



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_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（医 学） 氏 名 佐藤逸美

主査 大場 雄介 教授
審査担当者 副査 野田 展生 教授
副査 岩崎 倫政 教授

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)

申請者は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の骨格筋より単離した細胞に、ミトコンドリアへの薬物送達に特化したナノ粒子である MITO-Porter にミトコンドリア電子伝達系呼吸鎖複合体の補酵素コエンザイム Q₁₀ を内包した MITO-Porter (CoQ₁₀) を用いることで、DMD 骨格筋のミトコンドリア呼吸能が上昇することを示した。また、MITO-Porter (CoQ₁₀) を作用させたラット骨格筋由来筋芽細胞（L6）およびラット心筋由来筋芽細胞（H9C2）に対するメタボローム解析を行い、作用機序の探索、特に脂質量や薬物送達量について検討を行った。

審査にあたり、まず副査の岩崎倫政教授より、*in vivo* の実験にあたり DMD は骨格筋症状の強い疾患であるため、治療効果を *in vivo* で示すのは難しいのではないかと、DMD 以外の重症度が高くない疾患を *in vivo* のモデルとして選択するほうが適切ではないかと、との質問がなされた。申請者は、DMD 以外の筋変性疾患のモデルとして加齢モデルや外傷後モデルが候補となるが、先天性筋疾患のモデル動物としては mdx マウスなど DMD のモデル動物が最も入手しやすいと回答した。また、DMD は進行性の疾患であり、一度線維化した骨格筋が元通りに治癒することは難しいため、予防的投与による進行の遅延を目指していると回答した。さらに岩崎教授より、*in vivo* における予防効果を検証するのであれば、正常動物に MITO-Porter (CoQ₁₀) を投与した後に筋障害を生じさせ、その障害の程度や回復過程の違いを検証するとよいのではないかと指摘があった。次いで薬物送達による介入により骨格筋ミトコンドリア機能が上昇したというヒトなどでの先行報告の有無についての質問があった。申請者は、*in vivo* では抗酸化効果をもつ薬物であるレスベラトロールの内服によってミトコンドリア機能が上昇したとの既報があるものの、レスベラトロールがミトコンドリアへ送達されたことは示されていなかったと回答した。さらに、ヒトにおいては運動習慣の有無によってミトコンドリア機能に相違があるという既報があるが、ミトコンドリアへの直接的な薬物送達によって介入したという報告は極少数であると回答した。

続いて、副査の野田展生教授より、共焦点レーザー顕微鏡によるナノ粒子とミトコンドリアの共局在について、粒子に蛍光色素をつけているためミトコンドリアの膜に蛍光色素が接着してしまい CoQ₁₀ 自体がミトコンドリア内膜まで達しているかどうかは判断できないのではないかと

う指摘がなされた。また、細胞内に取り込まれた粒子のうちどの程度がミトコンドリアへ送達されたかを定量的に評価したかという質問があった。申請者は、指摘について同意した上で、現時点で CoQ₁₀ 自体を蛍光標識して追跡する技術がないため、ミトコンドリアに MITO-Porter を標識した蛍光色素が存在することをもって、CoQ₁₀ がミトコンドリアへ送達していると判断していると回答した。また、DMD 骨格筋でのミトコンドリア到達率は定量していないが、HeLa 細胞においては MITO-Porter の約 3 割がミトコンドリアに到達したという既報があると回答した。さらに、粒子が細胞内に入りさえすれば、拡散などにより非特異的にミトコンドリアに到達している可能性についての指摘がなされ、対照実験として細胞内には入るがミトコンドリア指向性を持たない粒子を用いた実験を行ったかの質問がなされた。申請者は、L6 細胞での取り込み評価においては、ミトコンドリア指向性に重要な正電荷を欠失した粒子の細胞取り込み量とミトコンドリア送達量を定量したと回答した。

次に主査の大場雄介教授より、DMD においてミトコンドリア機能低下がどれくらい病因や症状に関与しているかという質問がなされた。申請者は、ミトコンドリア機能が低下しているという多くの報告があるものの、ミトコンドリア機能低下が疾患の病勢や病因に寄与しているかについては既報がなく、二次的な異常である可能性もあると回答した。さらに *in vitro* における CoQ₁₀ 送達による作用持続時間がどれくらいか、野生型と比較してどの程度まで酸素消費速度が改善したのかという質問があった。これに対し申請者は、*in vitro* における効果持続時間の検討は今後行いたいと考えているが、現時点では酸素消費速度の上昇は投与 6 時間以降から見られ、24 時間まで持続していることは確認していると回答した。また、野生型の骨格筋の酸素消費速度との比較は現在検討中だが、およそ 7 割程度まで改善しているという予備実験結果がと回答した。おって、MITO-Porter (CoQ₁₀) のミトコンドリア呼吸能上昇以外の作用を検討するために、細胞の生存率や死細胞数などを評価することにより、今後の検討に深みが出るのではないかと指摘があった。さらに静脈投与など全身投与を行うにあたり、骨格筋特異抗体を用いたターゲティングについても言及があった。最後に H9C2 細胞に対する MITO-Porter (CoQ₁₀) 投与量に関して、投与量の増加に伴う酸素消費速度上昇は本研究内で実施した投与量に局限した結果であり、どこまでも増加傾向がある証明にはならないとの指摘があった。申請者は、指摘の通り本研究内で実施した範囲においての結果であると修正した上で、ある投与量において効果がプラトーに達すると考えていると回答した。

この論文は、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物質である CoQ₁₀ を MITO-Porter によって DMD 骨格筋細胞ミトコンドリアへ送達することで、DMD 骨格筋細胞のミトコンドリア呼吸能を改善することをしめした。また今後、さらなる動物実験やヒトに対する臨床研究への展開も検討している。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。