HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ミトコンドリア標的型ドラッグデリバリーシステムを用いた間葉系幹細胞のミトコンドリア機能改変
Author(s)	丸尾, 優爾
Description	配架番号：3003
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16910号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16910
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99755
Type	doctoral thesis
File Information	MARUO_Yuji_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　　丸　尾　優　爾

学 位 論 文 題 名

ミトコンドリア標的型ドラッグデリバリーシステムを用いた
間葉系幹細胞のミトコンドリア機能改変
（Mitochondrial Activation of Mesenchymal Stem Cells
Using a Mitochondria-Targeted Drug Delivery System）

【背景と目的】間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は、成体組織に存在する多能性細胞であり、骨、軟骨、脂肪組織、腱、筋肉など多様な細胞系列へ分化する能力を有している。さらに、MSC はサイトカイン放出を介して免疫細胞と相互作用することにより抗炎症作用を示すことが知られている。自家および同種 MSC 移植の有効性は、さまざまな疾患において報告されている。しかし、移植後の MSC は酸化ストレスやエネルギー代謝障害にさらされることで生存率や治療効果が制限されることがあり、ミトコンドリア機能の改善が移植効果向上に寄与する可能性がある。我々はこれまでに、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である MITO-Porter を開発しており、これは膜融合を介して多様な分子をミトコンドリアへ輸送することを可能にする。我々は以前、マイクロ流体デバイスを用いて、コエンザイム Q_{10} (CoQ_{10}) を内包した MITO-Porter の大量調製に成功している。さらに、我々はヒト心臓由来細胞 (CDC) を CoQ_{10} 内包 MITO-Porter で処理することでミトコンドリア呼吸能を増強し、そのミトコンドリア機能活性化 CDC を静脈内投与することによって心筋虚血再灌流マウスモデルにおいて治療効果を実証することに成功している。本研究では、CoQ_{10} 内包 MITO-Porter が MSC のミトコンドリア機能を増強し、MSC の細胞移植療法の改善につながるか検証することを目的とした。

【材料と方法】本研究では、高純度のヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (rapidly expanding clone: REC) を使用した。MITO-Porter への CoQ_{10} 内包量を制御するために、マイクロ流体デバイスを用いて、従来型の CoQ_{10} 内包 MITO-Porter (MP-(CoQ_{10}))、CoQ_{10} を従来型の約 2 倍および 3 倍内包する MITO-Porter (MP-(2x CoQ_{10})、MP-(3x CoQ_{10}))、および CoQ_{10} を含まない対照粒子 (MP-(Empty)) を作製した。各粒子の平均粒子径、ポリ分散指数 (PDI) 、ゼータ電位を動的光散乱法で測定し、脂質および CoQ_{10} の回収率、薬物/脂質比を算出した。REC に対して最終脂質濃度 20 μM となるように各 MITO-Porter を 24 時間添加し、細胞内取り込みは DiI 蛍光標識 MITO-Porter を用いてフローサイトメトリーで評価し、細胞内のミトコンドリア共局在の評価には、DiI 蛍光標識および MitoTracker Deep Red を用いた共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) で評価した。REC のミトコンドリア呼吸能の評価は、酸素消費速度 (OCR) を指標として、Oligomycin、FCCP、Rotenone/Antimycin A の順次添加により測定し、基礎呼吸能および最大呼吸能の相対 OCR を Non-treatment (NT) 群を基準として算出した。また、MITO-Porter の細胞毒性は WST-1 アッセイにより細胞生存率として評価した。各解析は適切な対照群 (PBS 処理群、MP-(Empty) 群) と比較して行った。

【結果】本研究において、我々はまず、CDC におけるミトコンドリア機能活性化を報告した先行研究に従い、最終脂質濃度 50–60 μM の MP-(CoQ_{10}) を 24 時間 REC に添加し、ミトコンドリア機能の増強を試みた。しかし、細胞外フラックスアナライザーによる評価の結果、ミトコンドリア呼吸能に有意な変化はみられなかった。REC におけるミトコンドリア呼吸能を増強するため、我々はマイクロ流体デバイスを用いて、より多くの CoQ_{10} を内包した MITO-Porter の調製を試み、その結果、CoQ_{10} 懸濁

液の濃度を変化させることにより、従来型の約 2 倍および 3 倍量の CoQ_{10} を含有する MP-(2x CoQ_{10}) および MP-(3x CoQ_{10}) の作製に成功した。MP-(Empty)、MP-(CoQ_{10})、MP-(2x CoQ_{10})、および MP-(3x CoQ_{10}) の平均粒子径は 41–58 nm、PDI は 0.18–0.22、ゼータ電位は 18–20 mV であり、安定した脂質ナノ粒子が得られた。脂質回収率は 75–85%、CoQ_{10} 回収率は 75–80% であり、薬物/脂質比は MP-(CoQ_{10})、MP-(2x CoQ_{10})、MP-(3x CoQ_{10}) でそれぞれ 0.16 ± 0.01、0.36 ± 0.06、0.55 ± 0.07 (平均値 ± SD) であった。フローサイトメトリー解析により、各 MITO-Porter は NT 群と比較して REC に有意に取り込まれることが示唆された。また、CLSM を用いた評価により、MITO-Porter は REC のミトコンドリアと共局在することが示唆された。REC に対して MP-(CoQ_{10})、MP-(2x CoQ_{10})、または MP-(3x CoQ_{10}) を最終脂質濃度 20 μM で処理した 24 時間後に OCR を測定したところ、MP-(2x CoQ_{10}) 処理群での REC の OCR が最大となった。REC に対して最終脂質濃度 20 μM となるように MP-(2x CoQ_{10}) を 24 時間処理したところ、NT 群および MP-(Empty) 処理群と比較して最大呼吸能が有意に増加した。WST-1 による細胞生存率評価では、最終脂質濃度 10–40 μM の範囲内において各 MITO-Porter の細胞毒性は認められなかった。

【考察】本研究では、従来型の MP-(CoQ_{10}) では REC におけるミトコンドリア呼吸能を増強できなかったため、より多量の CoQ_{10} を内包した MITO-Porter を、マイクロ流体デバイスシステムを用いて新たに調製した。MITO-Porter 調製前に CoQ_{10} 懸濁液の濃度を変更することにより、CoQ_{10} を豊富に内包する MITO-Porter を調製し、REC のミトコンドリア呼吸能を増強することに成功した。本研究により、マイクロ流体デバイスを活用することで MITO-Porter に内包される CoQ_{10} 量を精密に制御できることが示された。このことは、MSC 移植療法において、ミトコンドリア機能改善が治療効果の向上に寄与する可能性があることを示唆している。

【結論】本研究により、マイクロ流体デバイスを用いることで MITO-Porter に内包される CoQ_{10} 量を精密に制御できることを明らかにした。また、CoQ_{10} を豊富に内包した MITO-Porter により、MSC のミトコンドリア機能を活性化できることを示した。これらの知見は、MITO-Porter システムがミトコンドリア機能を人為的に制御し得ることを示すものであり、MSC 移植療法の治療効果を高める新たな技術基盤となる可能性が示唆された。今後は *in vivo* 評価を含めた安全性および有効性検討を進めることで、再生医療応用への展開が期待される。