

羊膜上皮細胞における細胞間ミトコンドリア 輸送イメージングと新たな培養条件の開発

高野智圭^{1,2)}, 生田 稜¹⁾, 林田真吾²⁾, 太向 勇³⁾, 加賀三鈴³⁾,
金丸和典³⁾, 小川えりか²⁾, 三木 敏生³⁾, 早川 智¹⁾

Visualization of intercellular mitochondrial transfer in human amniotic epithelial cells and development of new conditioned medium

Chika TAKANO^{1,2)}, Ryo IKUTA¹⁾, Shingo HAYASHIDA²⁾, Isamu TAIKO³⁾, Millei KAGA³⁾,
Kazunori KANEMARU³⁾, Erika OGAWA²⁾, Toshio MIKI³⁾, Satoshi HAYAKAWA¹⁾

要旨

多様な細胞間コミュニケーションのひとつとして、近年では細胞膜ナノチューブを介したミトコンドリア輸送という現象が知られているが、これを観察するにはミトコンドリアの可視化が必須である。本研究では胎盤由来幹細胞のひとつである羊膜上皮細胞を用いて、ミトコンドリアに赤色蛍光蛋白を発現する不死化細胞株を樹立した。この細胞を使って、共焦点顕微鏡による細胞間ミトコンドリア輸送のライブイメージング解析法、およびフローサイトメトリーによるミトコンドリア輸送の定量解析法を確立した。さらにはミトコンドリア機能障害、もしくは機能改善を及ぼす細胞培養条件の検討も行った。本研究で得られた成果をもとに、細胞間ミトコンドリア輸送に関わる分子機序の解明を目指す。

1. はじめに

ミトコンドリア病は未だ根本的治療が存在しない難治性疾患である¹⁾。新規治療法の開発として、機能不全に陥ったミトコンドリアを回復させる薬剤の他、健康細胞から抽出したミトコンドリアを病的細胞に直接あるいはナノカプセルを介して注入する等、様々な手法を用いた取り組みがなされている。細胞内小器官であるミトコンドリアを抽出し、その機能を保持したまま病的細胞に到達させることは容易ではないが、以前より細胞には細胞膜ナノチューブという細長い管を介してミトコンドリアを細胞間で直接受け渡す現象が観察されている^{2,3)}。もしもこの現象を制御でき、健康細胞(ドナー)が病的細胞(レシピエント)にミトコンドリアを輸送することでレシピエントのミトコンドリア機能を補うことが出来るとすれば、画期的な治療法の開発に繋がる可能性がある。

我々はこれまで、再生医療の新たなソースとして胎盤由来幹細胞のひとつであるヒト羊膜上皮細胞(amniotic epithelial cells: AEC)について研究してきた^{4,5)}。その中でAECが活発に細胞膜ナノチューブを伸ばし、近隣の細胞とコミュニケーションを取る現象をしばしば観察した。さらに前臨床研究として尿素サイクル異常症の疾患マウスを用いた検討では、原疾患により失われていた肝ミトコンドリア特異的な酵素活性が、AECの肝移植によって部分的に回復することを観察した。以上のことから、AECも自らが持つ健康なミトコンドリアを周囲のミトコンドリア機能が失われた細胞に輸送する能力を持つのではないかと考えた。

上記を検証するには、ミトコンドリアの時空間動態解析技術が必要である。そのためのツールとして、本研究では不死化AEC株(iAEC)にミトコンドリアを標識する蛍光蛋白を遺伝子導入し、AECの

1) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分

2) 日本大学医学部小児科学系小児科学分

3) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野

高野 智圭 : takano.chika@nihon-u.ac.jp

ミトコンドリア輸送を捉えるライブイメージング解析と、フローサイトメトリーによる定量解析を確立することを目的とした。さらにこれらの細胞を用いてミトコンドリア機能に影響を与える培養条件の検討を行った。ミトコンドリアに酸化ストレスによる障害を来たす過酸化水素⁶⁾、およびミトコンドリア機能を高める添加剤としては近年の実臨床で注目されている5-アミノレブリン酸⁷⁾を用いて、これらが*in vitro*でAECのミトコンドリアに与える影響を検討した。

2. 対象及び方法

不死化AEC株 (iAEC) にレンチウイルスで興味遺伝子を導入し、ミトコンドリアを5種類の赤色蛍光蛋白でそれぞれ標識した細胞株 (mito-RFP / iAEC) を樹立し、共培養実験における「ドナー細胞」とした。さらに細胞質を緑色蛍光蛋白で標識したヒト胎児腎細胞株 (cyto-GFP/HEK293) を作成し「レシピエント細胞」として共培養に使用した。細胞間ミトコンドリア輸送はプリズム分光型共焦点レーザー顕微鏡システム (Leica TCS SP8) を用いて観察した。ドナー細胞のミトコンドリアがレシピエント

細胞に輸送されると蛍光色素がひとつの細胞で共陽性になることを利用し、フローサイトメーター (BD FACS Aria) を用いてミトコンドリア輸送が起きた細胞集団の割合を定量解析した。さらにHEK293は過酸化水素を添加した培養液、iAECは5-アミノレブリン酸を添加した培養液を用いて、培養条件検討を行った。細胞の増殖能やミトコンドリアの膜電位、核DNAに対する相対的ミトコンドリアDNA量等の解析を用いて評価した。

3. 結果

はじめに、様々な赤色蛍光蛋白をミトコンドリアに発現させたiAECについて比較検討実験を行い、ミトコンドリアを可視化するのに最も適した蛍光蛋白を選出した。次にmito-RFP / iAECとcyto-GFP/HEK293を共培養し、共焦点顕微鏡を用いて細胞間に形成されたナノチューブとその内部に存在するミトコンドリア (図1矢印) を観察するライブイメージング系を確立した。上記結果は、英文学術雑誌に投稿中である。

フローサイトメトリーでは、レシピエント細胞 (mito-RFP / iAEC) 単独は図2A, ドナー細胞 (cyto-

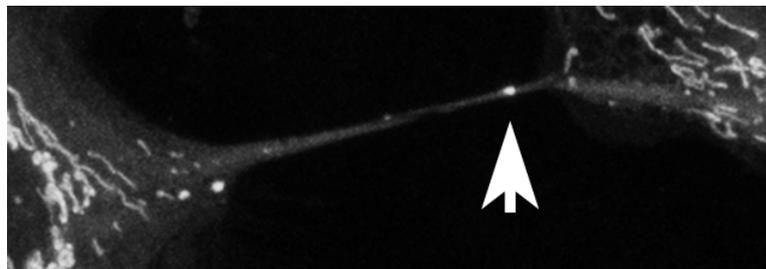


図1 ナノチューブの内部に存在するミトコンドリア

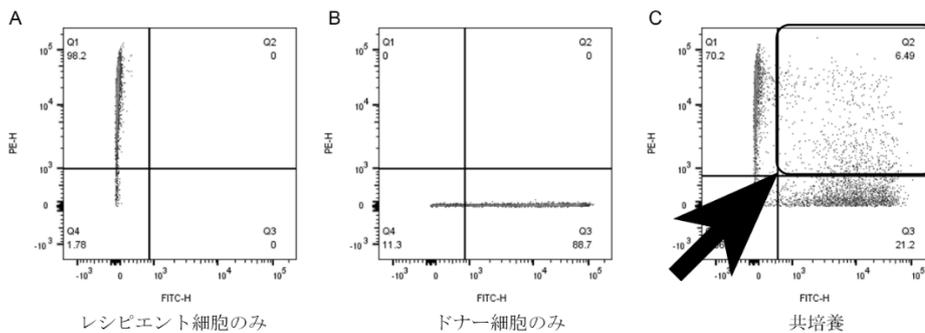


図2 フローサイトメーターによる解析

GFP/HEK293) 単独は図2Bのように検出されるが、共培養した細胞を解析すると図2C矢印部分のように、蛍光蛋白が共陽性となる細胞集団を観察することが出来た。観察に適した条件検討を繰り返し、評価系を確立した。

過酸化水素および5-アミノレブリン酸を用いた培養条件検討の結果は、学術論文に投稿予定である。

4. 考 察

本研究では胎盤由来幹細胞のひとつであるAECを用いて、細胞間ミトコンドリア輸送の評価系を確立することが出来た。プリズム分光型共焦点レーザー顕微鏡システムでは、高画質なイメージを3D構築することが可能であり、注目したミトコンドリアの位置を詳細に解析することが可能である。さらに生細胞のまま観察すること出来るため、タイムラプス機能を用い、細胞が細胞間ナノチューブを形成する様子、さらにその内部に存在するミトコンドリアをライブで評価することが可能となった。フローサイトメトリーでは、用いる抗体によって偽陰性が生じやすく、頻用されるMitoTracker®プローブは生細胞のミトコンドリアを電位に依存して標識することには極めて有用だが、共培養実験に使用するとプローブの伝播が起こるため、偽陽性が生じてしまう。本研究ではドナー細胞とレシピエント細胞のミトコンドリアを確実に識別することが必要であったため、遺伝子導入の手法を用いた。初代AECを用いることが出来ない点が研究の限界であるが、ミトコンドリアへの導入効率や発色の良い標識蛋白を選出出来たことは、今後多くの関連研究に役立つものと考えられる。

本研究に続く展望として、ミトコンドリア機能の高いドナー細胞とミトコンドリア障害を与えたレシピエント細胞を共培養することで、AECにおける細胞間ミトコンドリア輸送の詳細なメカニズムを追求したい。細胞間ナノチューブを介したミトコンドリア輸送が、細胞間の距離によって規定されるコミュニケーションではなく、ミトコンドリアの状態を反映した救済の目的で行われるコミュニケーションであるとすれば、これに関与する分子機序を解明することはミトコンドリア病の治療開発にも新たな可能性をもたらすと考えられる。

5. 結 語

細胞間ミトコンドリア輸送の時空間動態解析、および定量解析系の確立を、AECによるトランスレーショナルリサーチ、さらにはミトコンドリア病の新規治療開発に繋げたい。ミトコンドリア障害はミトコンドリア病のみならず、多様な疾患への関与が知られており、本研究の成果は医学部内連携のさらなる拡充と活性化にも貢献するものと期待される。

謝辞

本研究についてお力添えを頂きました日本大学学術研究助成に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Ng Y.S, Turnbull D.M. Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol.* 2016; 263 (1) : 179-91.
- 2) Rustom A, et al. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* 2004; 303 (5660) : 1007-10.
- 3) Murray L.M.A, Krasnodembkaya A.D. Concise Review: Intercellular Communication Via Organelle Transfer in the Biology and Therapeutic Applications of Stem Cells. *Stem Cells.* 2019; 37 (1) : 14-25.
- 4) Miki T, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells.* 2005; 23 (10) : 1549-59.
- 5) Takano C, et al. Clinical perspective on the use of human amniotic epithelial cells to treat congenital metabolic diseases with a focus on maple syrup urine disease. *Stem Cells Transl Med.* 2021; 10 (6) : 829-835.
- 6) Neustadt J., Pieczenik S.R. Medication-induced mitochondrial damage and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52 (7) : 780-8.
- 7) Shimura M, et al. Effects of 5-aminolevulinic acid and sodium ferrous citrate on fibroblasts from individuals with mitochondrial diseases. *Sci Rep.* 2019; 9 (1) : 10549.