



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 [全文の要約]
Author(s)	堀, 生実
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/89872
Type	doctoral thesis
File Information	Ikuma_Hori_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

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

脳神経細胞は細胞体、樹状突起と軸索から構成されている。神経細胞において、たんぱく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、順行性・逆行性輸送からなり、主にミトコンドリアが産生した ATP を駆動力としている。順行性輸送により、細胞体で生合成された健康なミトコンドリアは軸索末端に送られ、生存に必須な ATP 供給を補充している。一方、逆行性輸送により、損傷した機能不全のミトコンドリアは細胞体に送られ、排除されている。このように、軸索輸送によるミトコンドリアの品質管理が正常に行われることは、神経細胞のエネルギー恒常性において非常に重要である。これまでに、ミトコンドリア軸索輸送の破綻は、順行性輸送低下に伴う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、ミトコンドリアの軸索輸送の破綻が、神経変性疾患を発症する初期現象として考えられている。従って、薬物処理による細胞全体的なミトコンドリアへのストレス刺激は、順行性輸送を介した健康なミトコンドリアの軸索末端への輸送を低下させ、軸索末端におけるミトコンドリアの質が低下すると考えられる。一方、局所的な薬物処理による軸索末端でのミトコンドリアへのストレス刺激は、順行性輸送を介して健康なミトコンドリアを軸索末端へ活発に輸送し、軸索末端におけるミトコンドリアの質を維持できると考えた。この仮説を検証するために、局所的な軸索末端への薬物送達技術の開発を試みた。

当研究室ではミトコンドリアへの様々な種類の分子を送達する技術として、ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子 (Lipid nanoparticle (LNP))である MITO-Porter の開発に成功している。本研究では、神経保護作用を示すイソキノリンアルカロイドであるベルベリン (BBR)を LNP に封入し、細胞内局在制御による、ミトコンドリア機能を向上させることを目的とした。初めに、薄層水和法にて調製した BBR 封入 MITO-Porter (MITO-Porter (BBR))の細胞及びミトコンドリア内における集積量を評価した。次に、BBR 処理によるミトコンドリア機能向上の指標として細胞内 ATP 量を評価した。さらに、軸索末端を標的としたペプチド修飾 LNP を調製し、細胞内局在制御を試みた。最後に、軸索末端におけるミトコンドリア動態及び軸索長変化を指標として、製剤の有用性を評価した。

BBR はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I に作用し、薬理効果を発揮することが報告されている。しかし、BBR は核や細胞質など、ミトコンドリア以外に局在していることが確認されている。そのため、BBR のミトコンドリアへの集積量増加は、薬理効果増強において重要であるが、ミトコンドリアへの効率的な送達による薬理効果の変化に関する報告はない。そこで、BBR のミトコンドリアへの効率的な送達を可能にする、MITO-Porter を用いた薬物送達システムの利用が有用であると考えられた。初めに、薄層水和法を用いて MITO-Porter (BBR)の調製を試みたところ、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 (BBR)を用いた BBR の細胞への集積量を評価した。BBR の細胞への集積量は吸光度法を用いて評価した。BBR の集積量は未処理と比較して、Naked BBR と MITO-Porter (BBR) 処理において同程度増加することが示された。さらに、細胞よりミトコンドリアを単離し、BBR のミトコンドリアへの集積量を評価した。BBR の集積量は未処理と Naked BBR 処理と比較して、MITO-Porter (BBR) 処理において増加することが示された。以上のことより、MITO-Porter システムの利用は、BBR をミトコン

ドリアに効率的に送達するうえで有用であると示された。

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と報告されている。そこで、MITO-Porter (BBR)処理による、BBR の集積量増加による薬理効果は、ATP assay kit を用いた、神経細胞の生存に必須な ATP 産生量をもとに評価した。細胞内 ATP 産生量は、MITO-Porter (BBR)処理においてのみ、他の群と比較して増加することが示された。この結果は、ATP 産生量が低酸素条件下において単離されたミトコンドリアで増加することと一致している。以上のことから、MITO-Porter (BBR)処理は、低刺激ミトコンドリアストレス反応を誘発後、ミトコンドリア機能を向上させ、細胞内 ATP 産生量を増加させている可能性があるとし唆された。

MITO-Porter は細胞及びミトコンドリアへの効率的な薬物送達を行うために、ペプチドとしてオクタアルギニン (R8)を用いた。しかし、初代培養神経細胞において、MITO-Porter は主に細胞体に局在することが確認された。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 LNP に修飾することで細胞内局在制御できる可能性があるか評価した。初めに、これまで軸索末端に結合することが報告されているたんぱく質をもとに、4 種類のペプチド候補を選定した。選定したペプチドを LNP に修飾し、調製したところ約 100~300 nm で正または中性の電位を示す粒子調製に成功した。次に、調製した粒子を用いて神経細胞における細胞取り込みをフローサイトメーターにより評価した。細胞取り込み評価より、MITO-Porter と同程度の取り込みを示す軸索末端標的ペプチド修飾 LNP が確認された。このペプチドは軸索末端に結合するニューレキシン結合配列の類似体 (Neurexin binding site (NBS))である。そこで、初代培養神経細胞を用いた、共焦点顕微鏡による細胞内局在を評価した。細胞体または軸索末端における粒子解析により、NBS-LNP は MITO-Porter と異なり、軸索末端において多く取り込まれていることが示された。そのため、軸索末端における薬物送達において NBS-LNP の利用が、有用であると示唆された。

MITO-Porter (BBR)と BBR を封入した NBS-LNP (NBS-LNP (BBR))を用いて、神経軸索のタイムラプスイメージングにより、軸索ミトコンドリア動態評価をした。NBS-LNP (BBR)処理は、Naked BBR と MITO-Porter (BBR)と比較して、軸索ミトコンドリアの動態を変化させなかった。さらに、NBS-LNP (BBR)処理は、細胞体からの健康なミトコンドリアを輸送するための順行性輸送を増加させることが示された。これまで、局所的なエネルギー恒常性の変化は、ミトコンドリア軸索輸送を変化させることが報告されている⁷⁾。そのため、NBS-LNP (BBR)処理による、軸索末端における BBR の送達は、局所的なミトコンドリア動態の変化を引き起こした可能性があるとし唆された。

軸索の伸長には多くの ATP が必要であり、軸索末端に健康なミトコンドリアが順行性輸送により、送達されることが重要である。そのため、BBR の局在制御による、軸索ミトコンドリアの動態変化は軸索長に影響を与えようと考えられた。そこで、BBR 処理 24 時間後における、軸索長の変化を評価した。NBS-LNP (BBR)処理は、Naked BBR と MITO-Porter (BBR)と比較して、軸索退縮を防ぐことが示された。これまで、軸索ミトコンドリアの順行性輸送の増加による、軸索末端への ATP 供給の増加は、軸索再生を促進することが報告されている。そのため、NBS-LNP (BBR)処理による、軸索ミトコンドリアの順行性輸送の増加が、軸索長の変化に重要である可能性が示唆された。

最後に、神経細胞内の粒子の局在制御が薬理効果増強において重要であることを明らかにした。NBS-LNP を用いた、軸索末端への局所的な薬物送達は、ミトコンドリア動態変化と神経変性疾患の因果関係を明らかにする一助となることが期待される。