HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	心筋細胞のミトコンドリアを標的としたリポソームによる薬剤送達治療に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	辻岡, 孝郎
Description	配架番号：2704
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14964号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85836
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	TSUJIOKA_Takao_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　辻岡　孝郎

学位論文題名

心筋細胞のミトコンドリアを標的としたリポソームによる薬剤送達治療に関する研究
（Studies on drug-encapsulating liposomal delivery therapy targeting myocardial mitochondria）

【背景と目的】ドラッグ・デリバリー・システムの１つであるリポソームは、心血管疾患の診断・治療技術にも応用されており、臨床応用を目指して様々な前臨床試験が行われている。北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室の Yamada らは、独自のリポソームを開発して細胞ミトコンドリアを標的とした治療について研究している。著者は、その１つである Multifunctional envelope-type nano device for pancreatic β cells（β-MEND）を利用し、抗酸化作用や心保護効果が報告されている天然ポリフェノール類のレスベラトロール（Resveratrol：RES）を封入して心筋ミトコンドリアへ送達することでミトコンドリア呼吸能を賦活できるかどうかについて検証した。

【材料と方法】β-MEND は単純水和法で調製し、Egg yolk phosphatidylcholine（EPC）、3β-[N-(N’,N’-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol（DC-Chol）、Sphingomyelin（SM）という３種類の脂質を４:３:３のモル比率でガラス管内に混合し、さらに RES も添加し、溶媒を除去して形成される脂質膜を、2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid（HEPES）の緩衝液で水和することで得られた。心筋細胞モデルには、ラット心筋芽細胞である H9c2 細胞を使用した。β-MEND の細胞内取込みについては、蛍光染色したβ-MEND を H9c2 細胞と共培養した後に回収して、Fluorescence-activated cell sorter（FACS）で検証し、蛍光強度と細胞数の積分値である Mean fluorescent intensity（MFI）として計測した。細胞内に取込まれたβ-MEND の細胞内局在を確認するためにミトコンドリアへの染色も追加して、共焦点レーザー走査型顕微鏡（Confocal laser scanning microscope：CLSM）で観察した。β-MEND の細胞毒性については Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を用いて検証することとし、様々な濃度のβ-MEND と共培養後の細胞に同試薬を添加し、その後 440 nm と 650 nm の吸光度の差を細胞生存能として計測した。β-MEND 投与による細胞ミトコンドリア呼吸能の変化については、細胞をβ-MEND と共培養した後に、Seahorse XF HS Mini Analyzer で酸素消

費量（Oxygen consumption rate：OCR）を計測した。

【結果】以下、数値をすべて平均 ± 標準偏差で表す。RES を封入したβ-MEND（β-MEND（RES））を単純水和法で調製したところ、粒子径 79.7 ± 10.2 nm、ゼータ電位 37.7 ± 8.6 mV と、100 nm 未満の安定した粒子径で表面が正に帯電していた。FACS で計測した MFI は、未処理群が 36,426.55 ± 1,626.27 だったのに対し、β-MEND（RES）投与群では 2,273,007.42 ± 730,514.48 と有意に上昇していた（$p < 0.01$）。CLSM での観察では、細胞内に取込まれたβ-MEND（RES）の一部がミトコンドリアと共局在していることを確認できた。β-MEND（RES）の細胞毒性については、未処理群やリポソームに封入しなかった RES のみ（naked RES）を投与した群と比較して、RES 相当で 5、10、20、30 μM の濃度では、試薬添加後の吸光度は有意に低下せず、β-MEND（RES）によって細胞生存能は有意に低下しないと解釈できた。以上までのβ-MEND の物性、細胞内取込み、ミトコンドリアとの共局在、細胞毒性については、β-MEND（RES）だけでなく、RES を封入していないβ-MEND（Empty β-MEND）でも同等の結果が得られ、両者の間で有意差は見られなかった。ミトコンドリア呼吸能の指標である OCR については、未処理群や naked RES 群と比較してβ-MEND（RES）群では、基礎呼吸能（Basal respiration）は 114.1 ± 21.0% of Control と有意な上昇を認めなかったが、最大呼吸能を表す Maximal respiration や Spare respiratory capacity はそれぞれ 233.6 ± 43.9% of Control、390.6 ± 83.8% of Control と有意に上昇した（$p < 0.01$）。

【考察】β-MEND は、心筋細胞内に効率的に取り込まれた後にミトコンドリアまで到達し、封入していた RES がミトコンドリア呼吸能を賦活化した。また、細胞毒性を認めなかった。その分子学的な作用機序としては、サーチュイン 3 の活性化による ATP 合成酵素やカルジオリピンの機能向上などが知られている。Seahorse XF Analyzer シリーズでの検討で、基礎呼吸能は変化せず最大呼吸能だけが上昇したという現象についてもいくつか報告があるが、その機序ははっきりしていない。最大呼吸能の上昇は、その細胞がストレスに晒された際に産生できるエネルギーの予備能を示していると報告されており、ミトコンドリア呼吸能を予め強化しておくことで、様々な病態による細胞傷害を軽減しうる可能性が考えられた。

【結語】本論文は、心筋細胞のミトコンドリアを標的とした独自のリポソームを利用して、内部に封入した RES をミトコンドリアまで送達することでその呼吸能が賦活されることを Seahorse XF Analyzer シリーズで検証した、初めての報告である。臨床応用に向けて、検討しなければならない課題は多々あるが、本薬剤は、心筋を治療しうる新規のリポソーム製剤の候補となり得る。