

単離ミトコンドリアの細胞内導入法開発による 細胞加齢・病態モデルの構築

[1] 組織

代表者：田中 敦

(山形大学医学部メディカルサイエンス
推進研究所)

対応者：小椋 利彦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：野村 慎一郎

(東北大学大学院工学研究科)

研究費：物件費 345,120 円，旅費 4,880 円

[2] 研究経過

ミトコンドリアは細胞内エネルギーの生産の場として中心的な役割を果たすだけでなく、脂質代謝やヘム合成などの多岐にわたる生命活動に必須な生反応の場である。近年、ミトコンドリアの機能維持メカニズムの生理的意義について多くの知見が報告され、その崩壊がさまざまな疾患・老化などの原因であると考えられるようになった。しかしながらミトコンドリアは細胞内に多数存在することで、部分的な機能障害をミトコンドリア集合全体（ネットワーク）で相補し、細胞内の環境悪化を防ぐメカニズムを持つ。このことは「どれだけのミトコンドリアが病的になった場合に、細胞全体が老化・病態を示すか」といったことを定量的に測定することを困難にする（機能閾値問題）。

本研究計画では、細胞や臓器から精製したミトコンドリアを対象とする細胞にダメージを与えることなく導入することにより、さまざまな状態（病的・機能障害ミトコンドリア）・由来のミトコンドリアを任意の量・時期に細胞に導入し、定量的にミトコンドリアネットワークとしての機能閾値を検証する新たな手法を、分担者野村慎一郎研究室（東北大学大学院工学研究科）と開発することを目的とする。さらに、精製ミトコンドリアを細胞に導入し経時的に追跡するために、共同研究者である小椋研究室（東北大学加齢医学研究所）とともに、一細胞における自己・非自己ミトコンドリアの識別法を開発検討する。これらの研究計画により、これまで定量的ある

いは一細胞レベルでは観察が困難であったミトコンドリアの経時的変化、病的変化を捉えることを可能とし、細胞・個体における老化・疾患発症とミトコンドリア機能障害の関係性をより詳細に説明できるものとする。

今年度の研究経過の概要としては、東北大学加齢医学研究所小椋利彦教授、東北大学大学院工学研究科野村慎一郎准教授と、加齢医学研究所にて研究計画打ち合わせを行い、その後東北大学大学院工学研究科野村研究室および山形大学医学部田中研究室を中心に単離ミトコンドリアの導入手法の条件検討、非自己ミトコンドリア検出法の開発を進めた。手法開発を中心とした研究論文を共同執筆の予定である。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究では定量的にミトコンドリアネットワークとしての機能閾値を検証することを可能にし、一細胞における自己・非自己ミトコンドリアの識別法を開発検討するために、下記の3課題について遂行した。

1. 精製ミトコンドリアの細胞導入条件の至適化
2. 細胞導入した精製（ドナー）ミトコンドリアによるレシピエント細胞の環境変化観察
3. 導入ミトコンドリアの追跡および自己・非自己ミトコンドリア識別法の開発検討

マウス肝臓あるいはヒト培養細胞から精製したミトコンドリアを人工脂質膜(GUV)に取り込ませた後、レシピエント細胞に電氣的に導入し、導入した精製ミトコンドリアと、レシピエント細胞側の内在性ミトコンドリアの経時的な関係変化を観察することで、導入の至適条件を検討した（図参照）。良好な精製ミトコンドリアのレシピエント細胞への導入が認められた。この際、これまでに接着性の細胞を剥離してから手技を行うため、細胞観察には終夜培養を行い細胞接着時間を待つ必要があったが、今年度は接着細胞がそのまま培養状態にあるところにミトコンドリアを含む

GUV を融合・導入させることに成功した。これにより、融合・導入作業後の細胞へのダメージ、観察開始までのタイムラグ（接着までの時間）を軽減することが可能となった。（野村グループとの共同検討）

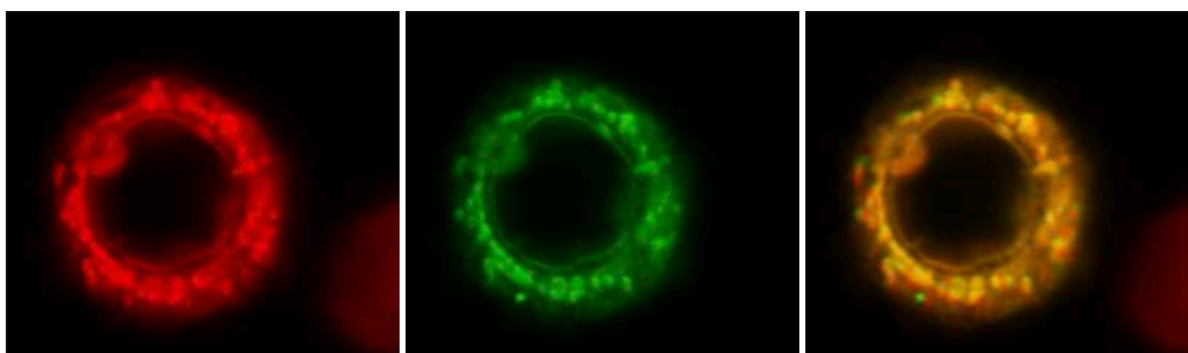
また、異種間（ヒト・マウスなど）ミトコンドリアの検出法開発については、主に小椋グループにより、ヒトミトコンドリア DNA とマウスミトコンドリア DNA の違いを、それぞれの特異的制限酵素配列を含む部位を PCR 法により増幅し、制限酵素を用い、一方の増幅断片のみを消化することを確認することで検出可能とした。今後、定量的な検出が可能であるか検討を続ける予定である。

（3-2）波及効果と発展性など

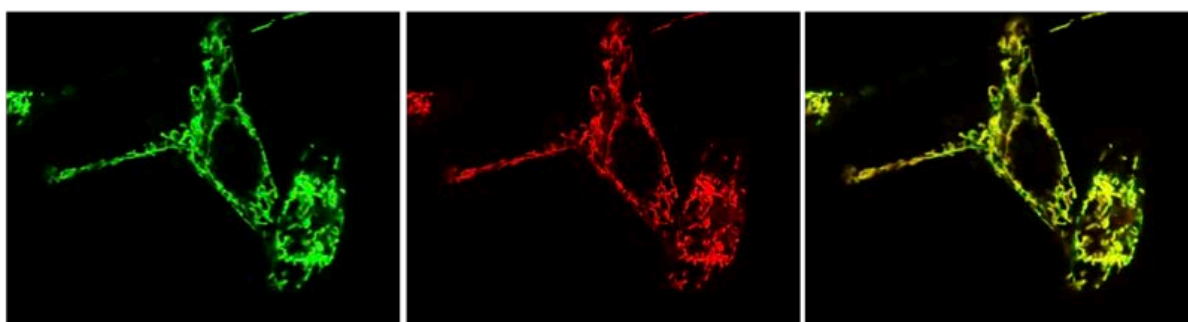
ミトコンドリア機能障害に端を発するような疾患の発症メカニズムを検討する際、より初期段階でミトコンドリア機能障害を捉えることは、診断法、予防法の開発にも貢献すると期待される。

〔4〕 成果資料

H29 度内に論文投稿を予定している。



GUVに内包した精製ミトコンドリア（赤）とレシピエント細胞のミトコンドリア（緑）：レシピエント細胞導入後の精製ミトコンドリアの多くが、内在性ミトコンドリアと融合している状態



GUVに内包した精製ミトコンドリア（赤）とレシピエント細胞のミトコンドリア（緑）：レシピエント細胞導入後、培養翌日の精製ミトコンドリアの多くが、内在性ミトコンドリアと融合している状態、かつレシピエント細胞が接着している状態