



Title	心筋細胞のミトコンドリアを標的としたリボソームによる薬剤送達治療に関する研究
Author(s)	辻岡, 孝郎
Description	配架番号 : 2704
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14964号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14964
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85924
Type	doctoral thesis
File Information	TSUJIOKA_Takao.pdf



学 位 論 文

心筋細胞のミトコンドリアを標的としたリポソームによる薬剤送達治療に関する研究

(Studies on drug-encapsulating liposomal delivery therapy targeting
myocardial mitochondria)

2022年3月

北 海 道 大 学

辻 岡 孝 郎

学 位 論 文

心筋細胞のミトコンドリアを標的としたリポソームによる薬剤送達治療に関する研究

(Studies on drug-encapsulating liposomal delivery therapy targeting
myocardial mitochondria)

2022年3月

北 海 道 大 学

辻 岡 孝 郎

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	4 頁
緒言	5 頁
方法	7 頁
結果	15 頁
考察	20 頁
結論	22 頁
謝辞	23 頁
利益相反	24 頁
引用文献	25 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Takao Tsujioka, Daisuke Sasaki, Atsuhito Takeda, Hideyoshi Harashima, Yuma Yamada.
Resveratrol-encapsulated mitochondria-targeting liposome enhances mitochondrial respiratory capacity in myocardial cells.
Int. J. Mol. Sci., 23 • 112, (2022)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 辻岡 孝郎, 山田 勇磨, 佐々木 大輔, 武田 充人, 原島 秀吉
心筋ミトコンドリアを標的としたリポソーム製剤の開発研究
第 57 回日本小児循環器学会学術集会
2021 年 7 月 9-11 日・奈良県コンベンションセンター（ハイブリッド開催）
2. 辻岡 孝郎, 山田 勇磨, 佐々木 大輔, 武田 充人, 原島 秀吉
心筋ミトコンドリア標的型リポソームを用いたドキソルビシン心筋傷害軽減の試み
第 4 回日本腫瘍循環器学会学術集会
2021 年 10 月 12-14 日・WEB 開催

要 旨

【背景と目的】 ドラッグ・デリバリー・システムの1つであるリポソームは、心血管疾患の診断・治療技術にも応用されており、臨床応用を目指して様々な前臨床試験が行われている。北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室のYamadaらは、独自のリポソームを開発して細胞ミトコンドリアを標的とした治療について研究している。著者は、その1つである Multifunctional envelope-type nano device for pancreatic β cells (β -MEND) を利用し、抗酸化作用や心保護効果が報告されている天然ポリフェノール類のレスベラトロール (Resveratrol : RES) を封入して心筋ミトコンドリアへ送達することでミトコンドリア呼吸能を賦活できるかどうかについて検証した。

【材料と方法】 β -MEND は単純水和法で調製し、Egg yolk phosphatidylcholine (EPC)、 3β -[N-(N', N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol (DC-Chol)、Sphingomyelin (SM) という3種類の脂質を4:3:3のモル比率でガラス管内に混合し、さらに RES も添加し、溶媒を除去して形成される脂質膜を、2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid (HEPES) の緩衝液で水和することで得られた。心筋細胞モデルには、ラット心筋芽細胞である H9c2 細胞を使用した。 β -MEND の細胞内取込みについては、蛍光染色した β -MEND を H9c2 細胞と共培養した後に回収して、Fluorescence-activated cell sorter (FACS) で検証し、蛍光強度と細胞数の積分値である Mean fluorescent intensity (MFI) として計測した。細胞内に取込まれた β -MEND の細胞内局在を確認するためにミトコンドリアへの染色も追加し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Confocal laser scanning microscope : CLSM) で観察した。 β -MEND の細胞毒性については Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を用いて検証することとし、様々な濃度の β -MEND と共培養後の細胞に同試薬を添加し、その後 440 nm と 650 nm の吸光度の差を細胞生存能として計測した。 β -MEND 投与による細胞ミトコンドリア呼吸能の変化については、細胞を β -MEND と共培養した後に、Seahorse XF HS Mini Analyzer で酸素消費量 (Oxygen consumption rate : OCR) を計測した。

【結果】 以下、数値をすべて平均 $\pm$ 標準偏差で表す。RES を封入した β -MEND (β -MEND (RES)) を単純水和法で調製したところ、粒子径 79.7 ± 10.2 nm、ゼータ電位 37.7 ± 8.6 mV と、100 nm 未満の安定した粒子径で表面が正に帯電していた。FACS で計測した MFI は、未処理群が $36,426.55 \pm 1,626.27$ だったのに対し、 β -MEND (RES) 投与群では $2,273,007.42 \pm 730,514.48$ と有意に上昇していた ($p < 0.01$)。CLSM での観察では、細胞内に取込まれた β -MEND (RES) の一部がミトコンドリアと共局在していることを確認できた。 β -MEND (RES) の細胞毒性については、未処理群やリポソームに封入なかった RES のみ (naked RES) を投与した群と比較して、RES 相当で 5、10、20、30 μ

M の濃度では、試薬添加後の吸光度は有意に低下せず、 β -MEND (RES) によって細胞生存能は有意に低下しないと解釈できた。以上までの β -MEND の物性、細胞内取込み、ミトコンドリアとの共局在、細胞毒性については、 β -MEND (RES) だけでなく、RES を封入していない β -MEND (Empty β -MEND) でも同等の結果が得られ、両者の間で有意差は見られなかった。ミトコンドリア呼吸能の指標である OCR については、未処理群や naked RES 群と比較して β -MEND (RES) 群では、基礎呼吸能 (Basal respiration) は $114.1 \pm 21.0\%$ of Control と有意な上昇を認めなかったが、最大呼吸能を表す Maximal respiration や Spare respiratory capacity はそれぞれ $233.6 \pm 43.9\%$ of Control、 $390.6 \pm 83.8\%$ of Control と有意に上昇した ($p < 0.01$)。

【考察】 β -MEND は、心筋細胞内に効率的に取り込まれた後にミトコンドリアまで到達し、封入していた RES がミトコンドリア呼吸能を賦活化した。また、細胞毒性を認めなかった。その分子学的な作用機序としては、サーチュイン 3 の活性化による ATP 合成酵素やカルジオリピンの機能向上などが知られている。Seahorse XF Analyzer シリーズでの検討で、基礎呼吸能は変化せず最大呼吸能だけが上昇したという現象についてもいくつか報告があるが、その機序ははっきりしていない。最大呼吸能の上昇は、その細胞がストレスに晒された際に産生できるエネルギーの予備能を示していると報告されており、ミトコンドリア呼吸能を予め強化しておくことで、様々な病態による細胞傷害を軽減しうる可能性が考えられた。

【結語】 本論文は、心筋細胞のミトコンドリアを標的とした独自のリポソームを利用して、内部に封入した RES をミトコンドリアまで送達することでその呼吸能が賦活されることを Seahorse XF Analyzer シリーズで検証した、初めての報告である。臨床応用に向けて、検討しなければならない課題は多々あるが、本薬剤は、心筋を治療しうる新規のリポソーム製剤の候補となり得る。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ANOVA	Analysis of variation
CLSM	Confocal laser scanning microscope
DC-Chol	3 β -[N-(N' , N' -dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol
DDS	Drug delivery system
DiI	1, 1' -dioctadecyl-3, 3, 3' , 3' -tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium High glucose
DMEM (+)	DMEM including FBS
DMEM (-)	DMEM without FBS
EPC	Egg yolk phosphatidylcholine
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FBS	Fetal bovine serum
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
HEPES	2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid
LP	Liposome
MFI	Mean fluorescent intensity
MTDR	MitoTracker Deep Red
NBD-DOPE	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-YL)-dioleoyl-phosphatidyl-ethanolamine
OCR	Oxygen consumption rate
PBS (-)	Phosphate-buffered saline without calcium chloride
PDI	Polydispersity index
RES	Resveratrol
SM	Sphingomyelin
SNK test	Student-Newman-Keuls test
β -MEND	Multifunctional envelope-type nano device for pancreatic β cells
β -MEND (RES)	β -MEND encapsulating RES

緒 言

ドラッグ・デリバリー・システム (Drug delivery system ; DDS) は、標的の細胞や組織へ治療分子を効率よく送達させるための技術で、治療分子の生体適合性や生体内利用効率の向上、治療分子による副作用の軽減などが期待される (Pala et al., 2020)。このナノテクノロジーは、心血管疾患の診断・治療技術にも応用されており、治療応用の大部分は心筋虚血や虚血後再灌流傷害で研究されている (Saludas et al., 2018; Pala et al., 2020 ; Fan et al., 2020)。DDS 以外では、幹細胞、エクソソーム、成長因子、低分子干渉 RNA など有望な治療候補として報告されているが、いずれも臨床応用には至っておらず、DDS を利用した薬剤送達次世代の心筋治療薬の候補として優勢である (Saludas et al., 2018 ; Fan et al., 2020)。心筋への治療に応用されている DDS の中の1つであるリポソーム (Liposome : LP) は、治療分子をリン脂質の二重膜で覆っている構造で、心筋虚血再灌流傷害モデルの前臨床研究において有望な結果が得られている (Saludas et al., 2018 ; Pala et al., 2020 ; Fan et al., 2020)。近年、この疾患モデルの病態にミトコンドリアが密接に関連していることが解明されており (Hausenloy and Yellon, 2013)、実際に、細胞内のミトコンドリアを標的とした LP は同病態モデルにおいて有望であると報告され (Zhang C. X., et al. 2019 ; Cheng et al., 2019)、ほかの病態にも応用できるものと期待されている。

北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室の Yamada らは、細胞ミトコンドリア標的 LP である MITO-Porter を独自に開発し (Yamada et al., 2008 ; Yamada et al., 2020a ; Yamada et al., 2020b)、様々な治療分子や核酸などの細胞内ミトコンドリアへの薬剤送達 (Yamada et al., in press ; Yamada et al., 2019 ; Yamada et al., 2020c) とその治療効果 (Satrialdi et al., 2020 ; Satrialdi et al., in press) について報告している。しかし、これまでの検討において MITO-Porter は、心筋細胞モデルとして利用されるラット由来の心筋芽細胞株の H9c2 細胞のミトコンドリアへの送達効率が低いことがわかっている。その一方で、Yamada らは、膵 β 細胞のミトコンドリアを標的とした別の LP である Multifunctional envelope-type nano device for pancreatic β cells (β -MEND) を開発したが (Yamada et al., 2014)、最近になって、この LP が MITO-Porter よりも H9c2 細胞のミトコンドリアへの到達効率が良いことを発見し (Yamada et al., 2020d)、心筋細胞への LP 製剤による治療の研究に応用できると期待されている。

レスベラトロール (Resveratrol ; RES) は、スチルベン・ファミリーに属する天然ポリフェノール化合物の1つで、ヒトの研究において抗がん作用、抗酸化作用、抗炎症作用、心保護作用などが報告されており (Machado, Fernandez and Diaz., 2019)、

心筋傷害モデルの実験において心筋ミトコンドリアを標的とした治療での有効性も報告されている (Schwarz and Sack., 2008 ; Abe et al., 2018 ; Cheng et al., 2019 ; Zhou et al., 2020) 。

本研究では、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室の Yamada らが開発した β -MEND が、心筋細胞のミトコンドリアまで RES を効率よく送達でき、それによって心筋細胞のミトコンドリア機能を賦活できるかどうかを、心筋細胞モデルで検証した (図 1)。

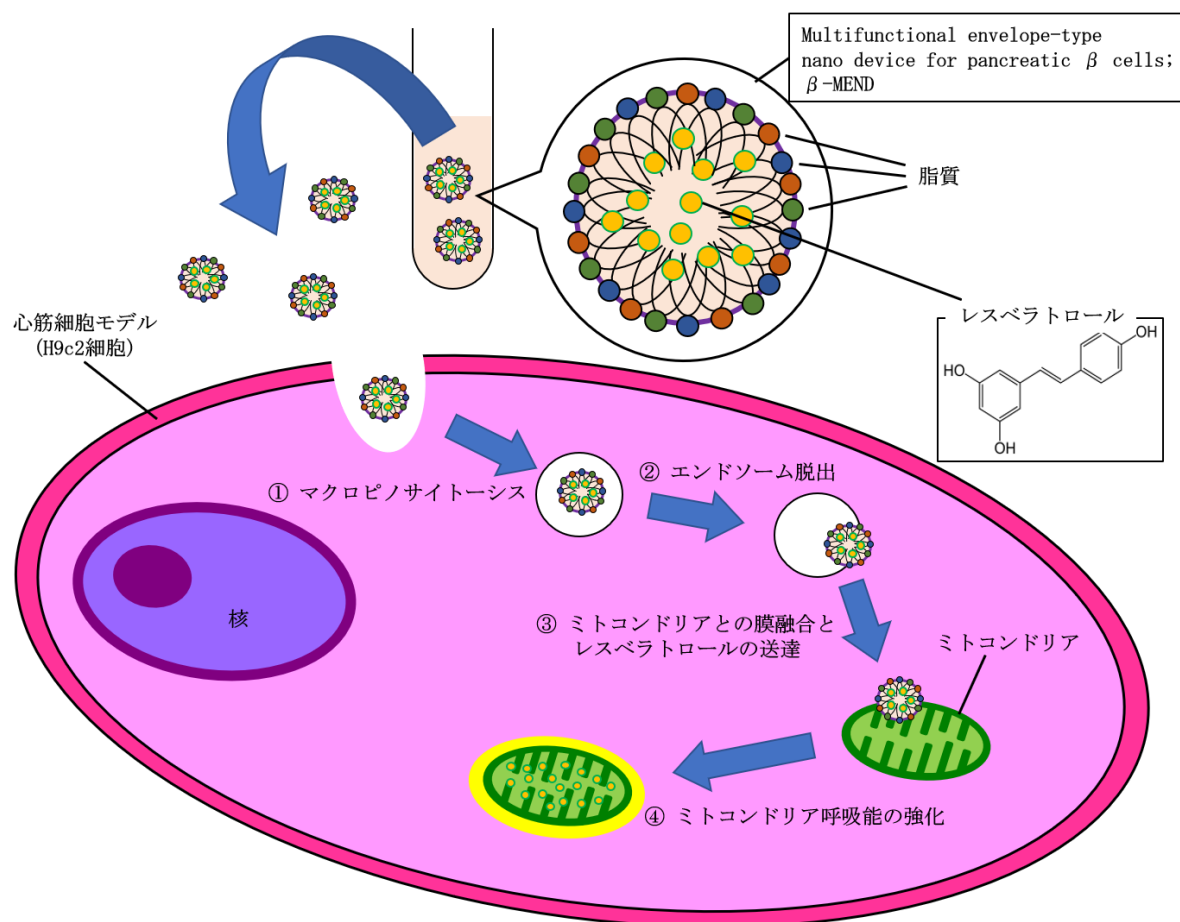


図 1. 本研究の概略図

単純水和法によって調製した β -MEND は、心筋細胞モデルである H9c2 細胞（ラット心筋芽細胞）と共培養することで、マクロピノサイトーシスによって細胞内に取込まれる。次に、エンドソーム脱出を経てミトコンドリアまで到達し、ミトコンドリア外膜と膜融合する。そして、内部に封入されていた RES がマトリックス内に放出され、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性が向上し、結果として細胞全体のミトコンドリア呼吸能が賦活される。

方 法

1. 実験試薬

- レスベラトロール： 富士フィルム和光純薬株式会社（大阪）
- Phosphate Buffered Salts タブレット： タカラバイオ株式会社（滋賀）
- Sphingomyelin (SM)： Avanti Polar Lipid, Inc. (Alabaster, AL)
- Egg yolk phosphatidylcholine (EPC)： 日油株式会社（東京）
- 3β -[N-(N', N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol (DC-Chol)：
Avanti Polar Lipid, Inc. (Alabaster, AL)
- N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)-dioleoyl-phosphatidyl-ethanolamine (NBD-DOPE)： Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL)
- 1,1'-dioctadecyl-3,3,3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)：
タカラバイオ株式会社（滋賀）
- MitoTracker Deep Red (MTDR)：
Thermo Fisher Scientific Life Sciences (Waltham, MA)
- エタノール： ナカライテスク株式会社（京都）
- 2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid (HEPES)：
株式会社 同仁化学研究所（熊本）
- Dulbecco's modified Eagle's medium with 4500 mg/L glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate, without Sodium Pyruvate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (DMEM)： シグマアルドリッチジャパン合同会社（東京）
- ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum; FBS)：
Thermo Fisher Scientific Life Sciences (Waltham, MA)
- ペニシリン-ストレプトマイシン (10,000 U/mL)：
Thermo Fisher Scientific Life Sciences (Waltham, MA)
- トリプシン 0.25% EDTA： Life Technologies (Carlsbad, CA)
- Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System： タカラバイオ株式会社（滋賀）
- Seahorse XF Cell Mito ストレステストキット：
Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA)
- Seahorse XF DMEM アッセイ培地パック, pH 7.4：
Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA)
- 乾燥凍結ウシ血清アルブミン粉末： シグマアルドリッチジャパン合同会社（東京）
- アジ化ナトリウム： ナカライテスク株式会社（京都）

- ・ヘパリンナトリウム： 富士フィルム和光純薬株式会社（大阪）

2. 実験細胞

- ・H9c2 細胞株： American Type Culture Collection (Manassas, VA)

3. 実験器材

- ・CELLSTAR 100×20mm 細胞培養シャーレ：
Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Austria)
- ・Corning 6 well cell culture multiple well plate, flat bottom with lid：
Corning Inc. (Corning, NY)
- ・96 well microplate, polystyrene, flat-bottom：
Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Austria)
- ・IWAKI glass base dish： AGC テクノグラス株式会社（静岡）
- ・Seahorse FluxPaks（センサーカートリッジ，細胞培養ミニプレート，キャリブレーション溶液）： Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA)
- ・ディスポーザブルメンブレンフィルターユニット DISMIC-25CS：
アドバンテック東洋株式会社（東京）
- ・1.5mL マイクロチューブ： Eppendorf (Hamburg, Germany)

4. 実験機器

- ・Seahorse XF HS Mini Analyzer： Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA)
- ・Zetasizer Nano ZS： Malvern Panalytical (Worcestershire, UK)
- ・卓上型超音波洗浄器 AU-25C： アイワ医科工業（東京）
- ・テーブルトップマイクロ冷却遠心機 Model 3520： 久保田商事株式会社（東京）
- ・マイクロ冷却遠心機 Model 3740： 久保田商事株式会社（東京）
- ・CO₂ インキュベーターMCO-170AICUV-PJ： PHC ホールディングス株式会社（東京）
- ・小型振盪恒温器 PIC-100S： アズワン株式会社（大阪）
- ・Vortex-Genie 2： Scientific Industry, Inc. (Bohemia, NY)
- ・真空デシケーター パチン錠式 V-12： 伸栄産業株式会社（大阪）
- ・卓上型冷却トラップ装置 ユニトラップ UT-1000： 東京理科器械株式会社（東京）
- ・CytoFLEX Flow Cytometer： Backman Coulter Inc. (Brea, CA)
- ・CellDrop Automated Cell Counters： DeNovix Inc. (Wilmington, DE)

- ・FLUOVIEW FV10i-LIV： オリンパス株式会社（東京）
- ・Varioskan LUX マルチモードマイクロプレートリーダー：
Thermo Fisher Scientific K.K.（東京）
- ・ポータブル型 pH メータ D-71： 株式会社堀場アドバンスドテクノ（京都）

5. 試薬調製

β -MEND を構成する脂質である EPC、DC-Chol、SM は、1 mM の濃度となるよう 100% エタノールに溶解し、 -20°C で保管していた。

RES は、5 mM の濃度となるよう 100% エタノールに溶解し、 -20°C で保管していた。

蛍光修飾に利用する試薬である NBD-DOPE と DiI は、1 mM の濃度となるよう 100% エタノールに溶解し、 -20°C で保管していた。

塩酸カルシウム非含有リン酸緩衝食塩水（Phosphate-buffered saline without calcium chloride ; PBS (-)）は、Phosphate Buffered Salts タブレット 10 錠を脱イオン蒸留水 1,000 mL で溶解し、 120°C 、20 分間でオートクレーブし、その後は 4°C で保管していた。

HEPES バッファーは、HEPES 粉末 238.21 mg に対して脱イオン蒸留水 100 mL で溶解して 10 mM の濃度とし、pH メータで pH を計測しながら NaOH を加えて pH 7.4 とした。最後にディスポーザブルメンブレンフィルターユニットを使用して濾過滅菌を行って、 4°C で保管していた。

蛍光活性化セルソーター（Fluorescence-activated cell sorter ; FACS）用のバッファー（FACS バッファー）は、PBS (-) 50 mL に対して、アジ化ナトリウム 50 mg と乾燥凍結ウシ血清アルブミン粉末 250 mg を添加して溶解、以後は 4°C で保管していた。

H9c2 細胞の培地には、DMEM 450 mL に対して、FBS 50 mL とペニシリン-ストレプトマイシン 5 mL を添加したものを使用した（DMEM (+)）。FBS を含まない培地を使用する場合には、DMEM 500 mL に対して、ペニシリン-ストレプトマイシン 5 mL だけを添加した（DMEM (-)）。いずれも 4°C で保管した。

Seahorse XF HS Mini Analyzer 専用のアッセイ培地は、Seahorse XF DMEM アッセイ培地パックを使用して、Seahorse XF DMEM アッセイ培地、pH7.4 が 9.4 mL に対して、1.0 M グルコース 247.5 μL 、100 mM ピルビン酸 125 μL 、200 mM グルタミン 200 μL を添加し、 4°C で保管した。

Seahorse XF Cell Mito ストレステストキットは、Oligomycin、Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP)、Rotenone/antimycin A の 3 種の試薬から構成されており、まずは、それぞれの薬剤ペレットを Seahorse XF HS Mini

Analyzer 専用アッセイ培地 252 μL 、288 μL 、216 μL で溶解した。さらに、Oligomycin 溶液と Rotenone/antimycin A 溶液それぞれ 40 μL を Seahorse XF HS Mini Analyzer 専用アッセイ培地 160 μL で希釈した。FCCP 溶液 60 μL は Seahorse XF HS Mini Analyzer 専用アッセイ培地 100 μL で希釈し、さらに 100 mM ピルビン酸 40 μL を添加した。それぞれがセンサーカートリッジ上のポートから well に滴下された後の well 内での濃度は、Oligomycin 1.0 μM 、FCCP 1.5 μM 、Rotenone/antimycin A 0.5 μM 、および、ピルビン酸は 3.0 mM となるように計算した。いずれも 4°C で保管した。

6. 実験方法

・単純水和法による β -MEND の調製

1 mM の濃度の EPC、DC-Chol、SM のエタノール溶液を、モル比率で 4 : 3 : 3 となるように、それぞれ 55.0 μL (55.0 nmol)、41.3 μL (41.3 nmol)、41.3 μL (41.3 nmol) ずつガラス管内に加えて、さらにクロロホルムを 125 μL 添加した。RES を添加する場合はさらに、5 mM の濃度の RES のエタノール溶液を 5 μL 添加した (25 nmol)。蛍光修飾する場合は、0.1 mM の濃度の NBD-DOPE または DiI のエタノール溶液を 6.9 μL 添加した (0.69 nmol、脂質の合計の 0.5 mol%)。これらの混合溶液が入ったガラス管を、真空デシケーターと卓上型冷却トラップ装置を使用して 2 時間以上かけて有機溶媒を除去したのちに、10 mM HEPES バッファー (pH 7.4) を 250 μL ずつ添加して、室温下で 15 分間以上静置した。その後、卓上型超音波洗浄器で 60 秒間以上超音波処理した後に、さらに 15 分間以上室温下で静置して回収した (図 2)。

調製した β -MEND の物性は、Zetasizer Nano ZS で測定した。回収したサンプルのうち 50 μL を専用の石英バッチセルに入れて、その粒子径と多分散指数 (Polydispersity index ; PDI) を測定した。次に、石英バッチセルに入れて使用したサンプル 50 μL を HEPES バッファー 450 μL で希釈して専用のディスポーザブルセルに入れてゼータ電位を測定した。

PDI が 0.3 未満で、かつ、ゼータ電位が正となっている粒子を適正な物性として、以下の実験に使用した。

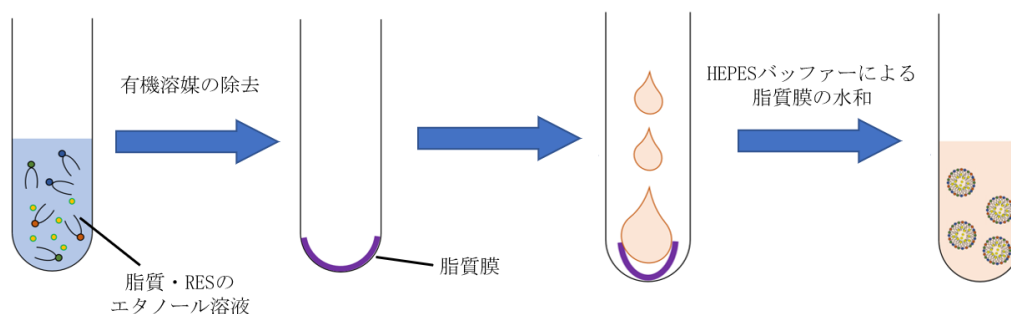


図 2. 単純水和法によるリポソーム調製の模式図

エタノールに溶解した脂質と RES をガラス管内で混合し、溶媒を除去することで形成される脂質膜を、HEPES バッファーで水和し、その後静置や超音波処理することで LP が調製される。

・ H9c2 細胞の培養

ラットの心筋芽細胞である H9c2 細胞を心筋細胞モデルとして利用し、100 mm 径のプラスチック製細胞培養シャーレ内で、DMEM (+) を使用して 37℃、5% CO₂ 下の CO₂ インキュベーターで培養した。光学顕微鏡での目視で培養皿の面積の 70% 以上の細胞増殖が見られたとき、または、3 日間培養したときに、トリプシン 0.25% EDTA で細胞を回収して、以下の実験に使用、あるいは、継代した。実験に使用した細胞の継代数は 3 から 8 までとした。

・ FACS による細胞内への LP 取込み評価

実験前日に、6-well cell culture multiple well plate に H9c2 細胞を $1.0 \times 10^6 / 1,000 \mu\text{L/well}$ ずつ播種して、37℃、5% CO₂ 下の CO₂ インキュベーターで一晩培養。

実験当日に、まずは PBS (-) で 1 回洗浄してから、DiI で染色した β -MEND の溶液 50 μL を DMEM (-) 950 μL で希釈したものを well に加えて、同じ条件のインキュベーターで 1 時間培養した。1 時間後にサンプル含有培地を除去し、PBS (-) で 1 回、さらに 20 U/mL の濃度のヘパリンナトリウムを加えた PBS (-) でも 1 回洗浄した後に、Trypsin 0.25% EDTA で 1.5mL マイクロチューブに回収した。テーブルトップマイクロ冷却遠心機で 300 g、4℃、5 分間で遠心分離して上清を除去して、FACS バッファーを加えて懸濁して再度同じ条件で遠心分離して上清を除去した。回収した細胞を再度 FACS バッファーで懸濁したものを、ナイロン製メッシュで濾過し、それを検体として CytoFLEX Flow Cytometer で計測した。DiI に対して、励起光の波長は 488 nm に、蛍光フィルターの波長は 542 から 585 nm までに、それぞれ設定した。結果は、対象の蛍光の強度と計測された細胞数の積分値である Mean fluorescent intensity (MFI) で表した。統計解析として、Non-repeated measures analysis of variation (ANOVA) を行い、両側 p 値が 0.05 未満となった場合を統計学的有意差ありと判定した。

- ・共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Confocal laser scanning microscope : CLSM) による LP の細胞内局在の観察

実験前日に IWAKI glass base dish に $2.0 \times 10^5 / 1,000 \mu\text{L}$ ずつ H9c2 細胞を播種して、 37°C 、5% CO_2 下の CO_2 インキュベーターで一晩培養。

実験当日に、培地を除去して PBS (-) で 1 回洗浄後に、NBD-DOPE で染色した β -MEND の溶液 $100 \mu\text{L}$ を DMEM (-) $900 \mu\text{L}$ で希釈したものに交換して、同じ条件のインキュベーターで 1 時間培養した。1 時間後にサンプル含有培地を除去し、PBS (-) で 1 回洗浄した後に DMEM (+) のみでさらに 2 時間培養した。次に、その培地を除去し、細胞内のミトコンドリアを染色するために MTDR を 100 nM の濃度となるよう DMEM (+) に添加したもので、15 から 20 分間同条件下で細胞を培養した。そしてさらに培地をフェノールレッド非含有の DMEM (+) に交換して、FLUOVIEW FV10i-LIV で観察した。対物レンズは 60 倍のものを使用し、NBD-DOPE と MTDR に対する励起光の波長はそれぞれ 473 nm と 635 nm に、蛍光フィルターの波長はそれぞれ 490 から 540 nm までと 660 から 760 nm までに設定した。尚、観察時のデジタルズームレンズのフィルター設定、レーザー強度、開口数は、いずれの試料の際にも一定の条件下で行った。

- ・LP 治療に伴う細胞毒性の評価

実験の前日に、96 well microplate に H9c2 細胞を $3.0 \times 10^4 / 100 \mu\text{L/well}$ ずつ播種して 37°C 、5% CO_2 下の CO_2 インキュベーターで一晩培養。

実験当日、まずは培地を除去した後に、RES を封入した β -MEND (β -MEND (RES))、RES を封入していない空の β -MEND (Empty β -MEND)、または、 β -MEND に封入されていない RES のみ (Naked RES) の溶液をそれぞれ同じ脂質濃度あるいは RES 濃度となるように DMEM (-) に希釈したものに交換して、3 時間同条件下で培養した。尚、薬剤を何も加えないコントロールの well には、同量の HEPES バッファーのみを添加した。3 時間後、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System が 10 倍希釈で添加された DMEM (+) に交換し、さらに 2 時間培養した後に、Varioskan LUX マルチモードマイクロプレートリーダーで各 well の吸光度を測定した。波長 440 nm と 650 nm での各 well の吸光度を測定し、その差を求め、最終的には未処理群の吸光度差を 100% とした相対値ですべて表した (Relative absorbance to Control) (% of Control)。統計解析として、Non-repeated measures ANOVA を行い、両側 p 値が 0.05 未満となった場合を統計学的有意差ありと判定した。

- ・LP 治療による心筋ミトコンドリア呼吸能の評価

実験前日に、Seahorse XF HS Mini Analyzer 専用の細胞培養ミニプレートに H9c2 細胞を $2.0 \times 10^4 / 100 \mu\text{L/well}$ ずつ播種して 37°C 、5% CO_2 下の CO_2 インキュベーター

一で一晩培養。また、専用のセンサーカートリッジを専用のキャリブ rant 溶液で水和して、CO₂ を含まず 37℃ に設定した小型振盪恒温器をインキュベーターとして利用し、内部に静置しておいた。

実験当日に、培地を除去して PBS (-) で 1 回洗浄後に、 β -MEND (RES) 溶液または同濃度となる Naked RES 溶液 100 μ L ずつを DMEM (-) 900 μ L で希釈したものに交換して、37℃、5% CO₂ 下の CO₂ インキュベーターで 3 時間培養した。尚、未処理群の well には、薬剤を添加していない DMEM (-) のみと交換した。その後培地を除去して、Seahorse XF HS Mini Analyzer 専用のアッセイ培地に交換し、CO₂ を含まず 37℃ に設定した小型振盪恒温器内に 1 時間以上静置した。水和したセンサーカートリッジ上の所定のポートに、調製した Oligomycin、FCCP、Rotenone/antimycin A をそれぞれ 20 μ L ずつ準備した。Seahorse XF HS Mini Analyzer 本体を起動して、Mito ストレステストのプロトコールを入力し、水和済みのセンサーカートリッジのキャリブレーション後に、専用のアッセイ培地に交換・静置済みの細胞培養ミニプレートを設置して測定開始。

今回の測定プロトコールでは、試薬投与前、Oligomycin 投与後、FCCP 投与後、Rotenone/antimycin A 投与後にそれぞれ 6 サイクルずつ、合計 24 サイクルで酸素消費量 (Oxygen consumption rate : OCR) (pmol/min) を測定し、これらをプロットして図 3 のような線グラフを作図した。さらに、この図からミトコンドリア呼吸能のパラメーターを算出し、試薬投与前と Rotenone/antimycin A 投与後の OCR の差を Basal respiration、FCCP 投与後と Rotenone/antimycin A 投与後の OCR の差を Maximal respiration、FCCP 投与後と試薬投与前の OCR の差を Spare respiratory capacity と定義した (図 3)。

OCR の結果は細胞数に影響を受けることが知られているため (Wanka et al., 2018)、OCR の測定後に細胞培養ミニプレート内の細胞数を回収して CellDrop Automated Cell Counters で計測し、その細胞数で OCR を補正した (pmol/min/10⁴cells)。さらに、線グラフを作成する際には、未処理群の試薬投与前の細胞補正 OCR を 100% とした相対的な OCR で作図した (Relative OCR to Control Baseline) (% of Control Baseline)。一方、各パラメーターの棒グラフを作成する際には、未処理群の細胞補正 OCR を 100% とした相対的な OCR で作図した (Relative OCR to Control) (% of Control)。統計解析として、Non-repeated measures ANOVA を行い、両側 p 値が 0.05 未満となった場合を統計学的有意差ありと判定した。

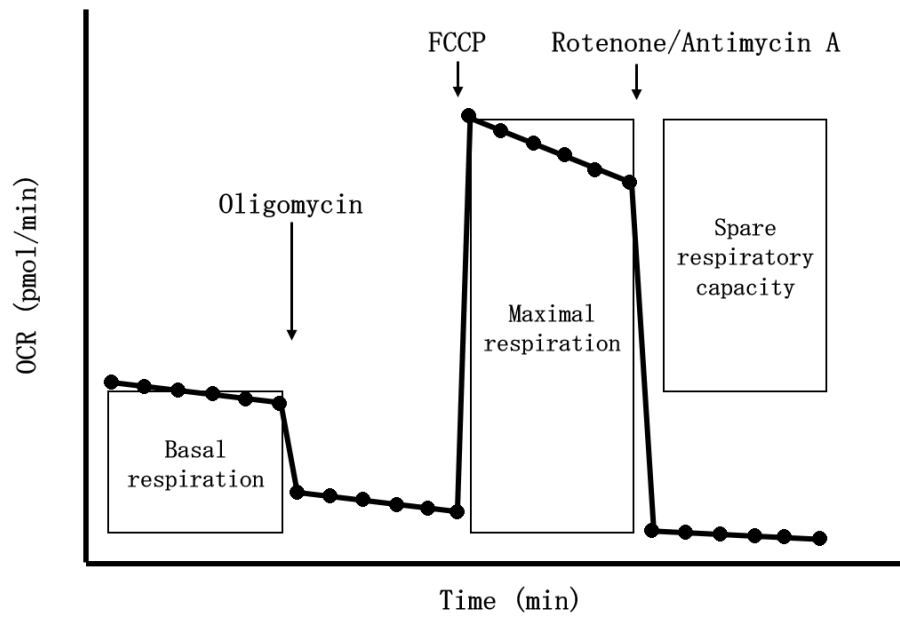


図 3. Seahorse XF HS Mini Analyzer で計測された OCR のグラフの例示

計測された OCR をプロットして得られたグラフから、ミトコンドリア呼吸能のパラメーターを算出し、以下のように定義した。Basal respiration：試薬投与前と Rotenone/antimycin A 投与後の OCR の差、Maximal respiration：FCCP 投与後と Rotenone/antimycin A 投与後の OCR の差、Spare respiratory capacity：FCCP 投与後と試薬投与前の OCR の差。

結 果

1. 単純水和法による β -MEND の調製

単純水和法により、RES を β -MEND に封入した β -MEND (RES) と、RES を封入していない Empty β -MEND をそれぞれ調製し、その物性を Zetasizer Nano ZS で評価した。

β -MEND (RES) の粒子径は 79.7 ± 10.2 nm、PDI は 0.26 ± 0.03 、ゼータ電位は 37.7 ± 8.6 mV であり (平均 $\pm$ 標準偏差、以下同じ)、100 nm 未満の粒子径で表面が正に帯電したりポソームを調製できた。一方、empty β -MEND の粒子径は 78.8 ± 10.0 nm、PDI は 0.26 ± 0.02 、ゼータ電位は 28.4 ± 11.1 mV であり、 β -MEND の物性は RES を封入しているかいないかには影響されなかったことがわかった (表 1)。

尚、 β -MEND が正に帯電しているのは、既報の通り (Yamada et al., 2014)、この LP を構成している DC-Chol に由来すると考えられた。

表 1. 本研究で使⤍した β -MEND の物性

数値はいずれも平均 $\pm$ 標準偏差で表した。

	脂質組成 (モル比)	n	粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
β -MEND (RES)	DC-Chol:EPC:SM	10	79.7 ± 10.2	0.26 ± 0.03	37.7 ± 8.6
Empty β -MEND	(3:4:3)	7	78.8 ± 10.0	0.26 ± 0.02	28.4 ± 11.1

2. FACS による β -MEND の細胞内への取込みの評価

培養した H9c2 細胞を蛍光染色した β -MEND と反応させ、細胞内への取込みを CytoFLEX Flow Cytometer で評価し、蛍光強度と細胞数の積分値である MFI で表した。

未処理群の MFI が $36,426.55 \pm 1,626.27$ だったのに対し、 β -MEND (RES) 群は $2,273,007.42 \pm 730,514.48$ 、Empty β -MEND 群は $2,257,773.13 \pm 620,953.20$ と有意に上昇しており、有意に細胞内へ取り込まれていることが確認できた ($p < 0.01$)。 β -MEND (RES) 群と Empty β -MEND 群の間には統計学的有意差はなく、RES 封入の有無は H9c2 細胞への取込みにも影響を与えないことがわかった (図 4)。

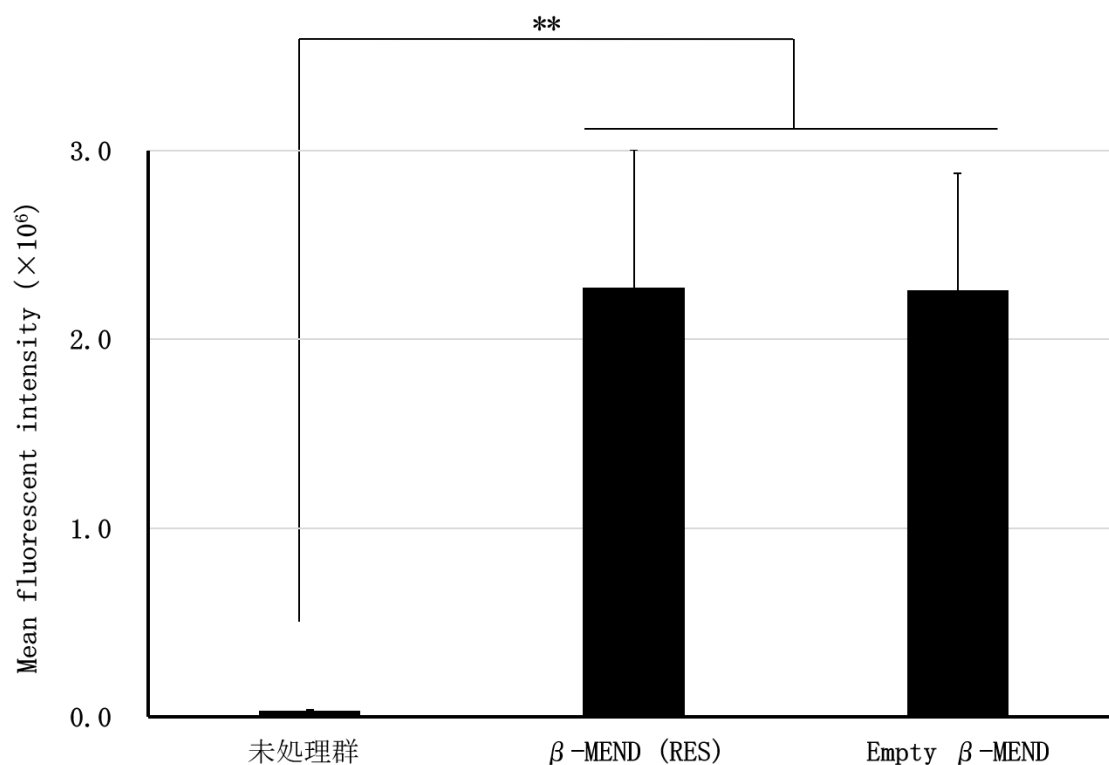


図 4. FACS による β -MEND の H9c2 細胞内への取込み

いずれも平均 $\pm$ 標準偏差で表した ($n = 3$)。統計学的有意差は Non-repeated measures ANOVA と SNK 検定で解析した (** : $p < 0.01$)。

3. CLSM による β -MEND の細胞内局在の観察

培養した H9c2 細胞を、緑色に蛍光染色した β -MEND と反応させ、さらに細胞内のミトコンドリアも赤色に染色した後に、FLUOVIEW FV10i-LIV で観察した。

β -MEND は H9c2 細胞内に取込まれ、さらに一部は、ミトコンドリアと共局在し、黄色を呈していた。この様子は、未処理群と比較して明らかであり、 β -MEND (RES) と Empty β -MEND では同程度であった (図 5)。

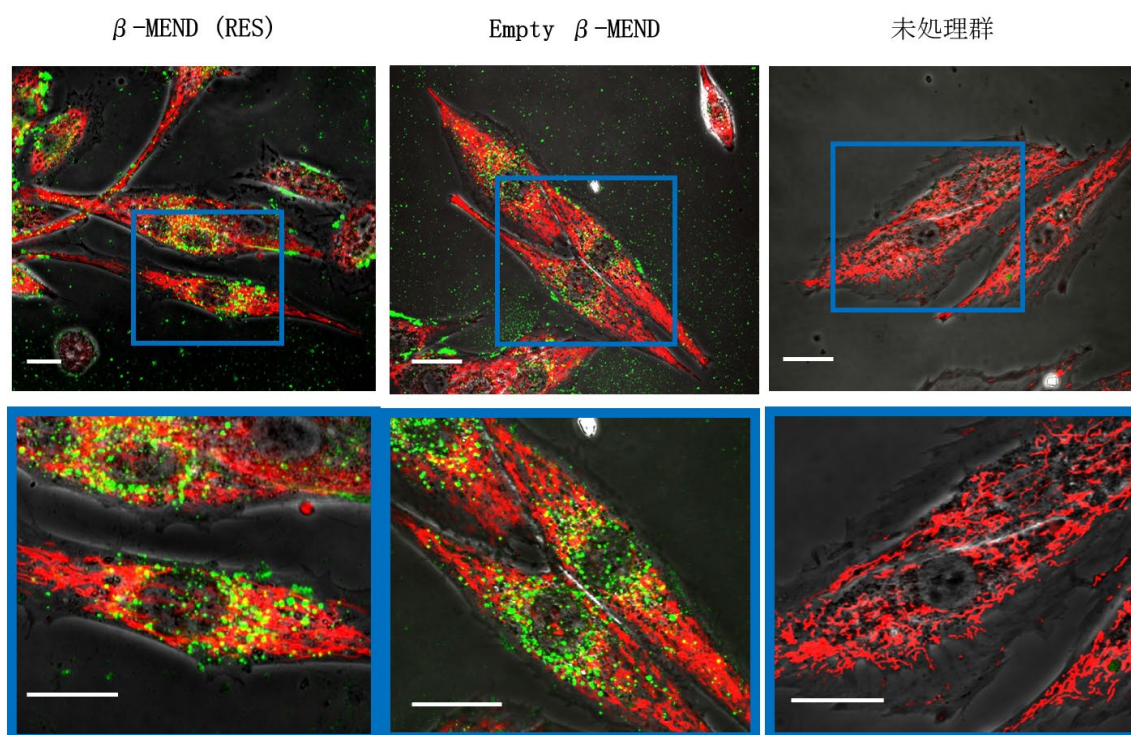


図 5. CLSM による β -MEND の細胞内局在の観察

β -MEND を緑色に、ミトコンドリアを赤色に染色した。下段の図はそれぞれの上段の図の青線で囲った部分を拡大したものである。 β -MEND (RES)、Empty β -MEND ともにリポソームがミトコンドリアと共局在して黄色を呈しているのが同程度に観察された。白色の線は 20 μ m を表す。

4. β -MEND の細胞毒性の評価

β -MEND によって H9c2 細胞の生存能が変化しないかを、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を使用して評価した。この試薬は、生細胞のミトコンドリアの呼吸鎖にあるコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素によって分解されることでホルマザン色素を形成し、この色素の吸光度が生細胞数と正比例する（タカラバイオ株式会社. n. d.）。未処理群に対して、複数の濃度の β -MEND (RES) 群と、それと同じ濃度のリポソームに封入されていない Naked RES 群、および、 β -MEND (RES) と同じ脂質濃度の Empty β -MEND 群を比較し、結果となる吸光度の差は、未処理群を 100% とした相対値で表した (% of Control)。

今回は RES 相当で 5~30 μ M の濃度で検討し、未処理群や Naked RES 群と比較して、 β -MEND の 2 群では吸光度の有意な低下は見られなかった。このことから、 β -MEND 投与によって H9c2 細胞に毒性は現れないと考えられた（図 6）。

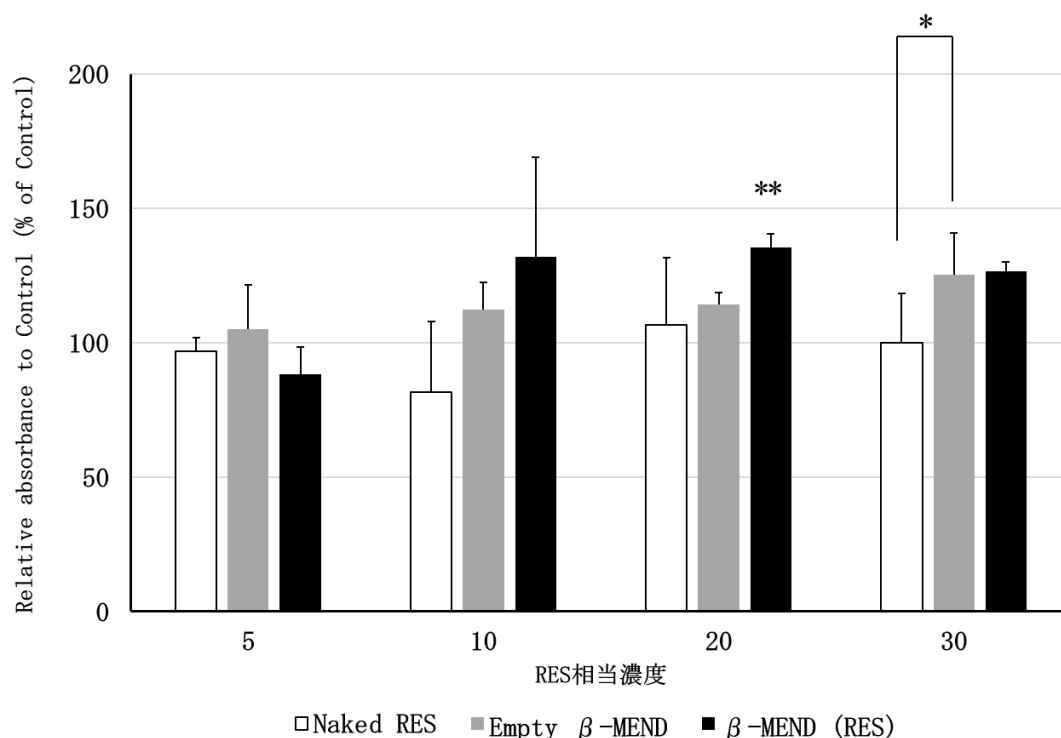


図 6. β-MEND の細胞毒性評価

未処理群の吸光度を 100%としたときの相対値として、平均 ± 標準偏差で表した ($n = 3$)。β-MEND の 2 群の濃度の表記については、β-MEND (RES) 群については RES 相当の濃度で、Empty β-MEND 群については β-MEND (RES) 群のそれぞれの RES 相当濃度となるときの同じ脂質濃度で、それぞれ表した。統計学的有意差は Non-repeated measures ANOVA と SNK 検定で解析した (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.05$ 対未処理群)。

5. β-MEND によるミトコンドリア呼吸能の変化

培養した H9c2 細胞に β-MEND (RES) を反応させ、その細胞のミトコンドリア呼吸能を Seahorse XF HS Mini Analyzer で OCR として計測した。β-MEND (RES) の濃度は、RES として 10 μM 相当となるように調製し、同じ濃度の naked RES と未処理群と比較した。

計測したすべての OCR をプロットした線グラフでは、FCCP を加えた後のグラフのピークが β-MEND (RES) 群で明らかに上昇が見られた (図 7A)。この線グラフから各パラメーターを算出し、未処理群をすべて 100%とした場合、Basal respiration は Naked RES 群で $101.2 \pm 15.6\%$ of Control、β-MEND (RES) 群で $114.1 \pm 21.0\%$ of Control と統計学的有意差を認めなかった。それに対し、Maximal respiration については Naked RES 群で $91.6 \pm 18.4\%$ of Control、β-MEND (RES) 群で $233.6 \pm 43.9\%$ of Control、Spare respiratory capacity については Naked RES 群で $77.4 \pm 32.9\%$ of Control、

β -MEND (RES) 群で $390.6 \pm 83.8\%$ of Control と、 β -MEND (RES) 投与によって最大呼吸能を示す 2 つのパラメーターが有意に上昇した ($p < 0.01$) (図 7B)。

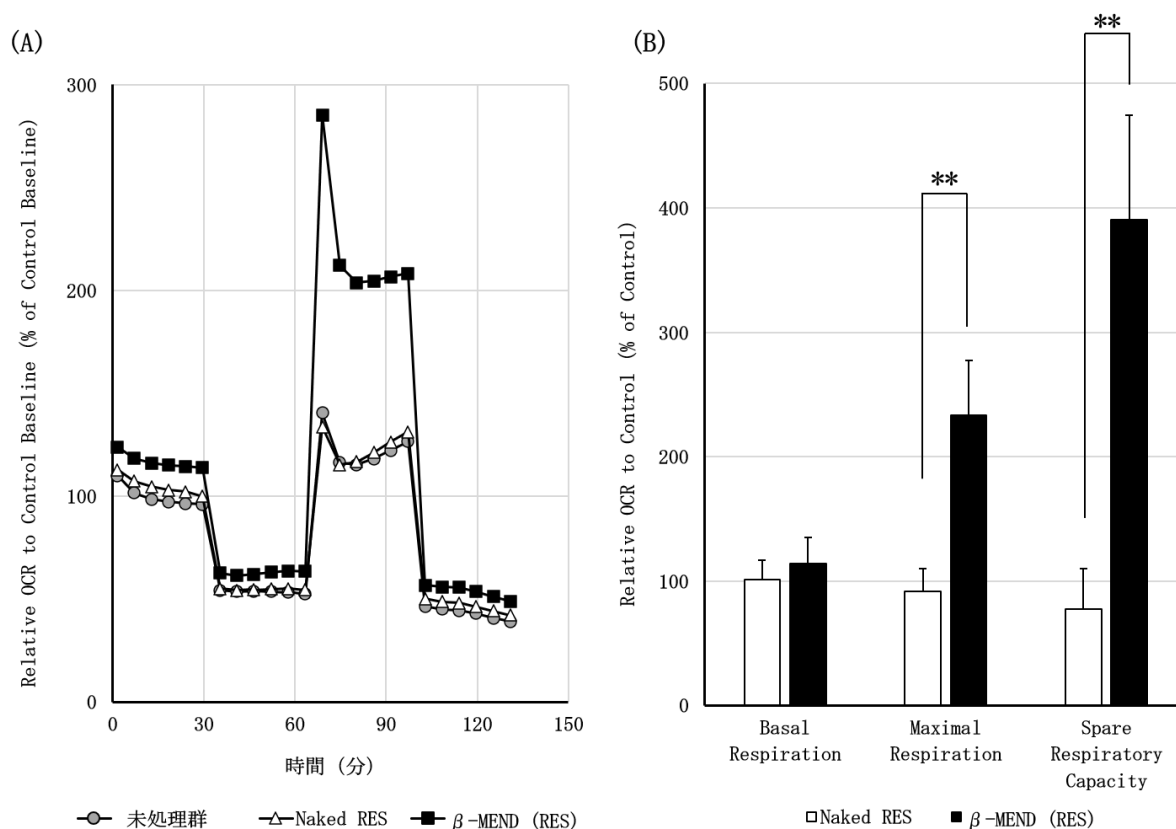


図 7. β -MEND (RES) によるミトコンドリア呼吸能の変化

A : 計測された OCR を細胞数で補正し、さらに、試薬投与前の未処理群の OCR を 100%としたときの平均相対値で表した (% of Control Baseline) ($n = 3$)。B : 計測された OCR を細胞数で補正し、さらに、未処理群の OCR を 100%としたときの相対値を算出し、いずれも平均 $\pm$ 標準偏差で表した (% of Control) ($n = 3$)。統計学的有意差は Non-repeated measures ANOVA と SNK 検定で解析した (** : $p < 0.01$)。

考 察

今回の検討において、Yamada らが開発した β -MEND を利用した β -MEND (RES) は、心筋細胞モデルである H9c2 細胞に効率良く取り込まれそのミトコンドリアへ到達でき、細胞毒性を呈することなく、かつ、その細胞のミトコンドリア呼吸能を賦活した。このことから、RES には心筋細胞のミトコンドリア呼吸能を活性化作用があることが示唆された。

以前に Yamada らは、最初に開発された LP である MITO-Porter が心筋細胞への取込みが悪いことを報告していた (Yamada et al., 2020d)。そのため彼らは、まず心筋前駆細胞へ MITO-Porter を使用して取込ませて、この細胞を心筋細胞と共培養、あるいは、モデルマウスの心筋へ直接注射することで、心筋細胞内へ RES を送達し、これによってドキソルビシンによる心筋傷害モデルへの治療効果を報告した (Abe et al., 2018)。

ドキソルビシン心筋傷害に対する RES の治療効果について、これまでに様々な報告がある (Dolinsky et al., 2013 ; Zhang L., et al. 2019 ; Alanazi et al., 2020a ; Alanazi et al., 2020b)。その中でも Cheung らは、RES が心筋細胞のミトコンドリアにどのように作用するのかを検討し、RES がミトコンドリアマトリックスにあるサーチュイン 3 を活性化することで、ミトコンドリアや電子伝達系の ATP 合成酵素が脱メチル化されたり、ミトコンドリア内膜のカルジオリピンが過剰に発現されたりすることで、ミトコンドリア呼吸能が賦活されることを示した (Cheung et al., 2015)。

今回利用した Seahorse XF Analyzer シリーズによる検証の結果から、Yamada らによる β -MEND を利用した β -MEND (RES) が、H9c2 細胞のミトコンドリア呼吸能のパラメーターのうち、最大呼吸能を示す Maximal respiration と Spare respiratory capacity が有意に上昇させたが、その一方、基礎呼吸能を表す Basal respiration は上昇しなかった。これまでの心筋ミトコンドリア呼吸能についての報告では、Maximal respiration と Spare respiratory capacity が上昇していたものではほとんどで Basal respiration も上昇していた (Cheung et al., 2015 ; Wen et al., 2019 ; Hoes et al., 2018 ; Ali Pour et al., 2020 ; Chen et al., 2020 ; Kokkinaki et al., 2019 ; Nukaga et al., 2020)。一方、Basal respiration が上昇せずに Maximal respiration と Spare respiratory capacity が上昇したという報告もあり、サーチュイン 3 の簡略遺伝子やレニン転写産物由来のタンパクの 1 つである Cyto-renin を細胞内に導入した際に認められている (Cheung et al., 2015 ; Wanka et al., 2018)。

カテコラミンによる負荷増大、酸化ストレス、虚血など重大なストレス下に置かれている心筋細胞においては、Spare respiratory capacity が減少しており、その細胞は結果的に死に至る、ということが知られている (Gong et al., 2003 ; Schipper et al.,

2017)。加えて、Spare respiratory capacity は、ATP の需要が高まった状況やストレス下においてその心筋細胞が利用できる酸素消費量の余力を示しているもので、これによって組織の機能が保たれたり細胞の修復が行われたりする。したがって、Spare respiratory capacity の増加は、心筋細胞が酸化ストレスなどの病態下にあるときに、その細胞にとって保護的な指標となり得る、と考えられる (Dranka et al., 2010)。

RES を封入して心筋細胞のミトコンドリアを標的とする LP が、ミトコンドリア呼吸能を賦活させることを Seahorse XF Analyzer シリーズで検証した報告は、これまでにない。 β -MEND (RES) を用いた DDS が新たな心不全薬となり得ることに期待し、今後は臨床応用へと発展させていきたい。

結 論

本研究から得られた新知見

- ・北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室の Yamada が開発した LP である β -MEND は、心筋細胞モデル内へ効率良く取込まれており、かつ、その一部はミトコンドリアまで到達していることを確認した。
- ・ β -MEND には、心筋細胞モデルへの細胞毒性を呈さなかった。
- ・RES を封入した β -MEND である β -MEND (RES) は、心筋細胞モデルのミトコンドリアまで到達し、その最大呼吸能を有意に賦活した。

新知見の意義

β -MEND (RES) は、心筋細胞のミトコンドリアまで到達することができ、そのミトコンドリア呼吸能を賦活することで、心筋細胞のストレスへの耐性を高めることができた。これを応用することで、心筋の様々な病態に対する治療薬または予防薬となり得るのではないかと期待している。

本研究で得られた新知見から今後どのような研究が添加されうるか

in vitro あるいは *in vivo* の実験において、虚血やアントラサイクリン系抗がん剤などによる心筋への傷害モデルを作製し、それに対して β -MEND (RES) を投与することで、細胞の生存能やミトコンドリア呼吸能、モデル動物の生存率や心機能などが有意に改善するかを検証したい。

今後の課題

どのような病態を対象として治療応用を検討するか、その病態モデルの作製と評価系の確立が可能か、投与する LP の最適な用量や濃度はどのくらいか、実際のモデル動物に投与した場合の生体内分布と心臓により多く到達させるためにはどうすればよいか、など臨床応用を目指すためには解決しなければならない問題が多々ある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究生として2年間、数多くのご指導・ご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学教室・原島秀吉教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、研究生として2年間、数多くの直接のご指導・ご鞭撻をいただき、本論文のご指導にもたくさんの時間を費やしていただいた、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学教室・山田勇磨准教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、共同研究を行うために北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学教室への留学をお許し頂きました、北海道大学大学院医学研究院小児科学教室・真部淳教授に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、二学部間の共同研究の立ち上げから、さらなる進展をめざし、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学教室に2年間の留学をお許し頂き、かつ、たくさんのご助言を賜りました北海道大学病院小児科・武田充人講師、ならびに、同科循環器グループの諸先輩・同僚たち皆様に深く感謝申し上げます。

利益相反

本論文に対して、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Abe, J., Yamada, Y., Takeda, A., Harashima, H. (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*, 177–188.

Alanazi, A., Fadda, L., Alhusaini, A., Ahmad, R. (2020a) . Antioxidant, antiapoptotic, and antifibrotic effects of the combination of liposomal resveratrol and carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *34*, e22492.

Alanazi, A.M., Fadda, L., Alhusaini, A., Ahmad, R., Hasan, I.H., Mahmoud, A.M. (2020b) . Liposomal Resveratrol and/or Carvedilol Attenuate Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Modulating Inflammation, Oxidative Stress and S100A1 in Rats. *Antioxidants.* (Basel). *9*, 159.

Cheng, Y., Liu, D.Z., Zhang, C.X., Cui, H., Liu, M., Zhang, B.L., Mei, Q.B., Lu, Z.F., Zhou, S.Y. (2019) . Mitochondria-targeted antioxidant delivery for precise treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury through a multistage continuous targeted strategy. *Nanomedicine.* *16*, 236–249.

Cheung, K.G., Cole, L.K., Xiang, B., Chen, K., Ma, X., Myal, Y., Hatch, G.M., Tong, Q., Dolinsky, V.W. (2015) . Sirtuin-3 (SIRT3) Protein Attenuates Doxorubicin-induced Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Respiration in H9c2 Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* *290*, 10981–10993.

Dolinsky, V.W., Rogan, K.J., Sung, M.M., Zordoky, B.N., Haykowsky, M.J., Young, M.E., Jones, L.W., Dyck, J.R. (2013) . Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *305*, E243–253.

Dranka, B.P., Hill, B.G., Darley-Usmar, V.M. (2010) . Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen

species. *Free. Radic. Biol. Med.* *48*, 905–914.

Fan, C., Joshi, J., Li, F., Xu, B., Khan, M., Yang, J., Zhu, W. (2020) . Nanoparticle-Mediated Drug Delivery for Treatment of Ischemic Heart Disease. *Front. Bioeng. Biotechnol.* *8*, 687.

Gong, G., Liu, J., Liang, P., Guo, T., Hu, Q., Ochiai, K., Hou, M., Ye, Y., Wu, X., Mansoor, A., From, A.H., Ugurbil, K., Bache, R.J., Zhang, J. (2003) . Oxidative capacity in failing hearts. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* *285*, H541–548.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2013) . Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* *123*, 92–100.

Machado, N.D., Fernandez, M.A., Diaz, D.D. (2019) . Recent Strategies in Resveratrol Delivery Systems. *Chempluschem.* *84*, 951–973.

Pala, R., Anju, V.T., Dyavaiah, M., Busi, S., Nauli, S.M. (2020) . Nanoparticle-Mediated Drug Delivery for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Int. J. Nanomedicine.* *15*, 3741–3769.

Saludas, L., Pascual-Gil, S., Roli, F., Garbayo, E., Blanco-Prieto, M.J. (2018). Heart tissue repair and cardioprotection using drug delivery systems. *Maturitas.* *110*, 1–9.

Satrialdi, Munechika, R., Biju, V., Takano, Y., Harashima, H., Yamada, Y. (2020) . The optimization of cancer photodynamic therapy by utilization of a pi-extended porphyrin-type photosensitizer in combination with MITO-Porter. *Chem. Commun. (Camb).* *56*, 1145–1148.

Satrialdi, Takano, Y., Hirata, E., Ushijima, N., Harashima, H., Yamada, Y. (in press) . The effective in vivo mitochondrial-targeting nanocarrier combined with a π -extended porphyrin-type photosensitizer. *Nanoscale. Advances.*

Schipper, D.A., Palsma, R., Marsh, K.M., O’Hare, C., Dicken, D.S., Lick, S.,

Kazui, T., Johnson, K., Smolenski, R.T., Duncker, D.J., Khalpey, Z. (2017) . Chronic Myocardial Ischemia Leads to Loss of Maximal Oxygen Consumption and Complex I Dysfunction. *Ann. Thorac. Surg.* *104*, 1298–1304.

Wanka, H., Lutze, P., Staar, D., Grunow, B., Peters, B.S., Peters, J. (2018) . An alternative renin isoform is cardioprotective by modulating mitochondrial metabolism. *J. Cell. Mol. Med.* *22*, 5991–6001.

Yamada, Y., Akita, H., Kamiya, H., Kogure, K., Yamamoto, T., Shinohara, Y., Yamashita, K., Kobayashi, H., Kikuchi, H., Harashima, H. (2008) . MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta.* *1778*, 423–432.

Yamada, Y., Tabata, M., Yasuzaki, Y., Nomura, M., Shibata, A., Ibayashi, Y., Taniguchi, Y., Sasaki, S., Harashima, H. (2014) . A nanocarrier system for the delivery of nucleic acids targeted to a pancreatic beta cell line. *Biomaterials.* *35*, 6430–6438.

Yamada, Y., Daikuhara, S., Tamura, A., Nishida, K., Yui, N., Harashima, H. (2019) . Enhanced autophagy induction via the mitochondrial delivery of methylated β -cyclodextrin-threaded polyrotaxanes using a MITO-Porter. *Chem. Commun. (Camb).* *55*, 7203–7206.

Yamada, Y., Ito, M., Arai, M., Hibino, M., Tsujioka, T., Harashima, H. (2020a) . Challenges in Promoting Mitochondrial Transplantation Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 6365.

Yamada, Y., Satrialdi, Hibino, M., Sasaki, D., Abe, J., Harashima, H. (2020b) . Power of mitochondrial drug delivery systems to produce innovative nanomedicines. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* *154–155*, 187–209.

Yamada, Y., Somiya, K., Miyauchi, A., Osaka, H., Harashima, H. (2020c) . Validation of a mitochondrial RNA therapeutic strategy using fibroblasts from a Leigh syndrome patient with a mutation in the mitochondrial ND3 gene. *Sci. Rep.* *10*, 7511.

Yamada, Y., Fujishita, N., Harashima, H. (2020d) . A nanocarrier for the mitochondrial delivery of nucleic acids to cardiomyocytes. *Nucleosides. Nucleotides. Nucleic Acids.* *39*, 141-155.

Yamada, Y., Ishimaru, T., Ikeda, K., Harashima, H. (in press) . Validation of the mitochondrial delivery of vitamin B1 to enhance ATP production using SH-SY5Y cells, a model neuroblast. *J. Pharm. Sci.*

Zhang, C.X., Cheng, Y., Liu, D.Z., Liu, M., Cui, H., Zhang, B.L., Mei, Q.B., Zhou, S.Y. (2019) . Mitochondria-targeted cyclosporin A delivery system to treat myocardial ischemia reperfusion injury of rats. *J. Nanobiotechnology.* *17*, 18.

Zhang, L., Zhu, K., Zeng, H., Zhang, J., Pu, Y., Wang, Z., Zhang, T., Wang, B. (2019) . Resveratrol solid lipid nanoparticles to trigger credible inhibition of doxorubicin cardiotoxicity. *Int. J. Nanomedicine.* *14*, 6061-6071.

タカラバイオ株式会社. (n.d.). Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System 説明書. https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/mk400_j.pdf. アクセス日 : 2021 年 10 月 9 日.