

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21872

研究課題名（和文）細胞共生能を有する人工ミトコンドリアの創製

研究課題名（英文）Development of artificial mitochondria with cell-symbiosis ability

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアを疾患細胞に移植するミトコンドリア移植療法は非常に有用であるが、治療効果を得るのに最適な共生（細胞導入・ミトコンドリアコミュニケーション）が実現できていない事に問題があった。本申請研究では、治療用ミトコンドリアとして共生能を付加した人工ミトコンドリアを創製する事を研究の目標に据えた。本申請研究では、人工ミトコンドリアの製剤化および細胞内動態の最適化、ミトコンドリア病モデルを用いた治療効果の検証。研究期間内に、人工ミトコンドリアの創製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人工ミトコンドリアは、オルガネラ製剤という新たな領域を拓き、根本的な治療が難しいミトコンドリア病などの治療に大きく貢献する事が期待される。さらに、組織・個体レベルでの人工ミトコンドリアの移植が実現すれば新たなモデル動物を作出し、ミトコンドリアが関連する個体レベルの生命現象の生体制御研究を世界に先駆けて着手する事が可能になる。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。

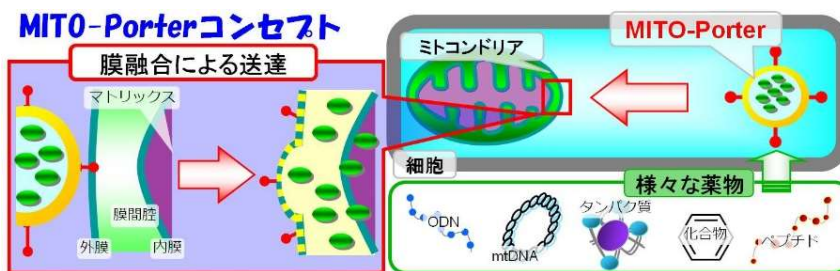
研究成果の概要（英文）：Mitochondria transplantation therapy, in which mitochondria are transplanted into diseased cells, could be a very useful, but there is a problem in that optimal symbiosis (cellular internalization and mitochondrial communication) for therapeutic efficacy has not been achieved. The aim of this research was to develop artificial mitochondria with enhanced symbiotic ability for use in therapeutic applications. This research proposal includes (i) the formulation of artificial mitochondria and the optimization of their intracellular dynamics, (ii) validation of their therapeutic efficiency using a model of mitochondrial disease cells. A number of results regarding the development of artificial mitochondria have been achieved and evaluated in preliminary experiments.

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 共生 移植 オルガネラ製剤

## 1. 研究開始当初の背景

既存のミトコンドリアへの Drug delivery system (DDS) 技術では、送達薬物子の大きさや種類を制限するため、タンパク質・核酸な



どの治療分子候補となり得る高分子を用いた薬物療法の実現は極めて困難な状況であった。このような状況の基、我々は MITO-Porter の開発を進め、様々な高分子のミトコンドリア送達に成功し、また動物実験においても一定の治療実績を示してきた [引用文献①、②]。ここ 10 年間のミトコンドリア DDS 研究の進展は目覚ましいが、ミトコンドリアを対象とした医薬品としてはイデベノン(LHON 治療に限定される低分子薬)が承認されるに留まっている。この原因としては、ミトコンドリア病の発症メカニズムが複雑である事が問題としてあげられる。ミトコンドリアの機能低下の理由は、ミトコンドリア DNA 由来/核ゲノム由来タンパク質、ミトコンドリアが構成する脂質・補酵素の変性・欠損など多岐にわたるため、特定の治療ターゲットを定める事が難しい。そのため、特定の原因を有する疾患モデルでの検証ができたとしても、多くの患者のための医薬品とはなり得ない。このような背景の基、ミトコンドリアに治療薬を送るのではなく、ミトコンドリアを治療薬として製剤化する事を発想した。米国・ボストン小児病院にて実施されたミトコンドリア移植療法は、我々の治療方針を支持するものであり、細胞導入能・ミトコンドリア移行能を付加した高機能の人工ミトコンドリアの製剤化を試みる、今回の申請に至った。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアを疾患細胞に移植するミトコンドリア移植療法は非常に有用であるが、治療効果を得るのに最適な共生 (細胞導入・ミトコンドリアコミュニケーション) が実現できていない事に問題があった。本申請研究では、治療用ミトコンドリアとして共生能を付加した人工ミトコンドリアを創製する事を研究の目標に据え研究を進めた。具体的には、細胞から単離したミトコンドリアをミトコンドリア標的用ナノカプセル・MITO-Porter に内包し、細胞導入能・ミトコンドリア移行能を付加した高機能の人工ミトコンドリアの構築を試みた。

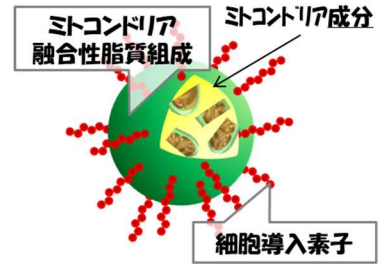
## 3. 研究の方法

2020 年度は、(1) 人工ミトコンドリアの製剤化および細胞内動態の最適化について、「ミトコンドリア材料のパッケージング」および「細胞内動態観察」を、2021 年度は、(2) ミトコンドリア病モデルを用いた治療効果の検証について、「疾患モデルを用いた検証」を中心に研究を進めた。

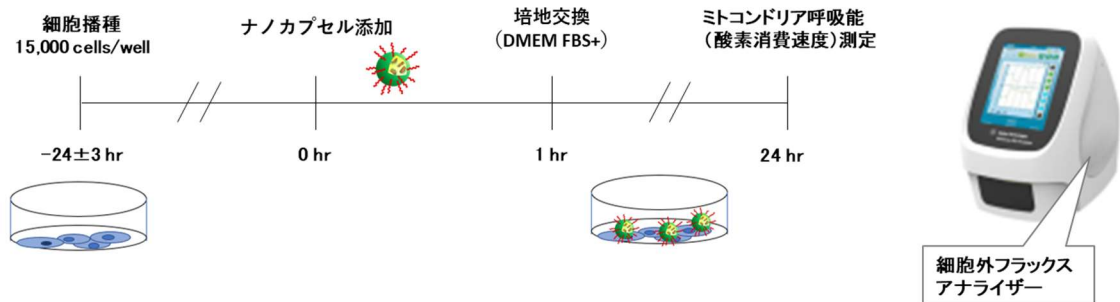
#### 4. 研究成果

##### (1) 人工ミトコンドリアの製剤化および細胞内動態の最適化

培養細胞から単離したミトコンドリア材料を細胞導入能およびミトコンドリア移行能を有する脂質膜でパッケージングしたナノカプセルを構築する事に成功した。粒子径は 100 nm 程度で正電荷であり、細胞導入素子が含まれる正電荷の脂質でパッケージングされている事が確認できた。また、ミトコンドリアのタンパク質および核酸濃度を測定したところ、材料に用いたミトコンドリアのタンパク質、核酸成分が効率良く内封されていることを確認した (90%以上の内封率)。

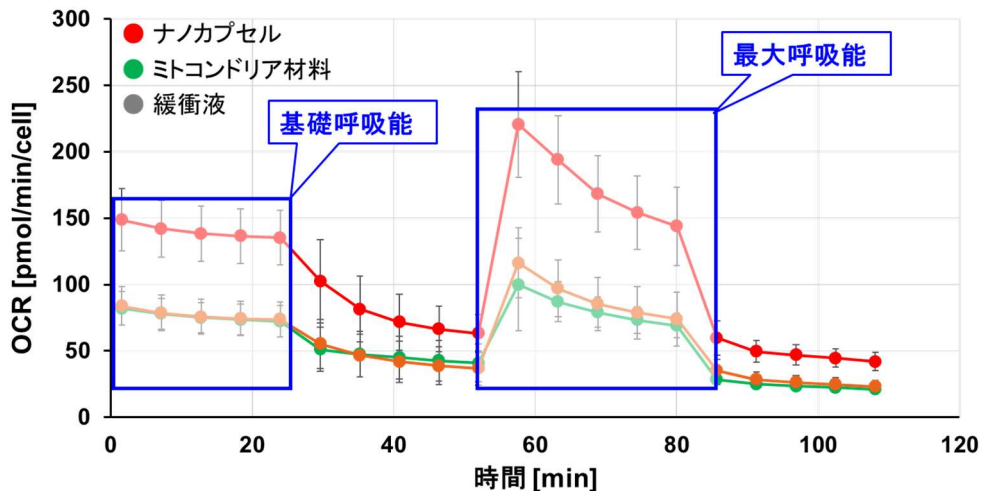


北海道大学病院の協力を得て、ミトコンドリア患者由来細胞 (Mt 疾患細胞) の樹立に成功した。Mt 疾患細胞に、蛍光標識を施したミトコンドリア含有ナノカプセルを添加し、細胞内動態観察 (蛍光顕微鏡) を行い、疾患細胞ミトコンドリアにナノカプセルが送達されることを確認した。



##### (2) ミトコンドリア病モデルを用いた治療効果の検証

治療効果を検証するために、ミトコンドリア呼吸能を測定した。培養細胞にナノカプセルを添加し、24 時間後の酸素消費速度を細胞外フラックスアナライザーを用いて測定した。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。



上図では、縦軸に酸素消費速度、横軸に測定開始からの経過時間を示してある。薬剤添加などの外部刺激がない状況でのミトコンドリア酸素消費速度を基礎呼吸能として評価する。また、薬剤添加によって最大限に呼吸鎖複合体を駆動した際の酸素消費速度・最大呼吸能を評価対象に含

めた。コントロールの緩衝液添加群とミトコンドリア材料投与群の酸素消費プロット図は同様の傾向を示した。一方で、ナノカプセル添加群では、測定の全時間帯で酸素消費速度の値が高く、基礎呼吸能、最大呼吸能の値も高く示された。

さらに、モデル動物を用いた検証の準備として、モデルマウスの心臓にナノカプセルを移植し、心機能、細胞機能、ミトコンドリア機能を評価するプロトコルを確立した [引用文献③]。

本研究で開発する『人工ミトコンドリア』は、オルガネラ製剤という新たな領域を拓き、根本的な治療が難しいミトコンドリア病などの治療に大きく貢献する事が期待される。

#### <引用文献>

- ① Yamada Y, Satrialdi, Hibino M, Sasaki D, Jiro A, Harashima H. Power of mitochondrial drug delivery systems to produce innovative nanomedicines. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 154-155: 187-209 (2020).
- ② Yamada Y, Ishizuka S, Arai M, Maruyama M, Harashima H. Recent advances in delivering RNA-based therapeutics to mitochondria. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11: 1-11 (2022).
- ③ Sasaki D, Abe J, Takeda A, Harashima H, Yamada Y, Transplantation of MITO cells, mitochondria activated cardiac progenitor cells, to the ischemic myocardium of mouse enhances the therapeutic effect. *Sci. Rep.* 12: 4344 (2022).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamada Y, Ito M, Arai M, Hibino M, Tsujioka T, Harashima H	4. 巻 21
2. 論文標題 Challenges in promoting mitochondrial transplantation therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176365.	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, 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 Tsujioka Takao, Sasaki Daisuke, Takeda Atsuhito, Harashima Hideyoshi, Yamada Yuma	4. 巻 23
2. 論文標題 Resveratrol-Encapsulated Mitochondria-Targeting Liposome Enhances Mitochondrial Respiratory Capacity in Myocardial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 112 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010112	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 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 Y, Ishizuka S, Arai M, Maruyama M, Harashima H	4. 巻 11
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 Opin. Biol. Ther.	6. 最初と最後の頁 1-11
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 5件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yamada Y, Harashima H.
2. 発表標題 Mito-porter, Investigation of Drug Delivery System Targeting Mitochondria.
3. 学会等名 The 84th annual scientific meeting of the japanese circulation society (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 Yamada Y, Harashima H.
2. 発表標題 The challenge of developing mitochondrial nano medicine based on MITO-Porter Technology
3. 学会等名 JSPCC-AHA 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 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、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリア機能を操作するDrug Delivery System
3. 学会等名 第30回日本バイオイメージング学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sasaki D, Yamada Y, Abe J, Takeda A
2. 発表標題 Mitochondria-activated myocardial progenitor cell (MITO cell) transplantation therapy in a mouse model of ischemia and reperfusion.
3. 学会等名 54th Annual meeting for European Paediatric and Congenital cardiology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田勇磨、日比野光恵、伊藤百、荒井愛永、佐々木大輔、真栄城正寿、渡慶次学、太田善浩、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリア運搬用DDS (Trans MIT system)の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木大輔、山田勇磨、後藤悠太、白石真大、武田充人、原島秀吉
2. 発表標題 ヒトミトコンドリア強化心筋幹細胞を用いた、急性心不全モデルラットに対する心筋幹細胞移植療法の治療効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田勇磨、日比野光恵、伊藤百、荒井愛永、佐々木大輔、真栄城正寿、渡慶次学、太田善浩、原島秀吉
2. 発表標題 ミトコンドリア人工共生による細胞機能制御の試み
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 単離ミトコンドリアを内包した脂質膜ベースの小胞	発明者 菅沼正司、山田勇磨、 原島秀吉、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/049314	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 単離ミトコンドリアの再構成用の凍結乾燥製剤	発明者 山田勇磨、佐々木大 輔、原島秀吉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-122400	出願年 2020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 <a href="https://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/">https://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/</a> 北海道大学 大学院薬学研究院 HP <a href="https://www.pharm.hokudai.ac.jp/">https://www.pharm.hokudai.ac.jp/</a>
--



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