



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	臨床応用を目指したミトコンドリア標的型コエンザイムQ10搭載ナノカプセル注射剤の創製 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	日比野, 光恵
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14851号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85668
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mitsue_Hibino_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 日比野 光恵

学位論文題名

臨床応用を目指したミトコンドリア標的型コエンザイム Q₁₀ 搭載ナノカプセル注射剤の創製

【研究背景と目的】

創薬技術の進歩により膨大な開発候補品が見出されたものの、その大半は難水溶性を示す傾向にあり、新薬開発の障壁となっている。特に biopharmaceutics classification system (BCS) のクラス 4 (低い水溶性、低い膜透過性) に分類される薬物は最も製剤開発が困難である。そのため多様な剤形への展開が乏しく、一般的に経口吸収率が制限され、効果が得られにくい。Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) は代表的なクラス 4 薬物である。市販された CoQ₁₀ 製剤は経口剤しかなく、過去に注射剤の開発が試みられたが、適切な乳化剤を選定できず中止となった。CoQ₁₀ は抗酸化作用を持ち、ミトコンドリア (Mt) でのエネルギー産生に不可欠な補酵素である。組織傷害時の細胞死は、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の過剰発生およびエネルギー産生の低下が起因しており、Mt 機能が密接に関連する。CoQ₁₀ の Mt 送達は Mt 関連疾患を治療できる可能性があり、急性期疾患等に用いる静注用製剤の開発は治療法の拡大につながる。近年、マイクロ流体デバイスは脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle : LNP) 調製の基盤技術であり、調製法のスケールアップや再現性の高い粒子調製が可能である。しかし、マイクロ流体デバイスを用いて難水溶性薬物を LNP に搭載した例は少ない。当研究室では Mt Drug Delivery System として Mt 標的型ナノカプセル “MITO-Porter” を開発し、様々な分子送達に成功している。本研究では、CoQ₁₀ を MITO-Porter に搭載し (CoQ₁₀-MITO-Porter)、従来法 (CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]) からマイクロ流体デバイスを用いた調製法 (CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]) へのスケールアップを試みた。次にマイクロ流体デバイスにて調製した CoQ₁₀-MITO-Porter の細胞内動態を評価した。治療効果の検証には acetaminophen (APAP) 肝障害モデルマウスを用いた。APAP は、幅広い世代に使用可能な解熱鎮痛剤である。しかし、APAP の過剰摂取は急性薬物中毒を引き起こし、欧米諸国での急性肝不全症例の半数以上を占める。肝障害発症の主要な機序は、Mt からの ROS の過剰発生であり、APAP 肝障害は Mt 関連疾患とも言える。そこで APAP 肝障害モデルマウスに CoQ₁₀-MITO-Porter を投与し、CoQ₁₀ の Mt 送達により酸化ストレスを軽減することで肝障害を治療し、急性期疾患等に用いる Mt 標的型静注用 CoQ₁₀ 製剤としての有用性を検証した。

【結果・考察】

1. マイクロ流体デバイスを用いた調製法の確立

従来の CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] はエタノール (EtOH) 希釈法が最も調製に適していた。しかし、CoQ₁₀ の難水溶性が粒子調製の効率を低下させ、粒子径が不均一で調製の再現性が乏しく、調製量が制限されていた。マイクロ流体デバイスを用いた調製法の特徴は、脂質相と水相の急速攪拌・混合による粒子の微小化、均一性の向上および無菌的な大量調製であり、従来法での課題を解決できる可能性がある。マイクロ流体デバイスは北海道大学大学院工学研究院渡慶次学教授らが開発した invasive lipid nanoparticle production (iLiNP) を使用した。iLiNP は LNP 形成メカニズムと流体力学シミュレーションに基づいて設計され、多様な粒子径制御が可能である。マイクロ流体デバイスによる LNP の調製原理は EtOH 希釈法に基づき、CoQ₁₀-MITO-Porter 調製を適用させる際にプロトコル変更を回避できる。マイクロ流体デバイスにおける調製パラメータは、①総流速②

流速比 (EtOH 希釈比率)③脂質相濃度④水相の種類である。種々の検討から総流速 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ および EtOH 希釈比率 20 %の時、最適な CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]を調製することができた。続いて、従来法とマイクロ流体デバイスを用いた調製法で得られた CoQ₁₀-MITO-Porter の物性を比較した。粒子径は 96 \pm 3.1 nm から 48 \pm 0.2 nm に減少し、微小化に成功した。粒子の均一性の指標である多分散性指数 (PDI)は 0.336 \pm 0.002 から 0.221 \pm 0.003 に低下し、均一性が向上した。以上より、CoQ₁₀-MITO-Porter の調製法はマイクロ流体デバイスを用いたことで従来法での課題を克服し、スケールアップに成功した。

2. HeLa 細胞を用いた細胞内動態評価

マイクロ流体デバイスにて調製した CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の細胞内動態を確認するために、フローサイトメーターによる細胞取り込み評価および共焦点レーザー走査型顕微鏡による細胞内局在観察を行い、従来法の CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]と比較した。CoQ₁₀-MITO-Porter は脂質量に対して 0.5 mol%の蛍光色素 (NBD)を標識させたものを用いた。粒子径は CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]が 46 \pm 2.2 nm、CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]が 79 \pm 4.7 nm であった。細胞取り込み評価より、CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の方が CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]よりも粒子の取り込みが有意に高かった。細胞内局在観察においても、CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]と比較して CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]は、多くのシグナルと共に共局在を示す黄色いドットが多数観察された。したがって、CoQ₁₀-MITO-Porter の粒子サイズの微小化が細胞導入および Mt 移行を向上させたことが示唆された。

3. APAP 肝障害モデルを用いた治療効果の検証

C57BL/6J マウス (10 週齢, 雄性, 約 21 g, 21 \pm 3 hr 絶食)に APAP を 250 mg/kg に皮下投与をし、その 6 hr 後に採血をして肝機能の指標である alanine transaminase (ALT)を評価したところ、5,295.6 \pm 2,730.5 IU/L を示す肝障害モデルの作製に成功した。このモデルを用いて、APAP 投与の 1 hr 後に PBS、CoQ₁₀ 懸濁液および CoQ₁₀-MITO-Porter を投与し、治療効果を検証した。CoQ₁₀濃度は 5.4 mg/kg であった。CoQ₁₀-MITO-Porter 群は 47.4 \pm 21.3 IU/L となり、他の 2 群と比較して有意に肝障害を抑制した。APAP 肝障害モデルに対する CoQ₁₀-MITO-Porter の用量反応性を確認するために、CoQ₁₀濃度が 0.675, 1.35, 2.7 および 5.4 mg/kg となるように投与した。その結果、CoQ₁₀濃度が増加すると ALT 値が正常化する傾向が見られ、個体値の変動も少なくなり、5.4 mg/kg が最適治療濃度であることが示唆された。以上より、APAP 肝障害への CoQ₁₀-MITO-Porter の投与により、肝障害を軽減させることに成功した。続いて、APAP 肝障害に対する CoQ₁₀-MITO-Porter の治療戦略は ROS の主要発生源である Mt への CoQ₁₀ 送達である。そこで Mt 低融合性脂質 (hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC)/cholesterol (Chol))で構成された CoQ₁₀-LP と CoQ₁₀-MITO-Porter とで治療効果を比較した。また、HeLa 細胞での細胞内動態評価で示されたように、粒子サイズの違いが肝臓および Mt 移行性に影響を与えると考えられたため、3 種類のサイズ (50 nm, 100nm および 200 nm)の CoQ₁₀-MITO-Porter を調製した。評価の結果、CoQ₁₀-MITO-Porter 組成の方が CoQ₁₀-LP 組成より有意に肝障害が軽減した。そして CoQ₁₀-MITO-Porter は粒子径が小さくなるほど、ALT 値が低下する傾向にあった。したがって、APAP 肝障害において CoQ₁₀-MITO-Porter の投与は Mt での酸化ストレスを軽減できる可能性があり、粒子サイズが小さい方が高い治療効果が得られた。

【総括】

- マイクロ流体デバイスを用いた CoQ₁₀-MITO-Porter の調製法を確立し、従来法と比較して粒子の微小化、均一性の向上および大量調製に成功した。
- 微小化した CoQ₁₀-MITO-Porter は細胞導入および Mt 移行性が増大した。
- CoQ₁₀-MITO-Porter は急性期疾患である APAP 肝障害を軽減させることができた。

本研究成果は CoQ₁₀ のような難水溶性薬物の可溶性技術への応用や従来の CoQ₁₀ 製剤では困難であった急性期疾患への適応にも期待され、Mitochondrial Nano Medicine の候補製剤になり得る。