77　変形性関節症のミトコンドリア機能障害の回復ツール

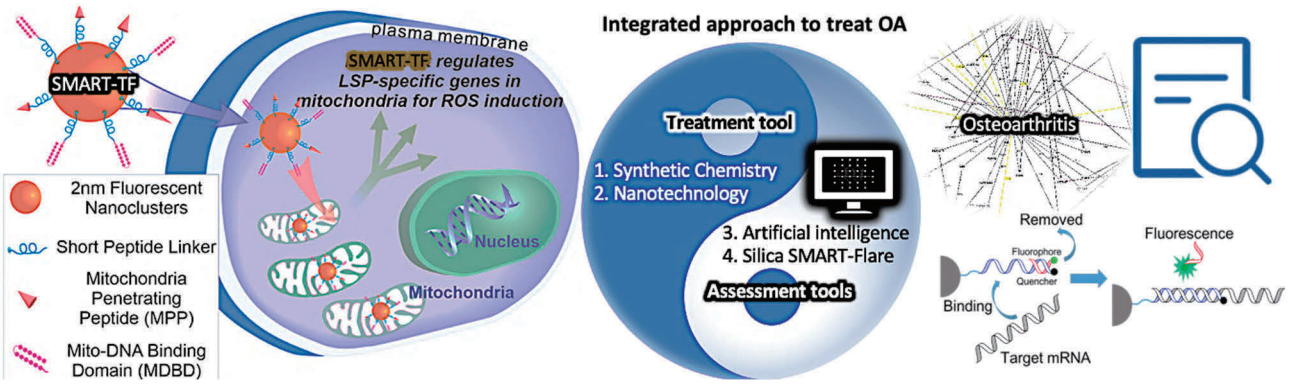
Namasivayam Ganesh Pandian

【目的】変形性関節症（OA）は、世界中で非常に多く見られる退行性関節疾患である。最近の OA 膝関節の軟骨細胞を用いた研究では、ミトコンドリアの機能障害やミトコンドリア DNA（mtDNA）の変異が炎症や OA の進行を促進していることが示唆されている。ミトコンドリアの生合成・炎症・変異した mtDNA の発現を人工的に制御することで、軟骨細胞の機能回復につながることが明らかになりつつある。しかし、ミトコンドリア活性に関連する複数の因子を生細胞内の分子レベルで制御するプログラム可能なツールは存在しない。小分子は外来の遺伝子を含まないため、薬剤として投与するのが簡単であり、イデベノンや CoQ10 のような抗酸化剤が効果的であることが示されている。ただし、mtDNA 変異の定常的な機能回復は行えないため、継続的に投与する必要がある。一方 DNA ベースの治療法は、変異型 mtDNA を直接標的にして排除することにより、問題となる部分を逆転させ、治療が可能であると考えられる。

【方法】学際的な手法により、3 つの異なるワークパッケージ（WP）の下で OA 治療用回復ツールを開発した。WP1：初めに、DNA 結合ドメインとして選択的 DNA 結合ピロールイミダゾールポリアミドを、局在化ドメインとしてミトコンドリア透過性ペプチドを、機能ドメインして生理活性小分子を用いた。これらを順次組み立てることにより、ミトコンドリアを標的とするナノ粒子ベースの SMART（＝プログラム可能な分子認識）転写因子（TF）を開発した。また、機能化されたナノ粒子と、OA で高発現している免疫グロブリン G（IgG）との相互作用についても調査した。WP2：人工知能（AI）を利用して、ゲノム全体の関連研究とメタ分析を実行し、新しい創薬標的を特定していった。また、ケミカルバイオロジーとインフォマティクスの手法を統合して、RNA エピジェネティクスを解読した。WP3：OA 患者で高度に発現することが知られている IL-6 の mRNA を検出するシリカナノ粒子ベースの SMART フレアを合成した。

【結果】WP1：ナノ粒子ベースの SMART-TF の設計に成功し、OA を引き起こすことが知られている活性酸素種に関連するミトコンドリア遺伝子 *ND6* の制御を達成した。さらに、*in vitro* 細胞株モデルおよび *in vivo* 動物モデルでのナノバイオ相互作用研究により、IgG のコンフォメーションを変化させない最適な処理条件を特定した。WP2：化学プローブや AI プログラムによって、イノシンとプソイドウリジンによる RNA 修飾部を解読できることが実証された。3,757 人それぞれの免疫プロファイルの AI ベースのメタ分析により、変形性関節症の発症に関連する標的として CD33 および CCR2 が特定され、検証研究を実施するために OA および正常なドナーから軟骨細胞を分取した。この細胞を用いた実験を続けている。WP3：本研究室に所属している安倍克彦は、JSPS 交換留学プログラムにて ARI（スイスの AO 研究所）を訪問し、IL-6 や TGFβR1/2 の mRNA を標的とする、シリカ SMART フレアプローブの開発に成功し、線維芽細胞や間葉系幹細胞を用いた最適化研究を続けている。まとめると、4 つの異なる研究分野（合成化学・ナノテクノロジー・機械学習・再生医療）を融合した研究において、OA のより良い治療につながる可能性のあるデータの取得に成功した。

変形性関節症におけるミトコンドリア機能障害の回復ツールの概略図



77. 変形性関節症のミトコンドリア機能障害の回復ツール

Namasivayam Ganesh Pandian

京都大学 高等研究院 物質 - 細胞統合システム拠点／大学院工学研究科 分子工学専攻

Key words：変形性関節症，ミトコンドリア，転写療法，AI，デザイナーナノ粒子

緒　言

2018 年の世界保健機関からの報告によるとスイス人男性と日本人女性は他国の人よりも比較的健康寿命が長いことが示されている。しかし、近年加齢による関節周辺の軟骨細胞の損失に伴う関節障害である変形性関節症（OA）により、健康が阻害される事例が多数報告されている。現在 OA の進行を防いだり痛みを軽減したりする治療は確立されているが、進行を逆転させるような根本的な治療法は存在しない。近年、OA 病理学において、多くの論文でミトコンドリア機能障害が深くかかわっていることが示されている。たとえば、ミトコンドリア転写因子 A（TFAM）の損失は ROS の生産を変化させる［1］。また、ND6、インターロイキン-6（IL-6）といった、核での転写を司る転写因子とミトコンドリア機能や OA との関係性は、次世代シークエンサーの急速な発展により明らかになっている。これらの結果を精査すると、幹細胞やエキソソームを使用した有望な OA 治療法とともに、OA の徹底的な治療のためにミトコンドリア機能障害を標的にした機能を回復させるための生物医学的ツールを開発する必要があると鑑みられる。CRISPR・TALEN・ジンクフィンガーヌクレアーゼなどのプログラム可能な生物学的ツールが治療薬の候補として挙がっているが、倫理的な問題やゲノムの変化の可能性が臨床応用の大きな障壁となっている。化合物を用いた遺伝子スイッチは簡便だが、膝関節の複雑な軟骨構造における天然の制御コードの機能を正確に模倣することはできず、肥大化を招く可能性がある。

N-メチルピロール-N-メチルイミダゾールポリアミド（PIP）は、4 つのワトソン - クリック塩基対を選択的に認識する化合物である（図 1A）。この特異性を用いて、テロメアの長さを可視化したり（図 1B）、天然の転写因子 DNA 結合ドメイン（DBD）の機能を模倣し、遺伝子発現をオフにしたりすることが可能である（図 1C）。より正確な転写制御を可能にするためには遺伝子をオンにする機能が必要であった。従って、これまでに我々と杉山弘教授（Co-I）は、エピジェネティック酵素標的の低分子を PIP に結合し、遺伝子活性化機能を付与していった（図 1D）。加えて、PIP にミトコンドリア特異的ペプチド（MITO-PIP）を付加し、ROS 産生に関連する *ND6* 遺伝子の標的サイレンシングを成功させている（図 1E）。また、非病原性細胞株のヘテロプラスミーを改善する、アデニンへの特異的アルキル化剤や GQ 構造の標的リガンドと結合させた PIP も開発した（図 1F）。更に、p300 結合リガンドを PIP に結合し、PGC-1 経路の制御における生物学的有効性を実証してきた。但し、これまでの研究結果から、エピジェネティックコードの機能を正確に模倣するためには、個々に DBD として機能する化合物・機能ドメイン・局在化シグナルとして機能するペプチドを組み合わせる必要性があると感じていた。そこでこれら要素の導入が容易で、生分解性を有し、自己蛍光する物質としてナノ粒子を選択し、そこに導入することで互いの機能を補完した遺伝子発現制御ができるという着想に至った。

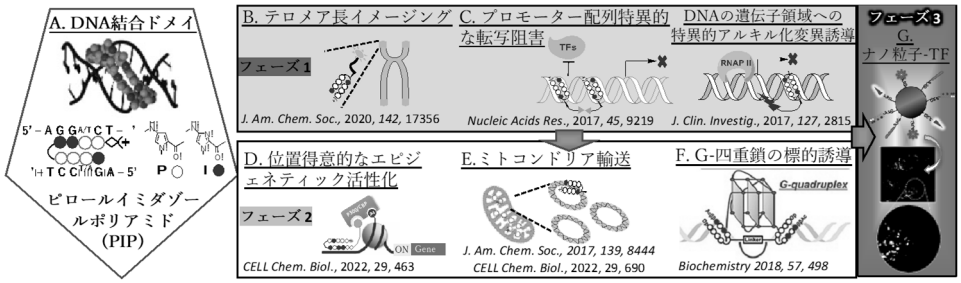


図 1. PIP 構造、DNA 認識、およびそれらの多様な転写標的の発展過程

方　法

1. SMART-TF の合成と特徴

軽鎖プロモーター（LSP）と重鎖プロモーター（HSP）を標的としたピロールイミダゾールポリアミド（PIP）を、固相合成法によって合成した。この合成の際には無水酢酸を用いてアセチル基により N 末端を保護した。逆相カラムクロマトグラフィー（CombiFlash Rf、C18 RediSep Rf reverse-phase flash column from Teledyne Isco, Inc）を使用して、サンプルをさらに精製した。Matrix-assisted laser desorption/ionization（MALDI-TOF）および HPLC を使用して、アミン末端を有する LSP-PIP や HSP-PIP の合成を確認した。今回はシリカナノ粒子の代わりに、グルタチオン（GSH）機能化金ナノクラスターを使用することで、以前から報告されていた手法により合成を行った［2］。PIP およびミトコンドリア透過性ペプチド（MPP）リガンドとの GSH 官能化ナノクラスターの結合は、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）／N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS、Thermo Fisher Scientific）カップリングを用いて行った。LSP 標的 SMART-TF の合成では、50 μL の 10 mM LSP-NH2 溶液（DMSO 中）と 50 μL の 10 mM MPP-NH2 溶液を氷浴で混合し、ボルテックス中に 1 mg/mL ナノクラスター溶液 1 mL を加え、続いて室温で 6 時間振盪した。次に、溶液中に形成された SMART-TF をアミコン限外ろ過膜でろ過し、MPP-NH2 の濃度を維持しながら LSP-NH2 リガンドの量のモル比を調整することにより、LSP/HSP と MPP の比率を変化させて合成した。SMART-TF の合成は、透過型電子顕微鏡、ゼータサイザー、ゼータ電位、および UV-Vis 吸収スペクトルによって確認された。

2. SMART-TF の生物学的評価

最初に、DMEM 基礎培地の 10%ウシ胎児血清（FBS、ThermoFischer®）で培養および維持された Hela 細胞を用いて最適化実験を行った。SMART-TF、PIP 分子、およびコントロールのナノ粒子の導入研究では、細胞を 20%コンフルエンシーで播種し、SMART-TF を無血清 OptiMEM®に 10 μg/ml の濃度で直接懸濁した。システムの再現性を検証するために、ヒト iPSC、神経幹細胞、THP-1 単球、およびヒト皮膚線維芽細胞（JCRB）に対して同じ一連の実験を行った。共局在効率は、Zeiss LSM 800 共焦点顕微鏡下で MitoTracker Green 色素（M7514）を使用したイメージング研究の後、MatLab ソフトウェアパッケージ（コードが利用可能）の標準的なピアソンテストによって確認している。細胞を溶解し、ミトコンドリア遺伝子発現を分析するために、QIAGEN の RNeasy Mini キットを使用して細胞を処理した。ミトコンドリア RNA の発現を分析するために、cDNA に変換し、Roche の LightCycler®キットと SYBR q-PCR ミックスキットにより qPCR を行った。[ND6]発現レベルと[MT-16S]発現レベルの比率により、MitoScript と PIP 分子を使用したミトコンドリア遺伝子抑制効率を定量化した。活性酸素種（ROS）アッセイでは、10 μM ジクロロ-ジヒドロ-フルオレセインジアセテート（DCFH-DA）を生細胞に処理した後、37℃のオーブンで 20 分間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。次に、FITC チャネル下で Nikon 顕微鏡を使用して細胞を画像化し、Nikon Element Air ソフトウェアの自動機能を使用して細胞内蛍光強度を測定することにより、ROS レベルを定量化した。

3. AIによるバイオインフォマティクス分析

OA内の炎症の仕組みをよりよく理解するために、800,000名のOA患者と健康な患者で構成されたバイオバンクから得られた一塩基多型（SNP）の共局在のバイオインフォマティクス分析とサルデーニャ（ブルーゾーンの国）のモデル集団3,750人の健康な免疫プロファイルに基づくメタ分析研究を実施した。AIベースのR統計プログラムとプラグColoc v2.3-1 package64パッケージを考案し、OAに関連するSNP、表現型／免疫表現型形質、およびサルデーニャ人集団からの配列決定されたゲノムを入力し、共局在化の確立を導出した。共局在の確率が（coloc_P）≧0.8の時に、疾患は共局在していると見なし、coloc_P≦0.2の共局在率は、共局在していないと見なした。

4. ナノバイオ相互作用

機能化されたシリコン量子ドットとの相互作用によるヒト免疫グロブリンG（IgG）の立体構造の変化は、紫外可視、蛍光定常状態および励起状態速度論と円偏光二色性によって確認された。schrodingerおよびOPLS 2005ソフトウェアを用いて分子モデリング研究も行っている。*in vivo*においては、地元の養魚場（京都府肥後ペット）から購入したメダカ（Oryzias latipes）の胚と幼生を使用し、25℃に維持された淡水ガラス水槽で10時間の夜と14時間の昼を繰り返すことで人工繁殖条件にさらした。Image-Jソフトウェアによって、メダカの胚と幼虫の平均蛍光強度を計算した。

5. シリカSMART-flareの合成（図2）

アミン修飾表面を持つシリカナノ粒子（NP）を調製し、走査型電子顕微鏡（TEM）画像で均一なサイズのナノ粒子であることを確認した。このナノ粒子をDBCO-NHSクロスリンカーによって修飾した。一方の端がアジドで修飾され、もう一方の端がBHQで修飾されたDNA鎖を日本バイオサービスより入手し、このDBCO修飾ナノ粒子の溶液に加えることでDNA鎖修飾を行った。TEM画像においてDNA修飾後は、靄のような構造が現れ、元素分布マップでDNA由来のリンが正しい位置に示されていることを確認した。

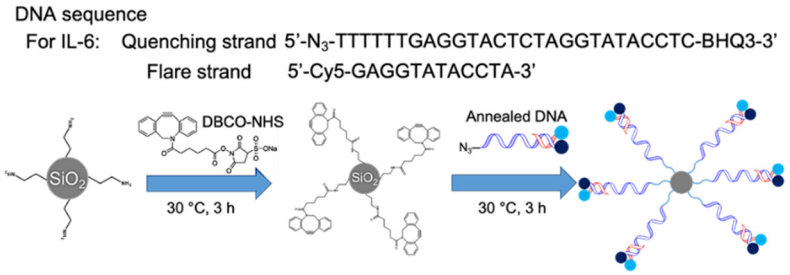


図2. シリカSMART-flareの合成
最初にDBCO-NHSとアミンを反応させ、そこにアジド修飾されたDNA鎖を導入した。

結果および考察

1. SMART-TFによるミトコンドリア遺伝子転写を特異的遺伝子制御

処理時間の最適化後（図3a）、異なる修飾を施したナノ粒子（図3b）をHeLa細胞に処理し、ベースライン遺伝子として16S（ミトコンドリアにコードされた16S RNA）を使用して、軽鎖プロモーター（LSP）領域を標的とするSMART-TFの導入の48時間後にミトコンドリア遺伝子を分析した（図3c）。

アミンを反応させ、そこにアジド修飾されたDNA鎖を導入したコントロールとして、PIPがミトコンドリアゲノムのHSP領域に対して同濃度となるように、LSP標的PIPのみ、MPPのみ、または両方のドメインとコ

ンジュゲートしたナノクラスターを合成して投与した（図 3d）。すべてのグループの中で、SMART-TF のみが ND6 の有意な抑制を示した。これは、LSP 関連ミトコンドリア遺伝子が調節されたことの直接的な根拠となっている。この結果より、MitoScript プラットフォームのマルチドメイン構造の設計が最適であったことが示された。さらに、positive control として、HeLa 細胞を様々な濃度の LSP 標的 PIP で処理した。2%ジメチルスルホキシド（DMSO）を用いてトランスフェクトされた高濃度 PIP（10 μM）溶液は、想定通り *ND6* 遺伝子発現の有意な抑制をもたらし、SMART-TF の低濃度（100 nM）処理と同等の効果が示された（図 3e）。ND6 は、ATP 産生に関与する電子伝達系の NADH デヒドロゲナーゼの重要なサブユニットである。ミトコンドリアで *ND6* 遺伝子が抑制されると、ROS が生成される（図 4a）。そのため、上記で示した LSP を標的とし *ND6* 遺伝子を抑制する SMART-TF は、NADH デヒドロゲナーゼを阻害することによって細胞のレドックスを操作することもできると仮定した。ROS 生成により緑色蛍光の強度が増加する細胞を用いてこの仮説を検証した。SMART-TF 処理された HeLa 細胞において蛍光強度が SMART-TF に対し濃度依存的な増加をしており、この計測によりこの仮説が証明された（図 4a、b）。

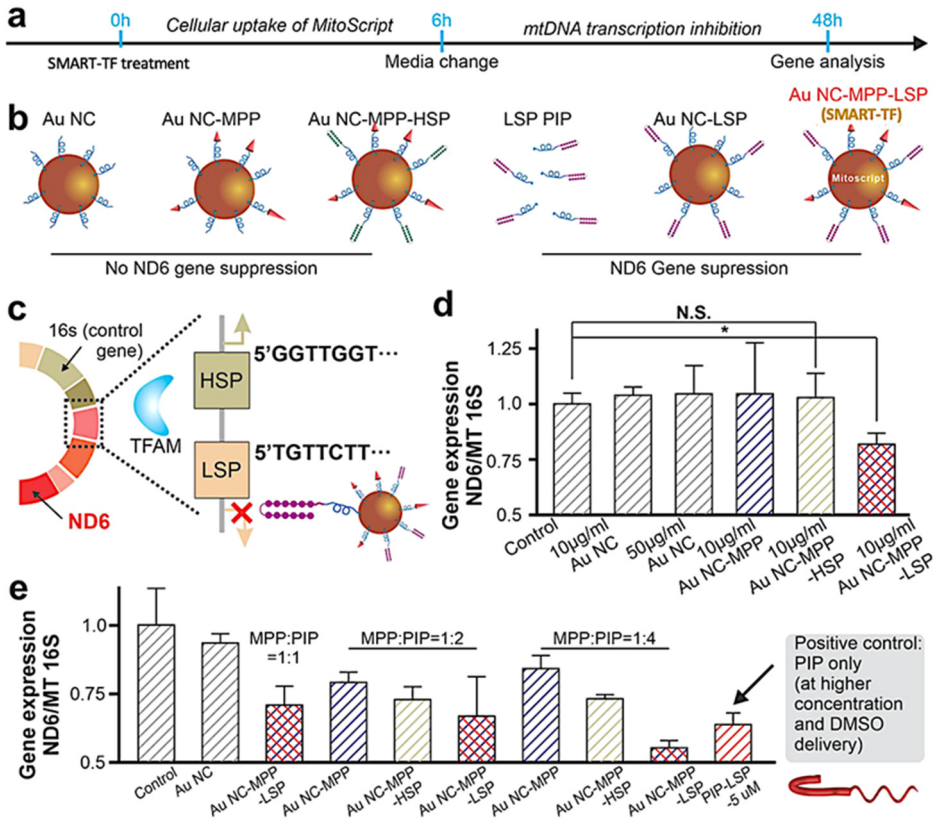


図 3. SMART-TF によるミトコンドリア遺伝子転写を特異的遺伝子制御

a）処理時間について。

b）コントロールと機能化されたナノ粒子の構造。

c）ミトコンドリアの遺伝子転写を研究するための *in vitro* モデルの概略図。

d）SMART-TF による ND6 の選択的抑制。*P＜0.05（Tuckey posthoc analysis を用いた一元配置分散分析検定による）。

e）MPP と PIP の結合比率を 1 : 1、1 : 2、1 : 4 に調整することによる SMART-TF プラットフォームの最適化。生物学的複製は N＝3。

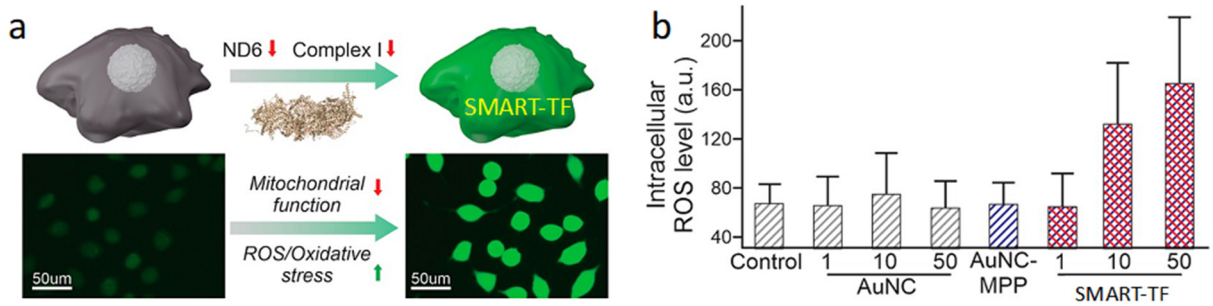


図 4. LSP を標的とし *ND6* 遺伝子を抑制する SMART-TF

a）SMART-TF を介した ND6 抑制が細胞の酸化還元状態の変化につながる。

b）ROS レベルのまとめ。

2. 新規 OA 標的を明らかにした AI ベースのゲノムワイド関連研究（GWAS）研究

初めに、800,000 人の被験者に対して実施された GWAS 研究と、免疫形質の遺伝子型と表現型の両方の遺伝子モデル集団からの健康な患者の研究を用いて、変形性関節症の診断に寄与しうる関係性を洗い出した。先行研究において、ミトコンドリアを可視化するためのいくつかのイメージングソフトウェアが開発されたため、バイオインフォマティクス分析にそれらを使用するという戦略に変更した［3］。CD33 の変化と *ANAPC* 遺伝子および CCR2 とそれぞれの *SLC39A8* 遺伝子との関係を特定し、患者の OA の早期診断に役立つ可能性を探った。本手法では、サルデーニャのような遺伝モデル集団で行われており遺伝子自体が失われている場合があったため、病理学的表現型に関連する遺伝子と有意な p 値が現れる確率が高くなっているものの病理学と有意に関連していない場合があった。OA は免疫系の異常な発現によって引き起こされ、病状の悪化以前でもある一定の遺伝子異常が引き起こされている可能性があると考えたため、サルデーニャ人集団で配列決定された OA および免疫表現型形質と相関する遺伝子の可能性のある関連性を見つけることに特に焦点を当てた。高い OA 発症リスクに関連するような免疫プロファイルは、生物学的マーカーとして、そして最終的には新しい治療の標的となりうる。この見通しをもとに、示した研究では、免疫特性の調節用の薬剤として承認され、すでに治験が行われているあらゆる薬剤をチェックし、IL-6 の役割を特定した。最後に、OA 患者からのシーケンス研究の後、実験データを使用してバイオインフォマティクス研究を行った。COLOC が作成したソフトウェアを用いて、患者から分離されたさまざまな種類の細胞で既に定義されている SNP とシーケンシングされたエピジェネティックな形質を設定した。軟骨から軟骨細胞、滑膜から滑液細胞（SDCS）、膝蓋下脂肪組織から脂肪由来幹細胞（ASC）、骨髄由来幹細胞（BMSC）を分離し、シーケンシングを行った。

3. Silica-SMART-Flare による IL-6 mRNA の検出

多くの細胞で炎症を引き起こす IL-6 を生細胞内で検出するために生分解性のシリカナノ粒子を用いたプローブ開発を行った。このプローブ Silica-SMART-Flare（SSF）は細胞内に導入された後鎖交換反応により蛍光色素がついた DNA 鎖が放出され、蛍光強度が増加するという特徴を持つ。この SSF を様々な処理を施した線維芽細胞に導入し、その蛍光強度を測定した。IL-6 の mRNA と鎖交換反応を引き起こさないスクランブルな SSF と特異的な SSF を比較したところ蛍光強度に差が現れた。

上記すべての研究において開発したナノバイオツールは、免疫プロファイルに対し、ほとんどもしくはまったく変化を引き起こさないナノ粒子誘導体治療の最適な治療条件を明らかにした。RNA 修飾を評価するために、化学プローブベースのナノポアシーケンシングと「Indo C」と呼ばれる新しい内部比較戦略も開発した。研究成果のうち一部は未公開だが、多くの研究をすでに出版物として公開している［4～6］。GitHub でのコードも提供している（https://github.com/geno-verse/indoC）。今後は、既存のネットワークを維持するために、膝関節を模倣したバイオリアクターを用いて、開発した治療法および評価ツールの検証に焦点を当てる予定である。

共同研究者・謝辞

私たちは、研究ネットワークを拡大し、持続可能な共同研究を確立することを可能にしてくださった上原記念生命科学財団に心から感謝しております。共同研究者は、京都大学大学院理学研究科の杉山弘教授と安倍克彦氏、米国ラトガース大学の KiBum Lee 教授、スイス AO 研究所の Martin Stoddart 教授、Elena Della Bella 博士、Valentina Basoli 博士、インド工科大学の Balasubramaniam Raman 教授です。加えて、V.B.への日本学術振興会招へいフェローシップ、K.A.への海外挑戦プログラム・若手研究者交換プログラムの助成に対し心より感謝をしております。また、G.N.P への日本学術振興会科研費（助成番号 22K19291）と京都大学物質－細胞統合システム拠点に感謝を表明いたします。

文　献

1） Zahan OM, Serban O, Gherman C, Fodor D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. Med Pharm Rep. 2020 Jan;93(1):12-22. doi: 10.15386/mpr-1422. Epub 2020 Jan 31. PMID: 32133442; PMCID: PMC7051818.

2） Yang L, Rathnam C, Hidaka T, Hou Y, Conklin B, Pandian GN, Sugiyama H, Lee KB. Nanoparticle-Based Artificial Mitochondrial DNA Transcription Regulator: MitoScript. Nano Lett. 2023 Mar 8;23(5):2046-2055. doi: 10.1021/acs.nanolett.2c03958. Epub 2023 Jan 23. PMID: 36688839.

3） Sahayasheela VJ, Lankadasari MB, Dan VM, Dastager SG, Pandian GN, Sugiyama H. Artificial intelligence in microbial natural product drug discovery: current and emerging role. Nat Prod Rep. 2022 Dec 14;39(12):2215-2230. doi: 10.1039/d2np00035k. PMID: 36017693; PMCID: PMC9931531.

4） Chinnathambi S, Shirahata N, Kumar M, Karthikeyan S, Abe K, Thangavel V, Pandian GN. Nano-bio interaction between human immunoglobulin G and nontoxic, near-infrared emitting water-borne silicon quantum dot micelles. RSC Adv. 2023 Feb 20;13(9):6051-6064. doi: 10.1039/d3ra00552f. PMID: 36814879; PMCID: PMC9939978.

5） Ramasamy S, Mishra S, Sharma S, Parimalam SS, Vaijayanthi T, Fujita Y, Kovi B, Sugiyama H, Pandian GN. An informatics approach to distinguish RNA modifications in nanopore direct RNA sequencing. Genomics. 2022 May;114(3):110372. doi: 10.1016/j.ygeno.2022.110372. Epub 2022 Apr 20. PMID: 35460817.

6） Ramasamy S, Sahayasheela VJ, Sharma S, Yu Z, Hidaka T, Cai L, Thangavel V, Sugiyama H, Pandian GN. Chemical Probe-Based Nanopore Sequencing to Selectively Assess the RNA Modifications. ACS Chem Biol. 2022 Oct 21;17(10):2704-2709. doi: 10.1021/acschembio.2c00221. Epub 2022 Oct 3. PMID: 36190780.