

114. ミトコンドリア疾患細胞を標的とする核酸 DDS の創製

山田 勇磨

北海道大学 大学院薬学研究院 医療薬学専攻 医療薬学分野 薬剤分子設計学研究室

Key words : ミトコンドリア, 薬物送達学, 核酸 DDS, 遺伝子治療, ナノマシン

緒言

ミトコンドリアは多彩な機能を有した細胞内小器官であり、その機能異常によって様々な疾患（心筋症、神経変性疾患、糖尿病、など）を誘発する。近年、ミトコンドリアの機能不全はミトコンドリア独自のゲノム (mtDNA) の変異・欠損が関連している事が報告されており、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療が種々の疾患の革新的治療法として注目されている。これらの疾患治療を実現するためには、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) が必要不可欠である。現在までに報告されているミトコンドリア移行性ペプチド (MTS) などのミトコンドリア標的型 DDS は、小分子・タンパク質のミトコンドリア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、遺伝子 (pDNA, mtDNA) のような高次構造分子の送達は不可能である¹⁾。また、既報の MTS などは細胞導入能はなく、単独使用では疾患治療細胞内への薬物導入は不可能であった。本研究では、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療の基盤技術を確立するため、疾患細胞ミトコンドリアを標的とした核酸 DDS を構築する。ミトコンドリアへの分子送達に関しては、研究代表者が世界に先駆けて開発したミトコンドリア融合性リポソーム、DF-MITO-Porter を用いる。多重型の DF-MITO-Porter を用いた戦略では、膜融合を介して細胞膜・ミトコンドリア膜を突破する独自のコンセプトを採用しているため、細胞導入、送達分子種を制限しないミトコンドリア送達が可能となる^{2, 3)}。本研究では、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療法の基盤技術を確立するため、①疾患細胞を用いた自主臨床研究の整備、②新規ミトコンドリア標的型 DDS の開発、③ミトコンドリア発現 DNA ベクターの開発を中心に研究を進めた。

方法および結果

1. 疾患細胞を用いた自主臨床研究の整備

ミトコンドリア病患者由来細胞を提供して頂き研究を実施するために、自主臨床研究『ミトコンドリア病に対する薬物治療法確立に向けた検討』を申請し、ヒトを対象とした臨床研究に着手した。本自主臨床研究は、北海道大学薬学部・北海道大学医学部・市立札幌病院の3施設で承認を得ており（北海道大学薬学部・生命倫理委員会 承認済 [2014-003]、北海道大学医学部・倫理委員会 承認済 [医 14-061]、市立札幌病院・倫理委員会 承認済 [H26-050-224]）、疾患細胞を用いた研究の遂行を可能とした。本研究では、tRNA^{Phe} に点変異を有するミトコンドリア患者由来の皮膚細胞の樹立・継代に成功した（図1）。本疾患細胞は、複合体 III 活性が低下しておりミトコンドリア膜電位・ATP 産生の低下が予想された。樹立した細胞のミトコンドリア膜電位をミトコンドリア染色用蛍光試薬（赤色蛍光 (Mitotracker Deep Red) : 膜電非依存的ミトコンドリア染色試薬、緑色蛍光 (Rhodamine 123) : 膜電位依存的ミトコンドリア染色試薬) を用いて評価した。その結果、疾患細胞では Rhodamine 123 の緑色蛍光が微弱に観察され（図1）、樹立された細胞が病態モデル細胞として機能している事を確認した。

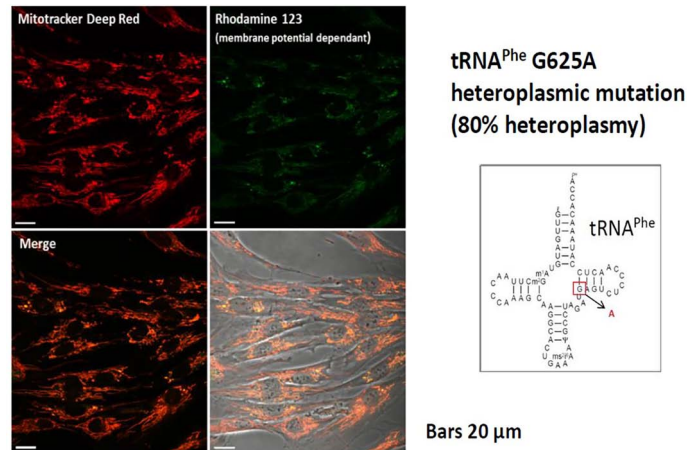


図1. ミトコンドリア患者由来細胞の観察図および変異部分

左図：患者細胞をミトコンドリア染色後に顕微鏡観察した。左上（赤色）はミトコンドリア膜電位非依存的染色、右上（緑色）はミトコンドリア膜電位依存的染色、左下は蛍光の重ね合わせ、右下は蛍光と明視野の重ね合わせ。右図：患者細胞が有する点変異の部位。

本病態モデル細胞に従来型 MITO-Porter を添加し、細胞取り込みおよび細胞内動態を観察した。その結果、これまでに HeLa 細胞で観察された結果と同様に従来型 MITO-Porter が病態モデル細胞に取り込まれ、ミトコンドリアに移行する事が確認された。また、独自に開発したミトコンドリア遺伝子発現プラスミド DNA (pHSP-mtLuc (CGG)) [詳細は後述] を病態モデル細胞のミトコンドリアにトランスフェクションし、微弱ではあるが遺伝子発現を確認した。後述する新規ミトコンドリア標的型 DDS および新規ミトコンドリア発現 DNA ベクター (pX-mtLuc (CGG)) を組み合わせる事で更なるミトコンドリア遺伝子発現が期待される。

2. 新規ミトコンドリア標的型 DDS の開発

正電荷を有するオクタアルギニン (R8) が付加されている従来型の MITO-Porter は、大きな負電位を有するミトコンドリアと静電的相互作用を介して結合すると考えられており、単離ミトコンドリアを用いた検討において R8 修飾がミトコンドリア結合に重要である事が確認されている⁴⁾。一方で、他のオルガネラおよび様々な細胞内分子が存在する細胞内ではミトコンドリアへの選択的な分子送達は望めず、細胞内動態観察において、一部のキャリアのみがミトコンドリアに存在する非特異的な分子送達が観察されている。また、疾患細胞は異常なミトコンドリアを保有しており、負電位の大幅な低下のため静電的相互作用を用いた従来の送達戦略は、疾患治療に十分な効果を発揮できない可能性が懸念される。そのため本研究では、静電的相互作用とは異なる戦略を用いてミトコンドリア選択的な分子送達を実現するため、核酸のミトコンドリア送達において有用性が示されているミトコンドリアを標的とする RNA アプタマーに着目した。

本研究では RNA アプタマーとして、Leishmania におけるミトコンドリア移行性が報告されていた RNA 配列 D-arm (5'-GGGACUGUAGCUCAAUUGGUAGAGCAU-3')、ミトコンドリアに輸送されるリボザイムから同定された RNA 配列 RP (5'-UCUCCCUGAGCUUCAGG-3') および MRP (5'-AGAAGCGUAUCCCGCUGAGC-3') を用いた。これらの RNA アプタマーはミトコンドリアとの静電的相互作用によらない結合が可能となる一方で、負電荷を有するため細胞親和性に乏しい。そのため、リボソームなどのナノ粒子のミトコンドリア標的リガンドとしての有用性は検証されていない。本研究では、細胞導入素子である R8 およびミトコンドリア移行能を有する RNA アプタマーを搭載した Dual-ligand リボソームを構築し、ナノ粒子の細胞導入を試みた。

はじめに、各種アプタマーのコレステロール誘導体を修飾した MITO-Porter の物性を調べた。その結果、2.5 mol% 以上のアプタマー修飾により負電荷を有する直径 100-150 nm 程度のナノ粒子が形成された。次に 3 種類のアプタマー修飾 MITO-Porter をトランスフェクション後、細胞内導入量をフローサイトメトリーにより評価した (図 2)⁵⁾。その結果、アプタマー単独修飾では、コントロールと同様低い細胞内導入量を示した (Open bars)。一方、アプタマーと R8 を共に修飾した MITO-Porter の場合、最適な修飾量で細胞内導入量の上昇がみられた。また、過剰な RNA ア

プタマーの修飾は細胞内導入量を減少させた。3種類のアプタマーのうち、2.5 mol% RP 修飾 MITO-Porter が最も高い取り込みを示し、従来型 MITO-Porter と比較して、最大2倍の取り込み量を示した。

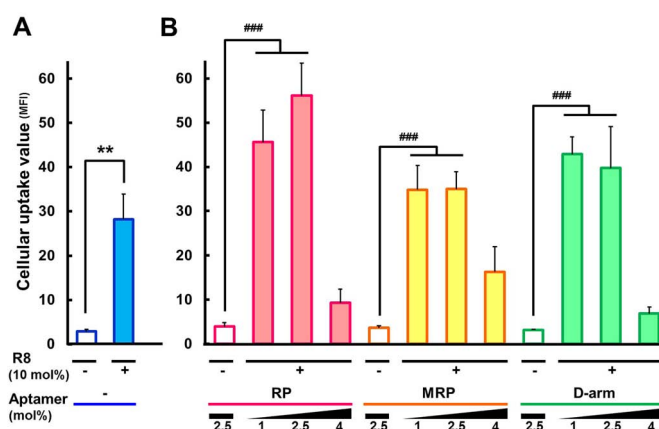


図2. RNA アプタマー修飾 MITO-Porter の細胞取り込み能評価

R8 修飾 MITO-Porter (A) および RNA アプタマー修飾 MITO-Porter (B) の細胞取り込み能をフローサイトメトリーを用いて評価した⁵⁾。蛍光標識を施したナノ粒子を HeLa 細胞に添加し細胞内に取り込まれたナノ粒子の蛍光強度を測定し細胞取り込み量とした。データは平均値±SEM で示した (n=3-4)。**有意差有 (t-test (p < 0.01))。***有意差有 (two-way ANOVA, followed by bonferroni test t-test (p < 0.001))。

さらに、従来型 MITO-Porter (R8 修飾 MITO-Porter) および RP/R8 修飾 MITO-Porter をトランスフェクションし、3 時間後の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、従来型 MITO-Porter と比較し、RP/R8 修飾 MITO-Porter はミトコンドリアと共局在を示す黄色のドットが多数観察された (図 3)。従来型 MITO-Porter では一部のミトコンドリアにのみ集積しているのに対し (図 3A)、アプタマー修飾により広範囲のミトコンドリアに集積していることが観察された (図 3B)。本研究は、ミトコンドリア移行性 RNA アプタマーがナノ粒子のミトコンドリア標的リガンドとしても有用である事を示した世界で初めての報告である⁵⁾。

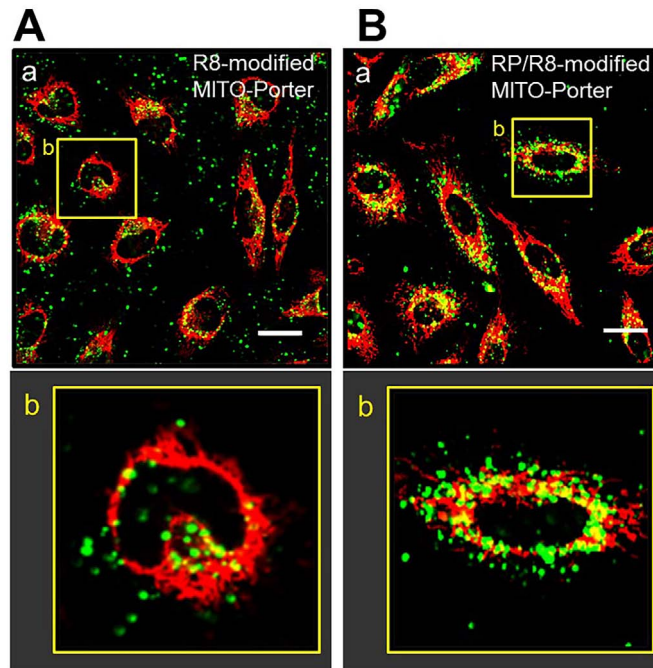


図3. RNA アプタマー修飾 MITO-Porter の細胞内動態観察

緑色蛍光標識を施した R8 修飾 MITO-Porter (A) および RP/R8 修飾 MITO-Porter (B) を HeLa 細胞に添加し、3 時間後に赤色にミトコンドリアを染色した後に細胞内動態を観察した⁵⁾。共局在は黄色として観察される。Scale Bars: 30 μ m.

3. ミトコンドリア発現 DNA ベクターの開発

ミトコンドリアは核と異なる遺伝子コドン・転写/翻訳機構を有しているため、ミトコンドリア専用の遺伝子発現プラスミド DNA を設計する必要がある。現在までに試験管内での mtDNA の転写・翻訳反応は研究されているが⁶⁾、その発現レベルは治療域に達していなかった。Hong Yu らはミトコンドリア移行性ペプチド (MTS) を付加した人工ウイルスベクター (Adeno associated virus (AAV)) 内部に、ミトコンドリア内部での転写・翻訳能を有する DNA を搭載し、直接ミトコンドリアに DNA を送達し外来遺伝子を発現する戦略を検証した⁷⁾。本研究では、組織内での転写・治療効果を中心に検討を進め一定の成果を得ているが、「ウイルスベクターを使用しているため安全性に問題がある点」、「機能性タンパク質の発現検証が不明瞭である点 (翻訳過程)」などの問題点があった。

研究代表者らは、ウイルスベクターを利用した Hong Yu らの先行研究を参考にして、ミトコンドリア内因性プロモーター heavy strand promoter (HSP)、転写・翻訳の過程に必要と考えられる配列 3'UTRtRNAなどを基盤遺伝子骨格に、レポーター発光タンパク質 NanoLuciferase (NLuc) を Mt 遺伝子コドンに改変した pHSP-mtLuc (CGG) (図 4) を用いて、マウス肝臓における遺伝子発現を評価した。本評価の遺伝子導入戦略として、「大容量の遺伝子溶液を短時間で投与し遺伝子を物理的に臓器細胞内に導入」するハイドロダイナミクス法 (肝臓、骨格筋、など、で適応) に着目した⁸⁾。我々はこれまでに、本方法によって肝臓および骨格筋のミトコンドリアに効率的にプラスミド DNA を送達する事に成功している⁹⁾。

Mt遺伝子発現pDNA (pHSP-mtLuc)

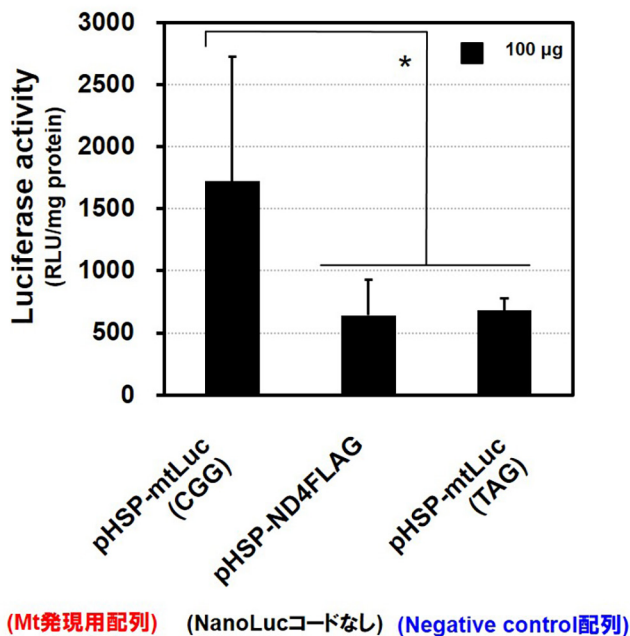


図4. ミトコンドリア遺伝子発現 DNA の設計図

pHSP-mtLuc (ミトコンドリア遺伝子発現 DNA) の設計図を示した。

pHSP-mtLuc (CGG) をハイドロダイナミクス投与し、肝臓 (図 5A) および骨格筋 (図 5B) を摘出、ホモジェナイズし、その NanoLuc 発光量を測定した。mtLuc (CGG) は核翻訳停止コドンである TGA を有しているため、検出されたルシフェラーゼは、ミトコンドリアで翻訳されたと判断できる。また、核・ミトコンドリアで翻訳されない TAG コドンを有する pHSP-mtLuc (TAG) をネガティブコントロールとして設計した。評価の結果、ミトコンドリア発現用配列を有する pHSP-mtLuc (CGG) 群は、ネガティブコントロール pHSP-mtLuc (TAG) と比較して、有意に高い NanoLuc 発光活性を示し、pHSP-mtLuc (CGG) はミトコンドリアにおける外来遺伝子発現を可能とする有用な DNA ベクターである事が示唆された¹⁰⁾。さらに、遺伝子発現活性を 40 倍増強した新規 pX-mtLuc (CGG) を設計・構築し特許出願している (特願 2015-230498)。

A 肝臓での遺伝子発現



B 骨格筋での遺伝子発現

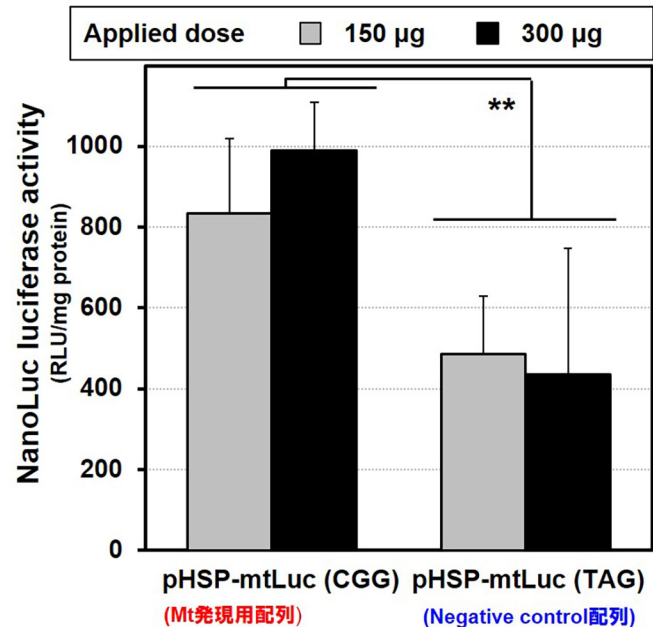


図5. pHSP-mtLuc (CGG) のミトコンドリア遺伝子発現評価

pHSP-mtLuc (CGG) をハイドロダイナミクス投与し、マウス肝臓 (A) およびラット骨格筋 (B) を摘出、ホモジェナイズし、その NanoLuc 発光量を測定した¹⁰⁾。本実験では、核・ミトコンドリアで翻訳されない TAG コドンを有する pHSP-mtLuc (TAG) をネガティブコントロールとして用いた。データは平均値 ± S D で示した (n=3-5)。*有意差有 (one-way ANOVA, followed by the Bonferroni test ($p < 0.05$))。**有意差有 (two-way ANOVA, followed by bonferroni test t-test ($p < 0.01$))。

考 察

今後は本研究で構築した Dual-ligand リボソーム RP/R8 修飾 MITO-Porter に pX-mtLuc (CGG) 骨格を有する治療用 DNA を搭載し、ミトコンドリア遺伝子治療戦略の検証を試みる。治療用 DNA の候補としては、疾患細胞の有する変異 tRNAPhe に対応する正常遺伝子をコードするミトコンドリア発現型 pDNA を使用し、これまで樹立したミトコンドリア患者由来の皮膚細胞 (tRNAPhe に点変異を有し、複合体 III 活性の低下、難聴などの症状) を用いる。治療効果は複合体 III 活性、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生量などを測定し評価する。

我々が開発を進めてきた「ミトコンドリア疾患細胞を標的とする核酸 DDS」は、ミトコンドリアが関連する様々な疾患の治療・診断を可能とし、ミトコンドリアを標的とした創薬開発の一助となると確信している。また、本 DDS は、老化・肥満に密接に関わることも報告されているミトコンドリアを標的とするため、美容・健康の維持にも応用可能な基盤技術である。さらに、本基盤技術は、多彩な機能を有するミトコンドリアの生物学的解析を可能とし、ライフサイエンス分野における日本の研究レベルの向上に大きく貢献する事が期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院薬学研究院・原島秀吉教授である。最後に、本研究に対してご支援賜りました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Kajimoto K, Sato Y, Nakamura T, Yamada Y, Harashima H. Multifunctional envelope-type nano device for controlled intracellular trafficking and selective targeting in vivo. *J Control Release*. 2014;190C:593-606. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.058. PubMed PMID: 24794902.
- 2) Yamada Y, Furukawa R, Yasuzaki Y, Harashima H. Dual function MITO-Porter, a nano carrier integrating both efficient cytoplasmic delivery and mitochondrial macromolecule delivery. *Mol Ther*. 2011;19(8):1449-56. doi: 10.1038/mt.2011.99. PubMed PMID: 21694702; PubMed Central PMCID: PMC3149179.
- 3) Yamada Y, Harashima H. Delivery of bioactive molecules to the mitochondrial genome using a membrane-fusing, liposome-based carrier, DF-MITO-Porter. *Biomaterials*. 2012;33(5):1589-95. Epub 2011/11/23. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.082. PubMed PMID: 22105068.
- 4) Yamada Y, Harashima H. Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(13-14):1439-62. Epub 2008/07/29. doi: 10.1016/j.addr.2008.04.016. PubMed PMID: 18655816.
- 5) Yamada Y, Furukawa R, Harashima H. A Dual-Ligand Liposomal System Composed of a Cell-Penetrating Peptide and a Mitochondrial RNA Aptamer Synergistically Facilitates Cellular Uptake and Mitochondrial Targeting. *J. Pharm. Sci.* 2016; 105(5):1705-13. doi: 10.1016/j.xphs.2016.03.002.
- 6) Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA. Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J Mol Biol*. 1995;249(1):11-28. doi: 10.1006/jmbi.1995.9889. PubMed PMID: 7776365.
- 7) Yu H, Koilkonda RD, Chou TH, Porciatti V, Ozdemir SS, Chiodo V, et al. Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(20):E1238-47. doi: 10.1073/pnas.1119577109. PubMed PMID: 22523243; PubMed Central PMCID: PMC3356643.
- 8) Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*. 1999;6(7):1258-66. doi: 10.1038/sj.gt.3300947. PubMed PMID: 10455434.
- 9) Yasuzaki Y, Yamada Y, Kanefuji T, Harashima H. Localization of exogenous DNA to mitochondria in skeletal muscle following hydrodynamic limb vein injection. *J Control Release*. 2013;172(3):805-11. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.09.029. PubMed PMID: 24100263.
- 10) Yasuzaki Y, Yamada Y, Ishikawa T, Harashima H. Validation of Mitochondrial Gene Delivery in Liver and Skeletal Muscle via Hydrodynamic Injection Using an Artificial Mitochondrial Reporter DNA Vector. *Mol Pharm*. 2015;12(12):4311-20. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00511. PubMed PMID: 26567847.