

ミトコンドリア標的型ナノデバイス

“MITO-Porter” の創製

～膜融合を介したミトコンドリアへの新規薬物送達戦略～

学位論文内容の要旨

【序論】

近年、ミトコンドリアと様々な疾患との関連が明らかとなっており、本オルガネラを標的とした薬物治療が注目されている^{1, 2)}。現在までに、ミトコンドリアを標的とした Drug Delivery System (DDS)がいくつか報告されてきたが、疾患治療を実現するレベルには達していない。特に DNA、タンパク質などの高分子の有用な送達システムは皆無である^{3, 4)}。私は、薬物キャリアとして注目されている脂質二重膜小胞(リポソーム)に着目し、ミトコンドリアを標的とした疾患治療を可能とするキャリアの構築を目指し研究を進めてきた。本研究では、膜融合を介してミトコンドリアへの薬物送達を可能とするリポソーム“MITO-Porter”を中心としたミトコンドリアを標的とした DDS の開発を試みた。

【結果と考察】

1. 高分子薬物のナノ粒子化パッケージング技術の開発

多彩な機能を有するミトコンドリアを標的とした場合、様々な治療薬物が候補として挙げられる。その中には、mtDNA (遺伝子補充) や機能性タンパク質など高分子薬物も挙げられる³⁾。これらの治療は非常に魅力的であるが、高分子薬物の効率的なパッケージング方法が確立されていなかったため、遺伝子治療、タンパク質治療への応用は難しかった。

当研究室では、新たな人工遺伝子ベクターとして多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)の開発を進めている^{5, 6)}。MENDはポリカチオンによって凝縮化された核酸ナノ粒子が脂質膜中に存在する特徴的な構造を有するため、封入率が非常に高い。そのため、MEND は薬理作用を発揮するのに十分量の薬物を疾患部位へ送達することが可能である。

MENDはpDNAの封入には適していたが、薬物候補として有望なオリゴDNA、タンパク質ではナノ粒子形成が困難であったため適応されていなかった。私は疎水基を有するポリカチオンSTR-R8を最適な比率で混合する事でオリゴDNA、タンパク質のナノ粒子形成を可能とし、高い効率で脂質膜内部に封入する事に成功した^{7, 8)}。

2. 細胞質送達型リポソームによる癌細胞ミトコンドリアへの薬物送達

ミトコンドリアへの薬物送達研究の第一弾として、リポソームを用いた癌細胞ミトコンドリアを標的とした薬物送達研究を試みた。当研究室では、癌標的リガンドであるトランスフェリン(Tf)、エンドソーム脱出因子 GALA を用いる事で癌細胞質中への薬物送達を可能とするリポソームの開発に成功している(Tf & GALA システム)。Tfは癌細胞に過剰発現する事が報告されており、薬物封入リポソームに表面修飾する事で、リポソームを受容体介在性エンドサイトーシスによって細胞内に取り込ませる事が可能である。しかし、細胞に取り込まれたリポソームはエンドソームから脱出しなければ、ライソソームで分解されてしまう。当研究室の角道らは、pH 感受性膜融合性ペプチド GALA をリポソーム表面に修飾する事で、エンドソーム内が酸性環境化になった時に膜融合を誘起し、薬物を細胞質中に送達する戦略を考案し、リポソーム内封薬物を細胞質に送達する事に成功している⁹⁾。

私は、アポトーシス誘導ペプチド、マストパラン¹⁰⁾を Tf & GALA 搭載リポソームに封入し、癌細

胞ミトコンドリアを標的とした癌細胞殺傷アプローチを試みた。マストパランがミトコンドリアに送達されるとチトクロム c が細胞質中に放出され、これが引き金となりアポトーシスが誘起される。Tf & GALA 搭載リボソームにマストパランを封入し白血病細胞株 K-562 細胞に添加し、細胞質に放出されたチトクロム c を Western blot 法により検出した結果、チトクロム c の細胞質放出が確認され、アポトーシスが誘起される事が示唆された¹¹⁾。以上の結果から、Tf & GALA 搭載リボソームを用いることでミトコンドリアへの薬物送達を可能とし、薬理活性を発揮させる事が可能であることが確認された。

3. 膜融合を介してミトコンドリアへの薬物送達を可能とするリボソーム、MITO-Porter の開発

ミトコンドリア移行能を有するペプチド MTS を用いた戦略は、タンパク質、オリゴヌクレオチドの送達においてその有用性が示されており、ミトコンドリアを標的とした薬物送達ツールとして注目されている^{12,13)}。

しかし、MTS による送達は非常に狭い透過孔を通過するため、送達させたい物質の大きさが制限され、mtDNA や高次構造を保持したタンパク質などを送達する事は不可能である¹⁴⁾。さらに、mtDNA がコードするタンパク質(呼吸鎖に関連するタンパク質)は、MTS によってミトコンドリアへ送達されないことが報告されており、ミトコンドリア病の大半を占める呼吸鎖酵素異常症を治療することは不可能である。

私は、この問題を解決するために薬物を封入したリボソームを細胞内に導入後、ミトコンドリア膜との結合 (1st STEP)、膜融合 (2nd STEP)を介してミトコンドリア内に内封薬物を放出する、ミトコンドリア融合性リボソーム (MITO-Porter) による新規送達戦略を考案した。本システムを用いる事で封入物質の種類やサイズによらない送達が可能となる。

はじめに、ミトコンドリアと融合能の高いキャリアを得るために、脂質膜組成のスクリーニングを行った。脂質膜構成成分としてよく用いられる EPC、または膜融合性脂質 DOPE と様々な脂質を組み合わせ、脂質膜の電荷、安定性、流動性などの性質を変化させたリボソームを調製した。蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET)を利用したスクリーニングの結果、ミトコンドリアと融合能の高いリボソーム (DOPE/SM/STR-R8 [9:2:1] or DOPE/PA/STR-R8 [9:2:1])を得る事に成功した¹⁵⁾。

これらの知見に基づいて調製した MITO-Porter に GFP を封入し細胞内動態を共焦点レーザー・スキャン顕微鏡によって観察した。その結果、内封物質 GFP とミトコンドリアとの共局在が確認され、生細胞内ミトコンドリアへの高分子送達が可能である事が示唆された。さらに、蛍光観察よりも分解能の高い電子顕微鏡を用いた評価を行い、直径 10 nm の金コロイドがミトコンドリア内に送達されていることを確認した¹⁵⁾。

4. 多重型 MITO-Porter の開発とその評価

MITO-Porter のミトコンドリアへの薬物送達効率を上昇させる事を目的として、本キャリアを細胞膜融合性脂質でコーティングした多重型 MITO-Porter の開発を試みた。薬理効果を評価するために、DNase I を内封薬物に選択した。ミトコンドリアへ DNase I が送達された場合には mtDNA が分解され、細胞内のミトコンドリア活性が低下する。

はじめに、DNase I ナノ粒子を形成し、ミトコンドリア膜、細胞膜と融合性の高い脂質膜でコーティングした DNase I 封入多重型 MITO-Porter の調製を行った。粒子径、表面電位測定の結果より、ナノ構造体の形成を確認した。次に、調製した多重型 MITO-Porter を HeLa 細胞に添加しミトコンドリア活性を評価した。その結果、従来型 MITO-Porter と比較して 30 倍以上の高い活性を示す事が確認された。

【結論】

ミトコンドリア高融合能リボソーム“MITO-Porter”は高分子を生細胞ミトコンドリアまで送達する事が示された。膜融合を介して内封分子をミトコンドリア内に送達する本戦略は、送達分子の大きさや種類を制限しないことが期待される。さらに、効率的な薬物封入を可能とする MEND システムと多重型コンセプトを導入した多重型 MITO-Porter は、従来型 MITO-Porter の薬物送達効率・薬理効果を飛躍的に上昇させた。今後は、MITO-Porter をより進化させ、ミトコンドリアを標的とした疾患治療が可能なキャリアの創製を目指し研究を進めていきたい。

【参考文献】

- 1) Chan D.C., Cell, 125, 1241-1252 (2006).
- 2) Schapira A.H., Lancet, 368, 70-82 (2006).
- 3) Yamada Y. et al., Mitochondrion, 7, 63-71 (2007).
- 4) Weissig V. et al., Mitochondrion, 3, 229-244 (2004).
- 5) Kogure K. et al., J Control Release, 98, 317-323 (2004).
- 6) Kogure K. et al., Adv Drug Deliv Rev, 60, 559-571 (2008).
- 7) Yamada Y. et al, Biol Pharm Bull, 28, 1939-1942 (2005).
- 8) Suzuki R. et al, Biol Pharm Bull, 30, 758-762 (2007).
- 9) Kakudo T. et al, Biochemistry, 43, 5618-5628 (2004).
- 10) Zimmerberg J. et al, Nature, 323, 36-39 (1986).
- 11) Yamada Y. et al, Int J Pharm, 303, 1-7 (2005).
- 12) Schatz G., J Biol Chem, 271, 31763-31766 (1996).
- 13) Flierl A. et al, Mol Ther, 7, 550-557 (2003).
- 14) Endo T. et al, J Biochem (Tokyo), 118, 753-759 (1995).
- 15) Yamada Y. et al, Biochim Biophys Acta, 1778, 423-432 (2008).

学位論文審査の要旨

主査	教授	原島秀吉
副査	准教授	紙谷浩之
副査	教授	井関健
副査	講師	平野剛

学位論文題名

ミトコンドリア標的型ナノデバイス

“MITO-Porter” の創製

～膜融合を介したミトコンドリアへの新規薬物送達戦略～

近年、ミトコンドリアと様々な疾患との関連が明らかとなっており、本オルガネラを標的とした薬物治療が注目されている。そのため、ミトコンドリアを標的とした Drug Delivery System (DDS)を構築する必要があるが、疾患治療を実現するレベルのシステムは構築されていない。本論文では、薬物キャリアとして注目されているリポソームに着目したミトコンドリア標的型 DDS の創製について述べられていた。山田勇磨氏はミトコンドリア標的型 DDS には、薬物の効率的なパッケージングおよび細胞内動態制御に基づいたミトコンドリアへの送達が必要不可欠と考え、これらの要素を満たす DDS の創製を目指し研究を行った。

効率的なパッケージングを目指した研究として、山田勇磨氏が所属する北海道大学大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室で構築された多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND)に着目して研究を進めた。MEND はポリカチオンによって凝縮化された核酸ナノ粒子が脂質膜中に存在する特徴的な構造を有するため、封入率が非常に高い。MEND は pDNA の封入には適していたが、薬物候補として有望なタンパク質ではナノ粒子形成が困難であったため適応されていなかった。山田勇磨氏は、タンパク質は大きな電荷を有さないためポリカチオンでのナノ粒子形成は不可能であると考え、タンパク質の有する疎水性領域に着目した。検討の結果、疎水基を有するポリカチオン STR-R8を使用する事でナノ粒子形成が可能である事をみだし、高い効率で脂質膜内部に封入する事に成功した。この成果は、タンパク質 DDS の基盤技術となると期待される。

ミトコンドリア移行能を有するペプチド MTS は、タンパク質、オリゴヌクレオチドの選択的送達ツールとして報告されているが、送達分子の種類や大きさを制限するため、mtDNA 由来

タンパク質、mtDNA などの送達は不可能である。ミトコンドリア病の大半がこれらのタンパク質の変異・欠損により引き起こされるので、MTS に代わる新たな DDS が必要と思われる。この問題を解決するために、山田勇磨氏は、膜融合を介して内封薬物をミトコンドリア内に送達するリポソーム“MITO-Porter”の開発に着手した。このシステムでは、薬物を封入したリポソームを細胞内に導入後、ミトコンドリア膜との膜融合を介してミトコンドリア内に内封薬物を放出するため、封入薬物の種類やサイズによらない送達が可能となる。ミトコンドリアと融合能の高い脂質膜組成のスクリーニングを蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) と単離ミトコンドリアを用いて行った。その結果、ミトコンドリアと融合能の高い脂質組成のリポソーム (DOPE/SM/STR-R8 [9:2:1] or DOPE/PA/STR-R8 [9:2:1] = MITO-Porter) を調製する事に成功した。次に、細胞内ミトコンドリアへの薬物送達が可能であるか否かを評価するために、MITO-Porter に GFP を封入しその細胞内動態を観察した。その結果、内封物質 GFP とミトコンドリアとの共局在が確認され、生細胞内ミトコンドリアへの高分子送達が可能である事が示唆された。さらに、電子顕微鏡を用いた評価を行い、直径 10 nm の金コロイドがミトコンドリア内に送達されていることを確認した。MITO-Porter が GFP や金コロイドを生細胞ミトコンドリアへの送達する事より、薬物の種類や大きさによらない送達が可能になると期待される。

最後に、MITO-Porter の薬物封入効率およびミトコンドリア送達能の向上を目指した多重型 MITO-Porter の構築とその薬物送達・薬理効果の評価を行った。多重型 MITO-Porter は薬物が濃縮された状態で封入されており、多重型構造の外膜には細胞膜融合性脂質を用いている。調製した多重型 MITO-Porter を HeLa 細胞に添加し、薬理効果の評価した結果、従来型 MITO-Porter と比較して 30 倍以上の高い活性を示す事が確認された。この結果より、本システムが薬物送達のみではなく薬理作用を発揮する DDS である事が示され、ミトコンドリア標的型 DDS としておおいに期待できる。

以上、山田勇磨氏は、ミトコンドリア膜融合性リポソーム“MITO-Porter”の構築に成功し、さらに薬物封入率、ミトコンドリア送達能を向上させた多重型 MITO-Porter へと発展させた。本研究において、MITO-Porter が薬理作用を発揮する DDS である事を示し、ミトコンドリアを標的とした疾患治療への応用の可能性を示したという点で非常に興味深くかつ有用であり、博士論文として十分な価値を有するものであると考えられる。