

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19920

研究課題名(和文)ミトコンドリア品質管理を行う機能性ナノキャリアによる加齢性疾患治療

研究課題名(英文) Treatment of age-related diseases with functional nanocarriers that perform mitochondrial quality control

研究代表者

川上 浩良 (Kawakami, Hiroyoshi)

東京都立大学・都市環境科学研究科・教授

研究者番号：10221897

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)：細胞老化の蓄積は2型糖尿病、動脈硬化、心不全などの加齢性疾患の発症に関わることが明らかで、その主原因の1つは、細胞内に蓄積した不全ミトコンドリア(Mt)の存在である。本来、マイトファジーは不全Mtを選択的に除去するMtの品質管理機能を担っているが、不全Mtから放出されるROSはDNAを損傷しクロマチン断片化、老化を行進させる。

本研究ではミトコンドリアの品質管理を目的とした新規ナノキャリアを合成、そのキャリアを用い老化細胞の老化抑制(マイトファジー誘導)あるいは除去(アポトーシス誘導：Senolytic薬剤)を標的とした加齢性疾患創薬を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初、細胞老化は培養系で起こるアーチファクトと考えられていたが、現在では個体内においても老化細胞は存在し、様々な加齢性疾患の発症に関わることが明らかとなっている。特に老化細胞の表現型の1つであるSASPは、老化の後期において周辺組織に慢性炎症を引き起こし、がんや慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病などを含めた様々な加齢性疾患を発症、さらには病態悪化へ導く増悪因子として考えられている。そのため、老化細胞を標的として、その老化細胞の除去(senolysis)を目的とする創薬や、老化細胞の若返りなどでその周辺細胞への影響を排除する研究が世界中で検討されている。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of cellular senescence in the body is clearly involved in the development of age-related diseases such as type 2 diabetes, atherosclerosis, heart failure, and so on. One of the main reasons is the presence of intracellularly accumulated dysfunctional mitochondrial (Mt). Originally, mitophagy plays a quality control function of Mt and selectively removes dysfunctional Mt, but ROS released from the Mt damages DNA, leading to chromatin fragmentation and aging. In this study, we synthesized novel nanocarriers for mitochondrial quality control and investigated drug discovery for aging-related diseases by targeting senescence inhibition (mitophagy induction) or removal (apoptosis induction: Senolytic agents) of senescent cells using these carriers.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ミトコンドリア 機能性ナノキャリア 加齢疾患治療 マイトファジー アポトーシス

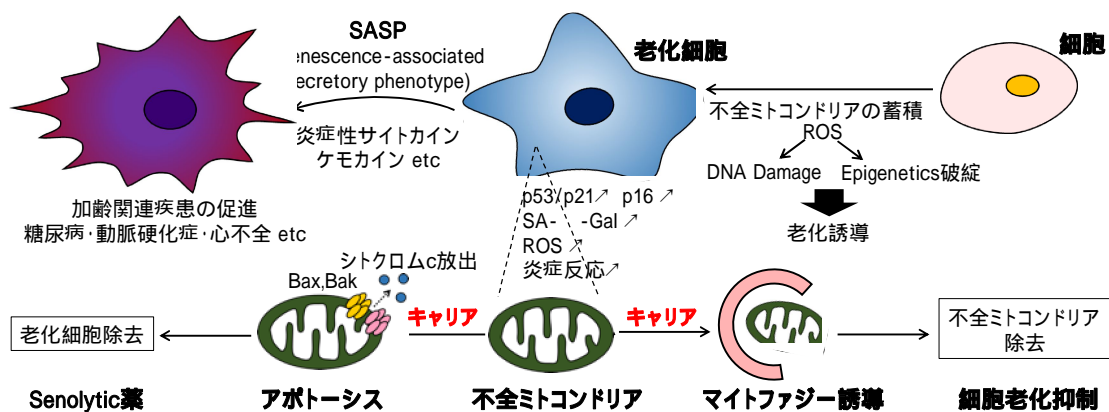
1 研究開始当初の背景

当初、細胞老化は培養系で起こるアーチファクトと考えられていたが、現在では個体内においても老化細胞は存在し、その蓄積が2型糖尿病、動脈硬化、心不全などの加齢性疾患の発症に関わることが明らかとなっている(*Nature*, 479,232 (2011), *Nature*, 530,184 (2016)など多数)。特に老化細胞の表現型の1つであるSASP(senescence-associated secretory phenotype)は、老化の後期において周辺組織に慢性炎症を引き起こし、がんや慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病などを含めた様々な加齢性疾患を発症、さらには病態悪化へ導く増悪因子として考えられている(*Cell*, 169, 1000 (2017)など多数、図1上段を参照)。そのため、老化細胞を標的として、その老化細胞の除去(senolysis)、主に細胞死の誘導、を目的とする創薬研究が世界中で検討されている(*Nature Comm.*, 11,1935(2020)など多数)。

老化が起こる主原因の1つは、細胞内に蓄積した不全ミトコンドリア(Mt)の存在である。本来、マイトファジーは不全Mtを選択的に除去するMtの品質管理機能を担っているが、老化細胞では細胞質内に大量のp53が存在しParkinと相互作用を形成、Parkin依存型ユビキチン介在型マイトファジーの誘導が阻害され、さらに不全Mtから放出されるROSがDNAを損傷しクロマチン断片化を誘導、その蓄積がcGAS/STING経路を活性化させSASP因子を発現、誘発することが知られている(*Nature*, 550,402 (2017), *Nature Comm.*, 9,1249 (2018)など多数)。

2 研究の目的

本研究ではミトコンドリアの品質管理を目的とした新規ナノキャリアを合成、そのキャリアを用い老化細胞の老化抑制(マイトファジー誘導)あるいは除去(アポトーシス誘導: Senolytic 薬剤)を標的とした加齢性疾患創薬を検討する(概念図下段を参照)。



概念図 上段:老化細胞の特徴 下段:キャリアによるマイトファジー・アポトーシス誘導の概念図

3 研究の方法

ミトコンドリア(Mt)品質が様々な加齢性疾患の発症に関わることは既に知られているが、近年、Mt 品質が細胞老化と深く関連することが明らかとなり、申請者は特に老化細胞内 Mt の品質管理維持が難治性疾患の治療に繋がる画期的な創薬創出になると考えた。細胞老化による細胞分裂停止はサイクル依存性キナーゼ阻害因子として働く p53/p21 経路と p16 が重要な役割を果たしているが、老化細胞内に大量に生成された p53 は上述したように Parkin と結合し、マイトファジーの誘導を阻害する。そこで申請者はマイトファジー・アポトーシス誘導型ナノキャリアを合成する(図 2 参照)。Parkin は Mt 膜電位の低下により誘導され、Mt 上に局在化する。適度な H₂O₂ は膜電位低下を誘導する (Mt に軽度な膜損傷が起こると Mt は膜電位を低下させ Parkin を活性化) ことが知られており、SOD 酵素活性(Mt から放出された O₂^{·-} H₂O₂) を持ち Mt 指向性を有する Mn ポルフィリン錯体(MnP)を合成、MnP と p53 阻害剤をリポソームナノキャリア(50nm 以下)に包埋することで、マイトファジー誘導を惹起する。この際、重要となるのは、(1) 老化細胞内 Mt の品質状態 (2) MnP の SOD 酵素活性と Mt 指向性 である。Mt 周辺 H₂O₂ 発生量 = (SOD 酵素活性)x(Mt 指向性)で決定され、Mt の H₂O₂ 感受性は Mt 品質に依存する。比較的品质が維持された Mt では、Mt は H₂O₂ に対し膜電位低下が優先的に起こるため不全 Mt を除去するマイトファジーが誘導される。一方、著しく品質低下した Mt、つまり SASP を発生する後期老化細胞内では、Mt は H₂O₂ に対してアポトーシスを優先的に起こすため死細胞を誘導する Senolytic 薬剤として機能する、との仮説を立てた。

この仮説を立証するため、実験は以下の 2 通りで進める。

- (1) ROS で細胞老化を誘導しキャリア機能を検証：既に正常線維芽細胞(WI-38)に ROS 暴露で、増殖停止や p21, p16, SA-β-Gal の増加を確認(老化)、実験条件は確立した。その後、ナノキャリアを用いて細胞老化の抑制を試みた。
- (2) 後期の細胞老化は細胞外で炎症を誘発し、周辺細胞を老化や疾患に誘導するため、それら細胞を標的としてナノキャリアを用い、老化細胞にアポトーシスの誘導を検討した。

4 研究成果

(1) ナノキャリアを用いた細胞老化の抑制検討

老化細胞に対し、蛍光色素封入ナノキャリア(F-NC)を添加して 24 時間インキュベートした後の細胞の細胞核を DAPI で染色した共焦点レーザー顕微鏡画像を図 1 に示した。F-NC に封入した蛍光色素(FITC)由来の蛍光が細胞核からは観測されず、細胞質に広く分布して観測されたことから、キャリアが細胞内部に取り込まれた後、内包された色素分子がキャリアから放出されミトコンドリアが存在する細胞質へ広く拡散している様子が確認された。

Human IL-8 ELISA Kit (Proteintech Group)を用いて拡大培養前後およびナノキャリア処理後の老化細胞から産生される IL-8 の分泌量の変化を評価した。その結果、拡大培養に伴い増加した

IL-8 分泌量が M-NC 処理によって減少した (Data not shown)。他の細胞老化マーカーの増減とも傾向が一致することから、拡大培養に伴う細胞老化で増加した SASP 因子の分泌が、ナノキャリア処理による細胞老化状態からの回復 (若返り) によって抑制されたことが確認された。

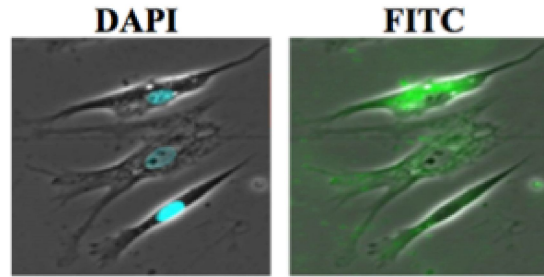


図1. 蛍光色素封入リポソームナノ粒子 (F-NC) で処理した老化間葉系幹細胞 (AT-MSCs) の共焦点レーザー顕微鏡画像

(2) ナノキャリアを用いた細胞老化へのアポトーシス誘導

ナノキャリア内で過酸化水素を誘導する SOD 活性ポルフィリン量を増やす、あるいはその SOD 活性を増大させることにより、老化細胞内でアポトーシス誘導が優先的に起こると考え、ナノキャリアを合成した。アポトーシス誘導はウエスタンブロットとフローサイトメトリーにより評価した。その結果、ナノキャリア投与により老化細胞に細胞死が認められ、BAX の高発現が確認されたことからアポトーシス誘導が明らかとなり、ナノキャリアの調整や SOD 活性ポルフィリン構造により老化細胞の若返りとアポトーシス誘導が制御可能であることが示された。

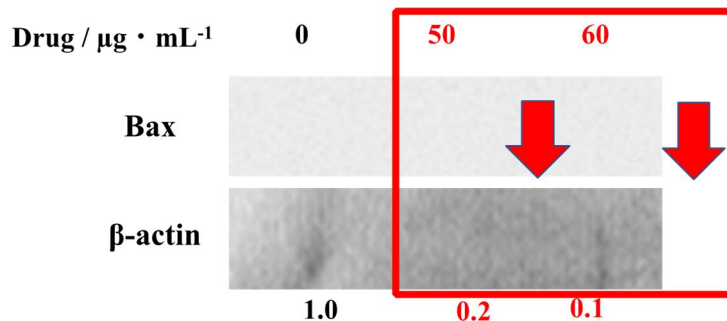


図2. ナノキャリア投与量による老化細胞内のBAX量の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 美野晃輝, 山崎健, 芦葉恵介, 佐藤 潔, 川上浩良
2. 発表標題 老化間葉系幹細胞の機能回復を可能とするマイトフ ァジー誘導ナノキャリア
3. 学会等名 第37 回日本DDS 学会学 術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芦葉 恵介, 山崎 健, 佐藤 潔, 川上 浩良
2. 発表標題 マイト ファジー誘導ナノキャリアによる間葉系幹細胞の老 化抑制
3. 学会等名 第50 回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 美野晃輝, 芦葉恵介, 佐藤 潔, 川上浩良
2. 発表標題 老化 間葉系幹細胞の機能回復を目指したマイトファジー 誘導ナノキャリア
3. 学会等名 第59 回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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