



| | |
|---------------------|---|
| 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 | https://hdl.handle.net/2115/89772 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Ikuma_Hori_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(薬科学) 氏名 堀 生実

| | | | |
|-------|----|-----|---------|
| 審査担当者 | 主査 | 教授 | 原 島 秀 吉 |
| | 副査 | 講師 | 米 田 宏 |
| | 副査 | 教授 | 中 川 真 一 |
| | 副査 | 准教授 | 山 田 勇 磨 |

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

博士学位論文審査等の結果について(報告)

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。しかしながら、治療分子の神経細胞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。

学位論文審査対象者が所属する北海道大学大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室では、ミトコンドリア標的型 Drug Delivery System (DDS)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 (LP)』、MITO-Porter を開発しており、様々な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、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ている。さらに、軸索末端標的型 LP を構築し、局所的な薬物送達と薬理作用の関連性も検証している。

第一章では、BBR 搭載 MITO-Porter を構築し、MITO-Porter を用いた細胞内ミトコンドリアへの BBR 送達を検証した。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 細胞へサンプル添加し、その後に細胞内 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。さらに、BBR 搭載 MITO-Porter は、未封入 MITO-Porter と比較し、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)発現量を有意に増加させた。

第二章では、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 添加後の細胞内局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いて観察した。その結果、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 LP 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 LP を構築した。次に、初代培養神経細胞を用いた、CLSM による軸索末端標的型 LP の細胞内局在を観察した。その結果、軸索末端標的型 LP 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。

第三章では、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 LP 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。サンプル添加後のミトコンドリア軸索輸送を CLSM によりタイムラプス観察した。その結果、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 LP 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 LP は BBR 搭載 MITO-Porter と比較して 40%程度順行性輸送を増加させた。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。その結果、BBR 搭載軸索末端標的型 LP 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成功した。本研究により見出された新たな知見は、神経細胞におけるミトコンドリアを標的とした新規の治療方法の開発に貢献することが期待される。よって学位論文審査対象者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。