



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主 査	准教授	山田 勇磨
	副 査	教 授	原島 秀吉
	副 査	教 授	菅原 満
	副 査	准教授	武隈 洋

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

ミトコンドリアは、エネルギー産生、アポトーシス制御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) が存在する。近年、mtDNA の変異がミトコンドリア機能障害を引き起こしミトコンドリア病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。しかし、治療分子のミトコンドリアへの送達効率が問題となることから、治療分子をより効率的にミトコンドリアへ送達するシステムが必要不可欠となる。著者らの研究室では、ミトコンドリア標的型 DDS (Drug Delivery System) として、MITO-Porter を開発している。本論文では、MITO-Porter を用いて機能性核酸を送達し、ミトコンドリアへの核酸送達検証および機能評価を行うことを目的としている。

第 1 章では、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について論じられている。本章で使用されている 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) を標的として設計されており、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。著者らの研究室では、これまでにエタノール希釈法を用いて Darm RNA 単独を内封した MITO-Porter を構築し、アンチセンス効果を検証していたが、調製した MITO-Porter には未封入りポソームと同程度の細胞毒性があることが明らかとなった。著者は、ポリエチレンジオキシ（PEI）を用いて Darm RNA/PEI ナノ粒子を調製し、MITO-Porter へ内封することによって毒性を大きく軽減させることに成功している。更に、構築した Darm RNA/PEI ナノ粒子搭載 MITO-Porter を HeLa 細胞に添加し、遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロッティングにより検証した結果、標的 COX2 mRNA、タンパク質発現量がコントロールと比較して有意に抑制されたことを示している。一方で遺伝子導入試薬（Lipofectamine

(LFN) RNAi MAX) では、標的 mRNA、タンパク質発現量は抑制されないことを明らかとした。次に、標的遺伝子の発現抑制に伴う細胞内ミトコンドリア機能への影響を検証した結果、遺伝子発現抑制がみられた投与量においてミトコンドリア酵素活性、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生量が有意に抑制されたことが示された。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。

第 2 章では、ミトコンドリア病患者由来細胞を用いて、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試みている。ミトコンドリア病には、変異 mtDNA と正常 mtDNA が混在するヘテロプラスミー変異が存在し、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。本章では、mtDNA の tRNA^{Phe} に変異率 80% の G625A 変異を有するミトコンドリア病患者より得た線維芽細胞を用いて研究を遂行している。著者は、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に 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) に送達し、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ている。変異導入 pre-tRNA^{Phe} を搭載した MITO-Porter を NB1RGB 細胞に添加し、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) に投与した結果、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。更に、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。

これを要するに、著者は、ミトコンドリアを標的とした機能性核酸を MITO-Porter を用いて細胞に導入することにより、ミトコンドリアにおける遺伝子発現とミトコンドリア機能の両方を制御することに初めて成功した。本研究により見出された新たな知見は、今後ミトコンドリア病に対する遺伝子治療の実現、疾患解明に貢献する事が期待される。

よって著者は、北海道大学博士 (臨床薬学) の学位を授与される資格あるものと認める。