



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 [全文の要約]
Author(s)	片山, 貴史
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2449 他
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/2115/74339
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Katayama_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

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)

2019年3月

北海道大学

片山 貴史

学 位 論 文 (要 約)

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)

2019年3月

北海道大学

片山 貴史

学位論文（要約）

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りポソームを作製し、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薬物 A を封入し、骨格筋芽細胞 C2C12 へ投与すると、封入しない場合と比較して封入した場合の方がミトコンドリアへの効果が増強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 を用いず薬物 A 単独で投与した群、薬物 A を封入しない空の β -MEND を投与した群とも比較検討した。複合体 I 活性はジギトニンによる細胞膜透過処理後の細胞へ各種呼吸基質を加えたときの酸素消費速度について高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置 Oxigraph-2k を用いて測定し評価した。

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。過去の報告と同様、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 NanoLuc 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、骨格筋芽細胞 C2C12 へ投与した後の発光量から、各種ペプチド修飾リポソームそれぞれの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。負電荷を帯びたプラスミド DNA をリポソームへ効率的に封入するため、正電荷であるプロタミンとプラスミド DNA を適切な割合で凝集させコア粒子を作製した。

リポソームはすべて単純水和法により作製した。リポソームを細胞へ投与する際には血清を含まない培地を用いた。リポソームを細胞へ投与した後は、細胞表面へ付着したリポソームを除去するためヘパリン溶液で 2 回以上洗浄した。細胞内蛍光強度の測定結果は、各群の幾何平均値を求め、非投与群における蛍光強度の幾何平均値で除すことで相対値を算出し、検定対象とした。各実験はリポソームの作製、細胞播種、測定それぞれ独立した実験操作を表記の回数施行した。統計学的解析では $p < 0.05$ をもって統計学的有意と判定した。

【結果】

実験 1 において、正電荷を帯びていないため細胞内取込能が低い脂質組成 DOPE/SM のリポソームを対照群としたとき、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、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薬物 A 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、各種呼吸基質存在下のいずれのステートにおいても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。条件検証として β -MEND の骨格筋芽細胞内取込の時間的経過を確認したところ、投与時間が長くなると細胞内取込も比例して増加するものの、投与中の血清非存在下では細胞数が減少した。実験 3 において、プラスミド DNA コア粒子を作製する最適な条件を確認し、プラスミド DNA 封入ナノカプセルを作製した。プラスミド DNA 封入ペプチド B 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。各種修飾 β -MEND は非修飾時と比較し細胞内取込能が有意に低下しており、共焦点レーザー走査型顕微鏡においても同様の細胞内動態が観察された。

【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ペプチド B 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．また，薬物 A についてはミトコンドリア内外で数多くの作用点が報告されており，ミトコンドリア内への薬物 A 送達による効果が不明瞭化している可能性がある．ミトコンドリア指向性ナノカプセルの特性を十分生かすことができるような，ミトコンドリア内でのみ効果をもたらす新たな送達物質候補について現在検討している．

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させる．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へ展開中である．

【結論】

ペプチド B 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．