



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	変異ミトコンドリアを標的とした核酸送達システムの開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	河村, 恵理子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第12743号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65350
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Eriko_Kawamura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学） 氏 名 河村 恵理子

学 位 論 文 題 名

変異ミトコンドリアを標的とした核酸送達システムの開発

ミトコンドリアは、エネルギー産生、アポトーシス制御、細胞内代謝など多彩な機能を有するオルガネラであり、生命活動を維持するための大きな役割を担っている。ミトコンドリア 2 枚膜構造の最内部、マトリクスには独自のゲノムとして、ミトコンドリア DNA (mtDNA) が複数コピー存在する。ヒトの mtDNA にはエネルギー産生を担う電子伝達系を構成する 13 種のタンパク質、22 種の tRNA、2 種の rRNA 遺伝子がコードされている。近年、mtDNA の変異・欠損がミトコンドリア機能障害を引き起こし、筋力・心臓機能の低下を主としたミトコンドリア脳筋症、神経変性疾患など様々な疾患を誘発することが報告されており、本オルガネラを標的とした疾患治療が期待されている。これまでにミトコンドリア遺伝子治療として、正常遺伝子の補充や変異遺伝子の排除など様々な戦略を用いた研究が進められている。しかし、治療分子のミトコンドリアへの送達効率が低いことが問題点として挙げられ、ミトコンドリア遺伝子治療を実現するためには、治療分子を mtDNA の存在するマトリクスへより効率的に送達するシステムが必要不可欠であると考えられた。

本研究室では、ミトコンドリア標的型 DDS (Drug Delivery System) として『膜融合を介してミトコンドリアへの分子送達を可能とするリポソーム』、MITO-Porter を開発しており、タンパク質や低分子のミトコンドリア送達を示している。現在までにオリゴ核酸を MITO-Porter に内封したキャリアを構築し、細胞内のミトコンドリアに送達可能であることを確認している。

本研究では、これまでに構築した核酸搭載 MITO-Porter を用いて、機能性核酸をミトコンドリアに送達し、ミトコンドリアへの核酸送達検証、機能評価を行うことを目的とした。さらに、変異ミトコンドリアを有するミトコンドリア病患者由来細胞を用いて、治療分子となる核酸を送達することにより、ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療を試みた。

はじめに、MITO-Porter を用いた細胞内ミトコンドリアへの核酸送達を検証するため、ミトコンドリアを標的としたアンチセンス RNA (AS RNA) の送達および遺伝子発現制御の検証を行った。使用した AS RNA は mtDNA にコードされたミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV のサブユニット Cytochrome c oxidase subunit 2 (COX2) を標的として設計しており、5'末端側にはミトコンドリア輸送能をもつ配列 Darm を付加している。当研究室では、これまでにエタノール希釈法を用いて Darm AS RNA 単独を内封した MITO-Porter を構築しており、アンチセンス効果を定性的に検証した結果、発現抑制が起こる可能性があることを示した。しかし、調製したキャリアには未封入リポソームと同程度の細胞毒性が得られ、詳細なミトコンドリア機能を検証することが困難であった。また、疾患治療を目的とした場合に強い毒性が問題となることからキャリアの改善が求められた。

MITO-Porter への RNA 搭載率を向上させるため、ポリカチオンであるポリエチレンジアミン (PEI) を用いて正電荷の Darm RNA/PEI ナノ粒子を調製し、キャリアへの内封を試みた。AS RNA による発現抑制効果と細胞毒性を評価した結果、Darm RNA/PEI ナノ粒子を用いた場合では、キャリアを構成する脂質量、アルギニン 8 重合体 (R8) 量を 10 分の 1 に減少させたことにより毒性が軽減され、ア

ンチセンス効果を確認することに成功した。

AS RNA のミトコンドリア送達による機能検証を行うため、HeLa 細胞への添加後 24、48 時間における標的 mRNA とタンパク質の発現量を qRT-PCR、ウェスタンブロッティングにより評価した。Darm AS RNA/PEI 搭載 MITO-Porter は、コントロール配列 (Darm mock) と比較し標的 COX2 mRNA、タンパク質発現量を抑制することが示唆された。一方、遺伝子導入試薬 (Lipofectamine (LFN) RNAi MAX) では、標的 mRNA、タンパク質発現量の抑制は確認されないことが明らかとなった。

標的遺伝子の発現量に伴う細胞内ミトコンドリア機能への影響を検証するため、48 時間後におけるミトコンドリア酵素活性、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生量、呼吸鎖複合体 IV 活性を評価した。評価の結果、Darm AS RNA/PEI 搭載 MITO-Porter の送達により、未封入リボソーム、Darm mock と比較してミトコンドリア酵素活性が有意に低下することを確認した。さらに、MITO-Porter を用いた Darm AS RNA の送達では、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生量が有意に低下することが示された。また、ミトコンドリア呼吸活性を評価した結果、標的遺伝子 COX2 が位置する呼吸鎖複合体 IV 活性が低下している傾向が観察された。

次に変異ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療戦略の検証を行った。ミトコンドリア遺伝子病は変異 mtDNA のみが存在するホモプラスミー変異、変異 mtDNA と正常 mtDNA が混在するヘテロプラスミー変異に分けられる。ヘテロプラスミー変異では、mtDNA の変異率がある閾値を超えるとミトコンドリアの機能低下に伴う疾患症状を引き起こすことが報告されている。本研究では、ミトコンドリア病患者の皮膚生検より得た線維芽細胞を用いて、MITO-Porter を使用した治療分子の送達による遺伝子治療戦略の検証を行った (臨床研究番号: 自 2014-003、承認日: 平成 26 年 10 月 17 日)。ミトコンドリア病患者は、mtDNA の tRNA^{Phe} に G625A 変異を有しており、mtDNA の変異率が 80% であることが確認されている。

変異ミトコンドリアを標的とした治療戦略として、ミトコンドリア内の tRNA^{Phe} の変異率を低下させるため、pre-tRNA^{Phe} を内封した MITO-Porter を送達することを試みた。はじめに、変異を導入した pre-tRNA^{Phe} を正常な線維芽細胞 (NB1RGB 細胞) に送達することにより、ミトコンドリア内の変異率を変動させることが可能かを検証した。in vitro 転写により精製した変異導入 pre-tRNA^{Phe} をポリカチオンであるプロタミンを用いてナノ粒子化し、MITO-Porter に内封したキャリアを構築した。NB1RGB 細胞に添加後 4 日目までの細胞内ミトコンドリアにおける tRNA^{Phe} の変異率を ARMS-qPCR 法を用いて算出した。評価の結果、RNA 量、インキュベーション時間に依存した変異率の変動を確認することに成功した。次に、正常 pre-tRNA^{Phe} を同様にミトコンドリア病患者由来線維芽細胞 (G625A 細胞) に投与した。コントロール配列 pre-tRNA^{Phe} (Yeast) では変化がなかったのに対し、正常 pre-tRNA^{Phe} ではミトコンドリアにおける tRNA^{Phe} の変異率が低下したことが示唆された。また、ミトコンドリア輸送能をもつ RNA 配列、RP-MRP、tRK1 を pre-tRNA^{Phe} に付加した場合においても同様に変異率の低下がみられた。さらに、変異率の低下に伴うミトコンドリア呼吸能への影響を Oxygraph-2k を用いて検証した結果、コントロール配列と比較して正常 pre-tRNA^{Phe} においてミトコンドリア呼吸能が上昇したことが示唆された。

本研究では、ミトコンドリアを標的とした AS RNA を細胞毒性を軽減した MITO-Porter を用いて送達し、標的遺伝子の発現量抑制、ミトコンドリア機能制御を実現した。さらに、ミトコンドリア病患者由来線維芽細胞に正常 pre-tRNA^{Phe} を内封した MITO-Porter を送達し、ミトコンドリアにおける変異率の低下、ミトコンドリア機能改善を示すことに初めて成功した。