

機関番号：10101  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21700483  
 研究課題名（和文）ミトコンドリア標的型ナノデバイス、MITO-Porterの創製と疾患治療への応用  
 研究課題名（英文）Development of Multi-layered nano-device for mitochondrial drug delivery and an innovative approach for mitochondrial disease' 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(和文)：ミトコンドリア (Mt)を標的とする分子生物・生化学研究および疾患治療を実現するためには、Mt への分子送達が必要であるが、有用なシステムは報告されておらず、特にタンパク質や核酸などの高分子送達に関しては皆無に等しい。本研究では、『膜融合を介した Mt への薬物送達システムの開発』を目的とし、送達分子が細胞膜・Mt 膜融合性エンベロープでパッケージングされた多重型 MITO-Porterを開発した。本システムを用いる事で、今までは不可能であったMtを標的とするタンパク質治療、さらには遺伝子治療を可能とする事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial dysfunction is associated with a variety of human diseases. Effective medical therapies for mitochondrial diseases will ultimately require an optimal drug delivery system, which will likely be achieved through innovations in the nanotechnology of intracellular trafficking. To achieve efficient mitochondrial drug delivery, two independent processes, i.e., “cytoplasmic delivery through the cell membrane” and “mitochondrial delivery through the mitochondrial membrane” are required. Here, we report the development of a Dual Function MITO-Porter (DF-MITO-Porter), a nano carrier integrating both efficient cytoplasmic delivery and mitochondrial macromolecule delivery. We show that the DF-MITO-Porter effectively delivers exogenous macro-biomolecules into the mitochondrial matrix, and provide a demonstration of its potential use in therapies aimed at mitochondrial DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 ・ 医用生体工学・生体材料学

キーワード：薬学、ミトコンドリア、バイオテクノロジー、癌、細胞・組織

### 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。申請者は世界に先駆けてミトコンドリアを標的とする新規送達戦略としてミトコンドリア膜融性リポ

ゾームMITO-Porterを構築し、生細胞ミトコンドリアへの高分子送達に成功している[Y. Yamada et al, Biochim. Biophys. Acta (2008), 若手研究(スタートアップ)H19～H20]。申請者は、『MITO-Porterを用いた疾患治療の実現』を究極の目標とし、①生細胞ミトコンドリアへの送達率の向上、②ミトコンドリア遺伝子が存在するマトリクスへの送達検証、③遺伝子キャリアへの改変を行い、生細胞ミトコンドリアを標的とした遺伝子送達システム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

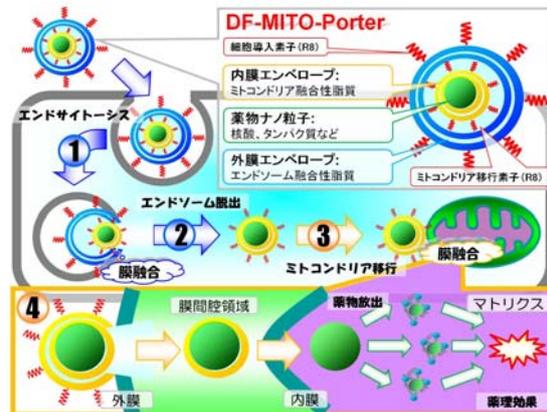
本研究では、膜融合を介して生細胞ミトコンドリアへの物質送達を可能とする、ミトコンドリア標的型ドラッグデリバリーシステム(DDS): 多重型MITO-Porterの開発を行う。研究戦略は、送達薬物をコアとするナノ粒子を形成し、細胞膜とミトコンドリア膜を突破するために、エンベロープを多重構造にする。最外層には細胞導入素子を、中間層にはミトコンドリア移行性素子を付加し、ナノ粒子のままミトコンドリア内へ送達させる。初年度(H21度)は、癌細胞ミトコンドリアへの薬物送達が可能な多重型MITO-Porterの開発を行い、ミトコンドリアへのタンパク質送達およびその薬理効果の評価を行った。本研究では、DNase Iタンパク質をmtDNAの存在するミトコンドリアマトリクスに送達し、癌細胞のmtDNAを分解する事で、ミトコンドリアを破壊し癌細胞を死滅させるアプローチに挑戦する。研究の後半には、遺伝子搭載型MITO-Porterの開発を行い、癌細胞(疾患細胞)ミトコンドリアへの遺伝子送達およびその評価を中心に研究を進めた。本研究の最終目標は、我々の開発したDDSが生細胞ミトコンドリア内でmtDNAに対して機能発現する事(遺伝子治療)を検証する事である。

## 3. 研究の方法

本研究では、ミトコンドリア関連疾患の新規治療法を実現するために、ミトコンドリア標的型ナノデバイス、多重型MITO-Porterの開発を行った。送達物質としては、DNase Iタンパク質を第一候補として選択し、生細胞ミトコンドリアでの薬理機能の評価する。具体的には、DNase Iを多重型MITO-Porterにより、ミトコンドリア内に送達しmtDNAを分解し、癌細胞を死滅させる今までにないアプローチからの癌治療を目指す。さらに、研究期間の終盤にはミトコンドリアへの遺伝子送達キャリアの開発を行い、ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療のコンセプトの検証を行った。

(1) 多重型MITO-Porterの構築および薬理効果の評価(タンパク質送達): DNase Iナノ粒子をミトコンドリア融合性脂質膜でコートしエンベロー

プ化する。その後、細胞膜融合性脂質膜でコートし、多重型MITO-Porterを構築した。次に、本キャリアを生細胞に添加し、薬理効果の評価を行った。薬理評価は、ミトコンドリアで産生されるNADH量を測定して行った。mtDNAが分解されたミトコンドリアは活性が減少しており、NADHの産生量が減少する事が予想される。



(2) ミトコンドリアマトリクス送達の検証: ミトコンドリアでの遺伝子治療を実現するためには、ミトコンドリア遺伝子の存在するマトリクスを標的としたDDSが必要不可欠である。申請者は、MITO-Porterによるミトコンドリアマトリクス送達が可能か否かを検証した。核酸染色試薬PIを封入したキャリアを単離ミトコンドリアに添加し、mtDNAが結合して生じたPI蛍光量を測定した。更に、生細胞においてもミトコンドリアマトリクス送達が可能か否かを検証した。

(3) 疾患細胞ミトコンドリアへの遺伝子送達と疾患治療への応用(遺伝子送達):

①遺伝子搭載型多重型MITO-Porterの構築および遺伝子導入の最適化: 遺伝子(pDNA)ナノ粒子をミトコンドリア融合性脂質膜および細胞膜融合性脂質膜でコートした多重型MITO-Porterを構築した。次に、本キャリアを癌細胞(HeLa細胞、疾患細胞モデル)に添加した後に、ミトコンドリア内に導入されたDNA量をリアルタイムPCR法によって定量した。

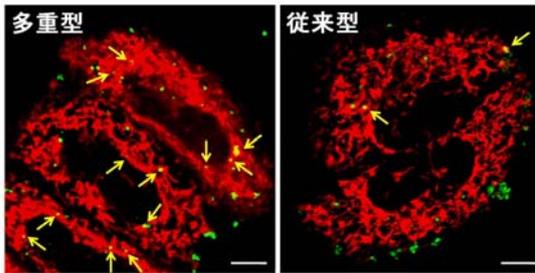
②癌細胞ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療の試み: DNase I封入MITO-Porterを癌細胞に添加し、DNase IによるmtDNAの切断効率をPCR法によって定量した。

## 4. 研究成果

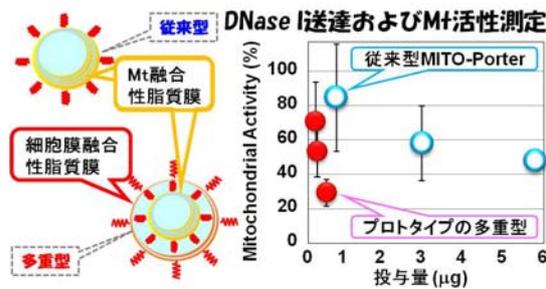
(1) 多重型MITO-Porterの構築および薬理効果の評価(タンパク質送達):

① DNase I封入多重型MITO-Porterの構築およびミトコンドリア送達能の評価: DNase Iナノ粒子をミトコンドリア融合性脂質膜・細胞膜融合性脂質膜でコートした多重型MITO-Porterを構築

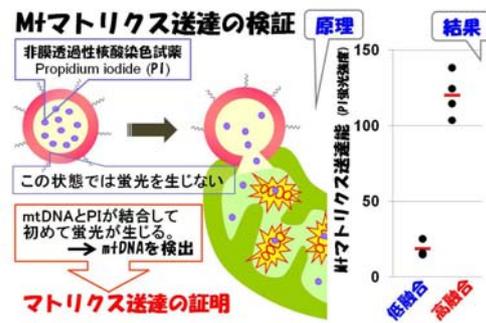
した。粒子径、表面電位を測定し最適化を行い、正に帯電した 100 - 150 nm の多重型構造体を調製する事に成功した。次に、多重型 MITO-Porter の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、ミトコンドリア送達能を評価した。その結果、多重型 MITO-Porter は細胞膜融合性膜を有さない従来型 MITO-Porter と比較してミトコンドリア送達能の劇的な向上が観察され、薬物送達における多重型の有用性が示された。



② 薬理効果の評価: 次に、本キャリアを生細胞に添加し、ミトコンドリア活性を測定した。DNase I が送達された場合、mtDNA が分解され、ミトコンドリア活性の低下が観察される。従来型の MITO-Porter を多重化したプロトタイプを評価した結果、従来型と比較して劇的なミトコンドリア活性の低下が観察され、多重型の有用性が示された [Y. Yamada et al, *Mol. Ther.* (in press)].



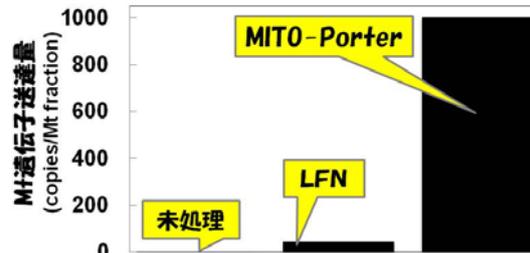
(2) ミトコンドリアマトリクス送達の検証:ミトコンドリアでの遺伝子発現を実現するためには、ミトコンドリアマトリクスを標的とした DDS が必要不可欠である。申請者は、MITO-Porter によるミトコンドリアマトリクス送達が可能か否かを検証した。核酸染色試薬 PI を封入したキャリアを単離ミトコンドリアに添加し、mtDNA が結合して生じた PI 蛍光量を測定した。その結果、MITO-Porter はミトコンドリア低融合性キャリアよりも高い蛍光強度を示し、ミトコンドリアマトリクス送達が可能である事が示唆された。更に、生細胞においてもミトコンドリアマトリクス送達が可能であることを確認している [Y. Yasuzaki, Y. Yamada et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2010)].



(3) 疾患細胞ミトコンドリアへの遺伝子送達と疾患治療への応用 (遺伝子送達):

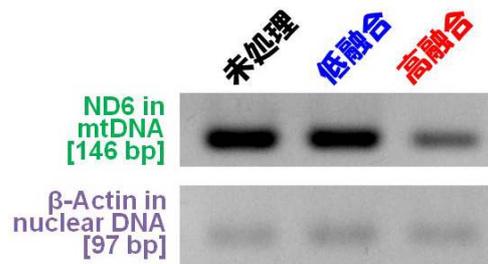
① 遺伝子搭載型 MITO-Porter の構築および遺伝子導入の最適化: 遺伝子 (pDNA) ナノ粒子をパッケージングした MITO-Porter を構築した。次に、本キャリアを HeLa 細胞に添加した後に、ミトコンドリア内に導入された DNA 量をリアルタイム PCR 法によって定量した。本評価によって、HeLa 細胞を用いた実験で MITO-Porter が遺伝子導入試薬 (LFN) よりも飛躍的に高いミトコンドリア送達能を有する事を確認した。

### ミトコンドリア送達遺伝子量評価



② 癌細胞ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療の試み: DNase I 封入 MITO-Porter を癌細胞に添加し、DNase I による mtDNA の切断効率を PCR 法によって定量した。その結果、本キャリアは mtDNA を選択的かつ効率的に切断することが確認され、mtDNA に分子を作用させる事が可能であることを確認した [Y. Yamada et al, *Mol. Ther.* (in press)].

### PCR法を利用した遺伝子の検出



本研究では、ミトコンドリア融合性リポソーム MITO-Porter による生細胞ミトコンドリアへの遺伝子送達およびその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 がミトコンドリアマトリクス送達に有用である事を示した。

B. 遺伝子搭載型 MITO-Porter を構築し、効率的に生細胞ミトコンドリアへの遺伝子送達を実現する事を確認した。

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 DDS として有用であると考えられる。本キャリアは、mtDNA を標的とした送達分子の機能発現にも成功し、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療キャリアとしての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。申請者は究極の目標として ミトコンドリア標的型遺伝子発現キャリアの開発 を掲げている。本システムが構築されれば、世界で初めてミトコンドリア内での外来遺伝子発現 が実現する。また、個体レベルでのミトコンドリアへの遺伝子導入が実現すれば新たな疾患モデル動物の作出が可能になり、世界に先駆けて難治性疾患の新しい治療法も確立することが可能になる。 将来的には、ミトコンドリアを標的とした診断・治療システムへと発展させ、世界初・且本発のミトコンドリア標的型 DDS によるミトコンドリア関連疾患治療法の開発 を目指していきたい。

本申請研究で得た成果を元に、in vivo ミトコンドリア DDS の構築 **〔保健医療分野における基礎研究推進事業〕** およびミトコンドリア遺伝子発現システムの開発 **〔若手研究A〕** に関する申請研究が採択され、現在鋭意遂行中である。本申請研究で確立した基盤技術は申請者にとってこれからの根幹をなす重要な成果であると確信している。

#### 〔今後の展望〕

##### A. in vivo ミトコンドリア DDS の構築

多重型 MITO-Porter を in vivo 適応型へと発展させ、動物実験でのミトコンドリア疾患治療のコンセプトを検証する。本研究に関しては、下記の研究費が採択されている。

●独立行政法人医薬基盤研究所 保健医療分野における基礎研究推進事業 H22 年～H24 『ミトコンドリア標的型 DDS の開発』(代表) 60,000(千円)/3 年

##### B. ミトコンドリア標的型遺伝子発現キャリアの構築

『ミトコンドリア遺伝子発現』を可能とする革新的基盤技術の構築を目的としミトコンドリアでの遺伝子発現を可能とする pDNA を MITO-Porter によって送達する。本研究では、ミトコンドリアでの遺伝子発現のために、ミトコンドリア独自のプロモーター、遺伝子コドン有するプラスミドを構築する予定である。本研究に関しては、下記の研究費が採択されている。

●若手研究(A) H23 年～H25 『ミトコンドリア遺伝子送達システムの開発と骨格筋における遺伝子発現の検証』(代表) 29,229 (千円)/3 年

#### 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, R. Furukawa, Y. Yasuzaki, H. Harashima. Dual Function MITO-Porter, a nano carrier integrating both efficient cytoplasmic delivery and mitochondrial macromolecule delivery. *Mol. Ther.* (in press). 査読あり
2. R. Furukawa, Y. Yamada (first author), M. Takenaga, R. Igarashi, H. Harashima. Octaarginine-modified liposomes enhance the anti-oxidant effect of Lecithinized superoxide dismutase by increasing its cellular uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 796-801 (2011). 査読あり
3. Y. Yasuzaki, Y. Yamada (first author), H. Harashima. Mitochondrial matrix delivery using a MITO-Porter, a liposome-based carrier that specifies fusion with mitochondrial membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397 181-186 (2010). 査読あり
4. Y. Yamada, T. Nomura, H. Harashima, A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui. Intranuclear DNA Release is a Determinant of Transfection Activity for a Non-viral vector: Biocleavable Polyrotaxane as a Supramolecularly Dissociative Condenser for Efficient Intranuclear DNA Release. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 1218-1222. (2010) 査読あり

[学会発表] (計 16 件)

1. 山田勇磨 “ミトコンドリアとDDS～日本発・世界初の研究・技術・創薬を目指して～若手研究者公開特別シンポジウムミトコンドリアとDDS 1” 札幌 2011年 1月21日 (オーガナイザー: 山田勇磨).
2. Y. Yamada, R. Furukawa, Y. Yasuzaki, H. Harashima. “Dual Function MITO-Porter, an innovative nano-carrier system for mitochondrial drug delivery” FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) 2010. Nov 14-18, 2010. New Orleans, USA.
3. Y. Yamada, R. Furukawa, Y. Yasuzaki, H. Harashima. “Membrane fusions open a new avenue for mitochondrial delivery: Dual Function MITO-Porter, a nano-carrier system with cell and mitochondrial membranes-fusogenic activity” International liposome research days & lipids liposomes & membrane biophysic. Aug 4-8, 2010. Vancouver, Canada.
4. 山田勇磨, 河村恵理子, 安崎友香理, 新藤充, 原島秀吉. “ボクシレン酸 (抗アポトーシス作動薬) 搭載ミトコンドリア標的型DDS (MITO-Porter) の開発” 第26回日本DDS学会. 2010年6月17-18. 大阪.
5. 山田勇磨, 古川亮, 安崎友香理, 原島秀吉. “ミトコンドリア標的型ナノデバイス“多重型MITO-Porter”の創製. 第9回 日本ミトコンドリア学会年会. 2009年12月17-19日. 東京.
6. Y. Yamada, Y. Yasuzaki, R. Furukawa, H. Harashima. “MITO-PORTER: A LIPOSOME-BASED NANO-DEVICE FOR MITOCHONDRIAL MACROMOLECULE DELIVERY VIA MEMBRANE FUSION-INNOVATIVE STRATEGY AIMED FOR MITOCHONDRIAL GENE THERAPY-” Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium. Nov 3-6, 2009. Fukuoka, Japan
7. 山田勇磨, 古川亮, 安崎友香理, 原島秀吉. “ミトコンドリア標的型ナノデバイス” 多重型MITO-Porter”の製剤化に関する検討 第25回日本DDS学会. 2009年7月3-4. 東京.
8. 山田勇磨, 古川亮, 安崎友香理, 原島秀吉. “ミトコンドリア標的型ナノデバイス” 多重型MITO-Porter”の有用性の検証. 日本薬剤学会第24年会. 2009年5月21-23日. 静岡.

[図書] (計 2 件)

1. 山田勇磨, 中村孝司, 原島秀吉 「多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)を基盤とした新規タンパク質DDSの構築と臨床開発研究への応用」、ペプチド・タンパク性医薬品の新規DDS製剤の開発と応用—*遺伝子医学MOOK別冊* (編集: 山本昌) メディカルドゥ (in press).
2. I.A. Khalil, Y. Yamada, H. Akita, H. Harashima “Chapter 25 Uptake Pathways Dependent Intracellular Trafficking of DNA Carrying Nanodelivery System” *Organelle-Specific Pharmaceutical Nanotechnology*, Editors: Volkmar Weissig and Gerard G.M. D’Souza Wiley A John Wiley&Sons, Inc., Publication 475---506 (Nov 2, 2010)

[その他]

ホームページ:

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

シンポジウムの開催:

申請者が行っている研究を国民・社会へ広く発信するために、申請者自らが若手研究者公開特別シンポジウムを主催した。

●**ミトコンドリアとDDS1 ～日本発・世界初の研究・技術・創薬を目指して～**  
札幌 2011年 1月21日

本シンポジウムでは、ミトコンドリア研究とDDS研究を中心に活躍する若手研究者を一堂に会し、これらの領域が関わる様々な分野の研究交流を活発にする事を目的とした。本会には50人以上の参加者があり、研究者同士の交流の場としての役割を果たすとともに、大学院生・大学生の皆さんにも大いに刺激を与えた。

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