

学位論文題名

ミトコンドリア標的型核酸デリバリーシステムの開発

学位論文内容の要旨

ミトコンドリア DNA (mtDNA)は、ミトコンドリアの最深部・マトリックスに存在し、エネルギー産生に必須の 13 種類のタンパク質、22 種類の tRNA、2 種類の rRNA をコードしている。mtDNA の変異により引き起こされる疾患は多彩で、ミトコンドリア病と呼ばれる特徴的な病態を呈する。疾患ミトコンドリアでは正常 mtDNA と変異 mtDNA が混在しており、病態の発症には閾値が存在する。従って、正常 mtDNA の補充や異常 mtDNA の排除を戦略とする遺伝子治療・核酸医薬はミトコンドリア関連疾患治療に有用であり、その開発が強く望まれている。治療用プラスミドやアンチセンス核酸 (ASO)をミトコンドリアで機能させるためには、キャリアの細胞内導入、エンドソーム脱出、ミトコンドリア標的化の各素過程を克服し、マトリックスへ核酸を送達する必要がある。薬剤分子設計学研究室では、人工的なナノデバイスの構築を目指し、膜融合を介して内封物質を送達するミトコンドリア標的型リポソーム、MITO-Porter の開発を行ってきた。本論では MITO-Porter を基盤技術とした、ミトコンドリア標的型核酸デリバリーシステムの開発を最終目標とする。第一章に、エンドソーム脱出素子・GALA 修飾 MITO-Porter による機能性核酸のミトコンドリアへの送達および機能評価、第二章に、ミトコンドリア移行性 RNA aptamer による MITO-Porter のミトコンドリア標的化能促進機構の解明、第三章に mitochondrial transcription factor A (TFAM)による外来遺伝子の転写活性化について述べる。

1. エンドソーム脱出素子・GALA 修飾 MITO-Porter による機能性核酸のミトコンドリアへの送達および機能評価

ミトコンドリア核酸医薬の開発において、キャリアの細胞内動態を最適化することは重要である。筆者はエンドソーム脱出の亢進を目的として、pH 応答性ペプチド・GALA に着目した。本研究では GALA 修飾 MITO-Porter によるアンチセンス RNA (ASO)のミトコンドリアへの送達および、標的遺伝子の抑制効果について評価した。はじめに、蛍光標識 ASO を封入した MITO-Porter をトランスフェクションし、その細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により評価した。従来型の MITO-Porter を用いて導入された ASO は主にエンドソームに局在した。一方、GALA 修飾 MITO-Porter により導入された ASO は細胞質に分布し、その一部はミトコンドリアに局在した。次に、ミトコンドリア mRNA のコードする cytochrome c oxidase subunit II (COX2)に対する ASO を封入した、GALA 修飾 MITO-Porter をトランスフェクションし、24 時間後における COX2 発現量を定量的逆転写

PCRにより評価した。その結果、ASO (COX2)トランスフェクションにより40%の抑制効果が認められた。この際、細胞当たりのmtDNA量には変化が認められなかった。さらにトランスフェクション48時間後におけるCOX2タンパク質を免疫染色したところ、標的タンパク質の抑制効果が観察された。最後に、48時間後におけるミトコンドリア膜電位を測定したところ、膜電位の低下が認められた。これらの結果は、ASO封入GALA修飾MITO-Porterが、標的遺伝子の抑制によりミトコンドリア膜電位の低下を誘導することを示唆している。

2. ミトコンドリア移行性RNAアプタマーによるMITO-Porterのミトコンドリア標的化促進機構の解明

筆者はMITO-Porterのアンチセンス効果の増強を目的として、ミトコンドリア移行性RNAアプタマーに着目した。本アプタマーは核酸に直接修飾することで、ミトコンドリアへの移行性を有することが報告されている。本研究では、RNAアプタマーをMITO-Porter表面に修飾し、そのミトコンドリア移行性のメカニズムについて評価した。3種類のRNAアプタマー修飾MITO-Porterをトランスフェクションし、3時間後の細胞内導入量をフローサイトメトリーにより評価したところ、RP修飾MITO-Porterは従来型MITO-Porterと比較して2倍高いことが示唆された。次にミトコンドリア移行性を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、Image Pro Plus (Ropper Industries)を用いて画像解析を行ったところ、すべてのアプタマー修飾MITO-Porterにおいて従来型MITO-Porterと比較して有意に高い移行性を示した。またRP修飾MITO-PorterはATPase阻害剤によりミトコンドリア移行性が阻害されたことから、ATP依存性のミトコンドリア移行を示す可能性が示唆された。最後にASOを封入したRP修飾MITO-Porterにより、標的遺伝子の抑制に成功した。

3. mitochondrial transcription factor A (TFAM)による外来遺伝子の転写活性化

ミトコンドリア遺伝子治療の実現には、マトリックスへの外来遺伝子の導入、および導入された外来遺伝子からの転写・翻訳が鍵となる。筆者は導入後の外来遺伝子の過程において、mtDNAのパッケージング様式を模倣することが有用であると考えた。本研究では外来遺伝子のミトコンドリア内での転写活性化を目的とし、mtDNA結合タンパク質・TFAMに着目し、TFAM/DNA複合体が転写に与える影響について評価した。はじめに、TFAM/DNA複合体を形成させ、T7 RNAポリメラーゼを用いたin vitro転写反応を行った。その結果、至適なモル比で1.8倍の転写効率の上昇が認められた。また、過剰量のTFAMによるDNA複合体は転写を阻害した。次に、TFAMのパッケージング構造が転写に与える影響を調べるために、塩基数の異なる環状DNAと直鎖DNAを用いて複合体形成させ、転写に与える影響について調べた。その結果、転写活性化に必要とするTFAM量は両者のDNAで異なった。TFAM1分子がDNAに結合する塩基数の間隔と転写効率との関係をプロットしたところ、直鎖DNA、環状DNA共に同様の挙動を示し、転写活性化に必要な塩基数の間隔は約17 bpであることが示唆された。本研究では、TFAMは外来遺伝子の転写活性化に有用なパッケージングタンパク質であることを明らかとした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	原島秀吉
副査	教授	菅原満
副査	准教授	秋田英万
副査	准教授	武隈洋

学位論文題名

ミトコンドリア標的型核酸デリバリーシステムの開発

博士学位論文審査等の結果について（報告）

遺伝子治療や核酸医薬はタンパク質の合成を制御可能な革新的医薬品として期待が集まっており、本薬剤を特異的に標的オルガネラに送達させるドラッグデリバリーシステムに関する研究が盛んに行われている。しかしその多くは核や細胞質への遺伝子、核酸送達に主眼が置かれており、ミトコンドリアを標的とした核酸送達に関する報告は皆無である。本論文は、遺伝子治療、核酸医薬のミトコンドリア関連疾患への応用を目指し、ミトコンドリア標的型核酸デリバリーシステムの開発を目的として研究されている。

第一章では、「GALA 修飾 MITO-Porter による機能性核酸のミトコンドリアへの送達および機能評価」について論じられている。本章では、エンドソーム脱出素子、GALA の修飾により、効率的に機能性核酸をミトコンドリアに送達し、ミトコンドリア内の標的遺伝子を抑制することに成功した。人工的なナノキャリアを用いたミトコンドリア遺伝子のノックダウンは世界初の報告例である。第二章では、「ミトコンドリア移行性 RNA アプタマーによるミトコンドリア標的化能促進機構の解明」について述べられている。従来の脂溶性、カチオン性ペプチドによる膜電位依存性のミトコンドリアの標的化ではなく、RNA アプタマーを用いることで、膜電位非依存性のアクティブターゲットを実現した点において新規性を有している。第三章では、ミトコンドリア遺伝子治療の実現を目指し、「Mitochondrial transcription factor A (TFAM) による外来遺伝子の転写活性化」について述べられている。本研究は TFAM/DNA 複合体の複合体形成機構、および塩基対数依存性の転写活性化を明らかとした。本研究は mtDNA のパッケージング様式を模倣した点において新規性があり、将来におけるミトコンドリア遺伝子治療の実現に寄与すると期待される。

一連の結果は、ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療、核酸医薬の基盤技術に関する新たな知見を得たものであり、本オルガネラに対する革新的医薬品の創製に貢献する事が期待される。よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。