



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ナノカプセルを用いた骨格筋ミトコンドリアを標的とした治療法の開発に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	片山, 貴史
Description	配架番号 : 2449
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13435号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74338
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Katayama_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（医 学） 氏 名 片 山 貴 史

学 位 論 文 題 名

ナノカプセルを用いた骨格筋ミトコンドリアを標的とした治療法の開発に関する研究
(Studies on a mitochondrial delivery system using liposome-based nanocarriers
that target myoblast cells)

【背景と目的】

慢性心不全をはじめとする多くの慢性疾患患者において、身体活動能力の指標である運動耐容能が低下している。慢性心不全患者では心機能以上に骨格筋の萎縮や線維型の変化、骨格筋ミトコンドリア異常によって、骨格筋機能が低下し、運動耐容能低下から生命予後不良につながっている。運動療法による骨格筋機能や運動耐容能の改善が図られているが、重症心不全患者や高齢の患者においては身体活動機能が高度に制限されているため、十分な運動療法を行うことができない。運動療法に代わる骨格筋機能低下への治療の開発が喫緊の課題である。骨格筋ミトコンドリアはエネルギー産生の主体であり骨格筋機能に直結することから治療ターゲットとして期待される。

ミトコンドリア異常への治療には、正常ミトコンドリアの移植、異常ミトコンドリアの選択的除去、ミトコンドリアへの薬物や核酸の送達といった方法が考えられているが、効率性や安全性などの面で障壁が多い。いかに効率よくミトコンドリアへ介入や物質送達するかが大きな課題となっている。物質送達の手段の一つとして、脂質二重膜のリポソームにミトコンドリア指向性修飾を施したナノカプセルによるミトコンドリア送達を検証されている。この方法は、送達物質の分子量や性質の制限が少なく、脂質組成や修飾を工夫することにより多様な特性をもたせられる特長がある。HeLa 細胞などを対象にナノカプセルによるミトコンドリア送達の研究が進んでいるが、細胞の種類によって細胞表面の性状や組織の周囲環境が異なるため、ナノカプセルが細胞外から細胞内のミトコンドリアまで送達する能力や効率については、細胞や組織の種類ごとに検討する必要がある。

本研究の目的は、骨格筋ミトコンドリアへの治療物質送達を細胞レベルで検証し確立すること、およびこの送達により骨格筋細胞のミトコンドリア機能を向上させることである。そして将来的な目標は、動物の組織レベルでの治療物質送達および骨格筋ミトコンドリア機能向上である。

【材料と方法】

実験 1 では、骨格筋芽細胞 C2C12 を用いて、細胞内への取り込み能が高いナノカプセルを、各種脂質組成について探索し開発した。他の細胞で細胞内取込能が高いことが明らかとなっている脂質組成「 β -MEND」をもとにカチオン脂質を入れ替えたリポソームを作製し、骨格筋芽細胞 C2C12 への細胞内取込能がより高いリポソームについて比較検討した。細胞内取込能は、リポソームへ修飾した蛍光の細胞内における強度をフローサイトメトリーで測定し評価した。

実験 2 では、実験 1 で最も骨格筋芽細胞内取込能が高かった β -MEND に、ミトコンドリア呼吸鎖の酵素複合体 I を活性化させる作用をもつ resveratrol を封入し、骨格筋芽細胞

C2C12 へ投与すると複合体 I 活性が向上するという仮説を立て、検証した。実験においては未投与群のほか、 β -MEND を用いず resveratrol 単独で投与した群、resveratrol を封入しない空の β -MEND を投与した群とも比較検討した。

実験 3 では、ミトコンドリア移行性を高めるものとして知られているいくつかのペプチドを修飾し、骨格筋芽細胞 C2C12 へのミトコンドリア移行性を比較検討した。KALA ペプチドは細胞膜貫通性を有するペプチドであり、MITO-Porter への修飾によってミトコンドリア移行性が改善することが他の細胞で明らかとなっている。S2 ペプチドは細胞浸透性を有する Szeto-Schiller ペプチドの 2 量体で、ミトコンドリア指向性を有する。RNase P RNA から得られた RP アプタマーはミトコンドリアへ特異的に結合する。本実験ではこれら 3 つの候補を修飾し、ミトコンドリア移行性が高いナノカプセルの作製を試みた。核内では終止コドンのため発現せずミトコンドリア内のみで本来の発光蛋白を発現するよう配列したプラスミド DNA をリポソームへ封入し、投与後の発光量からミトコンドリア移行性を評価した。また共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてミトコンドリアとリポソームの局在を画像的に評価した。

【結果】

実験 1 において、脂質組成 R8/DOPE/SM のリポソーム「R8-MITO-Porter」、脂質組成 DC-Chol/EPC/SM のリポソーム「 β -MEND」、および脂質組成 DDAB/EPC/SM のリポソームは、脂質組成 DOPE/SM のリポソームと比較し、骨格筋芽細胞 C2C12 への細胞内取込能が有意に高かった。実験 2 において、 β -MEND を用いることによる resveratrol の複合体 I 活性化作用増強効果の有無について検証したが、有意な効果が確認されず、仮説を立証することができなかった。実験 3 において、プラスミド DNA 封入 KALA 修飾 β -MEND は、プラスミド DNA 単独と比較し、骨格筋芽細胞 C2C12 のミトコンドリアへのプラスミド DNA 送達能が有意に高かった。

【考察】

骨格筋芽細胞においてミトコンドリア内へリポソームを用いて効率が高い核酸送達を実証した報告は初めてである。

各脂質組成のリポソームの細胞内へ取り込まれる性質は細胞の種類によって異なり、結果としてミトコンドリアへの移行性や送達能も細胞種によって異なる。これまでは子宮頸癌由来培養細胞 HeLa やマウス膵 β 細胞由来培養細胞 MIN6 など限られた種類の細胞で検証されてきた。本研究はミトコンドリア異常が臨床的に問題となっている骨格筋を標的とした検証であり、送達物質の制限が少ないリポソームによる骨格筋細胞ミトコンドリアへの物質送達実績は今後の臨床への応用が期待される。

実験 2 ではリポソーム β -MEND を用いた薬物送達による薬物作用増強効果を確認できなかったが、実験 3 の結果を踏まえ、よりミトコンドリア移行性が高い KALA 修飾 β -MEND を用いることにより、送達薬物の治療効果増強を示せる可能性がある。

本研究はマウス骨格筋由来の培養細胞である骨格筋芽細胞を研究対象としたが、今後の臨床応用に向けて、細胞レベルではなく動物における骨格筋組織を対象とした研究への進展が望まれる。心疾患などで骨格筋ミトコンドリア機能が低下した動物モデルへ治療薬物や正常遺伝子等を搭載したナノカプセルを筋肉注射または静脈注射することにより、運動耐容能や予後を改善させる研究の展開が期待される。

【結論】

KALA ペプチドを修飾した β -MEND リポソームは、骨格筋芽細胞へ取り込まれミトコンドリアへ核酸を送達させることができた。このリポソームによって核酸や治療薬物を骨格筋ミトコンドリアへ送達することで、骨格筋ミトコンドリア異常を治療することができる可能性が示された。