /アンチマイシン A 0.5 μ M になるように調整している。各アッセイに応じてプロトコールを作成しアッセイを行う。レスベラトロールおよび、RP/S2-MIT0-Porter (RES) の投与は

20 μ L 分注しポート A から添加した。取り込みの時間を 3 時間とした。この投与もプロトコール内にプログラミングし測定をおこなった。

<心筋虚血再還流モデルマウスの作成と CPC および、MITO cell 移植の方法>

モデルマウス作成には J-C57BL/6 (12-15 週齢)雌を用いた。吸入麻酔はイソフルラン 2-3% を使用した。麻酔ボックスを利用し麻酔導入をおこなった。マウスを固定後に剃毛し心電図を装着した。頸部切開を行い、挿管チューブを目視し気管内に挿入されたことを確認し人工呼吸器管理とした。実体顕微鏡下にて、剣状突起上の 3 mm 上から左上に向かって斜め方向に 8 mm 切開をおこなう。皮下組織と筋層を鈍的剥離。大胸筋および小胸筋を鈍的剥離し開創器にて固定し肋骨・肋間筋を確認する。第 4 肋間胸骨左縁 2-3 mm を筋層に沿うようにピンセットを用いて鈍的に開創する。胸腔内の視野が確保されたら、心膜を剥離し、心臓を露出し、冠動脈を目視で確認する。冠動脈を確認したら 8-0 ナイロンを用いて心筋に針をかけ、冠動脈走行周囲をすくうようにする。糸をかけた心筋、冠動脈をすくった心筋ごと PE10 で挟むような形で結紮する。虚血の確認は心電図変化および、心筋の色の変化を確認する。60 分間虚血をおこなう。虚血後 PE10 を除去し、糸切り、再灌流を確認する。細胞移植は、 1.0×10^6 細胞/ 30μ l PBS で浮遊液を作成し、3 箇所に分けて直接心筋に注射する。終了後皮膚を縫合し麻酔離脱を行い自発呼吸が確認でき他時点で抜管しゲージへ戻した。

<心筋虚血再還流モデルマウスの移植効果の検討>

●移植後の体重変化およびエコー検査

モデルを作成し移植後 30 日後の体重とマウスの左心室壁運動を心エコー検査で評価した。心エコー検査は、マウスを吸入麻酔下で鎮静し、左心室の短軸画像を収集した。短軸から得られた左室拡張末期径 (left ventricular end-diastolic dimension:LVDd) と左室収縮期径 (left ventricular end-systolic diameter:LVDs) から左心室短縮率 (fractional shortening:FS) を算出した。

●移植後の病理組織評価

モデル作成 30 日後に摘出した心臓の HE 染色および Masson trichrome 染色を行い、心臓線維化の程度を評価した。切除した心臓をパラホルムアルデヒドで固定しスクロース溶液を用いて脱水後、それらを OCT コンパウンド(凍結用包埋剤)を用いて液体窒素にて凍結した。凍結したサンプルをクリオスタットを用いて、厚さ 10 μ m で薄切し観察用プレパラートを作成した。切片をヘマトキシリン-エオシン染色および Masson trichrome 染色を行い、線維化の程度を評価した。

●走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いた虚血再灌流モデルマウスにおける細胞移植後の活性酸素とミトコンドリア膜電位の評価

虚血再灌流モデルマウスを作製し、3日後にマウスの心臓を摘出した。摘出した心臓を短軸乳頭筋レベルでメスを用いて切断した。活性酸素を検出するために Dihydroethidium (DHE) (最終濃度 $5\ \mu\text{M}$)、核を検出するために Hoechst 33342 (最終濃度 $10\ \mu\text{M}$) を用いて染色し、4度の PBS 中で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、組織を PBS で洗浄し、Confocal Laser Scanning Microscope (CLMS) (ニコン A1 ; ニコン株式会社、東京) で観察した。組織は、ダイオードレーザー 405 nm、Ar レーザー 561 nm で励起した。画像は、対物レンズ (Plan Apo 10 $\times$ /0.45) と第 1 ダイクロイックミラー (405/488/561/640) を装着したニコン A1 を用いて得た。蛍光検出 2 チャンネル (Ch) は、以下のフィルターに設定した。Hoechst33342 の BP (450/50) (青色)、Ch2. DHE は BP (525/75) (赤色) とした。ミトコンドリア膜電位は、上記と同様の方法で Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) を用いて評価した。各モデルを PBS 中の TMRM (最終濃度 250 nM) と Hoechst33342 (最終濃度 $10\ \mu\text{M}$) で 4 度、30 分間染色した。画像は、装備された Nikon A1 を用いて得た。2 つの蛍光検出 Ch は、以下のフィルターに設定した。Ch1. Hoechst33342 の BP (450/50) (青色)、Ch2. TMRM 用の BP (525/50) (赤色) に設定した。撮影した画像は、Image-pro Plus 7.0 を用いて画像解析を行った。面積当たりの DHE および TMRM の蛍光 (赤色) は、赤色の積分光学密度を青色の積分光学密度で除して求めた。そして、DHE と TMRM の積分光学密度 (赤色) を算出し、Hoechst 33342 の積分光学密度 (青色) を算出した。Hoechst33342 の青色の積分光学密度を DHE と TMRM の赤色の積分光学密度で割った。そして、1 区画の細胞成分あたりの DHE および TMRM の強度を算出した。計算方法は、活性酸素の強度 = (DHE (赤) の積分光学密度 / Hoechst33342 の積分光学密度 (青)) / (Hoechst33342 の積分光学密度 (青)) とする。膜電位の強度 = (TMRM の積分光学密度 (赤 / Hoechst33342 (青) の積分光学濃度) / (Hoechst33342 (青) の積分光学濃度) とした。

<ヒト心筋前駆細胞の単離方法>

ヒト正常心筋組織を、患者の手術によって得たヒトの心筋組織の入手を行なった。対象疾患は、根治術を要する右室流出路狭窄を伴う先天性心疾(ファロー四徴症、両大血管右室起始)とした。患者の同意のもとに(北海道大学病院 臨床研究番号 自 016-0507)、その根治術時に切除した余剰心筋(正常ヒト心筋組織)をいただき、その組織からヒト心筋幹細胞を単離した。

単離方法は手術当日に手術場に1×PBS(-)を氷冷したものを持参し心筋組織検体を受けとる。重量測定後に、クリーンベンチ内に移動し心臓をミンスする0.4%コラゲナーゼ20 mLで組織を回収し三角フラスコへ移す。三角フラスコを高温振盪器をもちいて37度,180回転/分,30分間攪拌する。反応終了後ピペットを用いて十分に攪拌する。上清をフィルターにかけDMEM/Ham's F-12 20 mLで反応中和を行う。遠心(15度,1500回転/分,390g,5分間)行う。上清を破棄、DMEM F-12(+)で懸濁し超低接着ディッシュに播種する。human FGF(終濃度40 ng/ml)、human EGF(終濃度20 ng/ml)となるように添加する。数日するとCardiac spheresを形成する。2-3日ごとに培地交換を行い。コラーゲンコートディッシュを用いて継代培養をおこなった。

<フローサイトメーターを用いたヒト心筋前駆細胞の表面抗原マーカー分析方法>

Human CDCを培養皿からはがし、細胞数の測定を行う。各エッペンドルフチューブに分注(3×10^5 細胞数)程度分注する。各表面抗原の抗体2 μ Lに対し細胞数 1.0×10^6 までとした。各エッペンドルフチューブを4度/300g/10分遠心をかけ、上清を破棄。各エッペンドルフチューブにMACS バッファー 98 μ Lを添加しそれぞれの表面抗原抗体(FITC, PEによる修飾されているもの)2 μ Lずつ加えた。4度,10分間反応後にMACS バッファー1 mLを加える。4度,300g,10分間遠心を行、上清を破棄しMACS バッファー 300 μ Lを加えた。測定の際にはナイロンメッシュフィルターを用いてフローサイト用試験管に回収し測定をおこなった。測定はフローサイトメトリー (Gallios)BEKMAN COULTERを使用した。

<ヒト心筋前駆細胞における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の機能評価>

測定日の前日に測定用プレートの各ウェルに目的となる細胞数(150000細胞/100 μ L)で播種し、5% CO₂ 37度インキュベーターで一晩静置した。センサーカートリッジの全ウェルにキャリブ rant液を200 μ L、外堀に400 μ Lずつ分注し、蓋をしてCO₂無しのインキュベーターで一晩静置、水和をおこなった。ランニング培地をDMEM Ham's F-12相当のブドウ糖17.5 mM、ピルビン酸0.625mM、グルタミン2.5mMとなるように添加した。測定当日、測定用プレートの培地をランニング培地に置換し、脱CO₂のためにCO₂無しのインキュベーターで1時間静置した。ATPキット、及びミトストレスキットを調整。各ポートに20 μ L

ずつ装填。終濃度オリゴマイシン 1.0 μ M、FCCP 1.5 μ M、ロテノン/アンチマイシン A 0.5 μ M になるように調整している。各アッセイに応じてプロトコールを作成しアッセイを行う。レスベラトロールおよび、RP/S2-MIT0-Porter (RES) の投与は 20 μ L 分注しポート A から添加した。取り込みの時間を 1 時間とした。サンプル投与、取り込み時間もプロトコール内にプログラミングし測定をおこなった。

<WST-1 試薬を用いた過酸化水素負荷によるヒト心筋前駆細胞生存率試験>

細胞生存率を、WST-1 試薬（タカラバイオ株式会社、滋賀県）を用いて評価した。ヒト心筋前駆細胞を、10%FBS を含む DMEM Ham' s F-12 を添加した Falcon® 24 ウェルマイクロプレート (Corning Inc. NY, USA) 上に 40,000 細胞/ウェルを播種し、5%CO₂、37 度で 24 時間インキュベートした。その後、細胞の培地を各種濃度の過酸化水素含有培地に交換し、上記と同様の環境下で 30 分インキュベートした。その後に培地を 10%WST-1 試薬溶液に交換し、2 時間インキュベートした。細胞生存率は、EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer, Inc., MA, USA) を用いて測定した。

結 果

●MITO cell 移植後の治療効果を評価するための実験プロトコール

本研究では、マウス由来のCPCからミトコンドリア活性化CPC (MITO cell) を調製し、虚血再灌流モデルマウスの虚血性心筋に移植し、従来の心筋幹細胞移植療法と治療効果を比較した。2匹の雄性マウス (C57BL/6 J 8~10 週齢) からCPCを培養した。概念図および単離方法を図2に示す。また、MITO cellの作成方法を図3に示す。

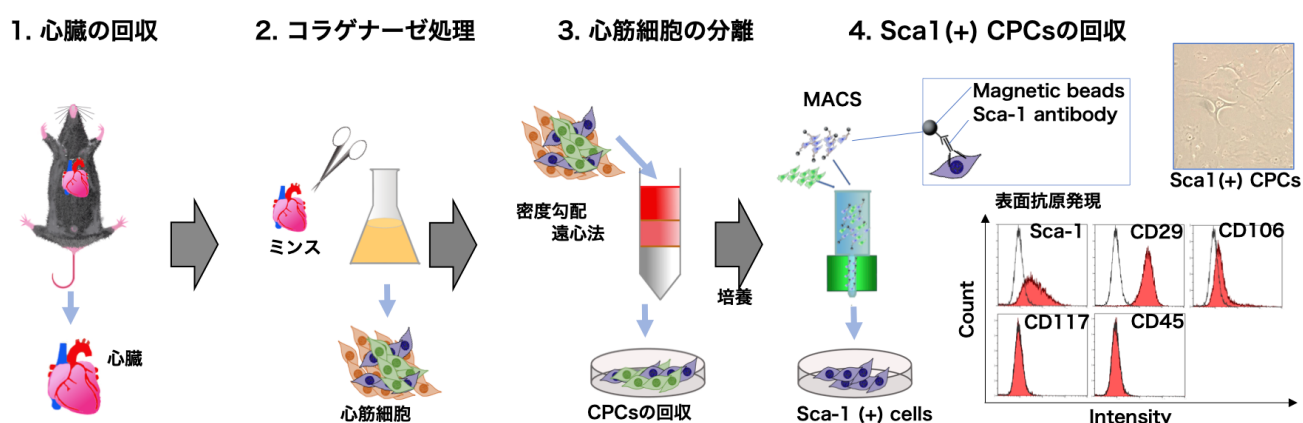


図2. 心臓摘出から Sca-1 陽性細胞を単離するプロトコール

マウスから心臓を摘出 (ステップ1)。回収した心臓をコラゲナーゼで処理して細胞を分離させた (ステップ2)。密度勾配遠心分離法を用いて細胞層を分離。細胞層を回収しコラーゲンコートディッシュに播種した。次いで、5%CO₂下、37度でインキュベートした (ステップ3)。2~3回の継代後、Sca-1抗体を用いてMagnetic cell sorting (MACS)を行い、Sca-1抗体陽性細胞を回収した (ステップ4)。得られた細胞は、間葉系幹細胞マーカー Sca-1、CD29、CD106が陽性、CD117、CD45が陰性。幹細胞であることを確認した。

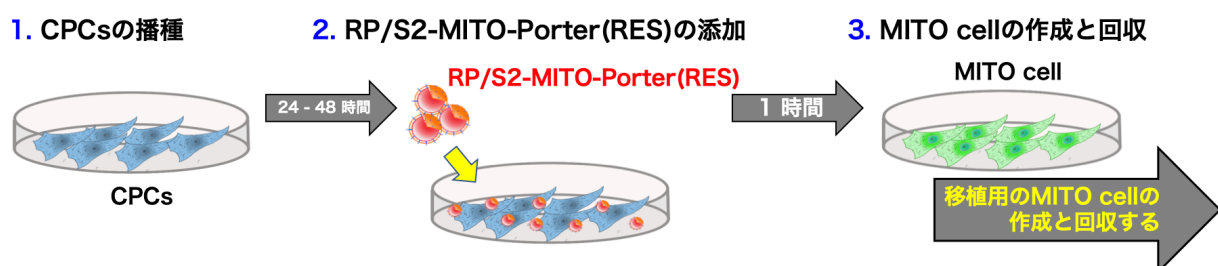


図3. MITO cellの作成過程について。

CPCは、成長因子 (FGF) を補充した培地で3~4回培養した。レスベラトロールをMITO-PorterをもちいてCPCのミトコンドリアに送達し、MITO cellを作成した。

虚血再灌流モデルマウス作成と細胞移植療法の方法(図4)を示す。心エコーや病理組織学による心機能の評価、膜電位によるミトコンドリア機能の評価、体重変化の評価を行った。

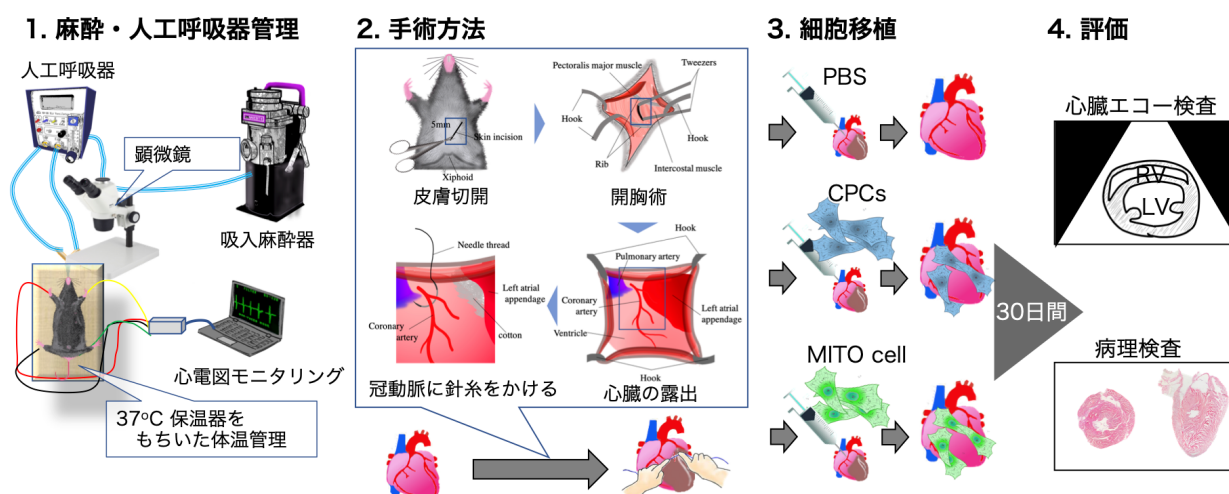


図4. 虚血再灌流モデルマウス作成と細胞移植療法の概念図。

1. マウスの全身麻酔、人工呼吸器、心電図モニターの装着による周術期管理。2. マウス心筋虚血再還流の実際の方法。3. 細胞移植の方法と移植細胞のPBS群、CPC移植群、MITO cell 群の3群。4. 術後の心エコーや病理組織学による心機能の評価について。

●RP/S2-MITO-Porter (RES) の調製

レスベラトロールをナノカプセルに封入した RP/S2-MITO-Porter (RES) を単純水和法を用いて調製し、CPC のミトコンドリアの活性化を行なった。RP/S2-MITO-Porter (RES) は、ミトコンドリア膜と脂質二重層で構成されており、その脂質二重層内にレスベラトロールが封入されている。DOPE/SM を 9:2 で混合したナノカプセルを作成したのちに S2 ペプチドと RP アプタマーで修飾した。RP/S2-MITO-Porter (RES) の構造およびその細胞内取り込みおよびミトコンドリア送達輸送の模式図を図5に示す。調製したナノカプセルの粒子径は、未修飾ナノカプセル[DOPE/SM-LP (RES)]では 126 ± 2 nm、S2 ペプチドのみを含むナノカプセル[S2-MITO-Porter (RES)]では 107 ± 11 nm、S2 ペプチドと RP アプタマーの dual ligand system を用いたナノカプセル[RP/S2-MITO-Porter (RES)]では 129 ± 4 nm であった。表面電位は、DOPE/SM-LP (RES)，RP/S2-MITO-Porter (RES) では陰性、S2-MITO-Porter (RES) では陽性であった(表1)。

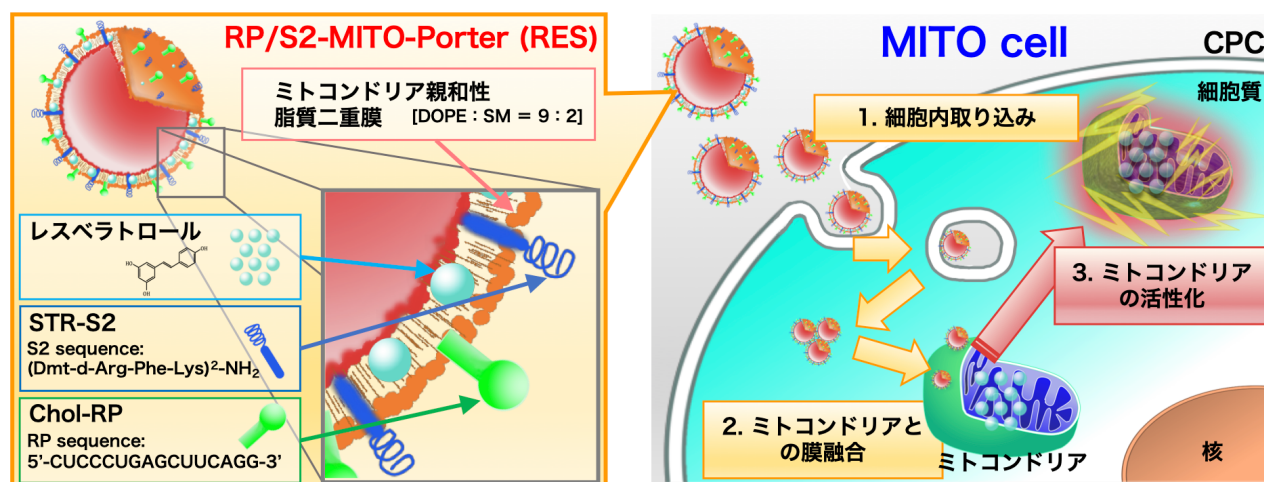


図5. RP/S2-MITO-Porter (RES) の構造およびその細胞内取り込みおよびミトコンドリア送達輸送の模式図。

DOPE, SM を基礎とした脂質二重膜構造をしており、二重膜内にレスベラトロールが搭載されている。STR-S2 (S2 ペプチド) および、Chol RP (RP aptamer) の構造式を示す。S2 ペプチド、RP aptamer は粒子表面に修飾されている。RP/S2-MITO-Porter (RES) は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、細胞内でミトコンドリア外膜と膜融合をおこし、ミトコンドリア内部に薬剤が送達される。

表1. 本研究で使用したレスベラトロール封入ナノカプセルの特性。

各粒子のサイズ、PDI (Polydispersity index)、 ζ 電位を測定した。データは SD (n=7) で平均値 $\pm$ 標準偏差を表示した。

粒子の種類	リポソーム 脂質組成 (モル比)	直径 (nm)	PDI	ζ 電位 (mV)
RP/S2-MITO-Porter (RES)	DOPE: SM: STR-S2: Chol-RP (9: 2: 1.1: 0.1)	126 $\pm$ 2	0.15 $\pm$ 0.05	- 45 $\pm$ 2
S2-MITO-Porter (RES)	DOPE: SM: STR-S2 (9: 2: 1.1)	107 $\pm$ 11	0.26 $\pm$ 0.01	+ 34 $\pm$ 3
DOPE/SM-LP (RES)	DOPE: SM (9: 2)	129 $\pm$ 4	0.13 $\pm$ 0.04	- 16 $\pm$ 3

●MITO-Porter (RES)の細胞内取り込みの評価

NBD（蛍光色素）で標識した MITO-Porter（RES）の CPC への細胞内取り込みをフローサイトメトリーで評価した（図 6 A）。DOPE/SM-LP（RES）と比較して、S2-MITO-Porter（RES）および RP/S2-MITO-Porter（RES）の細胞内への取り込みが有意に増加した。また、S2-MITO-Porter（RES）と RP/S2-MITO-Porter（RES）の細胞内取り込み量にも有意な差があった。キャリアの細胞内局在性を評価するために、NBD-DOPE で標識し、ミトコンドリアを MitoTracker deep red®で染色した粒子の細胞内動態を CLMS を用いて調べた（図 6 B）。DOPE/SM-LP (RES)と比較して、S2-MITO-porter (RES)と RP/S2-MITO-Porter (RES)の細胞内取り込みは、緑の点のがはっきりと観察され、細胞内取り込み能力が上昇していることが示された。また、赤色に染色されたミトコンドリアと緑色に標識された RP/S2-MITO-Porter (RES) が黄色のシグナルとして共局在していることが観察され、MITO-Porter がミトコンドリアに膜融合をおこしておりレスベラトロールを送達していることを示唆していた（図 6B）。

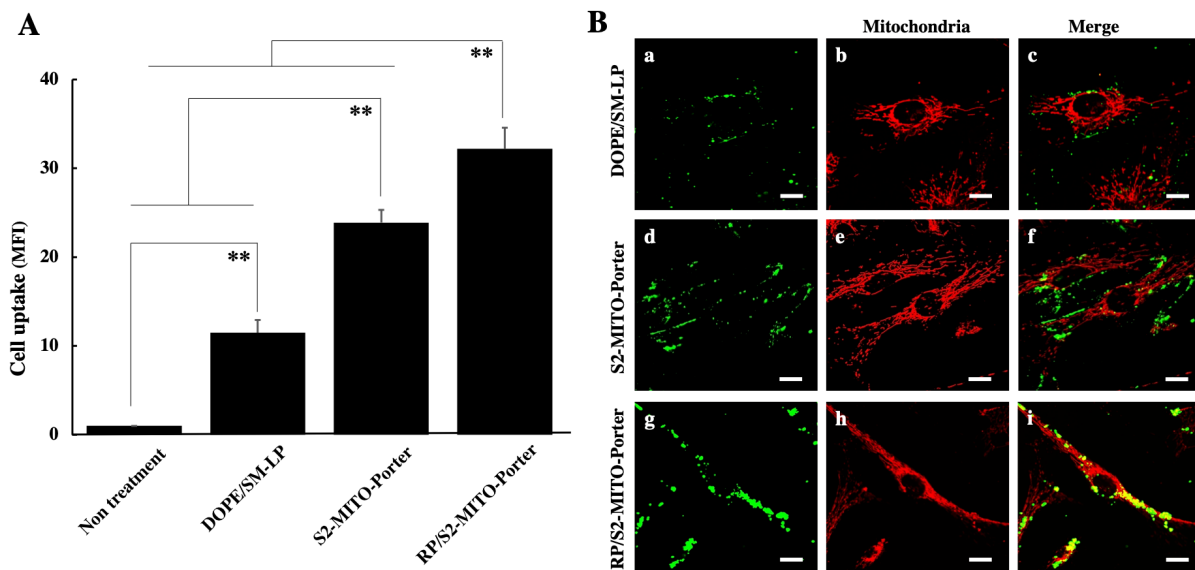


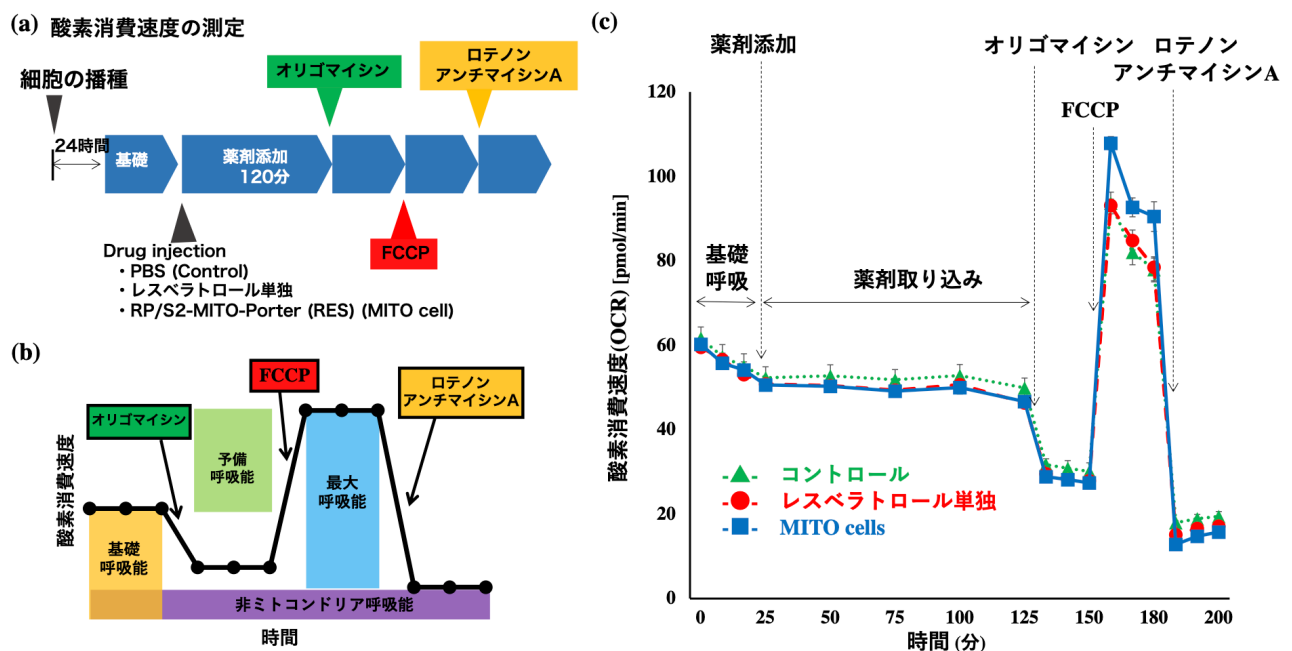
図 6. MITO-Porter（RES）の CPC への細胞内取り込みの評価。

A) NBD 標識した RP/S2-MITO-Porter（RES）、S2-MITO-Porter（RES）および DOPE/SM-LP (RES)の細胞取り込みを、CPC を用いてフローサイトメトリーで評価した。キャリアの平均蛍光強度（MFI）を用いた細胞取り込みの定量分析を行った。データは、平均値±標準偏差(n=3)を表示。有意差は、non-repeated ANOVA に続いて SNK 検定を用いて算出した (**p < 0.01)。B) CLSM を用いた DOPE/SM-LP（RES）（a-c）、S2-MITO-Porter（RES）（d-f）および RP/S2-MITO-Porter（RES）（g-i）の細胞内観察。緑色に標識されたキャリア（緑色）が赤色に染色されたミトコンドリアと共局在化された場合、マージされた画像に黄色のシグナルが観察された。スケールバーは 20 μm。

●細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア機能の評価

未処理 CPC 群（コントロール群）、レスベラトロールを直接添加した CPC 群（レスベラトロール単独群）、および RP/S2-MITO-Porter（RES）を添加した CPC（MITO cell 群）のミトコンドリア機能を、細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリア酸素消費量（OCR）を測定することにより評価した（図 7A）。いずれの群においても、OCR 基線の変化は認められなかった（図 7B（a））。MITO cell 群では、コントロール群およびレスベラトロール単独群と比較して、最大呼吸数および予備呼吸数の有意な増加が認められ、MITO cell のミトコンドリア機能の増加が示唆された（図 7B（b）、（c））。また、ミトコンドリア呼吸を停止した場合の酸素消費率は、対照群およびレスベラトロール単独群に比べて、MITO cell 群の方が有意に低かった（図 4 B（d））。これは、MITO cell 群の酸素消費量が他の 2 群よりもミトコンドリア依存性が高かったことを示していた。

図 7. 細胞外フラックスアナライザーを用いた MITO cell のミトコンドリア機能の評価。



ミトコンドリア OCR の測定に基づくミトコンドリア機能の評価方法。(a) 酸素消費率（OCR）の実験プロトコルを示す。b) 基礎呼吸能、最大呼吸能、予備呼吸能、および非ミトコンドリア酸素消費量の計算方法を示す。Ac) 未処理 CPC 群（コントロール群、●）、レスベラトロール単独群（▲）、MITO cell 群（■）の OCR 結果を示す。

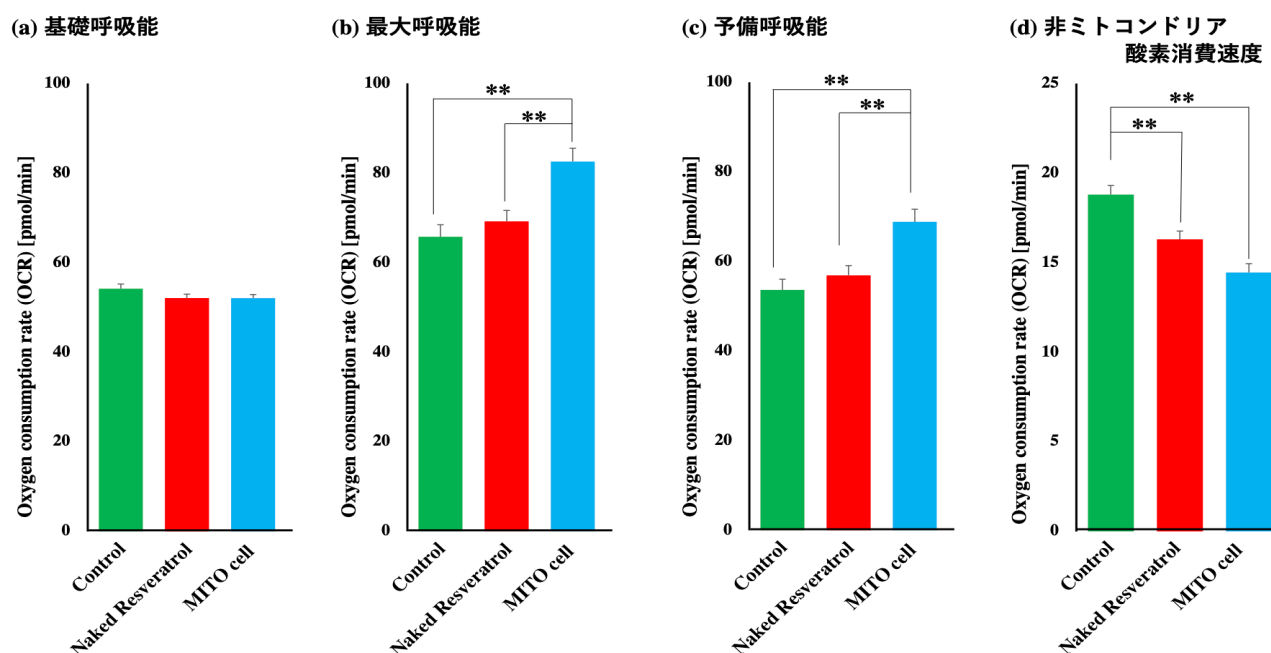


図 8. 細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能の評価。

3 群（コントロール群、レスベラトロール単独（Naked Resveratrol）群、MITO cell 群）それぞれの基礎呼吸能、最大呼吸能、予備呼吸能、非ミトコンドリア酸素消費量を示す。(a) 基礎呼吸能、(b)最大呼吸、(c)予備呼吸能、(d)非ミトコンドリア酸素消費量。データは平均 $\pm$ S.D. (n= 4) として表示。有意差 (** p < 0.01) は、non-repeated ANOVA に続いて SNK 検定を用いて算出した。

●細胞移植後の虚血性心筋の心機能の評価

虚血再灌流モデルマウスを作製し、sham 群、PBS 群、CPC 群、MITO cell 群のそれぞれについて、術後 30 日後の心エコー検査を行った（図 9A）。左心室径短縮率（FS ; Fractional Shortening）は、sham 群で 34%、PBS 群で 23%、CPC 群で 30%、MITO cell 群で 33%であった（図 8B）。CPC 群は PBS 群と比較すると有意差を認めた。MITO cell 群は PBS 群と比較して改善を認め、MITO cell 群が最も改善を認めた。また MITO cell 群、CPC 群、PBS 群の、30 日後の体重変化を観察した（図 8C）。MITO cell 群は+2.3g (+12.4%)、CPC 群は+1.5g (+7.4%)、PBS 投与群は+0.2g (+1%) であった。PBS 群と CPC 群では有意差はなかったが、PBS 群と MITO cell 群では有意差が認められた。

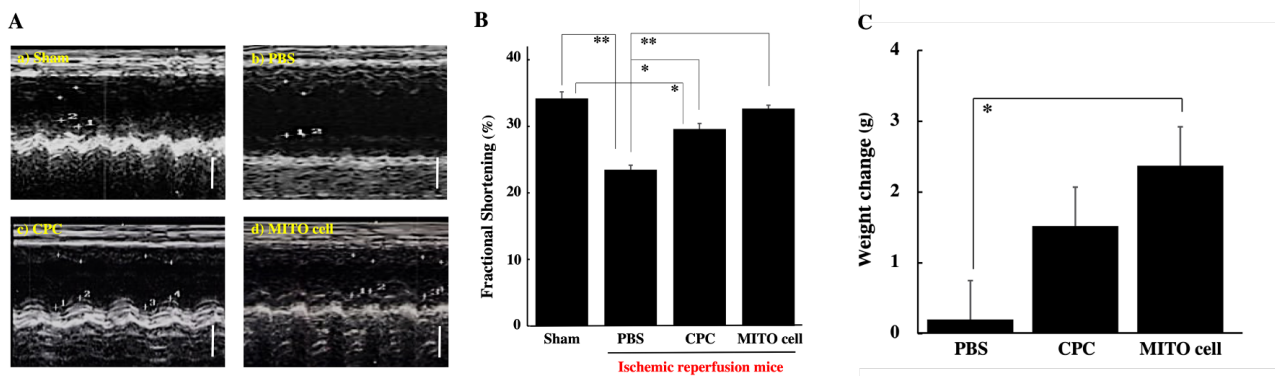


図9. 細胞移植後の虚血性心筋の心機能の評価。

A) 虚血再灌流モデルマウスにおける細胞移植後30日後の心エコー画像。(a)sham群、(b)PBS群、(c)CPC群、(d)MITO cell群、スケールバー、2mm。

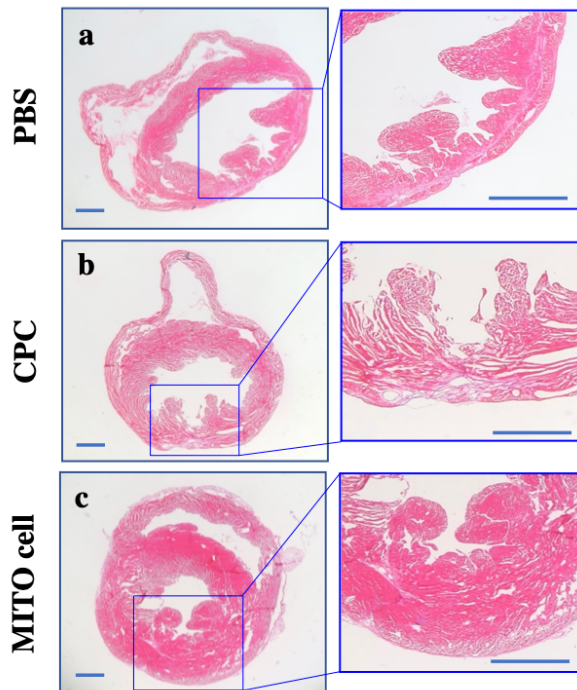
B) これらのグループ間での左心室径短縮率 (FS ; Fractional Shortening) の比較。左心室径短縮率 (FS ; Fractional Shortening) (%) は2次元で推定した。データは平均値 ± S.D (n=5-11) として表示した。

C) 虚血再灌流マウスモデルにおける各群 (PBS処理群、CPC群、MITO CELL群) の移植後30日後の体重変化を示す。データは平均値 ± 標準偏差 (n=5-7) で表した。non-repeated ANOVA に続いてSNK検定を用いて算出した (*p<0.05, ** p<0.01)。

●虚血再灌流モデルマウスにおける細胞移植後の心筋組織線維化評価

虚血再灌流モデルマウス PBS 群、CPC 群、MITO cell 群の各群を30日後に心臓を摘出し、組織病理組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色、マッソントリクローム染色を行った (図10)。PBS 群では左心室前壁領域に広範な線維化が認められたが、CPC 群ではPBS 群に比べて線維化の程度が抑制された。MITO cell 群ではCPC 群に比べて線維化がさらに抑制されており、MITO cell 群で線維化の程度が最も抑制されていることが示唆された。

A ヘマトキシリン・エオジン染色



B マッソン・トリクローム染色

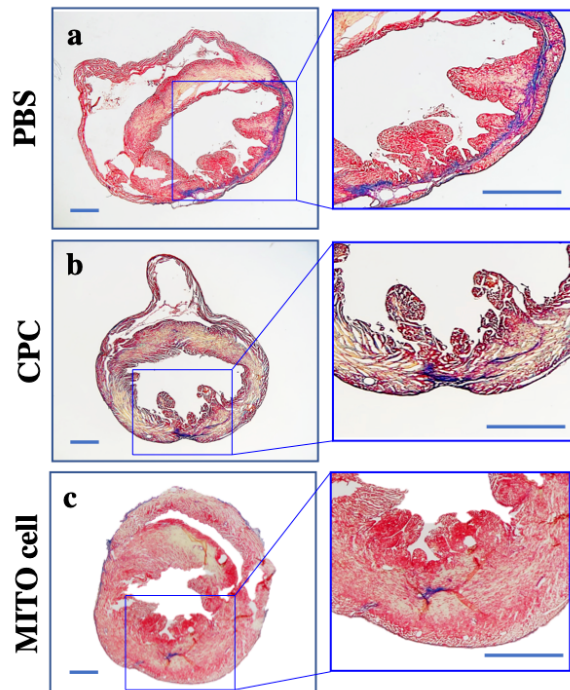


図 10. 細胞移植後のヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソン・トリクローム染色による評価。各群（PBS群（a）、CPC群（b）、MITO cell群（c））における治療後30日後の虚血性心筋の切片におけるH E 染色（A）およびマッソン・トリクローム染色（B）。左図は関心領域の拡大画像。スケールバー、200 μ m。

●虚血再灌流モデルマウスにおける細胞移植後の酸化ストレスとミトコンドリア膜電位の評価

虚血再灌流モデルマウスの各群、PBS 群、CPC 群、MITO cell 群の評価を行なった。また、虚血を伴わない対照群（Sham群）もコントロールとして作成した。移植後3日目にマウスの心臓を摘出し、心筋組織中の活性酸素のレベルを測定することを可能とするジヒドロエチジウム（DHE）を用いて活性酸素を可視化し、相対的なDHE陽性領域比を定量した（図11）。Sham群と比較して、PBS群では相対的なDHE陽性領域比の上昇が認められた。一方、CPC群およびMITO cell群では、ROS値が抑制されていた。さらに、MITO cell群ではその値が抑制されており、この差はPBS投与群と比較して有意差を認めた。

同様のモデルを用いて、心筋組織のミトコンドリア膜電位を可視化することが可能なテトラメチルローダミンメチルエステル(TMRM)を用いて活性のあるミトコンドリア膜電位を測定し、その後、相対的なTMRM陽性領域比を定量した（図12）。sham群と比較して、PBS群では、梗塞部位のミトコンドリア膜電位の低下が認められた。一方、MITO cell群のミトコンドリア膜電位はPBS群に比べて維持されていた。これらの結果から、MITO cell群が最も活性酸素の発生を抑制し、ミトコンドリア膜電位レベルを維持していたことが明らかになった。

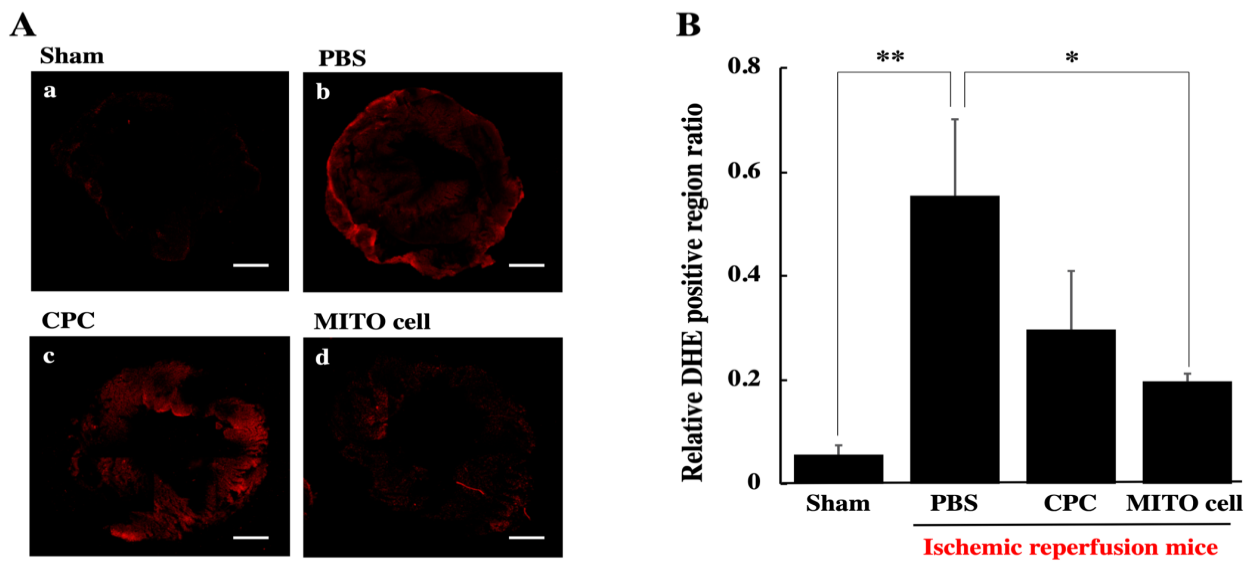


図 11. 細胞移植後の虚血性心筋の酸化ストレスの評価。

(a)DHE を用いた各群の治療後 30 日後の虚血性心筋の酸化ストレスを CLSM を用いて観察した。(a)sham 群、(b)PBS群、(c)CPC群、(d)MITO cell 群。スケールバー、 $200\mu\text{m}$ 。(B) 相対的なDHE陽性領域比の定量化は、CLSM 画像を用いて画像解析をおこなった。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3-6$) で表した。non-repeated ANOVA に続いてSNK検定を用いて算出した ($*p<0.05$, $**p<0.01$)。

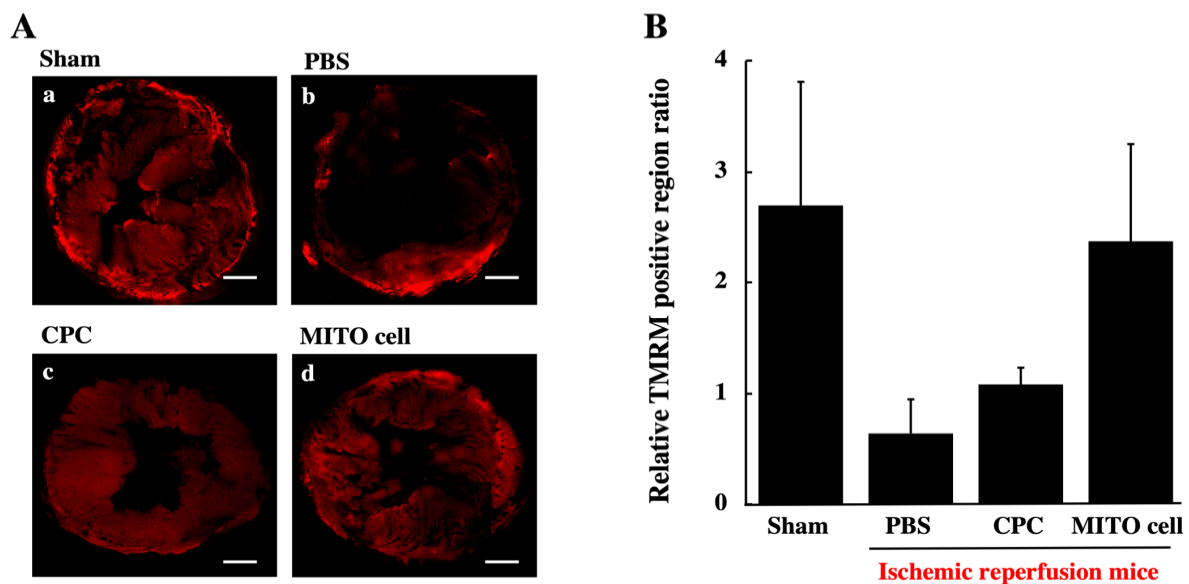


図 12. 細胞移植後の虚血性心筋のミトコンドリア膜電位の評価。

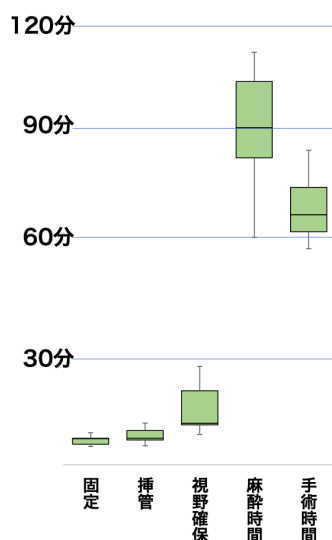
(A)TMRM (ミトコンドリア膜電位を評価する色素) を用いた各群の治療後 30 日後の虚血性心筋のミトコンドリア膜電位を CLSM を用いて観察した。(a)sham 群、(b)PBS群、(c)CPC群、(d)MITO cell 群。スケールバー、 $200\mu\text{m}$ 。(B) 相対的なTMRM陽性領域比の定量化は、CLSM 画像を用いて画像解析をおこなった。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3-6$) で表した。

●虚血再灌流モデルマウスを作製における手術方法の検討

虚血再灌流モデルマウスを作製するにあたって、マウスの手術手技を会得する必要がある。マウスに対しより侵襲を少なくし実験の安定性を担保できるよう、手術時間の短縮し、かつミスのないより正確な技術獲得を目標とした。第一の目標として最小限の時間で操作を行う必要があったため、マウスの麻酔導入から手術台に固定を行うまでの固定時間、気管挿管を行い速やかに麻酔導入を行うまで挿管時間、手術開始から心臓を露出し冠動脈を目視するまで視野確保時間、全体の手術時間（虚血時間30分を含む）、麻酔導入から麻酔が抜けてマウスが回復するまでの麻酔時間を測定し、一連の技術を安定させる努力を行なった（図 13）。

固定時間か、挿管時間はおおよそ15分で完了できた。手術開始から冠動脈を目視するまでは概ね10分程度であったが、目視してから冠動脈自体に針糸をかけ結紮するまでの手技の安定化を得るまでに時間と根気を要した。手術中は常に出血を起こさないように注意し施行した。出血するポイントとしては、開胸時の肋間筋の損傷、左心耳の損傷、などが挙げられた。そのため、ピンセットの動かし方、自作の開創器の形状改善および、掛ける位置とかける力加減の検討など様々であった。また、肺損傷による気胸を発症し、術後呼吸器離脱後に急性呼吸不全で亡くなってしまう例もあったことから、肺損傷にも気を配った。最終的にはほぼ無出血、死亡例のない状態での手術施行が可能となった。また、虚血の確認は心筋壁の色の変化及び、マウスの心電図によるST上昇（図 13）を全例で確認した。

モデルの作成時間の検討



マウス用心電図での虚血の評価

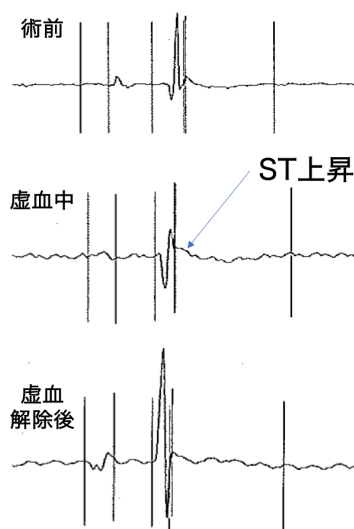


図 13. モデルマウスの作成時間とマウス心電図での虚血の確認。

固定が中央値 6 分 53 秒、挿管が中央値 7 分 00 秒、視野確保が中央値 11 分 00 秒、麻酔時間が中央値で 1 時間 29 分 00 秒、手術時間（虚血時間 30 分を含む）が中央値 1 時間 6 分 00 秒 となっていた。虚血の確認はマウスの心電図による ST 上昇を全例で確認した。

●虚血再灌流モデルマウスを作製における虚血時間の検討

虚血再灌流モデルマウスを作製するにあたって評価系として成り立つためのモデル作製を行う必要があった。当初は30分虚血をおこない、30日後の評価を行なった。その際に、心エコーでは多少差がでていたものの、有意差はつかず正常機能を持ったものが多かった。かつ30日後の組織切片の評価では心臓の線維化が不十分であり、治療評価を行う上では不十分であった（図 14）。冠動脈の永久結紮モデルもよく知られているため、永久結紮モデルの作成も行なったが、線維化がきわめて強く左心室の菲薄化が顕著であり（図 15）、治療介入の余地がないと考えられたため断念した。

以上より本研究での虚血再灌流モデルマウスの虚血時間は60分を選択することとした。

虚血再還流モデル 虚血時間30分

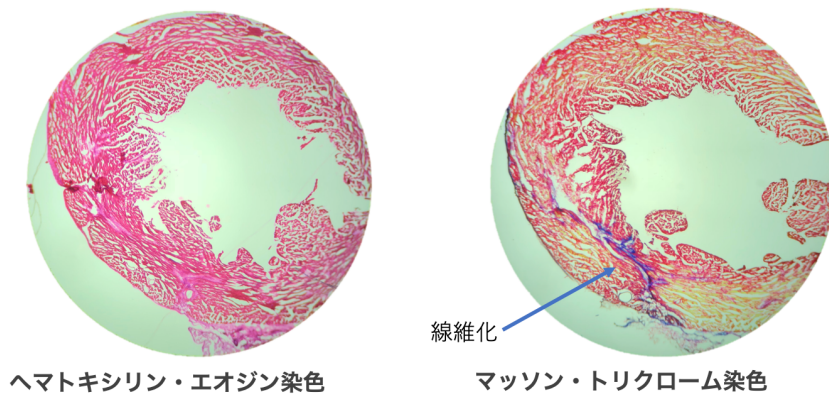


図 14. 虚血再還流モデル 虚血時間 30 分間で作成したのち 30 日後の病理切片像の一例を示す

永久結紮モデル

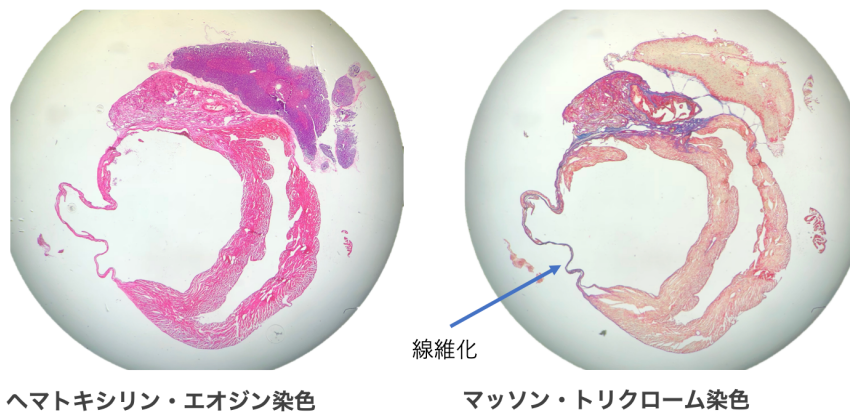


図 15. 虚血再還流モデル 虚血時間 30 分間で作成したのち 30 日後の病理切片像一例を示す

●虚血再灌流モデルマウスの細胞移植時のトラブルについて。

手術手技が短時間でトラブルなく行うことができるようになり、虚血時間の決定も行いうことができ、次のステップとして細胞移植の段階となった。

移植用の細胞を心筋内に直接投与した直後から致死的な徐脈となりマウスが死亡することが10例以上続いた。さまざまな論文を参照したが、同じようなことが生じている記載は一切見つけられなかった。心電図上は、急激な徐脈がおこっており、心房細動などの不整脈ではなかった。房室ブロックなどの致死的不整脈が細胞投与によって引き起こされたと判断し、細胞の保存条件や、回収のタイミングなどを様々変更した。

心室への心筋注射の場所の変更をおこなうことで、致死的な徐脈は減ったが一定率でマウスの移植後の死亡がおこっていた。心筋注射の場所による違いに着目し、右心室への移植細胞の混入による、肺動脈塞栓が考えられた。解明するために、移植細胞のミトコンドリアをMitoTracker deep red®を用いて標識し、マウスに移植用の細胞の尾静注をおこなった。移植用の細胞の尾静注をおこなった数分後に、マウスが徐脈となり死亡した。死んだマウスを解剖し、肺切片を作成し顕微鏡で観察したところ、移植細胞のMitoTracker deep red®が肺全体の血管に微小塞栓を起こしていることが判明した（図 16）。原因は右心系循環への移植用細胞の混入による肺塞栓症が判明したため、心筋への投与の際に、確実に左心室壁に入るように注意し手技を行うことで、術中のマウス死亡がほぼみられなくなり、本研究の結果を得ることができた。

MITO-Tracker deep redを用いて染色したCPCを静脈した後に摘出した肺組織切片

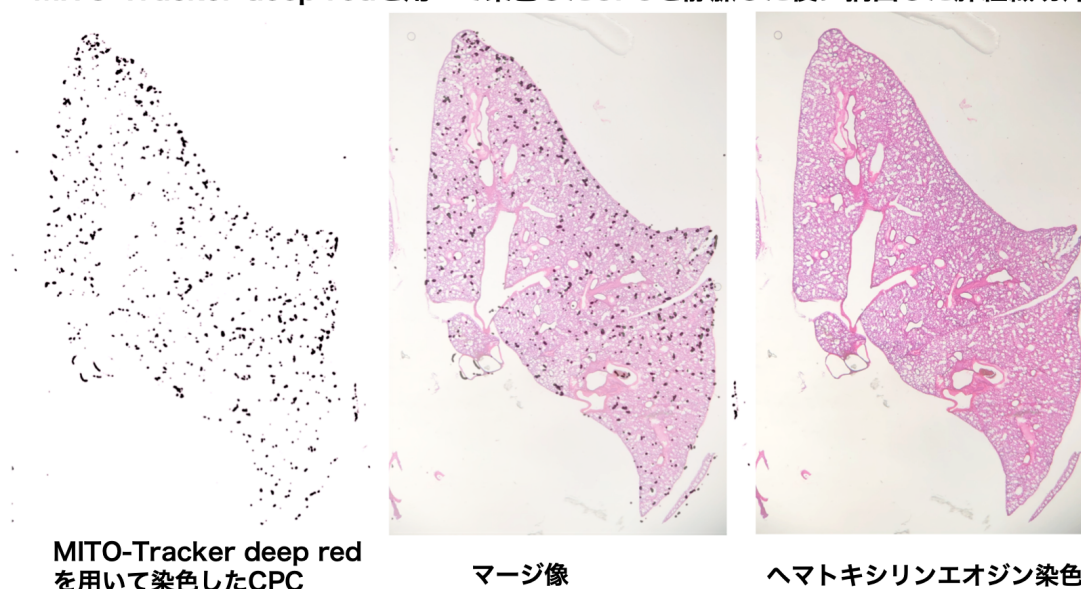


図 16. 移植細胞が全肺野にびまん性に広がっていることが判明した病理標本。

● ヒト心筋前駆細胞の単離

心筋前駆細胞移植および MITO-porter 技術の応用と、その臨床応用を目的にヒトの心筋組織からヒト心筋前駆細胞の単離をおこなった。適応疾患は右室流出路狭窄をともなう先天性心疾患の根治術の際に切除される右室心筋を対象とした（北海道大学病院臨床研究番号 自 016 - 0507）切除される心筋組織の量は 100-400mg 程度であった。（図 17）。

臨床応用を目的に “ヒト心筋組織” から心筋幹細胞の単離を行った。

対象疾患：右室流出路狭窄を伴う先天性心疾患

→ **ファロー四徴症、両大血管右室起始 etc**

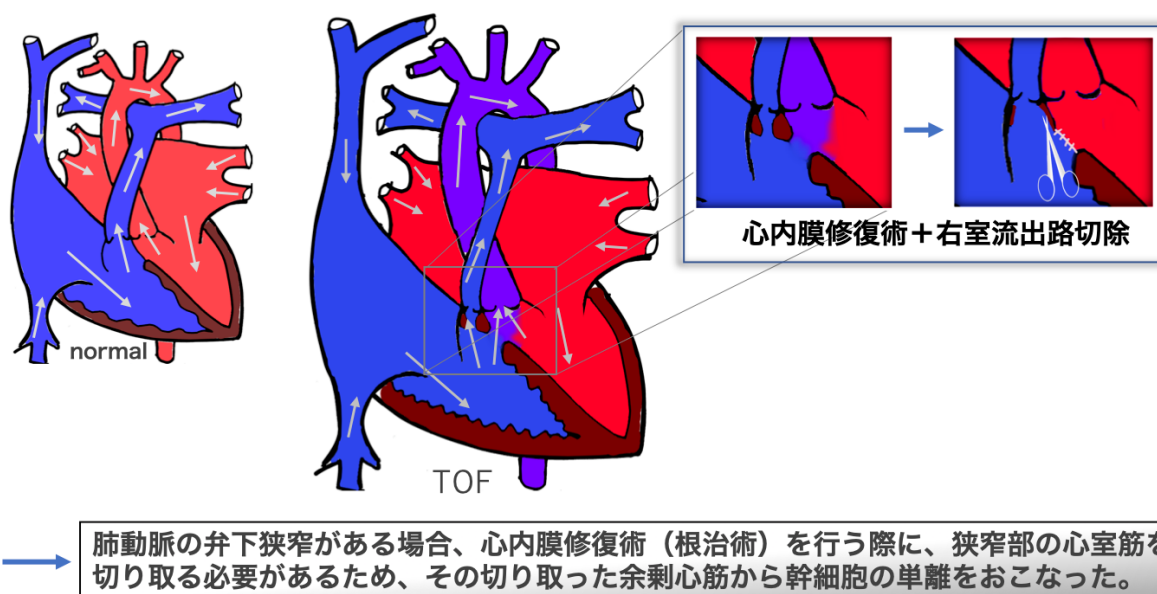


図 17. ヒト心筋前駆細胞単離の適応疾患。右室流出路狭窄をともなう先天性心疾患（ファロー四徴症、両大血管右室起始）の疾患・心筋切除における概要図。

ファロー四徴症、両大血管右室起始の根治術時に切除される右室心筋をもとに、cardiacsphere 法 (Ashur and Frishman, 2018) を用いてヒト心筋幹細胞を単離し、表面抗原マーカー検査し、間葉系幹細胞マーカーが陽性、CD117、CD29、CD34、CD45、CD338、CD11b、CD31が陰性。幹細胞であることを確認した（図 18）。

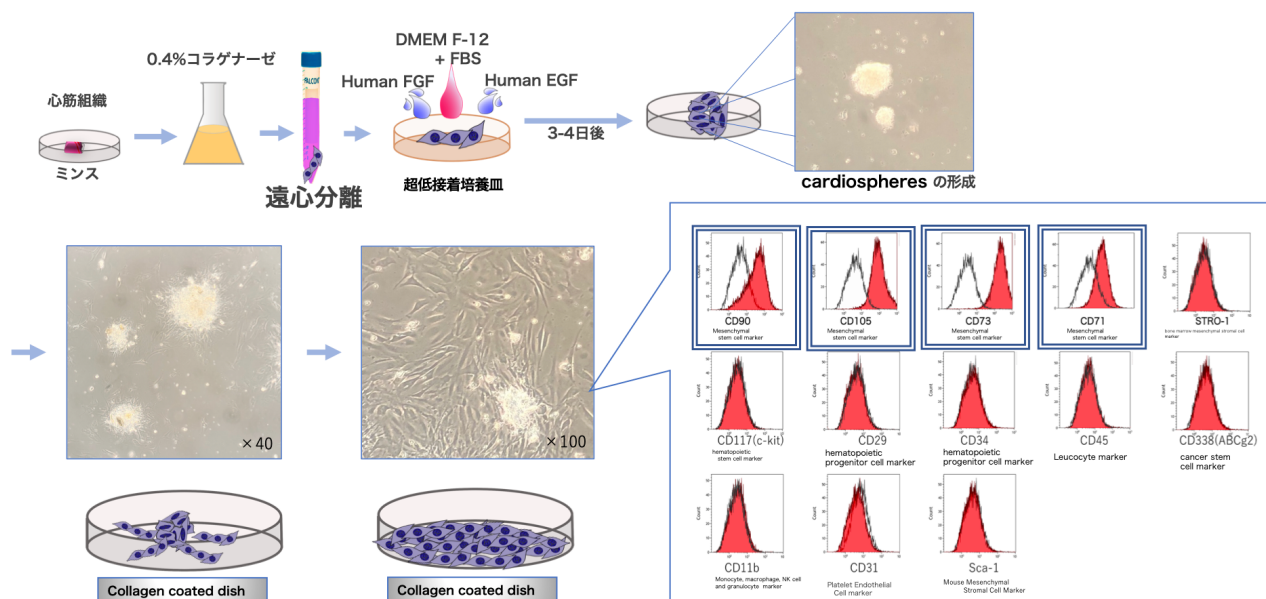


図 18. 心筋組織からヒト心筋前駆細胞の単離の工程のプロトコル図。

単離開始後二週間程度で超低接着ディッシュに 3 次元構造を保った cardiosphere 形成をした状態の心筋前駆細胞の塊がつくられる。細胞実験に使用する際にはコラーゲンコートディッシュに成長因子添加の上、継代培養を行うと、単層培養にて細胞増殖行うことが可能である。

単離したヒト心筋前駆細胞をコラーゲンコートディッシュで単層培養したのちに、超低接着ディッシュに戻すと、再度 3 次元構造を保った cardiosphere を再形成することも判明した。また、ヒト心筋前駆細胞を臨床応用おこなうためには、細胞を継代し多量に回収する必要がある。そのため、単層培養の継代によって細胞の分化にともなう形質変化が起こるのではないかと考え、継代初期の 2 継代目と 9 継代目の時点で、表面抗原マーカー検査した。その結果、2 継代目と 9 継代目では同様に間葉系幹細胞マーカーが陽性、CD117、CD29、CD34、CD45、CD338、CD11b、CD31 が陰性であり、継代を重ねて(9 継代まで確認)も幹細胞であることを確認した(図 19)。

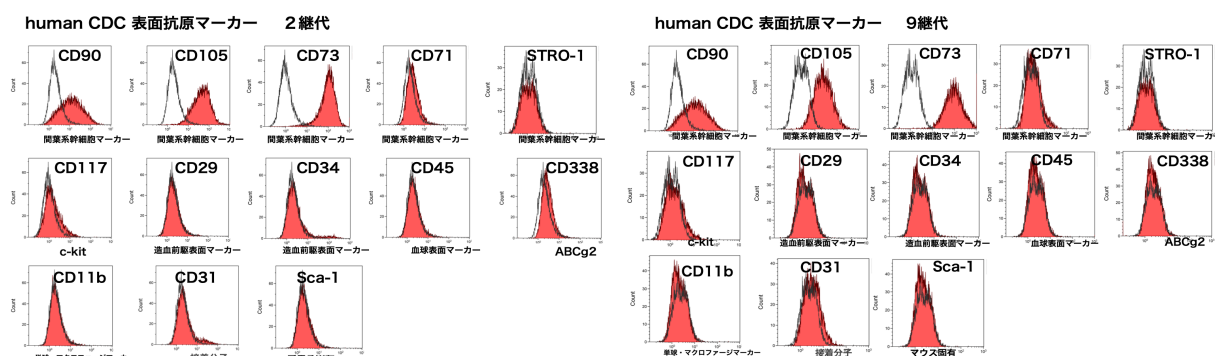


図 19. ヒト心筋前駆細胞における 2 継代目と 9 継代目の表面抗原マーカー評価。2 継代目と 9 継代目において、表面抗原マーカーの変化はみられなかった。

●心筋生検組織からのヒト心筋前駆細胞の単離

手術検体からヒト心筋前駆細胞の単離は組織の量としても十分量であり単離は上記の方法で可能であった。幅広い患者からのヒト心筋前駆細胞の回収を考慮した際に開心術が必要になるような状況では、臨床応用の適応は極めて限定的となる。臨床適応を広げるためには少なくとも、心筋生検のごくわずかな量からのヒト心筋前駆細胞が必要と考えられた。そこで、手術検体で手に入った心筋組織の一部を生検サイズに切り出して、ヒト心筋前駆細胞の単離ができるか検討した。コラゲナーゼを用いる方法、コラゲナーゼを使用しない方法、コラゲナーゼ濃度および、接触時間を調整などをおこない培養をおこなった。またさらに、超低接着ディッシュをもちいて組織自体からの3次元構造を保った cardiacsphere 形成を待つ方法、コラーゲンコートディッシュをもちいて細胞増殖を促す方法などを検討した。最終的にコラゲナーゼは少量検体からの単離の場合は必要ないと判断した。また、cardiacsphere 形成を待つ方法ではそだちが遅くほとんど細胞を回収できなかった。コラーゲンコートディッシュをもちいて細胞増殖を促すと心筋組織から細胞増殖が見られるようになった。細胞がある程度増殖した時点で、超低接着ディッシュに切り替えることで cardiacsphere の形成を得ることができた。この方法をもちいて、心筋生検の検体から細胞の単離を行い、樹立することができた。(図 20)。

心筋生検から細胞単離

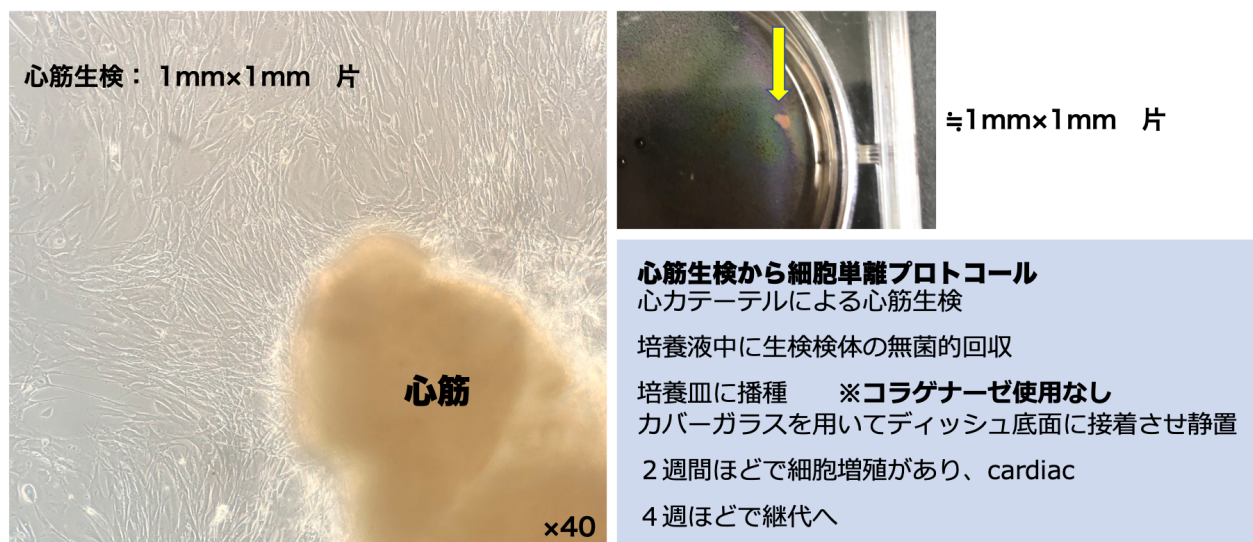


図 20. 心筋生検組織からの細胞の単離おこなった際の心筋組織および細胞増殖の様子。大きさは 1mm × 1mm。心筋から細胞が伸びるように増殖。単離のプロトコールを示した。

この方法を用いて単離した細胞の表面抗原マーカーの検査をおこなった。その結果、心筋組織からの培養と同様に間葉系幹細胞マーカーが陽性、CD117、CD29、CD34、CD45、CD338、CD11b、CD31が陰性であり、幹細胞であることを確認した（図 21）

心筋生検から細胞単離した細胞の表面抗原

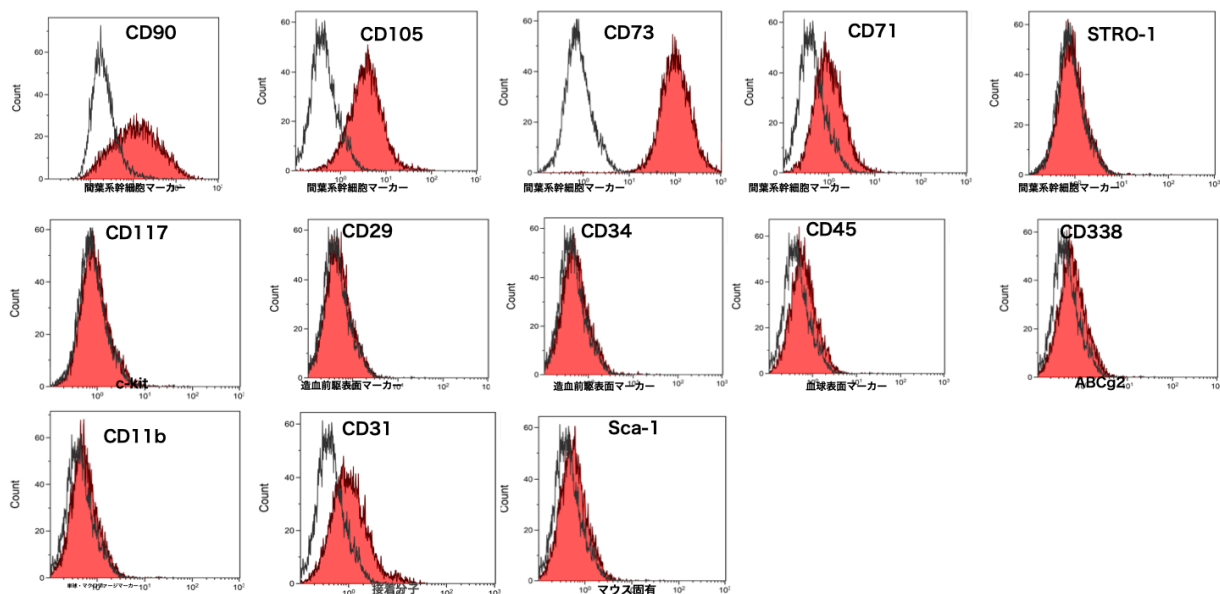


図 21. 心筋生検から単離した細胞の表面抗原マーカーの評価。

その結果、心筋組織からの培養と同様に間葉系幹細胞マーカーが陽性、CD117、CD29、CD34、CD45、CD338、CD11b、CD31 が陰性であり、幹細胞であることを確認した。

● MITO-Porter のヒト心筋前駆細胞内取り込みの評価

ヒト心筋組織からヒト心筋前駆細胞の単離し、そのヒト心筋前駆細胞への MITO-Porter の細胞内取り込みの評価を行った。NBD（蛍光色素）で標識した MITO-Porter のヒト心筋前駆細胞への細胞内取り込みをフローサイトメトリーで評価した（図 21(a)）。DOPE/SM-LP（RES）と比較して、S2-MITO-Porter（RES）および RP/S2-MITO-Porter（RES）の細胞内への取り込みが有意に増加した。また、S2-MITO-Porter（RES）と RP/S2-MITO-Porter（RES）の細胞内取り込み量にも有意な差があった。

キャリアの細胞内局在性を評価するために、NBD-DOPE で標識し、ミトコンドリアを MitoTracker deep red® で染色した粒子の細胞内動態を CLMS を用いて調べた。

DOPE/SM-LP (RES) と比較して、S2-MITO-porter (RES) と RP/S2-MITO-Porter（RES）の細胞内取り込みは、緑の点がはっきりと観察され、細胞内取り込み能力が上昇していることが示された。また、赤色に染色されたミトコンドリアと緑色に標識されたキャリアが黄色のシグナルとして共局在していることが観察され、キャリアがミトコンドリアに膜融合をおこしておりレスベラトロールを送達していることを示唆していた（図 22 (b)）。この CLMS で得られた画像を解析ソフト (Image-pro Plus 7.0) を用いて、細胞内におけるキャリアがどの程度ミトコンドリアと融合しているかを示す指標であるミトコンドリア移行率を評価した。移行率の算出は下記計算式によって行っ (Yamada et al., 2016) た。

黄色面積（ミトコンドリアと融合したキャリア）/（緑色面積（キャリア）＋黄色面積（ミトコンドリアと融合したキャリア））＝ミトコンドリア移行率

S2-MITO-porter (RES) と RP/S2-MITO-Porter（RES）のミトコンドリア移行を算出すると RP/S2-MITO-Porter（RES）が有意差を持ってミトコンドリア移行率が上昇していた。（図 22 (c)）

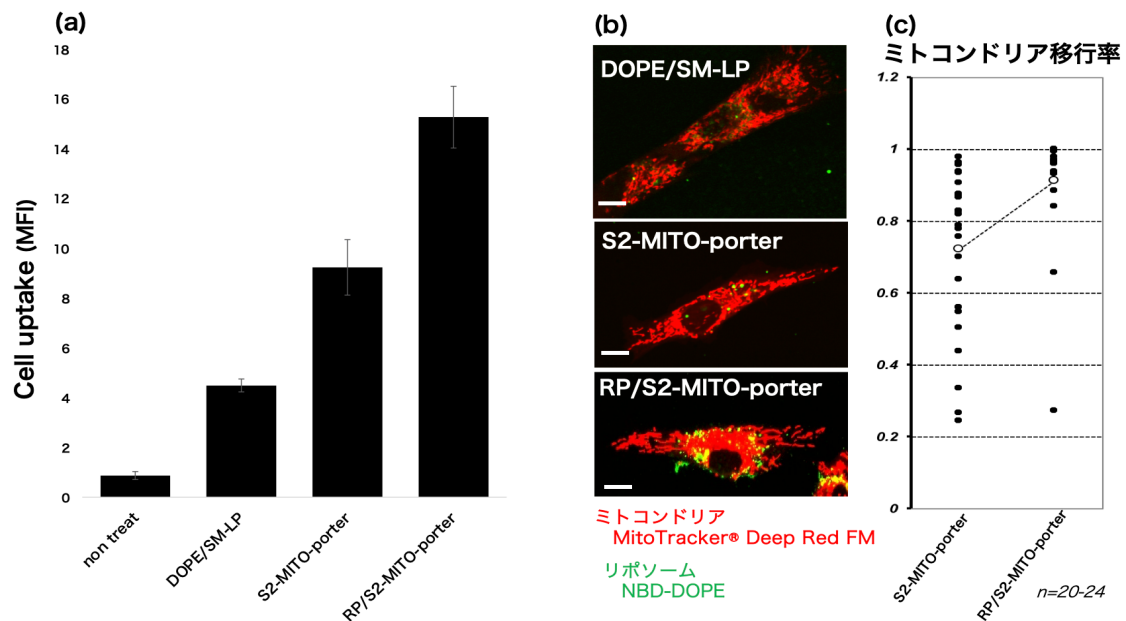


図 22. MITO-Porter のヒト心筋前駆細胞内取り込みの評価。

(a)NBD 標識した RP/S2-MITO-Porter (RES)、S2-MITO-Porter (RES) および DOPE/SM-LP(RES) の細胞取り込みを、ヒト心筋前駆細胞を用いてフローサイトメトリーで評価した。キャリアの平均蛍光強度 (MFI) を用いた細胞取り込みの定量分析を行った。データは S.D. (n=3) 平均値を表示。(b)CLSM を用いた DOPE/SM-LP (RES)、S2-MITO-Porter (RES) および RP/S2-MITO-Porter (RES) の細胞内観察をおこなった。緑色に標識されたキャリア (緑色) が赤色に染色されたミトコンドリアと共局在化された場合、マージされた画像に黄色のシグナルが観察された。スケールバーは $20\mu\text{m}$ 。(c) CLMS で得られた画像を解析ソフト (Image-pro Plus 7.0) を用いて、細胞内におけるミトコンドリア移行率を評価した。S2-MITO-porter(RES) と RP/S2-MITO-Porter (RES) のミトコンドリア移行を算出すると RP/S2-MITO-Porter (RES) が有意差を持ってミトコンドリア移行率が上昇を認めた ($P<0.01$ Unpaired t-test)。

● WST-1 試薬を用いた過酸化水素負荷によるヒト心筋前駆細胞生存率試験

ヒト心筋前駆細胞 (human CDC) 胞の単離をおこない。その細胞を用いて、RP/S2-MITO-Porter (RES) を添加し human MITO cell を作成した。単離した human CDC と human CDC から作成したミトコンドリア活性化細胞 (human MITO cell) について、30分の過酸化水素負荷 (濃度 0-1.5mM) を行い、細胞生存率を調べた (図 23)。

過酸化水素濃度 0.1mM では human CDC 63% と human MITO cell 82%、0.25mM では human CDC 52% と human MITO cell 67%、0.5mM では human CDC 44% と human MITO cell 54% とミトコンドリア活性化ヒト心筋前駆細胞群の細胞生存率の上昇がみられていた。

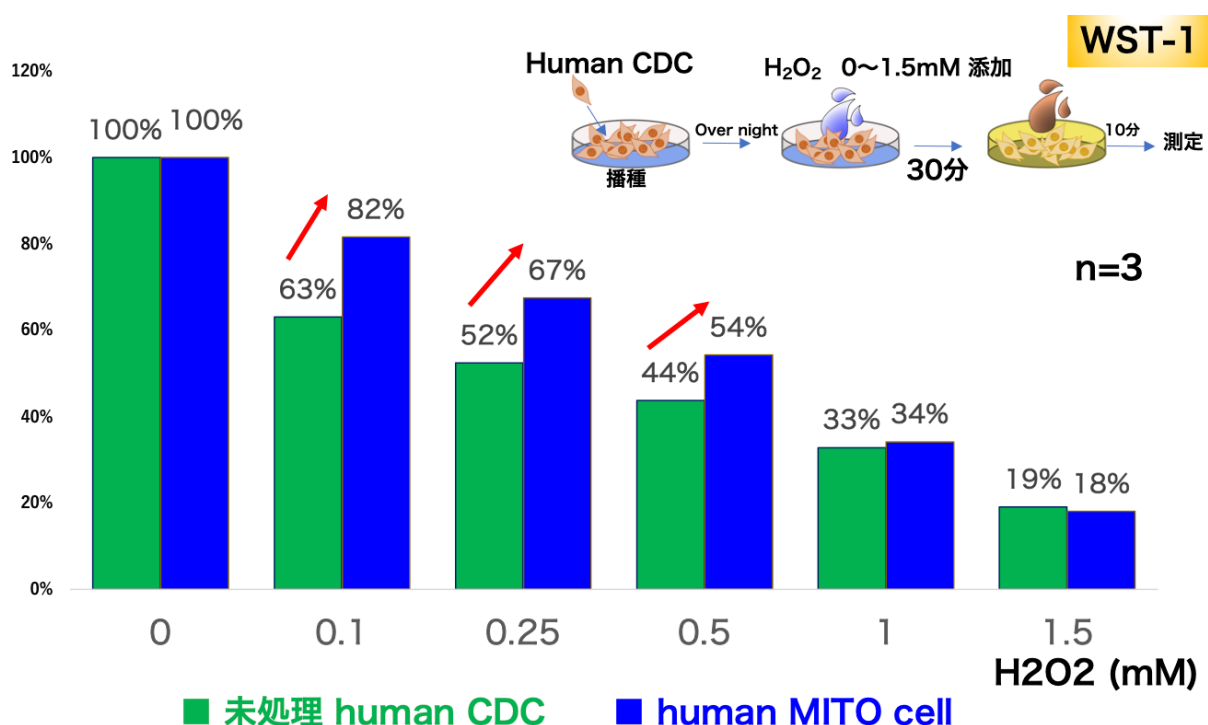


図 23. WST - 1 試薬を用いた過酸化水素負荷によるヒト心筋前駆細胞生存率試験。実験プロトコル及び、human CDC と human MITO cell の各濃度の細胞生存率を示す。過酸化水素濃度 0.1 mM では human CDC 63% と human MITO cell 82%、0.25 mM では human CDC 52% と human MITO cell 67%、0.5 mM では human CDC 44% と human MITO cell 54% とミトコンドリア活性化ヒト心筋前駆細胞群の細胞生存率の上昇がみられていた。n=3 の結果。

●細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア機能の評価

未処理 human CDC 群（control 群）、および RP/S2-MITO-Porter（RES）を添加した human CDC（human MITO cell 群）のミトコンドリア機能を、細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリア酸素消費量を測定することにより評価した（図24）。Human MITO cell 群では、control 群、最大呼吸数および ATP 産生量の増加が認められ、Human MITO cell のミトコンドリア機能の増加が示唆された（図24, 25(a) (b) (c)）。N=2 の結果のため有意差検定は行っていないが、RP/S2-MITO-Porter（RES）によって human CDC のミトコンドリア機能が上昇していることが示唆された。

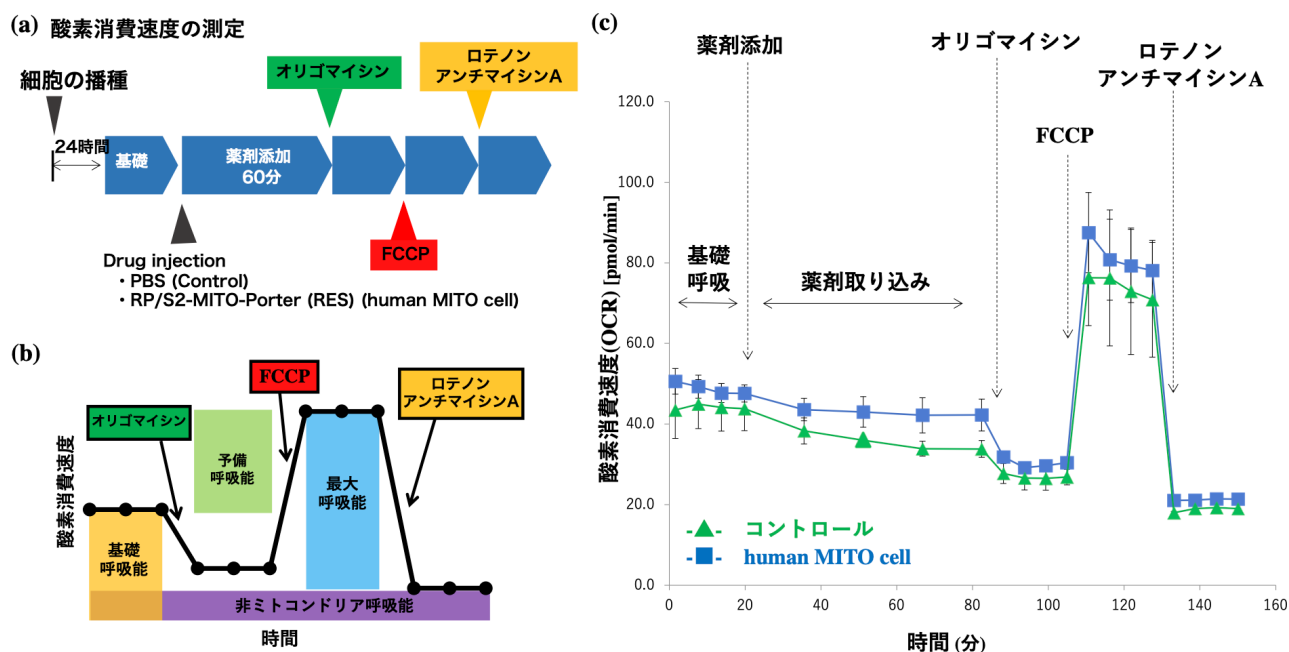


図24. 細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア機能の評価。

ミトコンドリアOCRの測定に基づくミトコンドリア機能の評価方法。a) 酸素消費率（OCR）アッセイプロトコールを示す。b) 基礎呼吸能、最大呼吸能、予備呼吸能、および非ミトコンドリア酸素消費量の計算方法を示す。c) PBS投与群（コントロール（▲））、human MITO cell 群（■）のOCR結果を示す。

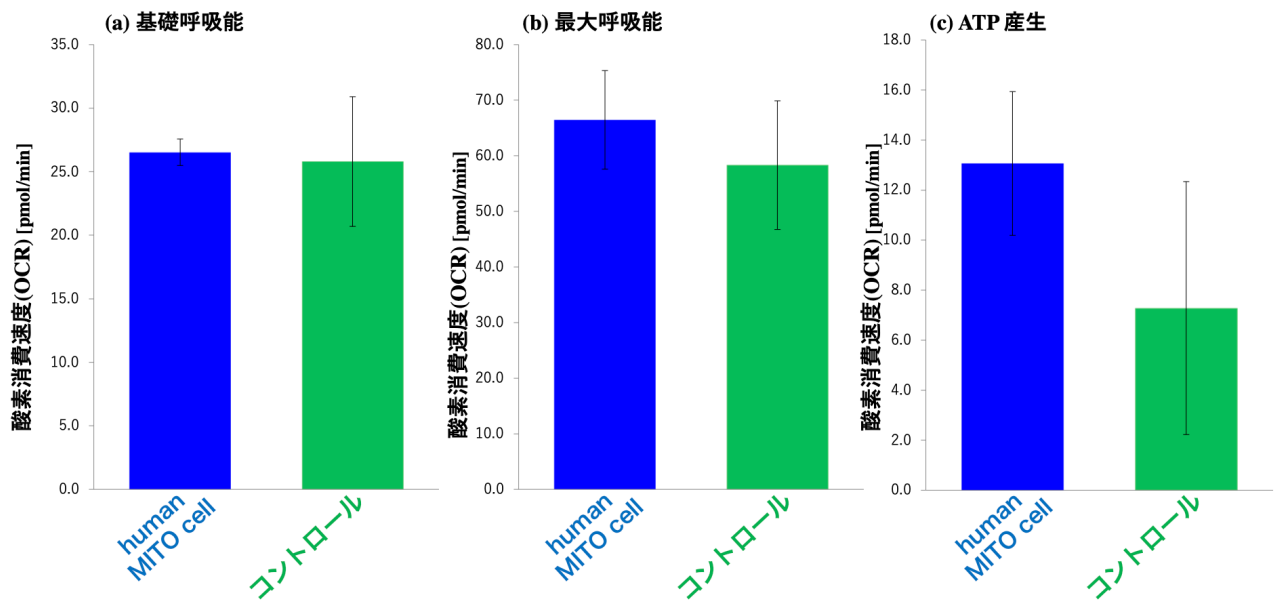


図 25. 細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア機能の評価

2 群 (human MITO cell 群、コントロール 群) それぞれの基礎呼吸能、最大呼吸能、ATP 産生量を示す。(a) 基礎呼吸能、(b) 最大呼吸、(c) ATP 産生量
n=2 のため有意差検定は未施行。

考 察

心不全に対する、未修飾の CPC もしくは、DDS を使用しない薬剤添加を用いた幹細胞移植は多数報告されモデルマウスを用いた研究では有効性は示されている (Li et al., 2007) (Silva Dos Santos et al., 2018)。CPC や間葉系幹細胞 (MSC) を用いたヒトへの細胞移植については、多くの臨床研究が行われている (Ashur and Frishman, 2018) (Turner et al., 2020)。その多くは有害事象が少なく、ある程度の効果が得られている。しかし、移植細胞の定着率の低さや移植方法の問題点 (Silva Dos Santos et al., 2018) などから、細胞移植療法はまだ臨床実用される段階には至っていない。このような背景から、この細胞移植療法を臨床応用、実用化するためには、細胞自体の機能を高める必要があると考えている。北海道大学薬学部薬剤分子設計学研究室では、ミトコンドリア活性化心筋幹細胞 (MITO cell) を MITO-Porter (RES) を用いてレスベラトロールをミトコンドリアに送達することで調製できることを報告している (Abe et al., 2018)。また、ドキシソルビシン心筋症のマウスモデルにおいて、従来の CPC 移植法と比較して MITO cell 移植が従来の方法と比較し改善されたことを示し、MITO cell 移植の予防効果を実証した (Abe et al., 2018)。

本研究では、MITO-Porter (RES) の治療効果をさらに高めるために、細胞内取り込みの上昇を試みた。キャリアの表面をS2ペプチドで修飾すると、細胞内への取り込みやミトコンドリアの移動が増加することが報告されている (Kawamura et al., 2013)。また、R8で修飾した MITO-Porter の場合、RPアプタマーでナノカプセルを修飾することで、細胞内取り込みの効率の上昇および、ミトコンドリア移行性が増強されることが報告されている (Yamada et al., 2016)。

本研究では、S2-MITO-Porter (RES) の表面をRPアプタマーで修飾し、細胞内取り込みを評価した。その結果、RP/S2-MITO-Porter (RES) が最も細胞内取り込みの増加を示した (図 6、22)。このことは、RPアプタマーで粒子表面を修飾することで、R8ペプチドと同様にS2ペプチドの存在下で MITO-Porter の細胞内取り込みが促進されることを示唆している (Yamada et al., 2016)。

北海道大学薬学部薬剤分子設計学研究室での既報 (Yamada et al., 2019) と同様に、S2ペプチドの改変は、血清の存在下での MITO-Porter (RES) の細胞内取り込みを可能にした。R8-MITO-Porter の場合、有血清培地でのキャリアの安定性を維持できず、血清含有培地中では凝集し、細胞の取り込み能力が著しく低下するため、無血清培地を用いて細胞内取り込みを行っていた (Yamada et al., 2008) (Yamada and Harashima, 2017)。しかしながら、無血清培地で細胞を培養すると細胞飢餓を誘発し、細胞毒性を引き起こす可能性があり、この点を改善させることは、細胞移植プロセスを改善す

るための戦略の一つとして重要事項であった。S2-MITO-Porter (RES) は、血清を含む細胞培養培地で使用することで、移植細胞を自然な環境で培養することができる。これは今後の臨床応用に向けた重要な点であり、血清存在下での安定した取り込みを実現したことで、より簡便に、より臨床応用・実用化を目指した研究が可能となった。

臨床現場では、急性心筋梗塞の患者が来院されると、すぐに冠動脈カテーテル検査が行われる。検査にて梗塞部位の特定が行われ、それに引き続き、経カテーテル的に冠血流再灌流が行われる。臨床的に考えられる細胞治療のタイミングは、心筋虚血が解除された後に、カテーテルを用いた冠動脈内の細胞の注射投与が一般的と考えられる。もしくは虚血性心疾患の慢性期、拡張型心筋症や先天性心疾患などの慢性心不全に対する、細胞移植としての冠動脈内注射投与が検討されることが考えられる。

実際の臨床研究では、再灌流療法の追加治療として冠動脈内細胞移植が選択されることが多い。これらの細胞移植は、再灌流に関連する状態を改善し、心筋を保護するデータが蓄積され臨床試験では成功している (Michler, 2018)。

本研究では、冠動脈虚血再灌流モデルマウスを作製し、細胞移植による心不全治療効果を検討した。手術では、虚血再灌流の急性期に CPC と MITO cell を心筋に直接注入した。細胞移植後30日目の時点では、MITO cell 群が最も体重増加が見られ、心エコーでも左室機能が良好であった (図 8)。病理組織象では線維化が抑制されており、虚血による心筋の損傷が最小限に抑えられていることが示唆された。CPC 移植単独でも有効であったが、MITO cell 移植群はより大きな治療効果を示した (図 9)。細胞移植後3日後の心筋組織のミトコンドリア機能を評価した。図 10.11 に示すように、MITO cell 群は活性酸素の発生を抑制し、膜電位の評価を行ったところ、活性酸素評価と同様の効果が得られた。MITO cell 群は、細胞を移植した部位だけでなく、組織全体で活性酸素の発生を抑制していた。

これについては移植された CPC 自体がこの短期間で増殖して心筋細胞に分化したとは考えにくく、他の作用機序も排除できないと考えられる。一つの可能性は、以前に報告されたパラクライン効果 (Maltais et al., 2010) (Redgrave et al., 2017)

(Ashur and Frishman, 2018) であり、CPC の作用によって誘導された何らかの因子が、組織全体の活性酸素の発生を抑制し、ミトコンドリア膜電位を維持する抗酸化作用を引き起こしたのではないかと考えられた (Kusuma et al., 2017)。もう一つの可能性としては、幹細胞が自らのミトコンドリアから他の損傷を受けた組織細胞に移動し、細胞内環境を最適化するミトコンドリア移動が考えられる (Paliwal et al., 2018)。

細胞外フラックスアナライザーを用いた実験からも明らかなように、MITO cell 群では CPC 群よりもミトコンドリア機能が増加していることがわかった (図 7)。これらの知見は、MITO cell のミトコンドリア機能の亢進が、生存率の向上やより強固なパラクリン作用、ミトコンドリア移行に寄与することを示唆している。このような作

用を誘導することで、その効果は局所的なものではなく、むしろ組織の改善という点でより広範囲に及んでいたのではないかと考えられる。従来の細胞移植治療に加えて、移植された細胞を活性化させることで、細胞移植効率の向上が期待できると考えられる。これにより、従来の細胞移植療法の弱点であった臨床応用への改善が期待される。

さらには、北海道大学薬学部薬剤分子設計学教室および医学部小児科循環器班の共同研究にて、ヒト心筋幹細胞をもちいた心筋幹細胞移植の心不全治療の臨床応用を目指している。ヒト心筋組織から単離したヒト心筋前駆細胞に対して MITO-porter をもちいて、ミトコンドリア活性化ヒト心筋前駆細胞の作成に着手し上記の結果を得ている。MITO-porter の細胞内取り込みは良好（図 22）で、WST-1 による細胞生存率の上昇を認め（図 23）、および細胞外フラックスアナライザーをもちいたミトコンドリア機能評価ではミトコンドリア機能向上を認めている（図 24, 25）。このことは、心不全治療に対する、心筋幹細胞移植療法が世界中で行われている現状を考慮すると、

MITO cell の移植治療の臨床応用は現実味を増しており、これまでの細胞移植の問題点を補うことができると考えられる。臨床応用を行うには、企業との共同研究は必須であると考えられる。その中で、粒子の安全性、搭載薬剤の検討、細胞実験の再現性、動物実験での治療効果証明、毒性試験、薬剤提供のための GFP 基準を満たすための施設選定などやるべき課題が残されている。

臨床応用、実用化を目指して、追加実験を進めていく予定である。

結 論

・心不全治療のための根本的な治療は心臓移植療法以外になく、細胞移植療法の治療効果が臨床的にも重要性が高まってきている。一方で細胞移植療法は上記に示したような問題点がある。現在その問題点を解決し、心不全の根本的な治療の一つとして確立するために、研究が必要とされている。心筋虚血およびそれによる心筋のダメージによるミトコンドリア機能低下の関係性が近年指摘され注目されつつある。

当研究室でこれまで開発を手掛けている、ミトコンドリアドラッグデリバリーシステムを用いて移植細胞に抗酸化剤であるレスベラトロールを移植細胞（心筋前駆細胞）のミトコンドリアに薬剤送達を行いミトコンドリア機能の強化を行なった。

新知見について

- ・これまでのナノカプセルの修飾素子を二重修飾法に変更することで、血清存在下培地で凝集することのないナノカプセルを作成に成功した。
- ・これまで以上に取り込み能力のよい粒子作成に成功した。
- ・二重修飾法を用いたナノカプセルを添加した心筋前駆細胞（MITO cell）のミトコンドリア機能は向上していた。
- ・この新規のナノカプセル組成を用いて作成した MITO cell の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。
- ・ヒト心筋組織からヒト心筋前駆細胞を単離することが可能となり、生検で得られた、ごくわずかな組織からも単離が可能であることがわかった。
- ・ヒト心筋前駆細胞をマウス心筋前駆細胞同様に、ナノカプセルを用いてミトコンドリア強化したヒト心筋前駆細胞を作成できることがわかった。

新知見の意義

移植細胞のミトコンドリア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 ROS の発生抑制認め、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。これによって 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いる。

ヒト心筋前駆細胞からも human MITO cell を作成できることがわかり、今後の細胞移植の問題点を解決できる可能性がある。

今後の研究の展開と課題点

これらの手法を用いることで、これまでの細胞移植療法自体の問題点を解決できる可能性があり、ヒトにおける心筋幹細胞で細胞実験および動物実験をさらに進めていく必要がある。

今後幹細胞移植療法の臨床応用を進めていく上で、細胞の前処置について、さらなる粒子の調整および、封入薬剤の検討、およびそれらについての毒性や腫瘍化の有無、コスト面なども含めた検討が必要となる

謝 辞

本研究を遂行するにあたり北海道大学大学院薬学部薬剤分子設計学教室に2年半の間、席を置かせていただき、数多くのご指導・ご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学部薬剤分子設計学教室・原島秀吉教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり終始、数多くの直接のご指導・ご鞭撻をいただきました。たくさんの時間を私との議論に費やしていただきご助言をしていただきました、北海道大学大学院薬学部薬剤分子設計学教室・山田勇磨准教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、共同研究を行うために北海道大学大学院薬学部薬剤分子設計学教室・中村考司助教、佐藤悠介助教に快く迎え入れていただき、ご指導いただきました。感謝申し上げます。

また、さまざまな実験手技、薬学の基礎知識を丁寧に教えていただき、また2年半の楽しい実験生活を送ることができたのは北海道大学大学院薬学部薬剤分子設計学教室ミトコンドリアグループの皆様のおかげです。深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究を行うために北海道大学大学院薬学部薬剤分子設計学教室に留学をお許し頂きました、北海道大学大学院 医学部医学科小児科学分野 有賀正名誉教授、真部淳教授に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、二学部間の共同研究の立ち上げから、さらなら進展をめざし、北海道大学大学院薬学部薬剤分子設計学教室に2年半の留学をお許し頂き、かつたくさんのご助言を賜りました北海道大学大学院 医学部医学科小児科学分野 武田充人講師に御礼申し上げます。また、留学を快くお許しいただきました循環器班の先生方に皆様に深く感謝申し上げます。

なお、本研究は、文部科学省科学研究費補助金(B) (補助金第17H02094号:有)、野口研究所、武田科学振興財団、持田記念医学・薬学研究財団の助成金の一部を受けて行われました。

利 益 相 反

所 属 北海道大学大学院医学研究科医学専攻 小児科学講座

氏 名 佐々木 大輔 (学生番号 42165206)

本学位論文に対し開示すべき利益相反はありません。

引 用 文 献 リ ス ト Uncategorized

References

- Abe, J., Yamada, Y., and Harashima, H. (2016). Validation of a Strategy for Cancer Therapy: Delivering Aminoglycoside Drugs to Mitochondria in HeLa Cells. *J Pharm Sci* 105, 734-740.
- Abe, J., Yamada, Y., Takeda, A., and Harashima, H. (2018). Cardiac progenitor cells activated by mitochondrial delivery of resveratrol enhance the survival of a doxorubicin-induced cardiomyopathy mouse model via the mitochondrial activation of a damaged myocardium. *J Control Release* 269, 177-188.
- Ashur, C., and Frishman, W.H. (2018). Cardiosphere-Derived Cells and Ischemic Heart Failure. *Cardiol Rev* 26, 8-21.
- Benjamin, E.J., Blaha, M.J., Chiuve, S.E., Cushman, M., Das, S.R., Deo, R., de Ferranti, S.D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., *et al.* (2017). Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135, e146-e603.
- Cheng, K., Malliaras, K., Smith, R.R., Shen, D., Sun, B., Blusztajn, A., Xie, Y., Ibrahim, A., Aminzadeh, M.A., Liu, W., *et al.* (2014). Human cardiosphere-derived cells from advanced heart failure patients exhibit augmented functional potency in myocardial repair. *JACC Heart Fail* 2, 49-61.
- Fernandez-Aviles, F., Sanz-Ruiz, R., Bogaert, J., Casado Plasencia, A., Gilaberte, I., Belmans, A., Fernandez-Santos, M.E., Charron, D., Mulet, M., Yotti, R., *et al.*

(2018). Safety and Efficacy of Intracoronary Infusion of Allogeneic Human Cardiac Stem Cells in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction. *Circ Res* *123*, 579–589.

Kawamura, E., Yamada, Y., and Harashima, H. (2013). Mitochondrial targeting functional peptides as potential devices for the mitochondrial delivery of a DF-MITO-Porter. *Mitochondrion* *13*, 610–614.

Kusuma, G.D., Carthew, J., Lim, R., and Frith, J.E. (2017). Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. *Stem Cells Dev* *26*, 617–631.

Kuznetsov, A.V., Javadov, S., Margreiter, R., Grimm, M., Hagenbuchner, J., and Ausserlechner, M.J. (2019). The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxidants (Basel)* *8*.

Le Page, S., Niro, M., Fauconnier, J., Cellier, L., Tamarelle, S., Gharib, A., Chevrollier, A., Loufrani, L., Grenier, C., Kamel, R., *et al.* (2016). Increase in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injuries in Opal+/- Mouse Model. *PLoS One* *11*, e0164066.

Li, T.S., Mikamo, A., Takahashi, M., Suzuki, R., Ueda, K., Ikeda, Y., Matsuzaki, M., and Hamano, K. (2007). Comparison of cell therapy and cytokine therapy for functional repair in ischemic and nonischemic heart failure. *Cell Transplant* *16*, 365–374.

Makkar, R.R., Smith, R.R., Cheng, K., Malliaras, K., Thomson, L.E., Berman, D., Czer, L.S., Marban, L., Mendizabal, A., Johnston, P.V., *et al.* (2012). Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* *379*, 895–904.

Malliaras, K., Makkar, R.R., Smith, R.R., Cheng, K., Wu, E., Bonow, R.O., Marban, L., Mendizabal, A., Cingolani, E., Johnston, P.V., *et al.* (2014). Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (Cardiosphere-Derived aUtologous stem Cells to reverse ventricUlar dySfunction). *J Am Coll Cardiol* *63*, 110–122.

Maltais, S., Tremblay, J.P., Perrault, L.P., and Ly, H.Q. (2010). The paracrine effect: pivotal mechanism in cell-based cardiac repair. *J Cardiovasc Transl Res* *3*, 652–662.

Menasche, P., Hagege, A.A., Scorsin, M., Pouzet, B., Desnos, M., Duboc, D., Schwartz, K., Vilquin, J.T., and Marolleau, J.P. (2001). Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* *357*, 279–280.

Meyer, G.P., Wollert, K.C., Lotz, J., Pirr, J., Rager, U., Lippolt, P., Hahn, A., Fichtner, S., Schaefer, A., Arseniev, L., *et al.* (2009). Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J* *30*, 2978–2984.

Michler, R.E. (2018). The current status of stem cell therapy in ischemic heart disease. *J Card Surg* *33*, 520–531.

Miller, L., Birks, E., Guglin, M., Lamba, H., and Frazier, O.H. (2019). Use of Ventricular Assist Devices and Heart Transplantation for Advanced Heart Failure. *Circ Res* *124*, 1658–1678.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., *et al.* (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* *410*, 701–705.

Paliwal, S., Chaudhuri, R., Agrawal, A., and Mohanty, S. (2018). Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer. *J Biomed Sci* *25*, 31.

Redgrave, R.E., Tual-Chalot, S., Davison, B.J., Singh, E., Hall, D., Amirrasouli, M.M., Gilchrist, D., Medvinsky, A., and Arthur, H.M. (2017). Cardiosphere-Derived Cells Require Endoglin for Paracrine-Mediated Angiogenesis. *Stem Cell Reports* *8*, 1287–1298.

Sanz-Ruiz, R., Casado Plasencia, A., Borlado, L.R., Fernandez-Santos, M.E., Al-Daccak, R., Claus, P., Palacios, I., Sadaba, R., Charron, D., Bogaert, J., *et al.* (2017). Rationale and Design of a Clinical Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Intracoronary Infusion of Allogeneic Human Cardiac Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction: The Randomized Multicenter Double-Blind Controlled CAREMI Trial (Cardiac Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction). *Circ Res* *121*, 71–80.

Schachinger, V., Assmus, B., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Yu, J., Corti, R., Mathey, D.G., Hamm, C.W., *et al.* (2009). Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail* *11*, 973–979.

Silva Dos Santos, D., Brasil, G.V., Ramos, I.P.R., Mesquita, F.C.P., Kasai-Brunswick, T.H., Christie, M.L.A., Cahli, G.M., Barbosa, R.A.Q., da Cunha, S.T., Pereira, J.X., *et al.* (2018). Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for the treatment of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Stem Cell Res Ther* *9*, 30.

Turner, D., Rieger, A.C., Balkan, W., and Hare, J.M. (2020). Clinical-based Cell Therapies for Heart Disease-Current and Future State. *Rambam Maimonides Med J* *11*.

Yamada, Y., Akita, H., Kamiya, H., Kogure, K., Yamamoto, T., Shinohara, Y., Yamashita, K., Kobayashi, H., Kikuchi, H., and Harashima, H. (2008). MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* *1778*, 423-432.

Yamada, Y., Daikuhara, S., Tamura, A., Nishida, K., Yui, N., and Harashima, H. (2019). Enhanced autophagy induction via the mitochondrial delivery of methylated beta-cyclodextrin-threaded polyrotaxanes using a MITO-Porter. *Chem Commun (Camb)* *55*, 7203-7206.

Yamada, Y., Furukawa, R., and Harashima, H. (2016). A Dual-Ligand Liposomal System Composed of a Cell-Penetrating Peptide and a Mitochondrial RNA Aptamer Synergistically Facilitates Cellular Uptake and Mitochondrial Targeting. *J Pharm Sci* *105*, 1705-1713.

Yamada, Y., and Harashima, H. (2017). MITO-Porter for Mitochondrial Delivery and Mitochondrial Functional Analysis. *Handb Exp Pharmacol* *240*, 457-472.

Yamada, Y., Munechika, R., Satrialdi, Kubota, F., Sato, Y., Sakurai, Y., and Harashima, H. (2020). Mitochondrial Delivery of an Anticancer Drug Via Systemic Administration Using a Mitochondrial Delivery System That Inhibits the Growth of Drug-Resistant Cancer Engrafted on Mice. *J Pharm Sci* *109*, 2493-2500.

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