



Title	デュシェンヌ型筋ジストロフィー骨格筋・心筋細胞に対するミトコンドリア標的とした進行遅延療法についての研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐藤, 逸美
Description	配架番号 : 2829
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15895号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92074
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SATOH_Itsumi_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（医 学） 氏 名 佐藤逸美

学 位 論 文 題 名

デュシェンヌ型筋ジストロフィー骨格筋・心筋細胞に対するミトコンドリア標的とした進行遅延療法についての研究 (A Study of Mitochondria-Targeted Progression-Delaying Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy in Skeletal and Cardiac Muscle)

【背景】

近年デュシェンヌ型をはじめとする筋ジストロフィーにおいて骨格筋における発症前からのミトコンドリア機能低下や形態異常や、心機能障害の進行においてミトコンドリア機能の低下が関与していることが明らかになり、ミトコンドリアを標的とした治療が将来有望視されている。ミトコンドリアへの介入による治療の可能性についてはミトコンドリアを標的とした治療法は、ミトコンドリアへの薬物送達の難しさから治療介入としての報告は少なく今後の開発が望まれる。

北海道薬学部薬剤分子設計学研究室山田勇磨教授らが開発したミトコンドリアへの薬物送達を可能とした脂質ナノ粒子である **MITO-Porter** は膜融合を介してミトコンドリアへ難水溶性の薬物も含め送達することが可能であり、すでに肝細胞送達による肝機能改善などが報告されている。上記より、ミトコンドリアの薬物送達が可能である脂質ナノ粒子 **MITO-Porter** にミトコンドリア活性化物質を骨格筋細胞や心筋細胞へ送達することでミトコンドリア機能を向上させ、エネルギー産生能上昇による細胞の活性化と細胞活性化による進行遅延抑制が出来ないかと考えた。

【目的】

本研究においては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー骨格筋、心筋におけるミトコンドリア機能低下に着目した。ミトコンドリアへの薬物送達を可能とした脂質ナノ粒子 **MITO-Porter** を用いて電子伝達系の補酵素でありミトコンドリア活性化物質であるコエンザイム **Q₁₀** (**CoQ₁₀**) をミトコンドリアへ直接送達することによりミトコンドリア機能の活性化を試みミトコンドリアへの治療介入の可能性について検討した。

【方法と結果】

モデル標的細胞として正常ラット骨格筋細胞(**L6**)、正常ラット心筋細胞 (**H9C2**) ,東京大学農学部獣医生理学研究室から委譲された **DMD** モデルラットから単離した骨格筋細胞を使用した。ミトコンドリアへの薬物送達のためのナノキャリアとして **MITO-Porter** を用いた。送達する薬物は **CoQ₁₀** を用いた。**CoQ₁₀** は、呼吸鎖複合体による **ATP** 産生や抗酸化活性など、ミトコンドリアにおいて多様な役割を果たしている。そのため、**CoQ₁₀** はミトコンドリアの機能障害に対して治療効果を発揮する可能性があるが、水に溶けないためそのまま投与するだけではミトコンドリアへ送達が困難であり治療効果を発揮することができない。蛍光標識した **MITO-Porter** を各細胞に添加し、フローサイトメーターを用いて細胞内ナノキャリアの蛍光量を測定し、**MITO-Porter** の細胞内取り込みを確認した。レーザー走査顕微鏡を用いて、**MITO-Porter** がミトコンドリアと共局在していることを確認した。細胞外フラックスアナライザーを用いて、**MITO-Porter**(**CoQ₁₀**)添加後の酸素消費率 (**OCR**) を測定することにより、ミトコンドリアの呼吸能力を評価し、**L6,H9C2,DMD** 骨格筋細胞においてミトコンドリア呼吸能上昇を得た。また、**L6** において **CoQ₁₀** 送達により活性化される代謝経路を特定するためメタボローム解析を行い **TCA** サイクルや抗酸化関連経路の活性化を認めた。

【考察】

本研究においては DMD モデルラット骨格筋から単離培養した細胞においてミトコンドリア呼吸能の低下を認めた。mdx マウス骨格筋におけるミトコンドリア機能低下の既報はあるが、今回使用したモデルラット骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能低下と DMD モデルラット骨格筋細胞への CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能の改善は本研究で初めて示した。

MITO-Porter は今まで骨格筋細胞や心筋細胞への使用歴がなく使用による薬物送達の可否や条件検討を要したが骨格筋細胞、心筋細胞への MITO-Porter を用いたミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達が可能であることを確認し、ミトコンドリア呼吸能の上昇が示唆された。本研究においては MITO-Porter 自体のミトコンドリア機能への影響を検討するため薬剤を内封しない Empty-MITO-Porter と比較を行い CoQ₁₀ 送達群の方が各細胞においてミトコンドリア呼吸能が上昇することを示したことから、MITO-Porter 自体ではなく送達した CoQ₁₀ による効果と考える。また、ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達の効果について L6 でのメタボローム解析の結果からミトコンドリアにおけるエネルギー産生能のみでなく、抗酸化効果による細胞の活性化も寄与していると考ええる。

DMD 骨格筋における病初期からのミトコンドリア機能低下や DMD 心筋症の進行とミトコンドリア機能の関連性は既報があるがそのどちらも治療介入についての報告は乏しい。

In vitro ではあるが骨格筋細胞、心筋細胞ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達によりミトコンドリア呼吸能の上昇が得られたことは、DMD 骨格筋障害、心筋症におけるミトコンドリア機能改善による進行遅延療法の一助になる可能性がある。今後、DMD 心筋細胞や動物実験でのミトコンドリアへの薬物送達による治療介入を検討したい。

【結論】

正常ラット骨格筋細胞(L6)においてミトコンドリアへの薬物送達を可能にした脂質ナノ粒子である MITO-Porter を用いてミトコンドリア活性化物質であるコエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) を骨格筋細胞ミトコンドリアへ送達しミトコンドリア呼吸能の上昇を示した。また CoQ₁₀ が影響する代謝経路を調べるためメタボローム解析を行い、TCA サイクルおよび抗酸化関連経路の活性化を確認した。

ラット正常心筋細胞(H9C2)において脂質ナノ粒子である MITO-Porter を用いてミトコンドリア活性化物質である CoQ₁₀ を骨格筋細胞ミトコンドリアへ送達しミトコンドリア呼吸能の上昇を示した。また CoQ₁₀ の至適送達量についても検討しミトコンドリア呼吸能は添加量に関連した上昇傾向を示した。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)モデルラットから単離培養した骨格筋細胞のミトコンドリア呼吸能低下を示し、DMD モデルラット骨格筋細胞ミトコンドリアに CoQ₁₀ を送達し、DMD 骨格筋細胞のミトコンドリア呼吸能改善を示した。

本研究では現在治療法が確立されていない DMD におけるミトコンドリア機能低下に着目し、ミトコンドリア活性化による DMD の進行抑制療法の可能性について検討した。骨格筋、心筋ミトコンドリアへの介入の可能性検討のため、正常骨格筋細胞、心筋細胞においてミトコンドリアへの薬物送達を行いミトコンドリア呼吸能が上昇することを示した。DMD モデルラットから単離培養した骨格筋細胞を用いて、In vitro における DMD 骨格筋細胞のミトコンドリア機能低下を示し、ミトコンドリアへの薬物送達によるミトコンドリア呼吸能の改善を示唆した。

DMD は遺伝疾患であり根治治療は遺伝子治療が主となると考えるがミトコンドリアへの介入を含めた進行遅延療法を遺伝子治療と組み合わせて実施することは患者の生命予後、QOL 改善に大きく貢献すると考え今後も本研究をさらに発展させたい所存である。