



Title	デュシェンヌ型筋ジストロフィー骨格筋・心筋細胞に対するミトコンドリア標的とした進行遅延療法についての研究
Author(s)	佐藤, 逸美
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15895号
Issue Date	2024-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k15895
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/92075
Type	theses (doctoral)
File Information	SATOH_Itsumi.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

デュシェンヌ型筋ジストロフィー骨格筋・心筋細胞に
対するミトコンドリア標的とした進行遅延療法につい
ての研究

(A Study of Mitochondria-Targeted Progression-
Delaying Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy in
Skeletal and Cardiac Muscle)

2024年3月

北海道大学

佐藤逸美

Itsumi Sato

学位論文

デュシェンヌ型筋ジストロフィー骨格筋・心筋細胞に
対するミトコンドリア標的とした進行遅延療法につい
ての研究

(A Study of Mitochondria-Targeted Progression-
Delaying Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy in
Skeletal and Cardiac Muscle)

2024年3月

北海道大学

佐藤逸美

Itsumi Sato

目次

発表論文および学会発表目録-----	1
要旨-----	2
略語集-----	5
緒言-----	6
第1章：ラット骨格筋細胞（L6）に対するナノ粒子を用いた薬物送達とミトコンド リア機能上昇-----	8
第2章：ラット心筋細胞（H9C2）に対するナノ粒子を用いた薬物送達とミトコンド リア機能上昇-----	31
第3章：DMD 骨格筋細胞に対するミトコンドリアミトコンドリア機能評価と介入-- -----	43
結語-----	59
謝辞-----	61
利益相反-----	62
引用文献-----	63

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は論文に発表した。

Activation of mitochondrial oxygen consumption rate by delivering coenzyme Q₁₀ to mitochondria of rat skeletal muscle cell (L6)

Itsumi Sato, Mitsue Hibino, Atsuhito Takeda, Hideyoshi Harashima, Yuma Yamada

Journal of Pharmaceutical Sciences (2024)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 佐藤逸美 山田勇磨 日比野光恵 佐々木大輔 武田充人 原島秀吉

骨格筋細胞ミトコンドリアに対する薬物送達および機能活性化についての検討 : 日本薬学会第 143 年会 2023/3/28 北海道 札幌

2. Itsumi Sato, Mitsue Hibino, Daisuke Sasaki, Atsuhito Takeda, Hideyoshi Harashima, Yuma Yamada

Validation of drug delivery and functional activation to mitochondria in skeletal muscle cell : The 143 rd Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan (PSJ-CSPS シンポジウム) 2023/3/28 Hokkaido Sapporo

3. Itsumi Sato, Mitsue Hibino, Daisuke Sasaki, Atsuhito Takeda, Hideyoshi Harashima, Yuma Yamada

Validation of drug delivery and functional activation to mitochondria in skeletal muscle cell : Euromit2023(International Meeting on Mitochondrial Pathology) 2023/6/14 Italy, Bologna

4. 佐藤逸美, 日比野光恵, 佐々木大輔, 武田充人, 原島秀吉, 山田勇磨

骨格筋細胞ミトコンドリアに対する薬物送達および機能活性化についての検討第 39 回日本 DDS 学会学術集会, 2023/7/27 千葉 幕張

要旨

【背景】

近年デュシェンヌ型をはじめとする筋ジストロフィーにおいて骨格筋における発症前からのミトコンドリア機能低下や形態異常や、心機能障害の進行においてミトコンドリア機能の低下が関与していることが明らかになり、ミトコンドリアを標的とした治療が将来有望視されている。ミトコンドリアへの介入による治療の可能性についてはミトコンドリアを標的とした治療法は、ミトコンドリアへの薬物送達の難しさから治療介入としての報告は少なく今後の開発が望まれる。北海道薬学部薬剤分子設計学研究室山田勇磨教授らが開発したミトコンドリアへの薬物送達を可能とした脂質ナノ粒子である MITO-Porter は膜融合を介してミトコンドリアへ難水溶性の薬物も含め送達することが可能であり、すでに肝細胞送達による肝機能改善などが報告されている。上記より、ミトコンドリアの薬物送達が可能である脂質ナノ粒子 MITO-Porter にミトコンドリア活性化物質を骨格筋細胞や心筋細胞へ送達することでミトコンドリア機能を向上させ、エネルギー産生能上昇による細胞の活性化と細胞活性化による進行遅延抑制が出来ないかと考えた。

【目的】

本研究においては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー骨格筋、心筋におけるミトコンドリア機能低下に着目した。ミトコンドリアへの薬物送達を可能とした脂質ナノ粒子 MITO-Porter を用いて電子伝達系の補酵素でありミトコンドリア活性化物質であるコエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) をミトコンドリアへ直接送達することによりミトコンドリア機能の活性化を試みミトコンドリアへの治療介入の可能性について検討した。

【方法と結果】

モデル標的細胞として正常ラット骨格筋細胞(L6)、正常ラット心筋細胞(H9C2)、東京大学農学部獣医生理学研究室から委譲された DMD モデルラットから単離した骨格筋細胞を使用した。ミトコンドリアへの薬物送達のためのナノキャリアとして MITO-Porter を用いた。送達する薬物は CoQ₁₀ を用いた。CoQ₁₀ は、呼吸鎖複合体による ATP 産生や抗酸化活性など、ミトコンドリアにおいて多様な役割を果たしている。そのため、CoQ₁₀ はミトコンドリアの機能障害に対して治療効果を発揮する可能性があるが、水に溶けないためそのまま投与するだけではミトコンドリアへ送達が困難であり治療効果を発揮することができない。蛍光標識した MITO-Porter を各細胞に添加し、フローサイトメーターを用いて細胞内ナノキャリアの蛍

光量を測定し、MITO-Porter の細胞内取り込みを確認した。レーザー走査顕微鏡を用いて、MITO-Porter がミトコンドリアと共局在していることを確認した。細胞外フラックスアナライザーを用いて、MITO-Porter(CoQ₁₀)添加後の酸素消費率(OCR)を測定することにより、ミトコンドリアの呼吸能力を評価し、L6,H9C2,DMD 骨格筋細胞においてミトコンドリア呼吸能上昇を得た。また、L6 において CoQ₁₀ 送達により活性化される代謝経路を特定するためメタボローム解析を行い Tricarboxylic acid cycle (TCA) サイクルや抗酸化関連経路の活性化を認めた。

【考察】

本研究においては DMD モデルラット骨格筋から単離培養した細胞においてミトコンドリア呼吸能の低下を認めた。mdx マウス骨格筋におけるミトコンドリア機能低下の既報はあるが、今回使用したモデルラット骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能低下と DMD モデルラット骨格筋細胞への CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能の改善は本研究で初めて示した。MITO-Porter は今まで骨格筋細胞や心筋細胞への使用歴がなく使用による薬物送達の可否や条件検討を要したが骨格筋細胞、心筋細胞への MITO-Porter を用いたミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達が可能であることを確認し、ミトコンドリア呼吸能の上昇が示唆された。本研究においては MITO-Porter 自体のミトコンドリア機能への影響を検討するため薬剤を内封しない Empty-MITO-Porter と比較を行い CoQ₁₀ 送達群の方が各細胞においてミトコンドリア呼吸能が上昇することを示したことから、MITO-Porter 自体ではなく送達した CoQ₁₀ による効果と考える。また、ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達の効果について L6 でのメタボローム解析の結果からミトコンドリアにおけるエネルギー産生能のみでなく、抗酸化効果による細胞の活性化も寄与していると考ええる。

DMD 骨格筋における病初期からのミトコンドリア機能低下や DMD 心筋症の進行とミトコンドリア機能の関連性は既報があるがそのどちらも治療介入についての報告は乏しい。In vitro ではあるが骨格筋細胞、心筋細胞ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達によりミトコンドリア呼吸能の上昇が得られたことは、DMD 骨格筋障害、心筋症におけるミトコンドリア機能改善による進行遅延療法の一助になる可能性がある。今後、DMD 心筋細胞や動物実験でのミトコンドリアへの薬物送達による治療介入を検討したい。

【結論】

正常ラット骨格筋細胞(L6)においてミトコンドリアへの薬物送達を可能にした脂質ナノ粒子である MITO-Porter を用いてミトコンドリア活性化物質であるコエ

ンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) を骨格筋細胞ミトコンドリアへ送達しミトコンドリア呼吸能の上昇を示した。また CoQ₁₀ が影響する代謝経路を調べるためメタボローム解析を行い、TCA サイクルおよび抗酸化関連経路の活性化を確認した。ラット正常心筋細胞(H9C2) において脂質ナノ粒子である MITO-Porter を用いてミトコンドリア活性化物質である CoQ₁₀ を骨格筋細胞ミトコンドリアへ送達しミトコンドリア呼吸能の上昇を示した。また CoQ₁₀ の至適送達量についても検討しミトコンドリア呼吸能は添加量に関連した上昇傾向を示した。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)モデルラットから単離培養した骨格筋細胞のミトコンドリア呼吸能低下を示し、DMD モデルラット骨格筋細胞ミトコンドリアに CoQ₁₀ を送達し、DMD 骨格筋細胞のミトコンドリア呼吸能改善を示した。

本研究では現在治療法が確立されていない DMD におけるミトコンドリア機能低下に着目し、ミトコンドリア活性化による DMD の進行抑制療法の可能性について検討した。骨格筋、心筋ミトコンドリアへの介入の可能性検討のため、正常骨格筋細胞、心筋細胞においてミトコンドリアへの薬物送達を行いミトコンドリア呼吸能が上昇することを示した。DMD モデルラットから単離培養した骨格筋細胞を用いて、In vitro における DMD 骨格筋細胞のミトコンドリア機能低下を示し、ミトコンドリアへの薬物送達によるミトコンドリア呼吸能の改善を示唆した。DMD は遺伝疾患であり根治治療は遺伝子治療が主となると考えるがミトコンドリアへの介入を含めた進行遅延療法を遺伝子治療と組み合わせて実施することは患者の生命予後、QOL 改善に大きく貢献すると考え今後も本研究をさらに発展させたい所存である。

略語集

AAV	adeno-associated virus
ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
ANOVA	Analysis of Variance
AT-1	Angiotensin II type 1 receptor
ATP	Adenosine Triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CLMS	Confocal laser scanning microscopy
CoQ ₁₀	Coenzyme Q ₁₀
DDW	Deuterium-depleted water
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DOPE	2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FCCP	Fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazone
FDB	Flexor digitorum brevis muscle
FGF	Fibroblast growth factor
FS	Fractional shortening
GSH	Glutathione-SH
GSSG	Glutathione-S-S-Glutathione
HEPES	4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMT	Human metabolome technology
LC-MS/MS	Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry
LVDd	Left ventricular end-diastolic diameter
LVDs	Left ventricular end-systolic diameter
MtOH	Methanol
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NBD-DOPE	DOPE-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazole-4-yl)
OCR	Oxygen Consumption Rate
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Polydispersity index
PEG-2000	Methoxy polyethylene glycol 2000
QOL	Quality of life
R8	Stearylated R8
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Rotation per minute
SM	Sphingomyelin
TCA	Tricarboxylic acid cycle
VGEF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wild type

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy: DMD)は遺伝性疾患でX染色体上のジストロフィンタンパク質をコードするジストロフィン遺伝子の異常による疾患で国内において3,500–5,000人に1人出生する。ジストロフィンは骨格筋内のアクチンなどの構造と細胞膜を固定する機能を持ち、筋収縮による伸び縮みから細胞を保護する役目を持つ。ジストロフィン異常により筋細胞および細胞膜が弱体化するため細胞内のカルシウム調節障害による筋細胞の脆弱性や再生能の低下が生じる。近年では骨格筋細胞の解糖系、TCA サイクルなどが機能低下することからDMDを代謝疾患としてとらえる報告もある(Ge et al. 2003; Kuznetsov et al. 1998)。上記のように報告がある一方で心筋症の発症メカニズムについては明らかになっていない部分も多い。

DMDの臨床症状としては骨格筋障害、心不全、呼吸不全などが挙げられる。骨格筋障害は2-5歳頃から発症し10歳前後で独歩困難となることが多い。呼吸不全に関しては非侵襲的陽圧換気法などの呼吸への治療介入の進歩により呼吸不全による死亡は減少しているが心筋症に対する治療は心保護療法が主であり現在のDMDにおける死因は心筋症による心不全である。

骨格筋についての治療は長らくステロイド投与やリハビリなどの対症療法であったが近年ビルトラルセン等のエクソン・スキッピングによる遺伝子治療が開発された。しかし、適応患者の少なさや継続治療の必要性など現時点で根治療法としては不十分である。心筋に対する治療は心筋症発症前からの心保護薬の導入による心保護療法が主流であり現在、成人の慢性心不全に適応のある薬剤の使用等、心筋症進行抑制に着目した治療法検討が行われている。しかし統一治療プロトコルは存在せず、各施設で治療方法の検討が行われている。

以上よりDMD骨格筋、心筋における治療方法の検討は患者の生命予後、Quality of life (QOL)双方に必須であると考えられる。以前よりDMDモデルマウスであるmdxマウスなどにおいて骨格筋における発症前や病初期からのミトコンドリア機能の低下や形態異常(Hughes et al. 2019) (Kuznetsov et al. 1998)や、心筋ミトコンドリアにおけるエネルギー産生能低下(Hughes et al. 2020)が報告されDMD骨格筋、心筋におけるミトコンドリアへの介入によるDMD治療の可能性について報告が複数ある。

一方でミトコンドリアへの直接的な介入の困難さにより DMD 骨格筋、心筋ミトコンドリアに対する治療介入報告は少なく、特にミトコンドリアを標的とした薬物送達による DMD 骨格筋、心筋ミトコンドリアへの治療介入報告はない。

本研究においては、ミトコンドリアへの薬物送達を可能とした脂質ナノ粒子を用いてミトコンドリア活性物質であり電子伝達系の補酵素であるコエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) を DMD 骨格筋細胞、心筋細胞へ送達しエネルギー産生能上昇による細胞の活性化と細胞活性化による進行遅延抑制が出来ないかと考えた。ミトコンドリアへの薬物送達のために、北海道大学薬学部薬剤分子設計学教室山田勇磨教授らが作成したミトコンドリアを標的とする薬物送達を可能とした脂質ナノ粒子である MITO-Porter (Yamada et al. 2008) を使用した。

第 1 章においては DMD 骨格筋細胞への介入検討の前段階としてラット正常骨格筋細胞ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達と CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能上昇について検討した。また、作用機序解明のためメタボローム解析を行い CoQ₁₀ 送達により活性化された代謝経路についても明らかにした。

第 2 章においては DMD 心筋細胞への介入検討の前段階としてラット正常心筋細胞(H9C2)ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達と CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能上昇について検討した。さらに MITO-Porter の添加濃度や内封する CoQ₁₀ 量も検討した。

第 3 章では DMD モデルラットから単離、培養した骨格筋細胞を用いて DMD 骨格筋細胞におけるミトコンドリア機能低下を示した。さらにミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能上昇を示しミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達による治療の可能性を示した。今後第 2 章、第 3 章の結果を DMD モデルラットから単離、培養した心筋細胞に応用し検討する予定である。

第1章：ラット骨格筋細胞 (L6) のミトコンドリア機能上昇

1-1 緒言

本研究で使用した脂質ナノ粒子である MITO-Porter は今まで骨格筋細胞への使用経験がない。MITO-Porter は標的や細胞種類ごとに粒子組成や濃度等の最適化を要するナノキャリアでありそのため細胞種ごとに脂質などの粒子組成やプロトコルの最適化が必要とされる。DMD 骨格筋への実験の前段階として正常骨格筋細胞 (L6:ラット正常骨格筋細胞) に対する検討を行った。

骨格筋は動作のみでなく、咀嚼や嚥下、眼球運動、呼吸に至るまで全身の様々な機能に必要不可欠でありその劣化は QOL を著しく低下させる。骨格筋細胞内には多くのミトコンドリアが存在するが加齢や筋委縮により、骨格筋内のミトコンドリアの構造の変化や機能低下(Short et al. 2005) (Tonkonogi et al. 2003)、活性酸素の増加が生じることがすでに報告されている(Holloway et al. 2018) (Standley et al. 2020)。加齢によるミトコンドリア遺伝子変異の報告もある。(Herbst et al. 2021)また、非高齢者における廃用症候群においてもミトコンドリア Adenosine Triphosphate (ATP) 産生能低下と Reactive Oxygen Species (ROS)発生の増加が報告されている(Dirks et al. 2016)がそれらに対する薬物治療介入報告は少なく正常骨格筋ミトコンドリアへの特異的に送達による機能活性化の報告もほとんどない。

本章では正常骨格筋細胞ミトコンドリアへ電子伝達系の補酵素でありミトコンドリア機能を活性化するコエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀)を内封した MITO-Porter を L6 へ添加し、細胞内取り込みやミトコンドリアへの共局在を確認した。また CoQ₁₀を送達することによるミトコンドリア呼吸能の上昇を認めた。さらにその作用機序解明のためにメタボローム解析を行った。正常骨格筋ミトコンドリアへの介入はDMDのみでなく幅広い正常骨格筋の機能低下に対するミトコンドリアへの薬物送達による治療介入について有益であると考え報告する。

1-2 実験方法

1-2-1 試薬・材料

2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), sphingomyelin (SM)は Avanti Polar lipids 社より購入した。1,2-Dimyristoyl-sn-glycerol, methoxy polyethylene glycol 2000 (DMG-PEG 2000) は NOF 社から購入した。Stearylated R8 (STR-R8) は Toray Industries Inc. から購入した。CoQ₁₀は和光純薬工業から購入し

た。 Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit は Agilent Technologies より購入した。その他は特に断りのない限り特級試薬を用いた。 L6 (rat normal myoblast: CRL-1458) は ATCC :The Global Bioresource Center より購入した。 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)(049-32645) と DMEM F-12(no phenol red: 045-30665) は 和光純薬工業から購入した。 Fetal bovine serum (FBS) は Sigma-Aldrich より購入した。

1-2-2 試薬調整

本章で使用した試薬、緩衝液などを以下に示した。記載があるもの以外は溶媒に Deuterium-depleted water(DDW)を用いた。オートクレーブによる高圧蒸気滅菌 (121°C、20 分) を行った場合は (AC) と記載した。

- ・ 10mM 4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES) : 10 mM HEPES ,pH 7.4 とした。
- ・ Phosphate buffered saline (PBS)(-) (AC):137 mM NaCl,2.68 mM KCl,8.05 mM Na₂HPO₄,1.47 mM KH₂PO₄
- ・ 非働化 FBS: -20°Cで保存された FBS を 4°Cで一晩静置し解凍した。解凍後 56°Cで 30 分インキュベーションしたのちに分注した。
- ・ DMEM 培地 : DMEM 28.2 g,ペニシリンGカリウム 150 mg ,ストレプトマイシン 300 mg。使用前に非働化 FBS を 10%溶液になるように加えた。
- ・ トリプシン溶液 (冷蔵保存) :0.25%トリプシン溶液、0.02%EDTA
- ・ Fluorescence-activated cell sorting(FACS) buffer (F): 0.5 % BSA 、0.1% sodium aside PBS 溶液.
- ・ ヘパリン溶液 :ヘパリンナトリウム (富士フィルム和光純薬) を 20U/mL となるように PBS で希釈し作成した。
- ・ ランニング培地 :14.62 mL の透明培地に 10 mM グルコース 55 μL、100 mM ピルビン酸 125 μL、200 mM グルタミン酸 200 μL を添加した。

1-2-3 細胞培養

本実験において正常ラット骨格筋細胞である L6 を用いた。培地は 10 % FBS、1×10⁵ U/L ペニシリン、0.1 g/L ストレプトマイシンを添加した DMEM (049-32645) を使用した。細胞は 10 cm ディッシュで培養し 37°C、5 % CO₂の条

件下で、約 80% のコンフルエントに達するまでインキュベーションした。細胞継代は 2~3 日に 1 回行った。継代の際はトリプシン溶液で処理し、付着した細胞を剥がし DMEM とともにコニカルチューブに回収して遠心したのちに上清を除去し、新しい DMEM を追加、細胞懸濁液を希釈し 10cm ディッシュで培養した。

1-2-4 MITO-Porter(CoQ₁₀)の調整

本実験ではナノ粒子として MITO-Porter を用いた。4.2mM の脂質 (DOPE:SM:DMG-PEG2000:STR-R8) [9:2:0.33:1.1、モル比] と 0.7mM の CoQ₁₀ を含む Ethanol(EtOH)溶液を調製した。MITO-Porter (CoQ₁₀) は、マイクロ流体デバイスシステム iLiNP (Maeki et al. 2018)を用いて、EtOH と PBS(-)中で脂質を混合することにより調製した。バッフルミキサー構造の標準寸法は、幅 150 mm、奥行き 100 mm、間隔 100 mm)、合算流速は 500 μ L/min である (脂質溶液速度は 100 μ L/min、PBS(-)速度は 400 μ L/min)。シリンジポンプ (Harvard Apparatus 社) を用いて流量を制御した。得られた懸濁液は透析膜(分子量カットオフ 12,000-14,000 Da; Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) を用いて PBS (-) で透析を 2-3 時間行ったのちに回収した。(図 1-1) (Hibino et al. 2019)

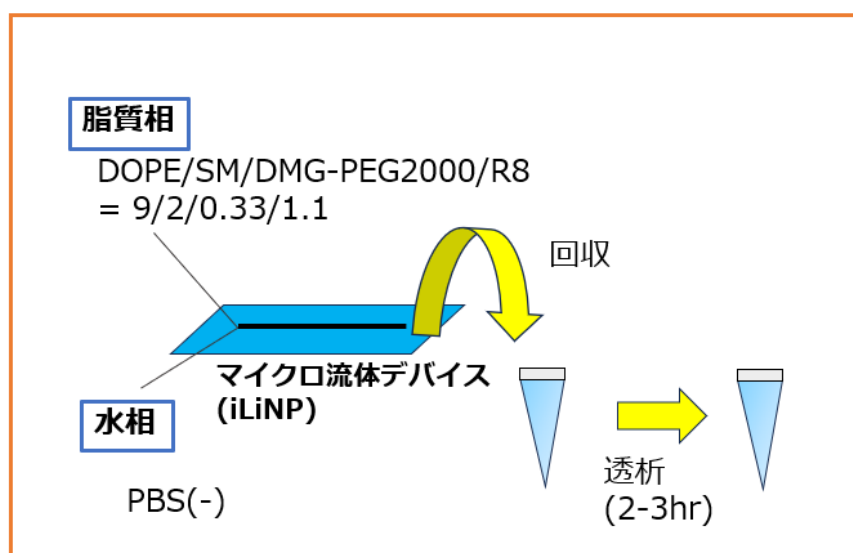


図 1-1 MITO-Porter(CoQ₁₀)の調製方法

1-2-5 MITO-Porter の物性評価

平均粒子径と多分散性指数 (Polydispersity index :PDI) は、ゼータサイザー Nano ZS (Malvern Instruments 社) を用いた動的光散乱法で測定した。粒子径の値

は粒子径分布の形で示した。サンプルの ζ 電位もゼータサイザーナノ ZS を用いて 10 mM HEPES 緩衝液中で測定した。

1-2-6 MITO-Porter の細胞内導入能評価

L6 を測定の 48 時間前に 5×10^4 cells/2mL/well を 6well プレートに播種し、 37°C 5 % CO_2 で培養した。測定 1, もしくは 24 時間前に 1 mL の PBS (-) で細胞を洗浄した後、1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI, Thermo Fisher Scientific 社) で標識した MITO-Porter(CoQ_{10}) を含む DMEM (FBS+) を添加した。DiI 標識は粒子調製時に脂質溶液に DiI を $0.5 \mu\text{M}$ となるように添加することにより行った。添加した粒子は同一濃度になるように調整後に添加した。ヘパリン溶液(20 U/mL)2 回洗浄した後、細胞をトリプシン処理し、1.5 ml マイクロチューブに細胞を回収した。遠心 (700 g , 4°C , 3 分) 後、上清を除去し、ペレットを FACS バッファー-500 μL に懸濁した。細胞懸濁液をナイロンメッシュでろ過した後、フローサイトメトリー (Beckman Coulter Inc.) で測定した。

1-2-7 共焦点レーザー顕微鏡(Confocal laser scanning microscopy :CLSM)による細胞内動態の評価

L6 を 3.5 cm ガラスディッシュ (IWAKI) に 20,000 cells/3 mL/dish となるように播種し、24 時間培養した (37°C 5 % CO_2)。各ディッシュに MITO-Porter(CoQ_{10})、 CoQ_{10} -DOPE-SM-LNP、PBS(-)を加え、 37°C 5 % CO_2 で 24 時間培養した。共焦点レーザー顕微鏡で観察する前に、Mito tracker Deep red(Thermo Fisher Scientific) ($1.2 \mu\text{L}/\text{dish}$) を添加し、30 分間インキュベートした。DMEM-F12 培地による洗浄を 2 回行った後、培地を DMEM F-12 に交換し、CLSM で各ディッシュを観察した。細胞は 473nm の光と LD レーザーの 635nm の光で励起した。水浸対物レンズ (UPlanSApo 60x/NA. 1.2) とダイクロイックミラー (DM405/473/559/635) を装備した Nikon A1 (Nikon Instruments Inc.) を使用した。2 つの蛍光検出チャンネル (Ch) は以下のフィルターに設定した。

Ch1: 490/50 (緑) DiI 標識 MITO-Porter

Ch2 : 560/50 (赤) Mito Tracker Deep Red

1-2-8 MITO-Porter(CoQ₁₀)、CoQ₁₀添加によるミトコンドリア呼吸能の評価

Seahorse mito stress kit plate (Agilent Technologies, Santa Clara, US)の各ウェルに L6 細胞を 7,500 cells/well (100 μ L) の濃度で播種し、37°C、5% CO₂ 中で 24 時間 (\pm 3 時間) インキュベートした。各 well の培地を除去し、MITO-Porter (CoQ₁₀)、Empty MITO-Porter または PBS (-)、CoQ₁₀ のいずれかを 20 μ L と DMEM 培地 (FBS (-)) 80 μ L (合計 100 μ L) を各 well に添加し、1 時間インキュベートした (37°C、CO₂ 5%)。添加した粒子は同一濃度になるように調整後に添加した。その後、DMEM (20%FBS) 100 μ L を各 well に加え、37°C、CO₂ 5% で 24 時間 (\pm 3 時間) 培養した。各 well の培地をランニング培地に交換し、37°C、CO₂ なしのインキュベーターで 1 時間培養した後、細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies, Santa Clara, US) を用いて MITO-Porter(CoQ₁₀)投与後のミトコンドリア呼吸能測定を行った。測定結果の Oxygen Consumption Rate (OCR)は、細胞数に応じて OCR/cells に補正した。

1-2-9 メタボローム解析

細胞を 6 well dish に播種し 24 時間培養した (37°C 5%CO₂)。200 μ L の各サンプル (MITO-Porter (CoQ₁₀) ,Empty MITO-Porter, PBS(-)と 800 μ L の DMEM (FBS-)を各 well に添加しその 1 時間後に DMEM(20%)1ml を添加し 24 時間培養した (37°C 5%CO₂)。5%マンニトール 1.5ml で各ウェルを洗浄したのち完全に除去しメタノール 250 μ L 添加し 30 秒静置した。その後 Human metabolome technology (HMT) 社より提供された内部標準溶液を 170 μ L 添加したのち 1.5 mL チューブに回収し遠心した (2300 g, 4°C, 5 分)。限界ろ過ユニットを用いて 9100 g, 4°C, 3 時間遠心し徐蛋白を行った。得られたサンプルを -80°C で保存し HMT 社に測定を依頼した。メタボローム解析は HMT の C-SCOPE パッケージに従い、陽イオン解析にはキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計を、陰イオン解析には CE-タンデム質量分析計を用いた。CE-TOFMS および CE-MS/MS 分析は、それぞれ Agilent 6210 飛行時間型質量分析計 (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA) および Agilent 6460 トリプル四重極 Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry (LC-MS/MS) (Agilent Technologies) を備えた Agilent CE キャピラリー電気泳動システムを用いて実施された。これらのシステムは、CE 用 Agilent G2201AA ChemStation ソフトウェアバージョン B.03.01 (Agilent Technologies) で制御され、電解質として市販の電気泳動バッファー (陽イオン分析用: H3301-1001、陰

イオン分析用：I3302-1023、HMT) を用いたフューズドシリカキャピラリー (内径 50 μm 、全長 80 cm) で接続した。飛行時間型質量分析計を m/z 50 から 1,000 まですキャンし、トリプル四重極型質量分析計を用いてダイナミック MRM モードで化合物を検出した。ピークは、自動統合ソフトウェア MasterHands (慶應義塾大学、山形県鶴岡市) と MassHunter Quantitative Analysis B.04.00 (Agilent Technologies) を使用して抽出し、 m/z 、ピーク面積、移動時間 (MT) などのピーク情報を取得した。シグナルピークは、 m/z 値と MT に基づいて HMT の代謝物データベースに従ってアノテーションされた。各代謝物のピーク面積を内部標準物質で規格化し、各標準化合物を用いた 3 点検量線による標準曲線で代謝物濃度を評価した。

1-2-10 ラット短肢屈筋 (Flexor digitorum brevis muscle :FDB) 筋線維単離

FDB を両側の腱で切断し collagenase 溶液に入れ 37°C, 45~50 rotation per minute (rpm) で 3 時間インキュベートした。実体顕微鏡下において FDB を DMEM の入った 10 cm ディッシュに移し、1000 μL ピペットを使って水流で筋をほぐした。100 μL ピペットで線維のみを DMEM の入った 3.5 cm ディッシュに移した後さらに培地を加えてゴミを除いた。100 μL ピペットで線維のみを DMEM の入った 5 mL チューブに移し静置し筋線維のみを沈殿させた。上清を実体顕微鏡下で除き、培地を加えた。ディッシュ・チップ・チューブを 5% BSA でコートして筋線維の付着を防いだ。単離した筋線維はホルマリン固定を行ったのち顕微鏡で確認し多核筋線維、衛星細胞などの筋組織由来の細胞であることを確認した。

1-2-11 統計解析

実験データは特に断りのない限り 3 回以上の実験で得られた平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表記した。平均値比較では、Student's t-test により検定を行い $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判断した。3 つ以上の比較データでは non repeat Analysis of Variance (ANOVA) により検定を行い、さらに Student-Newman-Keuls (SNK) test による多重比較を行い、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判断した。

1-3 結果

1-3-1 ナノ粒子の物性評価

本実験に使用したナノ粒子の物理学的特性を表1に示す。MITO-Porter(CoQ₁₀)の平均粒子径は約 70 nm、平均 ζ 電位は約 14 mV となった。Empty MITO-Porter の平均粒子径は約 83 nm、平均 ζ 電位は約 15 mV となった。MITO-Porter はCoQ₁₀の含有の有無に関わらず正に帯電し平均粒子径に大幅な違いは見られなかった。これは先行報告と一致した結果である(Hibino et al. 2019)。また、細胞内取り込み評価でネガティブコントロールとして使用した細胞内導入物質である R8 を持たない CoQ₁₀-DOPE/SM-LNP の平均粒子径は約 76 nm となった。平均 ζ 電位は-1.75 mV であり電荷は中性となった。(表.1)

	脂質組成 (モル比) [↵]	粒子径(nm) [↵]	PDI [↵]
MITO-Porter (CoQ ₁₀) [↵]	DOPE/SM/DMG-PEG2000/R8=9/2/0.33/1.1 [↵]	70.4 ±17.5 [↵]	0.257 ±0.04 [↵]
Empty MITO-Porter [↵]	DOPE/SM/DMG-PEG2000/R8=9/2/0.33/1.1 [↵]	82.7 ±42.7 [↵]	0.349 ±0.08 [↵]
CoQ ₁₀ -DOPE/SM-LNP	DOPE/SM/DMG-PEG2000=9/2/0.33 [↵]	76.6 ±18.9 [↵]	0.304 ±0.05 [↵]

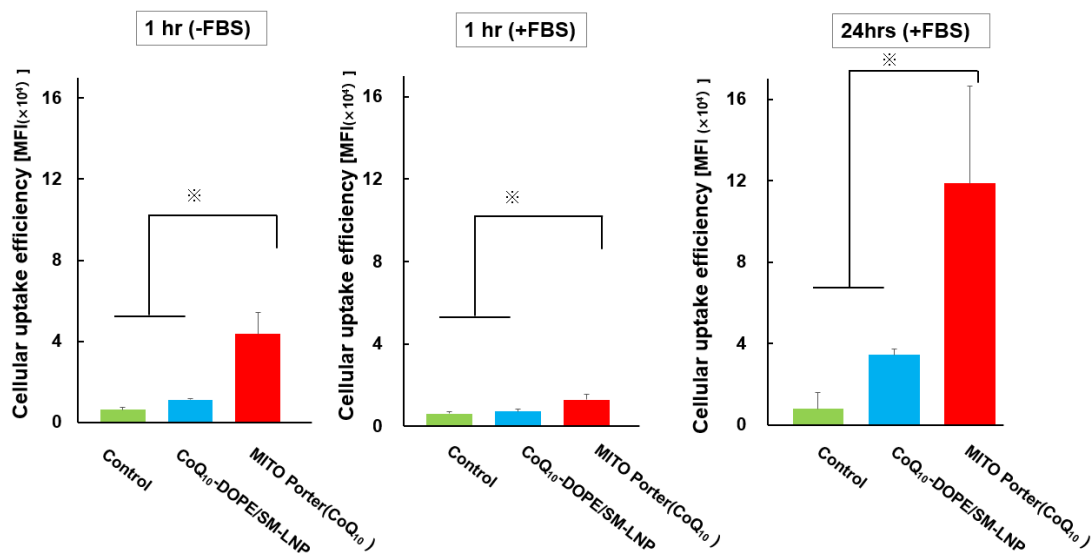
表 1: ナノ粒子の物性評価

MITO-Porter (CoQ₁₀) の平均直径は約 70 nm、ζ 電位は約 15 mV であった。Empty MITO-Porter の平均サイズは約 80 nm、ζ 電位は 15 mV であった。MITO-Porter は CoQ₁₀ の有無にかかわらず正に荷電していた。細胞内導入能評価でネガティブコントロールとして用いた STR-R8 を含まない DOPE/SM-LNP(CoQ₁₀)の平均粒子径は約 75 nm、平均 ζ 電位は-1.8 mV、電荷は中性であった。データは平均値±SD を示す (N=3-4)

1-3-2 MITO-Porter の L6 細胞内取り込み評価

CoQ₁₀を含有した MITO-Porter の細胞内取り込みを確認するために、DiI で蛍光標識した MITO-Porter を用いて、L6 への MITO-Porter の細胞内取り込み量を評価した。細胞内導入能はフローサイトメーターを用いて測定を行った。MITO-Porter 添加後、1、24 時間後の取り込み量を評価した。1 時間値においては血清存在

下、非存在下で測定を行った。長時間の血清非存在下は細胞状態の悪化が懸念されるため 24 時間非血清存在下の条件は実施しなかった。添加 1、24 時間後に測定した取り込み量を [図 1-2](#) に示す。MITO-Porter が L6 の細胞内に取り込まれることを確認した。



[図 1-2](#) MITO-Porter の L6 細胞内取り込み評価

DiI で標識した MITO-Porter を取り込んだ L6 の蛍光強度を測定した。測定値は平均 ±SD で示した。統計は nrANOVA と SNK test を用いた。(N=3-4 ※:p<0.01)

1-3-3 MITO-Porter の L6 細胞内動態能評価

MITO-Porter の細胞内動態については CLSM を用いて DiI で蛍光標識した MITO-Porter の細胞内局在を観察した。MITO-Porter(CoQ₁₀), Empty MITO-Porter(緑)はミトコンドリア (赤) との共局在を多く認めた(図 1-3)。MITO-Porter から R8 を除いた DOPE/SM/PEG-2000/SM-LNP)では細胞内への取り込みに乏しく (図 1-2 参照)、ミトコンドリアへの移行もほとんど認めなかった(図 1-4)。DOPE/SM/PEG-2000/SM-LNP では細胞内導入物質である R8 が存在しないことにより粒子に正の電荷がないため、細胞内取り込みおよびミトコンドリアへの移行において正の電荷の重要性が示唆された。

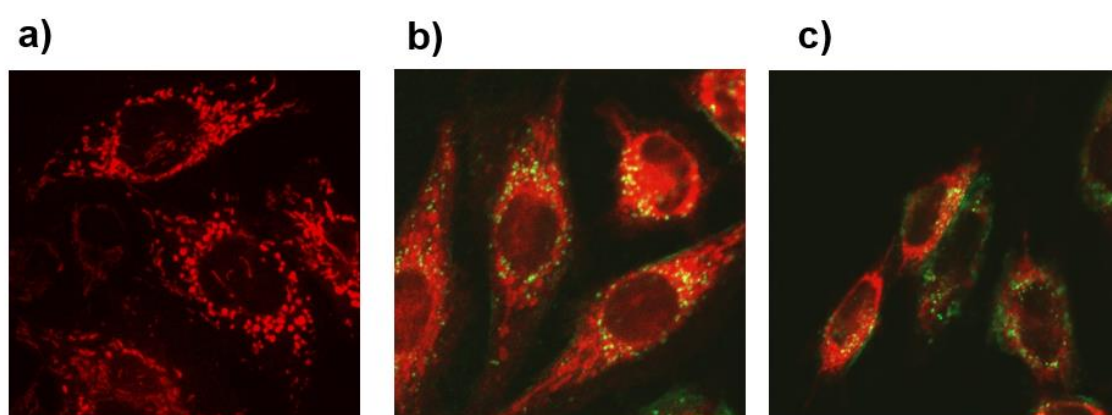


図 1-3 MITO-Porter 細胞内局在評価

0.5%DiI-脂質 (緑) で標識された MITO-Porter の細胞内輸送を CLSM で観察した。ミトコンドリアは Mito tracker deep red(赤)で染色した。

(a) Control (b) MITO-Porter (CoQ₁₀), (c)Empty MITO-Porter

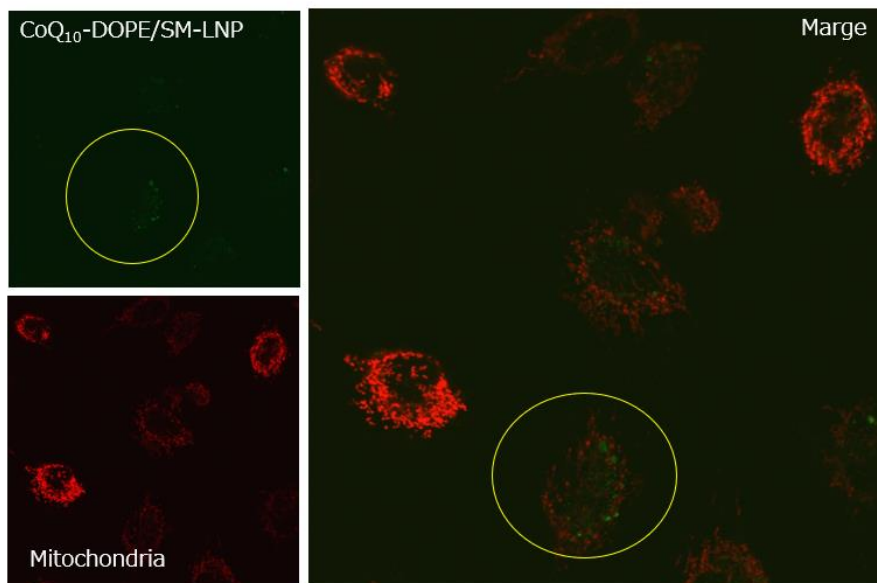


図 1-4 CoQ₁₀-DOPE/SM-LNP 細胞内局在評価

0.5%DiI-脂質（緑）で標識された CoQ₁₀-DOPE/SM-LNP の細胞内輸送を CLSM で観察した。ミトコンドリアは Mito tracker deep red(赤)で染色した。CoQ₁₀-DOPE/SM-LNP の存在箇所を丸枠(黄)で囲んだ。

1-3-4 ナノ粒子を用いた L6 ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能評価

L6 ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能への影響を評価した。L6 に対して MITO-Porter(CoQ₁₀), Empty MITO-Porter, PBS を添加し 24 時間後のミトコンドリア呼吸能の測定を行った。MITO-Porter の添加、細胞への取り込みは全て血清存在下で行った。投与した MITO-Porter(CoQ₁₀), Empty MITO-Porter は蛍光強度により粒子濃度を測定し、粒子濃度は同一になるように調整し、また各施行回でも粒子濃度は一定にした。MITO-Porter を用いて CoQ₁₀ を送達した群において、基礎呼吸能および FCCP を用いてミトコンドリアを賦活化した最大呼吸能の双方で他群と比較してミトコンドリア呼吸能 (OCR) の上昇を認めた。上記結果により、MITO-Porter を用いて L 6 ミトコンドリアへ CoQ₁₀ を送達することによりミトコンドリア呼吸能 (OCR) が上昇する可能性が示唆された。(図 1-5-1,2)

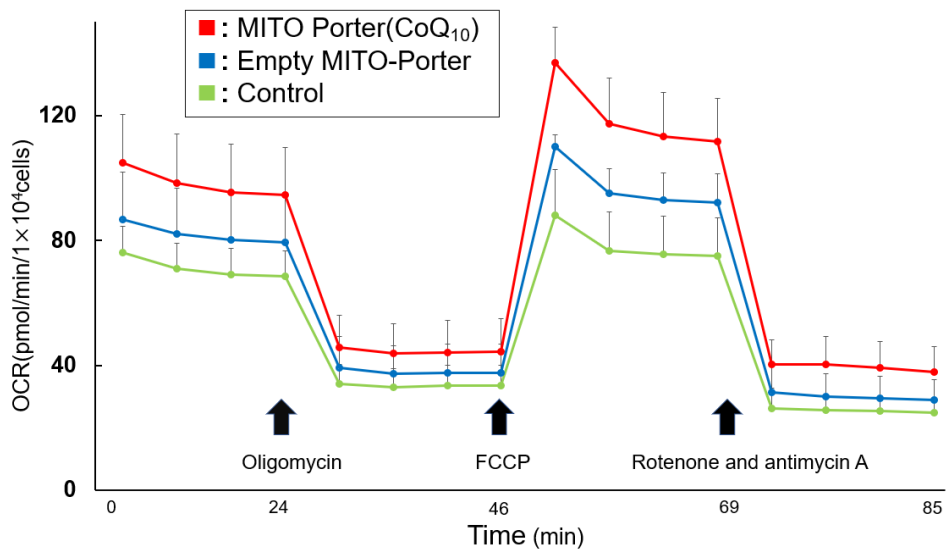


図 1-5-1 MITO-Porter(CoQ₁₀)添加によるミトコンドリア呼吸能の評価
 添加後 24 時間後のミトコンドリア呼吸能を Seahorse XFp Analyzer で評価した。
 MITO-Porter(CoQ₁₀) (赤) と Empty MITO-Porter (青) と PBS (緑)。酸素消費率
 (OCR) は細胞数で補正して算出した。データは平均値 ± SD を示す (N = 4)。

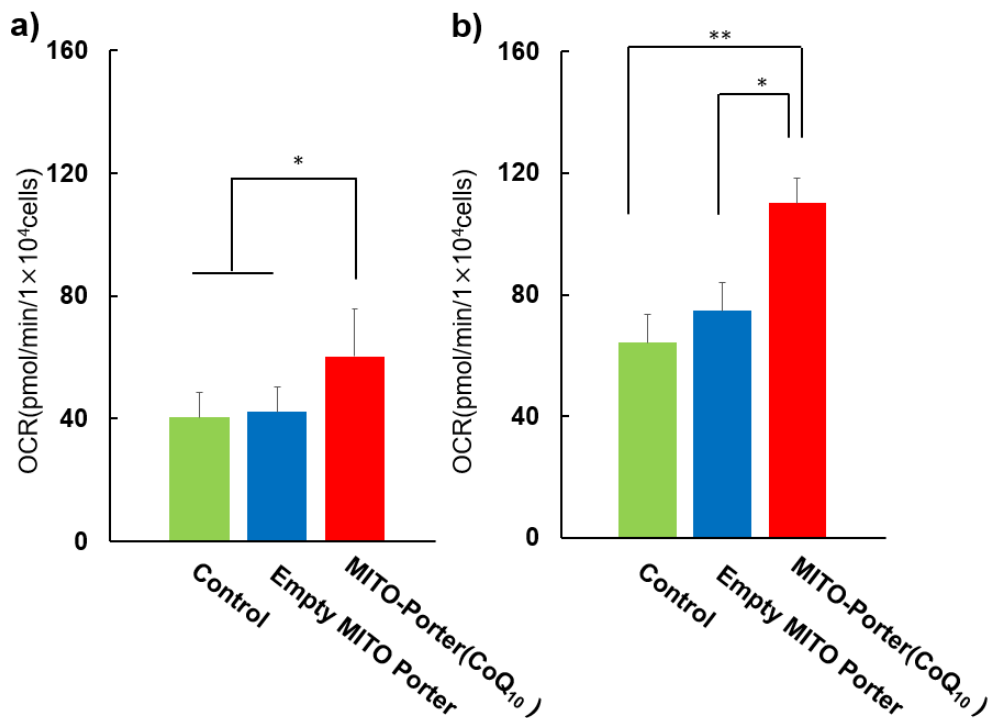


図 1-5-2 L6 に対する MITO-Porter(CoQ₁₀)添加による基礎呼吸能と最大呼吸能
 OCR は細胞数で補正し算出した。a)基礎呼吸 (basal respiration)、b)最大呼吸
 (maximal respiration)データは平均値 ± SD を示す (N = 4)。
 有意差は nrANOVA と SNK 検定により算出した。(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

1-3-5 L6 ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 添加によるミトコンドリア呼吸能評価

ミトコンドリアへの薬物送達に関する MITO-Porter の寄与を明らかにするため MITO-Porter を用いず、CoQ₁₀ 添加によるミトコンドリア呼吸能への影響を評価した。L6 に対して CoQ₁₀, PBS を添加し 24 時間後のミトコンドリア呼吸能の測定を行った。CoQ₁₀ の添加、細胞への取り込みは全て血清存在下で行った。2 群間で基礎呼吸能および FCCP を用いてミトコンドリアを賦活化した最大呼吸能の双方で有意差は認めなかった。上記結果により、CoQ₁₀ そのもののみではミトコンドリアへの到達が困難でありナノ粒子などの送達デバイスが必要であることが示唆された。(図 1-6)

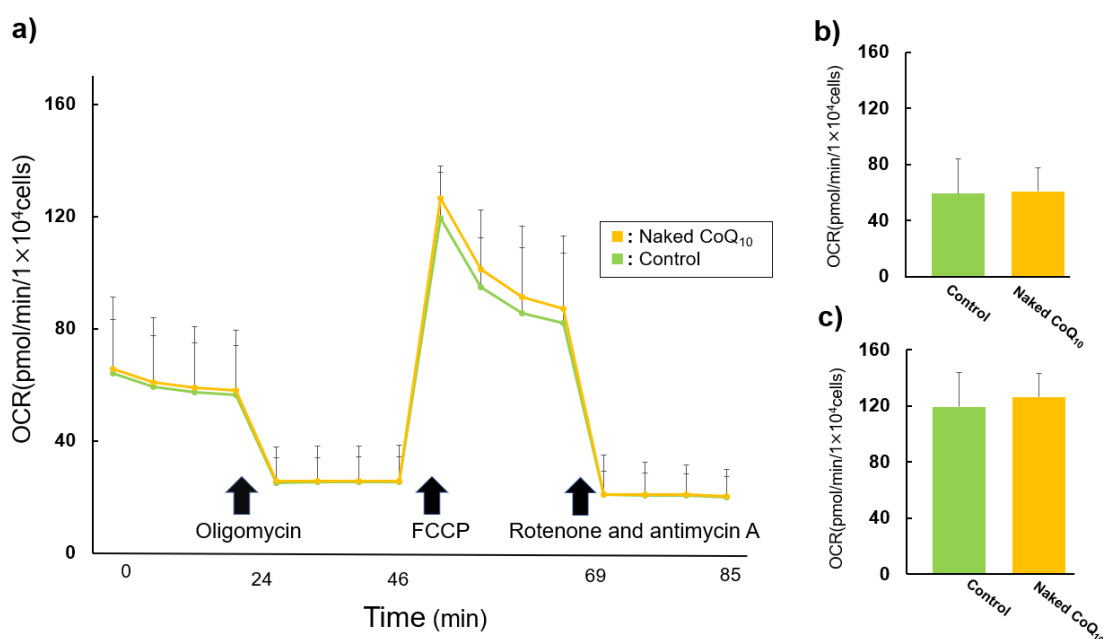


図 1-6 CoQ₁₀ 添加によるミトコンドリア呼吸能評価

CoQ₁₀(黄)とPBS(緑)添加後24時間でのミトコンドリア呼吸能を Seahorse XFp Analyzer を用いて評価した。OCRは細胞数で補正して算出した。データは平均値 ±SD を示す (N = 3)

a) 時系列表記 b)基礎呼吸能 c)最大呼吸能 *nr*ANOVA を行い両群間に統計学的有意差を認めなかった。

1-3-6 メタボローム解析

細胞内およびミトコンドリア内でどの代謝経路が活性化されているかを確認するために代謝経路の網羅解析であるメタボローム解析を行った。メタボローム解析に先立ち、MITO-Porter (CoQ₁₀) を投与した OCR 測定実験を再度行い、同じように

OCRの上昇が認められたサンプルを用いてメタボローム解析を行った(図1-7)。代謝経路の網羅解析結果(図1-8-1,2,3),ヒートマップ(図1-8-4)を示す。ヒートマップの結果から、MITO-Porter(CoQ₁₀)投与群において、他2群に比較して全体的に代謝経路の活性化を認めた。(図1-8-4) また、TCA回路や抗酸化関連の測定物質では統計的な差はないが全体的にMITO-Porter(CoQ₁₀)添加群で代謝産物の増加傾向を認めた。(図1-9-1,1-9-2) また、ATP産生能や抗酸化関連の測定物質の結果を図1-10-1,2を示す。

上記よりミトコンドリアの電子伝達系補酵素であるCoQ₁₀をミトコンドリアへ送達することによりTCAサイクルの活性化、それによるエネルギー産生能上昇が示唆された。また、GSH,GSSHなど抗酸化関連代謝物についても変化がみられ抗酸化能の関与も示唆された。(図1-10-2)

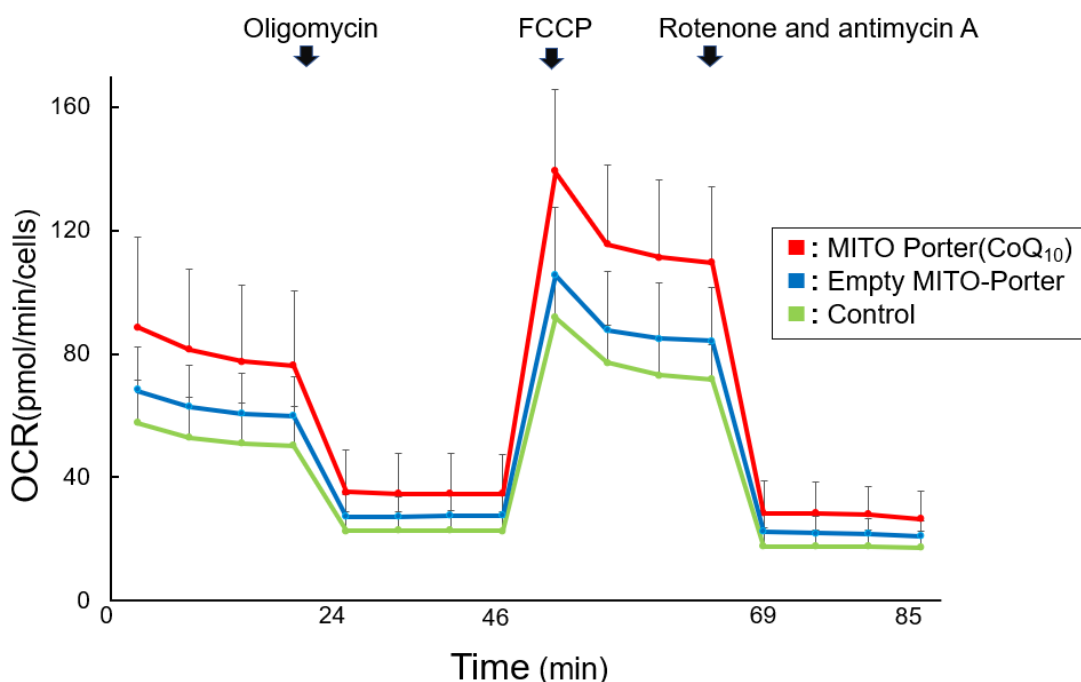


図1-7 メタボローム解析実施サンプルによるOCR評価

メタボローム解析に用いたサンプルでMITO-Porter(CoQ₁₀)(赤)とEmpty MITO-Porter(青)とPBS(緑)でそれぞれ添加後24時間後のミトコンドリア呼吸能をSeahorse XFp Analyzerで評価した。酸素消費率(OCR)は細胞数で補正して算出した。データは平均値±SDを示す。図1-5-1と同傾向を示した。

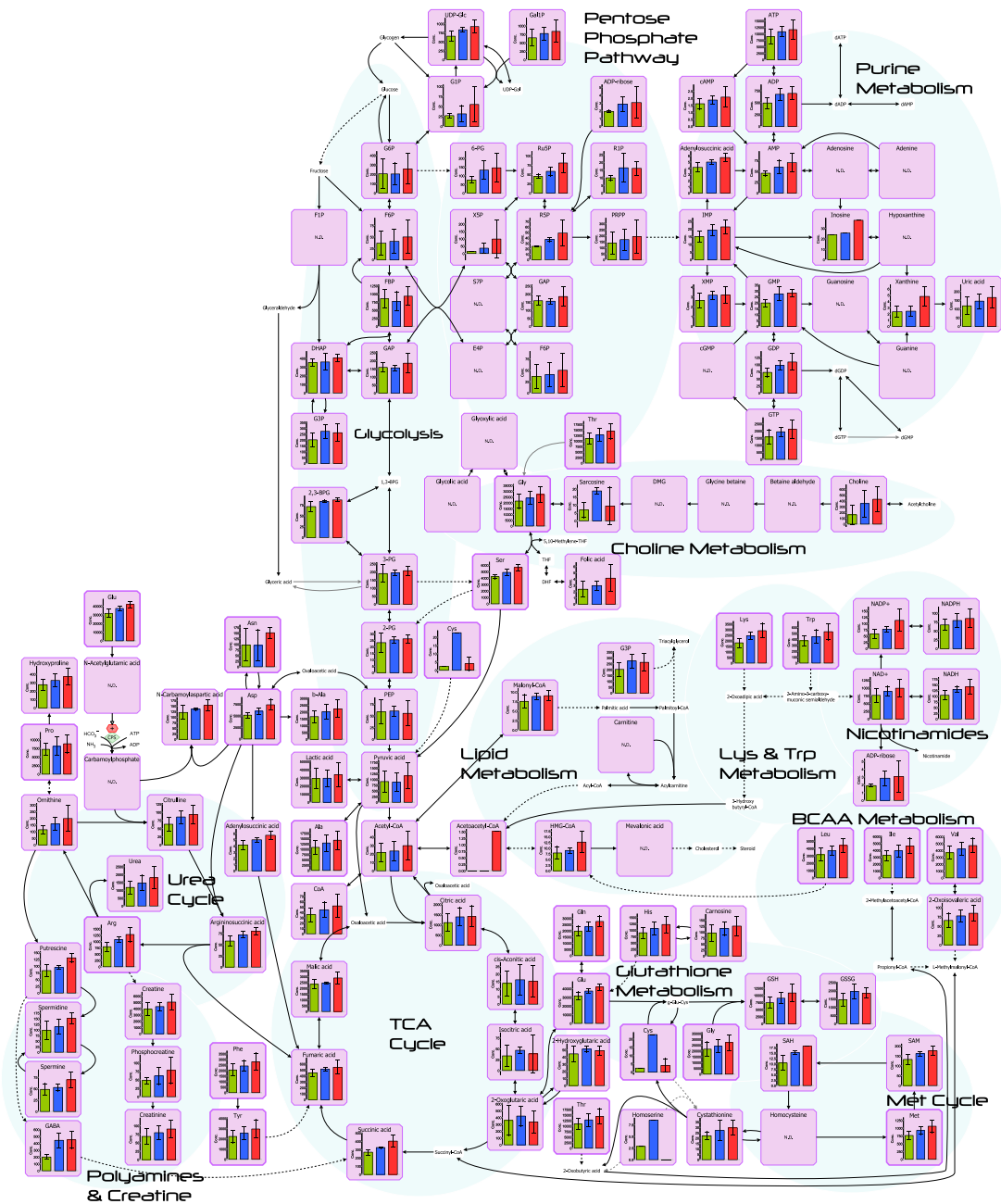


図 1-8-1 メタボローム解析 全体図

測定対象として、解糖系、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、ポリアミン・クレアチン代謝経路、プリン代謝経路、グルタチオン代謝経路、ニコチンアミド代謝経路、コリン代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路にて主要な役割を占める 116 (カチオン 52, アニオン 64) 種の代謝物質を選出し、解析を行った。これらの代謝物質の絶対定量値を算出し、それぞれの物質を代謝経路に描画した。左から順に Control (緑色)、Empty MITO-Porter (青)、MITO-Porter(CoQ10) (赤) の絶対定量値を示す。“N.D.”は解析対象物質が検出されなかったことを示す。(N=3)

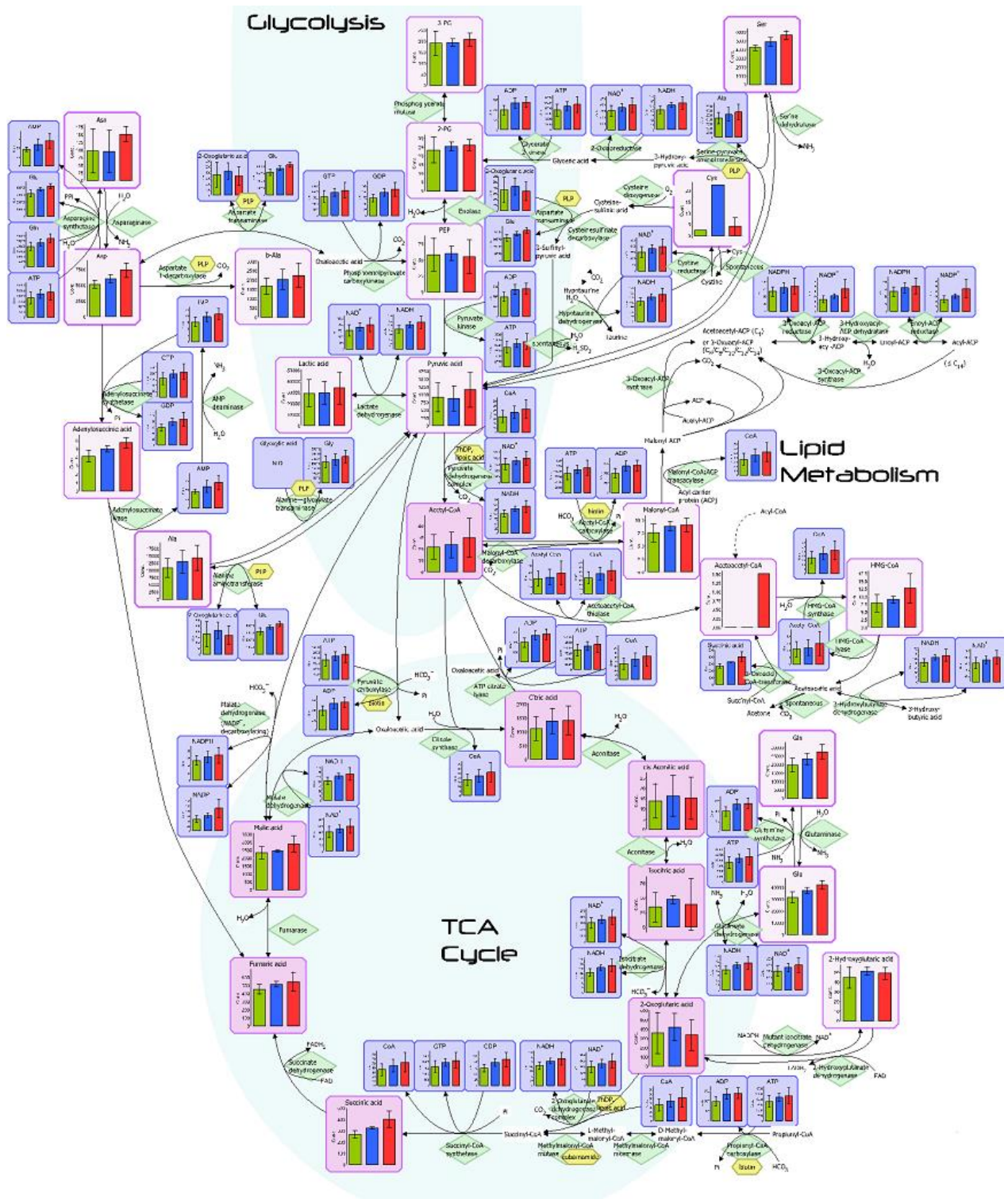


図 1-8-2 メタボローム解析：解糖系、TCA サイクル関連
 代謝物質の絶対定量値を算出し、それぞれの物質を代謝経路に描画した。左から順に Control (緑色)、Empty MITO-Porter (青)、MITO-Porter(CoQ10) (赤) の絶対定

量値を示す。経路上には代謝物質の他、補酵素および各反応に関与する物質（背景青色）、触媒となるビタミンおよび金属（背景黄色）、酵素（背景緑色）を示した。“N.D.(not detected)”は解析対象物質が検出されなかったことを示す。

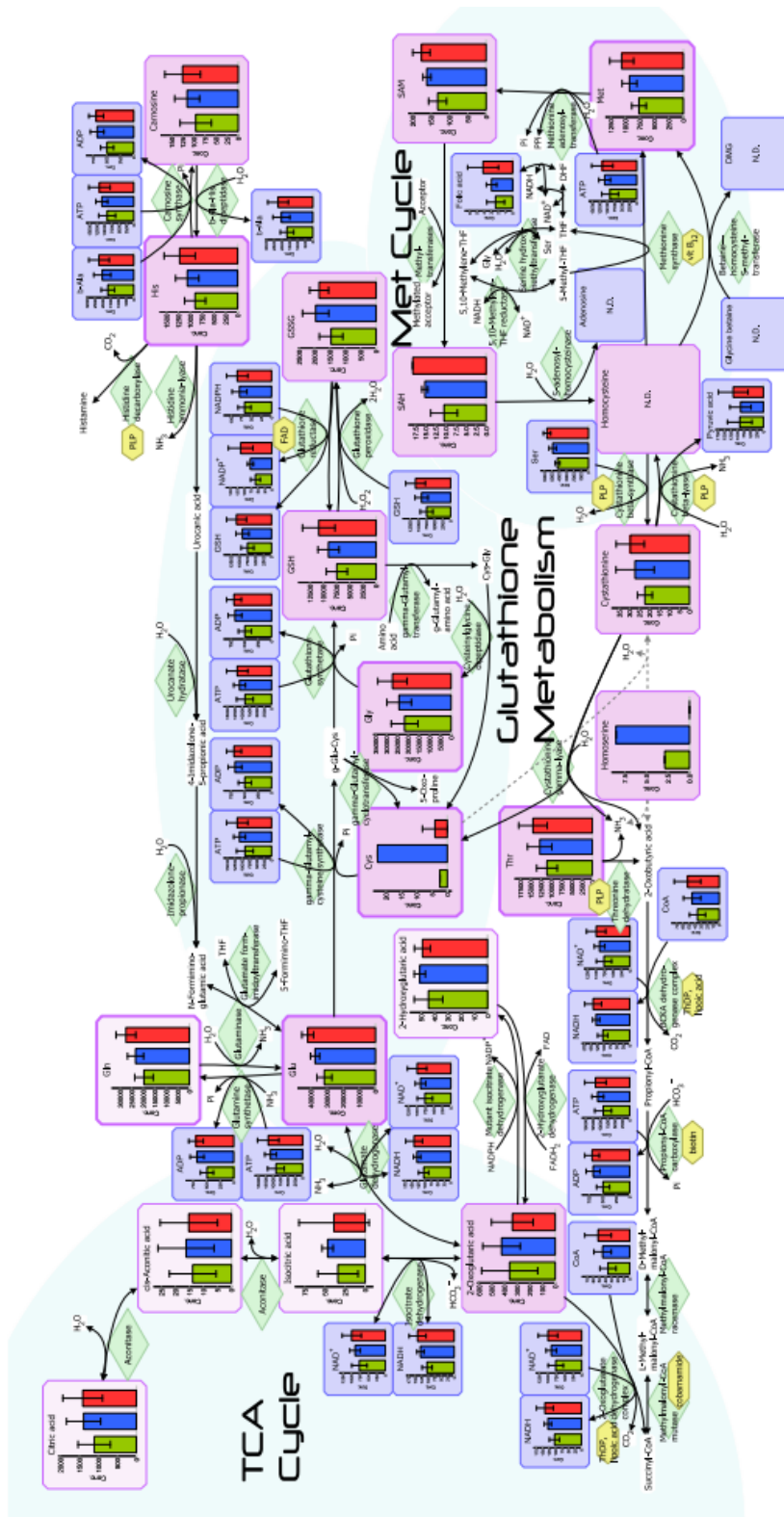


図1-8-3 メタボローム解析：メチオニン回路、グルタチオン代謝経路
代謝物質の絶対定量値を算出し、それぞれの物質を代謝経路に描画した。左から順に

Control (緑色)、Empty MITO-Porter (青)、MITO-Porter(CoQ10) (赤) の絶対定量値を示す。“N.D.”は解析対象物質が検出されなかったことを示す。

経路上には代謝物質の他、補酵素および各反応に関与する物質 (背景青色)、触媒となるビタミンおよび金属 (背景黄色)、酵素 (背景緑色) を示した。

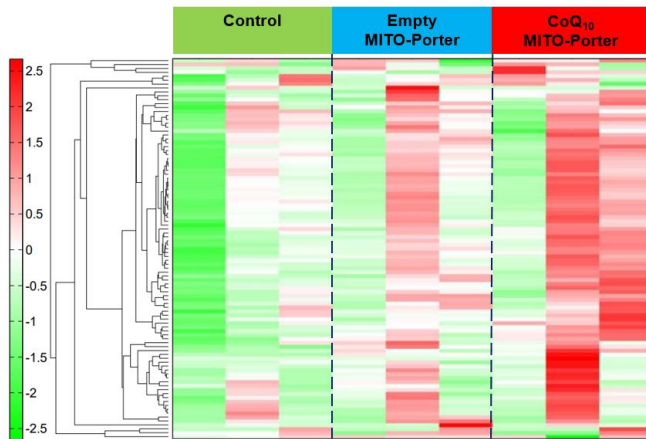


図 1-8-4 階層的クラスタリング解析結果のヒートマップ

検出された代謝産物を用いて階層的クラスタリングを行いヒートマップ表示した。横軸はサンプル、縦軸はピークを示す。緑が濃いほど平均値が低く、赤が濃いほど平均値より高いことを示す。(N=3)

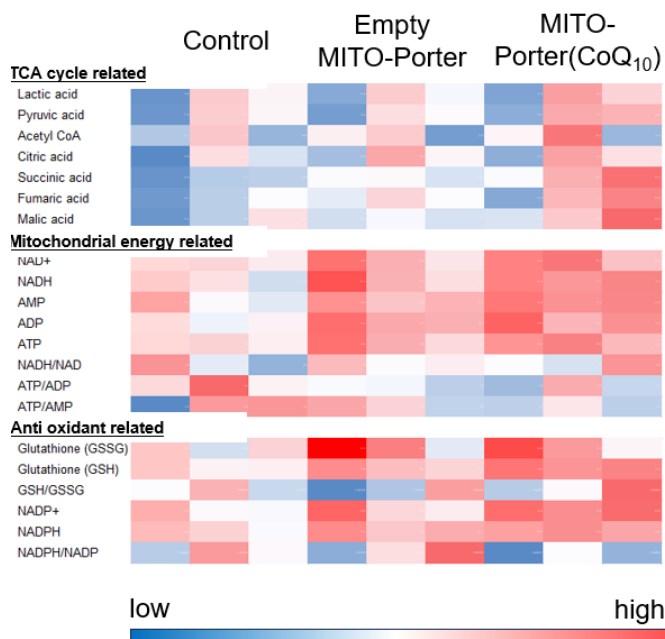


図 1-9-1 TCA 回路関連と抗酸化関連のヒートマップ

横軸はサンプル、縦軸はピークを示す。青が濃いほど平均値が低く、赤が濃いほど平均値より高いことを示す。(N=3)

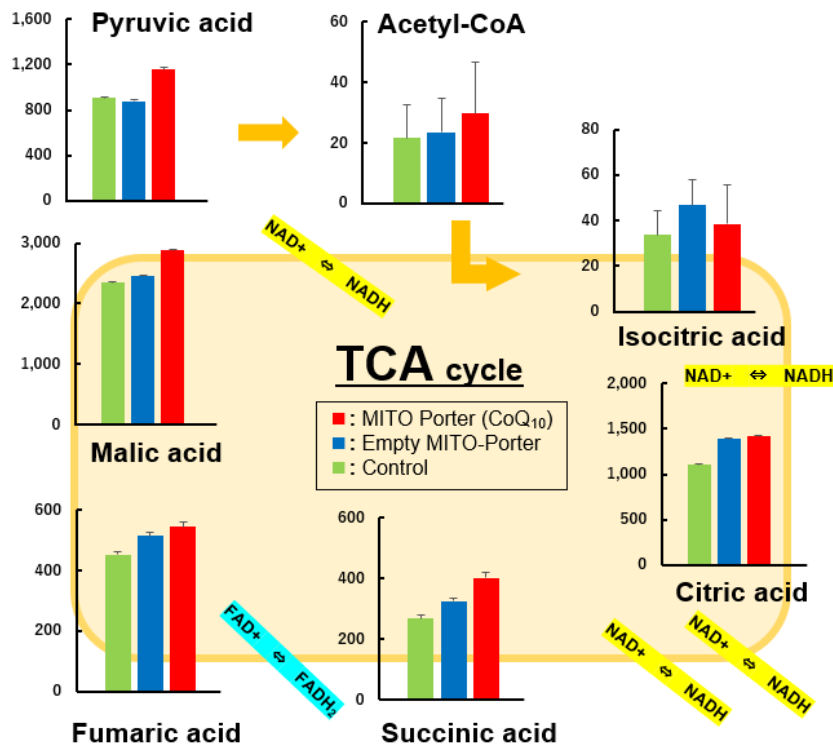


図 1-9-2 TCA 回路関連代謝物測定値

MITO-Porter (CoQ₁₀) (赤)、Empty MITO-Porter(青)、Control(緑)の各サンプル添加 24 時間後に各群の細胞から TCA サイクル中の代謝物を抽出し HMT 社に測定を依頼した。データは平均値±SD で示した (n=3)。統計的に有意な差は認められなかった。

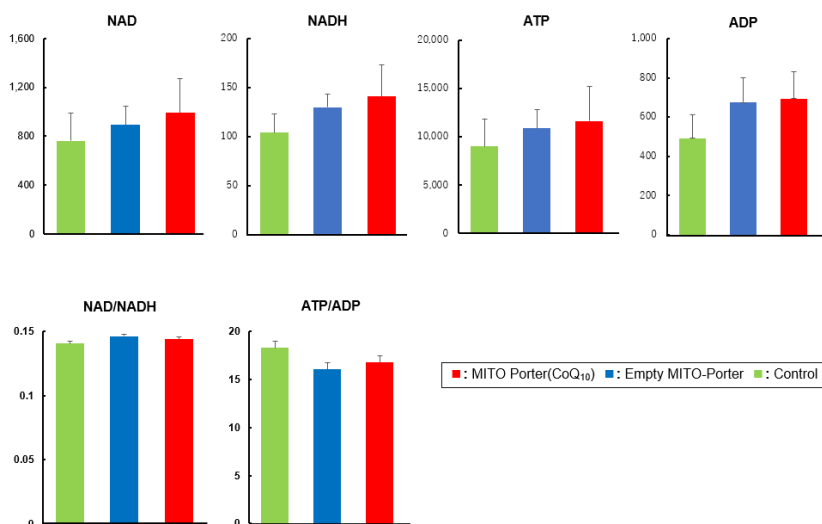


図 1-10-1 ミトコンドリアエネルギー産生関連メタボローム解析

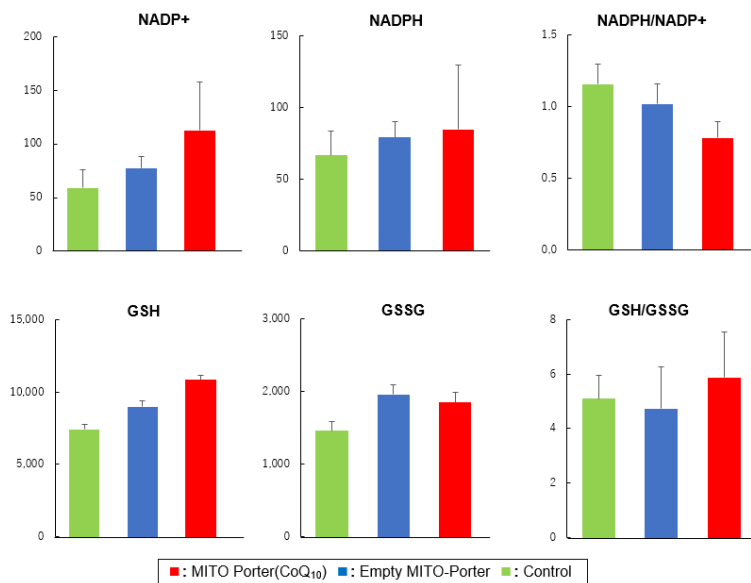


図 1-10-2 抗酸化関連メタボローム解析

MITO-Porter (CoQ₁₀) (赤)、Empty MITO-Porter(青)、Control(緑)データは平均値±SD で示した (N=3)。統計的に有意な差は認められなかったが MITO-Porter (CoQ₁₀) 群において抗酸化傾向を示した。

1-3-7 筋線維でのミトコンドリア機能評価のための筋線維単離

骨格筋細胞は生体内では筋鞘に包まれた多核筋線維として存在する。より生体内に近い状況下での MITO-Porter(CoQ₁₀)のミトコンドリア呼吸能への効果を確認するためラットから短肢屈筋を摘出し筋線維としての単離を行った。東京大学農学部獣医生理学研究室にて行われている方法を習得し再現した。片足の FDB から約 100 本の筋線維単離が出来た。単離した筋線維はホルマリン固定を行ったのち顕微鏡で確認し多核筋線維、衛星細胞などの筋組織由来の細胞であることを確認した。(図 1-11)

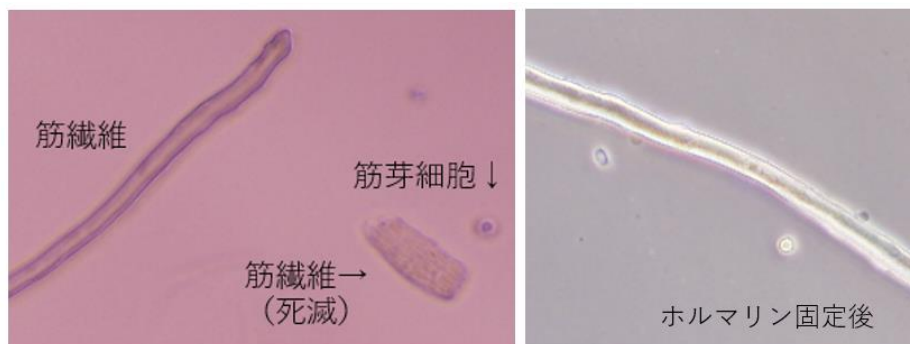


図 1-11 FDB より単離した骨格筋筋線維

多核筋線維と衛星細胞、単核筋芽細胞。死滅した筋線維は太く短く形態変化する

1-4 考察

本章においてはミトコンドリアへの薬物送達を可能にした脂質ナノ粒子である MITO-Porter を用いてミトコンドリア活性物質である CoQ₁₀ を送達しラットの正常骨格筋細胞 (L6) のミトコンドリア呼吸能が上昇した。また、その作用機序についても代謝経路の面から解析を行った。

MITO-Porter の細胞内取り込みの結果からは添加後 1 時間の測定では血清非存在下の方がより多くの細胞内取り込みを認めたが、添加後血清存在下で 24 時間おくことで血清なしの 1 時間値よりも多くの取り込みが確認された(図.1-2)。これらは時間を置くことで血清存在下であっても十分にナノ粒子が取り込み可能であることを示しており、我々の研究室内での先行報告とも一致する。血清に含まれる多くの蛋白は生体内に常に存在するため血清存在下での細胞内への粒子取り込みはより生体内に近い環境での評価となる。ミトコンドリアと MITO-Porter との共局在についても顕微鏡を用いて確認した。MITO-Porter はミトコンドリアへの薬物送達に特化した脂質ナノ粒子でありそれらの功績についてはすでに報告がある。(Hibino et al. 2023) (Yamada et al. 2022)脂質組成を変更したナノ粒子である CoQ₁₀-DOPE/SM-LNP では細胞内取り込みおよびミトコンドリアへの移行をほとんど認めなかったことから MITO-Porter のミトコンドリア指向性については十分であると言える。

CoQ₁₀ はミトコンドリア内の電子伝達系の呼吸差複合体 I, II の補酵素であり ATP 産生について電子伝達系で呼吸差複合体間の電子運搬を行う役割を持つ。(Ernster and Forsmark-Andree 1993) 今回の 図 1-5 の結果から basal respiration, Maximal respiration 双方で OCR の上昇を認めた。これは定常状態の骨格筋細胞 (basal respiration) と、運動や骨格筋へのダメージなど何らかの負荷がかかった状態の骨格筋細胞 (maximal respiration) すなわち ATP 産生能が上昇している状態の骨格筋細胞の双方で ATP 産生能の強化が可能であることを示している。骨格筋は日常的に動かされる細胞であり、運動時には ATP 産生能も向上する。Basal respiration, maximal respiration 両方の上昇は安静時、運動時双方でのミトコンドリア呼吸能の活性化が可能であることを示唆していると考ええる。

メタボローム解析によるヒートマップからは CoQ₁₀ 送達群において電子伝達系への CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリアエネルギー産生や TCA 回路関連代謝物質について上昇傾向が見られた(図.1-9-1,2,1-10-1)。電子伝達系への CoQ₁₀ 送達による呼吸鎖複合体を介した ATP 産生が活性化により、呼吸鎖複合体での Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH)消費も活発となるため、NADH の提供元である TCA

サイクルも活性化すると推察する。CoQ₁₀ は電子伝達系の補酵素であるのみでなく、細胞に対する抗酸化作用も持つ(Ernster and Forsmark-Andree 1993)。Heatmap の結果からは抗酸化に関連する NADPH/NADH (Anastasiou et al. 2011)や Glutathione Redox Ratio (GSH/GSSG) (2009) 等でも CoQ₁₀ 送達群で上昇傾向を認めた (図 1-10-2)。これらは CoQ₁₀ 送達による細胞内酸化ストレスが緩和されていることが示唆される。MITO-Porter によるミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達は抗酸化の観点からもミトコンドリア機能の向上に寄与した可能性もある。

1-5 本章のまとめ

本章では、正常ラット骨格筋細胞ミトコンドリアに対してナノキャリアである MITO-Porter を用いて電子伝達系の補酵素である CoQ₁₀ を送達しミトコンドリア呼吸能が上昇されることを示した。その機序として TCA サイクルや抗酸化経路の活性化の可能性が示唆された。今後、生体内により近い筋線維での *in vitro* 実験や *in vivo* での薬剤送達経路検討も含めた実験を検討する。(図 1-12)

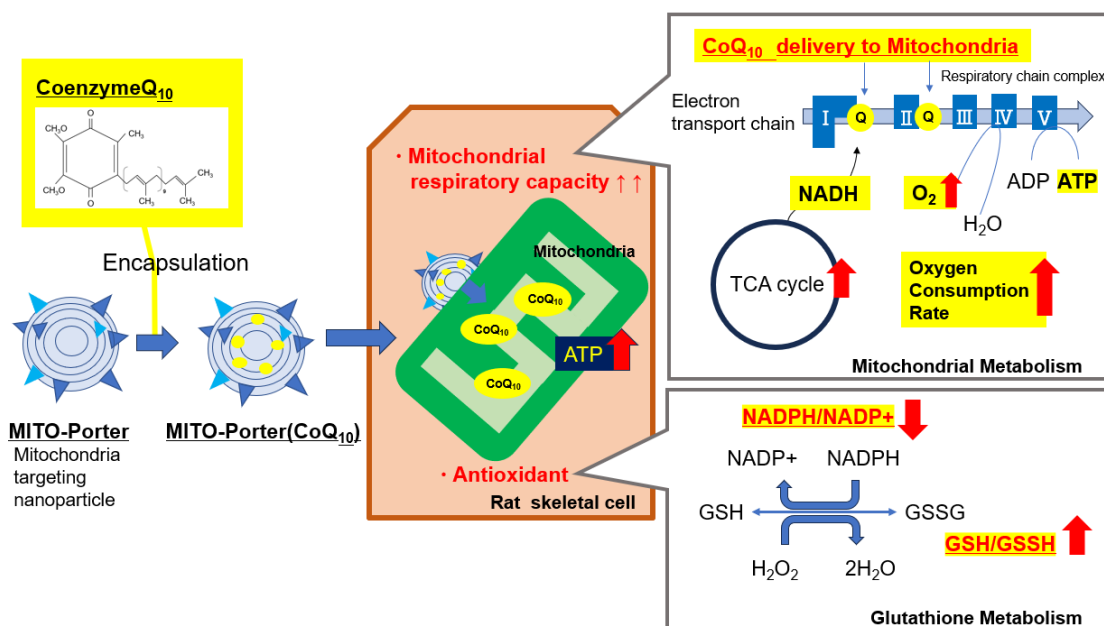


図 1-12 第 1 章のまとめ

第2章：H9C2 に対する薬物送達検討（DMD ラット心筋介入に向けて）

2-1 緒言

心筋細胞は人体を構成する様々な細胞の中で最も豊富にミトコンドリアを含む細胞でありミトコンドリアをターゲットとする治療方法による心筋症治療は心臓移植が適応にならない二次性心筋症患者において有用である。*In vivo* では angiotensin II type 1 receptor (AT₁) のような損傷心筋に発現する細胞表面受容体をターゲットとする心筋への薬剤送達(Lomis et al. 2021)や Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) など心筋への集積が報告されている因子の活用など(Carlsson et al. 2018)、等様々な戦略が報告されているが癌などと比較すると心筋特異的な薬剤送達報告は 1/10 程度である。心筋細胞内でのミトコンドリアをはじめとするオルガネラへの送達報告はさらに乏しい。心筋幹細胞移植による治療報告も多くあり(Tang et al. 2018)、ミトコンドリア機能を強化した幹細胞 MITO cell を用いた幹細胞移植療法など当教室からも報告がある(Abe et al. 2018; Sasaki et al. 2022)が、幹細胞療法は心筋への送達は数%程度と送達率が問題点である(Cheng et al. 2014)。

ラット正常横紋筋細胞（心筋）である H9C2 においてはナノ粒子の細胞内導入能の乏しさから第1章、第2章で使用した MITO-Porter の使用が難しく脂質再調整など行った先行研究がある(Tsujioka et al. 2021)。心筋選択的に薬剤を送達する方法は上記のように既報があるが心筋細胞内導入能強化および細胞内動態制御については検討を要する。

本章においては H9C2 に対する MITO-Porter の細胞導入の困難さを MITO-Porter の添加時間、培地への血清添加の有無などを検討することにより改善し条件変更により MITO-Porter の細胞内導入が可能であることを示した。血清存在下において粒子径による MITO-Porter の細胞内取り込みの差について先行研究はなく本論文で初めて報告する。さらに顕微鏡を用いて粒子の細胞内動態観察を行いミトコンドリアへの共局在を確認した。細胞内取り込み能が高い条件での MITO-Porter を用いた H9C2 ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達を行いミトコンドリア呼吸能の変化を測定し CoQ₁₀ 送達群で上昇傾向がみられた。また、MITO-Porter に含有する CoQ₁₀ 量を増加することによりミトコンドリア呼吸能の上昇効果の増強傾向を確認した。

DMD 心筋症の治療においては現状効果が乏しく治療は対症療法のみであり心筋症に対する治療方法の確立が望まれる。本章は H9C2 への介入報告のみである

が、本実験を元に今後DMD心筋ミトコンドリアへの薬物送達による治療の可能性について検討する予定である。

2-2 実験方法

2-2-1. 試薬・材料

2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), sphingomyelin (SM), 1,2-Dimyristoyl-sn-glycerol, methoxy polyethylene glycol 2000 (DMG-PEG 2000) は NOF 社から購入した。Stearylated R8 (STR-R8) は Toray Industries Inc. から購入した。CoQ₁₀ は和光純薬工業から購入した。その他は特に断りのない限り特級試薬を用いた。H9C2 (rat myoblast: CRL-1446) は ATCC より購入した。DMEM(049-32645) は 和光純薬工業から購入した。FBS は Sigma-Aldrich より購入した。Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit は Agilent Technologies より購入した。その他は特に断りのない限り特級試薬を用いた。

2-2-2 細胞培養

本実験においてラット横紋筋細胞である H9C2 を用いた。培地は 10 % FBS、 1×10^5 U/L ペニシリン、0.1 g/L ストレプトマイシンを添加した DMEM (049-32645) を使用した。細胞は 10 cm ディッシュで培養し 37 °C、5 % CO₂ の条件下で、約 80% のコンフルエントに達するまでインキュベーションした。細胞継代は 2~3 日に 1 回行った。継代の際はトリプシン溶液で処理し、付着した細胞を剥がし DMEM とともにコニカルチューブに回収して遠心したのちに上清を除去し、新しい DMEM を追加、細胞懸濁液を希釈し 10cm ディッシュで培養した。

2-2-3 H9C2 ミトコンドリア機能評価

Seahorse mito stress kit plate (Agilent Technologies, Santa Clara, US) の各 well に細胞を 10,000cells/well (100 μL) の濃度で播種し、37 °C、5 % CO₂ 中で 48 時間インキュベートした。各 well の培地をランニング培地に交換し、37 °C、CO₂ なしのインキュベーターで 1 時間培養した後、細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies, Santa Clara, US) を用いてミトコンドリア呼吸能測定を行った。測定後各ウェルの内容物を吸引し 0.25 % トリプシン溶液 20 μL を加えて細胞を剥がし、トリパンブルーで染色し細胞計数を行った。測定結果の OCR は、細胞数に応じて OCR/cells に補正した。

2-2-4 MITO-Porter の調製

本実験ではナノ粒子として粒子径の異なる3種類のMITO-Porterと2種類のCoQ₁₀含有量の異なるMITO-Porterを用いた。4.2 mMの脂質(DOPE:SM:DMG-PEG2000:STR-R8) [9:2:0.33:1.1、モル比]と1.5 μM, 3 μM, 5 μMのいずれかのCoQ₁₀を含むエタノール溶液を調製した。MITO-Porter (CoQ₁₀)は、マイクロ流体デバイスシステムiLiNP (Maeki et al. 2018)を用いて、エタノールとPBS(-)中で脂質を混合することにより調製した。得られた懸濁液は透析膜(分子量カットオフ12,000-14,000 Da; Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA)を用いてPBS(-)で透析を2-3時間行ったのちに回収した。

2-2-5 MITO-Porter の物性評価

平均粒子径と多分散性指数(Polydispersity index :PDI)は、ゼータサイザーNano ZS (Malvern Instruments 社)を用いた動的光散乱法で測定した。粒子径の値は粒子径分布の形で示した。サンプルのζ電位もゼータサイザーNano ZSを用いて10mM HEPES 緩衝液中で測定した。

2-2-6 MITO-Porter の細胞内取り込み評価

H9C2を測定の前48時間前に 1.0×10^5 cells/2mL/wellを6wellプレートに播種し、37°C 5% CO₂で培養した。測定1もしくは24時間前に1mLのPBS(-)で細胞を洗浄した後、DiI(0.5 μM)で標識したMITO-Porter(CoQ₁₀)を含むDMEM (FBS+)を添加した。添加した粒子は毎回同一濃度になるように調整後に添加した。ヘパリン溶液(20 U/mL)2回洗浄した後、細胞をトリプシン処理し、1.5mlマイクロチューブに細胞を回収した。遠心(700 g, 4°C, 3分)後、上清を除去し、ペレットをFACSバッファ500μLに懸濁した。細胞懸濁液をナイロンメッシュでろ過した後、フローサイトメトリー(Beckman Coulter Inc.)で測定した。

2-2-7 共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)による細胞内動態の評価

H9C2を3.5 cm ガラスディッシュ(IWAKI)に20,000 cells/3 mL/dishとなるように播種し、24時間培養した(37°C 5% CO₂)。各ディッシュにMITO-Porter(CoQ₁₀)、Empty MITO-Porter、PBS(-)を加え、37°C 5% CO₂で24時間培養した。共焦点レーザー顕微鏡で観察する前に、Mito tracker Deep red (1.2 μL/dish)を添加し、30分間インキュベートした。DMEM-F12培地による洗

浄を2回行った後、培地をDMEM F-12に交換し、CLSMで各ディッシュを観察した。細胞は473 nmの光とLDレーザーの635 nmの光で励起した。水浸対物レンズ (UPlanSApo 60x/NA. 1.2) とダイクロイックミラー (DM405/473/559/635) を装備したNikon A1 (Nikon Instruments Inc.) を使用した。2つの蛍光検出チャンネル (Ch) は以下のフィルターに設定した。

Ch1: 490/50 (緑) DiI 標識 MITO-Porter

Ch2 : 560/50 (赤) Mito Tracker Deep Red

2-2-8 H9C2 ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能評価

Seahorse mito stress kit plate (Agilent Technologies, Santa Clara, US) の各ウェルに H9C2 を 10,000cells/well (100 μL) の濃度で播種し、37°C、5 % CO₂ 中で 24 時間インキュベートした。各 well の培地を除去し、MITO-Porter (CoQ₁₀)、Empty MITO-Porter または PBS (-)、CoQ₁₀ のいずれかを 20 μL と DMEM 培地 (FBS (-)) 80 μL (合計 100 μL) を各 well に添加し、1 時間インキュベートした (37°C、CO₂ 5%)。その後、DMEM (20%FBS) 100 μL を各 well に加え、37°C、CO₂ 5% で 24 時間 (±3 時間) 培養した。添加した粒子は同一濃度になるように調整後に添加した。各 well の培地をランニング培地に交換し、37°C、CO₂ なしのインキュベーターで 1 時間培養した後、細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies, Santa Clara, US) を用いて MITO-Porter (CoQ₁₀) 投与後のミトコンドリア呼吸能測定を行った。測定結果の OCR は、細胞数に応じて OCR/cells に補正した。

2-3 結果

2-3-1 MITO-Porter 物性

本章の実験で使用した MITO-Porter の物性を以下に示す。(表 2-1)

	粒子作成時の CoQ ₁₀ 濃度	粒子径(nm)	PdI	ζ potential(mV)
MITO-Porter (1.5mM)	1.5mM	53.6± 7.5	0.222 ±0.06	14.1 ±2.2
MITO-Porter (3.0mM)	3.0mM	65.1± 25.2	0.243 ±0.02	14.1 ±0.7
MITO-Porter (5.0mM)	5.0mM	56.9± 1.7	0.283 ±0.05	16.0 ±2.4

表 2-1 CoQ₁₀ 濃度別 MITO-Porter 物性

データは平均値±SD を示す (N=3)

2-3-2 H9C2 の解糖系、酸化的リン酸化による ATP 産生能の確認

本研究ではミトコンドリアへの薬物送達による細胞機能活性化に焦点を当てる。そのため、対象となる細胞は酸化的リン酸化優位にエネルギー産生を行っている細胞が望ましいと考えたため H9C2 の解糖系、酸化的リン酸化の ATP 産生比率を測定した。細胞外フラックスアナライザーを用いて解糖系、酸化的リン酸化各々の酸素消費速度 (OCR) 測定し評価した。播種細胞数による変化が出ないように播種細胞数の設定は 7500,1000,15000cell/well で行った。H9C2 における OCR は約 90% が酸化的リン酸化で測定され、解糖系由来の OCR は全体の 1 割程度であった(図 2-1)。以上より、H9C2 はミトコンドリアへの介入によりエネルギー産生が向上する可能性のある細胞であることが示唆された。

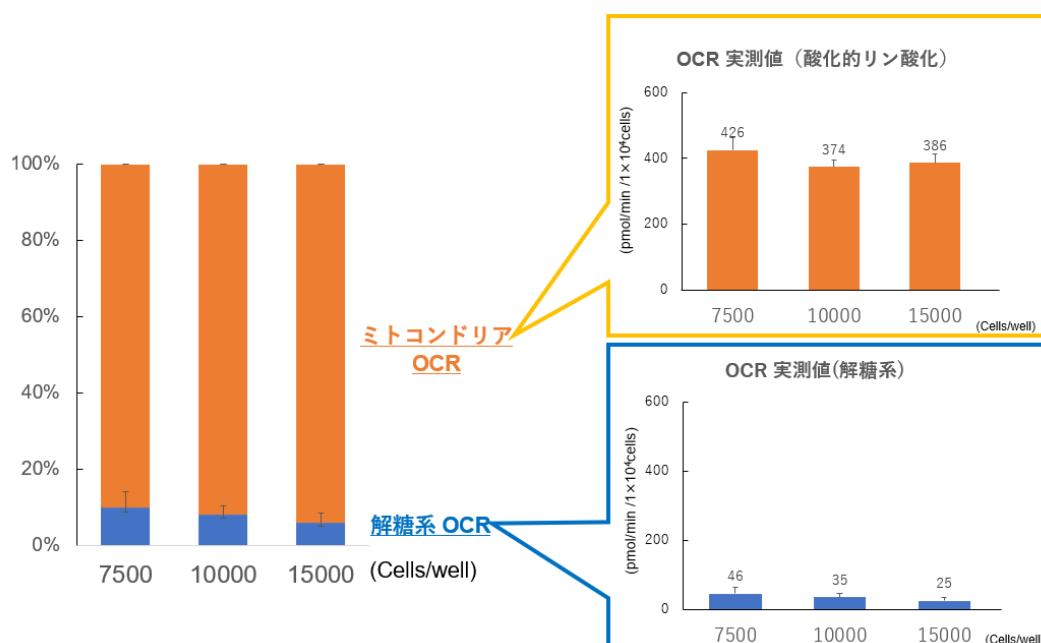


図 2-1 H9C2 酸素消費速度

H9C2 における酸素消費速度(OCR)は約 90%が酸化的リン酸化で測定され、解糖系由来の OCR は全体の 1 割程度であった(N=3)

2-3-3 細胞内導入能評価

CoQ₁₀ を含有した MITO-Porter の細胞内導入能を確認するために、DiI で蛍光標識した MITO-Porter を用いて、H9C2 への MITO-Porter の細胞取り込み量を評価した。細胞内導入能はフローサイトメーターを用いて測定を行った。MITO-Porter 添加後、1,6,24 時間の取り込み量を評価した。取り込みは全て血清存在下で実施した。添加 1,6,24 時間後に測定した取り込み量は図 2-2 に示す。血清存在下において MITO-

Porter は添加後 1 時間ではほとんど取り込みを認めないが添加後 6 時間以降では十分な細胞内導入能を認めた。

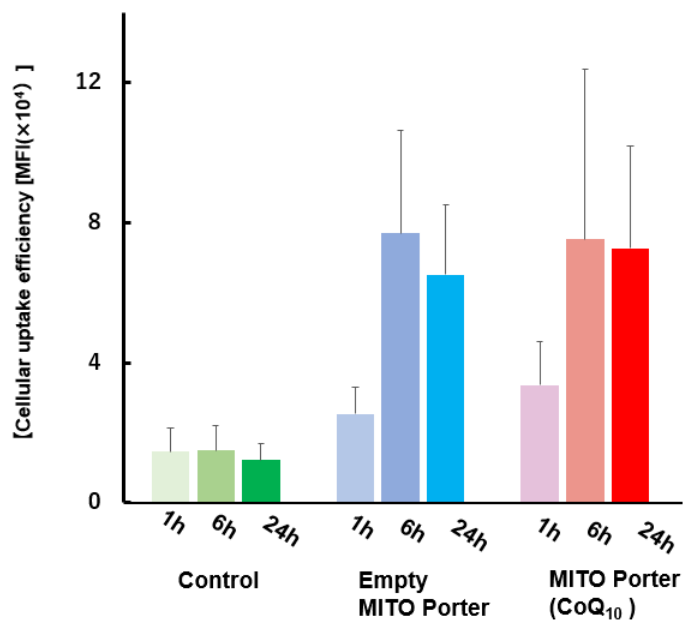


図 2-2 添加後 1,6,24 時間における血清存在下の細胞内導入能評価

MITO-Porter 添加後 1,6,24 時間の細胞内取り込み量を測定した。測定はフローサイトメトリーを用いて DiI で標識した MITO-Porter または Empty MITO-Porter を取り込んだ H9C2 の 1,6,24 時間後の蛍光強度を測定した。(N=3) 測定値は平均 \pm SD で示した。

2-3-4 細胞内動態評価

CLSMを用いてDiIで蛍光標識したMITO-Porterの細胞内局在を観察した。MITO-Porter(CoQ₁₀), Empty MITO-Porter(緑)はミトコンドリア(赤)との共局在を多く認めた。(図2-4)

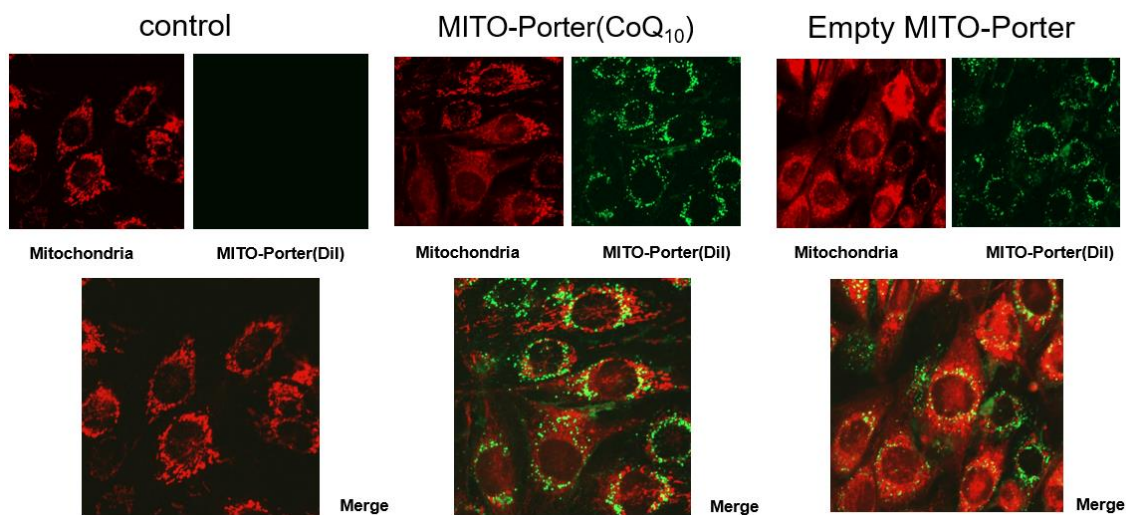


図2-4 MITO-Porter 細胞内局在評価 (CLSM)

0.5%DiI (緑) で標識された MITO-Porter の細胞内輸送を CLSM で観察した。ミトコンドリアは Mito tracker deep red(赤)で染色した。

2-3-5 ミトコンドリア呼吸能評価

H9C2 ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能への影響を評価した。H9C2 に対して MITO-Porter(CoQ₁₀), Empty MITO-Porter, PBS を添加し 24 時間後のミトコンドリア呼吸能の測定を行った。MITO-Porter の添加、細胞への取り込みは全て血清存在下で行った。粒子濃度は同一になるように調整し、また各施行回でも粒子濃度は一定になるように調整した。MITO-Porter(CoQ₁₀) において他 2 群と比較して上昇傾向を認めた。(図 2-5)

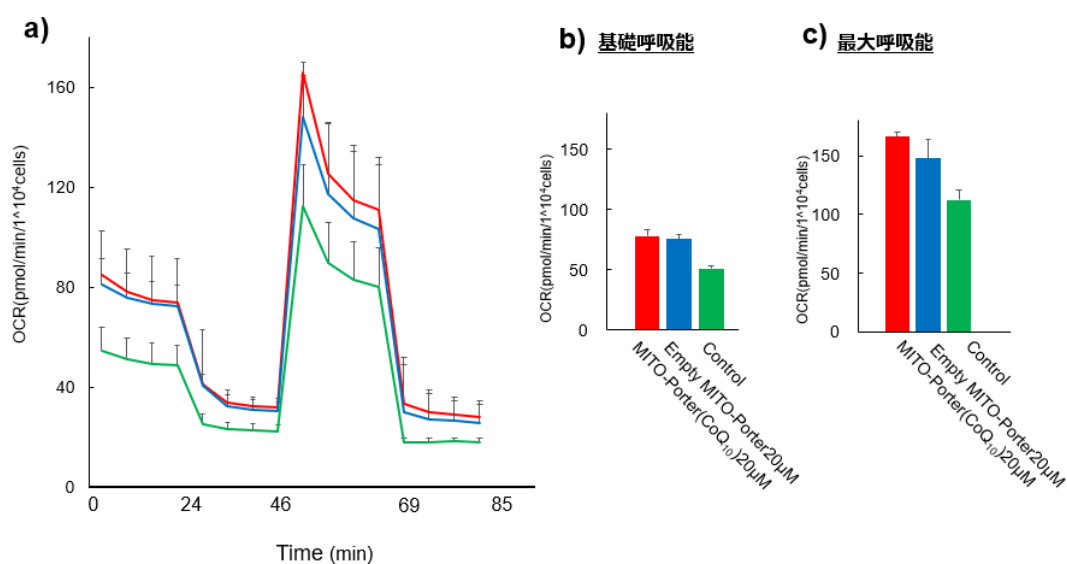


図 2-5 H9C2 ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能評価
MITO-Porter(CoQ₁₀) (赤) と Empty MITO-Porter (青) と PBS (緑)

OCR は細胞数で補正して算出した。a) 時系列結果 b) 基礎呼吸能 c) 最大呼吸能
データは平均値 ± SD を示す (N = 3)。統計学的な有意差は認めなかった。

粒子添加量によるミトコンドリア呼吸能の上昇の寄与を確認するため粒子濃度 10、20、40 μM にした MITO-Porter(1.5 mM)、Empty MITO-Porter を H9C2 に添加し測定した。濃度依存性に OCR の上昇傾向を認めた(図 2-6)。

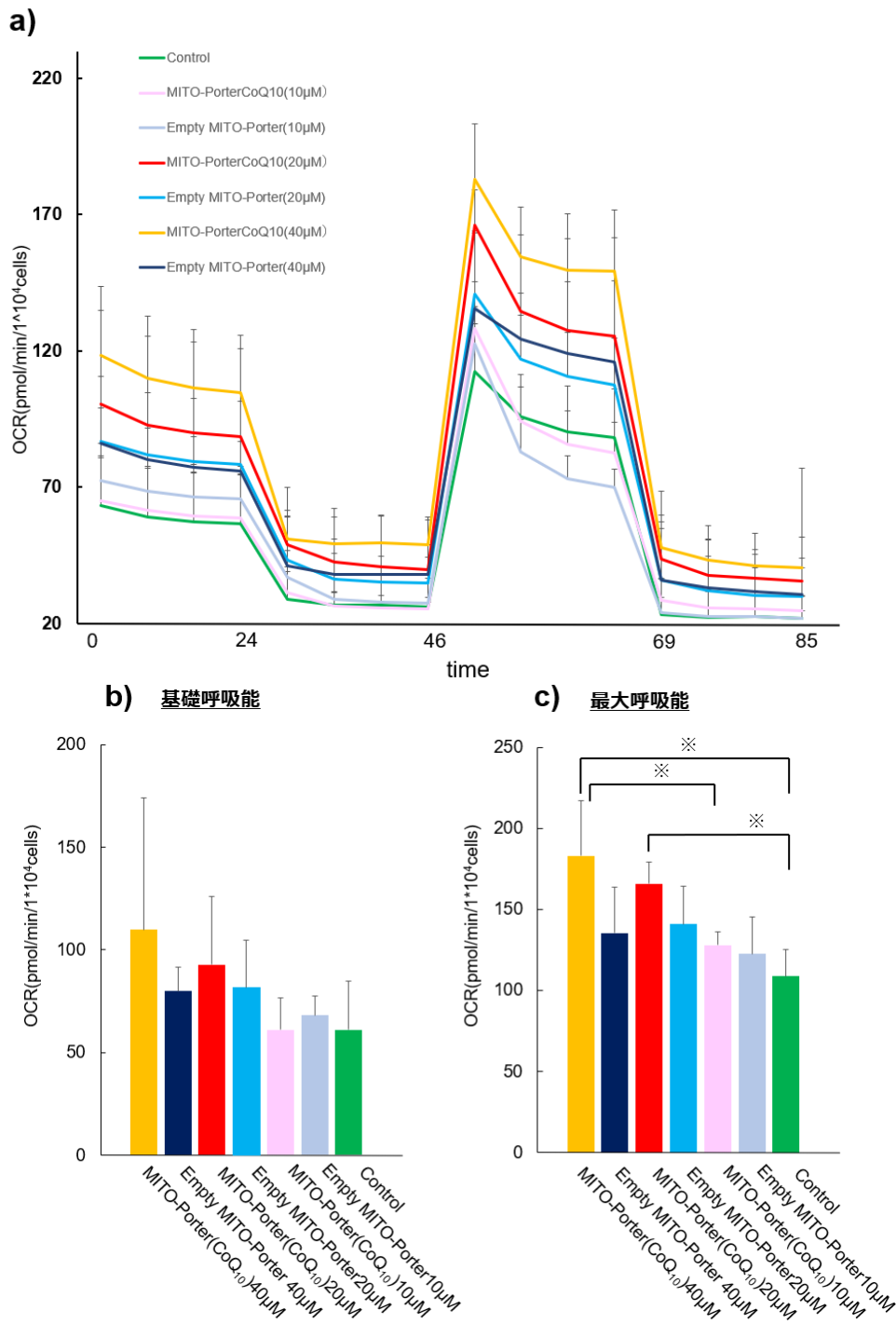


図 2-6 H9C2 における粒子添加濃度別ミトコンドリア呼吸能測定
粒子添加後 24 時間後のミトコンドリア呼吸能

a) 時系列結果 b)基礎呼吸能 c) 最大呼吸能 データは平均値±SD を示す
(N=3-5)。有意差は *nr*ANOVA と SNK 検定により算出した。**p* <0.01

CoQ₁₀の量によるミトコンドリア呼吸能上昇の寄与を確認するため CoQ₁₀濃度を 3 μ M, 5 μ M で調製した粒子で同様の OCR 測定を実施した。1.5 μ M CoQ₁₀ で調製した MITO-Porter 添加群(MITO-Porter(CoQ₁₀ 1.5 mM))と比較して 3 μ M, 5 μ M で作成した MITO-Porter(MITO-Porter(CoQ₁₀ 3 mM), MITO-Porter(CoQ₁₀ 5 mM))において基礎呼吸能、最大呼吸能ともにより上昇を認めた。(図 2-7)

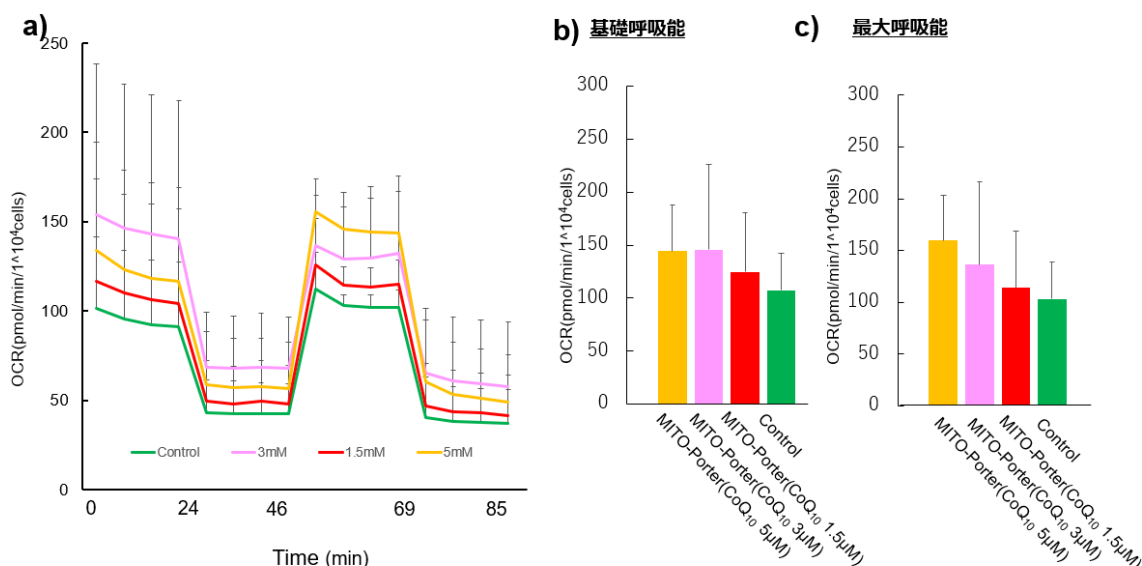


図 2-7 粒子調製時の CoQ₁₀濃度別ミトコンドリア呼吸能評価

粒子添加後 24 時間後に測定。OCR は細胞数で補正して算出した。

a) 時系列結果 b)基礎呼吸能 c) 最大呼吸能

データは平均値 \pm SD を示す (N=3)。統計学的有意差は認めなかった。

図 2-5,6,7 の結果より MITO-Porter を用いて CoQ₁₀を送達した群において、Fluor-carbonyl cyanide phenylhydrazine (FCCP)を用いてミトコンドリアを賦活化した最大呼吸能で他群と比較してミトコンドリア呼吸能の上昇を認めた。ミトコンドリア呼吸能の上昇幅は CoQ₁₀の送達量に依存する可能性が示唆された。また、Empty MITO-Porter 群においても粒子添加量に応じたミトコンドリア呼吸能上昇がみられた。

2-4 考察

本章においてはミトコンドリア活性物質である CoQ₁₀ をラット正常心筋細胞である H9C2 に送達する最適な方法を検討しミトコンドリア呼吸能を上昇させた。効果を最大とするための粒子投与濃度、CoQ₁₀ の送達量について検討を行った。今まで我々の研究室において H9C2 は MITO-Porter を取り込まないという実験結果が複数あるため、MITO-Porter の取り込み方法から検討を開始した。既報は血清非存在下、添加後 1 時間評価の評価のみであり粒子の作成方法も本研究で用いたマイクロ流体デバイスによる粒子調製ではなく単純水和法による調製であった。MITO-Porter は血清非存在下において高い細胞内導入能を示すことは 1 章,2 章で示した通りだが血清非存在下で長時間培養することによる細胞のコンディション悪化を懸念し添加後 1 時間評価以外は血清存在下で条件検討を行った。また、我々の研究室内において血清非存在下 1 時間値で全く細胞内導入が得られなかった細胞が添加後 24 時間では細胞導入が確認された実験結果があり、添加後 1 時間に加え添加後 6 時間、24 時間での取り込み量を評価し MITO-Porter の細胞内導入を確認出来た。血清の有無による MITO-Porter の細胞内取り込みの差は血清中に存在する種々の抗体やタンパク質がプロテインコロナを形成し粒子の取り込みに影響を与えていると考えるが、前述のような血清中の成分が導入量のみでなく細胞導入の経路の種類に影響する可能性も考える。細胞内への粒子取り込み経路であるエンドサイトーシスはクラスリンエンドサイトーシスやカベオラエンドサイトーシス、マイクロピノサイトーシスなどいくつかの細胞内導入経路が存在する。MITO-Porter の細胞内導入経路と血清の関連性については報告がなく他のナノ粒子についても血清存在下での細胞導入経路についての検討は報告が少ない。血清存在下、非存在下におけるエンドサイトーシス阻害実験により血清存在、非存在下における細胞内導入経路を明らかにし、血清と導入能の関連性を検討することは H9C2 のみならず様々な細胞への細胞内取り込み向上のために重要と考えるため今後阻害実験実施を検討している。

CoQ₁₀ はミトコンドリア内の電子伝達系の呼吸差複合体 I、II の補酵素であり ATP 産生について役割を持つ。CoQ₁₀ 送達後のミトコンドリア呼吸能測定の結果 (図 3-5) から H9C2 ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達による最大呼吸能におけるミトコンドリア呼吸能の上昇の可能性を示した。また、粒子濃度の上昇、粒子作成時の CoQ₁₀ 濃度を上昇させることによりさらに高いミトコンドリア呼吸能上昇傾向が示された。これは CoQ₁₀ の送達量と OCR の上昇幅が相関していることを示すと考える。一方で Empty MITO-Porter 投与群でも粒子濃度と相関して OCR の上昇がみられ

た (図 2-6)。その一因として MITO-Porter は膜融合を介してミトコンドリア内へ薬剤を送達するため、MITO-Porter とミトコンドリア膜の癒合自体がミトコンドリアへの刺激となる可能性を考える。これは Empty MITO-Porter の投与濃度とミトコンドリア呼吸能の上昇幅が比例することと合致する。そのため、MITO-Porter(CoQ₁₀) 群のミトコンドリア呼吸能上昇は CoQ₁₀送達とミトコンドリア膜への刺激の 2 因子が関連することが示唆された。図 2-7 より MITO-Porter の CoQ₁₀内封量増量により高いミトコンドリア呼吸能の上昇がみられたことから今後、CoQ₁₀送達量増量によりさらに高いミトコンドリア呼吸能上昇が得られると考える。

虚血などダメージを受けた心筋にのみ発現する因子を標的として心筋選択性を高めた核酸やナノ粒子を用いた心臓標的性向上戦略を用いた心筋細胞への薬剤送達はいくつか既報がある (Carlsson et al. 2018)(Lomis et al. 2021)が心筋細胞内の細胞内オルガネラを標的とする治療戦略は報告に乏しい。心筋はその性質上、常にエネルギーを要する細胞でありそのエネルギーのほとんどはミトコンドリアから供給されている。心筋細胞はミトコンドリア含有量が最も高い細胞であり DMD モデル動物心筋ミトコンドリアにおけるエネルギー産生能低下が報告されている (Hughes et al. 2020) ことから心筋細胞ミトコンドリアの活性化は DMD 心筋症への治療戦略の 1 つとして有効と考える。本研究で扱う DMD 心筋症は遺伝性心筋症であり心移植や補助心臓の適応にはほぼならならず内科的薬物治療が主である。上述したような既報の心臓標的戦略と細胞内ミトコンドリアへの薬剤送達性を持った MITO-Porter を用いた細胞内ターゲティングの組み合わせは DMD 心筋症における治療の一助となるのではないかと考える。今後 DMD モデルラット心筋でのミトコンドリア機能評価や本章の実験を応用した DMD モデルラット心筋に対する心筋細胞ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達による介入検討を予定している。

第 2 章まとめ

本章では今まで MITO-Porter の細胞内導入が不可能と言われていた H9C2 において MITO-Porter の細胞内取り込みとミトコンドリア共局在を認めた。また、ミトコンドリア活性物質である CoQ₁₀ を H9C2 に送達しミトコンドリア呼吸能上昇が示唆された。粒子の添加量や CoQ₁₀ の送達量によりミトコンドリア呼吸能の上昇幅は変化した。本章の結果を今後 DMD 心筋細胞に応用する。

第3章：DMD 骨格筋細胞に対するミトコンドリアミトコンドリア機能評価と介入

3-1 緒言

DMD 骨格筋において病初期からミトコンドリア機能低下や形態変化が生じることは数多く報告がある。DMD モデルマウスである mdx マウスにおいてはミトコンドリア呼吸能低下(Kuznetsov et al. 1998)やサイズと構造変化(Hughes et al. 2019)、活性酸素の増加(Hughes et al. 2019)などが報告されている、また、ミトコンドリア遊走能の低下による損傷治癒遅延についても報告があり損傷した骨格筋の修復回修復機能との関連性についても報告がある。(Vila et al. 2017) (表 3-1)上記報告ではミトコンドリアを標的とした進行抑制治療の可能性について言及されている。

現在報告されている治療的介入を表 3-2 にまとめる。治療介入として adeno-associated virus (AAV)の利用(van de Weijer et al. 2015)や抗酸化物質であるレスベラトロール内服(Selsby et al. 2012)、胎生期治療としての母胎へのタウリン内服(Barker et al. 2017)などが報告されているが、ミトコンドリアを対象とする薬物送達の困難さのため薬剤送達による DMD ミトコンドリア機能への介入についての報告はない。

また、1980-90 年代、動物実験や DMD 患者における CoQ₁₀ の効果について検討や臨床試験が行われたが、その効果が限定的であった(Folkers and Simonsen 1995; Wang et al. 2014)。その一因として難水溶性である CoQ₁₀ が細胞内およびミトコンドリア内へ適切に送達されなかった可能性を考える。第1章結果図 1-3-5, 図 1-8 ではナノ粒子を使用しない CoQ₁₀ 投与ではミトコンドリア呼吸能は上昇しなかった。近年 CoQ₁₀ の神経筋疾患についての治療効果について再度報告されてきている(Mizobuti et al. 2019) (Ren et al. 2022)がその多くは抗酸化効果である。さらなる治療効果向上のためには CoQ₁₀ の送達方法について検討し、細胞内抗酸化能のみでなくミトコンドリア内へ CoQ₁₀ 送達を行い電子伝達系の補酵素として利用することで相乗的な治療効果が発揮できる可能性があると考えられる。

以上より、本章ではミトコンドリア活性物質である CoQ₁₀ をミトコンドリアへの薬物送達が可能ナノ粒子(MITO-Porter (Yamada et al. 2008))を用いて確実にミトコンドリアへ送達し CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア機能強化とミトコンドリア機能強化による DMD 骨格筋に対する進行抑制治療についての可能性を検討した。

本章の研究ではまず、DMDモデルラットから骨格筋細胞を単離、培養しミトコンドリア呼吸能の低下を確認した。続いてDMD骨格筋細胞のミトコンドリア呼吸能低下に対して電子伝達系の補酵素でありミトコンドリア活性化物質であるコエンザイム Q₁₀を MITO-Porter を用いてミトコンドリアへ送達し DMD 骨格筋細胞におけるミトコンドリア呼吸能の上昇を確認しミトコンドリア活性化による DMD の治療可能性を示した。概念図を図 3-1 に示す。

ミトコンドリア異常の種類		References
mdx mice	<ul style="list-style-type: none"> 骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能低下 (基礎呼吸能・最大呼吸能) 	(Kuznetsov et al. 1998)
mdx mice	<ul style="list-style-type: none"> ミトコンドリア形態異常 (膨化) カルシウム保持力の低下 ROSの増加 	(Hughes et al. 2019)
mdx mice	<ul style="list-style-type: none"> 障害部位へのミトコンドリア遊走、集積能の低下 サルコメア修復遅延 	(Vila et al. 2017)

表 3-1 mdx マウスにおけるミトコンドリアの形態異常、機能低下報告

疾患動物	治療ターゲット	介入方法	結果	References
mdx mice	PCG-1 経路	AAVを用いたPCG-1遺伝子発現促進	ミトコンドリア蛋白の発現量増加	(Selsby et al. 2012)
mdx mice	PCG-1 経路	レスベラトロール投与 (100mg/kg/d)	耐疲労性の向上	(Selsby et al. 2012)
mdx mice	Ca ²⁺ 調節能 ROS産生	母胎へのタウリン投与	組織学的改善傾向	(Barker et al. 2017)

表 3-2 mdx マウスに対するミトコンドリア標的治療介入報告

DMDを対象とする骨格筋標的型drug delivery systemの開発

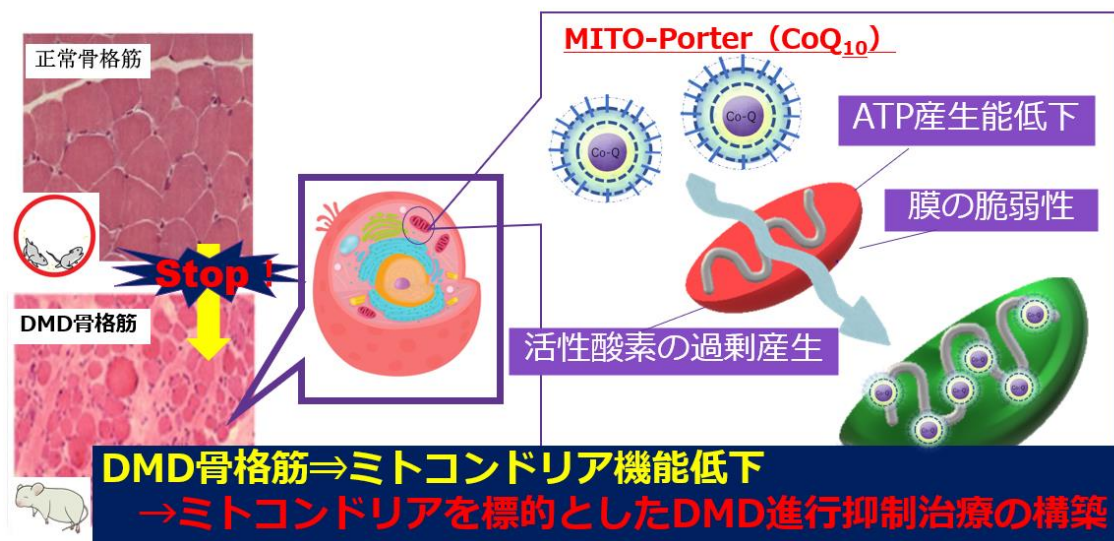


図3-1 DMD 骨格筋ミトコンドリア活性化による進行遅延介入 概念図

DMD 骨格筋ミトコンドリア機能低下に対して MITO-Porter を用いて CoQ₁₀ 送達を行いミトコンドリア機能活性化する。ミトコンドリア機能活性化による DMD 骨格筋機能を評価する。



図3-2 18カ月齢 DMD モデルラット外観

Wildtype rat (WT) と比較して明らか緩慢性動作、動揺性歩行が観察された。

3-1 本実験で使用した DMD モデルラットについて

本実験で使用した DMD モデルラットは東京大学農学部獣医生理学研究室山内教授らの研究室で CRISPR/Cas システムを用いてジストロフィン遺伝子をノックダウンし作成されたモデルラットである(Nakamura et al. 2014)。従来、よく使用される mdx マウスと異なり骨格筋機能低下のみでなく心筋症も発症するためより DMD の患者の臨床経過に近い経過を示し、生後 6~7 週から骨格筋の線維化が生じ、生後 13 週頃から心筋線維化が生じることが報告されている(Nakamura et al. 2014)。また、心機能については 10 か月齢ごろからエコーでの心機能低下が生じていることが報告されている(Sugihara et al. 2020)。今回使用したラットでも当科での研究において組織学的評価で心筋、骨格筋の線維化(図 3-5)、電子顕微鏡観察でのミトコンドリアの形態異常や基底膜異常が観察されている。(unpublished data)

本実験においては上記ラット(18 カ月齢)の組織学的評価及び細胞単離と細胞培養系を確立しその細胞を用いて細胞機能評価および介入評価を実施した。本実験で使用したラットの外観、体重、心筋重量、心機能を以下に示す(図 3-2,3-3,3-4)。

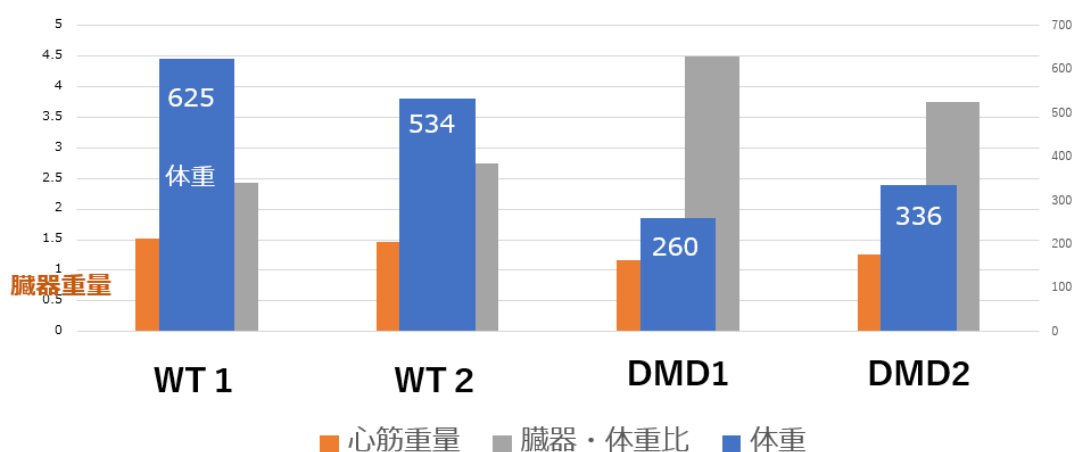


図 3-3 DMD ラットおよび WT ラットの体重・心筋重量・臓器体重比
DMD ラットにおいて体重の減少と臓器体重比の増加を認めた。

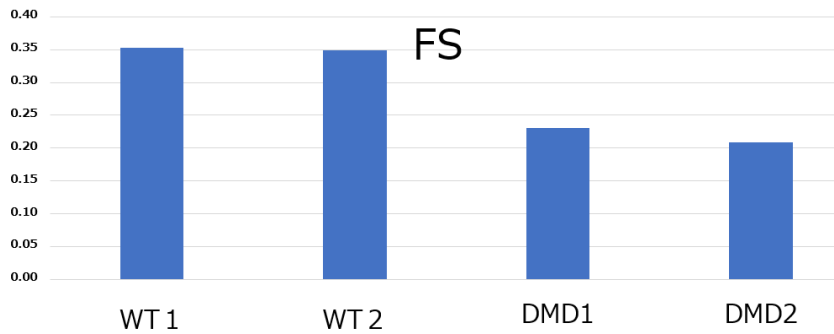


図3-4 DMD ラット、WT ラット 心機能評価
DMD ラットにおいて FS (左心収縮能) の低下を認めた。

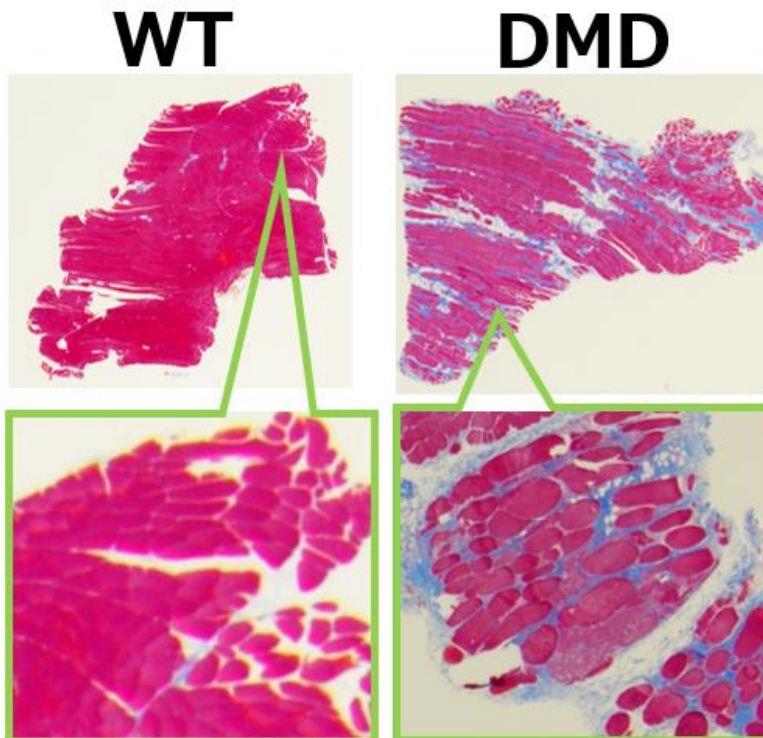


図3-5 DMD ラット、WT ラット骨格筋光顕像 (マッソントリクローム染色)
DMD ラット骨格筋において明らかな線維化を認めた。

3-2 実験方法

3-2-1. 試薬・材料

2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), sphingomyelin (SM)は Avanti Polar lipids 社より購入した。1,2-Dimyristoyl-sn-glycerol, methoxy

polyethylene glycol 2000 (DMG-PEG 2000) は NOF 社から購入した。Stearylated R8 (STR-R8) は Toray Industries Inc. から購入した。CoQ₁₀ は和光純薬工業から購入した。Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit は Agilent Technologies より購入した。その他は特に断りのない限り特級試薬を用いた。

HeLa 細胞 は ATCC :The Global Bioresource Center より購入した。DMEM(049-32645) は 和光純薬工業から購入した。FBS は Sigma-Aldrich より購入した。FGF は R&D SYSTEMS.INC より購入した。DE-U-10(抗デスミン抗体)、Alexa Fluor®488 は Thermo Fisher Scientific より購入した。

3-2-2.動物実験について

本研究ではラットから単離した骨格筋細胞を用いた。本実験を開始するにあたり動物実験計画書を提出し承認を得た。(承認番号：20-0176)。遺伝子組換え動物を使用するため、北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定に則り第二種使用等拡散防止措置承認申請書等を提出し承認を得た。(承認番号：2020-024)。全ての実験は北海道大学動物実験に関する規程に則り実施した。

3-2-3 骨格筋細胞単離

ラットを吸入麻酔し、頸椎脱臼により安楽死させ、大腿筋を速やかに摘出した。採取した骨格筋をバッファーで洗浄した後、コラゲナーゼで処理して細胞を分散させた。密度勾配遠心法で細胞を分離し、細胞層を集めてコラーゲンコートディッシュに播種した後、5%CO₂ 下、37°Cで培養した。得られた細胞は、Fibroblast growth factor (FGF)を添加した培養液中で3-4回培養した。本方法は(Sasaki et al. 2022)において心筋単離に用いた方法を骨格筋に応用した。

3-2-4 細胞培養

本実験においてDMDモデルラット、およびDMDモデルラットと同月齢のラット(Wistar-Imamichi系)から単離した骨格筋細胞を用いた(3-2-2参照)。培地は10%FBS、1×10⁵ U/L ペニシリン、0.1 g/L ストレプトマイシンを添加したDMEM (049-32645)を使用した。細胞はコラーゲンコートディッシュで培養し37°C、5% CO₂の条件下で、約80%のコンフルエントに達するまでインキュベーションした。細胞継代は4~5日に1回行った。継代の際はトリプシン溶液で処理し、付着した細胞を剥がしDMEMとともにコニカルチューブに回収して遠心したのちに

上清を除去し、新しい DMEM を追加、細胞懸濁液を希釈しコラーゲンコートディッシュで培養した。継代ごとに FGF を添加した。

3-2-5 免疫染色

DMD 骨格筋細胞および WT 骨格筋細胞を 3.5 cm ガラスディッシュ (IWAKI) に 20,000 cells/3 mL/dish となるように播種し、24 時間培養した (37 °C 5 %CO₂)。PBS(-)で2回洗浄したのちに 100% メタノール(MtOH)を 1mL 添加し常温で 10 分間細胞固定を行った。PBS(-)で洗浄後に Blocking として 5% BSA in 0.05% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート in PBS を添加し室温で 20 分静置した。5%BSA in 0.05%Tweenin in PBS を除いた後に 400 倍希釈 DE-U-10 を添加し2時間静置した。400 倍希釈 2 次抗体(AlexaFluor488)を添加し 1 時間静置した。二次抗体を除いたのち Hoechst33342[®]で核を染色し蛍光顕微鏡で観察した。

3-2-6 単離細胞の細胞種同定

DMD 骨格筋細胞およびWT骨格筋細胞をエッペンに回収し遠心をかけ上清を吸引した。100% MtOH を各エッペンに添加し細胞固定を行った。100 倍希釈 DE-U-10(抗デスミン抗体)をエッペンに添加し氷冷下で2時間静置した。2 回洗浄したのち 2 次抗体 (Alexa Fluor 488 400 倍希釈) を添加し氷冷下で1時間静置した。洗浄、遠心 (700 g, 4 °C, 3 分) 後、上清を除去し、ペレットを FACS バッファ-500 μL に懸濁した。細胞懸濁液をナイロンメッシュでろ過した後、フローサイトメトリー (Beckman Coulter Inc.) で測定した。

3-2-7 DMD 骨格筋単離細胞のミトコンドリア機能評価

Seahorse mito stress kit plate (Agilent Technologies, Santa Clara, US)の各 well に細胞を 10,000 cells/well (100 μL) の濃度で播種し、37°C、5 % CO₂中で 48 時間インキュベートした。各 well の培地をランニング培地に交換し、37 °C、CO₂なしのインキュベーターで 1 時間培養した後、細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies, Santa Clara, US) を用いてミトコンドリア呼吸能測定を行った。測定結果の OCR は、細胞数に応じて OCR/cells に補正した。

3-2-8 MITO-Porter(CoQ₁₀)の調整

本実験ではナノ粒子として MITO-Porter を用いた。4.2 mM の脂質 (DOPE:SM:DMG-PEG2000:STR-R8) [9:2:0.33:1.1、モル比] と 0.7 mM の CoQ₁₀ を含むエタノール溶液を調製した。MITO-Porter (CoQ₁₀) は、マイクロ流体デバイスシステム iLiNP (Maeki et al. 2018) を用いて、エタノールと PBS(-) 中で脂質を混合することにより調製した。得られた懸濁液は透析膜(分子量カットオフ 12,000-14,000 Da; Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) を用いて PBS (-) で透析を 2-3 時間行ったのちに回収した。(Hibino et al. 2019)

3-2-9 MITO-Porter 細胞内取り込み評価

DMD 骨格筋細胞、wild type 骨格筋細胞を測定の 48 時間前に 1×10^5 cells/2 mL/well を 6well プレートに播種し、37°C 5% CO₂ で培養した。測定 1、24 時間前に 1mL の PBS (-) で細胞を洗浄した後、DiI(0.5 μM) で標識した MITO-Porter(CoQ₁₀) を含む DMEM (FBS+) を添加した。ヘパリン溶液(20 U/mL) で 2 回洗浄した後、細胞をトリプシン処理し、1.5ml エッペンに細胞を回収した。遠心 (700 g, 4°C, 3 分) 後、上清を除去し、ペレットを FACS バッファー 500 μL に懸濁した。細胞懸濁液をナイロンメッシュでろ過した後、フローサイトメトリー (Beckman Coulter Inc.) で測定した。

3-2-10 DMD 骨格筋細胞ミトコンドリアへの CoQ₁₀ 送達によるミトコンドリア呼吸能評価

Seahorse mito stress kit plate (Agilent Technologies, Santa Clara, US) の各ウェルに DMD 骨格筋細胞を 10,000 cells/well (100 μL) の濃度で播種し、37°C、5% CO₂ 中で 24 時間 (±3 時間) インキュベートした。各 well の培地を除去し、MITO-Porter (CoQ₁₀)、Empty MITO-Porter または PBS (-)、CoQ₁₀ のいずれかを 20 μL と DMEM 培地 (FBS (-)) 80 μL (合計 100 μL) を各 well に添加し、1 時間インキュベートした (37°C、CO₂ 5%)。その後、DMEM (20%FBS) 100 μL を各 well に加え、37°C、CO₂ 5% で 24 時間 (±3 時間) 培養した。各 well の培地をランニング培地に交換し、37°C、CO₂ なしのインキュベーターで 1 時間培養した後、細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies, Santa Clara, US) を用いて MITO-Porter(CoQ₁₀) 投与後のミトコンドリア呼吸能測定を行った。測定結果の OCR は、細胞数に応じて OCR/cells に補正した。

3-3 結果

3-3-1 免疫染色による抽出細胞の確認

骨格筋細胞内に発現するデスミンを標的とする抗デスミン抗体を用いて抽出した細胞から継代した細胞が骨格筋細胞であることを確認した。ポジティブコントロールとして正常ラット骨格筋細胞も同時に染色した。DMD, WT細胞ともに抗デスミン抗体で繊維状の染色がみられ細胞内にデスミンが存在することが確認できた。以上より抽出、培養した細胞は骨格筋が含まれることが確認された。(図 3-6)

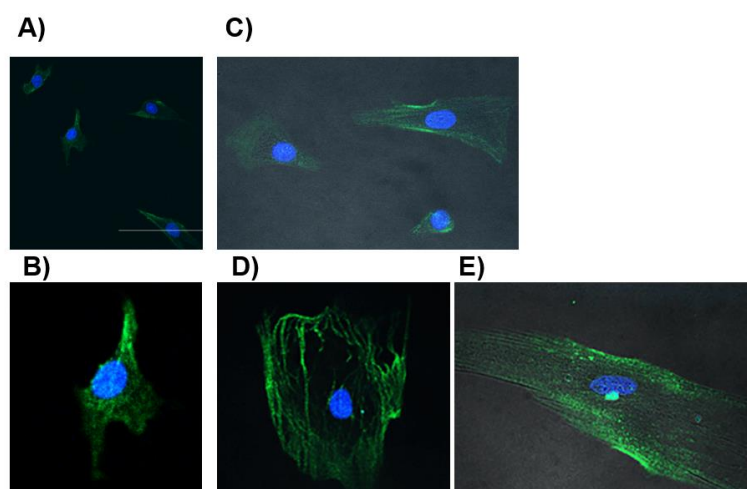


図 3-6 DMD, WT細胞の免疫染色

A)B)骨格筋細胞(ポジティブコントロール) C)D) DMD 骨格筋細胞より単離,継代した細胞 E) WT 骨格筋細胞より抽出,継代した細胞

青:核 (Hoechst33342[®]), 緑: 抗デスミン抗体(Alexa Fluor 488)

3-3-2 フローサイトメトリーを用いた抽出細胞評価

単離、培養した細胞における骨格筋細胞であることを確認するためフローサイトメトリーを用いて評価した。WT、DMD細胞ともにフローサイトメトリーを用いた蛍光度測定において高値を認めるがデスミンを持たない HeLa 細胞において蛍光度は低値であった。以上より抽出し培養した細胞は骨格筋細胞であることが示された。

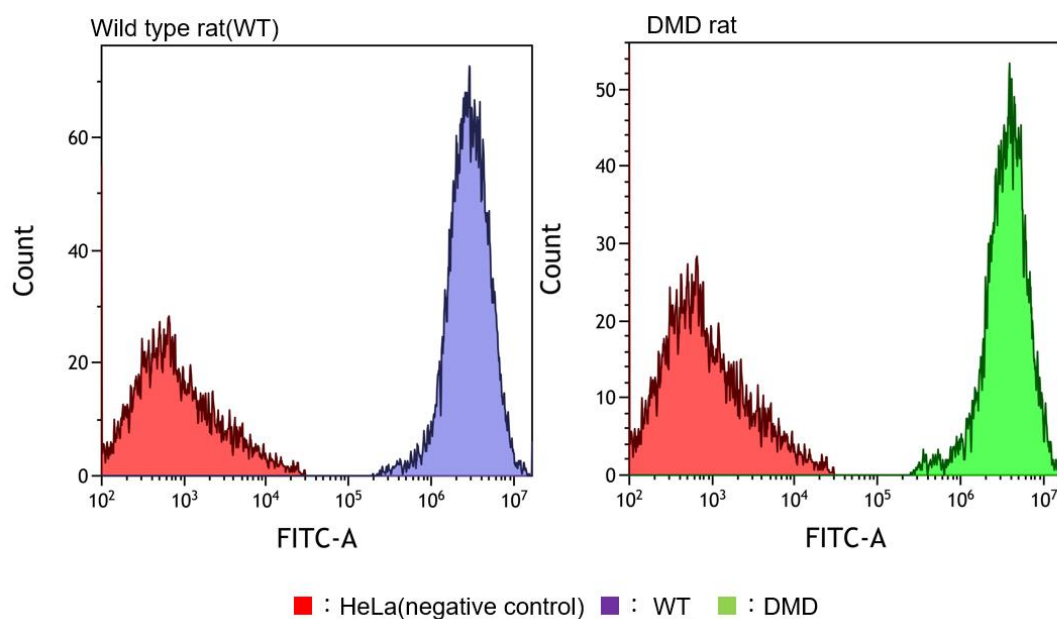


図 3-7 デスミン抗体を用いた抽出細胞特性評価

WT、DMD 細胞ともにフローサイトメトリーを用いた蛍光度測定において高値を認めるがデスミンを持たない HeLa 細胞において蛍光度は低値であった。

3-3-3 DMD 骨格筋単離細胞のミトコンドリア機能評価

細胞内での ATP 産生の際は酸化的リン酸化と解糖系に大別され、細胞種ごとに ATP 産生の比率は異なる。薬剤送達によるミトコンドリア機能強化による ATP 産生は酸化的リン酸化による ATP 産生の割合に依存する可能性があることから DMD 骨格筋細胞における ATP 産生の場の確認と WT と比較した産生能低下の程度検討を行った。検討は細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費速度 (OCR) を測定することにより実施した。DMD 骨格筋において、OCR は酸化的リン酸化:解糖系は 8:2 でありこれは ATP 産生の 80 % を酸化的リン酸化で行い、20 % を解糖系で産生していることを示す。WT では酸化的リン酸化:解糖系は 9:1 であった (図 3-8)。細胞における ATP 産生比率は同一細胞種であれば基本的に同一となるが、疾患細胞である DMD 骨格筋細胞は比率に変化が生じた。実際の計測値において解糖系 OCR は両群で差を認めなかった。酸化的リン酸化 OCR は WT と比較して DMD 骨格筋細胞において有意に減少した (図 3-9)。

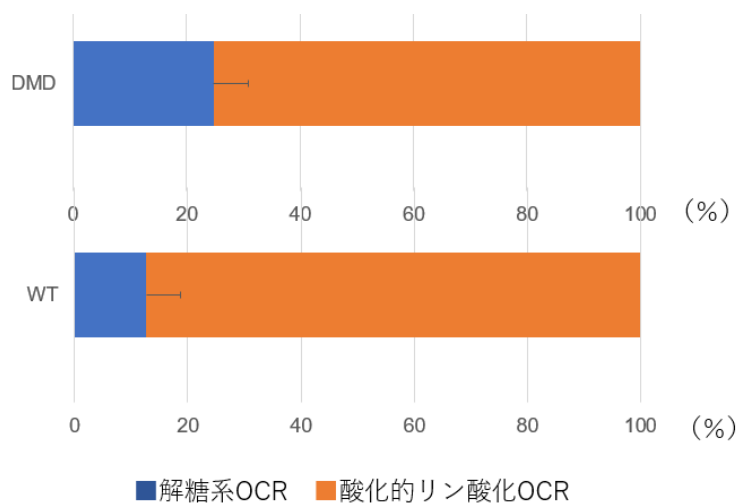


図 3-8 DMD、WT における解糖系、酸化的リン酸化による OCR 比率の変化
 DMD,WT 骨格筋細胞における解糖系、酸化的リン酸化の OCR の割合を示した。一般的に同一細胞種であれば同一の OCR 比を示すが、DMD 骨格筋細胞においては比率に変化を認めた。(N=3)

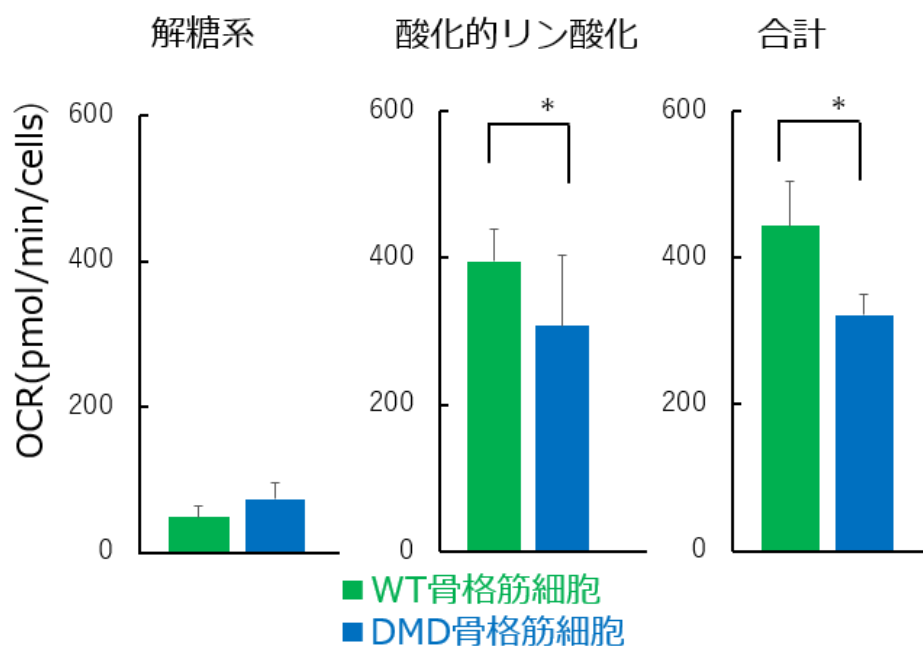


図 3-9 DMD,WT 骨格筋における酸素消費速度(OCR)
 DMD,WT 骨格筋細胞において解糖系、酸化的リン酸化それぞれで測定された OCR を示す。酸化的リン酸化 OCR は WT と比較して DMD 骨格筋細胞で有意に減少した。OCR 全体量も DMD 骨格筋細胞で減少した。(N=3) ※: $p < 0.05$

3-3-4 MITO-Porter のDMD骨格筋細胞内取り込み評価

CoQ₁₀を含有した MITO-Porter の取り込みを確認するために、DiI で蛍光標識した MITO-Porter を用いて、DMD骨格筋細胞への MITO-Porter の細胞内取り込み量を評価した。細胞内導入能はフローサイトメーターを用いて測定を行った。MITO-Porter 添加後、1、24 時間の取り込み量を評価した。1 時間値においては血清存在下、非存在下で測定を行った。添加 1、24 時間後に測定した取り込み量は図 3-10 に示す。DMD骨格筋細胞において MITO-Porter のDMD骨格筋細胞内取り込みを確認した。

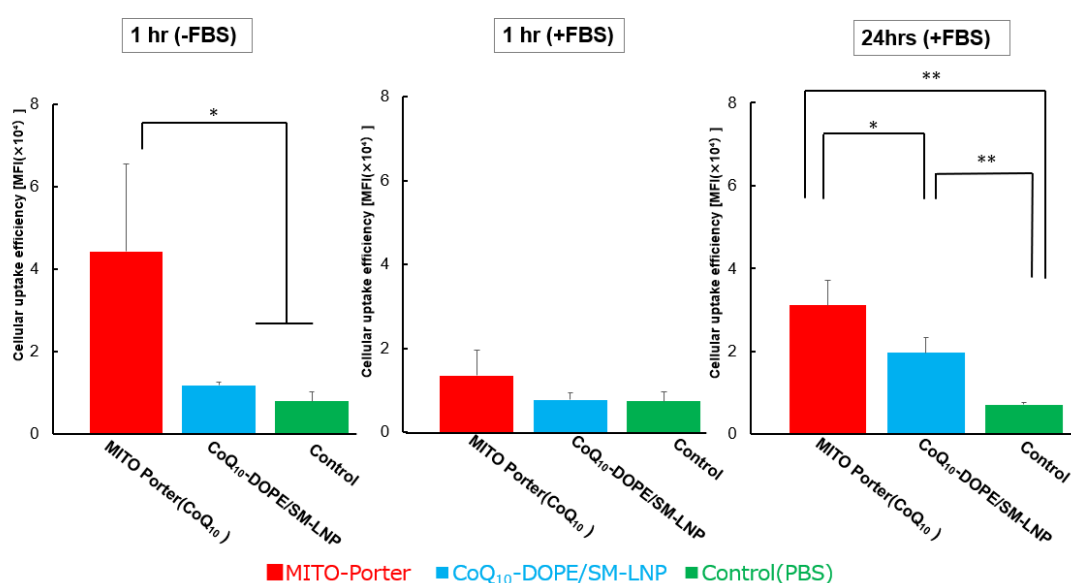


図 3-10 DMD 骨格筋細胞の MITO-Porter 細胞内導入能評価

添加後 1 時間値は FBS(+),FBS(-)それぞれでの細胞内取り込み量を測定した。24 時間値は FBS(+のみ)測定した。測定はフローサイトメトリーを用いて DiI で標識した MITO-Porter または CoQ₁₀-DOPE/SM/LNP を取り込んだ細胞の 1 時間後,24 時間後の蛍光強度を測定した。(N=3-4) 測定値は平均 ±SDで示した。統計は nrANOVA と SNK test を用いた。**: $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (N=3)

3-3-5 ナノ粒子を用いた DMD 骨格筋細胞ミトコンドリアへの CoQ₁₀送達によるミトコンドリア呼吸能評価

DMD 骨格筋細胞ミトコンドリアへの CoQ₁₀送達によるミトコンドリア呼吸能への影響を評価した。DMD 骨格筋細胞に対して MITO-Porter(CoQ₁₀), Empty MITO-Porter, PBS を添加し 24 時間後のミトコンドリア呼吸能の測定を行った。MITO-Porter の添加、細胞への取り込みは全て血清存在下で行った。投与した

MITO-Porter(CoQ₁₀), Empty MITO-Porter は蛍光強度により粒子濃度を測定し粒子濃度は同一になるように調整し、また各施行回でも粒子濃度は一定にした MITO-Porter を用いて CoQ₁₀を送達した群において FCCP を用いてミトコンドリアを賦活化した最大呼吸能と予備呼吸能で他群と比較してミトコンドリア呼吸能 (OCR) の上昇を認めた。(図 3-11,図 3-12A)各計測呼吸能の測定詳細については図 3-12B で示す。上記結果により、MITO-Porter を用いて DMD 骨格筋ミトコンドリアへ CoQ₁₀を送達することによりミトコンドリア呼吸能 (OCR) が上昇する可能性が示唆された。(図 3-11,12)

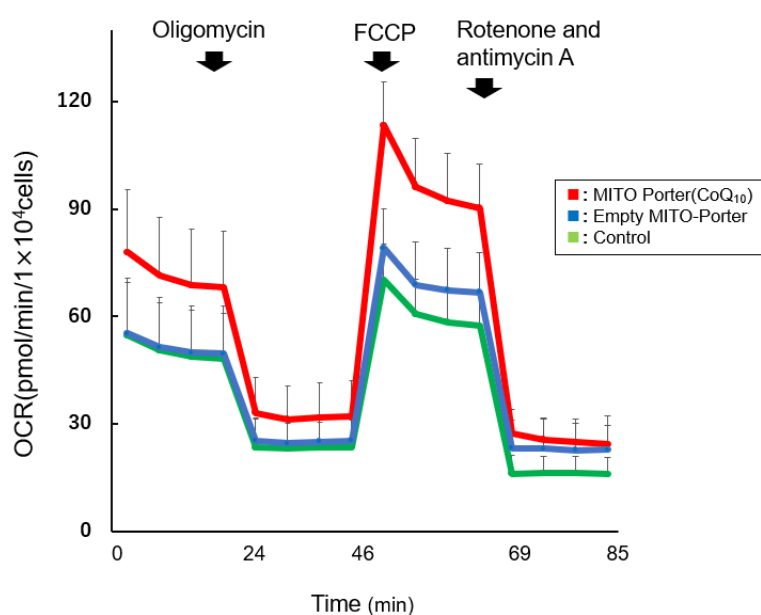


図 3-11 DMD 骨格筋細胞への CoQ₁₀送達ミトコンドリア呼吸能評価

A) MITO-Porter(CoQ₁₀)(赤)と Empty MITO-Porter(青)と PBS(緑)でそれぞれ添加後 24 時間後のミトコンドリア呼吸能を Seahorse XFp Analyzer で評価した。酸素消費率 (OCR) は細胞数で補正して算出した。データは平均値±SD を示す (N= 4)。

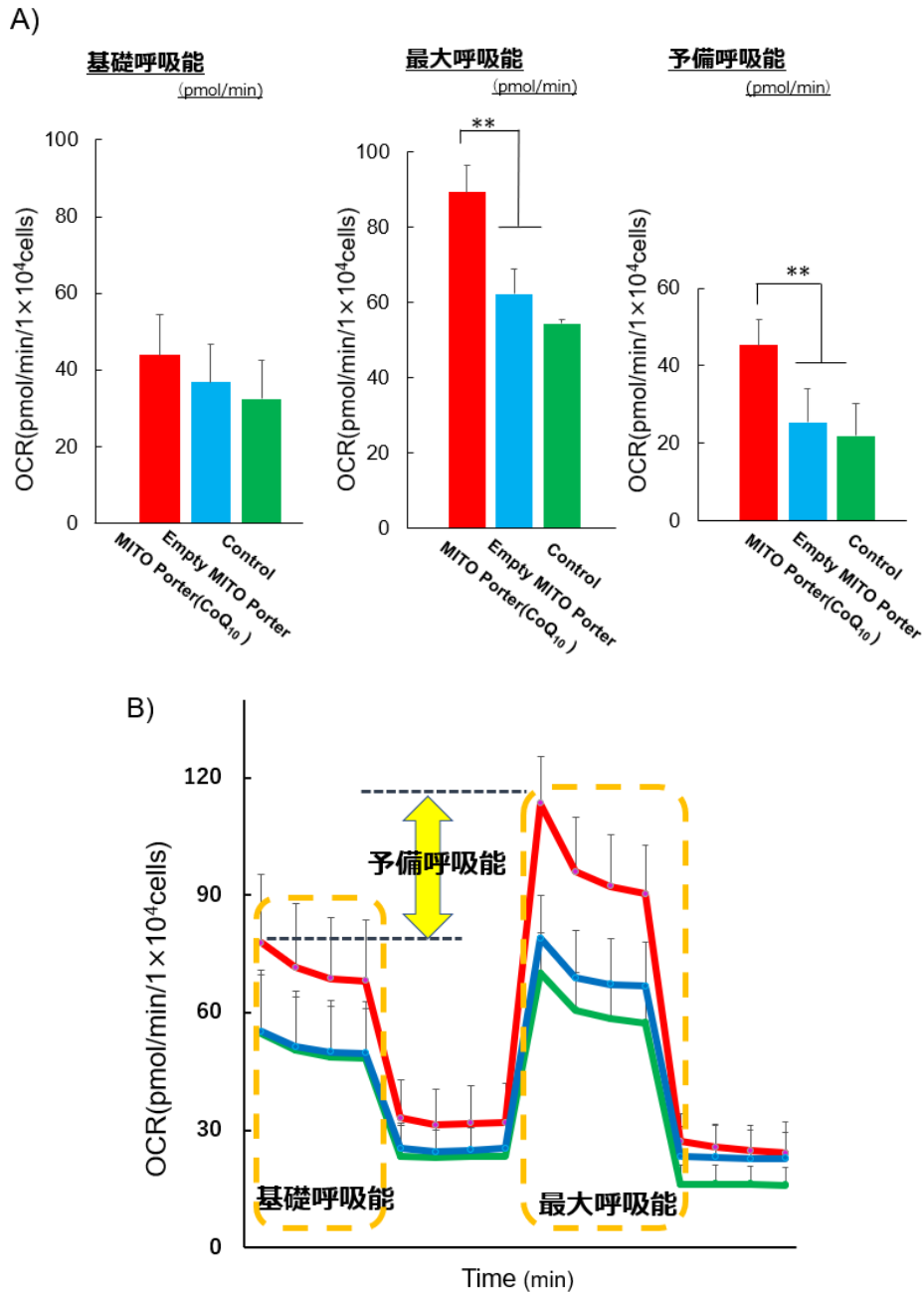


図 3-12 DMD 骨格筋細胞に対する CoQ₁₀ 送達による基礎呼吸能と最大呼吸能、予備呼吸能

OCR は、各細胞数で補正し算出した。

A) a)基礎呼吸能 b)最大呼吸能 c) 予備呼吸能

データは平均値±SD を示す (N = 4)。有意差は nrANOVA と SNK 検定により算出した。(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

B) 各測定項目詳細

図 3-11 における基礎呼吸能、最大呼吸能、予備呼吸能を概略図として示した。

3-4 考察

緒言でも述べたようにミトコンドリアの形態異常や機能低下とDMDの関連性は多くある(表 3-1)がその一方でミトコンドリアをターゲットとした治療報告は少ない。ミトコンドリア異常の報告はほとんどが mdx mice を使用した研究であり本研究で用いたDMDモデルラットについては、組織学的な骨格筋や心筋の線維化や臨床経過は報告されている(Nakamura et al. 2014) (Sugihara et al. 2020)がミトコンドリア機能についての評価は本研究で初めて実施した。本ラットは Wistar-Imamichi 系ラットに CRISPR/Cas システムを利用してジストロフィン遺伝子をノックアウトしたラットでありその他の部位は遺伝子改変されていない。このことから本ラットのミトコンドリア機能低下はジストロフィンタンパク質の欠失に起因すると考える。

本研究では、使用するDMDラット骨格筋細胞のミトコンドリア機能低下を確認したのち、そのミトコンドリアへの治療介入としてミトコンドリアへの CoQ₁₀ の送達を試みミトコンドリア呼吸能における最大呼吸能および予備呼吸能について有意な上昇を認めた。また、統計学的な有意差は認めないものの基礎呼吸能においても上昇傾向を認めた。

予備呼吸能は平常時のミトコンドリア OCR である基礎呼吸能と FCCP を用いて最大限に賦活化した時の OCR である最大呼吸能の差で定義される。予備呼吸能は第1章正常ラット骨格筋細胞(L6)においても測定したが各群で有意差は認めなかった。その一因としては健常細胞と疾患細胞における基礎呼吸能の差が挙げられる。DMD 骨格筋細胞におけるミトコンドリア呼吸能低下については本章で述べた通りであり(図 3-9)基礎呼吸能の差が予備呼吸能の上昇幅としてより多く生じたと考える。

DMD 骨格筋においてはジストロフィンタンパク質の欠損により細胞の易損傷性(Moser 1984)や修復遅延(Vila et al. 2017)が生じることがすでに報告されており、損傷とそれに伴う修復のため細胞は常に高ストレス下にある。生体内における過損傷と過修復による細胞の高ストレス状態が FCCP 負荷に類すると仮定すると高ストレス下である最大呼吸能におけるミトコンドリア呼吸能上昇は DMD の生体内により近い環境下での治療介入評価であるといえる。さらにジストロフィンタンパク質は細胞膜の安定性にも関連すると報告(Turner et al. 1988)されており今回用いた脂質ナノ粒子である MITO-Porter の透過性が正常細胞と比較し変化している可能性も考慮される。

DMDにおけるミトコンドリアへの介入による治療の可能性は前述のとおり既報があり(表 3-1,3-2)治療方法の開発が期待されるが一方でミトコンドリアへの薬

物送達は薬剤の細胞内取り込みに加え細胞内動態に依存するため難易度が高い。本研究は DMD 骨格筋細胞ミトコンドリアへの直接的な CoQ₁₀ 送達による治療介入の可能性を示した初の報告である。

3-5 第3章まとめ

本章では DMD モデルラットから摘出、培養した骨格筋細胞を用いて DMD 骨格筋細胞におけるミトコンドリア呼吸能の低下を示した。さらにミトコンドリア呼吸能低下に対して、ミトコンドリアへの薬物輸送に特化した脂質ナノ粒子を用いて電子伝達系の補酵素でもあり、ミトコンドリア活性化物質である CoQ₁₀ を DMD 骨格筋細胞に送達することによりミトコンドリア呼吸能上昇させた。以上より DMD 骨格筋細胞ミトコンドリアに対する薬物送達による DMD 治療介入の可能性が示唆された。

結語

本研究から以下の成果を得た。

・正常ラット骨格筋細胞(L6)においてミトコンドリアへの薬物送達を可能にした脂質ナノ粒子である MITO-Porter を用いてミトコンドリア活性化物質であるコエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) を骨格筋細胞ミトコンドリアへ送達しミトコンドリア呼吸能の上昇を示した。また CoQ₁₀ が影響する代謝経路を調べるためメタボローム解析を行い、TCA サイクルおよび抗酸化関連経路の活性化を確認した。

・正常ラット心筋細胞(H9C2) において脂質ナノ粒子である MITO-Porter を用いてミトコンドリア活性化物質である CoQ₁₀ を骨格筋細胞ミトコンドリアへ送達しミトコンドリア呼吸能の上昇を示した。また CoQ₁₀ の至適送達量についても検討した。

・デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)モデルラットから単離培養した骨格筋細胞のミトコンドリア呼吸能低下を示した。

・DMD モデルラット骨格筋細胞ミトコンドリアに CoQ₁₀ を送達し、DMD 骨格筋細胞のミトコンドリア呼吸能改善を示した。

本研究では現在治療法が確立されていない DMD におけるミトコンドリア機能低下に着目し、ミトコンドリア活性化による DMD の進行抑制療法の可能性について検討した。骨格筋、心筋ミトコンドリアへの介入の可能性検討のため、正常骨格筋細胞、心筋細胞においてミトコンドリアへの薬物送達を行いミトコンドリア呼吸能が上昇することを示した。DMD モデルラットから単離培養した骨格筋細胞を用いて、*In vitro* における DMD 骨格筋細胞のミトコンドリア機能低下を示し、ミトコンドリアへの薬物送達によるミトコンドリア呼吸能の改善を示唆した。

本研究の結果は、DMD 進行遅延の治療ターゲットとしてのミトコンドリアへの介入の可能性を示した。今後、DMD モデルラット心筋細胞へのミトコンドリア機能介入を行わずに *in vitro* での DMD 心筋ミトコンドリアへの治療介入への検討と骨格筋、心筋に対する *in vivo* での治療介入方法を検討する。*In vivo* への課題としては、心筋、骨格筋への効率的な移行を実現が必要である。そのため心筋、骨格筋標

的抗体などを用いた組織への標的化能を持たせる戦略が必要でありこれは今後の検討課題である。

DMD は遺伝疾患であり根治治療は遺伝子治療が主となると考えるがミトコンドリアへの介入を含めた進行遅延療法を遺伝子治療と組み合わせて実施することは患者の生命予後、QOL 改善に大きく貢献すると考え今後も本研究をさらに発展させたい所存である。

謝辞

本研究を行う機会を与えて下さった北海道大学医学部小児科学教室 真部淳教授に心より感謝いたします。

本研究を行うきっかけ、機会を与えて下さり臨床での多くのご指導と研究の面白さの両方を教えていただいた北海道大学医学部小児科学教室 武田充人先生に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり基礎研究を一からご教示、ご指導いただき研究の面白さや大変さを教えていただいた北海道大学薬学部薬剤設計学研究室 山田勇磨教授に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたりご指導いただいた北海道大学薬学部未来創剤学研究室 原島秀吉卓越教授、基礎研究のいろはを教えてください一緒に切磋琢磨した北海道大学薬学部薬剤分子設計学教室の皆様にご心より感謝いたします。

本研究に使用した DMD モデルラットを委譲いただいた東京大学農学部獣医生理学研究室山内啓太郎教授に心より感謝いたします。

利益相反：

開示すべき利益相反はありません

引用文献：

Abe, J., Y. Yamada, A. Takeda, and H. Harashima. 2018. 'Cardiac progenitor cells activated by mitochondrial delivery of resveratrol enhance the survival of a doxorubicin-induced cardiomyopathy mouse model via the mitochondrial activation of a damaged myocardium', *J Control Release*, 269: 177-88.

Anastasiou, D., G. Pouligiannis, J. M. Asara, M. B. Boxer, J. K. Jiang, M. Shen, G. Bellinger, A. T. Sasaki, J. W. Locasale, D. S. Auld, C. J. Thomas, M. G. Vander Heiden, and L. C. Cantley. 2011. 'Inhibition of Pyruvate Kinase M2 by Reactive Oxygen Species Contributes to Cellular Antioxidant Responses', *Science*, 334: 1278-83.

Carlsson, L., J. C. Clarke, C. Yen, F. Gregoire, T. Albery, M. Billger, A. C. Egnell, L. M. Gan, K. Jennbacken, E. Johansson, G. Linhardt, S. Martinsson, M. W. Sadiq, N. Witman, Q. D. Wang, C. H. Chen, Y. P. Wang, S. Lin, B. Ticho, P. C. H. Hsieh, K. R. Chien, and R. Fritsche-Danielson. 2018. 'Biocompatible, Purified VEGF-A mRNA Improves Cardiac Function after Intracardiac Injection 1 Week Post-myocardial Infarction in Swine', *Mol Ther Methods Clin Dev*, 9: 330-46.

Cheng, K., D. Shen, M. T. Hensley, R. Middleton, B. Sun, W. Liu, G. De Couto, and E. Marban. 2014. 'Magnetic antibody-linked nanomatchmakers for therapeutic cell targeting', *Nat Commun*, 5: 4880.

Dirks, M. L., B. T. Wall, B. van de Valk, T. M. Holloway, G. P. Holloway, A. Chabowski, G. H. Goossens, and L. J. van Loon. 2016. 'One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation', *Diabetes*, 65: 2862-75.

Ernster, L., and P. Forsmark-Andree. 1993. 'Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms', *Clin Investig*, 71: S60-5.

Forman, H. J., H. Q. Zhang, and A. Rinna. 2009. 'Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis', *Molecular Aspects of Medicine*, 30: 1-12.

Ge, Y., M. P. Molloy, J. S. Chamberlain, and P. C. Andrews. 2003. 'Proteomic analysis of mdx skeletal muscle: Great reduction of adenylate kinase 1 expression and enzymatic activity', *Proteomics*, 3: 1895-903.

Herbst, A., C. C. Lee, A. R. Vandiver, J. M. Aiken, D. McKenzie, A. Hoang, D. Allison, N. Liu, and J. Wanagat. 2021. 'Mitochondrial DNA deletion mutations increase exponentially with age in human skeletal muscle', *Aging Clin Exp Res*, 33: 1811-20.

Hibino, M., Y. Yamada, N. Fujishita, Y. Sato, M. Maeki, M. Tokeshi, and H. Harashima. 2019. 'The Use of a Microfluidic Device to Encapsulate a Poorly Water-Soluble Drug CoQ(10) in Lipid Nanoparticles and an Attempt to Regulate Intracellular Trafficking to Reach Mitochondria', *J Pharm Sci*, 108: 2668-76.

Hibino, M., M. Maeki, M. Tokeshi, Y. Ishitsuka, H. Harashima, and Y. Yamada. 2023. 'A system that delivers an antioxidant to mitochondria for the treatment of drug-induced liver injury', *Scientific Reports*, 13.

Holloway, G. P., A. M. Holwerda, P. M. Miotto, M. L. Dirks, L. B. Verdijk, and L. J. C. van Loon. 2018. 'Age-Associated Impairments in Mitochondrial ADP Sensitivity Contribute to Redox Stress in Senescent Human Skeletal Muscle', *Cell Rep*, 22: 2837-48.

Hughes, M. C., S. V. Ramos, P. C. Turnbull, I. A. Rebalka, A. Cao, C. M. F. Monaco, N. E. Varah, B. A. Edgett, J. S. Huber, P. Tadi, L. J. Delfinis, U. Schlattner, J. A. Simpson, T. J. Hawke, and C. G. R. Perry. 2019. 'Early myopathy in Duchenne muscular dystrophy is associated with elevated mitochondrial H₂O₂ emission during impaired oxidative phosphorylation', *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 10: 643-61.

Hughes, M. C., S. V. Ramos, P. C. Turnbull, B. A. Edgett, J. S. Huber, N. Polidovitch, U. Schlattner, P. H. Backx, J. A. Simpson, and C. G. R. Perry. 2020. 'Impairments in left ventricular mitochondrial bioenergetics precede overt cardiac dysfunction and remodelling in Duchenne muscular dystrophy', *J Physiol*, 598: 1377-92.

Kuznetsov, A. V., K. Winkler, F. R. Wiedemann, P. von Bossanyi, K. Dietzmann, and W. S. Kunz. 1998. 'Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse', *Mol Cell Biochem*, 183: 87-96.

Lomis, N., Z. K. Sarfaraz, A. Alruwaih, S. Westfall, D. Shum-Tim, and S. Prakash. 2021. 'Albumin Nanoparticle Formulation for Heart-Targeted Drug Delivery: In Vivo Assessment of Congestive Heart Failure', *Pharmaceuticals (Basel)*, 14.

Maeki, M., N. Kimura, Y. Sato, H. Harashima, and M. Tokeshi. 2018. 'Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems', *Adv Drug Deliv Rev*, 128: 84-100.

Sasaki, D., J. Abe, A. Takeda, H. Harashima, and Y. Yamada. 2022. 'Transplantation of MITO cells, mitochondria activated cardiac progenitor cells, to the ischemic myocardium of mouse enhances the therapeutic effect', *Sci Rep*, 12: 4344.

Short, K. R., M. L. Bigelow, J. Kahl, R. Singh, J. Coenen-Schimke, S. Raghavakaimal, and K. S. Nair. 2005. 'Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 5618-23.

Standley, R. A., G. Distefano, M. B. Trevino, E. Chen, N. R. Narain, B. Greenwood, G. Kondakci, V. V. Tolstikov, M. A. Kiebish, G. Yu, F. Qi, D. P. Kelly, R. B. Vega, P. M. Coen, and B. H. Goodpaster. 2020. 'Skeletal Muscle Energetics and Mitochondrial Function Are Impaired Following 10 Days of Bed Rest in Older Adults', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 75: 1744-53.

Tang, J., T. Su, K. Huang, P. U. Dinh, Z. Wang, A. Vandergriff, M. T. Hensley, J. Cores, T. Allen, T. Li, E. Sproul, E. Mihalko, L. J. Lobo, L. Ruterbories, A. Lynch, A. Brown, T. G. Caranasos, D. Shen, G. A. Stouffer, Z. Gu, J. Zhang, and K. Cheng. 2018. 'Targeted repair of heart injury by stem cells fused with platelet nanovesicles', *Nat Biomed Eng*, 2: 17-26.

Tonkonogi, M., M. Fernstrom, B. Walsh, L. L. Ji, O. Rooyackers, F. Hammarqvist, J. Wernerman, and K. Sahlin. 2003. 'Reduced oxidative power but unchanged antioxidative capacity in skeletal muscle from aged humans', *Pflugers Arch*, 446: 261-9.

Tsujioka, T., D. Sasaki, A. Takeda, H. Harashima, and Y. Yamada. 2021. 'Resveratrol-Encapsulated Mitochondria-Targeting Liposome Enhances Mitochondrial Respiratory Capacity in Myocardial Cells', *Int J Mol Sci*, 23.

Yamada, Y., H. Akita, H. Kamiya, K. Kogure, T. Yamamoto, Y. Shinohara, K. Yamashita, H. Kobayashi, H. Kikuchi, and H. Harashima. 2008. 'MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 423-32.

Yamada, Y., K. Nakamura, J. Abe, M. Hyodo, S. Haga, M. Ozaki, and H. Harashima. 2015. 'Mitochondrial delivery of Coenzyme Q10 via systemic administration using a MITO-Porter prevents ischemia/reperfusion injury in the mouse liver', *J Control Release*, 213: 86-95.

Yamada, Y., T. Ishimaru, K. Ikeda, and H. Harashima. 2022. 'Validation of the Mitochondrial Delivery of Vitamin B(1) to Enhance ATP Production Using SH-SY5Y Cells, a Model Neuroblast', *J Pharm Sci*, 111: 432-39.