

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08404

研究課題名(和文)自家単離ミトコンドリア局所移植による重症下肢虚血改善に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Autologous Mitochondrial Transplantation Rescues Critical Limb Ischemia

研究代表者

木原 康樹(Kihara, Yasuki)

広島大学・医系科学研究科(医)・名誉教授

研究者番号：40214853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化を背景とした下肢閉塞性動脈硬化症による難治性重症下肢虚血では、慢性低酸素の骨格筋組織において、ミトコンドリアの非可逆的障害と細胞死、持続性炎症が生じていると考えられており、自家骨髄由来単核球局所細胞移植の効果が得られない原因になっている可能性がある。本研究では、成熟雄日本家兎の重症下肢虚血モデルを用いて、自家ミトコンドリア移植を自家骨髄単核球移植と組み合わせることにより、患肢局所の血流の改善が得られるかどうかを検討する予定であった。しかし、自家大胸筋切片から家兎ミトコンドリアを分離精製することができなかつたため、ミトコンドリア移植による下肢血流改善効果の検討を行うことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、下肢閉塞性動脈硬化症による難治性重症下肢虚血に対する治療法の開発に関する重要な研究である。現在、自家骨髄由来単核球局所細胞移植が下肢虚血治療の一つの選択肢として用いられているが、その効果が得られない場合がある。本研究では、自家ミトコンドリア移植を自家骨髄単核球移植と組み合わせることにより、下肢局所の血流改善が期待された。しかし、ミトコンドリアの分離精製ができなかつたため、検証することができなかった。この研究は、今後の研究でミトコンドリアの分離精製技術が改善されることで、下肢虚血治療に新たな選択肢を提供する可能性があるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Irreversible mitochondrial damage, cell death, and persistent inflammation may occur in the skeletal muscle tissue with chronic hypoxia, which may contribute to the lack of effectiveness of autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with chronic limb-threatening ischemia caused by arteriosclerosis. In this study, we planned to investigate whether improvement of local blood flow in the affected limb could be achieved by combining autologous mitochondrial implantation with autologous bone-marrow mononuclear cell implantation using a severe lower limb ischemia model in adult male Japanese rabbits. However, we were unable to isolate and purify rabbit mitochondria from autologous pectoral muscle slices, so we could not investigate the effect of mitochondrial implantation on blood flow improvement

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 心筋再生 自家移植 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国際的な疫学研究によると、足首上腕血圧比など客観的試験に基づいた下肢閉塞性動脈硬化症の総有病率は3-10%であり、年齢と共に増加し、70歳以上では15-20%に達する。人種・性・年齢・喫煙・糖尿病・肥満・高血圧・慢性腎臓病・脂質異常症などが危険因子となり、1個体への重積が発症を促進する。間欠性跛行を有する下肢閉塞性動脈硬化症患者の4人に1人が症状の進行を示し、10人に1人が重症下肢虚血 (CLI) に陥る。CLIを発症すると、診断時に50%が血行再建術、25%が一次切断術を受けるが、2年後においては30%が死亡し、15%が大腿切断を余儀なくされている。従って、CLIは予後不良な疾患群であり、現状での治療効果は限定的である。これまでCLI患者に対し、救肢を目的として自家骨髄由来単核球局所細胞 (BM-MNC) 移植療法が行われてきたが、動脈硬化を背景としたCLI患者における効果は限定的である。その理由として、ミトコンドリアの減少および機能低下が考えられている。下肢閉塞性動脈硬化症では、慢性低酸素の骨格筋組織において、更なる虚血イベントと、それに引き続く再灌流が微小血管レベルで繰り返し発生しており、そのサイクルにおいてミトコンドリアの非可逆的障害と細胞死、持続する炎症機転が誘導されると考えられている。そのため、投入された血管新生機転がもたらす血流回復が活用される場がないため、BM-MNC移植療法の効果は限定的と考えられている。心臓の領域では、家兎心臓に自家骨格筋由来単離ミトコンドリアを虚血心筋領域に局所注入することで、慢性期梗塞サイズが著明に減少することが報告されている。下肢閉塞性動脈硬化症動物モデルにおいて、BM-MNC移植療法と同時に、自家単離ミトコンドリア移植を実施することにより、BM-MNC移植療法単独よりも、良好な血流回復が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

重症下肢虚血では、血流障害のみならず組織の慢性虚血/再灌流に伴う骨格筋障害の役割 (組織因子) が指摘され、骨格筋ミトコンドリアの減少・変性とその主因と想定される。本研究の目的は、重症下肢虚血動物モデルを用いて自家ミトコンドリア移植を実施するとBM-MNC単独移植療法を上回る改善効果が発現し、患肢局所血流、代謝、および骨格筋量が増加し、移植ミトコンドリアは骨格筋細胞内に移行・封入されて正常形態とATP産生能を保ち、同時に自己免

疫反応・炎症反応・ROS活性亢進を誘導しない。これらを証明することによりProof of Conceptを確立し、知財を確保することである。

3．研究の方法

成熟雄日本家兎（3.0-3.5Kg）を用いて麻酔下に左側大腿動脈を剥離・結紮し、片側下肢虚血モデルとする。BM-MNCは腸骨陵から吸引採取する。ミトコンドリア（Mito）は自家大胸筋切片より分離精製し、MitTracker Red CMXRos（Invitrogen, CA）で標識した後、レスピレーションバッファに浮置する。下肢虚血家兎を虚血作成後7日目に4群（生食水+生食水、生食水+BM-MNC、生食水+Mito、BM-MNC+Mito）に分類し、26G注射針にて大腿動脈虚血領域に6か所局所注入する。移植術施行後28日目に機能的計測を実施し、その後、血液・血清・組織を得る（各群=10）。Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) を測定し、健常右肢を対照としつつ患肢血液灌流量を定量する。アセチルコリン、ニトロプルシッド投与下に変化を比較する。MNRにより下腿筋肉量と局所ATP・Pi・Cr濃度を測定する。血清よりhsCRP、IL-6、TNF を測定する。抗ミトコンドリア抗体（AMA）陽性化を検証するため、間接蛍光抗体法に供する。アルカリフォスファターゼ染色により毛細血管密度を測定する。ATP染色は凍結切片に対して蛍光染色で同定する。以下の蛍光免疫染色を実施する：DAPI、anti-human mitochondria antibody MTC02、anti-alfa-actin 2、anti-dystrophin CAP6-10、caspase-3、AMA。電子顕微鏡での観察に際しては、anti-human mitochondrial antibodyをanti-mouse secondary antibody, Protein A-gold conjugateと結合させて染色する。これらを通して移植ミトコンドリアが局所骨格筋細胞に封入され、正常形態を維持していること、組織的な免疫反応や炎症反応を惹起していないことを確認する。RT-PCR法にてMito関連遺伝子群の発現を網羅的に検討する。

4．研究成果

家兎の大胸筋切片からのミトコンドリア分離に成功することができず、ミトコンドリア移植による血流改善効果の検討、血液、組織学的な検討を行うことができなかった。今後、ミトコンドリア分離精製方法を工夫し、血流改善効果の検討を行いたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tatsuya Maruhashi, Yukihiro Higashi, Yasuki Kihara, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Upstroke Time Is a Useful Vascular Marker for Detecting Patients With Coronary Artery Disease Among Subjects With Normal Ankle-Brachial Index	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc .	6. 最初と最後の頁 e017139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.120.017139.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuya Maruhashi, Yukihiro Higashi, Yasuki Kihara, et al.	4. 巻 43
2. 論文標題 Vascular function is further impaired in subjects aged 80 years or older	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertens Res	6. 最初と最後の頁 914-921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-020-0435-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitagawa T, Yasuki Kihara, et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Current Medical and Social Issues for Hospitalized Heart Failure Patients in Japan and Factors for Improving Their Outcomes - Insights From the REAL-HF Registry.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circ Rep	6. 最初と最後の頁 226-234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circrep.CR-20-0011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸橋達也、木原康樹、東幸仁
2. 発表標題 血流依存性血管拡張反応とニトログリセリン誘発性血管拡張反応
3. 学会等名 第5回血管不全学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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 分担者	丸橋 達也 (Maruhashi Tatsuya) (10727069)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授 (15401)	
研究 分担者	東 幸仁 (Higashi Yukihiro) (40346490)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401)	

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
---------	---------