

ミトコンドリアのDNAを標的にした 根本的な治療薬の開発を目指して

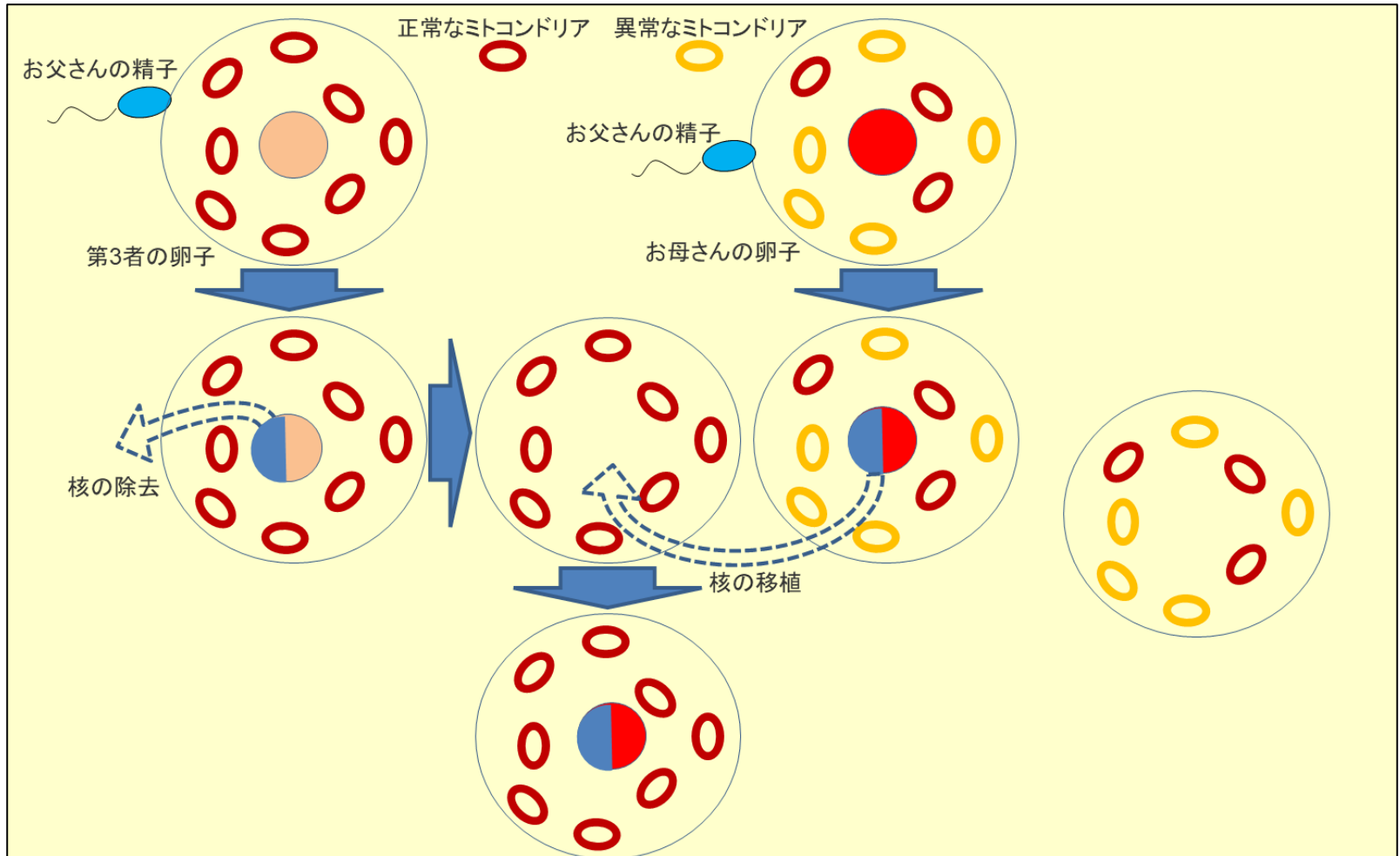
永瀬 浩喜

くすり で
異常なミトコンドリアを除去し
正常なミトコンドリアを増やす

ミトコンドリア置換による治療の試み (2016年4月男児出産)

根本的な治療、発症予防効果が考えられる しかし 異常なミトコンドリアが残る可能性

異常なミトコンドリアの増加を防ぐ、完全に除去する治療・薬剤が必要

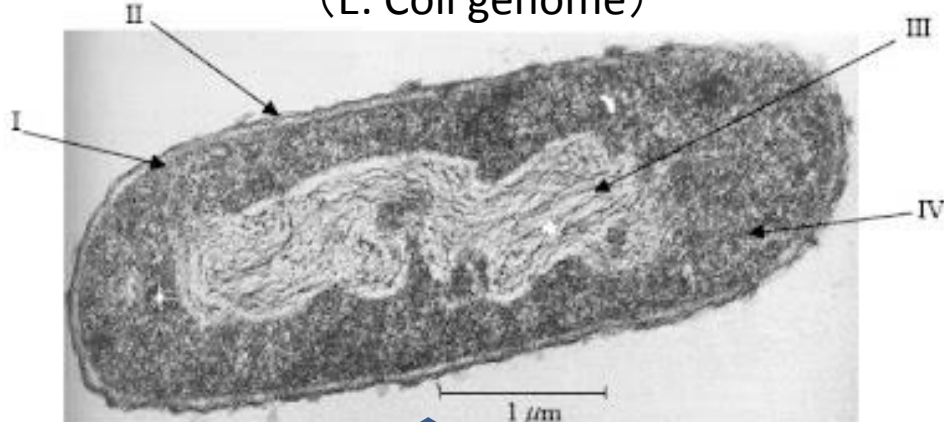


ミトコンドリアのDNAを標的にした根本的な治療薬の開発を目指して

大腸菌

46,000,000 bp 4千6百万対

(E. Coli genome)

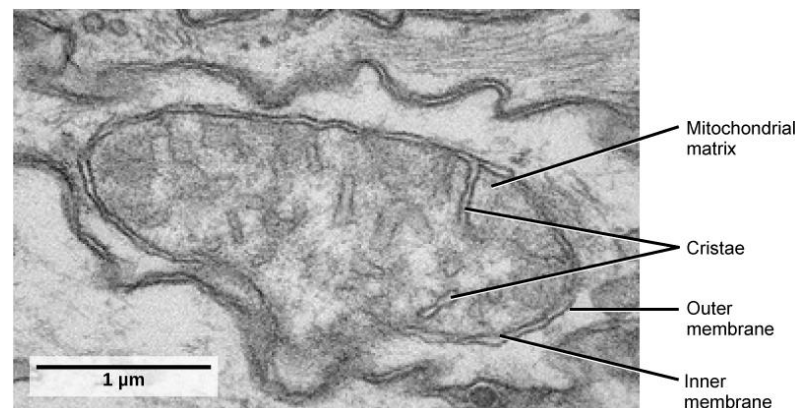


約 3000 倍

>>>

ミトコンドリア

16,569 bp 1万7千対弱



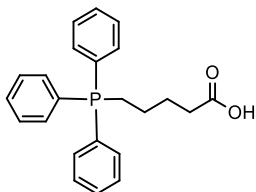
抗生物質(他の菌を駆逐し自身を増加)

細菌ゲノムを標的にしたDNA副溝結合化合物
マイナーグループバインダー

変異ミトコンドリアを駆逐する
抗ミトコンドリア物質も創れるはず

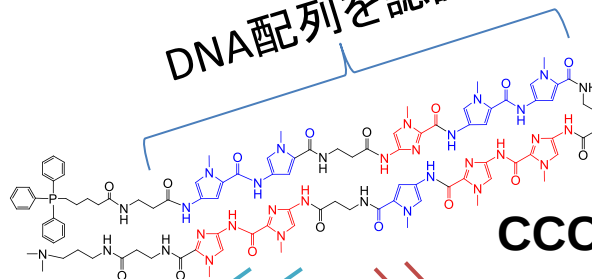
変異ミトコンドリアDNA配列を識別する MELAS3242G変異特異的標的化合物を合成した

TPP: triphenylphosphonium



ミトコンドリアに
運ぶ化合物

DNA配列を認識



CCC024-TPP

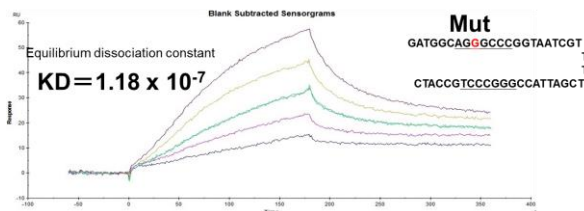
認識し結合

結合出来ない

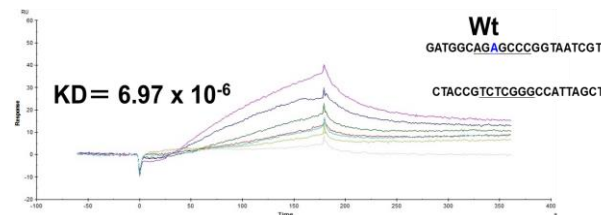
ATGGCAGGGCCCGG
MELAS 3243G 変異配列

ATGGCAGAGCCCGG
正常 ミトコンドリア 配列

変異ミトコンドリアDNA配列を特異的に識別する化合物



SPRアッセイという方法で
60倍結合力が強い



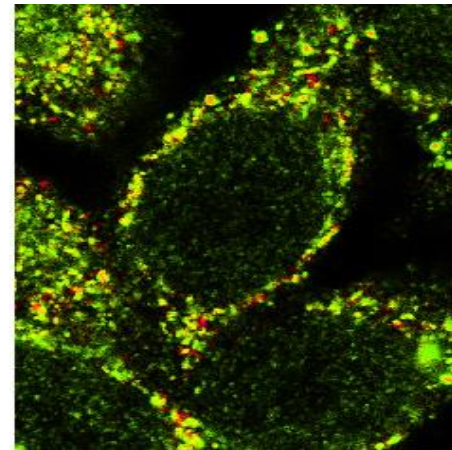
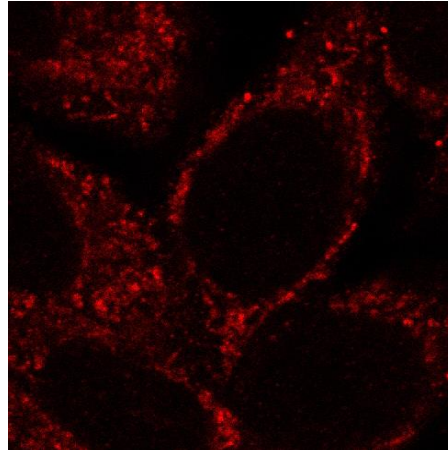
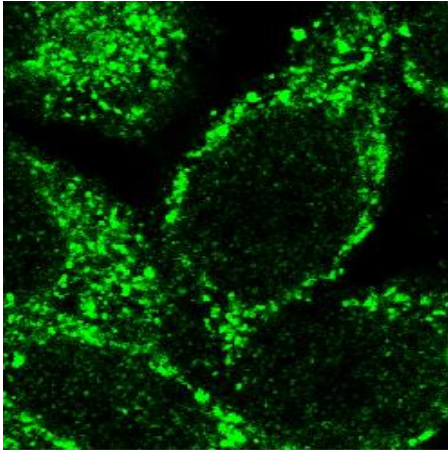
薬が核のDNAではなくミトコンドリアDNAに届いている
CCC024-TPPはミトコンドリアに局在する

薬の細胞内局在(TPP)

ミトコンドリアの局在(Cyt c)

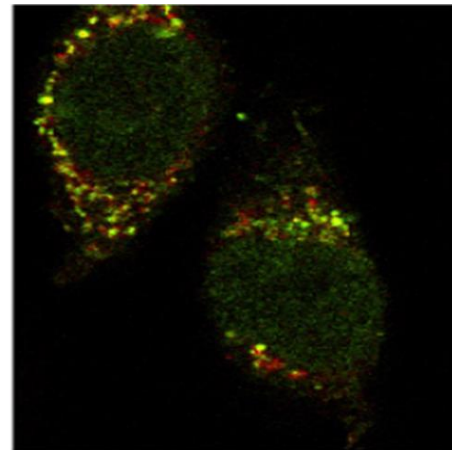
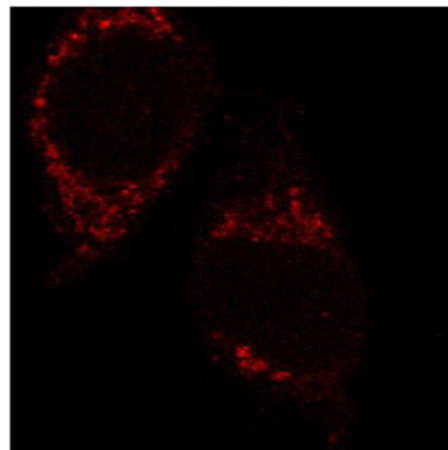
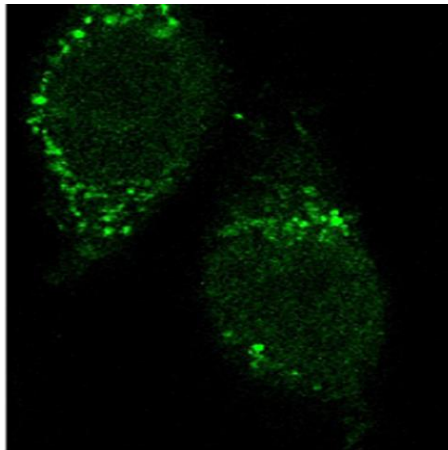
薬がミトコンドリアに局在

HeLa
(3243G High)



(3 d)

HeLa
(3243G Low)



(14 d)

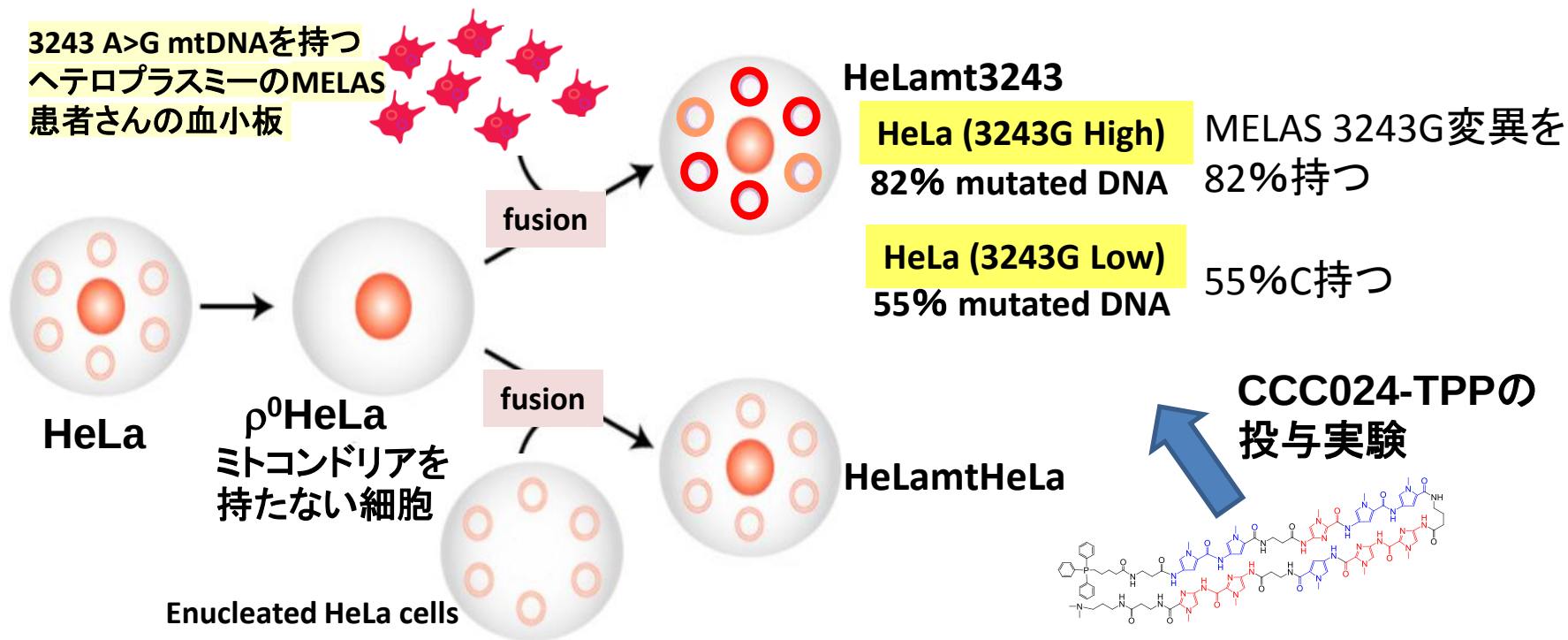
3243G High cybrid: 3 days after CCC024-TPP treatment (100nM)

3243G Low cybrid: 14 days after CCC024-TPP treatment (500nM)

「変異ミトコンドリアDNAに結合することで変異ミトコンドリアが増え難くなる」
と考えた

このことを確認するため

MELAS 3243G変異を持つヒト子宮頸がん細胞モデルを利用した



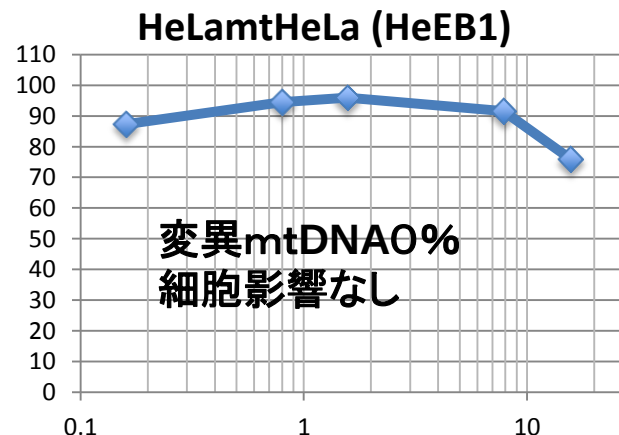
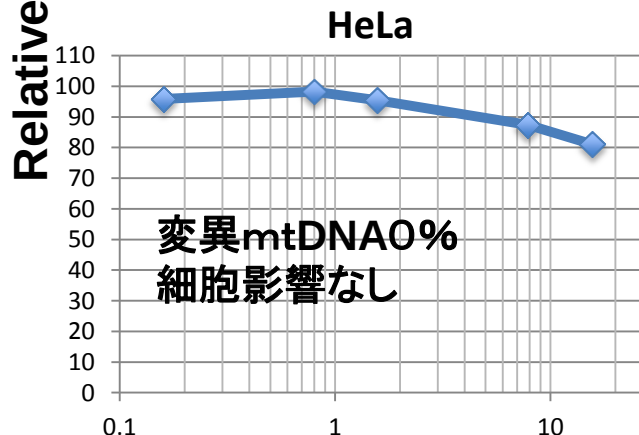
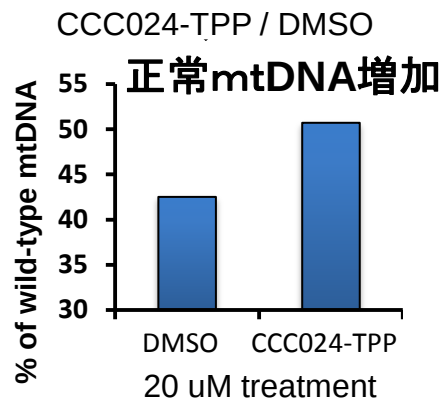
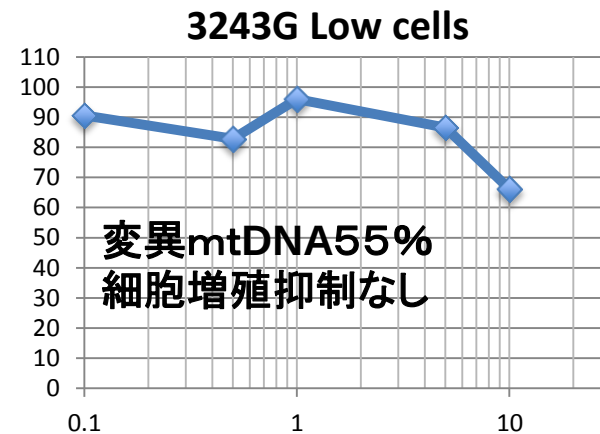
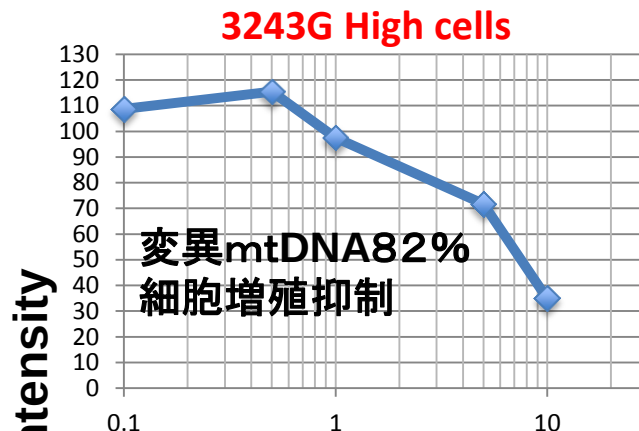
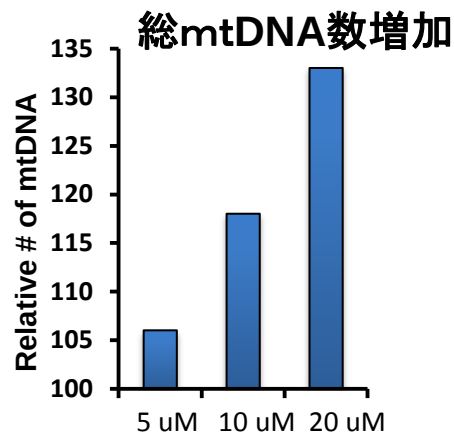
Cybrids were provided by Profs. J. Hayashi and K. Nakada group (Tsukuba Univ.)

CCC024-TPP の投与で変異ミトコンドリアの割合が減少

総ミトコンドリアDNA数は増加した

変異ミトコンドリアの割合が多い(82%)細胞では細胞が増えなくなったが、
割合が少ない細胞(55%)やない細胞には影響しなかった

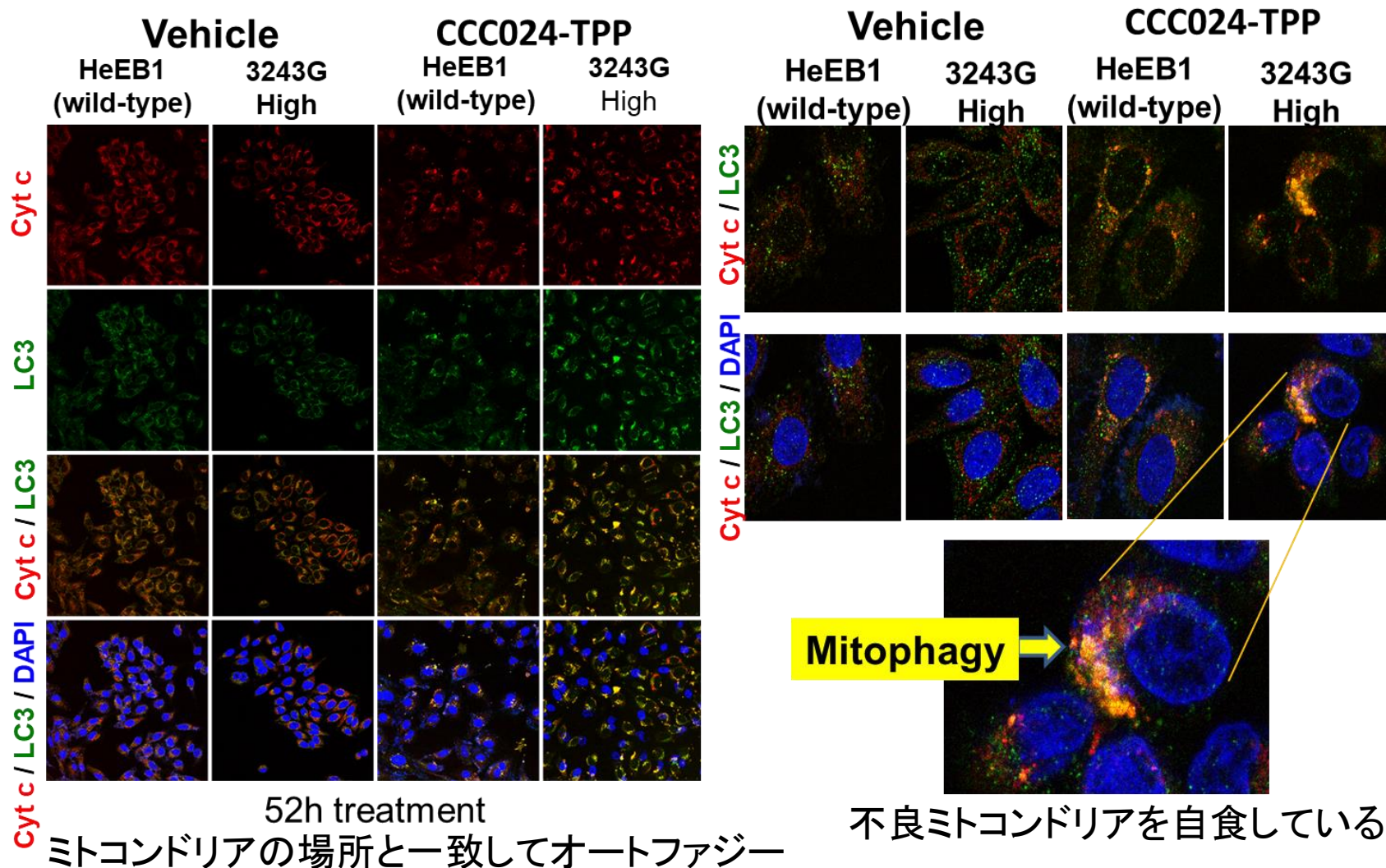
60 days CCC024-TPP
treatment in 3243G low cells



48h treatment of CCC024-TPP (μ M)

CCC024-TPP の投与で変異ミトコンドリアがなぜ減少するのか？

不良ミトコンドリアを除去する仕組み(マイトファジー)が活性化
MELAS変異をもつミトコンドリアが不良として認識されるようになった



ミトコンドリアを品質管理する機構がある

健康人では頻繁に
不良ミトコンドリアは発生するが、
品質管理機構で除去される

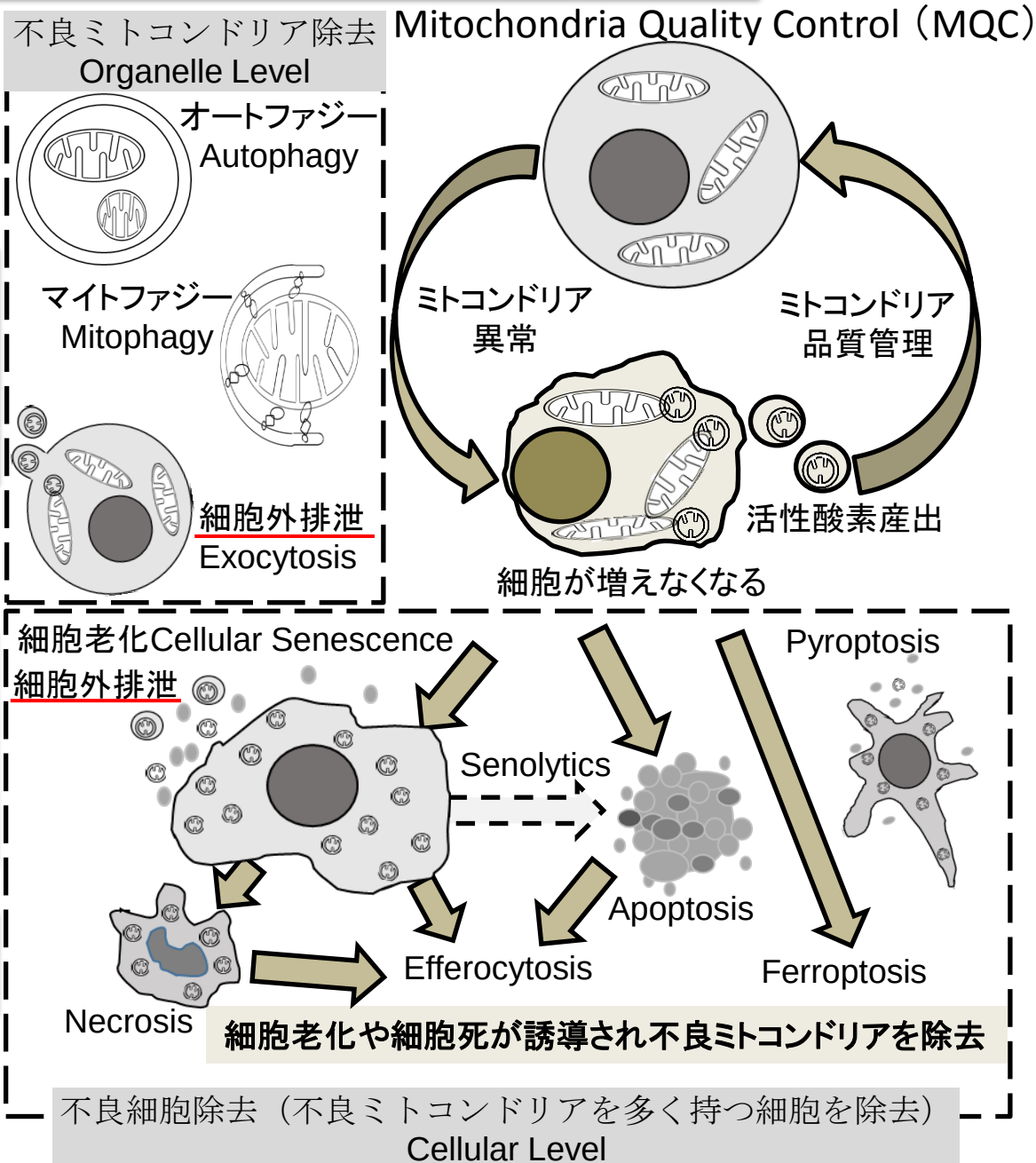
ミトコンドリア病患者では
変異ミトコンドリアが品質管理機構
から逃れ、除去できない もしくは
除去しきれない



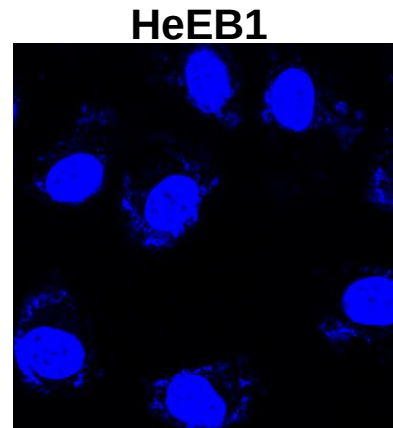
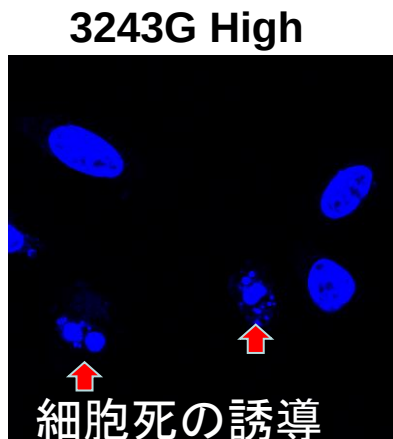
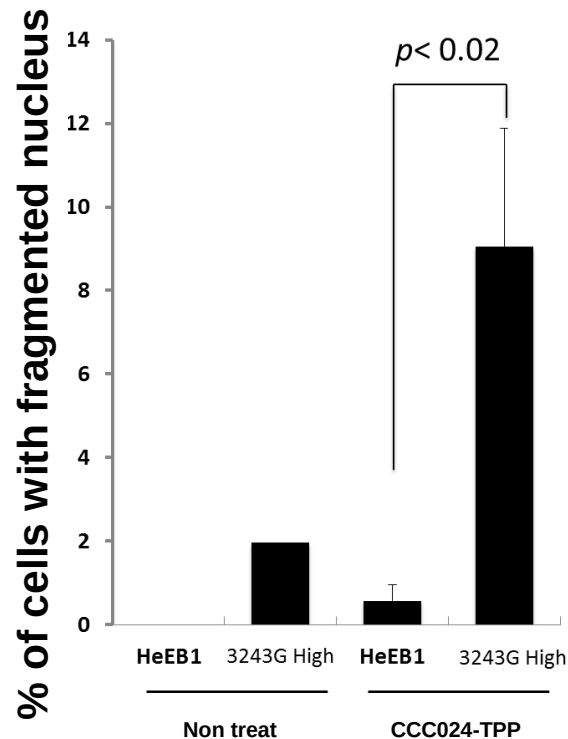
変異ミトコンドリアを品質管理機構
によって不良品として認識できる
ようにすれば
変異ミトコンドリアを除去できる

排出された不良ミトコンドリアは
周囲の細胞へ

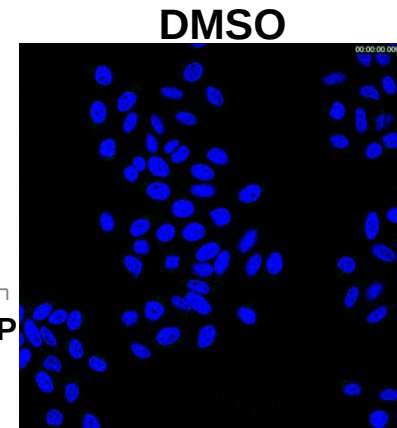
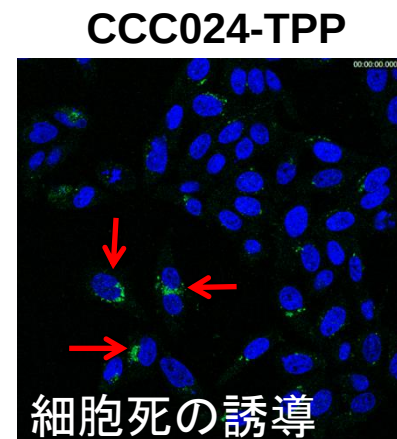
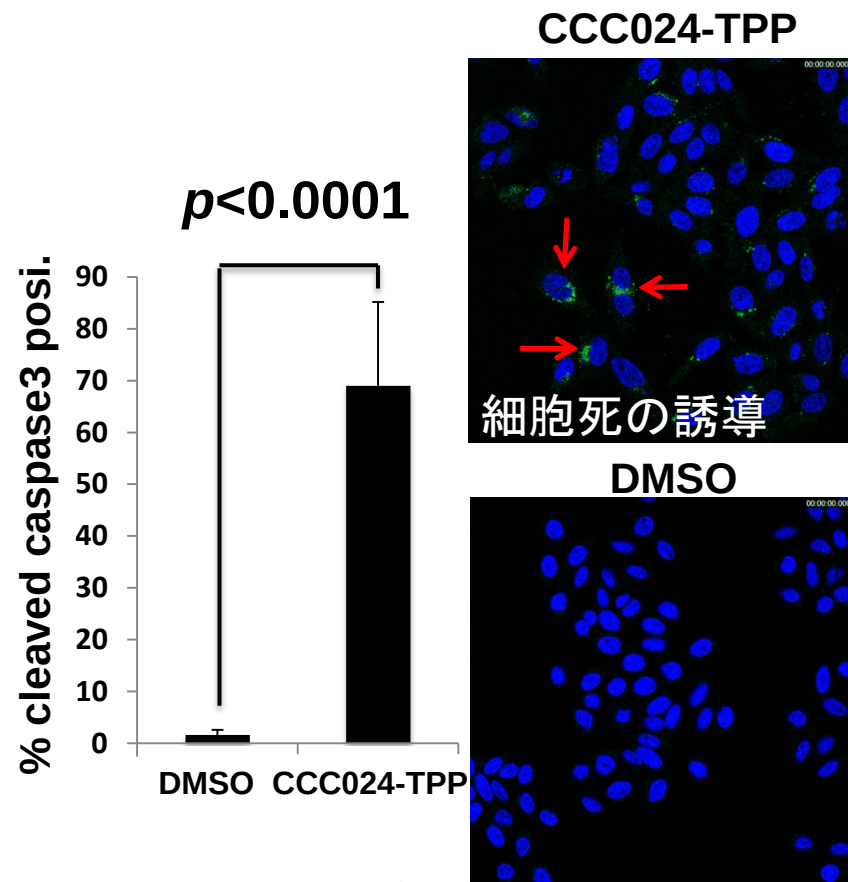
病勢の拡大



CCC024-TPPはMELAS3243G変異を多く持つ細胞の細胞死を誘導した
不良ミトコンドリアを細胞ごと除去 = 病的細胞の除去



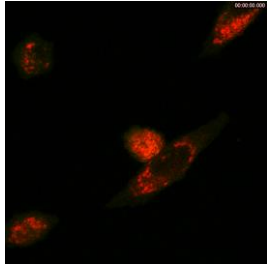
↑ fragmented nucleus



↑ cleaved caspase 3

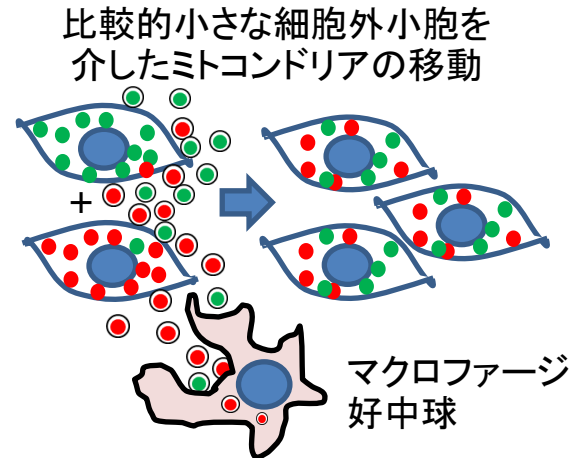
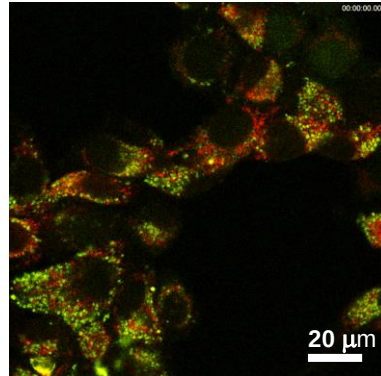
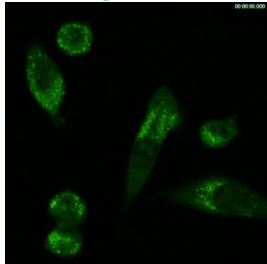
ミトコンドリアは細胞間を移動する 不良ミトコンドリアを排泄する細胞が ミトコンドリア病のそれぞれの臓器症状の原因？

P29 細胞 (正常な mtDNA)
MitoTracker Deep Red



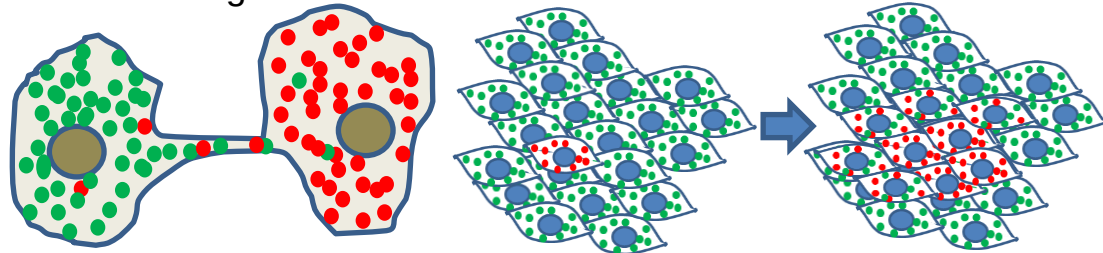
24時間両細胞を共培養

A11 細胞 (ND6 G13997A)
CellLight mitochondria-GFP



細胞外小胞分泌によるミトコンドリア移動

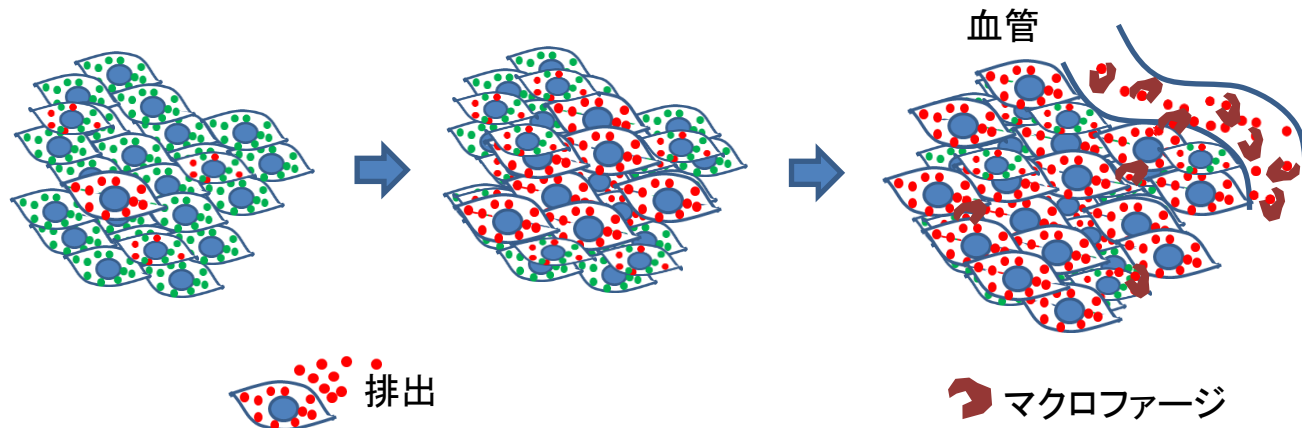
Tunneling nanotubes mediated mitochondria transfer



トンネルナノチューブ (周囲細胞と同調 ミトコンドリアも移動)

ミトコンドリアは細胞間を移動できる

局所臓器でミトコンドリア病の症状が発症する仕組みに関する仮説



炎症や老化により変異ミトコンドリアをばらまく細胞が生じ、局所で異常ミトコンドリアを多く含む細胞が増加、局所症状の原因となる

血管などの細胞外に出たミトコンドリアはマクロファージや好中球に貪食される
近接する細胞には移動できるが、遠隔への移動は困難

- 変異ミトコンドリアの供給原細胞から周囲細胞に変異mtDNAが移動
- 感染症・炎症によって変異ミトコンドリアの排出が増加する
- 組織の多くの細胞で変異ミトコンドリアが増加し、症状が増悪

Mitochondria: Endosymbiont bacteria DNA sequence as a target against cancer

Hiroki Nagase¹ | Takayoshi Watanabe² | Nobuko Koshikawa¹ | Seigi Yamamoto¹ | Keizo Takenaga¹ | Jason Lin¹

Received: 15 January 2021 | Revised: 31 March 2021 | Accepted: 31 March 2021
DOI: 10.1111/cas.14912

A PI polyamide-TPP conjugate targeting a mtDNA mutation induces cell death of cancer cells with the mutation

Nobuko Koshikawa¹ | Nanami Yasui¹ | Yuki Kida¹ | Yoshinao Shinozaki^{1,2} | Kohei Tsuji¹ | Takayoshi Watanabe³ | Keizo Takenaga¹ | Hiroki Nagase¹



Review

The Road Not Taken with Pyrrole-Imidazole Polyamides: Off-Target Effects and Genomic Binding

Jason Lin * and Hiroki Nagase *

Laboratory of Cancer Genetics, Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba 260-8717, Japan
* Correspondence: linjason@chiba-cc.jp (J.L.); hnagase@chiba-cc.jp (H.N.)

Received: 21 February 2020; Accepted: 19 March 2020; Published: 3 April 2020



A linear five-ring pyrrole-imidazole polyamide-triphenylphosphonium conjugate targeting a mitochondrial DNA mutation efficiently induces apoptosis of HeLa cybrid cells carrying the mutation

Nobuko Koshikawa^a, Yuki Kida^a, Nanami Yasui^a, Yoshinao Shinozaki^{a,b}, Kohei Tsuji^a, Takayoshi Watanabe^c, Jason Lin^a, Seigi Yamamoto^a, Keizo Takenaga^{a,*}, Hiroki Nagase^{a,*}

Takenaga et al. *BMC Molecular and Cell Biology* (2021) 22:52
<https://doi.org/10.1186/s12860-021-00391-5>

BMC Molecular and Cell Biology

RESEARCH

Open Access

Intercellular transfer of mitochondrial DNA carrying metastasis-enhancing pathogenic mutations from high- to low-metastatic tumor cells and stromal cells via extracellular vesicles

Keizo Takenaga^a, Nobuko Koshikawa and Hiroki Nagase

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Association of predicted pathogenic mutations in mitochondrial *ND* genes with distant metastasis in NSCLC and colon cancer

Nobuko Koshikawa¹, Miho Akimoto^{2,4}, Jun-ichi Hayashi³, Hiroki Nagase¹ & Keizo Takenaga²

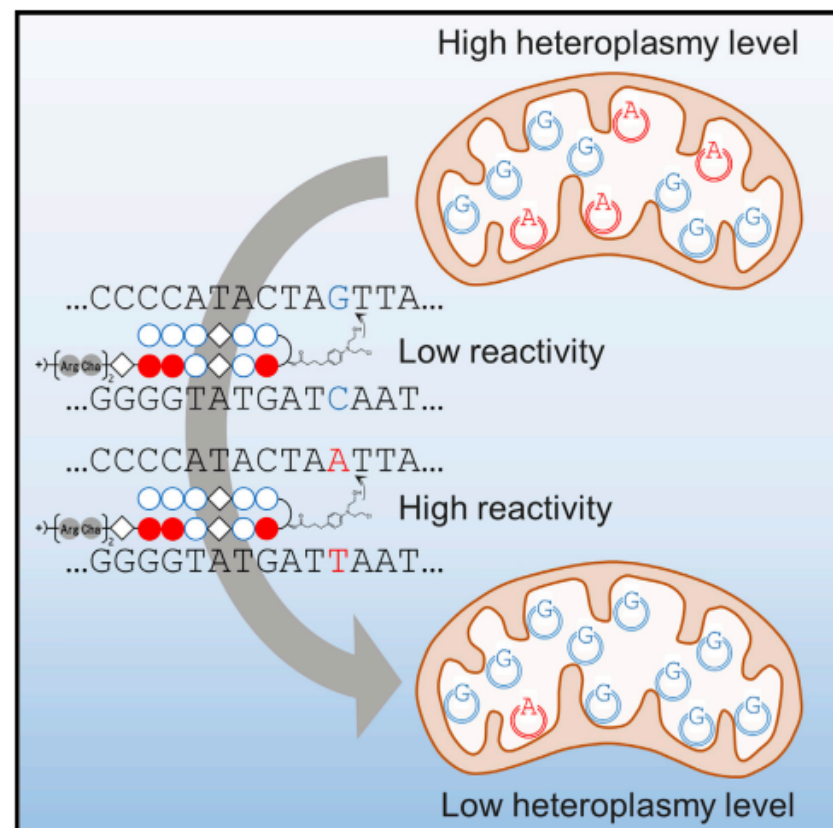
Received: 18 July 2017
Accepted: 31 October 2017
Published online: 14 November 2017

Cell Chemical Biology

Targeted elimination of mutated mitochondrial DNA by a multi-functional conjugate capable of sequence-specific adenine alkylation

アデニンの限定的な変異のみ標的可能

Graphical abstract



Authors

Takuya Hidaka, Kaori Hashiya,
Toshikazu Bando, Ganesh N. Pandian,
Hiroshi Sugiyama

この方法はリー脳症に
応用できるかもしれない

Correspondence

namasivayam.ganeshpandian.5z@
kyoto-u.ac.jp (G.N.P.),
hs@kuchem.kyoto-u.ac.jp (H.S.)

アルキル化剤による副作用

Highlights

- Sequence-selective mitochondrial DNA (mtDNA) alkylators have been developed
- *In vitro* assays verified selective alkylation of mutant adenine in mtDNA sequence
- Studies in live cells show a reduction of mutant mtDNA by our alkylator
- Our strategy targeting mtDNA has therapeutic potential in mitochondrial diseases

Hidaka et al., 2022, Cell Chemical Biology 29, 1–6 2022
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.08.003>

根治的治療・予防法の開発が必要

原因変異ミトコンドリアを排除できれば可能に

- 根本的な原因である異常ミトコンドリアおよび異常ミトコンドリアを持つ細胞を除去することが必要
- ミトコンドリアDNAの変異が多くの場合 異常ミトコンドリアの原因となっている
- 各細胞内にミトコンドリアは多数存在し、多くの重要な機能を担うが除去しても細胞は維持可能
- 特定の臓器で症状を示す病態では局所投与、特定臓器移行性等も将来的に付与できる
- 異常ミトコンドリアを細胞から除去することはゲノム編集等でも可能であるが再発、安全性や製剤が問題

「二重膜構造細胞内小器官DNA標的薬」特願2019-053528による
全く新しい治療薬の提案



薬によって

ミトコンドリアの品質管理機構の活性化し、異常ミトコンドリア除去を促進
そして 異常ミトコンドリアを多数持つ細胞に対する細胞死を誘導

AMED令和3年度「難治性疾患実用化事業」
希少難治性疾患に対する画期的な医薬品の実用化に関する研究分野 採択

配列特異的認識によって変異ミトコンドリアDNA(mtDNA)を除去する

予防

症状緩和

治療

PIP-TPP

変異ミトコンドリアの増加

PIP-TPP

PIP-TPP

○正常 ○変異 ミトコンドリア

マイトファジー

マイトファジー

ROS ↑

正常な細胞ホメオスタシス
変異ミトコンドリアDNAは抹消分割後
マイトファジーにより除去

病的変異mtDNA増加
ATP産生低下 もしくは
ATP産生低下とROS産生増

ミトコンドリアのQC
オートファジー
マイトファジーによる除去

PIP-TPP

予防

症状緩和

PIP-TPP

治療

SASP

老化細胞

細胞死誘導

ミトコンドリアのQC

ミトコンドリアのQC

ミトコンドリアのQC

マイトファジーにより除去
細胞外放出

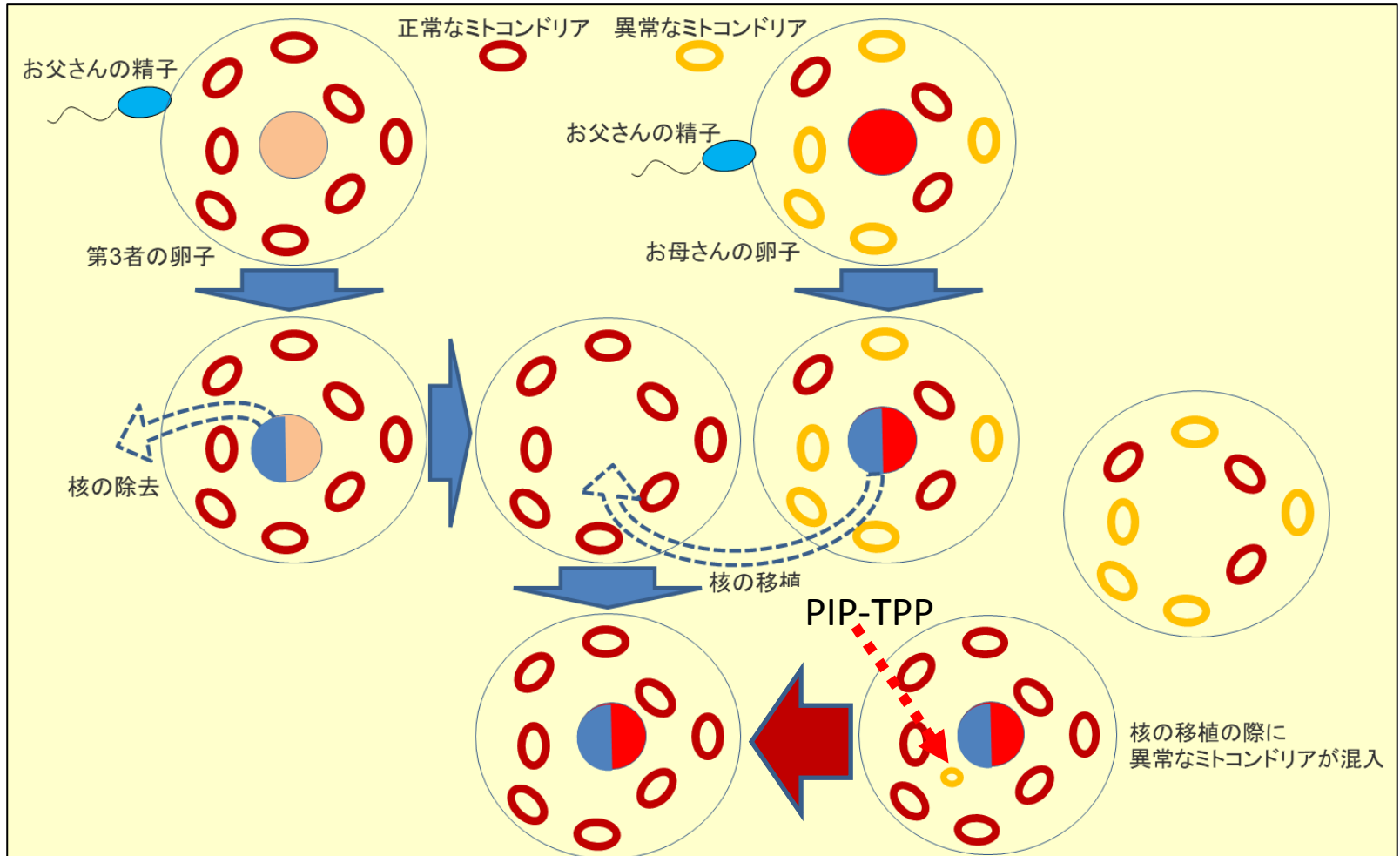
変異mtDNAが増えすぎた細胞は
細胞死により除去

細胞死耐性細胞は老化細胞に
(慢性炎症、細胞死遅延)

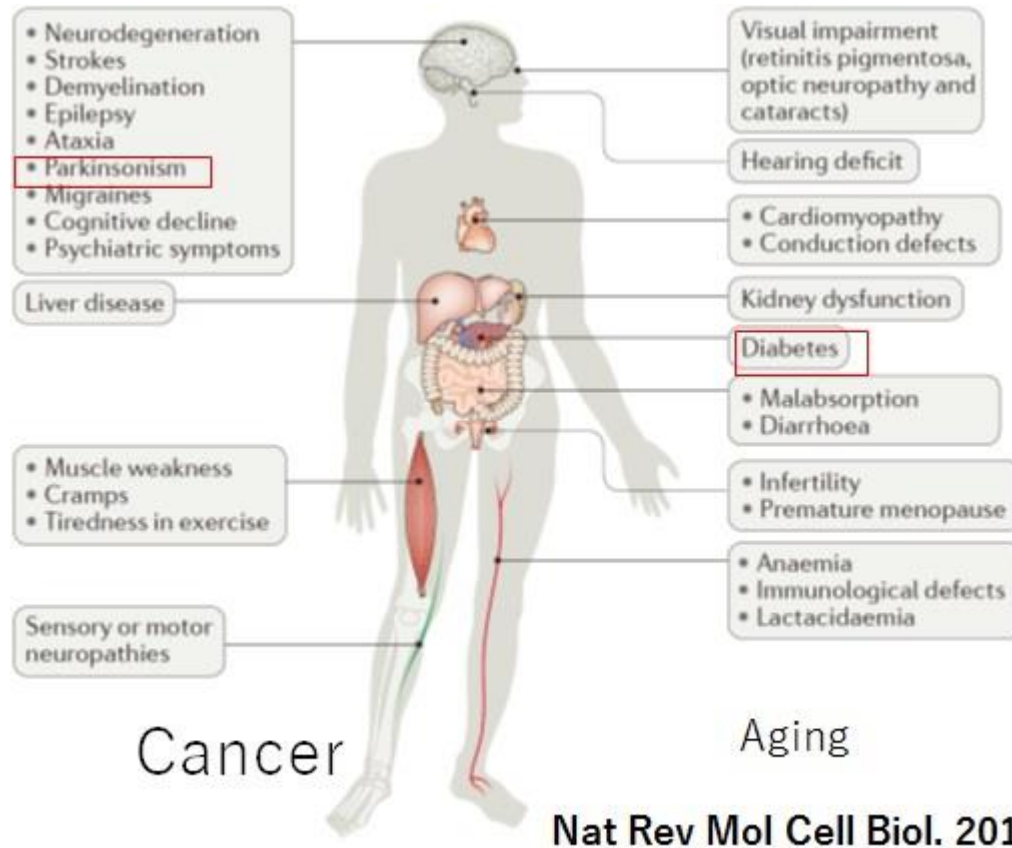
ミトコンドリア置換による治療を補完

根本的な治療、発症予防効果が考えられる しかし 異常なミトコンドリアが残る可能性

異常なミトコンドリアの増加を防ぐ、完全に除去する治療・薬剤としてのPIP-TPP



ミトコンドリアと疾患



ミトコンドリア病

MELAS

Leigh脳症

生活習慣病

糖尿病

脳神経系疾患

循環器系疾患

腎機能不全

難聴

がん

老化

不良ミトコンドリアは様々な病気の原因

加齢とともに 不良ミトコンドリア増加、活性酸素産生、老化細胞増加、組織老化促進、低酸素環境の構築、がん発症、悪性化にも関

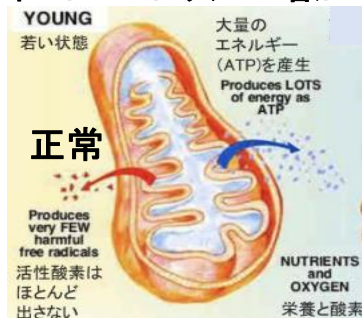
与

不良ミトコンドリアが除去できなくなることが原因？

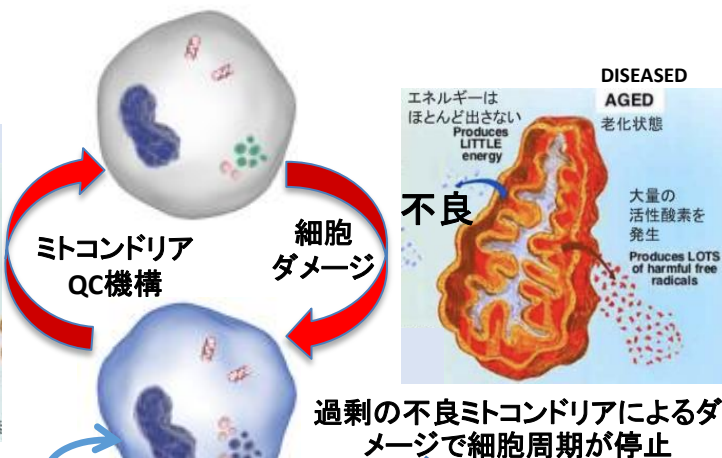
ミトコンドリア関連疾患の根治・予防法の開発

不良ミトコンドリア除去機構(細胞の自浄作用)を再活性化する薬剤開発

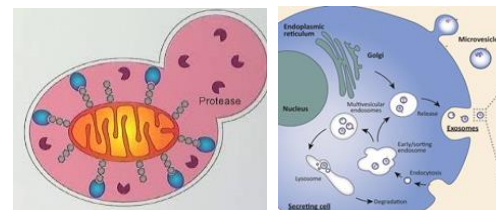
不良ミトコンドリアの除去
正常ミトコンドリアの増加



薬剤による
ミトコンドリア
クオリティー
コントロール
QCの再活性化



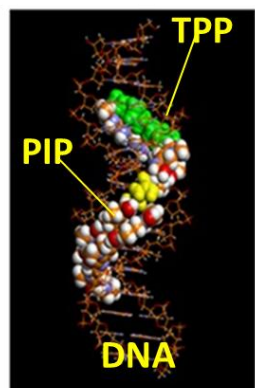
ミトコンドリアQC機構
不良ミトコンドリア除去
Mitophagy Exocytosis



ミトコンドリア病治療

生活習慣病・老化予防

PIポリアミド-TPP 複合体



抗がん剤
抗老化剤

Mitophagy

薬剤による
マイトファジー誘導

マイトファジー: 不良ミトコンドリアの自食

薬剤による老化細胞除去促進

Senolytics 抗老化薬
老化細胞を特異的に死滅
BCL2阻害剤等併用

Apoptosis
細胞死誘導

Cellular senescence
老化細胞誘導

一定期間で老化細胞は細胞死

生活習慣病 がん
慢性炎症 老化促進

Proinflammatory factors

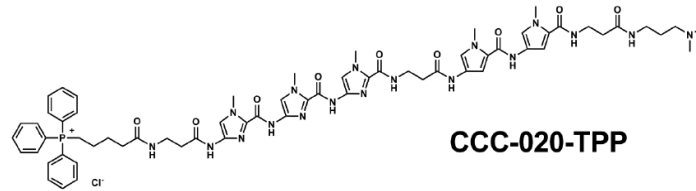
SASP 老化物質・炎症物質
不良ミトコンドリアを分泌

特許 特願2019-053528
PCT/JP2020/012498
WO/2020/189779

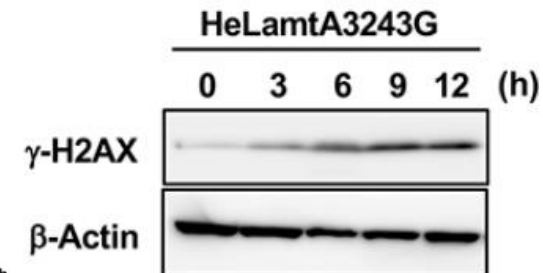
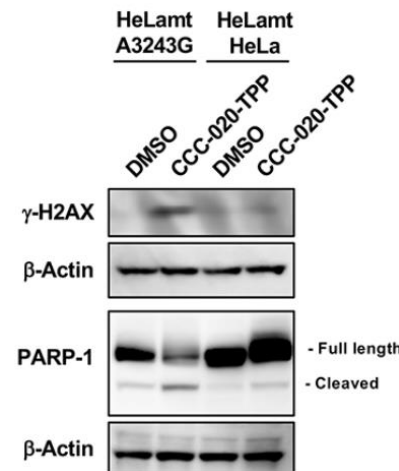
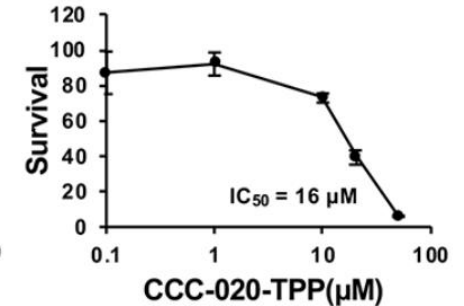
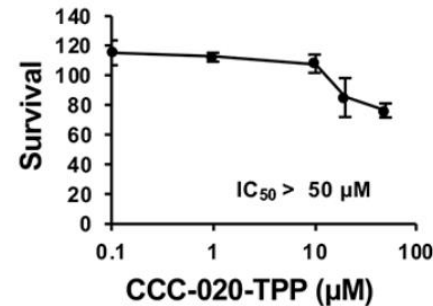
Cancer Science Dec. 2021
BMC Molecular & Cell Biol 2021
Scientific Reports 2017
Cancer Science Jun. 2021
Biochem Biophys Res Com 2021

ミトコンドリアDNAを配
列特異的に認識し不良
ミトコンドリアを除去す
る薬剤候補

経口、経皮投与でも効果があるくすりの開発へ

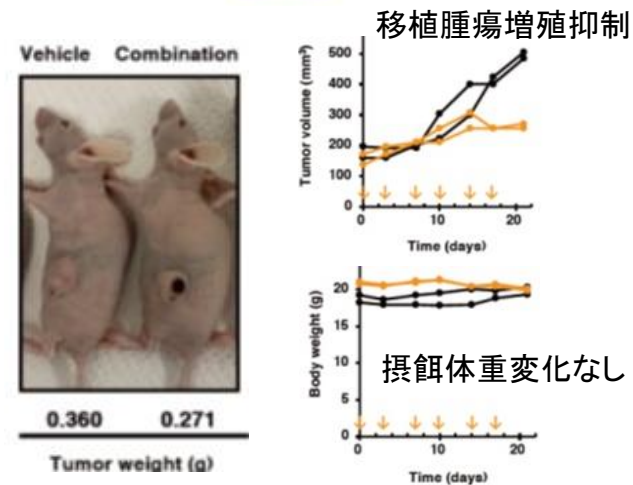
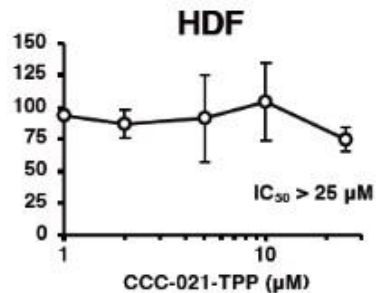
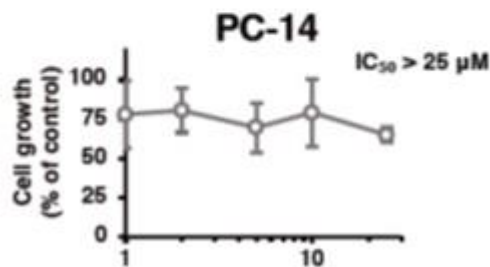
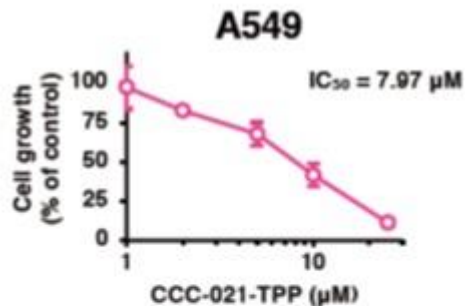
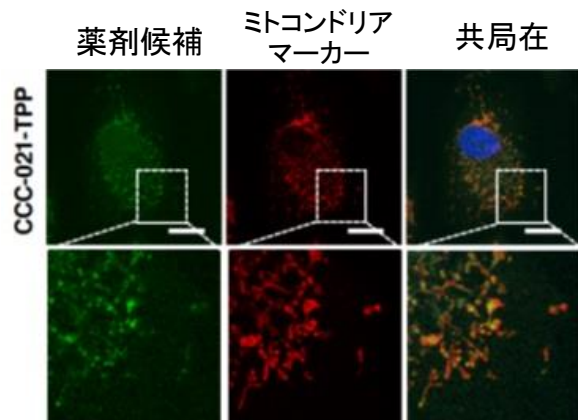
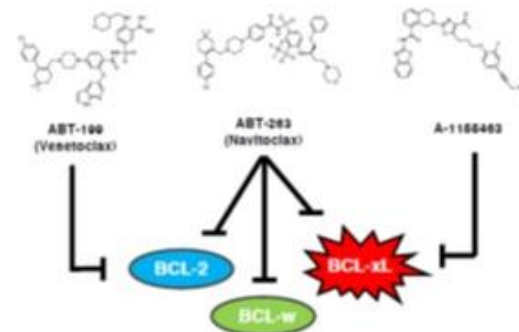
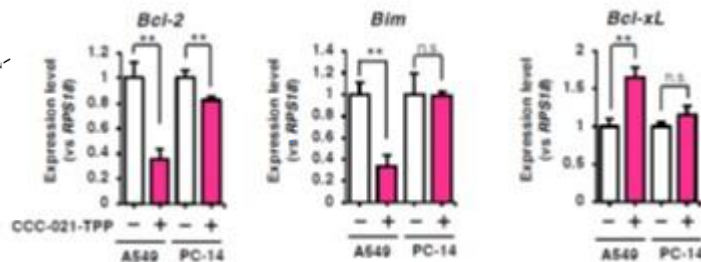
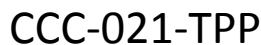


HeLamtA3243G

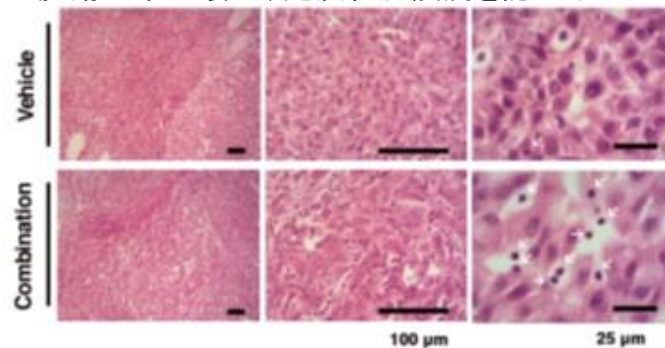


DNAに影響し、細胞死を誘導

mtDNA変異をもつ肺がん細胞で老化を誘導



腫瘍は中心壊死、免疫細胞浸潤を認める



Cancer Science 2022



Nobuko Koshikawa
Seigi Yamamoto
Jason Lin
Keizo Takenaga
Rie Igarashi
Yuki Kaiho
Sei Sakuma
Kohei Tsuji
Yuki Kida
Jihang Yao

Atsushi Takatori
Takayoshi Watanabe
Osamu Shimozato
Kei Murayama
Yasutoshi Tatsumi
Yoshiaki Maru
Rino Nankinzan
Yoko Ota
Akiko Tsujimoto
Takanori Inagaki

Isamu Hoshino
Yousuke Iwadate
Fumitaka Ishige
Xudong Zhang
Nanako Toyofuku
Eriko Isogai
Hruo Mikami
Yoko Nakamura
Miho Kusakabe
Tadamichi Denda

Ex-lab members

Hiroyuki Yoda
Mayu Shinohara
Nanami Yasui
Sun Ki
Yayoi Ebata
Yoshinao Shinozaki

Nina Matsuo
Asuka Hattori
Yuto Hirano
Yu Ishihara
Jun Ito
Yasuko Imai
Yume Tabata

Kiriko Hiraoka
Takahiro Inoue
Hirokazu Sugimoto
Toshinori Ozaki
S. Krishnamurthy
Tomoko Koga
Yoshiyasu Kitagawa

Kyoto University

Hiroshi Sugiyama
Toshikazu Bando
Ganesh N. Pandian
Akimichi Ohtsuki

Chiba University

Atsushi Kaneda
Ken-ichi Shinohara

Kumamoto University

Takumi Era

Juntendo University

Yasushi Okazaki

UCSF

Allan Balmain

Saitama Medical University

Akira Otake

Chiba Children's Hospital

Kei Murayama

Nihon University

Noboru Fukuda
Yoshiaki Matsumoto
Kyoko Fujiwara
Isao Saito
Xiaofei Wang
Min Chen
Makoto Kimura
Rajeev Mishra
Asako Oguni
Kaoru Tagata
Tsukasa Suzuki

AIST

Paul Horton
Daisuke Tominaga

Gentire Biosystems

Funded by AMED

Practical Research for Innovative Cancer Control P-DIRECT
 Development of advanced manufacturing technologies for biologics

Funded by MEXT

KIBAN (B) KIBAN (C) Academic Frontier Project 2006-2010
 Innovative Areas "Conquering Cancer through Neo-dimensional
 Systems Understanding"