



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_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 日比野 光恵

審査担当者	主査	准教授	山田 勇 磨
	副査	教授	菅原 満
	副査	教授	原島 秀吉
	副査	講師	佐藤 夕紀

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

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)** クラス 4 に分類される薬物は最も製剤開発が困難である。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 送達には 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が期待される。

Mt への分子送達の手法としてカチオン性脂質である **triphenylphosphonium cation (TPP)** が挙げられる。TPP に CoQ₁₀ を結合させた MitoQ は、Mt の有する負電位を利用し、静電的相互作用により Mt へ送達される。MitoQ は、前臨床試験において様々な効果が示され、C 型肝炎とパーキンソン病の治療薬として第 II 相臨床試験に到達している。しかし、MitoQ の低い経口生物学的利用率と標的組織への集積量の低さが指摘され、その後の臨床試験の続報はない。したがって体内動態を制御し、選択的オルガネラ送達を満たす、CoQ₁₀ 製剤の開発は非常に重要な課題である。Mt 標的型 **Drug Delivery System (DDS)** である MITO-Porter に CoQ₁₀ を搭載した CoQ₁₀-MITO-Porter は、エタノール (EtOH) 希釈法で調製され、予防的投与による肝虚血再灌流モデルマウスでの肝障害抑制効果を確認している。しかし CoQ₁₀-MITO-Porter の調製法には、問題点があり、調製の再現性が乏しく、大量調製が困難であった。本論文では、CoQ₁₀-MITO-Porter の臨床応用に向けた調製法のスケールアップ技術の構築と急性期疾患であり Mt 関連疾患でもある **acetaminophen (APAP)** 肝障害モデルマウスへの治療効果を検証し、静注用製剤としての有用性を確認することを目的としている。

まず筆者は CoQ₁₀-MITO-Porter の調製法のスケールアップとしてマイクロ流体デバイスの使用を試みている。マイクロ流体デバイスの調製原理は EtOH 希釈法に基づき、溶液の急速な混合および攪拌と容易に制御できる連続製造工程により、均一・微小化・大量の脂質ナノ

粒子 (lipid nanoparticle : LNP) の調製が可能である。しかしながら、マイクロ流体デバイスを用いて CoQ₁₀ ほどの BCS クラス 4 に属する難水溶性薬物を LNP に封入させ、均一かつ 100 nm 以下の微小粒子を調製し、大量調製を試みた例は少ない。EtOH 希釈法で調製した従来法 (CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]) とマイクロ流体デバイスを用いた調製法 (CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]) を比較することで、本キャリアの有用性を検証した。粒子径は CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] が 96±3.1 nm であり、CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] が 48±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) はマイクロ流体デバイスの使用により改善した。CoQ₁₀-MITO-Porter の調製におけるマイクロ流体デバイスの使用は、従来法での課題を克服し、スケールアップに成功した。子宮頸がん HeLa 細胞を用いた細胞内動態評価では、CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の方が CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]よりも有意に細胞に取り込まれ、Mt 移行性が観察された。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明らかとなった。

次に筆者は、*in vivo* 評価に適した CoQ₁₀-MITO-Porter の構築を試みている。投与容量による実験動物への負担を軽減するために Amicon® システムを用いた限外ろ過による CoQ₁₀-MITO-Porter の濃縮法の確立に成功した。*In vivo* 評価において CoQ₁₀-MITO-Porter は、尾静脈投与により肝臓への集積が確認された。そして CoQ₁₀-MITO-Porter の治療効果を検証するために APAP 肝障害モデルを用いている。APAP 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、CoQ₁₀ による酸化ストレスの軽減は有効な治療戦略となり得る。APAP 肝障害モデルに対する CoQ₁₀-MITO-Porter は、肝機能の指標である alanine transaminase (ALT) の上昇を抑制し、肝臓組織の壊死領域を縮小させ、肝障害を軽減させることが明らかとなった。本モデルマウスへの CoQ₁₀-MITO-Porter の肝障害抑制作用は、CoQ₁₀ の Mt 送達による酸化ストレスの軽減が考えられたため、筆者は、Mt 低融合性脂質で構成された 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、粒子径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 種類の粒子径 (50 nm, 100 nm および 200 nm) の CoQ₁₀-MITO-Porter を調製している。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させることを見出した。また 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 肝障害における 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、粒子径が小さい方が高い治療効果が得られることが明らかとなった。

これを要するに、筆者は、CoQ₁₀ のような難水溶性薬物の可溶化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と Mt 関連疾患への強力な治療効果を実現した。本研究により見出された新たな知見は、Mitochondrial Nano Medicine の発展に貢献することが期待される。よって筆者は、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。