

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02094

研究課題名(和文)異常ミトコンドリアを認識する遺伝子治療用ナノカプセルの構築

研究課題名(英文)Construction of nanocapsule targeting mutated mitochondria for gene therapy

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリア標的型ナノカプセル【MITO-Porter】を用いて疾患細胞の異常ミトコンドリアへ遺伝子発現制御装置を運搬し、ミトコンドリア機能を遺伝子レベルで治療する事を目的とした。本研究では、MITO-Porterを用いて、変異型ミトコンドリアゲノムを保有する異常ミトコンドリアに遺伝子発現制御装置を導入し、変異型ゲノム変異率を減少させることに成功した。さらに、酸素消費量を指標とした機能評価を行い、ミトコンドリア機能が回復することも確認した。本研究で構築したミトコンドリア遺伝子治療用ナノカプセルは、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療戦略の有用性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難病指定されているミトコンドリア病などミトコンドリア機能異常が関連する疾患の多くはミトコンドリア遺伝子の変異・欠損が原因であることが報告されているが、現在の治療法はビタミン剤などを継続的に投与し、ミトコンドリア機能を一時的に補助する対症療法が主流である。本研究では、ミトコンドリア標的型ナノカプセル【MITO-Porter】を用いて、患者由来細胞に治療用核酸を送達する「ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療戦略」の実証に成功した。ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療は、これまでの治療法に代わる難病の根本治療につながるため医療に大きなインパクトを与える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we validated a mitochondrial gene therapeutic strategy using fibroblasts from a mitochondrial disease patient by the mitochondrial delivery of therapeutic nucleic acids. The treatment involved the use of a liposome-based carrier (a MITO-Porter) for delivering therapeutic nucleic acids to mitochondria via membrane fusion. The results confirmed that the mitochondrial transfection of therapeutic nucleic acids by the MITO-Porter system resulted in a decrease in the levels of mutated mitochondria of diseased cells. An evaluation of mitochondrial respiratory activity by respirometry also showed that transfection using the MITO-Porter resulted in an increase in maximal mitochondrial respiratory activity in the diseased cells. These results support the conclusion that the mitochondrial delivery of therapeutic nucleic acids represents a viable strategy for mitochondrial gene therapy.

研究分野：薬物送達学

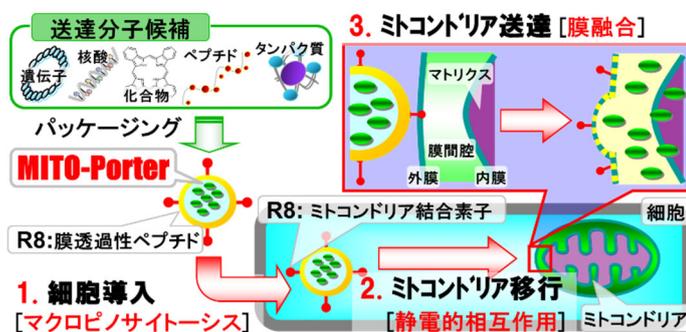
キーワード：薬物送達システム ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは1細胞あたり多数存在しており、ミトコンドリアの質および量が細胞機能に大きな影響を与える。ミトコンドリア内部のミトコンドリアゲノム (mtDNA)の変異の割合が増加すると、細胞内のミトコンドリア機能不全を呈する異常ミトコンドリアが増加し、正常な細胞機能を維持する事が困難となり疾患を発症することが報告されている。これまでに、ミトコンドリアゲノムの変異と種々の疾患(ミトコンドリア脳筋症、神経変性疾患、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遺伝子治療が期待されている。本治療戦略を実現するためには、遺伝子送達用のミトコンドリア標的型ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が必要不可欠である。ミトコンドリア移行性ペプチド MTS はタンパク質・化合物のミトコンドリア送達ツールとして報告されているが [G. Schatz, *Eur. J. Biochem.* (1987)]、送達分子の種類や大きさを制限するため、遺伝子治療の候補送達分子である核酸・遺伝子のような高次構造分子の送達は不可能である。そのため、疾患原因である異常ミトコンドリアに治療用分子を送達するDDSが存在せず、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療進展の大きな障壁となっていた。

代表者はミトコンドリア膜との膜融合を介して内封物質を送達する、ミトコンドリア融合性リポソーム(MITO-Porter)の開発に成功している [Y. Yamada et al, *Biochim Biophys Acta* (2008)]。膜融合を介する本戦略は、送達分子の種類や大きさを制限しない送達が可能となる。代表者は、ミトコンドリア遺伝子発現制御装置(核酸・遺伝子)を MITO-Porter に搭載する事で、疾患細胞ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療が可能になると考え、本申請研究を提案した。



2. 研究の目的

ミトコンドリアのゲノム変異と種々の疾患との関連が報告されており、本オルガネラを標的とした遺伝子治療が期待されている。本申請研究では、ミトコンドリア標的型ナノカプセル(MITO-Porter)を用いて標的ミトコンドリアへ遺伝子発現制御装置を運搬し、ミトコンドリア機能を遺伝子レベルで治療する事を目的とする。具体的には、疾患細胞の異常ミトコンドリアを認識するナノカプセルを構築し、その内部に治療用タンパク質・RNAを発現するミトコンドリア遺伝子発現プラスミド DNAを有する制御装置を搭載する。本研究で構築するミトコンドリア遺伝子治療用ナノカプセルは、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療を実現するだけでなく、多彩な機能を有したミトコンドリアを標的としたライフサイエンス、疾患モデル細胞・動物の作出に大きく貢献する事が期待される。

3. 研究の方法

本研究では、『ミトコンドリア機能を遺伝子レベルで治療』するため、(1) 疾患細胞ミトコンドリア標的型ナノカプセルの構築、(2) ミトコンドリア遺伝子治療用核酸の設計、(3) ミトコンドリア環境応答性ナノ粒子の構築、(4) 疾患細胞を用いたミトコンドリア遺伝子治療の検証を下記に示す方法で実施した。

(1) 疾患細胞ミトコンドリア標的型ナノカプセルの構築

① 自主臨床研究の整備：ミトコンドリア病患者由来細胞を提供して頂き研究を実施するため

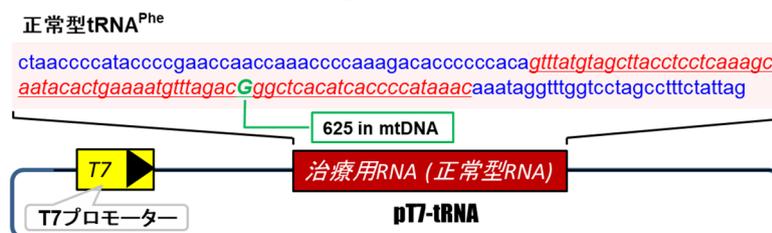
に、以下の自主臨床研究の申請を進めた。**G625A 細胞**の使用のため、自主臨床研究『ミトコンドリア病に対する薬物治療法確立に向けた検討』を北海道大学薬学部 (No. 2014-003)・北海道大学医学部 (No. 14-061)・市立札幌病院 (No. H26-050-224) の3施設に継続申請し、承認を得た。

LS^{ND3} 細胞の使用のため、自主臨床研究『ミトコンドリア病に対する医療用ナノカプセルの創製に向けた検討』を北海道大学薬学部 (No. 2017-005)・自治医科大学小児科 (Genetics 18-07) の2施設に新規申請し、承認を得た。

② **ナノカプセルの構築・細胞内動態の最適化**： ナノカプセルの細胞内動態の最適化は、蛍光標識を施したナノカプセルを G625A 細胞または LS^{ND3} 細胞に添加し、細胞導入能およびミトコンドリア移行を指標に行った。細胞導入能の評価はフローサイトメトリーを利用して、ミトコンドリア移行能は、ミトコンドリアを染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内動態観察解析によって評価した。

(2) ミトコンドリア遺伝子治療用核酸の設計

治療用分子をコードするプラスミド DNA として、疾患細胞が有する変異型 RNA に対応する正常型 RNA をコードした **pX-RNA** を設計した。これらのプラスミド DNA は人工核酸合成品を購入し、大腸菌株を用いて大量精製した。さらに、当初予定になかった治療用 RNA として正常型 RNA をコードした RNA 断片も複数種調製した。用いたプラスミド DNA (pT7-RNA) は、T7 プロモーターの下流に治療用 RNA 遺伝子が配置されており、*in vitro* 転写反応により RNA の精製が可能である (右図、pT7-tRNA^{Phe} を例示、詳細は、4(2)に記す)。本報告書では、治療用 RNA を用いた遺伝子治療戦略について報告する。

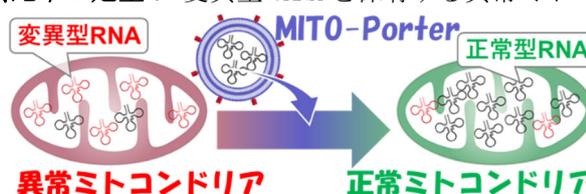


(3) ミトコンドリア環境応答性ナノ粒子の構築

本申請研究に着手する時点で、MITO-Porter を用いて mtDNA が存在する最内部領域マトリクスへの核酸ナノ粒子送達に成功していた [Y. Yamada et al., *Mitochondrion* (2015)]. 本研究では、マトリクス領域に送達された後に、ミトコンドリア環境に応答して核酸を放出するナノ粒子を設計し、その核酸放出能および核酸機能を評価した。ミトコンドリア環境応答性を有する種々のポリペプチドを設計し、各ポリペプチドによる核酸ナノ粒子を調製し、粒子径・表面電位などの物性データを取得した。マトリクス環境を模倣した条件 (pH 変化など) における核酸ナノ粒子からの核酸放出能を評価した。さらに、ナノ粒子化したアンチセンス核酸 (ミトコンドリア内因性 mRNA を標的) を搭載した MITO-Porter を用いて、細胞内ミトコンドリアへ核酸を送達してアンチセンス効果を評価した。

(4) 疾患細胞を用いたミトコンドリア遺伝子治療の検証

① **疾患細胞への治療用核酸の送達および変異比率の定量**： 変異型 tRNA を保有する異常ミトコンドリアを標的とした治療戦略として、ミトコンドリア内の変異型 RNA の含有比率を低下させるため、治療用 RNA 搭載 MITO-Porter を用いて疾患細胞への治療用 RNA の核酸導入を行った。具体的には、**G625A 細胞** (tRNA^{Phe} (G625A) 変異を有する) には MITO-Porter (tRNA) を、**LS^{ND3} 細胞** (mRNA [ND3] (T10158C) 変異を有する) には、MITO-Porter (mRNA) を用いて検討を進めた。核酸導入・培養後に、ミトコンドリア単離、RNA 抽出・精製を行い、逆転写 PCR によって cDNA を作成した。その後、Amplification refractory mutation system (ARMS)-qPCR 法を利



用してミトコンドリア内部の正常型 RNA および変異型 RNA を定量し、変異型 RNA 含有比率を算出した。

② **ミトコンドリア酸素消費量を指標とした治療効果の検証**：G625A 細胞および LS^{ND3} 細胞はミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能が低下しており、ミトコンドリア酸素消費量が低下している。本実験では、治療用 RNA 搭載 MITO-Porter を疾患細胞に添加・培養した後に、酸素消費量を指標としたミトコンドリア呼吸活性（治療効果の指標）を測定した。

4. 研究成果

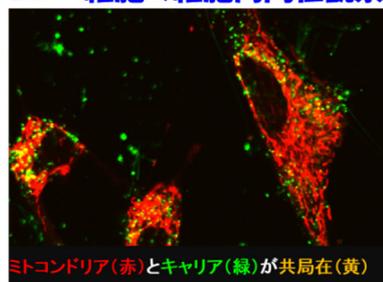
(1) 疾患細胞ミトコンドリア標的型ナノカプセルの構築

① **自主臨床研究の整備**：自主臨床研究の承認後、ミトコンドリア病患者の皮膚生検より得た線維芽細胞の樹立・継代に成功した。G625A 細胞は、mtDNA の tRNA^{Phe} 上に G625A 変異を有しており、mtDNA の変異率が 80% であり、臨床症状として、てんかんや進行性難聴が認められている。本疾患細胞は、複合体 III 活性が低下しており、ミトコンドリア膜電位・ATP 産生が低下している事を確認した。LS^{ND3} 細胞は、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I を構成する ND3 タンパク質に点変異(T10158C)を有する mtDNA を保有する Leigh 脳症患者の皮膚線維芽細胞である。

② **ナノカプセルの構築・細胞内動態の最適化**：細胞導入能の評価および細胞内動態観察を行い、粒子径・機能素子修飾量などを調整し細胞導入能、ミトコンドリア移行能を最適化した MITO-Porter を構築することに成功した（150 nm 程度、正電荷）。

自主臨床研究計画に基づき、G625A 細胞のミトコンドリア核酸導入が可能な治療分子搭載 MITO-Porter (tRNA)、および LS^{ND3} 細胞はミトコンドリア核酸導入が可能な治療分子搭載 MITO-Porter (mRNA) の構築方法を確立した(右図、LS^{ND3} 細胞を用いた細胞内局在観察結果を例示)。これらのナノカプセルを、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療戦略の検証に用いた。

LS^{ND3}細胞の細胞内局在観察



(2) ミトコンドリア遺伝子治療用核酸の設計

治療用 RNA をコードする pT7-DNA として、tRNA^{Phe} (G625A) 変異に対する正常 tRNA^{Phe} をコードする pDNA (pT7-tRNA^{Phe})、および ND3 変異 (T10158C 変異) に対する正常 mRNA (ND3) をコードする pDNA (pT7-mRNA (ND3)) を設計・構築し、大腸菌を用いて大量精製する事に成功した。pT7-tRNA^{Phe} および pT7-mRNA (ND3) から *in vitro* 転写反応を利用して、tRNA^{Phe} を mRNA (ND3) を高純度に精製する事に成功した [E. Kawamura, Y. Yamada et al., *Mol. Ther. - NA* (2020), Y. Yamada et al., *Sci Rep.* (2020)]。

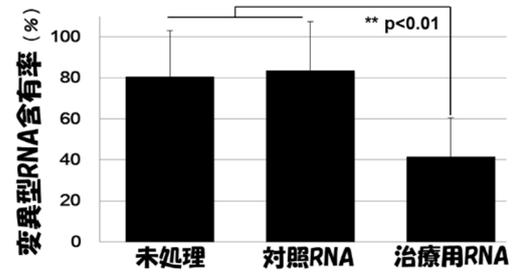
(3) ミトコンドリア環境応答性ナノ粒子の構築

ミトコンドリア環境応答性を有する種々のポリペプチドを含有する核酸ナノ粒子の調製に成功した (100 nm 程度、正電荷)。核酸ナノ粒子からの核酸放出能を評価し、pH に応答して核酸を放出する核酸ナノ粒子を同定した。さらに、アンチセンス核酸ナノ粒子搭載 MITO-Porter を培養細胞にトランスフェクションし、アンチセンス効果を得る事に成功した [Y. Yamada et al., *Mitochondrion* (2020)]。

(4) 疾患細胞を用いたミトコンドリア遺伝子療法の検証

① **疾患細胞への治療用核酸の送達および変異比率の定量**：G625A 細胞へ治療用 RNA (正常型 tRNA^{Phe}) を導入・培養後に、ミトコンドリア内部の G625A 変異を有する tRNA^{Phe} の含有比率算出した結果、変異型 tRNA^{Phe} の含有比率の低下が認められた(次頁図)。変異型 RNA 含有比率の低下

は数日間にわたり持続していた[E. Kawamura, Y. Yamada et al., *Mol. Ther. - N A* (2020)]. 同様の検証をLS^{ND3}細胞を用いて行い、ミトコンドリアへの治療用 mRNA (正常型 mRNA [ND3]) の導入成功し、80%あった変異型 mRNA (ND3) の含有比率を10%まで減少させた[Y. Yamada et al., *Sci Rep.* (2020)].



② **ミトコンドリア酸素消費量を指標とした治療効果の検証:** 上述のとおり、G625A細胞およびLS^{ND3}細胞に、治療用 RNA 搭載 MITO-Porter を添加・培養した後に、ミトコンドリア呼吸活性 (治療効果の指標) を測定した。その結果、いずれの疾患細胞においても、RNA 変異率の減少に伴うミトコンドリア呼吸活性の回復が観察された [E. Kawamura, Y. Yamada et al., *Mol. Ther. - N A* (2020), Y. Yamada et al., *Sci Rep.* (2020)]. これらの検討より、MITO-Porter を用いたミトコンドリアへの核酸送達治療戦略は、ミトコンドリア病に対する新しい治療法として有用である事が示唆された。

本研究では、『ミトコンドリア機能を遺伝子レベルで治療』するため、(1) 疾患細胞ミトコンドリア標的型ナノカプセルの構築、(2) ミトコンドリア遺伝子治療用核酸の設計、(3) ミトコンドリア環境応答性ナノ粒子の構築、(4) 疾患細胞を用いたミトコンドリア遺伝子治療の検証に関する研究を遂行し以下の成果を得た。

- A. 疾患細胞ミトコンドリアへの核酸導入可能とする治療用 RNA (正常型 tRNA^{Phe} および正常型 mRNA [ND3]) を搭載した MITO-Porter の構築に成功した。
- B. 疾患細胞 (G625A細胞 (tRNA 変異細胞)、LS^{ND3}細胞 (mRNA 変異細胞)) に、治療用 RNA 搭載 MITO-Porter を投与し、変異型 RNA 含有比率低下を伴うミトコンドリア呼吸活性の回復に成功した。

[国内外における位置づけとインパクト]

本研究は、MITO-Porter システムがミトコンドリアを標的とした治療用核酸送達用キャリアとして有用であることを示し(ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療戦略の実証)、国際特許出願および論文で成果を報告している。本研究で得た成果は、ミトコンドリアの関連する多くの研究分野の発展に寄与するものであると確信している。

[今後の展望]

本申請研究内では、ミトコンドリア環境応答性ナノ粒子の構築についても検討を進めてきたが、疾患細胞を用いた遺伝子治療の検証は実施していないため、今後の検討課題と考えている。本研究を推進中 (2017-2019) に「ミトコンドリアを標的とする創薬」に向けた準備を進行した。その一環として、一般社団法人・こいのぼりが企画する創薬プロジェクト「7 SEAS PROJECT」への参画、臨床医と連携した自主臨床研究の実施、資金獲得と社会への情報発信を実現するクラウドファンディングの活用など、研究環境を整備するために様々な活動に挑戦している。2019 年には我々のミトコンドリア DDS をコア技術として設立されたルカ・サイエンス株式会社の科学顧問に就任し、2020 年 4 月に北海道大学・産業創出講座が開設され、『ナノ医薬品』の開発研究をさらに加速している。今後は、革新的な研究、基盤技術をさらに充実させるとともに、基礎・応用研究から「革新的治療薬」を創出する架け橋となるような「ミトコンドリア DDS」の創製に貢献したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計25件（うち査読付論文 22件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hibino Mitsue, Yamada Yuma, Fujishita Naoki, Sato Yusuke, Maeki Masatoshi, Tokeshi Manabu, Harashima Hideyoshi	4. 巻 108
2. 論文標題 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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 2668-2676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.xphs.2019.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山田勇磨	4. 巻 55
2. 論文標題 ミトコンドリア標的型DDSを基盤とした革新的ナノ医薬品の創製	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 330-334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Khalil Ikramy A., Yamada Yuma, Harashima Hideyoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Optimization of siRNA delivery to target sites: issues and future directions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 1053 ~ 1065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1080/17425247.2018.1520836	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 山田勇磨、原島秀吉	4. 巻 823
2. 論文標題 ミトコンドリアDDSが拓く新しいミトコンドリア病治療戦略	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 523-528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Yuma, Burger Laila, Kawamura Eriko, Harashima Hideyoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Packaging of the Coenzyme Q10 into a Liposome for Mitochondrial Delivery and the Intracellular Observation in Patient Derived Mitochondrial Disease Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 2183 ~ 2190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Yuma, Ishikawa Takuya, Harashima Hideyoshi	4. 巻 136
2. 論文標題 Validation of the use of an artificial mitochondrial reporter DNA vector containing a Cytomegalovirus promoter for mitochondrial transgene expression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 56 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2017.05.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Yuma, Tabata Mai, Abe Jiro, Nomura Masatoshi, Harashima Hideyoshi	4. 巻 107
2. 論文標題 In Vivo Transgene Expression in the Pancreas by the Intraductal Injection of Naked Plasmid DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharm Sci	6. 最初と最後の頁 647 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2017.09.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Takuya, Somiya Kana, Munechika Reina, Harashima Hideyoshi, Yamada Yuma	4. 巻 274
2. 論文標題 Mitochondrial transgene expression via an artificial mitochondrial DNA vector in cells from a patient with a mitochondrial disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Control Res	6. 最初と最後の頁 109 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2018.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山田勇磨	4. 巻 262
2. 論文標題 ミトコンドリアを標的とする核酸医薬研究	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 142-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katayama T, Kinugawa S, Takada S, Furihata T, Fukushima A, Yokota T, Anzai T, Hibino M, Harashima H, Yamada Y.	4. 巻 49
2. 論文標題 A mitochondrial delivery system using liposome-based nanocarriers that target myoblast cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 66-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mito.2019.07.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura E, Hibino M, Harashima H, Yamada Y.	4. 巻 49
2. 論文標題 Targeted mitochondrial delivery of antisense RNA-containing nanoparticles by a MITO-Porter for safe and efficient mitochondrial gene silencing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 178-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mito.2019.08.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Y, Fukuda Y, Sasaki D, Maruyama M, Harashima H.	4. 巻 52
2. 論文標題 Development of a Nanoparticle That Releases Nucleic Acids in Response to a Mitochondrial Environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 67-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mito.2020.02.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Eriko, Maruyama Minako, Abe Jiro, Sudo Akira, Takeda Atsuhito, Takada Shingo, Yokota Takashi, Kinugawa Shintaro, Harashima Hideyoshi, Yamada Yuma	4. 巻 20
2. 論文標題 Validation of Gene Therapy for Mutant Mitochondria by Delivering Mitochondrial RNA Using a MITO-Porter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 687 ~ 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.omtn.2020.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Yuma, Somiya Kana, Miyauchi Akihiko, Osaka Hitoshi, Harashima Hideyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Validation of a mitochondrial RNA therapeutic strategy using fibroblasts from a Leigh syndrome patient with a mutation in the mitochondrial ND3 gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1038/s41598-020-64322-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 山田勇磨	4. 巻 -
2. 論文標題 ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療用ナノカプセルの創製	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本核酸医薬学会誌	6. 最初と最後の頁 12-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura T, Yamada Y, Sato Y, Khalil IA, Harashima H.	4. 巻 218
2. 論文標題 Innovative Nanotechnologies for Enhancing Nucleic Acids/Gene Therapy: Controlling Intracellular Trafficking to Targeted Biodistribution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119329.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計34件（うち招待講演 24件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Yamada Y
2. 発表標題 Mitochondrial Nano DDS Toward Innovative Medicine and Therapy.
3. 学会等名 HIGO Program Cutting edge Seminar. (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田勇磨
2. 発表標題 ミトコンドリアDDSの使い方
3. 学会等名 第9回 フリーラジカルスクール (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 勇磨、原島秀吉
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第91回 日本生化学大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H
2. 発表標題 Mitochondrial DDS opens emerging therapies and novel strategy of new drug development for mitochondrial disorders.
3. 学会等名 KSAP annual convention 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 勇磨、原島秀吉
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第18回 日本ミトコンドリア学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 The 19th RIES-HOKUDAI International Symposium.（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 勇磨、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリアDDSが拓く新しいミトコンドリア病治療戦略
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 勇磨、原島秀吉
2. 発表標題 遺伝子・細胞治療に用いるミトコンドリアDDS
3. 学会等名 第34回日本DDS学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 勇磨
2. 発表標題 ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療用ナノカプセルの創製
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H
2. 発表標題 Mitochondrial DDS for Gene & Cell Therapy.
3. 学会等名 Cardiovascular and Metabolic Week 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宗宮加奈、山田勇磨、河村恵理子、宮内彰彦、小坂仁、原島秀吉
2. 発表標題 ND3変異細胞を対象とした治療用mRNA送達によるミトコンドリア遺伝子治療戦略の検証
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宗宮加奈、山田勇磨、宮内彰彦、小坂仁、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリア標的型DDSを用いたミトコンドリア病に対する遺伝子治療戦略の検証
3. 学会等名 第18回 日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田勇磨
2. 発表標題 ミトコンドリアを診る・操る・治すDrug Delivery System
3. 学会等名 第2回先端ケミカルバイオロジー研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田勇磨
2. 発表標題 ミトコンドリアDDSの開発と医療分野への展開
3. 学会等名 第11回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田勇磨
2. 発表標題 ミトコンドリア機能を制御するナノカプセルの開発
3. 学会等名 第6回ミトコンドリア機能研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 勇磨、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリアDDSを基盤とした遺伝子・細胞治療への展開
3. 学会等名 第33回日本DDS学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H
2. 発表標題 Validation of mitochondrial gene therapy using a MITO-Porter
3. 学会等名 8th SFRR-Asia & 14th ASMRM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 勇磨、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリア標的型ナノカプセルMITO-Porterを基盤とした遺伝子治療への挑戦
3. 学会等名 第59回日本先天代謝異常学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H
2. 発表標題 Nano-drug delivery system for mitochondrial gene therapy
3. 学会等名 The 18th International Union of Materials Research Societies, International Conference in Asia (IUMRS-ICA) 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 勇磨
2. 発表標題 ミトコンドリア病の遺伝子改変治療
3. 学会等名 H29 年度 村山班ミトコンドリア病診断・診療マニュアル作成委員拡大合宿 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Y, Kawamura E, Harashima H
2. 発表標題 VALIDATION OF MITOCHONDRIAL GENE THERAPY BY MITOCHONDRIAL DELIVERY OF THERAPEUTIC NUCLEIC ACIDS
3. 学会等名 EUROMIT2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田勇磨、石川卓哉、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリア外来遺伝子発現を可能とするDDSの開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第32年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 勇磨、福田豊、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリアマトリクス環境応答性を有する核酸ナノ粒子の設計
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第3回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宗宮加奈、山田勇磨、河村恵理子、宮内彰彦、小坂仁、原島秀吉
2. 発表標題 治療用RNA搭載ミトコンドリア標的型リポソームによる遺伝子治療戦略の検証
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H.
2. 発表標題 MITO-Porter, liposomal mitochondrial delivery system: Toward Mitochondrial Nanomedicine.
3. 学会等名 Liposome Research Days 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada Y.
2. 発表標題 MITO-Porter therapy to open innovative therapies targeting mitochondria.
3. 学会等名 16th ASMRM & 19th J-mit. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 勇磨
2. 発表標題 ミトコンドリア標的型ナノDDSを基盤とした遺伝子・細胞治療の実装
3. 学会等名 第12回 CHEMBIOハイブリッドレクチャー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 勇磨
2. 発表標題 ミトコンドリアDDSが描くナノ医療の未来予想図～リポ化プロスタグランジン製剤の話題を含めて～
3. 学会等名 第12回 北海道小児オータムセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada Y, Ishikawa T, Harashima H.
2. 発表標題 Mitochondrial transgene expression by the mitochondrial delivery of an artificial mitochondrial DNA vector using a MITO-Porter system.
3. 学会等名 2019 Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Somiya K, Yamada Y, Miyauchi A, Osaka H, Harashima H.
2. 発表標題 Validation of mitochondrial RNA therapy for mitochondrial diseases using Liposome-based nano device.
3. 学会等名 Liposome Research Days 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maruyama M, Yamada Y, Kita T, Kitajiri S, Usami S, Harashima H.
2. 発表標題 Development of ribosomal RNA-loaded nano device for mitochondrial delivery to achieve mitochondrial deafness related gene therapy.
3. 学会等名 Liposome Research Days 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 山田勇磨、秋田英万、宮田完二郎、佐藤悠介	4. 発行年 2019年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 240
3. 書名 ドラッグキャリア設計入門 6.1節	

1. 著者名 Yamada Y, Harashima H	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 708
3. 書名 Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 ミトコンドリア内でタンパク質を発現させるための核酸、前記核酸を封入した脂質膜構造体及びそれらの利用	発明者 原島秀吉, 山田勇磨, 宗宮加奈, 小坂仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/7145	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 ミトコンドリアリボソームRNA変異検出用プライマー-DNAセットを含むキット、ミトコンドリアリボソームRNA発現用核酸、前記核酸を封入してなる脂質膜構造体及びそれらの利用	発明者 山田勇磨, 原島秀吉, 丸山美菜子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-089566	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>北海道大学 大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室HP https://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/ 北海道大学 大学院薬学研究院 HP https://www.pharm.hokudai.ac.jp/7SEAS_PROJECT_HP https://7sp.life/ ルカ・サイエンス https://luca-science.com/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田村 篤志 (Tamura Atsushi) (80631150)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授 (12602)	