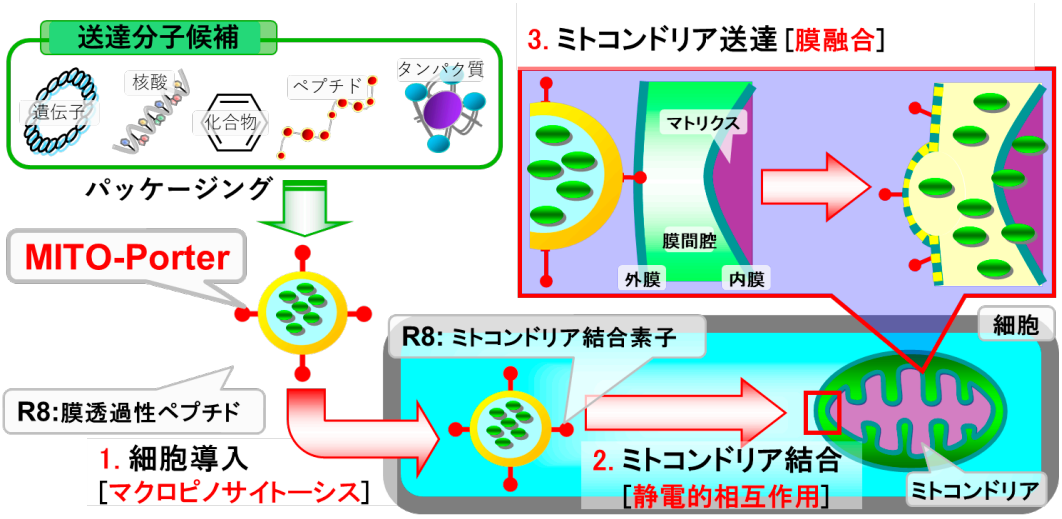
97　ミトコンドリア標的型タウリン封入DDSの構築	山田　勇磨

【目的】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症状を呈するミトコンドリア病を発症する。2019 年に「タウリン」がミトコンドリア病に対する治療薬として保険適用され、有効な治療法が確立されていない本疾患の治療方針として非常に明るい話題となっている。一方で、薬物療法に用いられる薬物は、疾患細胞への細胞導入能が乏しく、ミトコンドリア移行性が無いため、継続的に大量投与する対症療法が主流である。研究代表者らはミトコンドリア膜との膜融合を介して内封物質を送達する MITO-Porter を開発し、培養細胞ミトコンドリアへの機能性分子送達に成功している。研究代表者は、MITO-Porter システムに疾患細胞への細胞導入能を付加した「疾患細胞ミトコンドリアを標的とした Drug Delivery System（DDS）を構築」することで、ミトコンドリア病の革新的治療が可能になると考え、本研究を提案した。本研究では、「疾患細胞標的型 MITO-Porter の構築」、「疾患細胞を用いた細胞内動態の最適化および治療効果の検証」、「動物を用いた毒性試験」に関する研究を進めた。

【方法】1. 疾患細胞標的型 MITO-Porter の構築 : 疾患細胞標的型 MITO-Porter（RP/KALA-MITO-Porter）の調製、マイクロ流体デバイスを利用したコエンザイム Q_{10}（CoQ）などの候補薬剤の封入検討を行った。調製した DDS の粒子物性（粒子径、均一性、表面電位）を測定し最適化を図った。2. 疾患細胞を用いた細胞内動態の最適化および治療効果の検証 : 患者由来疾患細胞を用いた実験を行うため、自主臨床研究の整備を進めた。疾患細胞の細胞内動態観察、ミトコンドリア機能評価を行い DDS の治療効果を検証した。3. 動物を用いた毒性試験 : DDS 投与後に、血液・生化学検査を行い、臓器毒性などを評価した。

【結果】1. RP/KALA-MITO-Porter の構築に成功した。また、マイクロ流路デバイスを利用して CoQ を封入する方法を確立した。2. 自主臨床研究を整備し、3 種のミトコンドリア疾患細胞を用いた実験をする環境を整えた。また、調製した MITO-Porter が疾患細胞ミトコンドリアにアクセス可能であることを示した。3. RP/KALA-MITO-Porter を静脈内投与した際に肝臓、腎臓、膵臓に対する毒性を示さなかった。

MITO-Porter を用いたミトコンドリアへの分子送達戦略



97. ミトコンドリア標的型タウリン封入 DDS の構築

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，Drug delivery system（DDS），ミトコンドリア病，ナノ医薬品，創薬

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症状を呈するミトコンドリア病および関連疾患 （神経変性疾患、心筋症、など）を発症する。代表的なミトコンドリア病として報告されている Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes（MELAS）は、ミトコンドリア tRNA（ロイシン）（Mt-tRNA^{Leu}）のタウリン修飾の欠損に伴うミトコンドリア翻訳阻害が原因となり、ミトコンドリア機能障害を誘発し病態を呈すると考えられている。2019 年に「タウリン」がミトコンドリア病に対する治療薬として保険適用され、有効な治療法が確立されていない本疾患の治療方針として非常に明るい話題となった。一方で、薬物療法に用いられる薬物は、疾患細胞への細胞導入能が乏しく、ミトコンドリア移行性が無いため、継続的に大量投与する対症療法が主流である。

既存のミトコンドリアを標的とした Drug Delivery System（DDS）は、送達分子の物性やサイズを制限するため治療用分子のミトコンドリア送達は困難であった。研究代表者らはミトコンドリア膜との膜融合を介して内封物質を送達する MITO-Porter を開発し、培養細胞ミトコンドリアへの機能性分子送達に成功している［1，2］。本戦略は、「膜融合を介して内封分子をミトコンドリアへ送達する」ため、送達分子の物性やサイズを制限しない。研究代表者は、MITO-Porter システムに疾患細胞への細胞導入能を付加した「疾患細胞ミトコンドリアを標的とした DDS を構築」することで、ミトコンドリア病の革新的治療が可能になると考え、本研究の提案に至った。

本研究では、「疾患細胞ミトコンドリアを標的とした DDS」を構築し、ミトコンドリア標的型 DDS による疾患治療の有用性を実証する。治療戦略の検証のために、代表的なミトコンドリア病として報告されている MELAS を含む患者由来細胞を使用し、送達治療分子としては、MELAS の治療薬として保険適応されているタウリン、抗酸化能・ミトコンドリア電子伝達系補酵素であるコエンザイム Q_{10}（CoQ）を選定し、ミトコンドリア標的型 DDS への内封を検討した。本研究では、「疾患細胞標的型 MITO-Porter の構築」、「疾患細胞を用いた細胞内動態の最適化および治療効果の検証」および「動物を用いた毒性試験」の順に研究を進めた。

方　法

1. 疾患細胞標的型 MITO-Porter の構築

1）RP/KALA-MITO-Porter の調製

疾患細胞のミトコンドリアは機能異常（膜電位低下など）のため、正電荷を有するミトコンドリア移行性素子を用いた従来の静電的相互作用を利用するミトコンドリア送達戦略は疾患細胞への適応は不可能である。研究代表者は、静電的相互作用によらないミトコンドリア輸送機構を有するミトコンドリア移行性 RNA アプタマーなどに着目し、MITO-Porter システムにミトコンドリア輸送能を付加させることで、今までは不可能であった疾患細胞の異常ミトコンドリアへの薬物送達が可能となると考えた。本研究では、表面には電位非依存性ミトコンドリア移行能素子 RP アプタマー［3］およびミトコンドリア融合能を有するペプチド KALA（WEKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA-NH_2）を配置した疾患細胞標的型 MITO-Porter の構築を検討した。

2）マイクロ流体デバイスを利用した薬剤封入の検討

本研究では、実用化を見据え、均一性の高いナノ粒子を無菌的に大量調製が可能なマイクロ流体デバイスを利用した薬剤封入粒子調製を試みた。以下に、CoQ をオクタアルギニン（R8）が付与された R8-MITO-Porter に内封した R8-MITO-Porter（CoQ）の調製について説明する。図 1 に示す共同研究者である北海道大学大学院工学研究院の渡慶次学教授、真栄城正寿助教が開発したマイクロ流体デバイス（invasive lipid nanoparticle production（iLiNP）device）を用いて、エタノール希釈法の原理を利用した CoQ の封入を検討した［4］。

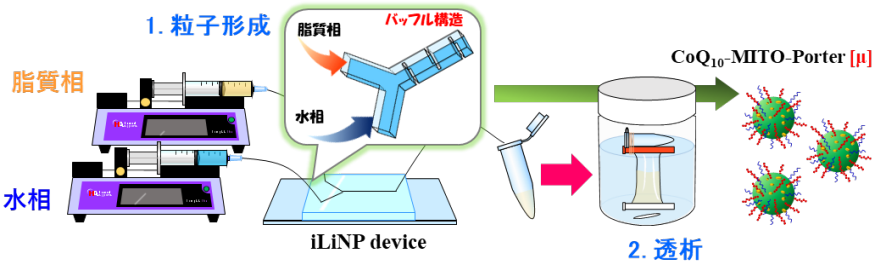


図 1. iLiNP を用いた CoQ-MITO-Porter の調製スキーム
iLiNP によって脂質懸濁液（CoQ を含む）と緩衝液を急速混合することで均一な粒子調製、連続調製が可能となる。調製の過程は、1. 粒子形成、2. 透析の順に行う。

iLiNP を用いた脂質粒子調製では、①脂質相の組成、②水相の種類、③総流速、④流速比を変化させることにより多彩な粒子設計が可能となる。①脂質相の組成には、R8-MITO-Porter を構成するナノカプセル材料および CoQ を含有するエタノール懸濁液を、②水相には、phosphate buffered saline（PBS）(−) を用いて、③総流速は 500 μL/min に固定し、④流速比は、EtOH 希釈濃度が 10%、20%、30%、40%となるように設定して検討を進めた。最終工程として、iLiNP で調製した MITO-Porter 溶液は、透析（2 時間、4℃）を行い含有するエタノールを除去した。

3）粒子物性の評価

前項までに記載した MITO-Porter の粒子径、PdI（均一性の指標であり、値が小さい方が均一性が高い）、ゼータ電位（表面電位）を測定した。粒子径および PdI は動的光散乱法を、ゼータ電位は電気泳動法を利用した原理に基づき、Zetasizer Nano ZS （Malvern Instruments Ltd., Malvern、WR、UK）を用いて測定した。

2. 疾患細胞を用いた細胞内動態の最適化および治療効果の検証

1）自主臨床研究の整備

ミトコンドリア病患者由来細胞を用いた研究を実施するため、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』の承認を得て G625A 細胞を、自主臨床研究 『ミトコンドリア病に対する医療用ナノカプセルの創製に向けた検討』の承認を得て MELAS 細胞、LS^{ND3}細胞を用いた実験準備を整えた。

2）疾患細胞を用いた細胞内動態観察

RP/KALA-MITO-Porter（G625A 細胞）および R8-MITO-Porter（LS^{ND3}細胞）の細胞内動態（細胞取り込み能評価、蛍光顕微鏡観察）を評価した。細胞取り込み評価については、蛍光標識を施した粒子を細胞に添加し、細胞に取り込まれた粒子の蛍光量をフローサイトメトリー（Gallious; Beckman Coulter Inc., Pasadena, MA, USA）を用いて平均蛍光強度を測定し、細胞取り込み能を算出した。蛍光顕微鏡観察については、蛍光標識粒子（緑色）を細胞に添加し、ミトコンドリアを赤色に染色した後、細胞内局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

3）ミトコンドリアの機能評価

粒子添加時のミトコンドリア機能を評価するために、ミトコンドリア酸素消費量 （OCR）を Agilent Seahorse XFp extracellular flux analyzer （Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）を用いて評価した。ミトコンドリア機能の指標として基礎呼吸能 （mitochondrial basal respiration）および最大呼吸能 （Maximal respiration）を計測した。本評価の詳細な方法は既報を参考にして頂きたい ［5］。

3. 動物を用いた毒性試験

静脈内投与し、24 時間後に血液を採取し生化学マーカーの値を測定し、毒性を評価した。

結果および考察

1. 疾患細胞標的型 MITO-Porter の構築

1）RP/KALA-MITO-Porter の調製

単純水和法を利用してミトコンドリア融合能を有するペプチド KALA（正電荷）を表面修飾した KALA-MITO-Porter を調製した。その後、異なる比率で RP（負電荷）を修飾した RP/KALA-MITO-Porter を調製し、ゼータ電位（表面電位の指標）を測定した（図 2）。RP 修飾量の増加に伴い、表面電位が正から負に反転する様子が確認され、RP が修飾された負電荷の RP/KALA-MITO-Porter が調製可能であることを確認した。

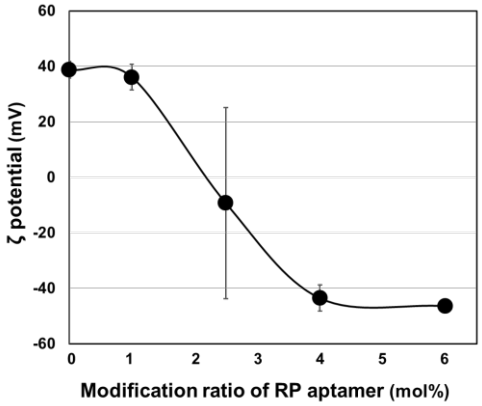


図 2. RP/KALA-MITO-Porter のゼータ電位測定結果
KALA-MITO-Porter に異なる比率で RP を修飾し、ゼータ電位を測定した。データは平均値±標準偏差で示す（n=3）。

2）マイクロ流体デバイスを利用した薬剤封入の検討

iLiNP を用いた CoQ 内封粒子（R8-MITO-Porter（CoQ））の調製において、流速比（水相/脂質相の流速の比率＝EtOH 希釈濃度に相当）の条件を検討した（タウリン内封の検討も行ったが、特許出願準備中のためここでは割愛する）。流速比は、エタノール希釈濃度の低下に依存して粒子径が小さくなった（図 3A）。エタノール希釈濃度が 20～30%の時、PdI は約 0.12 と単分散であったが、エタノール希釈濃度 10%では他の希釈濃度よりも多分散であった。最終工程として、iLiNP で調製した R8-MITO-Porter（CoQ）溶液を透析した際の粒子物性を図 3B に示す。粒子径は小さくなる傾向を認めたが、PdI については増加が認められた。ここまでの検討より、流速比を 20%に設定し R8-MITO-Porter（CoQ）を調製する事とした［4］。iLiNP を用いることにより粒子径は約 50 nm と従来技術より 1/2 倍小さな粒子となった。

2. 疾患細胞を用いた細胞内動態の最適化および治療効果の検証

1）自主臨床研究の整備

自主臨床研究の承認後、ミトコンドリア病患者の皮膚生検より得た線維芽細胞の樹立・継代に成功した。G625A 細胞は、mtDNA の $tRNA^{Phe}$ 上に G625A 変異を有しており、臨床症状として、てんかんや進行性難聴が認められている。LS^{ND3}細胞は、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I を構成する ND3 タンパク質に点変異（T10158C）を有する mtDNA を保有する Leigh 脳症患者の皮膚線維芽細胞である。MELAS 細胞は、$Mt\text{-}tRNA^{Leu}$ 上に点変異（A3243G）を有する mtDNA を保有する MELAS 患者の皮膚線維芽細胞である。

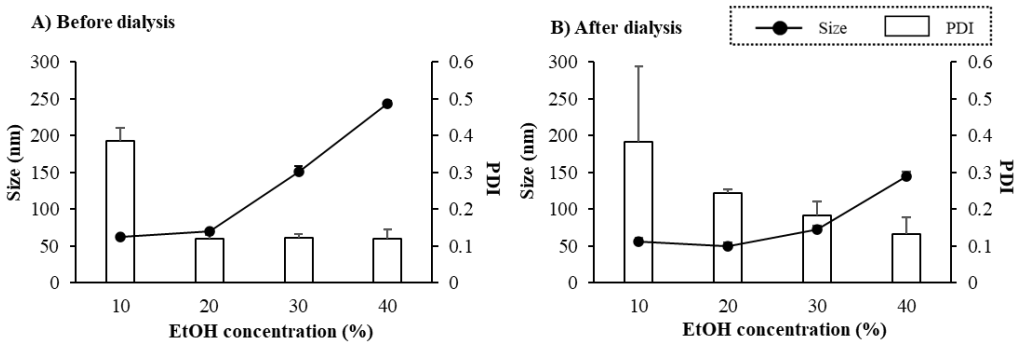


図 3. 異なる流速比で調製した MITO-Porter（CoQ）の物性評価

異なる流速比で調製したMITO-Porter（CoQ）の粒子径およびPDIを測定した。Aは透析前、Bは透析後の物性データを示す。データは平均値±標準偏差で示す（n=3）。

2）疾患細胞を用いた細胞内動態観察

RP/KALA-MITO-Porter（G625A 細胞）：異なる比率で PR アプタマーを修飾した RP/KALA-MITO-Porter を G625A 変異細胞に添加し、細胞内導入量を評価した。その結果、4 mol% RP アプタマーを修飾した RP/KALA-MITO-Porter は、KALA 単独修飾体よりも有意に高い核酸導入能を示した（図 4A）。さらに、その細胞内局在を観察したところ、RP/KALA-MITO-Porter は、赤色に染色したミトコンドリアと緑色で示した pDNA との共局在を示す黄色のドットが観察された（図 4B）。以上より、RP/KALA-MITO-Porter は、静電的相互作用によらない疾患細胞ミトコンドリアへの分子送達が可能であることが示唆された（図 4 には pDNA をトレーサーとして用いた実施例を提示［6］）。

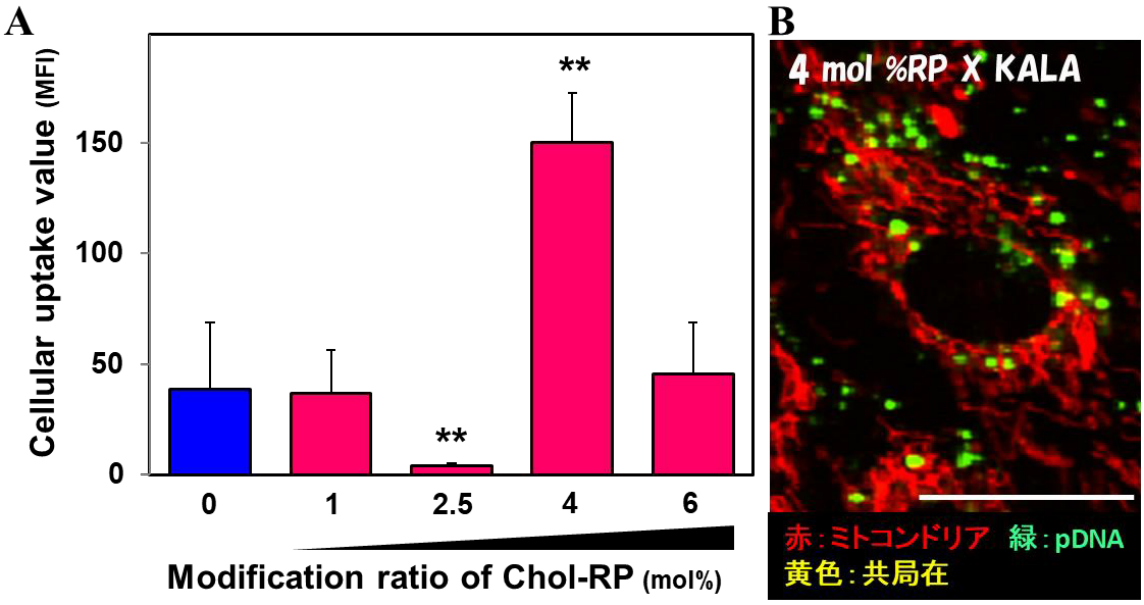


図 4. RP/KALA-MITO-Porter （CoQ）の細胞内動態観察

A） 細胞取り込み評価：データは平均値±標準偏差で示す（n=3）。有意差は ANOVA（bonfferoni test、vs KALA-MITO-Porter （青色バー））を用いて検出した（** $p<0.01$）。

B） 4 mol% RP/KALA-MITO-Porter の蛍光顕微鏡観察像（スケールバー：30 μm）。

R8-MITO-Porter （LS^{ND3}細胞）：LS^{ND3}細胞に R8-MITO-Porter を添加し、細胞内局在を顕微鏡で観察したところ疾患細胞ミトコンドリアへ粒子が移行している様子が観察された［7］。

3）ミトコンドリアの機能評価

R8-MITO-Porter（CoQ）を MELAS 細胞に添加し、その後にミトコンドリア機能の指標としてミトコンドリア基礎呼吸能およびミトコンドリア最大呼吸能を計測した。特許出願準備中のため、詳細は開示できないが、構成を最適化した R8-MITO-Porter（CoQ）を用いた際には、CoQ 単独投与では観察されなかったミトコンドリア機能の向上が確認されている。現在、タウリン内封粒子および RP/KALA-MITO-Porter での検討も進めている。

3. 動物を用いた毒性試験

RP/KALA-MITO-Porter 投与後の血液検査の結果、腎障害マーカー（BUN、CRE）、肝障害マーカー（ALT、LDH）、膵障害マーカー（AMY）のいずれにおいても緩衝液投与群と同程度の値を示し、これらの項目における毒性は観察されなかった（表 1）。

表 1. RP/KALA-MITO-Porter 投与後の血液検査結果

	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	ALT (IU/L)	LDH (IU/L)	AMY (IU/L)
HEPES 緩衝液	21.2	0.13	39.7	679.3	2750.0
RP/KALA-MITO-Porter	25.7	0.13	40.0	676.0	2609.3

HEPES緩衝液およびRP/KALA-MITO-Porter を尾静脈投与し、24時間後に血液を採取し腎障害（BUN : blood urea nitrogen、CRE : creatinine）、肝障害（ALT : alanine aminotransferase、LDH : lactate dehydrogenase）、膵障害（AMY : amylase）のマーカー分子を測定した。データは平均値±標準偏差で示す（n=3）。

考　察

本報告書では、以下の内容を報告した。

1. 負電荷を有する RP/KALA-MITO-Porter を構築する事に成功した。また、マイクロ流路デバイスを利用して CoQ を封入する方法を確立した。

2. 自主臨床研究を整備し、3 種のミトコンドリア疾患細胞を用いた実験を実施する環境を整えた。また、調製した MITO-Porter が疾患細胞ミトコンドリアにアクセス可能であることを示した。

3. RP/KALA-MITO-Porter を静脈内投与した際に肝臓、腎臓、膵臓に対する毒性を示さなかった。

本研究では、疾患細胞ミトコンドリアに治療分子（CoQ）を、DDS を用いて送達することで、ミトコンドリア機能が改善されることを示した。現在は、タウリンを含む既存薬を用いた検討を進めており、既存薬物に疾患細胞ミトコンドリア送達能を付加し、ミトコンドリア治療薬剤として Drug Repositioning（既存薬の新しい薬効の発見・再利用）する可能性を示していきたいと考えている。また、RP/KALA-MITO-Porter の表面には静電的相互作用非依存的にミトコンドリアと結合する素子を配置するため、膜電位が消失した重篤な疾患細胞ミトコンドリアへのアクセスも可能であり、種々の病態を呈するミトコンドリア病での適応範囲が広い。今後は、これまで培ってきたナノ DDS 技術を活用し、局所投与型 DDS、臓器移行性を付与した静脈投与型 DDS、経口投与型 DDS へと発展させる予定である。本研究は、ミトコンドリア病に対する新たな治療戦略を提供するとともに、ミトコンドリアを標的とした創薬開発を一気に加速させると確信している。

謝　辞

ここで紹介した研究成果は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【Team Mitochondria】に所属する学生諸氏の日々の努力の賜物であり、学生各位に心より感謝する。また、本研究を遂行するにあたり、公益財団法人上原記念生命科学財団のご支援を頂きましたことに深く御礼申し上げます。

文　献

1) Yamada Y, et al., MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. Biochim Biophys Acta 1778: 423-432 (2008). PMID: 18054323 DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.11.002.

2) Yamada Y, et al., Power of mitochondrial drug delivery systems to produce innovative nanomedicines. Adv. Drug. Deliv. Rev. 154-155： 187-209 (2020). PMID: 32987095 DOI: 10.1016/j.addr.2020.09.010.

3) Yamada Y, et al., 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 105: 1705-1713 (2016). PMID: 27056631 DOI: 10.1016/j.xphs.2016.03.002.

4) Hibino M, et al., The use of a microfluidic device to encapsulate a poorly water-soluble drug CoQ10 in lipid nanoparticles and an attempt to regulate intracellular trafficking to reach mitochondria. J Pharm Sci 108: 2668-2676 (2019). PMID: 30959057 DOI: 10.1016/j.xphs.2019.04.001.

5) Yamada Y, et al. The use of a MITO-Porter to deliver exogenous therapeutic RNA to a mitochondrial disease's cell with a A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene results in an increase in mitochondrial respiratory activity. Mitochondrion 55: 134-144 (2020). PMID: 33035688 DOI 10.1016/j.mito.2020.09.008.

6) Ishikawa T et al., Mitochondrial transgene expression via an artificial mitochondrial DNA vector in cells from a patient with a mitochondrial disease. J Control Release 274: 109-117 (2018). PMID: 29408532 DOI 10.1016/j.jconrel.2018.02.005.

7) Yamada Y, et al., Validation of a mitochondrial RNA therapeutic strategy using fibroblasts from a Leigh syndrome patient with a mutation in the mitochondrial ND3 gene. Sci. Rep. 10: 7511 (2020). PMID: 32371897 DOI 10.1038/s41598-020-64322-8.