

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19890001  
 研究課題名（和文） ミトコンドリア標的型の多重型・多機能性ナノ構造体の開発と  
 癌治療への応用  
 研究課題名（英文） Development of Multi-layered nano-device for mitochondrial drug  
 delivery and mitochondrial protein delivery for cancer therapy  
 研究代表者  
 山田 勇磨（YAMADA YUMA）  
 北海道大学・大学院薬学研究院・助教  
 研究者番号：60451431

研究成果の概要：ミトコンドリア (Mt) は様々な疾患と密接に関わっており、Mt を標的とした薬物治療が注目を集めている。これらの治療を実現するためには、Mt へ治療薬物を送達する必要があるが、有用なシステムは報告されていない。本研究では、Mt を標的とした新規送達システムを開発する事に成功し、癌細胞 Mt への薬物送達および薬理効果を確認した。本システムを用いる事で、今までは不可能であった難治性疾患の治療が期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：薬物送達学

科研費の分科・細目：医歯薬学・医療系薬学

キーワード：薬学、ミトコンドリア、癌、共焦点レーザー顕微鏡、ナノマシン、タンパク質送達、イメージング、細胞内動態制御

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ミトコンドリアと様々な疾患（パーキン病、糖尿病、癌の誘発など）との関連が報告されており、本オルガネラを標的とした薬物治療が注目されている [D. C. Chan et al, Cell (2006)]。これらの治療を実現するためには、ミトコンドリアへ高分子薬物（DNA、タンパク質）を送達する必要があるが、有用なシステムは報告されていない。そのため申請者は、ミトコンドリアを標的とする新規送達システムの開発を行い、新たな医療用ナノ

マシンの基盤技術を確立したいと考え、本申請研究を提案した。

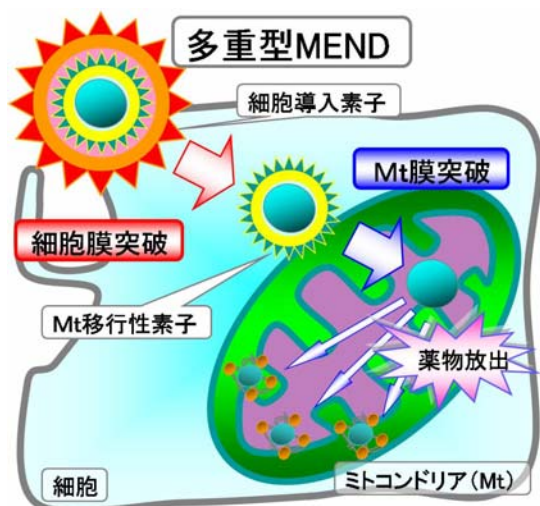
## 2. 研究の目的

本申請研究では、タンパク質をミトコンドリアへ送達するための新規送達システムの開発を目的とする。研究戦略は、タンパク質をコアとするナノ粒子（直径 約 100 nm）を形成し、細胞膜とミトコンドリア膜を突破するために、エンベロープを多重構造にする（多重型・多機能性ナノ構造体：多重型 MEND）。

最外層には細胞導入素子を、中間層にはミトコンドリア移行性素子を付加し、ナノ粒子のままミトコンドリア内へ送達するシステムを開発する。研究の後半では、ミトコンドリア標的型の多重型 MEND を用いて治療タンパク質を癌細胞ミトコンドリアへ送達し、その活性を評価しキャリアの有用性を検証する。本研究の最終目標は、癌細胞ミトコンドリアを標的とした新たなアプローチからの癌治療方法を検証する事である。

### 3. 研究の方法

本申請研究では、薬物を癌細胞ミトコンドリアへ送達するための新規送達システムとして、ミトコンドリア標的型の多重型 MEND の開発を目的とした。実弾として使用する治療用タンパク質には、Superoxide dismutase (SOD) および DNase I を選択した。癌細胞は活性酸素を除去する事でアポトーシスを誘発する事が報告されているので、活性酸素除去タンパク質 SOD の送達は抗腫瘍効果が期待できる。また、DNA 切断活性を有する DNase I の送達によって癌細胞ミトコンドリアのミトコンドリア DNA (mtDNA) を切断し、癌細胞を死滅させる事が期待できる。本研究では、タンパク質封入多重型 MEND の構築、細胞内動態評価、および薬理活性評価を行い、ミトコンドリアを標的とした癌治療に関する検討を行った。



#### (1) 多重型 MEND の構築:

SOD タンパク質および DNase I タンパク質のナノ粒子形成の検討を行った。ナノ粒子は、タンパク質の濃縮化素子 STR-R8 [Suzuki et al, Biol. Pharm. Bull. (2007)] とタンパク質を混合して形成させた。その後、ミトコンドリア融合性脂質膜でコートしエンベロープ化し、さらにエンドソーム融合能の高い脂質膜でコートし多重型構造体とした。ナノ粒子の形成および多重型構造体の形成は粒子

径および表面電位を測定して評価した。

#### (2) 多重型 MEND の生細胞におけるミトコンドリア送達効率の評価:

共焦点レーザー顕微鏡を用いて構築した多重型 MEND の細胞内動態観察を行い、キャリアのミトコンドリア送達能を評価した。これらの評価は、当研究室で開発した細胞に導入した蛍光分子の標的オルガネラにおける局在量の定量が可能な CIDIQ 法を用いて解析した [H. Akita et al., Mol. Ther. (2004)]。

#### (3) 癌細胞ミトコンドリアを標的とした多重型 MEND によるタンパク質送達:

キャリアの薬理効果を評価するために治療タンパク質を封入し、培養細胞に添加後ミトコンドリア内での薬理活性を評価した。SOD タンパク質を用いた場合には、細胞内活性酸素量を測定し、活性酸素の除去効果を評価した。DNase I タンパク質を用いた場合には、生細胞のミトコンドリア活性を測定した。生細胞ミトコンドリア内部へ DNase I タンパク質が送達されると mtDNA が切断され、ミトコンドリア活性が低下する。ミトコンドリア活性は、ミトコンドリアで産生される NADH 量を測定して行った。本実験では、ミトコンドリアを標的とする新たな制癌アプローチを目指した。

### 4. 研究成果

#### (1) 多重型 MEND の構築:

##### ① SOD タンパク質を用いた検討

SOD を STR-R8 でナノ粒子化することを試みたが、SOD はナノ粒子化されず脂質膜でパッケージングすることが困難であった。そのため、SOD を効率的に MEND へ封入する戦略として、リポプレックスを利用した封入法を考案した。負電荷を有する SOD と正電荷を有するリポソームを混合し、高密度に SOD を濃縮したナノ粒子を調製した。その後、ミトコンドリア融合能の高い脂質膜でコーティングした。以下、MITO-Porter (SOD) とする。

##### ② DNase I タンパク質を用いた検討

DNase I タンパク質の場合は、STR-R8 と当モル比で混合する事により、粒子径 150 nm 程度の正に帯電したナノ粒子の形成に成功した。その後、ナノ粒子をミトコンドリア融合性脂質でパッケージングした後に、細胞膜融合能の高い脂質膜でコートした多重型構造体を形成し、粒子径、表面電位を測定し最適化を行った。その結果、正に帯電した 100 - 150 nm の多重型構造体を調製する事に成功した。以下、多重型 MITO-Porter (DNase I) とする。さらに、多重型の有用性を評価するために、細胞膜融合性脂質膜を有していない

従来型 MITO-Porter (DNase I) も調製した。

**従来型 MITO-Porter**

脂質組成	粒子径 (nm)	PDI	表面電位 (mV)
EPC/CHEMS/STR-R8 (9/2/1)	123 ± 7.7	0.305 ± 0.042	38.7 ± 3.7
DOPE/SM/CHEMS/STR-R8 (9/2/1/1)	215 ± 42	0.364 ± 0.034	43.8 ± 5.9
DOEP/PA/STR-R8 (9/2/1)	235 ± 19	0.414 ± 0.064	37.3 ± 6.7



**多重型 MITO-Porter**

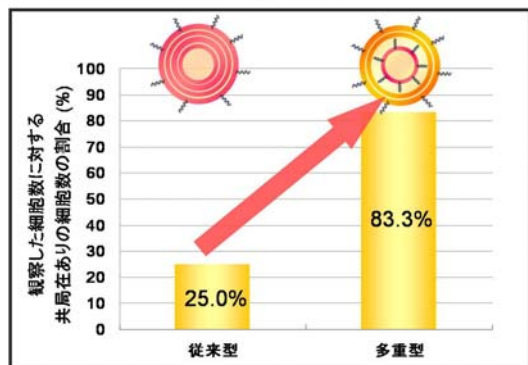
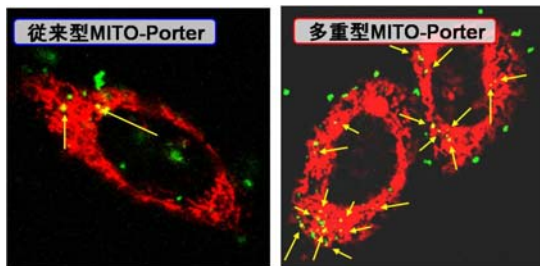
脂質組成 (内膜)	粒子径 (nm)	PDI	表面電位 (mV)
EPC/CHEMS/STR-R8 (9/2/1)	112 ± 5.5	0.162 ± 0.010	30.8 ± 2.2
DOPE/SM/CHEMS/STR-R8 (9/2/1/1)	152 ± 8.8	0.193 ± 0.028	34.7 ± 7.8
DOEP/PA/STR-R8 (9/2/1)	157 ± 12	0.175 ± 0.033	33.6 ± 10



また、従来型 MITO-Porter と多重型 MITO-Porter の均一性の指標 PDI (値が小さいほど均一) を比較したところ、多重型 MITO-Porter の方が従来型と比較して非常に均一である事が明らかとなった。

(2) 多重型 MEND の生細胞におけるミトコンドリア送達効率の評価:

多重型 MITO-Porter の細胞内動態を共焦点レーザースキャン顕微鏡で観察し、ミトコンドリア送達能を評価した。蛍光標識(緑色)を施した多重型 MITO-Porter およびミトコンドリア融合性脂質のみから構成される従来型 MITO-Porter を HeLa 細胞に添加し、キャリアと生細胞ミトコンドリア (赤色) との共局在 (黄色) を観察した。その結果、多重型 MITO-Porter は従来型 MITO-Porter と比較してミトコンドリア送達能の劇的な向上が観察され、薬物送達における多重型の有用性が示された。



(3) 癌細胞ミトコンドリアを標的とした多重型 MEND によるタンパク質送達:

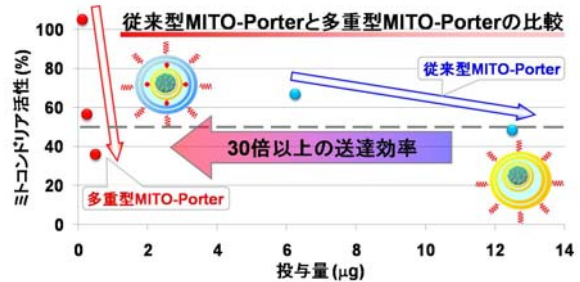
① SOD タンパク質を用いた検討

MITO-Porter (SOD) の細胞内活性酸素除去

能の評価を行った。癌細胞である HeLa 細胞にミトコンドリア選択的に活性酸素を産生させるロテノンに添加し過剰に活性酸素が産生される細胞を構築した。その後、MITO-Porter (SOD) を添加し細胞内の活性酸素の量を測定した。その結果、MITO-Porter (SOD) は細胞内の活性酸素の 40% を除去する事が確認された。

② DNase I タンパク質を用いた検討

多重型 MITO-Porter の薬理効果を評価するためにキャリアに DNase I タンパク質を封入し、培養細胞に添加後、ミトコンドリア活性を評価した。DNase I タンパク質がミトコンドリア内部に送達されると mtDNA が切断され、ミトコンドリア活性が低下する。ミトコンドリア活性は、ミトコンドリアで産生される NADH 量を測定して行った。評価の結果、多重型 MITO-Porter は従来型 MITO-Porter の送達効率を飛躍的に上昇させた。これらの結果は、薬理効果においても多重型が有用である事を示している。



本研究では、ミトコンドリア融合性リポソーム MITO-Porter に多重型の概念を導入した多重型 MITO-Porter を構築し、その薬物送達および薬理効果の評価を行い、以下の成果を得た。

A. ミトコンドリア融合性脂質、細胞膜融合性脂質を有する多重型 MITO-Porter の構築に成功した。

B. 多重型 MITO-Porter は従来型 MITO-Porter の薬物送達効率・薬理効果を飛躍的に上昇させる事を明らかにした。

以上より、多重型 MITO-Porter のコンセプトはミトコンドリア標的型ナノデバイスとして有用であると考えられる。また、本キャリアは癌細胞 (HeLa 細胞) において薬理効果を発揮する事を確認しており、本戦略が癌細胞ミトコンドリアを標的とした新たな制癌アプローチとして有用である事が示唆された。

〔国内外における位置づけとインパクト〕

本申請研究は、「ミトコンドリアを標的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発」を目的としている。近年、ミトコンドリアと様々な疾患との関連が報告されているが、効率的な薬物送達戦略が確立されてお

らず、これらの疾患治療に至っていない。従って、本オルガネラを標的としたDDSの開発は、国民の健康・福祉に大きく貢献する事が期待される。また、ミトコンドリアは、アポトーシス、エネルギー産生などの重要な機能を有し、また老化、癌、発生・分化など基礎的な生命現象に深く関わる事が明らかになりつつある。従って、本申請研究は医療に対して大きなインパクトをもたらすだけではなく、生命現象に関わる多彩な機能を有するミトコンドリアに特定の物質を送達することで、生命原理の解明にも大きく貢献すると確信している。さらに、本研究は海外の研究者からも非常に注目を受けている。基盤技術の基礎となる論文 (Yamada et al., BBA (2008)) を発表したところ多数の共同研究の依頼があった。具体的には、ミトコンドリア遺伝子研究のイギリスの権威、ミトコンドリア膜のアメリカの生物物理学者から本キャリアを使用したいとの要望があった。この状況を考えると、本研究で構築したキャリアは多くの国際共同研究を創出する可能性が極めて高く、我が国が中心となった国際共同研究が多数遂行されると期待している。

[今後の展望]

#### A. in vivo への応用と製剤化

多重型 MITO-Porter を in vivo 適応型へと発展させ、動物実験での制癌効果を評価する。また、凍結乾燥法による製剤化技術の確立も行っていく予定である。

#### B. ミトコンドリア内動態制御

ミトコンドリアは、外膜、内膜の2層の膜構造を有し膜間腔、マトリックスから構成されておりそれぞれの部位で生命活動に必要な動作をしている。そのため、ミトコンドリア内の目的部位へ治療薬物を送達するミトコンドリア内動態制御も考慮に入れた DDS の確立を目指していきたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Y. Yamada, H. Harashima. Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 1439-1462 (2008) 査読あり
2. K. Kogure, H. Akita, Y. Yamada, H. Harashima. Multifunctional Envelope-type Nano Device (MEND) as a non-viral gene delivery system. *Adv.*

*Drug Deliv. Rev.* 60: 559-571 (2008) 査読あり

3. Y. Yamada, H. Akita, H. Kamiya, K. Kogure, T. Yamamoto, Y. Shinohara, K. Yamashita, H. Kobayashi, H. Kikuchi, H. Harashima, MITO-Porter: a liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778: 423-432 (2008) 査読あり
4. 原島秀吉, 小暮健太朗, 秋田英万, 山田勇磨, 紙谷浩之「多機能性エンベロープ型ナノ構造体による人工遺伝子デリバリーシステムの創製」*Drug Delivery System* 22: 569-577 (2007) 査読あり
5. 原島秀吉, 小暮健太朗, 山田勇磨, 秋田英万, 紙谷浩之「多機能性エンベロープ型人工遺伝子デリバリーシステムの創製」*YAKUGAKU ZASSHI* 127: 1655-1672 (2007) 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. Y. Yamada, H. Akita, H. Kamiya, H. Harashima. "MITO-Porter: Nano Device for Mitochondrial Delivery -Mitochondrial Macromolecule Delivery System via Membrane Fusion-" 11th Liposome Research Days Conference (LRD2008). 20-22 July, 2008. Yokohama, Japan
2. 山田勇磨, 秋田英万, 紙谷浩之, 原島秀吉. "多重型MITO-Porterによるミトコンドリアを標的とした薬物送達戦略" 第24回日本DDS学会. 2008年6月30日. 東京 (六本木アカデミーヒルズ40)
3. 山田勇磨, 秋田英万, 紙谷浩之, 小暮健太朗, 篠原康雄, 原島秀吉. "細胞内FRET法を用いたMITO-Porter (ミトコンドリア膜合融性リポソーム)の膜融合能評価". 第23回日本DDS学会. 2007年6月14日. 熊本
4. Y. Yamada, H. Akita, H. Kamiya, K. Kogure, Y. Shinohara, H. Kobayashi, H. Kikuchi, H. Harashima. "MITO-Porter, a novel liposome-based mitochondrial delivery system via membrane fusion" 3rd Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC2007). 22-25 April, 2007. Amsterdam, The Netherlands

[図書] (計 2 件)

1. 山田勇磨, 原島秀吉「ミトコンドリアへの輸送」*機能性DDSキャリアの製剤設計* シーエムシー出版 178-188 (2008).

2. 山田勇磨, 原島秀吉「ミトコンドリアを標的とする多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) の開発」 *遺伝子医学MOOK別冊* (編集: 田畑泰彦) メディカルドゥ 131-139 (2007).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 勇磨 (YAMADA YUMA)  
北海道大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号: 60451431

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし