

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical research project for rare/intractable diseases

研究開発課題名： (日本語) ナノカプセルを用いた拡張型心筋症に対するミトコンドリアをターゲットとした新規治療法の開発  
(英語) Development of new therapy targeting mitochondria for dilated cardiomyopathy by liposome-based nanocarrier

研究開発担当者 (日本語) 循環病態内科学教室 講師 絹川真太郎  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Lecturer, Shintaro Kinugawa

実施期間： 平成28年11月1日 ～ 平成30年3月31日

分担研究 (日本語) ナノカプセルを用いた拡張型心筋症に対するミトコンドリアをターゲットとした新規治療法の開発  
開発課題名： (英語) Development of new therapy targeting mitochondria for dilated cardiomyopathy by liposome-based nanocarrier

研究開発分担者 (日本語)  
国立大学法人北海道大学 大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室 准教授 山田 勇磨  
国立大学法人北海道大学 大学院医学研究科循環病態内科学 助教 横田 卓  
国立大学法人北海道大学 大学院医学研究科循環病態内科学 博士研究員 高田 真吾  
北海道大学病院 循環器内科 医員 降旗 高明  
北海道大学病院 卒後臨床研修センター 准教授 石森 直樹  
北海道大学病院 臨床研究開発センター センター長 佐藤 典宏  
国立大学法人北海道大学 探索医療教育研究センターTR企画管理部門 部門長 杉田 修  
国立大学法人北海道大学 大学院医学研究科連携研究センターレギュラトリーサイエンス部門 教授 荒戸 照世  
北海道大学病院 臨床研究開発センター臨床開発推進部門 准教授 稲毛 富士郎

所属 役職 氏名：（英 語）

Laboratory for Molecular Design of Pharmaceuticals, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Associate Professor Yuma Yamada.

Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Research Associate Takashi Yokota.

Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Postdoctoral Fellow, Shingo Takada.

Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University Hospital, Clinical Fellow, Takaaki Furihata.

Hokkaido University Hospital Clinical Training Center, Associate Professor, Naoki Ishimori.

Hokkaido University Hospital Deputy Director Clinical Research and Medical Innovation Center, Professor, Director, Norihiro Sato.

Hokkaido University Hospital Clinical Research and Medical Innovation Center Research and Development Division, Specially Appointed Professor, Osamu Sugita.

Graduate School of Medicine Research Center for Cooperative Projects Division of Regulatory Science Department of Regulatory Science, Professor, Teruyo Arato.

Hokkaido University Hospital Clinical Research and Medical Innovation Center Quality Management Division/Research and Development Division, Specially Appointed Associate Professor, Fujio Inage.

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

心筋細胞と親和性の高い脂質組成を探索し、高い心筋細胞導入能を有するナノカプセルを構築することができた。このナノカプセルの心筋細胞への取り込み量をフローサイトメトリーにより評価し、心筋細胞導入能を最適化した。作成したナノカプセルをミトコンドリア移行性機能素子で修飾することにより、心筋細胞への取り込量を低下させずに、ミトコンドリア移行性が高まることを蛍光顕微鏡観察により確認した。過去の報告にしたがって、マウス各種臓器サンプルから環状ミトコンドリア DNA を作成（Hum Gene Ter 20:897-907, 2009）に取り組んでいる。並行して、ミトコンドリア遺伝子でコードされた 13 遺伝子の一つである ND4 を組み込んだウイルスプロモーターを有するプラスミド DNA (pDNA) を設計・作成した（国際特許出願中：PCT/JP2016/85098）。この pDNA によってミトコンドリアにおける強力な遺伝子発現活性が示された。作成した pDNA をナノカプセルに搭載し、心筋細胞におけるミトコンドリアでの遺伝子発現検証を行い、発現活性が得られることを確認した。

We searched for lipid composition with high affinity for cardiomyocytes and constructed a liposome-based nanocarrier with high capability to be introduced into cardiomyocytes. The amount of uptake of this nanocarrier into cardiomyocytes was evaluated by flow cytometry to optimize cardiomyocyte transduction ability. By modifying the liposome-based nanocarrier with a mitochondrial RNA aptamer, it was confirmed by fluorescence microscopy observation that mitochondrial targeting rate was increased without decreasing uptake into cardiomyocytes. In accordance with previous report, we are working on creating cyclic mitochondrial DNA from various mouse organ samples (Hum Gene Ter 20; 897-907, 2009). In parallel, a plasmid DNA (pDNA) having a viral promoter incorporating ND4 which is one of the 13 genes encoded by the mitochondrial gene was designed and prepared (International Patent Pending: PCT / JP2016 / 85098). This pDNA showed potent gene expression activity in mitochondria. The prepared pDNA was mounted on liposome-based nanocarrier, and gene expression in mitochondria in cardiomyocytes was verified, and it was confirmed that expression activity could be obtained.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Yamada Y, Munechika R, Kawamura E, Sakurai Y, Sato Y, Harashima H. Mitochondrial delivery of Doxorubicin using MITO-Porter kills drug-resistant renal cancer cells via mitochondrial toxicity. J Pharm Sci (in press).
2. Yamada Y, Ishikawa T, Harashima H. Validation of the use of an artificial mitochondrial reporter DNA vector containing a Cytomegalovirus promoter for mitochondrial transgene expression. Biomaterials (in press).
3. Yamada Y, Harashima H. MITO-Porter, Multifunctional Envelope-Type Nano Device for Mitochondrial Delivery toward Innovative Nano Medicine. J. Soc. Powder Technol., Japan (in press).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ミトコンドリア標的型ナノカプセル・MITO-Porter を用いたミトコンドリアを標的とする疾患治療戦略の提案, 山田勇磨, 原島秀吉, 第 10 回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2016/11/6、国内.
2. 心筋細胞ミトコンドリアを標的とするナノキャリアの構築, 藤下直樹, 山田勇磨, 原島秀吉, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み 特になし

1. ミトコンドリアに薬を運ぶナノカプセル —ミトコンドリア病の新しい治療法を探る—, 山田勇磨, 「ミトコンドリア病を知る市民公開講座」, 2016/11/19, 国内.

(4) 特許出願

PCT/JP2016/85098