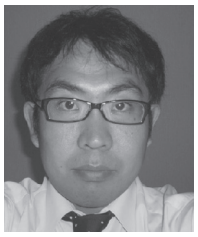
薬 剤 学, **72** (1), 53–57 (2012)

≪若手研究者紹介≫



ミトコンドリアとDDS

山 田 勇 磨* Yuma Yamada
北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室

1. はじめに

多彩な機能を有するミトコンドリアは様々な分野から注目されており，疾患治療，美容・健康の維持，ライフサイエンスの発展に大きく貢献するオルガネラとして脚光を浴びている．これまでに，ミトコンドリアの機能不全と様々な疾患との関連が明らかとなってきており，本オルガネラを標的とした薬物治療が注目されている．例えば，電子伝達系の機能低下による糖尿病，アポトーシスの制御異常による癌・心筋梗塞，マイトファジー誘導異常によるパーキンソン病，ミトコンドリア融合・分裂異常による神経筋疾患，mtDNAの変異・欠損によるミトコンドリア遺伝病などが挙げられる．現在までに，ミトコンドリアを標的とした薬物送達システム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．本稿では，ミトコンドリアへの薬物送達システムについて概説するとともに，我々が設計したミトコンドリア標的型ナノデバイスMITO-Porter[1]を用いたミトコンドリアへの薬物送達戦略の試みを紹介する．

2. ミトコンドリア標的型DDS開発の現状

ミトコンドリアは，外膜・内膜からなる2層の膜構造を有しており，電子伝達系の存在する膜間腔領域とミトコンドリアゲノム（mtDNA）の存在するマトリクス領域から構成されている．ミトコンドリアの外膜は分子量5 kDaまでの低分子を非特異的に透過させるが，内膜において膜透過性に対する抵抗性が極めて高く薬物の送達は非常に困難である．ミトコンドリアへの薬物送達を達成するためには，細胞質まで送達された薬物をこの鉄壁のバリアを乗り越えて，ミトコンドリア内部まで送達しなければならない．ここでは，現在までに報告されているミトコンドリアを標的としたDrug delivery system（DDS）[2]をいくつか紹介する．Lipophilic triphenylphosphonium cation（TPP），Rhodamine 123などの脂溶性カチオン物質はミトコンドリアの有する大きな負電位を利用して，静電的相互作用によってミトコンドリア膜を介して薬物を送達するため，脂溶性低分子には非常に有用な戦略である．本戦略はビタミンEのような脂溶性低分子薬物の送達に有用であるが，ミトコンドリア膜を通過する戦略のため，送達分子の「分子量，物性」を考慮する必要がある．また，ミトコンドリア移行能を有するペプチドMitochondrial Targeting Sequence（MTS）は，TOM/TIM複合体を介して選択的にタンパク質，オリゴ核酸を送達する戦略として注目されているが，送達分子のサイズ・種類を大きく制限する点が問題点として挙げられる．ベシクルタイプのDDSとしては，Weissigらが開発したミトコンドリア膜と親和性の高いカチオニックリポソーム（DQAsome）[3]と我々が開発したミトコンドリア融合性リポソーム（MITO-Porter）[1]が報告されている．ベシクルタイプのDDSは送達分子への機能素子修飾を必要としないため，操作の煩雑性・失活の恐れなどがなく他の戦略と比較して大きなアドバンテージを有してい

*2003年北海道大学薬学部卒業（薬剤分子設計学研究室），2005年同修士課程修了後，同博士課程進学．2007年同助手に着任（同博士課程中退），2008年博士（薬学）［北海道大学］取得，同10月より現職，助教．2011年北海道大学病院・東日本大震災医療救護班として復興支援活動に従事．連絡先：〒060–0812 札幌市北区北12条西6丁目
E-mail：u-ma@pharm.hokudai.ac.jp

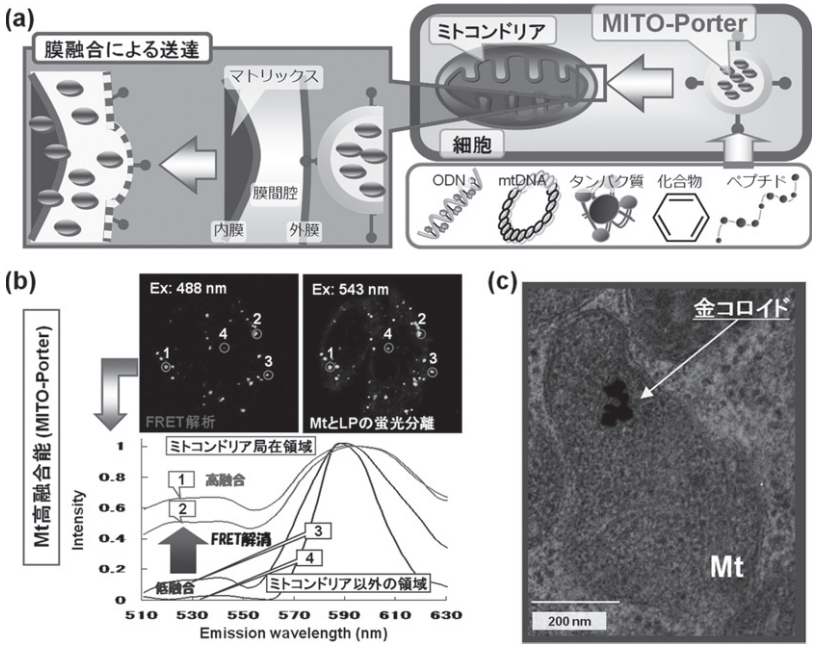


図 1　ミトコンドリア融合性リポソーム MITO-Porter による薬物送達戦略
MITO-Porter コンセプト（a），細胞内 FRET による膜融合評価（b），電子顕微鏡観察（c）．

る．Weissig らは，生細胞内においても DQAsome が機能し，ミトコンドリア近傍まで DNA を送達する事を確認している．本送達戦略はミトコンドリアを標的とした遺伝子送達キャリアとして非常に画期的な戦略であるが，ミトコンドリア近傍の DNA がミトコンドリア内に送達される可能性は極めて低く，今後，さらなるキャリアの改善が期待されている．

3.　ミトコンドリア融合性リポソーム，MITO-Porter によるミトコンドリア送達の挑戦

我々はミトコンドリア標的型 DDS として，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ミトコンドリア融合性リポソーム，MITO-Porter を考案した（図 1（a））[1]．本戦略では，「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，送達分子種を制限しない．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，単離ミトコンドリアと融合能の高いリポソーム（DOPE/SM/STR-R8［9：2：1］＝MITO-Porter）を得る事に成功した．本キャリアが細胞内で機能する事を確認するために，細胞内 FRET を利用した膜融合の解析を行った．スペクトラルイメージング法を FRET 解消率算出（膜融合能の指標）に応用し，生きた細胞

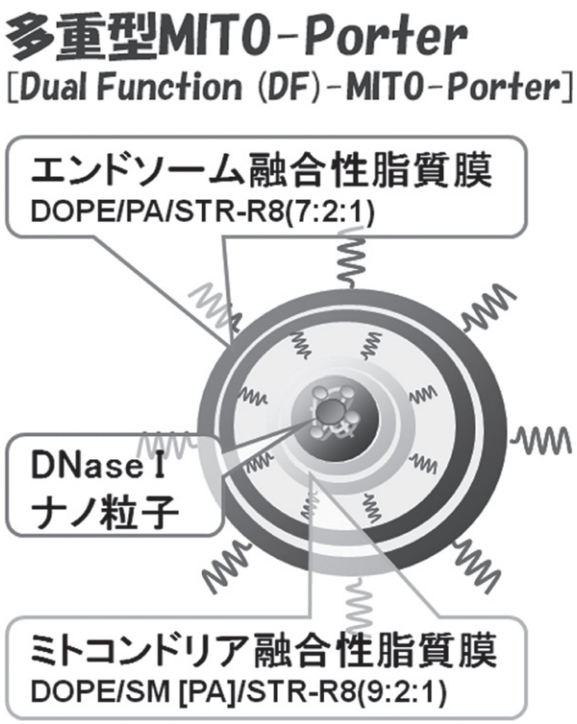


図 2　多重型 MITO-Porter の概念図

のミトコンドリアと MITO-Porter が膜融合している様子を観察する事に成功した（図 1（b））．MITO-Porter の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結果，内封物質 Green fluorescent protein（GFP）がミトコンドリアまで送達される様

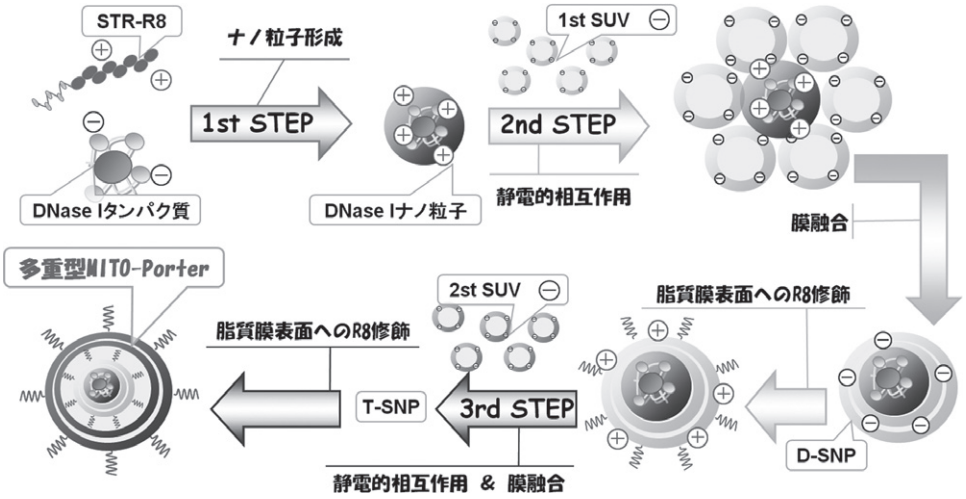


図 3　DNase I タンパク質封入多重型 MITO-Porter の調製工程
SUV, small unilamellar vesicle; D-SNP, di-lamellar structured nano particle; T-SNP tetra-lamellar SNP.

子が観察できた．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部まで送達されている事を確認した（図 1（c））．

4.　多重型 MITO-Porter の構築

MITO-Porter をより性能の高いナノデバイスへと進化させるために，新たなナノデバイスを設計した．新たにデザインした多重型 MITO-Porter（Dual Function（DF）-MITO-Porter）[4]は，MITO-Porter がエンドソーム膜融合性脂質でコーティングされた構造を有し，その内部には凝縮化された高分子ナノ粒子が内封されるように設計されている（図 2）．多重型 MITO-Porter は，①エンドソーム膜，ミトコンドリア膜を効率よく突破するため，ミトコンドリアの薬物送達効率が飛躍的に向上する事が期待される．また，②高濃度の高分子薬物が内封されているため，細胞導入効率の上昇も期待できる．図 3 に DNase I タンパク質を搭載した多重型 MITO-Porter のパッケージング概略図を示す．はじめに，タンパク質凝縮能のあるステアリルオクタアルギニン（STR-R8）を用いて，DNase I タンパク質ナノ粒子を形成する．次に，調製したナノ粒子をミトコンドリア融合性脂質でパッケージングし，その後，多層膜パッケージング法を利用してエンドソーム融合性脂質でパッケージングする．多重型 MITO-Porter の物性は，粒子径が約 150 nm，ゼータ電位が約 30 mV であった．

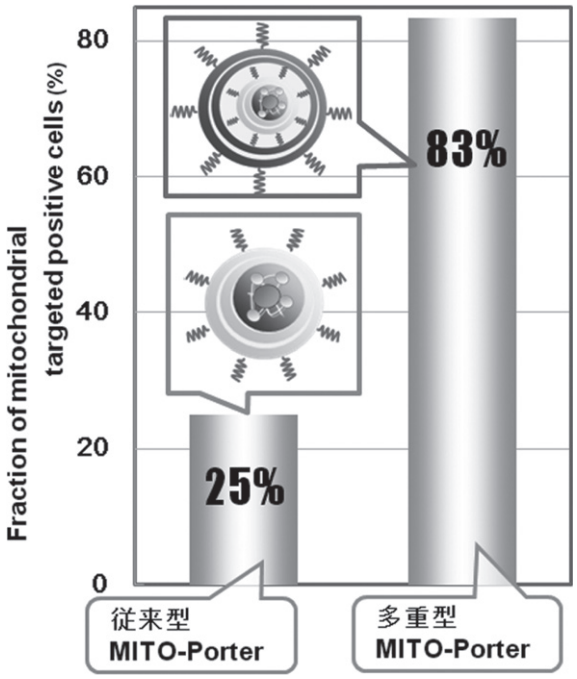


図 4　多重型 MITO-Porter および従来型 MITO-Porter のミトコンドリア移行能の比較
細胞内動態観察画像に基づき Fraction of mitochondrial targeted positive cells を算出した．

多重型 MITO-Porter のミトコンドリア移行能を評価するために，キャリアの細胞内動態を共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察した．エンドソーム・ライソソーム染色後の観察結果より，従来型 MITO-Porter と比較して多重型 MITO-Porter を用いた場合に効率的にエンドソームを脱出する様子が観察された．さらに，ミトコンドリア染色後の観察結果において，多重型 MITO-Porter ではミトコン

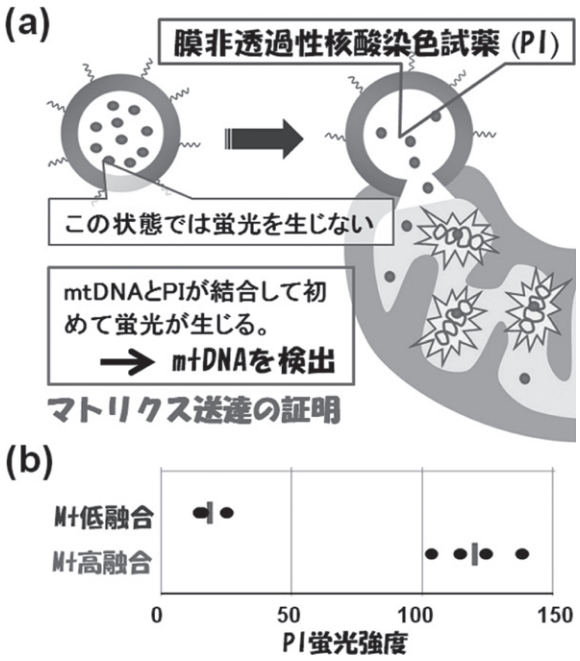


図 5　ミトコンドリアマトリクス送達の検証
ミトコンドリアマトリクス送達検証概略図（a），単離ミトコンドリアを用いた評価（b）.

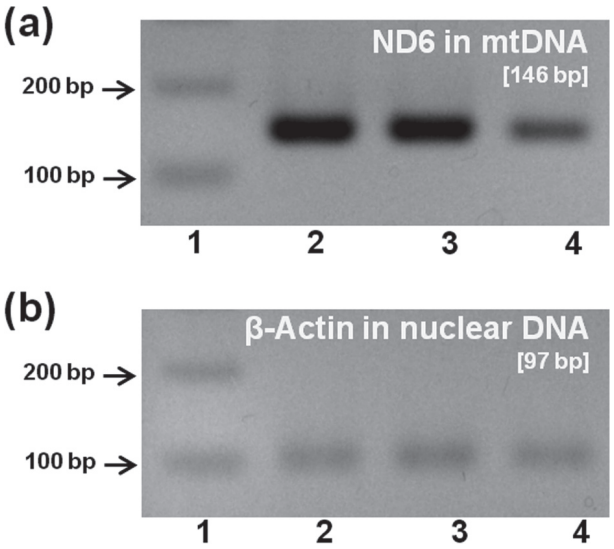


図 6　DNase I タンパク質送達後の mtDNA および核 DNA の検出
DNase I タンパク質送達後に細胞内 DNA を回収し，PCR を行い ND6（(a)，mtDNA）および β-Actin（(b)，核 DNA）を検出した．Lane 1, 100 bp DNA Ladder；lane 2，未処理；lane 3，ミトコンドリア低融合能キャリア；lane 4, DF-MITO-Porter.

ドリアと共局在している様子が多くの細胞で確認された．顕微鏡観察イメージを定量的に評価し，Fraction of mitochondrial targeted positive cells（ミトコンドリア移行能の指標）を算出した．その結果，多重型 MITO-Porter は従来型 MITO-Porter のミトコンドリア移行能を劇的に上昇させ，生細胞ミトコンドリア送達における多重型構造体の有用性が示唆された（図 4）[4].

5.　ミトコンドリアを標的とした遺伝子治療への挑戦

ミトコンドリア関連疾患の多くは，ミトコンドリアが有する独自のゲノム mtDNA の変異・欠損が関連している事が明らかとなっており，mtDNA の複製・転写阻害，修復，分解に関する戦略が注目されている．これらの革新的戦略を遺伝子治療へと発展させるためには，疾患細胞を標的とし，mtDNA の存在するミトコンドリアマトリクスへ治療分子を送達する DDS の開発が重要となる．我々は，MITO-Porter によるミトコンドリアマトリクス送達が可能か否かを検証した（図 5）．膜非透過性核酸染色試薬 propidium iodide（PI）を封入したキャリアを単離ミトコンドリアに添加し，mtDNA が結合して生じた PI 蛍光量を測定した（図 5（a））．その結果，MITO-Porter はミトコンドリア低融合性キャリアよりも高い蛍光強度を示し，ミトコンドリアマトリクス送達が可能である事が示唆された（図 5（b））[5]．さらに，本キャリアは生細胞においてもミトコンドリアマトリクス送達が可能である事を確認している．

また，ミトコンドリア遺伝子（mtDNA）を標的としたアプローチとして，DNase I タンパク質封入多重型 MITO-Porter を調製し，生細胞ミトコンドリアへの送達および mtDNA への作用（mtDNA の分解）を検証した [4]．mtDNA の分解評価では，DNase I タンパク質内封キャリアを生細胞に添加後，細胞内のミトコンドリア・核遺伝子を回収し PCR を利用して遺伝子量を測定した（図 6）．評価の結果, 多重型 MITO-Porter を用いた場合に mtDNA の減少が確認された一方で，ミトコンドリア低融合キャリアでは mtDNA の減少は確認されなかった（図 6（a））．さらに，核由来の遺伝子を測定した結果，いずれのキャリアを用いた場合にも遺伝子量の減少は確認されず（図 6（b）），多重型 MITO-Porter がミトコンドリア選択的に遺伝子標的可能であることが示唆された．現在は，MITO-Porter を用いたミトコンドリアを標的とする遺伝子治療を目指し,『ミトコンドリア標的型核酸キャリアの構築』,『*in vivo* ミトコンドリア核酸送達技術の確立』,『ミトコンド

図 7　ミトコンドリアと DDS 1st グラビア

リア内転写・翻訳制御機構の解明』に関する研究を精力的に進めている．

6. おわりに

本稿では，ミトコンドリアを標的とした DDS 研究に関して，我々の研究を中心に議論してきた．ミトコンドリアを標的とした疾患治療，さらには遺伝子治療を実現するためには，DDS の開発だけではなくミトコンドリアの生化学，分子生物学，臨床研究などの異分野研究の融合が必要不可欠である．筆者は，このような背景のもと医薬基盤研究所：保健医療分野における基礎研究推進事業（ミトコンドリア標的型 DDS の開発）の一環として，『ミトコンドリアと DDS』と題したシンポジウムを開催し，異分野研究者間の交流，産・官・学の連携強化，国民・社会への情報発信を推進する活動を展開している．第 1 回シンポジウムは 2011 年 1 月に後藤雄一先生（国立精神・神経医療研究センター）を招聘し盛会のうちに幕を閉じた（図 7）．2012 年 1 月 20 日には第 2 回シンポジウム（於：北海道大学・薬学部）を企画しており，野村政壽先生（九州大学病院）を招聘する予定である．興味のある方は是非ともご参加いただきたい（問合せ先：山田勇磨［u-ma@pharm.hokudai.ac.jp］）．今後は，このようなシンポジウムを通じて『ミトコンドリアと DDS』が国民・社会へもたらす効果を伝えつつ，疾患治療に応用可能なナノデバイスの創製に精力的に取り組んでいきたい．

引用文献

1) Y. Yamada, H. Akita, H. Kamiya, K. Kogure, T. Yamamoto, Y. Shinohara, K. Yamashita, H. Kobayashi, H. Kikuchi, H. Harashima. MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 423–432 (2008).
2) E. Zhang, C. Zhang, Y. Su, T. Cheng, C. Shi. Newly developed strategies for multifunctional mitochondria-targeted agents in cancer therapy, *Drug Discov. Today*, **16**, 140–146 (2011).
3) V. Weissig, G. G. D'Souza, V. P. Torchilin, DQAsome/DNA complexes release DNA upon contact with isolated mouse liver mitochondria, *J. Control. Release*, **75**, 401–408 (2001).
4) Y. Yamada, R. Furukawa, Y. Yasuzaki, H. Harashima, Dual function MITO-Porter, a nano carrier integrating both efficient cytoplasmic delivery and mitochondrial macromolecule delivery, *Mol. Ther.*, **19**, 1449–1456 (2011).
5) Y. Yasuzaki, Y. Yamada, H. Harashima. Mitochondrial matrix delivery using MITO-Porter, a liposome-based carrier that specifies fusion with mitochondrial membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397**, 181–186 (2010).