

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15673

研究課題名（和文）高純度間葉系幹細胞由来ミトコンドリアの移入によるミトコンドリア病の治療開発

研究課題名（英文）Mitochondria transfer by highly-purified MSC in mitochondria diseases

研究代表者

松村 美咲（Misaki, Matsumura）

島根大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30811244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの含有量が極めて高い高純度間葉系幹細胞からミトコンドリアが移入することによって治療法のないミトコンドリア病の細胞機能が回復することを明らかにするために、ミトコンドリア欠失細胞株（O細胞株）およびミトコンドリア病由来iPS細胞から分化された神経細胞を用いて、高純度間葉系幹細胞と共培養して、ミトコンドリア機能を検討した。どちらの細胞でも、高純度間葉系幹細胞が通常の培養方法で樹立した間葉系幹細胞よりも、ミトコンドリアの移入効率が良いだけでなく、ミトコンドリアの膜電位とATP産生能の回復および活性酸素と乳酸の低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高純度間葉系幹細胞は増殖だけでなく遊走性に優れていることは証明している。また、非臨床POCにおいて、静脈内の反復投与での安全性も実証済みであることから、有効性が得られれば可及的速やかに臨床試験あるいは治療を行うことができるため、臨床応用が可能な細胞である。ミトコンドリア病に対する確立した治療法が存在しない現在、今回の高純度間葉系幹細胞がミトコンドリア移入に優れているだけでなくミトコンドリア機能も回復させることから、今後in vivoでの有効性が実証できれば世界初の有効な治療法となり得る可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：To clarify that the transfer of mitochondria from high-purity mesenchymal stem cells (REC) with extremely high mitochondrial content restores the cell function of mitochondrial disease for which there is no cure, mitochondrial function was investigated by co-culturing with REC using mitochondrial deletion cell line (O cell line) and nerve cells differentiated from iPS cells derived from patients with mitochondrial disease. Both cells have better mitochondrial transfer efficiency from REC compared with mesenchymal stem cells established by conventional culture methods. Recovery of mitochondrial membrane potential and ATP production ability and decrease in active oxygen, and lactic acid was observed.

研究分野：再生医療、細胞治療、希少難病、間葉系幹細胞

キーワード：間葉系幹細胞 ミトコンドリア病

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病は、ミトコンドリア機能が障害によるエネルギー産生低下などにより、中枢神経系に加えて骨格筋、心臓、肝臓、腎臓などの多臓器にわたる障害を認め、重症例は進行して致死的な経過をとる。現在、有効な治療法は確立していない。

最近、間葉系幹細胞が脳梗塞や急性肺疾患などの障害された細胞内に、間葉系幹細胞内のミトコンドリアが移入することによって細胞機能を回復させることが報告されている。

そこで、我々が開発したミトコンドリアの含有量が極めて高い高純度間葉系幹細胞 (MSC) (rapidly expanded cell, REC) からミトコンドリアが移入することによってミトコンドリア病の細胞機能が回復することを明らかにし、その機序を解明する。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアの含有量が極めて高い EEC からミトコンドリアが移入することによってミトコンドリア病の細胞機能が回復することを明らかにすること。

## 3. 研究の方法

- (1) REC および通常の培養方法で増殖した MSC をミトコンドリア欠失細胞株 ( $\rho 0$  細胞株) およびミトコンドリア病患者由来 iPS 細胞から樹立した神経細胞 (MELAS-neuron cells) と共培養して、ミトコンドリアが移入することを証明する。
- (2) 正常なミトコンドリアが移入した  $\rho 0$  細胞株および MELAS-neuron cells の機能が改善することを明らかにするために、viability、活性酸素量、乳酸量、ATP 産生能、呼吸鎖機能 (フラックスアナライザーによる酸素消費量)、ミトコンドリア膜電位 (JC-1) を検討する。
- (3) ミトコンドリアが移入する機序として、細胞間接着、微小管、細胞外小胞が考えられる。細胞間接着の必要性を明らかにするためにトランスウェルアッセイ (ボイデンチャンバー) を行う。微小管の形成は免疫蛍光染色 (F-actin) で評価し、Mito-red ラベルしたミトコンドリアが微小管内を移動することを証明する。また、微小管形成を阻害する薬剤 (Cytochalasin D) を用いて微小管がミトコンドリアの移入に必要なかを明らかにする。また、細胞間接着 (GAP junction) を阻害する薬剤 (Carbenoxolone) を用いて同様の実験を行う。さらに、細胞外小胞に関して、高純度 MSC が通過しないが細胞外小胞は通過するボイデンチャンバーを用いてミトコンドリアが移入することを証明する。その際、endocytosis を阻害する Dynasore を用いて同様の実験を行う。

## 4. 研究成果

- (1)  $\rho 0$  細胞株の樹立および間葉系幹細胞からのミトコンドリア移入  
DMSO で処理した HeLa 細胞株および A549 細胞株において、どちらの細胞株でもミトコンドリアを欠失させた細胞株 ( $\rho 0$  細胞株) の樹立を行うことができた (図 1A, B)。

図 1A

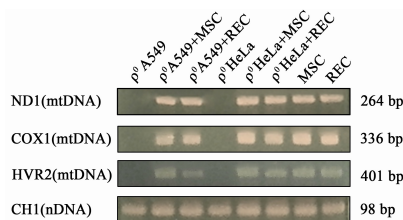
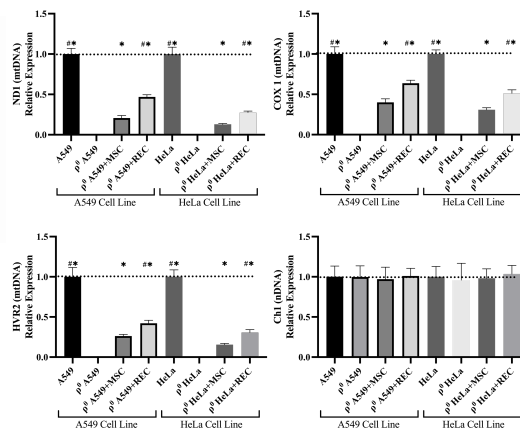
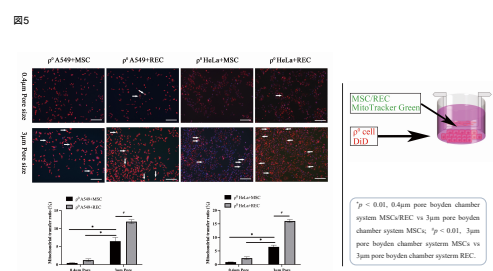
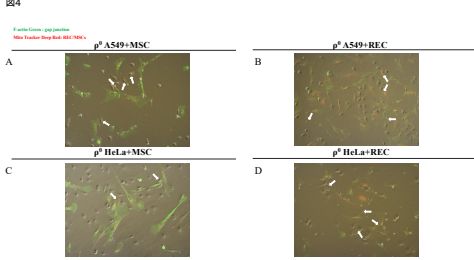
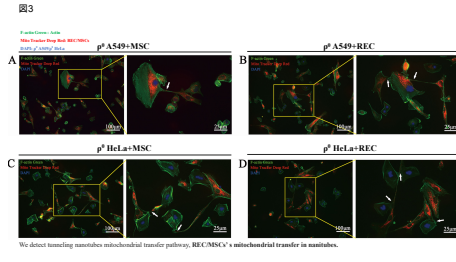
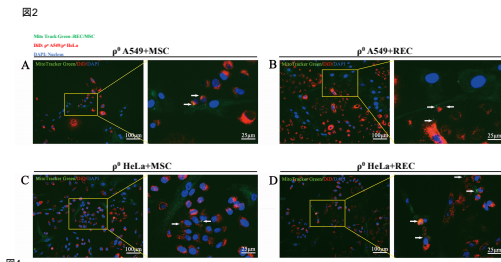


図 1B



\*p < 0.05 compared to  $\rho^0$  cells. Note that the  $\rho 0$  cells exhibited no detectable mtDNA. REC/MSCs donated mtDNA to replenish the  $\rho^0$  cells.

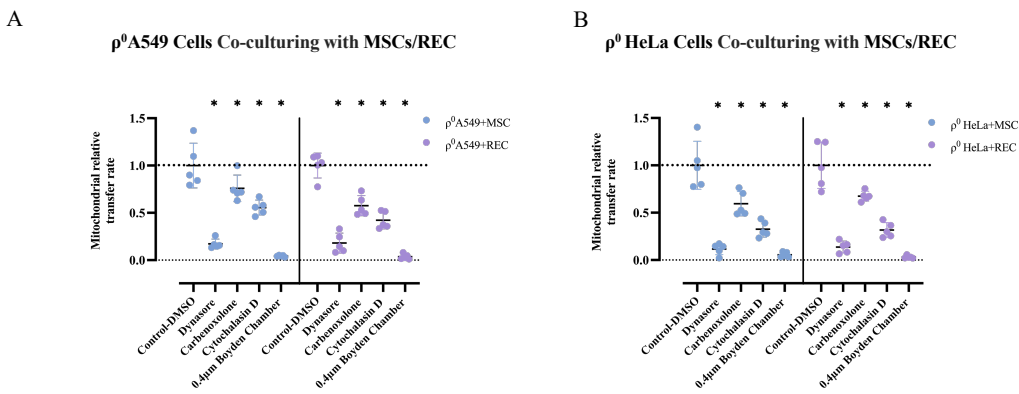
これらの細胞株と REC および MSC と共培養した結果、どちらも遺伝子レベルでミトコンドリアの移入を確認できた。また、RECの方がMSCよりもミトコンドリアの移入が有意に多かった(図1A, B)。また、RECおよびMSCにラベルしたミトコンドリアがそれぞれの細胞株に移入していることを確認できた(図2A-D)。また、F-actinで免疫染色を行なったところ、nanotube(図3A-D)およびGAP junction(図4A-D)を介してミトコンドリアが移入していることを確認できた。



次に、トランスウェルアッセイを用いて  $\rho 0$  細胞株と REC あるいは MSC が直接接触しない状況(ボイデンチャンバーの pore サイズ  $3\mu\text{m}$ )でミトコンドリアが移入するか検討したところ、RECの方がMSCよりもミトコンドリアの移入が有意に多かった(図5)。

- (2) ミトコンドリアが移入する機序である、細胞間接着、微小管、細胞外小胞のいずれが重要な移入経路であるか明らかにするために、微小管形成を阻害する薬剤(Cytochalasin D)、細胞間接着(GAP junction)を阻害する薬剤(Carbenoxolone)、endocytosisを阻害するDynasoreを用いて検討した。その結果、direct contactの機序である細胞間接着あるいは微小管よりも non-direct contactの機序である細胞外小胞の方が優位にミトコンドリア記入に必要であることを明らかにした(図6A, B)。

図6



\*  $p < 0.01$ , Control-DMSO vs others multiple mechanisms

- (3) ミトコンドリアが移入した  $\rho 0$  細胞株において、ミトコンドリア機能が回復したか明らかにするために、細胞増殖、活性酸素量、乳酸量、ATP産生能、呼吸鎖機能、ミトコンドリア膜電位を検討した。JC-1を用いたミトコンドリア膜電位(図7)、ATP産生能(図8A)、活性酸素量(図8B)および細胞内外の乳酸量(図9A, B)において、ミトコンドリアの膜電位とATP産生能の回復および活性酸素と乳酸の低下を認めた。これらの結果はすべてRECがMSCを凌駕していた。しかし、CSFEを用いた細胞増殖に関しては、ミトコンド

リアが移入しても細胞増殖に影響はみられなかった (図 10)。フラックスアナライザーを用いた呼吸鎖機能に関して、REC が MSC よりも酸素消費量の回復を認めた (図 11)。

図7

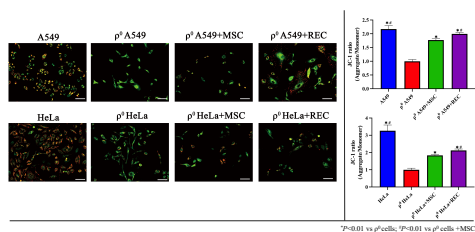


図8A

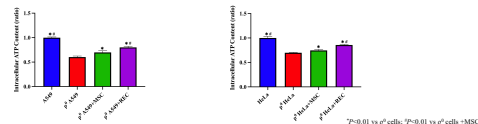


図8B

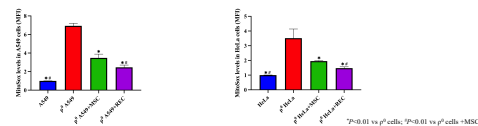


図9

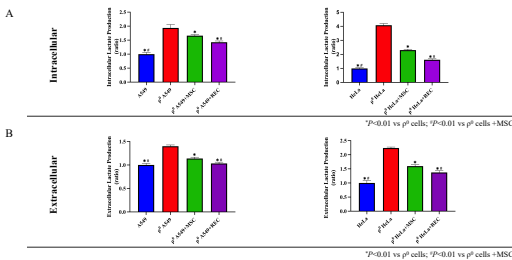
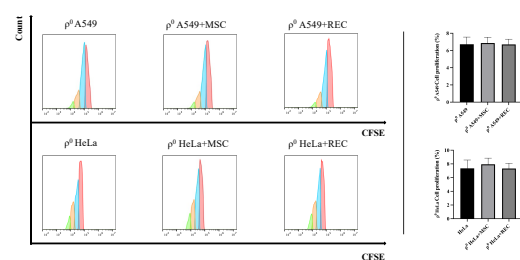


図10



(4) ミトコンドリア病由来 iPS 細胞から分化された神経細胞の樹立とミトコンドリアの移入  
 理化学研究所から購入した MELAS 由来 iPS 細胞から分化させた神経細胞 (MELAS-iPSCs-N cells) を用いて、REC と MSC との共培養実験を上記の p0 細胞株と同様に行なった。フラックスアナライザーを用いた呼吸鎖機能に関して、MELAS-iPSCs-N cells の呼吸鎖機能が、REC と MSC との共培養により正常健康人由来 iPS 細胞から分化させた神経細胞と同程度まで回復した (図 12)。また、増殖能および ATP 産生能の回復、乳酸および活性酸素の低下も確認できた (図 13A-D)。

図11

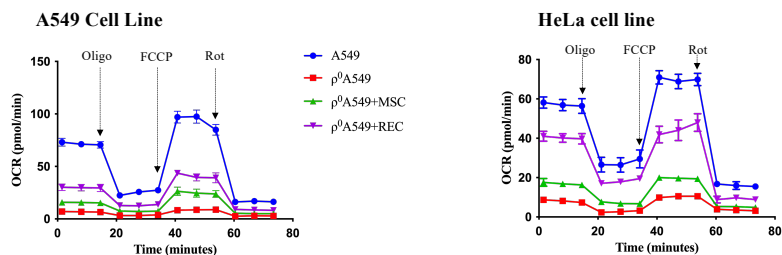


図12

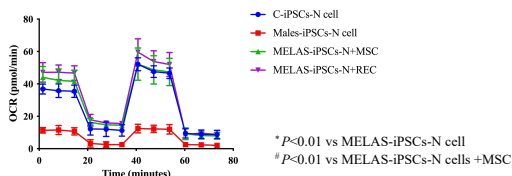
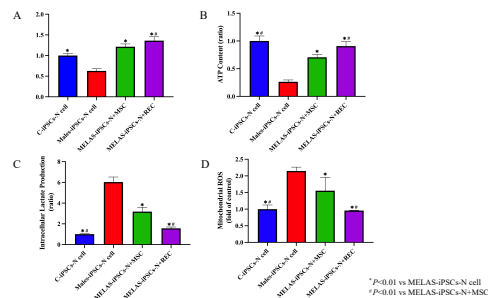


図13





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	竹谷 健  (Taketani Takeshi)	島根大学・医学部小児科・教授	
研究協力者	楊 嘉豪  (YANG JIAHAO)	島根大学・医学部小児科・大学院生	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関