

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16982

研究課題名（和文）ミトコンドリア移植による創傷治癒促進効果に関する研究

研究課題名（英文）Wound healing promotion effect by mitochondria transplantation

研究代表者

高清水 一慶（Takashimizu, Ikkei）

信州大学・医学部・助教（特定雇用）

研究者番号：00793019

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）：創傷治癒で重要な働きを有する正常ヒト線維芽細胞から細胞内小器官であるミトコンドリアを単離し、創傷治癒モデルの培養細胞に移植することで、創閉鎖に与える影響を検証した。単離したミトコンドリアは微細形態、機能ともに正常であり、培養細胞と共培養することで細胞内へ移植できることを確認した。ミトコンドリア移植により創閉鎖時間は短縮し、また量依存効果があることが判明した。遺伝子発現解析では、細胞遊走能よりも細胞増殖能の増加を認め、ミトコンドリア移植による創傷治癒促進効果には細胞増殖が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷治癒では、細胞周辺環境調整や細胞外からの刺激による外的因子でなく、細胞自身の力、すなわち内的因子も重要である。本研究ではこの内的因子に注目し、エネルギー産生の要であるミトコンドリアを細胞へ移植することで創傷治癒を促進させる効果があることを解明した。これは細胞自身を活性化させられる可能性を示唆しており、これまでにない新しい概念の治療法へとつながると考える。

研究成果の概要（英文）：By isolating mitochondria from normal human fibroblasts, which play an important role in wound healing, and transplanting them into cultured fibroblast cells in wound healing model, the effect on wound healing was examined. It was confirmed that the isolated mitochondria are normal in both micromorphology and function, and can be transplanted into fibroblast cells by co-culturing. Mitochondrial transplantation was found to reduce wound closure time and have a dose-dependent effect. Gene expression analysis showed an increase in cell proliferation ability rather than cell migration ability, suggesting that cell proliferation is involved in the wound healing promoting effect of mitochondrial transplantation.

研究分野：形成外科 創傷治癒 再生医療

キーワード：創傷治癒 ミトコンドリア移植 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 治らない傷の要因

集学的治療を行っても治らない傷が存在する。これは創傷治癒が働くための要因が満たされていないことを意味しており、現在行われている治療は細胞周辺環境調整や細胞へ働きかける外的要因であり、細胞自身に注目した内的要因に対する治療は行われてこなかった。

(2) ミトコンドリア異常で生じる疾患

細胞のエネルギー産生の要であるミトコンドリア(以下、Mt)が機能不全に陥ると、細胞だけでなく、組織・個体にまで影響を与えることが分かっている。その疾患例として糖尿病や、循環器疾患、認知症、パーキンソン病、気分障害、骨粗しょう症、がんや生活習慣病などが挙げられる。

(3) Mt 移植と創傷治癒

これまでに、単離した Mt を別の細胞へ移植しても、移植した Mt が移植先の細胞で機能することがわかっている。このことから我々は、創傷治癒の治療で足りない内的要因の改善を Mt 移植で図れるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

正常なヒト線維芽培養細胞より Mt を単離し、細胞へ移植することで *in vitro* での創傷治癒モデルにおける創傷治癒へ与える効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) Mt の単離

単離する Mt は創傷治癒で重要な働きをするヒト線維芽培養細胞から回収した。針とシリンジの圧格差を用いて培養細胞を破碎後、遠心分離により Mt を単離した。単離時の各分画はウェスタンブロットを行い、さらに透過型電子顕微鏡を用いて微細形態学的を確認した。

(2) 単離 Mt の機能と移植

単離 Mt の機能が正常であることを Mt が細胞のエネルギー源である ATP (アデノシン三リン酸) を産生する際に消費する酸素量を計測することで確認した。また、単離 Mt を正常ヒト線維芽細胞へ移植、すなわち共培養することで細胞内へ取り込まれることを、レーザー共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーで確認した。

(3) 創傷治癒アッセイと遺伝子発現解析

培養細胞に人工的な傷を作成し、単離 Mt と共培養することで、傷が閉鎖するまでの時間を画像解析で算出した。また、その際の遺伝子発現を解析するため、各時系列で細胞より total RNA を採取し、Realtime-PCR による遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) Mt の単離と移植

線維芽細胞には十分量の Mt が存在(図 1A)しており、本研究の圧格差と摩擦力による細胞破碎と遠心分離により Mt は濃縮して回収できた(図 1B)。また電子顕微鏡では Mt 特有の微細形態を認め(図 1C)、酸素を消費する(図 1D)ことが解析より判明した。このことから単離 Mt は ATP 産生能も有していることを示唆し、正常な機能を有していると判断した。

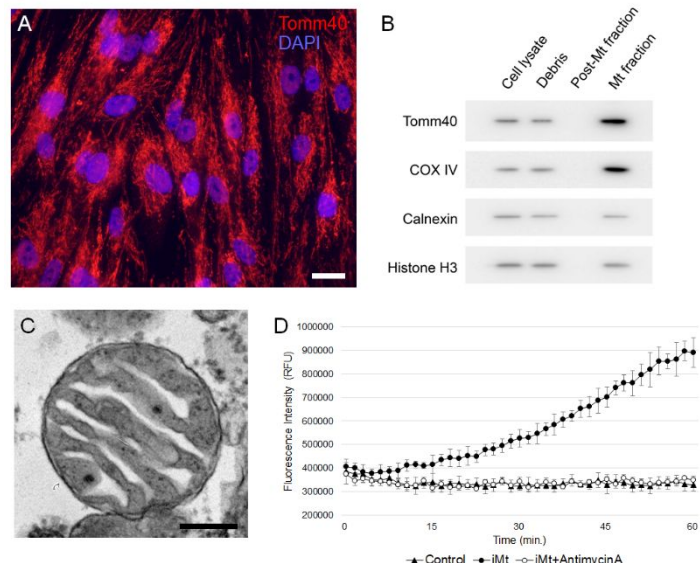


図 1 ヒト線維芽細胞の Mt 単離と形態・機能的評価

(2) Mt 移植が創傷治癒に与える効果

創傷治癒アッセイ

正常ヒト線維芽培養細胞に人工的な傷を作成し、単離 Mt と共培養することで創閉鎖に至る時間を計測したところ、12 時間、24 時間の時点においてコントロール群よりも有意に早くなった。また創閉鎖の効果は移植する単離 Mt の量依存的な関係になることも認められた(図 2A-C)。

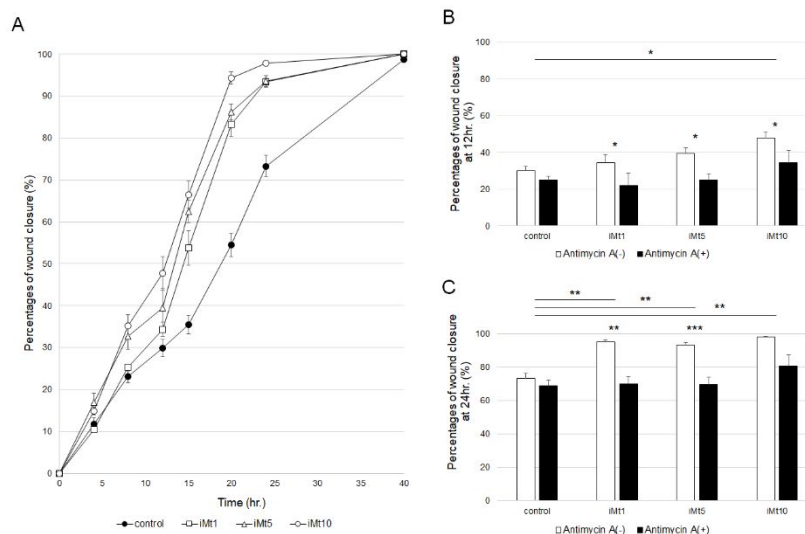


図 2 単離 Mt を用いた創傷治癒アッセイ (A; 創傷治癒アッセイ, B; 12 時間後, C; 24 時間後, *; $p < 0.5$, **; $p < 0.05$, ***; $p < 0.01$)

増殖抑制アッセイと遺伝子発現解析 (Real time-PCR)

細胞増殖抑制剤を用いて創閉鎖の要因を解析したところ、12 時間まではコントロールと同じであったが、それ以降は有意に創閉鎖までの時間が短縮した(図 3A-C)。

また、創傷治癒アッセイ時に採取した total RNA を用いた遺伝子発現解析では、細胞遊走能関連マーカーである RhoA や Rac1 は時間が経過しても著大な変化は認めなかった。一方で、細胞増殖能関連マーカーである Ki67 は時間とともに 4 倍の発現増加を認め、PCNA はコントロールでは 24 時間の時点で発現量が半分で減少するところを、単離 Mt 群では 2 倍程度の発現を維持し続けた(図 3D-G)。

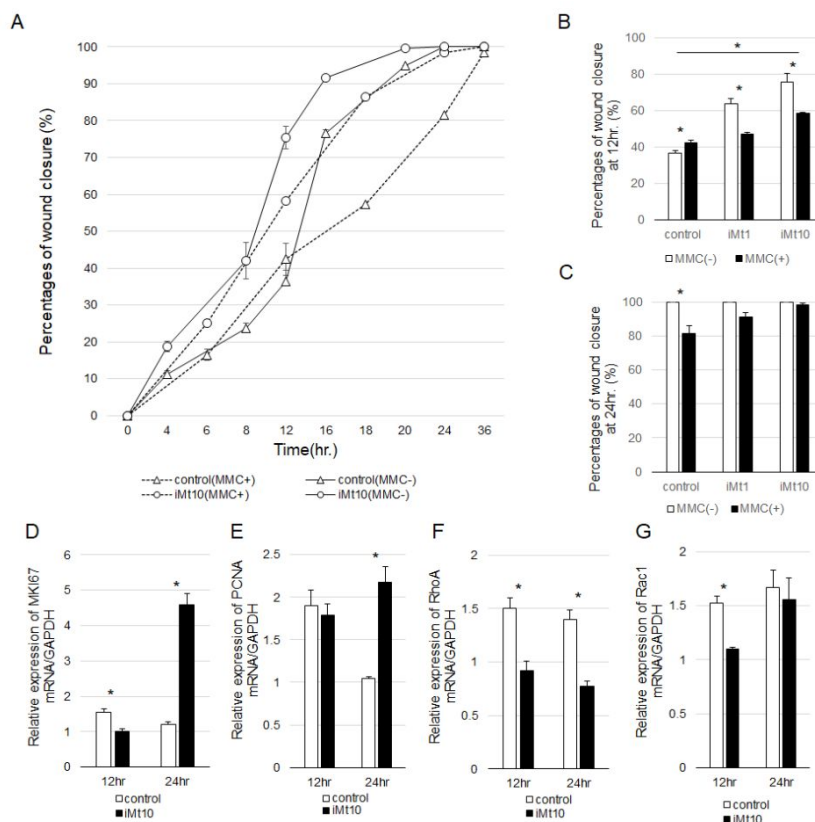


図 3 増殖抑制アッセイと遺伝子発現解析 (A; mitomycinC (MMC) による増殖抑制アッセイ, B; 12 時間後, C; 24 時間後, D-G; 遺伝子発現解析, *; $p < 0.5$)

< 引用文献 >

- Schultz GS, et al., Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. Wound Repair Regen 2003 Suppl1 S1-28
- Feng L, et al., Reactive oxygen species stimulate mitochondrial allele segregation

toward homoplasmy in human cells. *Mol Biol Cell* 2016 27(10) 1684-93

ここまでわかったミトコンドリア研究の新展開 医歯薬出版株式会社より引用

Clark MA and Shay JW: Mitochondrial transformation of mammalian cells. *Nature* 1982, 295 605-7

Spees JL, et al., Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006 103(5) 1283-8

Masuzawa A, et al., Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: 2013 304 H966-82

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高清水一慶、杠俊介
2. 発表標題 ミトコンドリア移植による創傷治癒促進効果の検討
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高清水一慶、杠俊介
2. 発表標題 ミトコンドリア移植による創傷治癒促進効果の検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高清水一慶、杠俊介
2. 発表標題 ミトコンドリア移植は創傷治癒を加速させる効果がある
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高清水一慶、杠俊介
2. 発表標題 ミトコンドリア移植による創傷治癒活性化の可能性
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高清水一慶、杠俊介
2. 発表標題 ミトコンドリア移植による創傷治癒活性化の可能性
3. 学会等名 第12回日本創傷外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高清水一慶、杠俊介
2. 発表標題 ミトコンドリア移植による創傷治癒促進効果の検討 第2報
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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

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