

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15482

研究課題名(和文)ミトコンドリア薬剤送達技術およびミトコンドリア病に対する治療薬の開発研究

研究課題名(英文)Development of drug delivery system to mitochondria and a drug for the treatment of mitochondrial disease

研究代表者

富澤 一仁 (Tomizawa, Kazuhito)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：40274287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜透過性ミトコンドリア局在シグナルペプチドとして、Cdk5rap1のミトコンドリア局在シグナルに9個のアルギニンを付加した細胞膜透過性ペプチド(9R)を付加したペプチドを作製した。同ペプチドを初代培養心筋、骨格筋および神経細胞の培地中に添加すると、同ペプチドがミトコンドリアに局在することを確認した。このペプチドを付加したリポソームにエペリゾンを含封入することに成功した。ミトコンドリア局在シグナルペプチド付加エペリゾン封入リポソームをCdk5rap1欠損骨格筋細胞に投与すると、ミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア機能を改善することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We generated the peptides consisting of mitochondrial localizing signal peptide derived from Cdk5rap1 and poly arginine (9R). We incubated primary cultured myocardial cells, skeletal muscle cells and neurons with the peptides. The peptides were localized on mitochondria. Moreover, we generated the liposomes containing eperisone, which are conjugated with the mitochondrial signal peptide. When applied the liposomes to Cdk5rap1-deficient skeletal muscle cells, the liposomes were localized in mitochondria and mitochondrial functions such as compel activities, mitochondrial membrane potential and the translation of mitochondrial proteins were improved.

研究分野：生理学

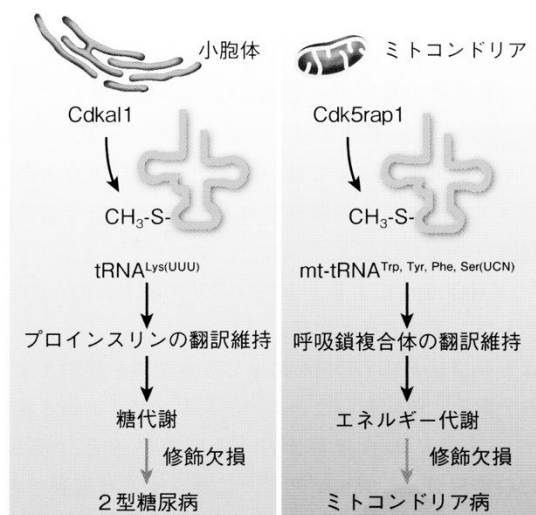
キーワード：ミトコンドリア DDS 糖尿病 ミトコンドリア病 リポソーム

1. 研究開始当初の背景

すべての生物種において tRNA は様々な化学修飾を受けている。とくにアンチコドン近傍の 37 位のアデノシン(37A)は、複雑に化学修飾されている。これまで tRNA 修飾の研究は、細菌や酵母を用いて行われていたため、ヒトにおける修飾酵素は大部分が不明であった。Cdkal1 は、アジア型 2 型糖尿病と相関のある危険因子の一つであるが、我々は同分子が細胞質 tRNA の 37A をチオメチル化する酵素であり、誤翻訳を防止していることを突き止めた〔J Biol Chem (2010) 285,28425; Clin Chem (2013) 59, 51〕。そして、Cdkal1 欠損マウスを作製し、Cdkal1 機能欠損がなぜ 2 型糖尿病を引き起こすかその分子機構を解明した(下図)〔J Clin Invest (2011) 121,3598〕。また、tRNA に結合することによりチオメチル化 tRNA と類似構造を示し、誤翻訳を防止する薬剤としてエペリゾンを見出した(PCT/JP2014/001853)。現在、同薬剤のアジア型 2 型糖尿病に対するコンパニオン診断薬医師主導臨床試験を実施している。

さらに、ミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾酵素として Cdk5rap1 を同定した。この遺伝子欠損マウスは、ミオパチーやてんかん、不整脈などミトコンドリア病患者の病態を呈し、ミトコンドリア病患者では本酵素活性が低下していることを明らかにした(下図)〔Cell Metab (2015) 21, 428〕。

これら研究成果から、エペリゾンがミトコンドリア病の根本的な治療薬になるのではとの着想に至った。しかし、同薬剤はミトコンドリア内には導入されないことが明らかになり、ミトコンドリアに導入できる薬剤送達技術の開発と同技術によりエペリゾンをミトコンドリア内で機能させる開発研究を提案するに至った。



ミトコンドリア病は、国の指定難病の一つであり根本的な治療法は無い。その原因は、ミトコンドリア病の発症機構が不明なことに起因する。ミトコンドリア病の中でも頻度が高い病型として MELAS および MERRF

がある。両病型とも、ミトコンドリア (mt) tRNA をコードする mtDNA の変異に起因する。しかしこれまで、同変異が、なぜミトコンドリア病を引き起こすのか不明であった。我々は、mtDNA に変異があると、mt-tRNA の 37 位のアデノシンがチオメチル化修飾されないことを見出した。また同修飾酵素として Cdk5rap1 を同定し、その酵素欠損マウスを作製した。このマウスは、mtDNA 由来のタンパク翻訳で誤翻訳が起こり、その結果、ミトコンドリア機能が低下し、ミオパチーやてんかん等ミトコンドリア病患者と同じ病態を示すことを明らかにした。さらに、ミトコンドリア病患者では、mtDNA の変異率および病態と mt-tRNA のチオメチル化修飾率が逆相関することを突き止めた〔Cell Metab (2015) 21, 428〕。

エペリゾン(商品名ミオナール)は、日本で開発された薬剤で筋緊張改善薬として 30 年以上使用されている。我々は、エペリゾンが細胞質 tRNA のアンチコドンループ内で 37A に結合し、37A がチオメチル化された状態と同じ立体構造を呈することを明らかにし、ドラッグリポジショニングの可能性を示した〔J Clin Invest (2011) 121,3598〕。さらに、アジア型 2 型糖尿病モデルマウスにエペリゾンを投与すると、耐糖能が改善することを見出し〔Hum Mol Genet (2014) 23, 4639〕、tRNA チオメチル化修飾をハイスループットに定量解析する技術開発に成功した〔Clin Chem (2013) 59, 51〕。そして、mt-tRNA チオメチル化修飾が低下しているアジア型 2 型糖尿病患者に対してエペリゾンが有効か検証する医師主導臨床試験を今年度より開始した。

これら従来の成果を踏まえて、本研究では、MELAS および MERRF 型ミトコンドリア病の疾患発症分子機構に基づいた同疾患治療薬開発に繋がる基礎研究を行った。未だ有効な治療法が確立していないミトコンドリア病に対する治療薬開発という困難な課題に挑戦した。

2. 研究の目的

本研究は、以下の項目を達成することを目的として実施した。

- ・エペリゾンをミトコンドリア内に導入できる薬剤送達技術を開発すること。
- ・ミトコンドリア病モデルマウスである Cdk5rap1 欠損マウスに対して、ミトコンドリア内導入エペリゾンの有効性について検討すること。

3. 研究の方法

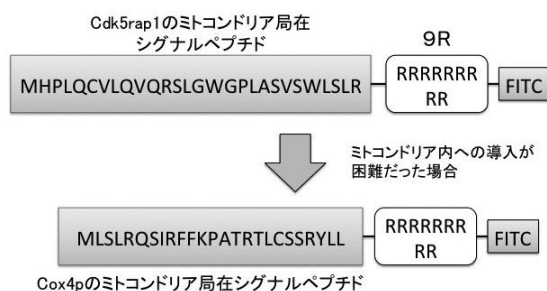
(1) ミトコンドリア内導入シグナルペプチドの開発と同ペプチドを付加したリポソームの作製

今回のエペリゾンの標的分子は Cdk5rap1 である。すなわち、エペリゾンをミトコンドリア

ア内の Cdk5rap1 近傍に送達することが重要である。そこで、まずは Cdk5rap1 のミトコンドリア局在シグナルに 9 個のアルギニンを付加した細胞膜通過性ペプチド (9R) を付加したペプチドを作製した。すでに我々は、Cdk5rap1 の N 末端に存在するミトコンドリア局在シグナルを同定している (下図) ので、同配列のペプチドに 9R および FITC を付加したペプチドを合成した。同ペプチドをマウス初代培養心筋、骨格筋および神経細胞に導入し、FITC シグナルを共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、細胞内導入効率およびミトコンドリア内への局在について検討した (下図)。

また、ミトコンドリア局在シグナルペプチドとして知られている Cox4p の N 末端アミノ酸配列を同局在シグナルペプチドとして用いて同様に実験を行った (下図)。

次に、上述のペプチドを付加したリポソームの作製を行った。リポソームへのペプチドの付加は、我々がこれまで報告した方法に準じて行った [Biomaterials (2009) 30, 1746]。具体的には、リポソーム構成脂質として、DOPC:DOPG:DOGS-NTA-Ni:CH:DSPE-PEG₂₀₀₀ を 3:3:1:4:0.1 モル比で混合し、逆相蒸発脱水法にてリポソームを作製した。一方、ペプチドの 9R の C 末端側に、6 個のヒスチジンを付加し、リポソームの表面にあるニッケル (Ni) とヒスチジンが配位結合することにより、リポソーム表面にミトコンドリアシグナルペプチドと 9R から成るペプチドが露出したペプチドを作製した。



(2) (1) で作製したペプチドを付加したリポソームへのエペリゾンの封入

(1) で作製したリポソームとエペリゾンをクロロフォルムおよびジエチルエーテル下で反応させた。反応後、超音波破壊を行い、逆相蒸発脱水法にて結晶化させた。凍結・溶解を繰り返した後、リポソームを高速液体クロマトグラフィーにより、リポソームのサイズにより分画した。直径 100nm サイズのリポソームに最も多くのエペリゾンが封入されていることが想定されるが、サイズ毎に分画されたリポソームにおけるエペリゾン含有量について、質量分析法にて確認した。最も多くエペリゾンを含むリポソームを同定した。

(3) エペリゾン封入リポソームのミトコン

ドリアへのエペリゾン導入効率の検討

Cdk5rap1 欠損マウスから心筋、骨格筋および神経細胞を取り出し、初代培養を行った。培養細胞の培地に 1、5、10 および 100 μM のエペリゾン封入リポソームを添加し、24 時間培養した。培養後、エペリゾンに予め付加していた蛍光色素 Cy5.5 シグナルについて、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、ミトコンドリア内へエペリゾンが導入されているか確認した。さらに、エペリゾンを導入することにより、Cdk5rap1 欠損細胞のミトコンドリアタンパク質の誤翻訳が抑制されるか、ミトコンドリア DNA がコードする全 13 種類のミトコンドリアタンパク質翻訳量、コンプレックス活性、ミトコンドリア膜電位、マイトファジーの形成などについて検討した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア内導入シグナルペプチドの開発と同ペプチドを付加したリポソームの作製

Cdk5rap1 のミトコンドリア局在シグナルペプチドに 9R および FITC を付加したペプチド (Cdk5rap1-9R-FITC)、ならびに Cox4 のミトコンドリア局在シグナルペプチドに 9R および FITC を付加したペプチド (Cox4-9R-FITC) の合成に成功した。精製後の純度は、95% 以上であった。

上述のペプチドをマウス胎児から単離した初代培養心筋細胞、骨格筋細胞および神経細胞の培地に最終濃度が 1 μM 、5 μM および 10 μM になるよう添加した。1 時間後、6 時間後ならびに 24 時間後に FITC シグナルについて、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、1 μM の Cdk5rap1-9R-FITC を培地に添加 1 時間後にすでに同ペプチドは細胞内に導入されることが明らかになった。しかし、ペプチドはミトコンドリアに局在しておらず、エンドソーム、細胞質、ミトコンドリアに認められた。しかし、ペプチド添加 6 時間および 24 時間後では、Cdk5rap1-9R-FITC のシグナルがミトコンドリアに局在することが明らかになった。ペプチド添加後 6 時間と 24 時間後のミトコンドリアにおける FITC シグナルについて比較したところ、6 時間後のシグナルのほうが強かった。このことから、細胞内に導入されたペプチドは、24 時間後には分解されることが示唆された。

次に、1 μM 、5 μM および 10 μM の各濃度のペプチドを添加したときの導入効率について比較検討した。すると、Cdk5rap1-9R-FITC のシグナルは、1 μM 、5 μM 、10 μM と濃度依存的に強くなることが明らかになった。

心筋細胞、骨格筋細胞ならびに神経細胞において Cdk5rap1-9R-FITC の導入効率に差があるのか検討した。いずれの細胞においても 6 時間後にはペプチドがミトコンドリアに局在していることが確認された。また、それぞれの細胞間で FITC シグナルに差は認められなかったことから、Cdk5rap1-9R-FITC は、心

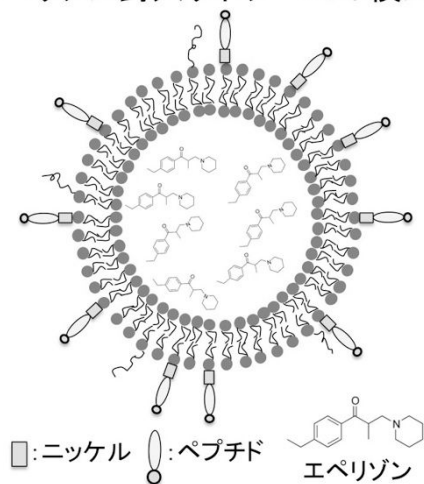
筋細胞、骨格筋細胞、神経細胞のいずれの細胞にも効率良く導入されることが明らかになった。

Cox4-9R-FITC を用いて同様の実験を行った。Cox4-9R-FITC も培地添加 6 時間後には、ミトコンドリアに局在した。また、Cdk5rap1-9R-FITC と Cox4-9R-FITC ミトコンドリア内導入効率について比較したが、両ペプチド間で有意な差は認められなかった。

(2) (1) で作製したペプチドを付加したリポソームへのエペリゾンの封入

Cdk5rap1-9R-FITC がミトコンドリアに局在することが明らかになったので、Cdk5rap1-9R-FITC の 9R の C 末端側に、6 個のヒスチジンを付加し、あらかじめニッケルを表面に配位結合させたりポソーム、さらにエペリゾンを混合し、反応させた。反応後、超音波破壊を行い、逆相蒸発脱水法にて結晶化させた。凍結・溶解を繰り返した後、エペリゾン封入リポソームを高速液体クロマトグラフィーにより、50 nm ~ 1 μm 間でリポソームを分画した。各分画におけるエペリゾン量について質量分析器で検討した。すると、100 ~ 200 nm サイズのリポソームに最もエペリゾンの含有量が高いことが明らかになった。下図の模式図のようなミトコンドリア局在シグナルペプチド付加エペリゾン封入リポソームの作成に成功した。

エペリゾン封入リポソームの模式図



(3) エペリゾン封入リポソームのミトコンドリアへのエペリゾン導入効率の検討

Cdk5rap1 欠損マウス胎児から初代培養心筋、骨格筋および神経細胞に、(2) で作製したエペリゾン封入リポソームを添加した。24 時間後に、エペリゾンに予め付加していた蛍光色素 Cy5.5 シグナルについて、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。すると、同シグナルはミトコンドリアで観察された。1 μM のリポソームではシグナルは弱かったが、10 μM のエペリゾン封入リポソームを添加すると強いシグナルが認められた。

さらに、10 μM の Cdk5rap1 エペリゾン封入

リポソームを Cdk5rap1 欠損骨格筋細胞に導入し、48 時間後に細胞を回収し、ミトコンドリアタンパク質翻訳量、コンプレックス活性、ミトコンドリア膜電位、マイトファジーの形成などについて検討した。すると、エペリゾン封入リポソームを導入した細胞では、ミトコンドリア DNA 由来のミトコンドリアタンパク質量が 1.3 ~ 2.2 倍に改善した。また、Complex I および Complex II の活性が有意に改善した。一方、Complex III の活性に変化は認めなかった。さらに、ミトコンドリア膜電位について、エペリゾン封入リポソームを添加した細胞と無添加の細胞で比較したところ、エペリゾン封入リポソームを添加した細胞ではミトコンドリア膜電位の改善が認められた。

Cdk5rap1 欠損マウスの尾静脈から 1.6mg/kg ~ 160mg/kg 量のエペリゾン封入リポソームを投与した。投与後の経時的エペリゾン体内動態について、小動物用イメージングシステムで Cy5.5 の蛍光色をイメージングすることにより検討した。心筋および骨格筋において細胞内へのエペリゾンの取り込みは認められたが、ミトコンドリアへの局在は認められなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Fakruddin M, Wei FY, Emura S, Matsuda S, Yasukawa T, Kang D, and Tomizawa K. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine modification is absent from nuclear-derived RNA species. *Nucleic Acids Res.* 45(20):11954-11961 (2017). 査読有

DOI: 10.1093/nar/gkx819.

Fakruddin M, Wei FY, Suzuki T, Asano K, Kaieda T, Omori A, Izumi R, Fujimura A, Kaitsuka T, Miyata K, Araki K, Oike Y, Scorrano L, Suzuki T, Tomizawa K. Defective mitochondrial tRNA taurine modification activates global proteostress and leads to mitochondrial disease. *Cell Rep.* 22(2):482-496 (2018). 査読有

DOI: 10.1016/j.celrep.2017.12.051.

[学会発表] (計 1 件)

Tomizawa K. Taurine-modification of mitochondrial tRNA is essential for translation and controls proteostasis network via Opa1. Cold Spring Harbor Asia "RNA modifications & Epitranscriptomics" (招待講演) (国際学会) 蘇州 (中国) 2017 年 11 月 15 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://kumamoto-physiology.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富澤 一仁 (TOMIZAWA, Kazuhito)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 40274287

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

安東由喜雄 (ANDO, Yukio)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 20253742

(4) 研究協力者

該当無し