

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04523

研究課題名（和文）ミトコンドリアを標的とするゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Development of a nano device for mitochondrial gene editing

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）：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ゲノム編集装置を運搬し、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。本申請研究では、(1) ミトコンドリア標的型ナノカプセルへのゲノム編集装置パッケージング、(2) ミトコンドリアゲノム編集の検証、(3) モデル疾患動物細胞を用いたゲノム編集、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

ミトコンドリアは細胞核とは異なる独自の遺伝子(ゲノム)を保有しており、ミトコンドリアのゲノム変異(遺伝子に傷がつく)と様々な疾患との関連が報告されている。本研究では、ミトコンドリア標的型ナノカプセル(MITO-Porter)を利用して、疾患細胞のミトコンドリアへゲノム編集装置(遺伝子を書き換えることができる装置)を運搬し、ミトコンドリアの機能を遺伝子レベルで治療することを目指す。本研究で構築するナノカプセルは、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の発展に大きく貢献する事が期待される。

研究成果の概要（英文）：The relationship between mitochondrial genome mutations and various diseases has been reported, and gene therapy that targets this organelle has the potential to be an effective therapy. In this application, our objective was to develop a genome editing device that could be delivered to mitochondria using mitochondria-targeted nanocapsules (MITO-Porter) and to use this device to treat mitochondrial diseases. In this research application, we have obtained preliminary results regarding “packaging the genome editing device into a MITO-Porter”, “validating genome editing and evaluating mitochondrial function”, and “conducting mitochondrial genome editing using model disease cells from animals”.

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 ゲノム編集 遺伝子治療 ナノカプセル

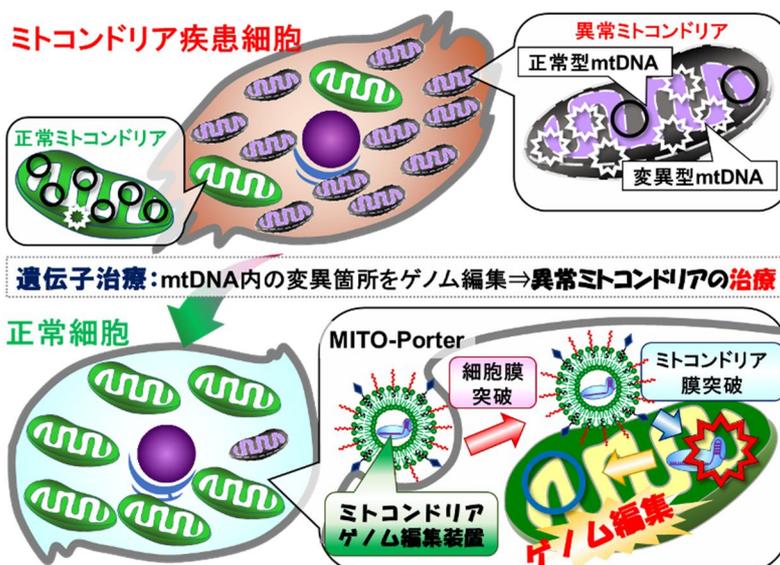
1. 研究開始当初の背景

近年、ミトコンドリアのゲノム (mtDNA/mtRNA) 変異と種々の疾患 (ミトコンドリア脳筋症、神経変性疾患、心疾患など) 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。1 細胞には複数のミトコンドリアが存在しており、個々のミトコンドリアは数十コピーの mtDNA を有している。変異を有する mtDNA の割合が増加 (閾値以上の蓄積) すると、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と考えられている。ミトコンドリア病では、1 塩基の点変異が原因となり症状を呈する事が多数報告されており、遺伝子レベルでミトコンドリアの質を制御するゲノム編集技術は革新的治療法になり得る。

核ゲノムを標的としたゲノム編集研究は精力的に進められており、細菌の獲得免疫システムである Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)-associated protein 9 (Cas9) の哺乳類への応用が 2013 年に報告されて以降 (引用文献 1、引用文献 2)、ゲノム編集に関する研究がさらに加速している。一方で、ミトコンドリアゲノムを標的とした研究はほとんど報告されておらず、CRISPR/Cas9 を基礎とする RNP のミトコンドリアでの機能検証に関する研究は皆無であった。

このような背景の基、本申請研究では『CRISPR/Cas9 システムを活用したミトコンドリアゲノム編集』を学術的「問い」の中心に据え、研究を計画した。研究申請を計画していた 2019 年時点では、巨大なゲノム編集装置である CRISPR-Cas9 システムをミトコンドリアへ送達する術はなく、ミトコンドリアゲノムを編集する手法は確立されていなかった。

我々はこれまでにミトコンドリアへの分子送達を可能とする MITO-Porter の開発に成功しており、100 nm 程度の核酸ナノ粒子を標的細胞ミトコンドリア内部まで送達する事に成功している (引用文献 3)。従って、MITO-Porter に特定の mtDNA 配列を編集する CRISPR-Cas9 システムを搭載する事で、疾患細胞ミトコンドリアでのゲノム編集が可能になると考え、本件研究申請を提案するに至った。



2. 研究の目的

本申請研究では、ミトコンドリアにおける CRISPR-Cas9 システムを基盤とするゲノム編集の検証を研究の目的に据えた。巨大なゲノム編集装置である CRISPR-Cas9 システムをミトコンドリアへ送達する技術が必須であるが、既存のミトコンドリア分子送達システムでは、送達分子の種類や大きさに制限があり、ゲノム編集装置のような高次複合体の送達は難しかった。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ゲノム編集装置を

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試みた。具体的には、(1) MITO-Porter へのゲノム編集装置パッケージング、(2) ミトコンドリアゲノム編集の検証、(3) モデル疾患動物細胞を用いたゲノム編集に関する研究を進めた。

3. 研究の方法

2020年度は、(1) MITO-Porter へのゲノム編集装置パッケージングについて、「疾患細胞ミトコンドリア標的型ナノカプセルの構築」および「ゲノム編集装置のパッケージング」を、2021年度は、(2) ミトコンドリアゲノム編集の検証について、「ゲノム編集の検証」および「ミトコンドリア機能の評価」を、2023年度は、(3) モデル疾患動物細胞を用いたゲノム編集を中心に研究を進めた。

4. 研究成果

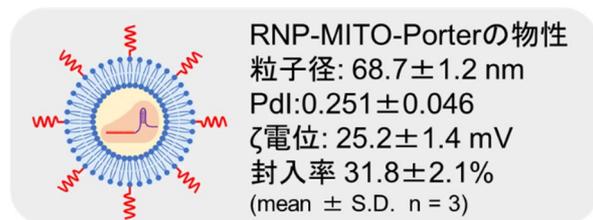
(1) MITO-Porter へのゲノム編集装置パッケージング

「疾患細胞ミトコンドリア標的型ナノカプセルの構築」

ミトコンドリア病由来・皮膚細胞を提供頂き、本疾患細胞を用いたナノカプセルの細胞内動態を観察した。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、ナノカプセルのミトコンドリアへの移行を確認した。

「ゲノム編集装置のパッケージング」

本研究では、疾患細胞が保有する RNA 領域の mtDNA 変異をゲノム編集可能な装置を設計・構築した。試験管内で本ゲノム編集装置が標的配列を認識可能であることを確認した。さらに、ゲノム編集装置をパッケージングしたナノカプセルを調製し、粒子物性（粒子径・ゼータ電位）を測定し、物性を最適化した。

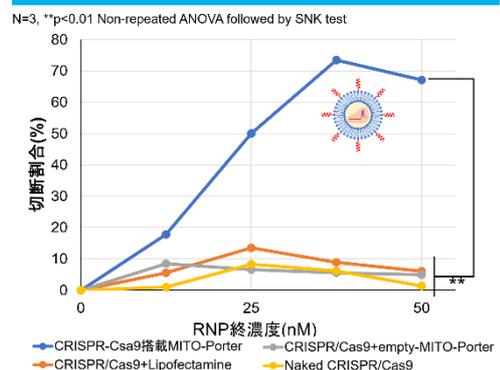


(2) ミトコンドリアゲノム編集の検証

「ゲノム編集の検証」

mtDNA 変異をゲノム編集可能な装置をパッケージングした MITO-Porter を調製し、疾患細胞ミトコンドリア内部にゲノム編集装置を導入した。単離したミトコンドリアを用いて、定量的 PCR 法を利用してミトコンドリア内部の mtDNA 変異の切断効率を測定し、ゲノム編集装置搭載 MITO-Porter が変異 mtDNA を効率的に切断することを確認した。

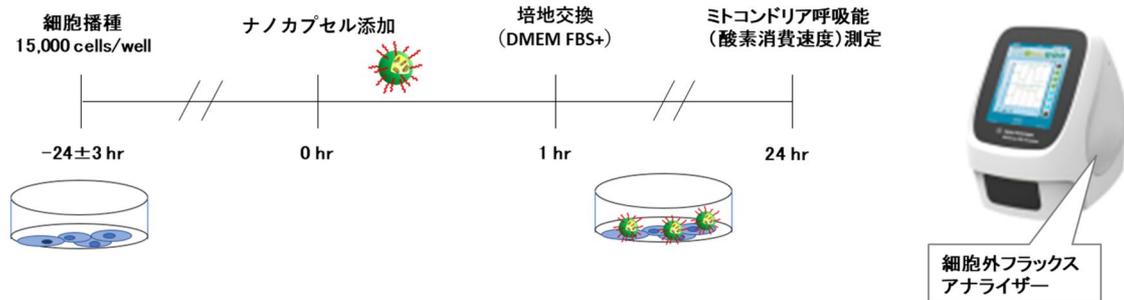
単離ミトコンドリアでのmtDNAの切断



「ミトコンドリア機能の評価」

実験に用いる疾患細胞は、ミトコンドリア呼吸活性複合体の活性低下が観察されている。その

ため、治療効果の指標としてミトコンドリア呼吸活性（細胞外フラックスアナライザー）を評価する。疾患細胞のミトコンドリア呼吸活性を測定する手法を確立した。ゲノム編集装置搭載 MITO-Porter 投与時の疾患細胞ミトコンドリア呼吸活性を測定し、投与プロトコルの最適化を図った。ミトコンドリアは呼吸鎖複合体を介して ATP を産生する際に酸素を消費する。その際の酸素消費速度を測定することで、ミトコンドリア呼吸能を評価する事が可能となる。酸素消費速度の値が大きいほど、呼吸能を介した ATP 産生が活発に行われているため、ミトコンドリア機能が活性化されているととらえることができる。



(3) モデル疾患動物細胞を用いたゲノム編集

モデル細胞が保有する mtDNA 変異をゲノム編集可能な装置をパッケージングした MITO-Porter を調製し、モデル細胞ミトコンドリア内部にゲノム編集装置を導入した。単離したミトコンドリアおよび細胞ミトコンドリアでゲノム切断・編集の効率を評価した。その結果、ゲノム編集装置搭載 MITO-Porter が変異 mtDNA を効率的に切断することを確認した。モデル疾患マウスを用いた治療効果を評価するために、病態回復の評価（心機能評価、肝機能、など）、細胞機能、ミトコンドリア機能の評価方法を確立した。現在、モデル疾患動物での検証を進めている。

<引用文献>

1. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science (New York, NY. 2013;339(6121):819-23.
2. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science (New York, NY. 2013;339(6121):823-6.
3. Yamada Y, Satrialdi, Hibino M, Sasaki D, Abe J, Harashima H. Power of mitochondrial drug delivery systems to produce innovative nanomedicines. Adv Drug Deliv Rev. 2020;154-155:187-209.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Satrialdi, Takano Yuta, Hirata Eri, Ushijima Natsumi, Harashima Hideyoshi, Yamada Yuma	4. 巻 3
2. 論文標題 An effective in vivo mitochondria-targeting nanocarrier combined with a -extended porphyrin-type photosensitizer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 5919 ~ 5927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1NA00427A	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 該当する
1. 著者名 Yamada Y, Ishimaru T, Ikeda K, Harashima H	4. 巻 111
2. 論文標題 Validation of the mitochondrial delivery of vitamin B1 to enhance ATP production using SH-SY5Y cells, a model neuroblast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Pharm. Sci.	6. 最初と最後の頁 432-439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2021.08.033.	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 Sasaki D, Abe J, Takeda A, Harashima H, Yamada Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Transplantation of MITO cells, mitochondria activated cardiac progenitor cells, to the ischemic myocardium of mouse enhances the therapeutic effect	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 4344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08583-5.	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 該当する
1. 著者名 Yamada Yuma, Ishimaru Takuya, Harashima Hideyoshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Validation of a therapeutic strategy involving the mitochondrial delivery of thiamine pyrophosphate using brain damage induced mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Discovery	6. 最初と最後の頁 e43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ctd2.43	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 Kawamura E, Maruyama M, Abe J, Sudo A, Takeda A, Takada S, Yokota T, Kinugawa S, Harashima H, Yamada Y	4. 巻 20
2. 論文標題 Validation of gene therapy for mutant mitochondria by delivering mitochondrial RNA using a MITO-Porter, a liposome-based nano device.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Ther. - 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) 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 Y, Somiya K, Miyauchi A, Osaka H, Harashima H	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 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 7511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 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 Yamada Y, Maruyama M, Kita T, Usami S, Kitajiri S, Harashima H	4. 巻 55
2. 論文標題 The use of a MITO-Porter to deliver exogenous therapeutic RNA to a mitochondrial disease's cell with a A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene results in an increase in mitochondrial respiratory activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 134-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mito.2020.09.008.	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, Satrialdi, Hibino M, Sasaki D, Jiro A, Harashima H	4. 巻 154-155
2. 論文標題 Power of mitochondrial drug delivery systems to produce innovative nanomedicines.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv. Drug. Deliv. Rev.	6. 最初と最後の頁 187-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.addr.2020.09.010.	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 Kubota Fumika, Satrialdi, Takano Yuta, Maeki Masatoshi, Tokeshi Manabu, Harashima Hideyoshi, Yamada Yuma	4. 巻 16
2. 論文標題 Fine tuning the encapsulation of a photosensitizer in nanoparticles reveals the relationship between internal structure and phototherapeutic effects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biophotonics	6. 最初と最後の頁 e202200119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbio.202200119	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 Hori Ikuma, Harashima Hideyoshi, Yamada Yuma	4. 巻 24
2. 論文標題 Development of a Mitochondrial Targeting Lipid Nanoparticle Encapsulating Berberine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 903 ~ 903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24020903	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, Ishizuka Sen, Arai Manae, Maruyama Minako, Harashima Hideyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Recent advances in delivering RNA-based therapeutics to mitochondria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Biological Therapy	6. 最初と最後の頁 1209 ~ 1219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14712598.2022.2070427	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, Sato Yusuke, Nakamura Takashi, Harashima Hideyoshi	4. 巻 348
2. 論文標題 Innovative cancer nanomedicine based on immunology, gene editing, intracellular trafficking control	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 357 ~ 369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2022.05.033	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 Takashi, Sato Yusuke, Yamada Yuma, Abd Elwakil Mahmoud M., Kimura Seigo, Younis Mahmoud A., Harashima Hideyoshi	4. 巻 188
2. 論文標題 Extrahepatic targeting of lipid nanoparticles in vivo with intracellular targeting for future nanomedicines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Drug Delivery Reviews	6. 最初と最後の頁 114417 ~ 114417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.addr.2022.114417	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 3件)

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 Drug Delivery System を基盤とした遺伝子治療戦略の検証
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第6回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 勇磨
2. 発表標題 オルガネラ標的型DDSを基盤とした創剤研究の最前線
3. 学会等名 第72回北日本小児科学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H
2. 発表標題 Targeting mitochondria: innovation of mitochondrial drug delivery system (DDS) to mitochondrial medicine
3. 学会等名 Mitochondrial Medicine -Therapeutic Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 勇磨、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療戦略の検証
3. 学会等名 第20回日本ミトコンドリア学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021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核酸ナノ医薬品の創製を目指して
3. 学会等名 ゲノム創薬・創発フォーラム第9回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H
2. 発表標題 Mito-porter, A Mitochondrial Dds Towards An Innovative Therapy.
3. 学会等名 2020 Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society.（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H
2. 発表標題 MITO-Porter, a cutting-edge mitochondrial DDS.
3. 学会等名 Pharmaceutical Society of Korea 2020.（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020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医薬品の創製を目指して
3. 学会等名 第35回日本小児神経学会北海道地方会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田 勇磨
2. 発表標題 希少疾患の未来について考える 患者とともに挑むイノベーション
3. 学会等名 iPark Frontier Talk（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 勇磨
2. 発表標題 ミトコンドリアDDSの夢： ミトコンドリア標的型ナノ医薬品の創出
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会（招待講演）
4. 発表年 2022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挑戦
3. 学会等名 第28回日本遺伝子細胞治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田勇磨、丸山美菜子、原島秀吉
2. 発表標題 治療用rRNA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 日本核酸医薬学会第7回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野呂田楓、石塚宣、廣瀬みさ、真栄城正寿、渡慶次学、原島秀吉、山田勇磨
2. 発表標題 mtDNA 変異モデルマウス細胞におけるゲノム編集装置の活性評価
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柳 茂、三牧 正和	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 245
3. 書名 ミトコンドリア 疾患治療の新時代	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ミトコンドリアDNAの3 2 4 3位のアデニンからグアニンへの変異による変異tRNA Leuを検出する方法	発明者 山田勇磨、原島秀吉	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-73420	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ミトコンドリアゲノム編集用脂質ナノ粒子	発明者 山田勇磨、原島秀吉、他	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-027872	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------