

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670586

研究課題名(和文)単離ミトコンドリア移植法の開発

研究課題名(英文)Development of Isolated Mitochondria Transplantation

研究代表者

渡辺 太治(Watanabe, Taiji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20448723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：初代培養細胞におけるミトコンドリアの細胞への導入効率は低いことが知られている。そこで細胞膜透過性ペプチドTATとミトコンドリアを結合させる物質としてデキストランに着目し、ミトコンドリアを初代培養細胞へ高効率に導入できる系を構築した。このTATデキストランを用いてミトコンドリア導入したところ、ラット新生児心筋細胞(RNCM)に対してミトコンドリアの導入効率が改善し、過酸化水素処理したRNCMのアポトーシス誘導率を軽減させることを明らかにした。今後はミトコンドリア導入したRNCMのミトコンドリア活性について酸素消費速度を指標としたミトコンドリア機能評価をしていく。

研究成果の概要(英文)：It is known that the efficiency of mitochondria transfer into cells in primary cultured cells is low efficiency. Therefore, we focusing on TAT peptide known as the cell membrane penetrating peptide, we have constructed a system that can high-efficiently transfer mitochondria into primary cultured cells. We introduced mitochondria using this TAT dextran and showed that the introduction efficiency of mitochondria improves on rat neonatal cardiomyocytes (RNCM), and it reduces the apoptosis induction rate of hydrogen peroxide treated RNCM. In the future, we will evaluate the mitochondrial function using the oxygen consumption rate as an indicator for mitochondrial activity of RNCM introduced mitochondria.

研究分野：心血管移植

キーワード：ミトコンドリア 移植 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、がん、心血管障害、神経変性疾患などの様々な疾患にミトコンドリアの異常が関与していると考えられている (Chan, D.C. *Cell*. 2006)。心筋虚血再灌流障害や心不全においても、ミトコンドリア機能不全が重要な役割を果たしていると考えられている (Lesnefsky, E.J. *J Mol Cell Cardiol*. 2001)。これまでに様々な手段を用いてミトコンドリアの治療法が模索されてきたが、現在のところ生体の異常なミトコンドリアを治療することは困難である。一方、受精卵に対しては、外来性の健常なミトコンドリアを移植することで、着床率が改善することが知られている (Templeton, A. *NEJM*. 2002)。また、*in vitro* の研究では、培養細胞間でミトコンドリアが移動していること、このミトコンドリアの移動によって障害されていた細胞の機能が改善することが報告されている (Spees, J.L., *PNAS*. 2006.)。このことから、我々は生体の体細胞においても、健常な組織より単離したミトコンドリアを標的の組織の細胞内に直接移植することにより、移植先の細胞・組織の機能を改善することができれば、様々な疾患の治療に応用出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

ミトコンドリア機能不全は特殊な疾患だけではなく、ヒトの様々な健康状態に悪影響を及ぼしている。循環器分野においても、心筋虚血再灌流障害や心不全の発症におけるミトコンドリア機能不全の関与が報告されている。これまでに、細胞内にあるミトコンドリアの機能の改善が試みられてきたが、いまだに確立された方法は存在しない。そこで、本研究では健常な組織より取り出した単離ミトコンドリアを、細胞内移行ペプチドにて修飾を行うことによって、ミトコンドリア機能不全状態にあるヒト細胞内部へと移植し、細胞・組織の機能を改善させることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では取り出した健常なヒトミトコンドリアを、細胞内移行ペプチドにて修飾を行い、ミトコンドリア機能不全状態にあるヒト細胞内部へと移植を行うことによって、細胞・組織の機能を改善させることを目的とする。そのために以下の3つの研究、「移植に適したミトコンドリアの採取方法の確立」、「細胞内移行ペプチドの開発およびミトコンドリアへの修飾の最適化」、「修飾ミトコンドリアを培養細胞、虚血再灌流障害モデルの培養細胞へ移植し評価」を進めた。

4. 研究成果

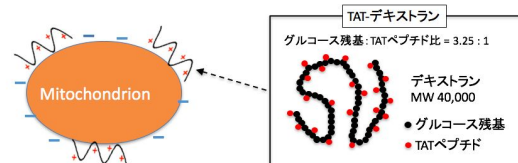
移植に適したミトコンドリアの採取方法の確立

過去に報告されているミトコンドリアの単離方法を再検討し、改良を加えることによって、移植に適したミトコンドリアの単離方法を確立した。すでに先行する実験において形態的にも損傷の少ない、膜電位の保たれたミトコンドリアを単離することに成功している。そこでさらにミトコンドリア特異的タンパク質を認識する抗体結合磁性ビーズを用いた単離した。この単離ミトコンドリアを電子顕微鏡にて確認したところ、磁性ビーズごとミトコンドリアが回収されていることが分かり、この方法では磁性ビーズと一緒に細胞内に移行してしまうため、何らかの悪影響の可能性が否定できない。また Thermo Fisher Scientific Inc. 製の単離キットを用いてミトコンドリア単離を試みたが、現行の方法ほどクリアなミトコンドリアが回収できないことも明らかにした。以上の理由から本研究では当初の遠心分離機を用いた従来法によるミトコンドリア単離にて研究を進めることとした。

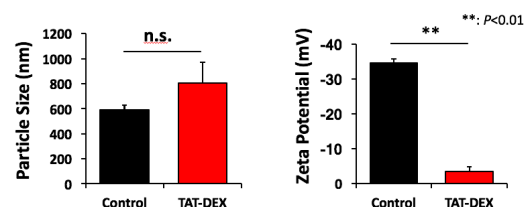
細胞内移行ベクターの開発およびミトコンドリアへの修飾の最適化

低分子デキストラン (分子量約 40,000) を利用して細胞膜透過性ペプチドを単離ミトコンドリアの表面に修飾することを計画している。細胞膜透過性ペプチドはエイズウィルス由来の TAT ペプチド (GRKKRRQRRRPQ) を用いることにした。TAT ペプチドはカチオン性アミノ酸であるアルギニンを含んでおり、細胞膜と結合しやすいとされている。このペプチドと低分子デキストランはシアノ水素化ホウ素ナトリウムと過ヨウ素酸ナトリウムを用いて架橋し、結合させた。この結合に最適なデキストラン由来グルコース残基と TAT ペプチドの比は 3.25:1 であった。この TAT ペプチドとデキストランを結合させた TAT デキストランを用いてミトコンドリアの細胞内移行の効率を検討することにした。

TAT-デキストランのミトコンドリア修飾の模式図



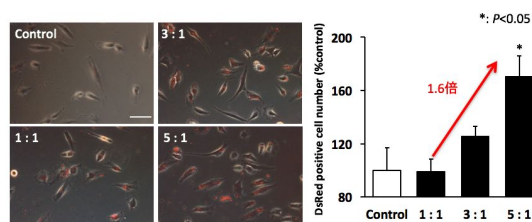
合成した TAT デキストランと細胞から抽出したミトコンドリアが結合するかを検討するために Zeta 電位を測定した。この結果、TAT デキストラン容量依存的に抽出ミトコンドリアの Zeta 電位の減少が確認できた。また、ミトコンドリアの大きさは TAT デキストランの有無によって変化しなかった。



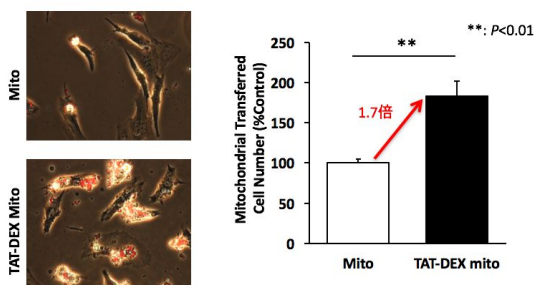
次にミトコンドリアとTAT デキストランを複数組み合わせることで重量比の最適化を試みたところ、細胞への取り込みは1:5が最適であることが明らかとなった。

修飾ミトコンドリアを培養細胞、虚血再灌流障害モデルの培養細胞へ移植し評価

TAT デキストランはミトコンドリア移行に有効かどうかを評価するために、先程の条件にてTAT デキストランとミトコンドリアを寿命延長処理したヒト子宮内膜由来間葉細胞へ導入した。ミトコンドリアはミトコンドリア移行シグナル付DsRedを取り込ませたミトコンドリアを同培養細胞から抽出し、導入効率はFACSにてDsRed陽性細胞数にて評価した。この結果、従来法よりも1.7倍の効率にて導入できることが明らかとなった。



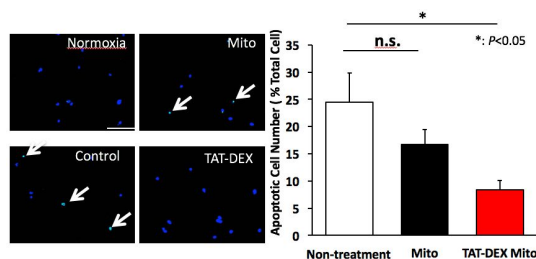
次に培養細胞ではなく、初代培養細胞においてもミトコンドリア移行がTAT デキストランにて効率化するかどうかを評価した。初代培養細胞としてはラット新生児心筋細胞を用いることにした。この結果、ラット新生児心筋細胞でも従来法よりも高効率(1.7倍)にミトコンドリアが取り込まれることが確認できた。



そこでラット新生児心筋細胞に虚血再灌流処理し、TAT デキストラン付加したミトコンドリアを導入し、アポトーシスに対する影響について評価することにした。新生児ラット心臓を生後1日目にて取得し、コラゲナーゼにて細胞化した。この新生児心筋細胞を低酸素(1%)培養庫にて虚血再灌流処理したところ、25%の細胞がTunel陽性となった。一方でTAT デキストランを用いなかった場合、用いた場合でそれぞれのTunel陽性率を測定したところ、16、8%となった。

さらに過酸化水素処理したラット新生児心筋細胞でも同様の結果になるかを評価した。低酸素条件と同様にTAT デキストラン付加ミトコンドリアを細胞外から移行させたところ、心筋細胞のTunel陽性率は有意に減

少した。



これらの結果から、TAT デキストランはミトコンドリアの導入効率を上昇させ、低酸素や過酸化水素処理によるTunel陽性細胞数を減少させる結果となった。この結果は培養細胞だけでなく、初代培養細胞においても確認することができた。

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0件)

現在、投稿準備中(2017年6月)

[学会発表](計6件)

高岡勇輝、木谷友哉、吉本雄、渡辺太治、上
 大介、田畑泰彦、五條理志. 細胞内移行ペプ
 チド(TAT)修飾ミトコンドリアの細胞内移植.
 第15回日本再生医療学会総会. 2016年3月
 17日. 大阪国際会議場(大阪府大阪市).

木谷友哉、吉本雄、渡辺太治、石田良、上大
 介、田畑泰彦、五條理志. TATペプチドを用
 いた細胞へのミトコンドリア移植. 第14回
 日本再生医療学会総会. 2015年3月19日. パ
 シフィコ横浜(神奈川県横浜市).

木谷友哉、吉本雄、渡辺太治、上大介、田畑
 泰彦、五條理志. 細胞内移行ペプチドを用
 いたミトコンドリアの細胞内移植. 第14回再
 生心臓血管外科治療研究会. 2015年2月16
 日. 国立京都国際会館(京都府京都市).

木谷友哉、上大介、河崎貴宣、中田緑、的場
 聖明、五條理志. 単離ミトコンドリアの細胞
 内移行現象による細胞機能への影響. 第13
 回日本再生医療学会総会. 2014年3月5日.
 国立京都国際会館(京都府京都市).

Kitani T, Kami D, Kawasaki T, Matoba S,
 Gojo S. Recovery of mitochondrial function
 and cellular viability in human
 mitochondria-depleted cells by direct
 mitochondrial transfer in vitro.
 International Society for Stem Cell
 Research 12th Annual Meeting.
 June/18/2014. Vancouver. Canada.

Kitani T, Kami D, Kawasaki T, Nakata M,
 Matoba S, Gojo S. Direct Mitochondrial

Transfer: A novel concept based on the endosymbiotic theory. The 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. September/4/2013. Kyoto International Conference Center (Kyoto-fu, Kyoto-shi). Japan.

〔図書〕(計0件)
該当なし。

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
該当なし。

取得状況(計0件)
該当なし。

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 太治 (WATANABE, Taiji)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：20448723

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者

五條 理志 (GOJO, Satoshi)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：90316745

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)
京都大学・生体組織工学研究部門生体材料
学分野・教授
研究者番号：50211371

上 大介 (KAMI, Daisuke)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：80415588