

令和元年6月12日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20076

研究課題名(和文)ミトコンドリアの品質管理を科学するナノデバイスの開発

研究課題名(英文)Development of a nano device to investigate mitochondrial quality control

研究代表者

山田 勇磨(Yamada, Yuma)

北海道大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：60451431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞におけるマイトファジー(ミトコンドリア選択的なオートファジー)の誘導不全が進行性の神経変性疾患であるアルツハイマー病やパーキンソン病の発症原因の一部として報告されており、ミトコンドリアの品質維持と疾患解明・治療は非常にホットな研究領域として注目されている。本申請研究では、神経細胞をターゲットとし、ミトコンドリア標的型ナノデバイス(MITO-Porter)を用いたミトコンドリアへのオートファジー誘導分子の送達、ミトコンドリアを介したオートファジー誘導の検証の順に研究を進めた。研究期間内に、人工オートファジー誘導システムに関する一定の成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発を進めたミトコンドリアを標的とする人工オートファジー誘導システムは、今までにないアプローチからのミトコンドリア科学を拓き、根本的な治療が難しい進行性神経変性疾患などの疾患解明・治療に大きく貢献することが期待される。さらに、個体レベルでのミトコンドリアを介したオートファジー誘導が実現すれば新たなモデル動物の作出が可能になり、ミトコンドリアが関連する個体レベルの生命現象研究を世界に先駆けて着手することが可能になる。本申請研究で得た知見は、我が国の科学技術発展および新薬開発にも大きく貢献するが期待される。

研究成果の概要(英文)：Failure of autophagy induction results in the accumulation of abnormal mitochondria and is thought to be a contributing factor to the onset of a variety of progressive neurodegenerative diseases. Relationships between the maintenance of quality of mitochondria and the mechanism responsible for the onset of such diseases have attracted the interest of the scientific community. The aim of this study is to validate that induced autophagy can be activated by delivering autophagy inducing molecules to mitochondria. To achieve efficient mitochondrial delivery, we used a MITO-Porter, a liposome-type nanodevice for mitochondrial delivery via mitochondrial membrane fusion. Autophagy induction was confirmed in HeLa cells by the detection of an autophagy marker, resulting in a remarkable enhancement in autophagy induction caused by the mitochondrial delivery of the autophagy inducing molecules. Our findings constitute additional innovative research findings related to addressing autophagy.

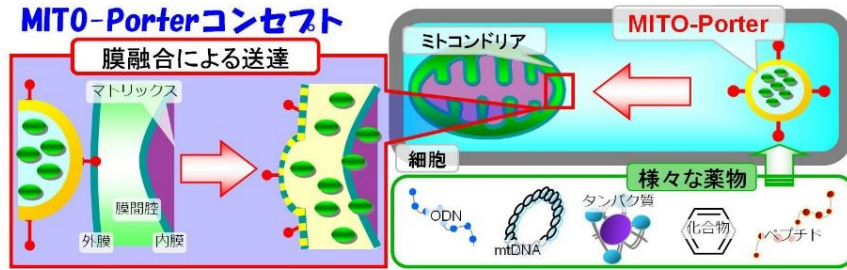
研究分野：薬物送達学

キーワード：薬物送達システム ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

2016年ノーベル生理学・医学賞に選出されたオートファジーに関連するミトコンドリアの品質管理システム、マイトファジーがミトコンドリアの新たな機能として注目を集めている。神経細胞における

オートファジーの誘導不全が進行性の神経変性疾患であるアルツハイマー病やパーキンソン病の発症原因の一部として報告されており、ミトコンドリアの品質維持と疾患解明・治療は非常にホットな研究領域として注目されていた。オートファジー誘導の分子候補は、低分子のみならずタンパク質、核酸などの高分子も想定されるが、ミトコンドリアへの分子送達が大きな障壁となっていた。申請者は、ミトコンドリア標的型ナノカプセルである MITO-Porter を開発し、送達分子の大きさ・種類を制限しないミトコンドリア送達を可能としていた (引用文献 ①, ②)。このような背景の基、申請者は、MITO-Porter システムを用いてオートファジー誘導分子を直接ミトコンドリアに作用させる人工オートファジー誘導システムに関する研究を申請するに至った。



2. 研究の目的

本申請研究では、細胞の品質管理法に学び、人工的にオートファジーを誘導するシステムを構築する。オルガネラ傷害 (膜構造傷害、機能障害、など) がオートファジーを誘起することが報告されているので、ミトコンドリア傷害分子をミトコンドリアに送達しオートファジーを誘導する戦略を検証した。具体的には、申請者が世界に先駆けて開発した生細胞ミトコンドリアへの分子送達を可能とする MITO-Porter (引用文献 ①, ②) にミトコンドリア作動性のあるオートファジー誘導分子を搭載し、ミトコンドリアにアクセスし人工的にオートファジーを誘導する戦略の検証を研究目的とした。

3. 研究の方法

本申請研究では、(1) 神経細胞を標的とするナノデバイスの構築、(2) オートファジー誘導を可能とする MITO-Porter の構築、(3) オートファジー誘導の検証、(4) オートファジー誘導に最適なミトコンドリア傷害条件の探索の順に研究を進めた。当初すべての実験を神経細胞 (SH-SY5Y 細胞) を用いて行う予定であったが、SH-SY5Y 細胞のオートファジー誘導効率が非常に低かったため、オートファジー誘導の実験からは子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) を用いた検討を中心に行うことにした。

4. 研究成果

(1) 神経細胞を標的とするナノデバイスの構築:

神経細胞 (SH-SY5Y 細胞) を用いて、細胞導入能の評価 (フローサイトメトリーの利用)、細胞内動態観察 (共焦点レーザー顕微鏡の利用) を行い、神経細胞における MITO-Porter の細胞導入能、ミトコンドリア送達能を最適化した。種々の検討を経て、ミトコンドリア融合性脂質エンベロープの表面に、HeLa 細胞において細胞導入能・ミトコンドリア移行能があることを確認しているアルギニン八重合体 (R8) およびミトコンドリア移行性 RNA アプタマーである RP アプタマー (5'-UCUCCCUGAGCUUCAGG-3') を適切に比率で修飾した Dual ligand RP/R8-MITO-Porter が最適な組成であることを見出した。



アルギニン八重合体 [R8]
細胞導入能・ミトコンドリア移行能

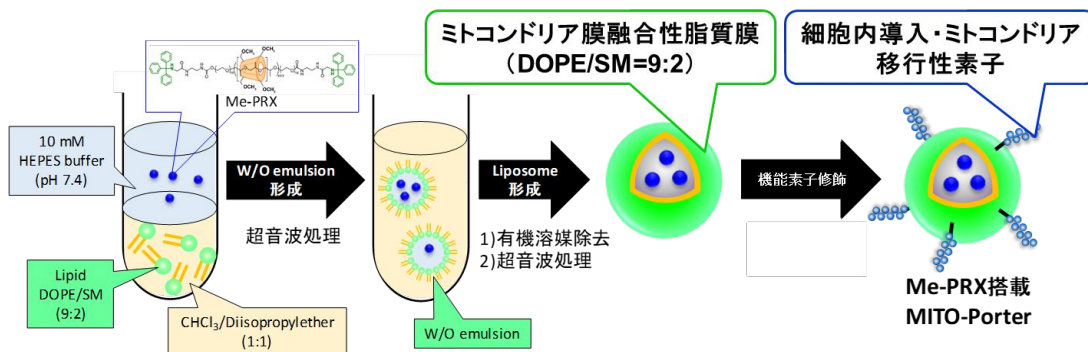
RPアプタマー
ミトコンドリア移行性RNAアプタマー

(2) オートファジー誘導を可能とする MITO-Porter の構築:

① Me-PRX のパッケージング

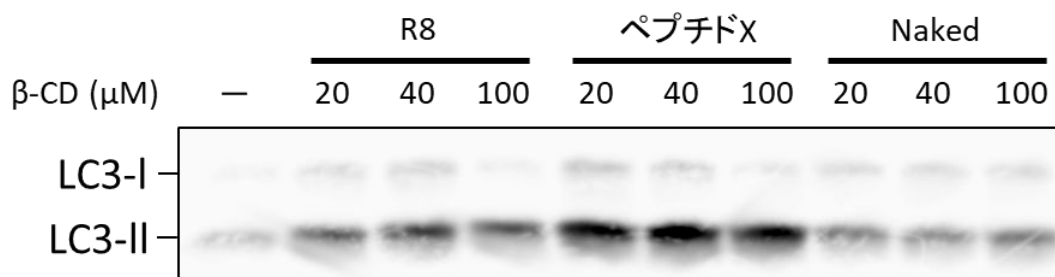
東京医科歯科大学・由井研究室で合成されたオートファジーを誘導する超分子構造ポリマー・Me- γ -CD-threaded acid-labile polyrotaxane (Me-PRX) (引用文献 ③) をオートファジー誘導分子として選択し、MITO-Porter への封入を検討した。種々の検討を経て PRX を搭載した MITO-Porter を Reverse phase Evaporation Vesicle (REV) 法を用いて調製する事に成功した (下

図)。調製したリポソームに対して細胞導入能・ミトコンドリア移行能を有するペプチド R8 または新規ペプチド X を修飾した。調製した PRX 搭載 MITO-Porter は正電荷を帯びた約 100 nm の粒子が形成された。

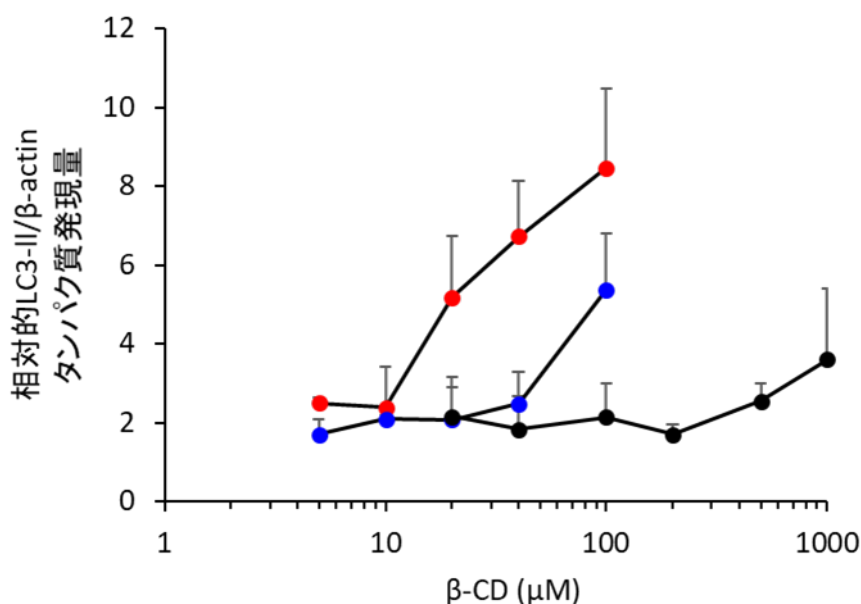


② ウェスタンブロッティング法によるオートファジー誘導評価

オートファジー誘導を HeLa 細胞を用いてウェスタンブロッティングにより評価した。無血清状態は細胞に対して飢餓応答オートファジーを誘導するため、本実験では MITO-Porter を血清存在下で細胞に作用させた。ウェスタンブロッティングではオートファジーマーカータンパク質 LC3-II を指標にした。その結果、新規ペプチド X を修飾した X-MITO-Porter を用いた際に LC3-II の発現が上昇し、オートファジーが誘導されたことを確認した (下図)。また、R8 - MITO-Porter ではバンド強度は弱く、PRX 単体を同じ濃度で作用させた際には、LC3-II の発現量に変化は観察されなかった。

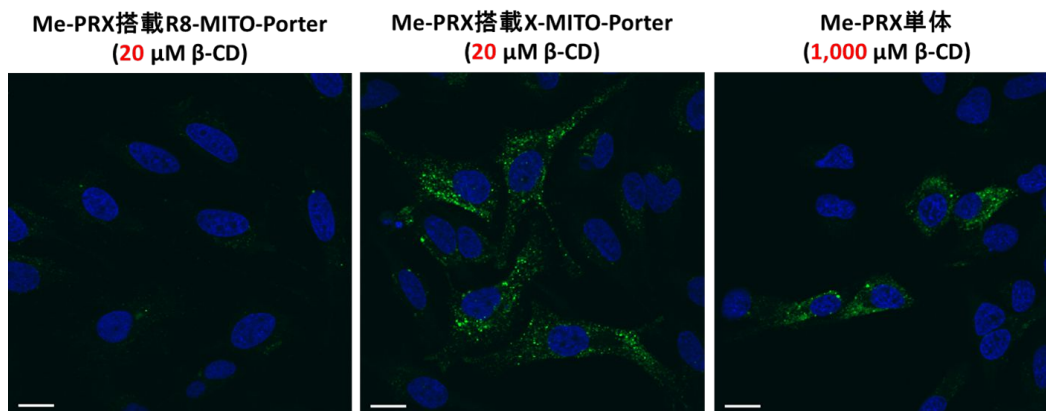


さらに、画像解析ソフト・ImageJ を用いて LC3-II のバンド強度を定量した (下図)。その結果、黒丸の PRX 単体では 1,000 μM から LC3-II の発現が上昇し始めるのに対し、赤丸の X-MITO-Porter を用いた場合においては 20 μM から LC3-II の発現が上昇し、X-MITO-Porter によってオートファジーが効率的に誘導されることが示された。



(3) オートファジー誘導の検証:

さらにオートファゴソームの形成を確認するため、Cyto-ID Autophagy Detection Kit によってオートファゴソームを染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。その結果、PRX 搭載 X-MITO-Porter においてオートファゴソームを示す緑の蛍光量が増大している様子が観察され、オートファジー誘導に伴って細胞内のオートファゴソーム形成が亢進していることが示された。



(4) オートファジー誘導に最適なミトコンドリア傷害条件の探索:

MITO-Porter を用いたオートファジー誘導時 (LC3-II タンパク質検出時) のミトコンドリア傷害の度合いを測定した。また、ミトコンドリア傷害および他のオルガネラ機能についても評価し、ミトコンドリア標的型ナノデバイスを用いて調節し、オートファジー誘導に最適なミトコンドリア傷害の条件を見出した。

本研究で開発する『ミトコンドリアを標的とするオートファジー誘導システム』は、今までにないアプローチからのミトコンドリア科学を拓き、根本的な治療が難しい進行性神経変性疾患などの疾患解明・治療に大きく貢献する事が期待される。

< 引用文献 >

- Yamada Y, Akita H, Kamiya H, Kogure K, Yamamoto T, Shinohara Y, Yamashita K, Kobayashi H, Kikuchi H, Harashima H. MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*. 1778:423-432 (2008).
- Yamada Y, Harashima H. MITO-Porter for Mitochondrial Delivery and Mitochondrial Functional Analysis. *Handb Exp Pharmacol*. 240: 457-472 (2017).
- Nishida K, Tamura A, Yui N. pH-Responsive Coacervate Droplets Formed from Acid-Labile Methylated Polyrotaxanes as an Injectable Protein Carrier. *Biomacromolecules*. 19: 2238-2247 (2018).

5 . 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 7 件)

- Hibino M, Yamada Y, Fujishita N, Sato Y, Maeki M, Tokeshi M, Harashima H. The use of a microfluidic device to encapsulate a poorly water-soluble drug CoQ₁₀ in lipid nanoparticles and an attempt to regulate intracellular trafficking to reach mitochondria. *J Pharm Sci (in press)* (査読有) [doi: 10.1016/j.xphs.2019.04.001.]
- Yamada Y, Burger L, Kawamura E, Harashima H. Packaging of the Coenzyme Q₁₀ into a liposome for mitochondrial delivery and the intracellular observation in patient derived mitochondrial disease cells. *Biol Pharm Bull* 40: 2183-2190 (2017) (査読有) [doi: 10.1248/bpb.b17-00609.]
- Takano Y, Munechika R, Biju VP, Harashima H, Imahori H, Yamada Y. Optical Control of Mitochondrial Reductive Reactions in Living Cells using an Electron Donor-Acceptor Linked Molecule. *Nanoscale* 9: 18690-18698 (2017) (査読有) [doi: 10.1039/c7nr06310e]
- Yamada Y, Munechika R, Kawamura E, Sakurai Y, Sato Y, Harashima H. Mitochondrial delivery of Doxorubicin using MITO-Porter kills drug-resistant renal cancer cells via mitochondrial toxicity. *J Pharm Sci* 106: 2428-2437 (2017) (査読有) [doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.058.]

【学会発表】(計 17 件)

- Yamada Y, Harashima H. The MITO-Porter integrates a mitochondrial drug delivery system with a variety of other current scientific concepts with the goal of developing new innovative technologies

- and medicines. The 19th RIES-HOKUDAI International Symposium. 2018 年.
2. 山田 勇磨, 原島秀吉. ミトコンドリア標的型 DDS を基盤としたナノ医療の創出を目指して. 第 18 回 日本ミトコンドリア学会年会. 2018 年.
 3. Yamada Y, Harashima H. Mitochondrial DDS opens emerging therapies and novel strategy of new drug development for mitochondrial disorders. KSAP annual convention 2018. 2018 年.
 4. 山田 勇磨, 原島秀吉. ミトコンドリア機能を制御するナノカプセルの構築および疾患治療に向けた試み. 第 91 回 日本生化学大会. 2018 年
 5. 山田 勇磨. ミトコンドリア機能を制御するナノカプセルの開発. 第 6 回ミトコンドリア機能研究会. 2018 年.
 6. 山田 勇磨. ミトコンドリア DDS の開発と医療分野への展開. 第 11 回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 2017 年

【図書】(計 1 件)

1. 山田勇磨. ドラッグキャリア設計入門-D DS からナノマシンまで- (編集:片岡一則、原島秀吉). (2019) 240 頁. 丸善出版

【産業財産権】

出願状況 (計 1 件)

名称: リポソーム様ナノカプセル及びその製造方法

発明者: 山田勇磨, 原島秀吉, 日比野光恵, 佐藤悠介, 渡慶次学, 真栄城正寿

権利者: 国立大学法人北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2019-070124

出願年: 2019 年

国内外の別: 国内

【その他】

7 SEAS PROJECT への参加

「ミトコンドリア病」の新しい治療法の研究開発を目指す創薬プロジェクト『7 SEAS PROJECT』の構成メンバーとなり、本研究成果を医薬品へと発展させ、医療・経済・社会への貢献を目指し、新たな研究を計画・推進中である。

実用化を目指した企業との連携

『7 SEAS PROJECT』内で研究を展開している MITO-Porter 基盤技術の特許ライセンスを基に、バイオベンチャー(ルカ・サイエンス社)が 2018 年 12 月 25 日に設立された。2019 年 4 月からは科学顧問に就任し、実用化に向けた研究を展開している。

ホームページ

・北海道大学大学院薬学研究院 HP : <http://www.pharm.hokudai.ac.jp>

・北海道大学大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室(所属研究室) HP : <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

・7SEAS PROJECT HP : <https://7sp.life/>

・ルカ・サイエンス社 HP: <https://luca-science.com/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。