



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ベルベリン搭載脂質ナノ粒子によるミトコンドリア機能向上と神経内局在制御 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	堀, 生実
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15319号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89772">https://hdl.handle.net/2115/89772</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Ikuma_Hori_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(薬科学) 氏名 堀 生実

### 学位論文題名

ベルベリン搭載脂質ナノ粒子によるミトコンドリア機能向上と神経内局在制御

神経細胞において、タンパク質やオルガネラなどの生合成・分解は主に細胞体で行われている。そのため、細胞体から非常に遠く離れた軸索末端における恒常性を維持するために、細胞体との双方向の物質輸送が必要となる。この機構は軸索輸送と呼ばれ、主にミトコンドリアが産生した ATP を駆動力としている。近年、ミトコンドリア軸索輸送の破綻は、軸索末端におけるミトコンドリアの質の低下が原因となり、軸索内におけるエネルギー恒常性の崩壊が引きこされる事が報告されている。そのため、ミトコンドリア軸索輸送の破綻が、神経変性疾患を発症する初期現象であると報告されており、ミトコンドリア軸索輸送の調節を標的とした疾患治療が期待されている。これまでに神経変性疾患治療として、血液脳関門を突破するために様々な戦略を用いた研究が進められている。しかし、治療分子の神経やオルガネラに対する局在やそれによる薬理作用への影響が明らかとされていないことが問題として挙げられる。神経変性疾患治療を実現するためには、治療分子を神経細胞やオルガネラへ局所的に送達するシステムが必要不可欠である。

北海道大学大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室（以下、当研究室と略す）では、ミトコンドリア標的型 DDS (Drug Delivery System) として『膜融合を介してミトコンドリアへの分子送達を可能とするリポソーム』、MITO-Porter を開発しており、タンパク質や低分子のミトコンドリア送達を示している。本研究では、ベルベリン (BBR) 搭載 MITO-Porter を構築し、BBR をミトコンドリアに送達し、ミトコンドリアへの BBR 送達検証、機能評価を行うことを目的とした。さらに、初代培養神経細胞を用いて、新たに軸索末端標的型リポソームを構築し、ミトコンドリアへ作用する BBR を局所的に送達することにより、局所的薬物送達と薬理作用の関連性を検証した。

はじめに、BBR 搭載 MITO-Porter を構築するために、薄層水和法により粒子調製を行った。その結果、約 100 nm で正の電位を示す粒子の調製に成功した。次に、MITO-Porter を用いた細胞内ミトコンドリアへの BBR 送達を検証するため、BBR の細胞及びミトコンドリアへの送達の検証を行った。その結果、MITO-Porter を用いることで効率的にミトコンドリアへ BBR を送達できることを確認した。BBR はミトコンドリアに作用し、低刺激ミトコンドリアストレス反応の誘発により、ミトコンドリア機能を向上させる。そこで、BBR 送達によるミトコンドリア機能評価を行うため、神経芽細胞・Neuro2a 細胞へのサンプル添加 4 時間後における細胞内 ATP 産生量を ATP assay kit により評価した。BBR 搭載 MITO-Porter は、未処理、BBR 又は未封入 MITO-Porter と比較し細胞内 ATP 産生量を有意に増

加させた。ミトコンドリアはマイトファージによって損傷したミトコンドリアタンパク質又はミトコンドリアネットワークの一部を排除し、生合成を通じてタンパク質と脂質を新規合成し、集合的なミトコンドリアターンオーバーによる品質管理により質を維持している。そこで、Neuro2a 細胞へのサンプル添加 24 時間後におけるミトコンドリア品質管理に関与しているミトコンドリアユビキチンリガーゼ (MITOL) の発現量を qRT-PCR により評価した。その結果、BBR 搭載 MITO-Porter は、未封入 MITO-Porter と比較し MITOL 発現量を有意に増加させることが確認された。

初代培養神経細胞に対して MITO-Porter の細胞内局在を検証するため、MITO-Porter 添加 2 時間後における細胞内局在は共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。顕微鏡観察の結果、MITO-Porter は初代培養神経細胞の細胞体に多く粒子が局在している様子が観察された。また、MITO-Porter は初代培養神経細胞の軸索末端にほとんど局在しない様子が観察された。そこで、軸索末端に対して効率的な薬物送達を行うために、軸索末端標的ペプチドをリポソームに修飾することで軸索末端局所的な薬物送達できる可能性があるか評価した。これまで軸索末端に結合することが報告されているタンパク質をもとに選定したペプチドを修飾した軸索末端標的型リポソームを構築するために、薄層水相法により粒子調製を行った。その結果、約 100 nm で中性の電位を示す粒子調製に成功した。次に、初代培養神経細胞を用いた、共焦点レーザー走査型顕微鏡による軸索末端標的型リポソームの細胞内局在を観察した。顕微鏡観察の結果、軸索末端標的型リポソームは MITO-Porter と異なり、軸索末端において多く粒子が局在している様子が観察された。

初代培養神経細胞を用いて局所的薬物送達と薬理作用の関係を明らかにするため、MITO-Porter と軸索末端標的型リポソームを用いた BBR の局所的な送達による神経機能への影響を検証した。はじめに、サンプル添加 2 時間後におけるミトコンドリア軸索輸送を共焦点レーザー走査型顕微鏡によりタイムラプス観察した。ミトコンドリア軸索輸送評価の結果、BBR 搭載 MITO-Porter はミトコンドリア軸索輸送を未処理と比較して 40%程度低下させた。一方、BBR 搭載軸索末端標的型リポソームはミトコンドリア軸索輸送を変化させず、未処理と同程度のミトコンドリア軸索輸送を維持していることが示された。さらに、ミトコンドリア軸索輸送の内軸索末端への輸送を示す順行性輸送の割合を定量化した結果、BBR 搭載軸索末端標的型リポソームは BBR 搭載 MITO-Porter と比較して 40%程度増加させた。次に、サンプル添加直後、24 時間後における軸索長は多色蛍光タイムラプス顕微鏡を用いて観察した。軸索長評価の結果、BBR 搭載軸索末端標的型リポソームは BBR と BBR 搭載 MITO-Porter と比較して、軸索退縮を抑制することが示された。

本研究では、MITO-Porter を用いて効率的にミトコンドリアへ BBR を送達し、細胞内 ATP 産生量増加、MITOL 発現量増加によるミトコンドリア機能向上を実現した。さらに、初代培養神経細胞に BBR を搭載した軸索末端標的型リポソームを軸索末端局所的に送達し、ミトコンドリア順行性輸送の増加、軸索退縮の抑制による神経機能への影響を示すことに初めて成功した。