

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09679

研究課題名(和文) Imaging技術を基盤としたミトコンドリア心筋症の診断法・新診断基準の確立

研究課題名(英文) Establishment of diagnostic procedure and the new diagnostic criteria of mitochondrial cardiomyopathy based on an Imaging technology

研究代表者

武田 充人 (Takeda, Atsuhito)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00374413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：指定難病であるミトコンドリア病は未だ治療法が確立しておらず、早期発見につながる診断法の確立が急務である。われわれはミトコンドリア心筋症モデルとその評価系を含め、ミトコンドリア心筋症診断基準の確立を目指してきた。基礎実験ではドキシソルピシンミトコンドリア心筋症誘発モデル動物の作成とその評価系およびミトコンドリアDDSを用いたレスキュー実験において成果を認めた。臨床ではミトコンドリア心筋症の診断基準として、心筋病理組織：電子顕微鏡像におけるミトコンドリア異常、組織生化学：心筋組織呼吸鎖酵素活性低下、遺伝子変異の3点を必要な要素と断定した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial disease, which is a designated intractable disease, has not yet been established as a treatment method, and it is urgent to establish a diagnostic method leading to early detection. We have aimed to establish mitochondrial cardiomyopathy diagnostic criteria including mitochondrial cardiomyopathy model and its evaluation system. In the basic experiments, the results were confirmed in the preparation and evaluation system of doxorubicin mitochondrial cardiomyopathy-induced model animals and the rescue experiment using mitochondrial DDS. Clinically, as diagnostic criteria for mitochondrial cardiomyopathy, we identified three points of (1) myocardial pathology tissue: mitochondrial abnormality in electron microscopic image, (2) tissue biochemistry: myocardial tissue respiratory chain enzyme activity reduction, and (3) gene mutation as necessary elements.

研究分野：心筋症

キーワード：ミトコンドリア 電子顕微鏡 呼吸鎖酵素活性 心筋症

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア心筋症は既存の検査法や基準では診断することが困難である。北海道大学病院小児科では骨格筋生検や遺伝子検査を用いることでミトコンドリア心筋症の診断に至った例を報告してきた。また、北海道大学大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室でミトコンドリア創薬研究を専門とする山田准教授と疾患細胞や心筋組織の顕微鏡イメージングを中心にミトコンドリア機能解析を始めた。有効な治療薬を開発するためにも診断基準・診断法の必要性を痛感し、小児循環器臨床で頻用される様々なイメージングを主体とした診断基準および診断法を創設することにした。

2. 研究の目的

(1) モデル病態動物におけるイメージング評価系の確立：ミトコンドリア心筋症誘発モデル動物を作製し各種イメージング評価系を確立する。

(2) ヒトにおけるイメージング評価基盤の確立：ミトコンドリア心筋症の新規診断基準・診断法の基盤構築を行う。

3. 研究の方法

(1) モデル病態動物におけるイメージング評価系の確立：心ミトコンドリア毒性を有する抗がん剤ドキシソルピシンを投与したミトコンドリア心筋症誘発モデル動物を作製し、各種イメージング評価系を確立する。

(2) ヒトにおけるイメージング評価法の確立：遺伝子異常、呼吸鎖酵素活性低下によって証明されたミトコンドリア心筋症のミトコンドリア電顕異常について定性的、定量的に検討する。

(3) 分子・細胞・個体レベルでの構造-機能相関に基づく新診断基準・診断法の確立 基礎研究と臨床研究で得られた解析結果を元にミトコンドリア心筋症診断法の開発を目指す。

4. 研究成果

(1) モデル病態動物におけるイメージング評価系の確立：ドキシソルピシン処理心筋細胞に対する、ミトコンドリアDDSを用いた心筋幹細胞移植のin vitro検証

心筋前駆細胞の単離とその品質評価

マウスからの心筋前駆細胞(CPC)単離はコラゲナーゼ処理による分散法をもとにMACSシステムを用いてSca-1陽性CPCを確立した。

MITO-Porter systemを用いたミトコンドリアDDSの創製：北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室ではカチオンリポソーム型DDSとしてMITO-Porter systemを開発している。本研究ではレスベラトロールを搭載し、表面に細胞膜突破能及びミトコンドリア指向能をもつとされるS2-peptide(SS)を使用し、SS-RES-MITO-Porterと命名した。

SS-RES-MITO-Porterを用いた心筋前駆細胞

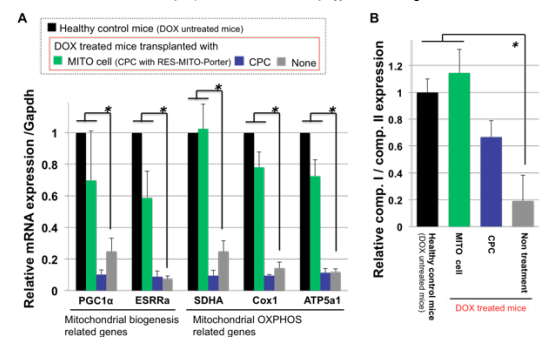
に対する取り込み実験：共焦点走査型レーザー顕微鏡で蛍光修飾した粒子の細胞内動態を確認したところ、粒子はミトコンドリアに近接を示した。

心筋前駆細胞ミトコンドリアへのSS-RES-MITO-Porterの導入効果検証：CPCに対してSS-RES-MITO-Porterを投与した群と未投与群に対してCLSM観察したところ、JC-1色素で膜電位の上昇が示唆された。Sca-1陽性CPCに導入し、ドキシソルピシン投与下にミトコンドリア呼吸酵素活性についてWST-1試薬で確認したところ、酵素活性の上昇が確認された。SS-RES-MITO-Porterを導入したCPCをMITO cellと命名した。

レスベラトロール処理をした心筋前駆細胞と心筋細胞との共培養系に対するドキシソルピシンの影響検証 ドキシソルピシン心筋症のin vitroモデル：ラット心筋細胞(H9c2 cell line)とMITO cellとの共培養系を最適化し、ドキシソルピシンで傷害を与えた。評価系はWST-1試薬を用いた細胞生存率試験で行い、SS-RES-MITO-PorterでSca-1陽性CPC細胞を前処理することは有意にラット心筋細胞生存率を高めた。またこの効果は、レスベラトロールを封入しない空キャリア群CPC(+MITO-Porter)やレスベラトロール単剤で処理した群CPC(+RES)より有意に生存率の向上を示していた。

図 心筋前駆細胞移植後のミトコンドリア呼吸鎖タンパク質発現レベルおよび関連遺伝子発現レベル評価

MITO cell前投与により、PGC1 /ESRRaの発現レベルは有意に保たれており、ミトコンドリア新生が遺伝子レベルで維持されていることが示唆されており、またミトコンドリア酸化リン酸化遺伝子群も有意に維持されていた。MITO cellを移植することで、心筋組織内ミトコンドリア呼吸鎖複合体complex は有意に保持されていたことがBlue-Native PAGEを用いてタンパク質レベルで確認した。



(2) ヒトにおけるイメージング評価法の確立：遺伝子異常もしくは呼吸鎖酵素欠損によって確定診断されたミトコンドリア心筋症の心内膜下心筋生検による心筋病理像を検討し

た。光顕像では空胞変性を伴う心筋細胞を認めるも特異的所見に乏しかった。一方、電顕像では筋原線維周囲におけるミトコンドリアの異常増生、クリスタの変性を認めサルコメア遺伝子異常やNoonan症候群にみられる肥大型心筋症の電顕像とは大きな相違点を認めた。ミトコンドリアの体積密度をステレオロジーを用いて定量評価し、ミトコンドリア心筋症ではミトコンドリア体積密度が有意に高いことを認めた。

(3) 分子・細胞・個体レベルでの構造-機能  
関連に基づく新診断基準・診断法の確立:

上記(1)および(2)の結果および既存のミトコンドリア病診断基準を踏まえ、ミトコンドリア心筋症の診断基準として、心筋病理組織:電子顕微鏡像におけるミトコンドリアの異常増生やクリスタの変形、組織生化学:心筋組織を用いた呼吸鎖酵素活性の低下、遺伝子変異の3点が重要であることを認めた。また、組織生化学検査ではBN-PAGEを用いた呼吸鎖酵素複合体の欠損を証明することで診断可能である。遺伝子変異はミトコンドリアDNAと核遺伝子の異常が存在し、報告遺伝子は250以上に及ぶため、現在は難治性疾患実用化研究事業:「ミトコンドリア病診療の質を高める、レジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイドラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究」においてミトコンドリア病遺伝子パネルおよび全エクソーム解析によって新規遺伝子変異を同定するシステムが確立している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

In vivo transgene expression in the pancreas by the intraductal injection of naked plasmid DNA. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 197 (2018) 647-653. Yamada Y, Tabata M, Abe J, Nomura M, \*Harashima H. (査読有り)  
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. *Journal of Controlled Release* 269 (2018) 177-188

Abe J, Yamada Y, Atsuhito T, Harashima H. (査読有り)

ミトコンドリア心筋症(review), *Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery* 33(4): 287-296 (2017).

武田 充人 (査読有り)

[学会発表](計21件)

阿部 二郎, 山田 勇磨, 武田 充人, 原島 秀吉 ミトコンドリアドラッグデリバリーを用いた幹細胞移植はドキシソルビン心筋症予後を改善する. 第39回心筋生検研究会 2017年

武田 充人 シンポジウム 二次性心筋症における診断と治療の進歩

「ミトコンドリア心筋症の臨床像と診断」第21回 日本心不全学会学術集会 2017年

武田 充人 シンポジウム ミトコンドリア病の臨床-その多様性の中心

「ミトコンドリア心筋症」第59回日本先天代謝異常学会 埼玉 2017年

武田 充人 「肥大型心筋症から新生児、神経疾患まで-ミトコンドリア異常の診断と治療-」第28回 徳島小児循環器談話会(特別講演) 2017年

武田 充人 「肥大型心筋症から新生児、神経疾患まで-ミトコンドリア異常の診断と治療-」第28回 徳島小児循環器談話会(特別講演) 2017年

Abe J, Yamada Y, Takeda A, Harashima H Cardiac progenitor cells with resveratrol delivered into mitochondria can ameliorate survival of doxorubicin-induced cardiomyopathy mouse via mitochondrial activation of damaged myocardium.

*European Society of Cardiology Congress*. 2017

阿部 二郎, 山田 勇磨, 武田 充人, 原島 秀吉

ドキシソルビン心筋症に対するミトコンドリアドラッグデリバリーシステムを用いた心筋前駆細胞移植の検討 第53回日本小児循環器学会総会・学術集会 2017年 Abe J, Yamada Y, Takeda A, Harashima H Validation of cardiac progenitor cell therapy using mitochondrial drug delivery system for doxorubicin-induced cardiomyopathy. APSTJ global education seminar. 2017

Abe J, Yamada Y, Takeda A, Harashima H An innovative cell therapy using mitochondrial drug delivery system for mitochondrial cardiomyopathy. 2017 Euro Mit 2017

武田 充人 「新生児・乳児の心筋症 ミトコンドリア異常から考える診断アプローチ」第21回 愛媛県周産期医療研究会 2017年

Takeda A., Yamazawa H., Izumi G., Sasaki O., Abe J., Sasaki D.

Stereological analysis of mitochondria in hypertrophic cardiomyopathy

- A proposal for pathological diagnostic criteria of mitochondrial cardiomyopathy

51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Association for European Pediatric and Congenital Cardiology. 2017

武田 充人、山澤 弘州、阿部 二郎、泉 岳、佐々木 理、佐々木大輔  
Stereologyに基づいた電顕ミトコンドリア像定量解析の試み-ミトコンドリア心筋症における病理診断の可能性. 心筋生検研究会 2016年

Atsuhito Takeda

Sponsored symposium, Diversity of mitochondrial diseases-1

Mitochondrial cardiomyopathies in children. The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine. 2016

Jiro Abe, Yuma Yamada, Atsuhito Takeda, Hideyoshi Harashima

Innovative strategy to manage myocarditis using mitochondrial drug delivery system(DDS). 6<sup>th</sup> Congress of The Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society. 2016

武田 充人、村山 圭、山澤 弘州、阿部 二郎、南 孝臣、池田 善彦、今井 敦子、小垣 滋豊、岡崎 康司、大竹 明

ミトコンドリア心筋症の診療ネットワーク構築について 第 25 回日本小児心筋疾患学会 2016年

武田 充人、山澤 弘州、阿部 二郎、泉 岳、佐々木 理、佐々木大輔  
心筋症から考えるミトコンドリア疾患 第 14 回東北・北海道代謝異常症研究会 2016年

武田 充人、村山 圭、山澤 弘州、阿部 二郎、泉 岳、武井 黄太、佐々木 理、谷口 宏太 会長要望演題 心筋症に関連した基礎的研究「確定診断されたミトコンドリア心筋症における診断プロセスにおける考察」第 24 回 日本小児心筋疾患学会 2015年

武田 充人 シンポジウム 心筋症の分子メカニズムと治療法 「小児心筋症におけるミトコンドリア形態異常と機能障害」第 51 回 日本小児循環器学会学術集会 2015年

武田 充人 シンポジウム 心筋症の診断～イメージングとバイオマーカーでどこまで迫れるのか

「ミトコンドリア機能は、イメージングとバイオマーカーで把握できるか」

第 1 回 日本心筋症研究会 2015年

Takeda A, Yamazawa H, Takei K, Furukawa T, Izumi G

Cardiac mitochondrial ultrastructure and respiratory chain enzymatic activities in patients with pediatric

hypertrophic cardiomyopathy

49<sup>th</sup> Annual meeting of the Association for European Pediatric and Congenital Cardiology. 2015

- ② 武田 充人、山澤 弘州、武井 黄太、古川 卓朗、泉 岳 小児 HCM に認める電顕 mitochondria 像についての考察  
第 23 回日本小児心筋疾患学会 2015年

〔図書〕(計 3 件)

武田 充人、阿部 二郎. Heart View. 「心筋のミトコンドリア機能を評価する」, 2017

武田 充人. 南江堂「ミトコンドリア心筋症」診断モダリティとしての心筋病理, 2017

武田 充人. 診断と治療社

「ミトコンドリア心筋症」ミトコンドリア病診療マニュアル, 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 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

発明者: 阿部 二郎, 山田 勇磨, 武田 充人, 原島 秀吉

権利者: 阿部 二郎, 山田 勇磨, 武田 充人, 原島 秀吉

種類: 2016-223069

番号: P2016-029-JP01

出願年月日: 平成 28 年 11 月 16 日

国内外の別: 国内(国際出願申請中)

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 充人 (TAKEDA ATSUHITO)

北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：00374413

(2)研究分担者

山田 勇磨 (YAMADA YUMA)  
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：60451431

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

阿部 二郎 (ABE JIRO)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
研究者番号：90802447