

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 阿部 二郎

学位論文題名

ドキシソルビシ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有効性検証

(Validation of cardiac progenitor cell therapy using mitochondrial drug delivery system for doxorubicin-induced cardiomyopathy)

【背景と目的】

重症心不全に対する細胞移植療法の臨床応用は基礎研究の進展とともに進んできている。これまで虚血心以外の病態モデルで細胞移植の有効性を示した研究は少ないが、2010年にAntonellaらによるラットドキシソルビシン心筋症モデルを用いた心筋幹細胞移植の生存期間延長を示した報告がある。ドキシソルビシン心筋症は代表的な薬剤性心筋症の1つであり、世界的に汎用されているアントラサイクリン系抗癌剤であるドキシソルビシン(商品名アドリアマイシン)により心不全を発症するが、有効な治療法はない。心毒性については1979年にVon Hoffらによって報告されて以降多数の報告がある。ドキシソルビシンによる心筋組織傷害はその治療が終了した後も心血管イベントのリスクとして残る。多くのCancer survivorが寛解後に社会復帰している時代において、小児癌でも長期生存が見込まれるようになり、アントラサイクリン系抗癌剤の心血管毒性は予後に多大な影響を及ぼし、その治療法の開発が急務である。ドキシソルビシン心筋症において細胞移植療法は有用であると考えられるが、Antonellaらの報告にあるように心筋幹細胞はそもそもドキシソルビシン耐性が低いため、有効性を上げるためにはミトコンドリア由来の酸化ストレスが増大した心筋組織内での移植後生着率の向上が求められる。北海道大学薬学研究院薬剤分子設計学研究室のYamadaらはミトコンドリアへの薬物送達の研究から、これまでアプローチが困難であったミトコンドリアに対してミトコンドリア高膜融合性の脂質組成を探索し、膜融合を介したリポソーム型 Drug Delivery System (DDS)であるMITO-Porter systemを開発した。MITO-Porter systemは送達分子サイズを問わず、*in vitro*から*in vivo*まで様々な分子を細胞内ミトコンドリアに送達することで、優れた薬理効果を発揮することが実証されている。このMITO-Porter systemを用いてミトコンドリア保護分子を移植予定細胞ミトコンドリアに送達することは、ドキシソルビシン心筋症の新たな心筋幹細胞移植治療に大きく寄与すると考えた。レスベラトロールは1930年に北海道帝国大学(現北海道大学)のTakaokaらが発見したスチルベン誘導体であり、PGC1 α 経路の上流にあるサーチュインタンパク質を介してのミトコンドリア活性化作用があるとされるミトコンドリア作動薬である。これまで線虫の寿命促進、肥満マウスの延命効果など様々な脂質代謝改善を介した有効性の報告があるが、その機序としてサーチュインタンパク質やAMPK (AMP-activated protein kinase)の活性化、ミトコンドリア呼吸鎖複合体への直接作用、Phosphodiesterases; PDEs 阻害作用などが想定されている。これまでの数多くの基礎研究からミトコンドリア新生を促進する薬剤と考えられているが、臨床試験ではこれまで有用性を示すに至っていない。その原因は、レスベラトロールがヒトで薬理効果を示すには不十分な薬物動態であることに加え、単体での細胞内への取り込みや細胞内動態に問題がある可能性が考えられる。筆者はコエンザイム Q₁₀ やゲンタマイシンなどミトコンドリア作動薬である低分子薬剤を、ミトコンドリア DDS の手法を用いて標的細胞

ミトコンドリアに送達し、優れた薬理効果が発揮されることを報告してきた。本論の基盤研究となっている、レスベラトロールと同じ低分子ミトコンドリア作動薬であるゲンタマイシンの DDS 化を行った研究成果を受け、レスベラトロール搭載 MITO-Porter system を確立し、ミトコンドリア DDS を用いた細胞移植療法をドキシソルビシン心筋症モデルで実験した。

【対象と方法】

本研究においては、レスベラトロールを細胞内ミトコンドリアに送達することで、ミトコンドリア新生の賦活化やそれに付随する抗酸化効果を期待できると考えた。心筋幹細胞 (Cardiac Progenitor Cell: CPC)ミトコンドリアに対して MITO-Porter system によりレスベラトロールを選択的に送達し、ミトコンドリアが活性化された CPC を *MITO-Cell* と命名した (特願 2016-223069)。細胞移植用の *MITO-Cell* を作製し、マウス心臓に CPC を細胞移植した後、ドキシソルビシン投与によって心筋ミトコンドリア傷害を起こし、*MITO-Cell* を含めた CPC 細胞移植の効果を様々な角度 (生存率、心機能、分子機序など) から解析した。

はじめにキャリア調製と *in vitro* 評価を行った。CPC の単離とその品質評価を細胞表面マーカー、発現遺伝子解析を用いて行った。次いでレスベラトロールを搭載した MITO-Porter system を最適化し、ミトコンドリア DDS を創製した。開発した MITO-Porter について動的散乱光法を用いて粒子径や表面電荷などの物性の確認を行い、フローサイトメリー法を用いて細胞内取り込みを、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて細胞内動態について観察した。開発した MITO-Porter の機能評価のために、ドキシソルビシン心筋症モデル構築と *MITO-Cell* を用いた延命効果の検証を行った。*In vitro* 実験で *MITO-Cell* はドキシソルビシン耐性であることが判明し、続けて既報を参考にドキシソルビシン心筋症モデルマウスを構築し、モデルに対して CPC の心筋細胞移植を行い、生存率を検証した。最後にドキシソルビシン心筋症モデルの CPC 移植後病態評価を行った。移植後の心筋組織を対象に顕微鏡実験で酸化ストレスとアポトーシスについて評価した後、心筋組織のミトコンドリア関連遺伝子と呼吸鎖酵素複合体タンパク質発現レベルについて解析を行った。

【結果】

MITO-Cell を用いた細胞移植療法により、ドキシソルビシン心筋症モデルマウスの生存率が、従来の心筋幹細胞移植法よりも有意に延長することが明らかとなった。*MITO-Cell* を移植した心筋組織内では、ドキシソルビシンの標的となるミトコンドリア新生関連遺伝子や OXPHOS 関連遺伝子の発現が比較的保たれていることがわかり、呼吸鎖酵素複合体タンパク質レベルも一部保持されていることが判明した。

【考察】

ミトコンドリア新生の亢進が *MITO-Cell* 移植の生存率への寄与に影響していることが示唆された。本研究は、レスベラトロールを単離心筋幹細胞ミトコンドリアに DDS の技術を用いて導入し、それを移植用幹細胞として使用することにより、既報の細胞移植療法より有効な移植手段と成りうることを検証した世界で初めての報告である。ミトコンドリア DDS を用いてミトコンドリア保護分子を幹細胞に送達することは、重症心不全に対する幹細胞移植療法の有効性を高める可能性がある。

【結論】

MITO-Cell を用いた細胞移植療法により、ドキシソルビシン心筋症モデルマウスの生存率を、従来の心筋幹細胞移植法よりも有意に延長することができた。ミトコンドリア DDS を用いてミトコンドリア活性を高めた細胞移植療法は、広範な酸化ストレスを主座とするドキシソルビシン心筋症に対する画期的な心筋幹移植療法に発展する可能性がある。