



Title	臨床応用を目指したミトコンドリア標的型コエンザイムQ10搭載ナノカプセル注射剤の創製
Author(s)	日比野, 光恵
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14851号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14851
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88819
Type	doctoral thesis
File Information	Mitsue_Hibino.pdf



博士學位論文

臨床応用を目指したミトコンドリア標的型
コエンザイム Q₁₀ 搭載ナノカプセル注射剤の創製

北海道大学大学院 生命科学院

臨床薬学専攻

薬剤分子設計学研究室

日比野 光恵

令和 4 年 3 月

目次

略語.....	4
序論.....	9
本論	
第一章	
マイクロ流体デバイスを用いた難水溶性薬物 CoQ ₁₀ 搭載ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子の構築	17
緒言	18
結果	
1-1 エタノール希釈濃度が及ぼす粒子径の影響.....	21
1-2 水相と透析の影響	22
1-3 安定性試験	23
1-4 従来法およびマイクロ流体デバイスを用いた調製法の比較.....	24
1-5 細胞取り込み評価	26
1-6 細胞内動態観察	27
考察	29
第二章 <i>In vivo</i> に適した CoQ ₁₀ 搭載ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子の構築	33
緒言	34
結果	
2-1 CoQ ₁₀ -MITO-Porter の構造評価.....	37
2-2 マイクロ流体デバイスを用いた粒子調製における PEG および R8 の影響.....	39
2-3 CoQ ₁₀ -MITO-Porter の濃縮操作の構築.....	44
2-4 APAP 肝障害における CoQ ₁₀ -MITO-Porter の組織移行性.....	47
2-5 後期 APAP 肝障害モデルに対する CoQ ₁₀ -MITO-Porter の治療効果の検証.....	48
2-6 組織学的評価.....	49
考察	50

第三章 CoQ ₁₀ 搭載ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子の薬物性肝障害への応用	53
緒言	54
結果	
3-1 <i>Ex vivo</i> イメージングによる CoQ ₁₀ -MITO-Porter の組織移行性	56
3-2 APAP 肝障害モデル作製の再検討	58
3-3 CoQ ₁₀ -MITO-Porter の血液スクリーニング検査	60
3-4 前期 APAP 肝障害モデルに対する CoQ ₁₀ -MITO-Porter の治療効果の検証	63
3-5 組織学的評価	65
3-6 APAP 肝障害モデルへの治療効果に対する粒子物性の影響	67
3-7 粒子の肝臓移行性およびミトコンドリア移行性	68
3-8 CoQ ₁₀ のミトコンドリア移行性	70
考察	72
結語	75
実験方法	77
参考文献	97
謝辞	109

略語

A.C.	autoclave
AIF	apoptosis inducing factor
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
ATP	adenosine triphosphate
APAP	acetaminophen
BCS	biopharmaceutics classification system
BSA	bovine serum albumin
Chol	cholesterol
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CoQ ₁₀	Coenzyme Q ₁₀
Da	Dalton
DDS	drug delivery system
DDW	deionized distilled water
DiD	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate salt
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMG-PEG	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycerol, methoxyPEG
DNA	deoxyribonucleic acid
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DQA	dequalinium chloride
EDTA	ethylene diamine- <i>N'</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> -tetraacetic acid
Em	emission
EtOH	ethanol
Ex	excitation
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
g	gravity
GSH	glutathione
HE	hematoxylin and eosin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethanesulfonic Acid
HPLC	high performance liquid chromatography
hr	hour
HSPC	L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy)

IU	international unit
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LP	liposomes
MCFU	mitochondrial electrogenic Ca^{2+} , Fe^{2+} uniporter
MIB	mitochondria isolation buffer
min	minute
mL	milliliter
μL	micro liter
MPTP	mitochondrial permeability transition pore
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondrial DNA
MTP	mitochondrial targeting peptide
MTS	mitochondrial targeting signal
MWCO	molecular weight cut off
NAC	acetylcysteine
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzoquinone imine
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole
OD	optical density
PBS	phosphate-buffered saline
PDI	definition of the polydispersity index
PEG	polyethylene glycol
pH	potential hydrogen
R8	octaarginine
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomal RNA
SAXS	small angle X-ray scattering
S.D.	standard deviation
S.E.	standard error
sec	second
SDS	sodium dodecyl sulfate
SM	sphingomyelin
SS	szeto-schiller
STR-R8	stearyl octaarginine
sus	suspension
TEM	transmission electron microscope

TPP triphenylphosphonium cation
Tris tris (hydroxymethyl)aminomethane
tRNA transfer RNA
TUNEL TdT-mediated dUTP Nick End Labeling

序論

序論

ミトコンドリアは細胞内に存在する細胞内小器官であり、外膜と内膜の二重膜によって囲まれ、内部が膜間腔とマトリクスという空間に分けられた構造体である。細胞内におけるミトコンドリアの重要な役割は、エネルギー (adenosine triphosphate: ATP)の産生である。さらにミトコンドリアは、アポトーシス制御・細胞内カルシウムイオン濃度の調節・脂質酸化などの種々の細胞内代謝などに関与し¹⁾、また近年は免疫応答においても不可欠な働きを果たすことが明らかとなった²⁾。

ミトコンドリアは、ATP 産生を担う電子伝達系においてスーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシルラジカル ($HO^{\cdot}$)、過酸化水素 (H_2O_2)といった活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS)を形成する。適度なレベルの ROS はシグナル伝達や細胞の生存、アポトーシスおよび分化や免疫系の活性化などの役割を果たし、還元酵素や抗酸化経路により ROS 産生は調節されている^{3, 4)}。しかし、外部刺激などによりミトコンドリアがホメオスタシスを維持できないと過剰な ROS が発生し、酸化障害が誘導される。ミトコンドリア由来の酸化ストレスの増大は、老化、パーキンソン病やアルツハイマー型認知症といった神経変性疾患、2 型糖尿病、心血管および肝疾患、動脈硬化、高血圧、炎症、癌などの様々な疾患の原因となる⁵⁻¹²⁾。したがって、抗酸化分子のミトコンドリアへの送達は、有用な治療戦略である。

抗酸化療法におけるミトコンドリア標的型 Drug Delivery System (DDS)として、Triphenylphosphonium (TPP)、Mitochondrial targeting signal (MTS)などのペプチドおよびナノキャリアがある^{13, 14)} (Fig. A)。TPP は疎水性とカチオン性を併せ持つ化合物である。現在、TPP はミトコンドリアを標的化する技術として最もよく使用され、主に脂溶性低分子の送達が可能である。TPP を用いたミトコンドリア標的型 DDS に関して、Table A に示した。TPP はカチオン性を示すため、負 (-160~-180 mV)に帯電するミトコンドリアに対して静電的相互作用により、細胞質よりも数倍高く集積できる¹⁵⁾。一方で TPP は 10 μ M 以上で用いるとミトコンドリアにおいて脱共役剤として働き、プロトンリークを増大させ、毒性をもたらす可能性がある¹⁶⁾。TPP は、抗酸化分子との直接結合やナノキャリアのリガンドとして用いられる。Mitochondria targeting peptide (MTP)として最も有名であるのは Szeto-Schiller (SS)ペプチドである¹⁷⁾。MTP のミトコンドリアを標的するための重要なポイントとして、カチオン性および疎水性残基の repeating unit も持つことが挙げられる。SS ペプチドは水溶性テトラペプチドであり tyrosine (Tyr)または dimethyltyrosine (Dmt)、arginine (Arg)、phenylalanine (Phe)および lysine (Lys)で構成され、これまで SS-01 から SS-31 が開発されている。SS ペプチドは静電的相互作用および疎水性相互作用を介してカルジオリピンが豊富なミトコンドリア内膜への集積を可能にした¹⁸⁾。さらに SS ペプチドは、Tyr および Dmt のような芳香族アミノ酸残基により、非反応性チロシルまたはジチロシラジカルがチロシンヒドロペルオキシドを形成し、スーパーオキシドラジカルと反応できるため ROS を除去し、抗酸化作用を示す¹⁹⁾。また 1 mM で用いてもミトコンド

リアを脱分極させず、毒性が低いことも魅力的であり²⁰⁾、多くの研究に使用され^{21, 22)}、Elamipretide (SS-31、MTP-131、BendaviaTMとして知られる)を用いた第 II 相臨床試験では経皮経管腎血管形成術後に発症する虚血/再灌流障害を改善させた²³⁾。ナノキャリアを用いたミトコンドリア標的型 DDS では、ミトコンドリアそのものを標的化するよりも組織移行性や細胞取り込みを向上させることでミトコンドリアへの移行性を向上させる受動的な戦略が多く取られている¹⁴⁾。一方でナノキャリアの組成によってミトコンドリア指向性を上げる能動的な戦略はほとんど報告がないのが現状である。標的組織としては、虚血により重篤な症状を呈する脳疾患が特に多く、次いで心臓、肝臓および腎臓である。

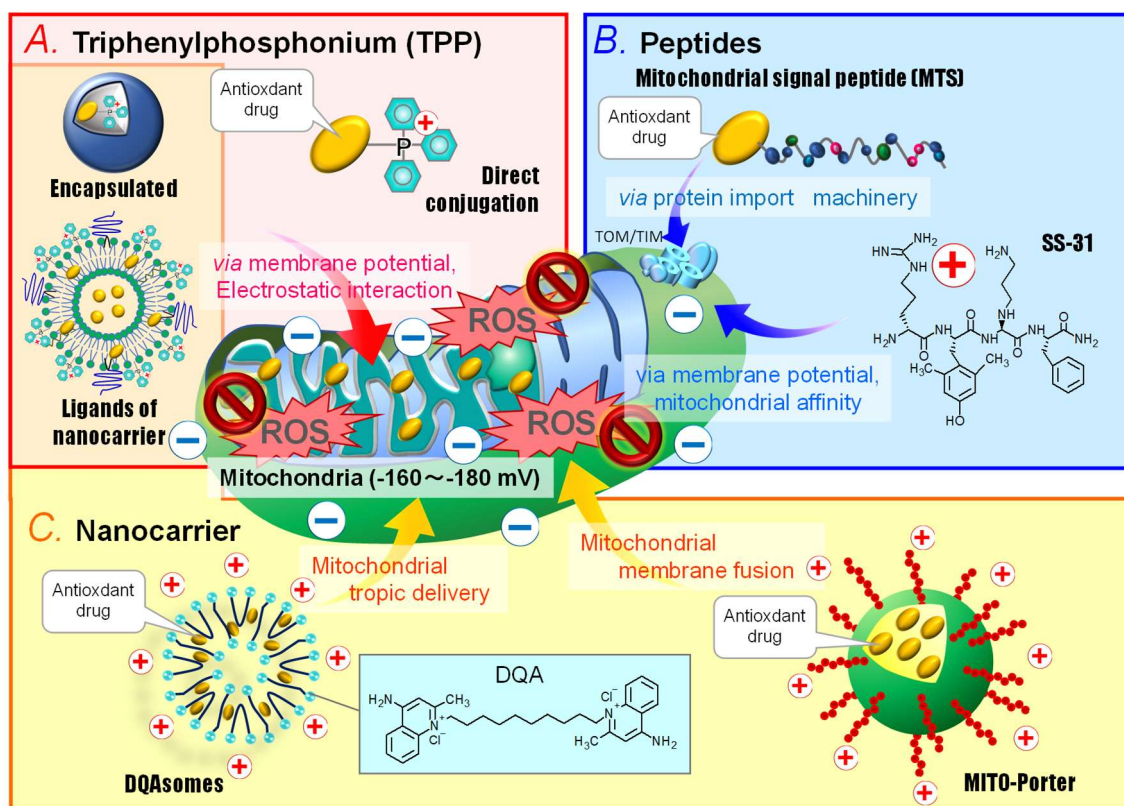


Fig. A 抗酸化療法でのミトコンドリア標的型 DDS の概要図

Table A TPP を用いたミトコンドリア標的型 DDS の例

Formulation	抗酸化分子	TPPの応用			ナノキャリア		結果	Refs.
		直接結合	TPP結合体のナノキャリアへの搭載	ナノキャリアアリガンド	種類・組成	目的		
MitoQ	Coenzyme Q ₁₀	○			—	—	フェロトーシス誘導マウス海馬由来HT22細胞およびマウス胚性皮膚線維芽細胞に対するミトコンドリア酸化ストレスの減少	24
Mito-TEMPO	TEMPO	○			—	—	アセトアミノフェン肝障害モデルマウスに対するミトコンドリア酸化ストレス軽減による治療効果	25
Mito-Apo	Apocynin		○		Biodegradable polyanhydride nanoparticle (300-400 nm, -25 mV) (CPH:SA=20/80) modified FA	・優れた生体適合性、薬物放出性制御 ・中枢神経系への送達に多用 ・FA修飾によるニューロンへの取り込み促進	H ₂ O ₂ 負荷Immortalized rat mesencephalic cells (N27)における神経保護効果	26
MitoPBN	PBN		○		Liposome (100 nm, -60 mV) (Cholesterol:lecithin=1/2)	肝臓標的	LO2細胞のミトコンドリア呼吸能向上および2型糖尿病マウスのグルコース代謝の正常化	27
T-CoQ ₁₀ -NPs	Coenzyme Q ₁₀			○	Biodegradable polyanhydride nanoparticle (140 nm, 50 mV) (PEG化Polymer:CoQ ₁₀ =5/1(w/w)) modified TPP	脳標的 BBBを通過しやすく、脳組織に蓄積しやすい	マウスおよびヒト神経前駆細胞における抗HIV薬処理に対する酸化ストレスの軽減	28
TPP-D-NAC	NAC			○	Dendrimer conjugated TPP and NAC (7.5 nm, 17 mV) (11 TPP and 7 NAC/dendrimer)	・高い薬物負荷量 ・脳組織および病巣部位 (炎症) に蓄積しやすい	H ₂ O ₂ 負荷BV2マウスミクログリアに対する酸化ストレスの軽減およびTBIモデルウサギに対する損傷部位への粒子の局在化	29

Apocynin : 4-hydroxy-3-methoxyacetophenone, BBB : blood-brain barrier, CPH : 1,6-bis-(p-carboxyphenoxy) hexane, FA : folic acid, NAC : N-acetyl cysteine, PBN : phenyl tert-butyl nitron, SA : sebatic acid, TBI : traumatic brain injury, TEMPO : 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl, TPP : triphenylphosphonium

筆者が所属する北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室 (以下、当研究室)では、ミトコンドリア標的型 DDS として MITO-Porter の開発に成功している (Fig. B)。MITO-Porter はミトコンドリア融合性脂質膜で構成されており、内部の水相には水溶性分子を、脂質膜には脂溶性分子を搭載可能であり、粒子表面への機能性素子の修飾によって細胞取り込みを促進し、ミトコンドリア膜との融合を介して搭載分子をミトコンドリアへ送達する³⁰⁾。そのため搭載分子の物性・サイズを制限することなく、低分子から高分子まで様々な分子を送達させることが可能である。これまでに水溶性分子である金コロイド・vitamin B₁、脂溶性分子である bongkreikic acid (BKA)・coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀)・rTPA、タンパク質である green fluorescence protein (GFP)・DNase、核酸である antisense RNA・pDNA・mtDNA (mRNA・tRNA・rRNA)など様々な物質の搭載およびミトコンドリアへの送達に成功している³¹⁻⁴²⁾。

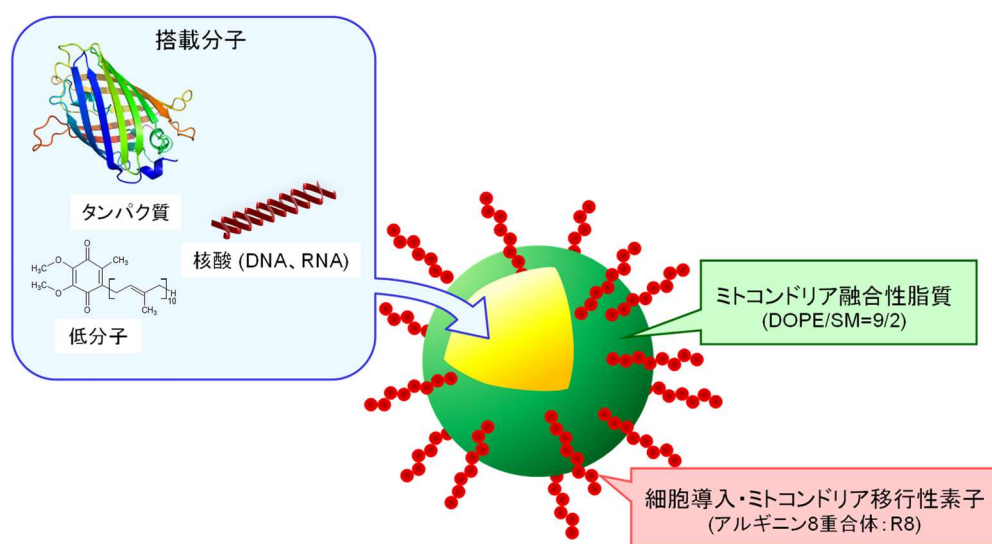


Fig. B ミトコンドリア標的型 DDS : MITO-Porter

CoQ₁₀ は ATP 産生に不可欠な補酵素であり、強力な抗酸化作用をもつ。CoQ₁₀ のミトコンドリアへの送達は、ミトコンドリア機能の活性化や酸化ストレスの軽減が期待でき、ミトコンドリア関連疾患を治療できる可能性がある (Fig. C)。CoQ₁₀ は代表的な難水溶性薬物でもあり、剤形は経口剤にとどまり、注射剤は最適な乳化剤を選定できずに開発中止となり、製剤化を困難にしている⁴³⁾。当研究室では、CoQ₁₀ 搭載 MITO-Porter (CoQ₁₀-MITO-Porter)の構築に成功し³⁵⁾、予防的投与による肝虚血再灌流モデルマウスでの肝傷害抑制効果を確認している⁴⁴⁾。次なる試みとして、臨床応用に向けた検討が必要である。

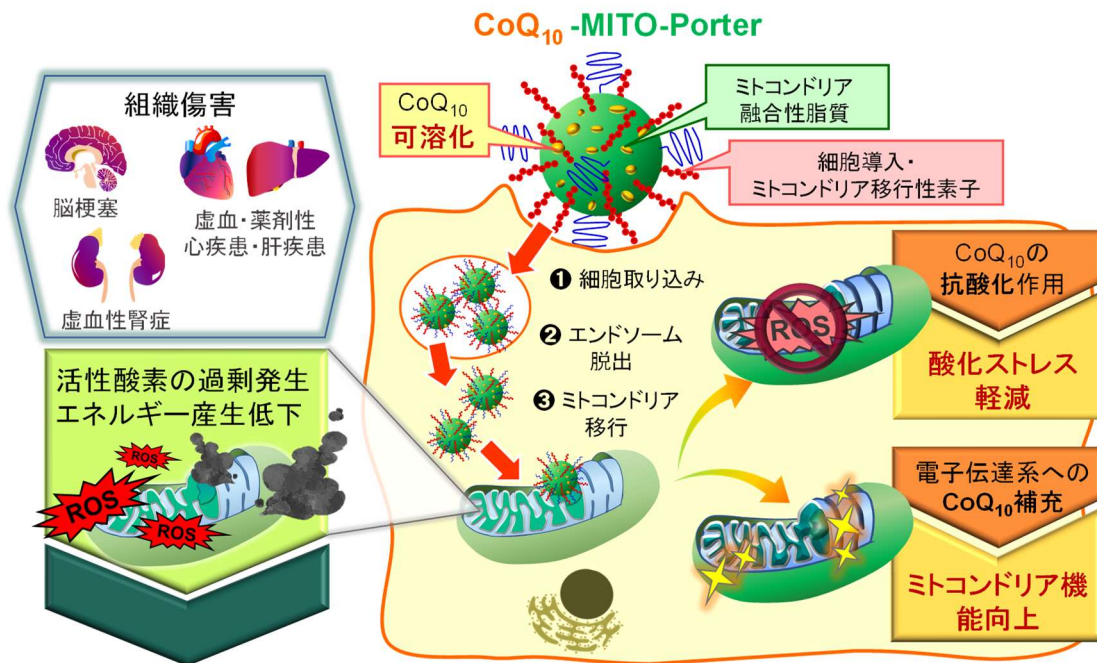


Fig. C CoQ₁₀-MITO-Porter の治療戦略図

本研究では、CoQ₁₀-MITO-Porter の新たな調製法としてマイクロ流体デバイスを使用し、調製法のスケールアップや大量調製ができるか試みた。マイクロ流体デバイスにて調製した CoQ₁₀-MITO-Porter と従来法にて調製した CoQ₁₀-MITO-Porter とで物性や細胞内動態を比較した。その後、ミトコンドリア関連疾患であり、急性期疾患である acetaminophen (APAP)肝障害に CoQ₁₀-MITO-Porter を投与することで治療効果が得られるか検証した。本論文の第一章では、マイクロ流体デバイスを用いた難水溶性薬物 CoQ₁₀ 搭載ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子の構築に関して述べる。第二章では、*in vivo* に適した CoQ₁₀ 搭載ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子の構築に関して述べる。第三章では、CoQ₁₀ 搭載ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子の薬物性肝障害への応用に関して述べる。

第一章

マイクロ流体デバイスを用いた難水溶性薬物 CoQ₁₀ 搭載ミトコンドリア標的型 脂質ナノ粒子の構築

緒言

近年、薬物パイプラインはますます困難を極めている。上市される医薬品の 40%、開発候補薬物に至っては約 90%が難水溶性分子であるとの報告があり⁴⁵⁾、利用拡大のための製剤化が求められる。これらの難水溶性化合物の多くは、biopharmaceutics classification system (BCS)分類の中でも低い水への溶解性と低い消化管膜透過性を示すクラス 4 に分類されており、一般的に製剤化が難しい。BCS クラス 4 に分類される薬物の代表例として coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀)が挙げられる⁴⁶⁾。

これまでに CoQ₁₀ は、虚血の予防・治療のための経口治療薬 (ノイキノン錠®)やサプリメントなどが開発されている。虚血による組織傷害時の細胞死は、過剰に発生する活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS)やエネルギー産生低下が大きな要因となっており、ミトコンドリアの機能回復処置は有効な治療法になり得る⁴⁷⁾。CoQ₁₀ は、生体内で強力な抗酸化物質かつミトコンドリア内膜における酸化的リン酸化の電子運搬体として働く⁴⁸⁾。しかし、CoQ₁₀ 製剤が経口剤しかないため、迅速な対応が求められる虚血性疾患に対する治療法の選択肢を狭めているのが現状である。既存薬において、細胞導入能やミトコンドリア移行性に特化しているものはなく、薬物の送達効率を上げることができれば、薬物自体の効果を上げることにつながり、大きなドラッグリポジショニングをもたらすだろう。Triphenylphosphonium cation (TPP)に酸化型 CoQ₁₀を結合させた MitoQ は、前臨床試験において様々な効果が示され、2010 年には C 型肝炎とパーキンソン病の治療薬として第II相臨床試験に到達している^{49, 50)}。MitoQ の経口投与は、C 型肝炎に対しては肝機能の改善がみられたが、パーキンソン病に対しては病状の進行を止めることはできなかった。MitoQ が十分な効果を得られなかった要因として、低い経口バイオアベイラビリティ (10%)と標的組織への集積量の低さが考えられている。その後、この 2 件の臨床試験の続報はなく、他の臨床研究も実施されてきたが、期待された効果が得られているとは言い難い^{51, 52)}。

我々はミトコンドリア drug delivery system (DDS)として膜融合を介してミトコンドリアへの分子送達を可能にするナノキャリア”MITO-Porter”を開発しており^{30, 53, 54)}、CoQ₁₀を内封した CoQ₁₀-MITO-Porter の作製にも成功し、ミトコンドリアへの移行も確認し、in vivo 評価において優れた薬効を示した^{35, 44)}。先行研究において、様々な方法を用いてナノキャリアへの CoQ₁₀ の封入が試みられている⁵⁵⁻⁵⁸⁾。ナノ粒子の代表的な調製法として単純水和法、逆相蒸発法およびアルコール希釈法が挙げられる。CoQ₁₀-MITO-Porter の場合、エタノール希釈法で調製した際に、最も CoQ₁₀ の搭載率 (脂質に対する薬物の含有量)の高い粒子を得られることができた³⁵⁾。しかし、エタノール希釈法では、大量のナノ粒子溶液を調製できないなどのデメリットが存在する。

ナノ粒子は、低分子などの既存薬や核酸医薬品を内封または粒子表面へ担持させることにより、薬物は標的部位に集積し、治療効果の増大や副作用の軽減等の効果をもたらす^{59, 60)}。さらに、ナノ粒子は可溶化技術にも応用され、CoQ₁₀のような難水溶性分子の分散性の向上に寄与する^{61, 62)}。しかし、ナノカプセル注射製剤が実用化した例は多くはない。その原因として、研究室レベルから工業レベルへの調製法のスケールアップ、製剤の安定性、試薬の品質、バリデーションの難しさ等

が挙げられる。その中でも医薬用脂質ナノ粒子をはじめとする微粒子製剤は、製造工程の変更に
よる物理化学的特性のわずかな変化が薬物の有効性や製剤の安定性に大きな影響を及ぼす可
能性があることに留意する必要がある。

このような状況を踏まえ、調製法のスケールアップの手段の 1 つとして、マイクロ流体デバイス
を用いた調製法が近年注目を集めている⁶³⁻⁶⁶。本研究では、エタノール希釈法に基づく脂質ナノ粒
子の調製にマイクロ流体デバイスを使用する。マイクロ流体デバイスによる溶液の急速な混合およ
び攪拌と容易に制御できる連続製造工程により、均一・微小化・大量のナノ粒子を調製できる。し
かしながら、マイクロ流体デバイスを用いて CoQ₁₀ ほどの BCS クラス 4 に属する難水溶性薬物を脂
質ナノ粒子に封入させ、均一かつ 100 nm を下回るような微小な粒子を調製し、ナノ医薬品化に必
要な大量調製を試みた例は少ない⁶¹。さらに、ミトコンドリア標的能をもったナノ粒子においても同
様な検討を行った例はない。

そこで本研究は、難水溶性分子である CoQ₁₀ をモデル薬物とし、マイクロ流体デバイスを用いて
CoQ₁₀ を封入したミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子 (CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]) の調製を試みた
(Fig. 1-1)。マイクロ流体デバイスは *invasive lipid nanoparticle production (iLiNP)* を使用した⁶⁷。
iLiNP は粒子形成メカニズムと流体力学シミュレーションに基づいて設計され、多様な粒子径制御
が可能である。マイクロ流体デバイスによる調製はエタノール希釈法に基づき、CoQ₁₀-MITO-
Porter 調製を適用させる際にプロトコルの変更を回避できる。エタノール希釈法で調製した従来法
(CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]) と新法を比較することで、本キャリアの有用性を検証した。さらに、各
CoQ₁₀-MITO-Porter の細胞取り込み能・ミトコンドリア局在を評価するため子宮頸がん HeLa 細胞を
用いた検討を行った。

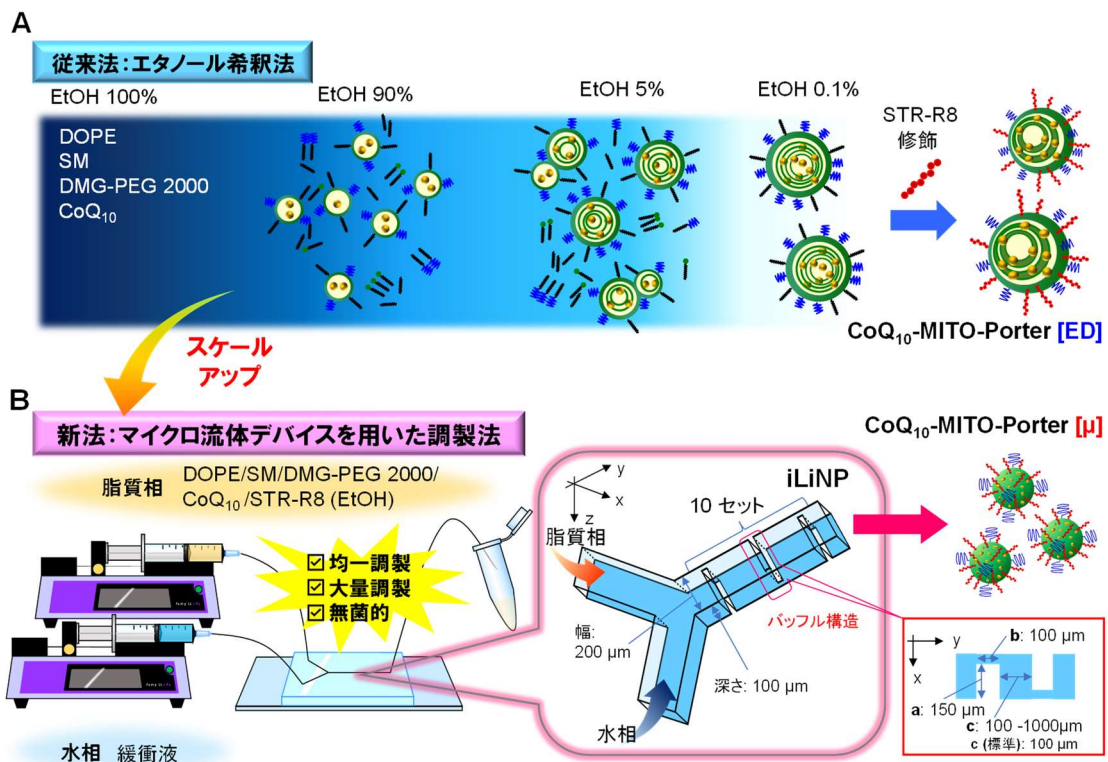


Fig. 1-1 CoQ₁₀-MITO-Porter の調製法

CoQ₁₀-MITO-Porter の調製法の概要図を示した。(A) 従来法はエタノール希釈法を用いて CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]を調製した。(B) マイクロ流体デバイスを用いて CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]を調製した。マイクロ流体デバイス (iLiNP)は内部にバツフル構造を有する。

結果

1-1 エタノール希釈濃度が及ぼす粒子径の影響

マイクロ流体デバイスを用いた調製法では、脂質相と水相の流速比を調節することにより、エタノール希釈濃度が変化するため、形成される粒子の粒子径を制御することができる。そこで、エタノール希釈濃度が 10、20、30、40 %となるように脂質相と水相の流速比を変化させ、粒子径への影響を検証した (Fig.1-2)。エタノール希釈濃度が 10、20、30、40 %の時、粒子径はそれぞれ 62.6 ± 0.1 nm、 70.5 ± 0.3 nm、 150.8 ± 7.8 nm、 243.0 ± 4.3 nm であり、PDI はそれぞれ 0.385 ± 0.038 、 0.120 ± 0.010 、 0.122 ± 0.010 、 0.119 ± 0.026 であった (Fig. 1-2A-a)。そして透析後は、エタノール希釈濃度が 10、20、30、40 %の時、粒子径はそれぞれ 56.3 ± 4.6 nm、 49.0 ± 6.0 nm、 71.7 ± 5.5 nm、 144.2 ± 7.0 nm であり、PDI はそれぞれ 0.382 ± 0.206 、 0.243 ± 0.011 、 0.183 ± 0.037 、 0.133 ± 0.044 であった (Fig. 1-2A-b)。マイクロ流体デバイスを用いた調製法では、エタノール希釈濃度が減少するにつれて、粒子径は減少した。透析後は、どの希釈比率でも透析前と比較して粒子径が小さくなった。

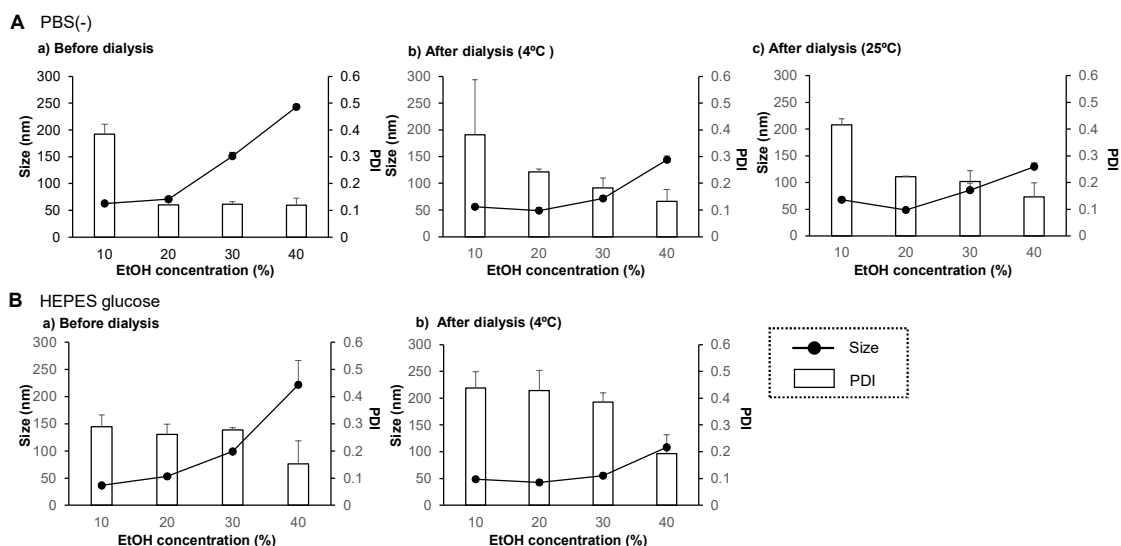


Fig. 1-2 CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]におけるエタノール希釈濃度が及ぼす物性

マイクロ流体デバイス調製時に用いた水相および透析溶媒での(A) PBS (-)および(B) HEPES glucose における CoQ₁₀- MITO-Porter [μ]の粒子径および PDI を示す。エタノール希釈濃度は 10、20、30 および 40%となるようにマイクロ流体デバイスを制御した。データは(a) before dialysis (マイクロ流体デバイス調製後)および透析時の温度が(b) 4°C、(c) 25°C のものである。(mean with S.D., n=3)

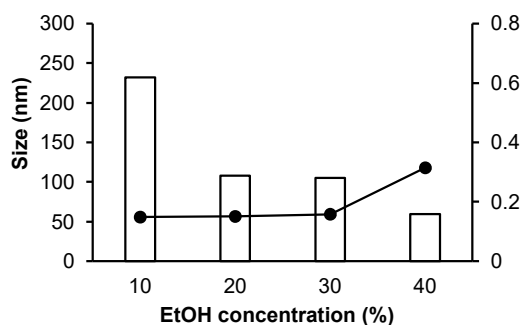
1-2 水相と透析の影響

今回、水相と透析溶媒は、PBS (-)を用いた。透析は、脂質ナノ粒子溶液を透析溶媒である緩衝液に置換し、エタノールを除去することができる。しかし、難水溶性分子である CoQ₁₀ を封入させた CoQ₁₀-MITO-Porter 溶液が緩衝液に置換することは、分散性や溶解性の観点から物性に影響を及ぼす可能性がある。また、無機塩がエマルション溶液中に存在すると塩析が生じ、粒子が凝集してしまうことがある。そこで、無機塩を含まない HEPES glucose を水相および透析溶媒として用い、PBS (-)との比較検討を行った (Fig. 1-2)。HEPES glucose においてエタノール希釈濃度が 10、20、30、40 %の時、粒子径はそれぞれ 36.6 ± 4.3 nm、 53.5 ± 2.4 nm、 98.9 ± 3.6 nm、 221.7 ± 44.7 nm であり、PDI はそれぞれ 0.289 ± 0.048 、 0.261 ± 0.038 、 0.277 ± 0.009 、 0.152 ± 0.085 であった (Fig. 1-2B-a)。そして透析後は、エタノール希釈濃度が 10、20、30、40 %の時、粒子径はそれぞれ 48.7 ± 4.0 nm、 42.7 ± 4.4 nm、 55.4 ± 5.0 nm、 108.2 ± 23.6 nm であり、PDI はそれぞれ 0.428 ± 0.061 、 0.428 ± 0.076 、 0.386 ± 0.035 、 0.192 ± 0.018 であった (Fig. 1-2B-b)。PBS (-)と HEPES glucose では、透析前後において粒子径の挙動は類似していたが、HEPES glucose の方が PDI は大きい傾向にあった。

HEPES glucose には糖が含有しているため、粘性が粒子の安定性に影響を及ぼす可能性がある。そこで、HEPES buffer を用いて同様の検討を行った (Fig. 1-3)。エタノール希釈濃度が 10、20、30、40 %の時、粒子径はそれぞれ 55.5 nm、56.6 nm、59.3 nm、117.8 nm であり、PDI はそれぞれ 0.619、0.288、0.281、0.159 であった (Fig. 1-3-a)。そして透析後は、エタノール希釈濃度が 10、20、30、40 %の時、粒子径はそれぞれ 89.0 nm、56.0 nm、44.0 nm、53.8 nm であり、PDI はそれぞれ 0.737、0.591、0.546、0.354 であった (Fig. 1-3-b)。HEPES glucose と HEPES buffer では、透析前後において粒子径と PDI ともに挙動が同じであった。有機化合物である HEPES が粒子の分散性に影響を与えた可能性がある。

透析過程は使用する溶媒だけでなく、温度も重要な因子になると考えられる。次に PBS (-)を透析溶媒とし、透析温度を 4°C および 25°C 条件下で行った (Fig. 1-2)。4°C 下では、エタノール希釈濃度が 10、20、30、40 %の時、粒子径はそれぞれ 56.3 ± 4.6 nm、 49.0 ± 6.0 nm、 71.7 ± 5.5 nm、 144.2 ± 7.0 nm であり、PDI はそれぞれ 0.382 ± 0.206 、 0.243 ± 0.011 、 0.183 ± 0.037 、 0.133 ± 0.044 であった (Fig. 1-2A-b)。そして 25°C 下では、エタノール希釈濃度が 10、20、30、40 %の時、粒子径はそれぞれ 67.9 ± 0.7 nm、 48.3 ± 0.2 nm、 85.5 ± 13.1 nm、 129.7 ± 6.9 nm であり、PDI はそれぞれ 0.416 ± 0.023 、 0.221 ± 0.003 、 0.204 ± 0.040 、 0.146 ± 0.052 であった (Fig. 1-2A-c)。2 時間という透析時間では、温度という因子は、粒子径や PDI に大きな影響を与えないと考えられた。

A Before dialysis



B After dialysis (4°C)

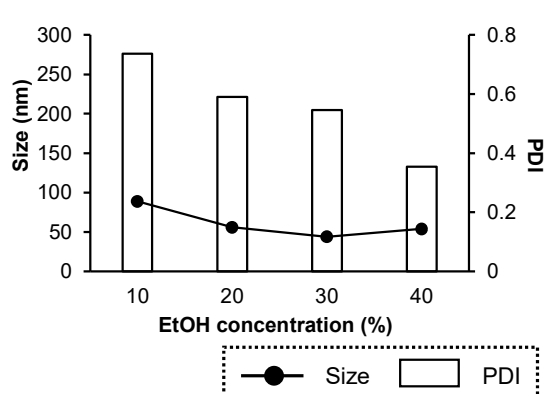


Fig. 1-3 HEPES buffer を用いた時の CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の物性

データは(A) before dialysis (マイクロ流体デバイス調製後)および(B) 4°C 透析時の平均粒子径および PDI を示す。(n=2)

1-3 安定性試験

調製した粒子の安定性を評価するために、遮光し、4°C および 25°C 条件下にて 14 日間の安定性試験を行った (Fig. 1-4)。4°C 条件下では、day 0 の粒子径は 45.5 ± 3.4 nm であり、day 14 の粒子径は 44.7 ± 2.8 nm であり、ほぼ一定であった。一方、25 °C 条件下では、day 0 の粒子径は 49.2 ± 5.9 nm であり、day 14 の粒子径は 86.4 ± 8.6 nm となり、経日的に粒子径が増大した。脂質ナノ粒子製剤の保存には、保存温度は重要なファクターとなり、低温保存する必要がある。

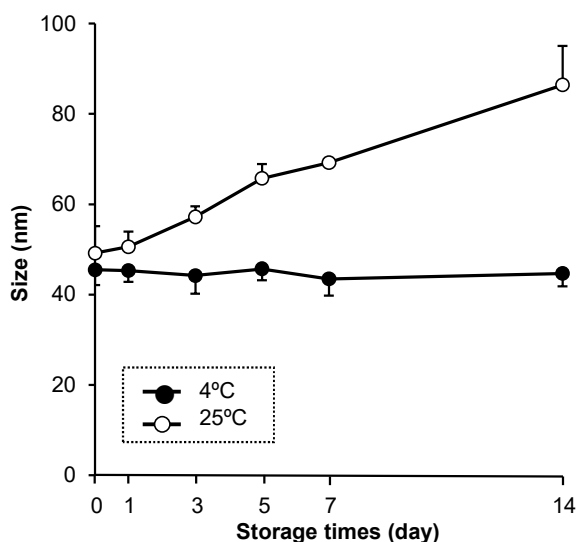


Fig. 1-4 CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の安定性評価

CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] を遮光下において、4°C (closed circles)および 25°C (open circles)にて保存した際の粒子径の変化を示す。透析時の平均粒子径を示す。(mean with S.D., n=3)

1-4 従来法およびマイクロ流体デバイスを用いた調製法の比較

従来法では、エタノール希釈法を用いて CoQ₁₀ の封入に成功している³⁵⁾。従来法での粒子 (CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]) の物性は、粒子径が 96.1±3.1 nm、PDI が 0.336±0.002、ゼータ電位が 8.8±0.5 mV であった (Fig. 1-5a, 5b, 5c, 水色プロット)。一方、マイクロ流体デバイスにて調製した後の CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] は、エタノール希釈濃度 20 %において、粒子径が 71.3±8.8 nm、PDI が 0.181±0.047、ゼータ電位が 19.3±2.2 mV であった (Fig. 1-5A, 5B, 5C, 橙色プロット)。透析後の CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] においては、粒子径が 48.4±4.4 nm、PDI が 0.247±0.019、ゼータ電位が 19.0±2.2 mV であった (Fig. 1-5A, 5B, 5C, 濃桃色プロット)。CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] と比較し、CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] は有意に均一性が向上した粒子調製できた。さらに、各調製法の調製の精度を評価するために変動係数 (Coefficient of Variation: CV) を算出した (Fig. 1-5D)。粒子径では、従来法が 0.082、透析前が 0.062 および透析後が 0.065 であった。PDI では、従来法が 0.192、透析前が 0.148 および透析後が 0.066 であった。ゼータ電位では、従来法が 0.171、透析前が 0.112 および透析後が 0.114 であった。CV 値からも、従来法と比較して透析前と透析後は小さな値を示し、均一な粒子が再現性良く調製できたことが示された。

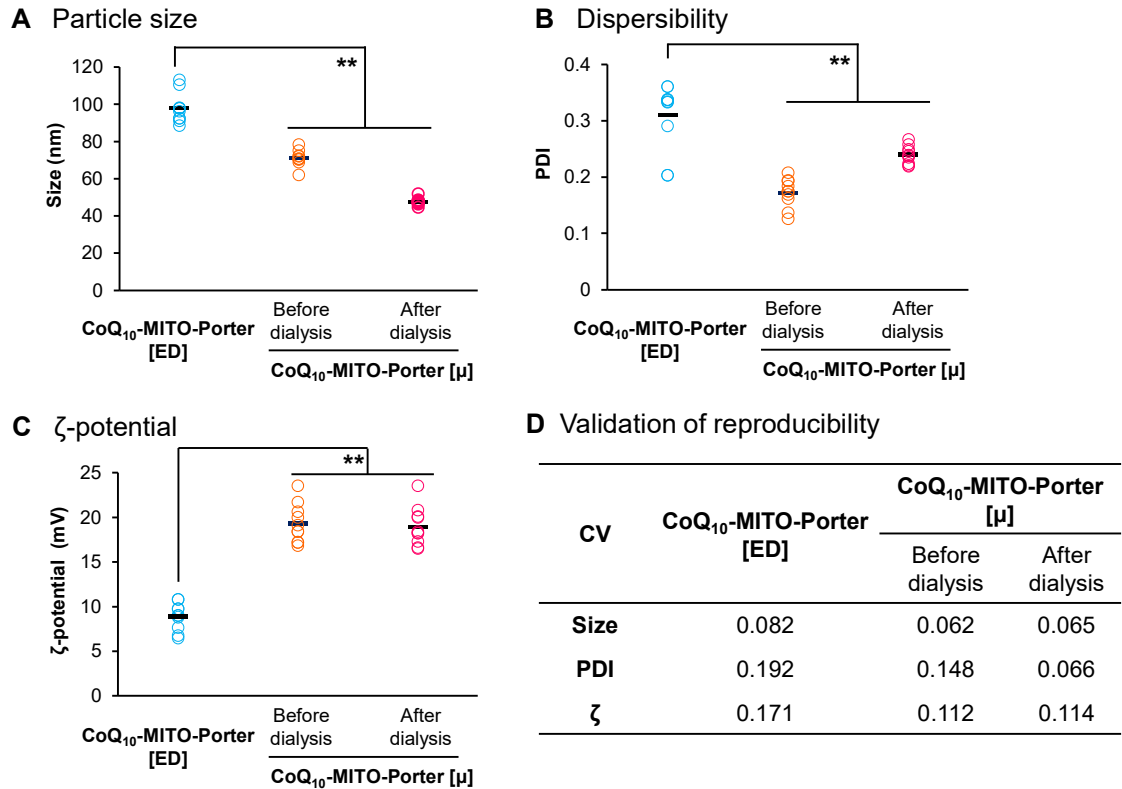


Fig. 1-5 CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]および CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]での物性比較

400 μL 単位で調製した CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]とエタノール希釈濃度 20%で調製した CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の(A) particle size, (B) PDI, (C) ζ-potential を示した。Circles は 10 個のサンプルデータ、bars は平均値 (n=10)を示す。(**p<0.01, vs. CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] by one-way ANOVA, followed by the Bonferroni test) (D) Coefficient of variation (CV)は調製の再現性の指標として(a)~(c)のデータを用いて算出した。

従来法とマイクロ流体デバイスを用いた調製法では、ゼータ電位において最も大きな違いがあった (Fig. 1-5C)。従来法にて調製した CoQ₁₀-MITO-Porter はゼータ電位が 8.8±0.5 mV であるのに対し、マイクロ流体デバイスを用いることで、ゼータ電位は約 20 mV であった。ゼータ電位が正に帯電するのは STR-R8 が粒子表面に修飾されるためである。従来法において、マイクロ流体デバイスを用いた調製法よりもゼータ電位が低い値を示したのは、STR-R8 が安定的に修飾されていない可能性があった。STR-R8 を脂質ナノ粒子に修飾する際の懸濁液ボリュームに起因するという仮説が考えられた。そこで、調製量の違いにより物性に变化が生じるか従来法とマイクロ流体デバイスを用いた調製法にて比較検証した (Table 1-1)。

調製量は、100 µL および従来法の調製上限量である 400 µL とした。従来法において、100 µL の時、粒子径が 90.6±5.9 nm、PDI が 0.252±0.047、ゼータ電位が 17.9±2.7 mV であり、400 µL の時、粒子径が 96.1±3.1 nm、PDI が 0.300±0.085、ゼータ電位が 9.8±0.9 mV であった。一方、マイクロ流体デバイスを用いた調製法において、100 µL の時、粒子径が 86.1±1.4 nm、PDI が 0.210±0.015、ゼータ電位が 16.1±1.2 mV であり、400 µL の時、粒子径が 86.1±1.8 nm、PDI が 0.168±0.026、ゼータ電位が 17.8±0.6 mV であった。したがって、従来法において STR-R8 を安定的に修飾する調製上限量は、100 µL という少量単位であった。しかし、マイクロ流体デバイスを用いた調製法では、容量に依存することなく、安定的な STR-R8 の修飾を達成できた。

Table 1-1 異なる調製量での CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]および CoQ₁₀-MITO-Porter [µ]での物性比較

	CoQ ₁₀ -MITO-Porter [ED] (Ethanol Dilution Method)		CoQ ₁₀ -MITO-Porter [µ] (After Microfluidic Device Preparation)	
調製量 (µL)	100	400	100	400
平均粒子径 (nm)	91 ± 5.9	96 ± 3.1	86 ± 1.4	86 ± 1.8
PDI	0.252 ± 0.047	0.300 ± 0.085	0.210 ± 0.015	0.168 ± 0.026
ζ-電位 (mV)	18 ± 2.7	10 ± 0.9	16 ± 1.2	18 ± 0.6

調製量は、100 µL および 400 µL とした。調製した CoQ₁₀-MITO-Porter の平均粒子径 (nm)、polydispersity index (PDI)、ζ-電位 (mV)を示す。(mean with S.D., n=3)

従来法とマイクロ流体デバイスを用いた調製法の最終産物 (以下、透析後)を比較した結果を Table 1-2 に示した。粒子径は、従来法が 96.1±3.1 nm および透析後が 48.3±0.2 nm であり、マイクロ流体デバイスを用いることで粒子径が約 1/2 倍小さくなった。PDI は、従来法が 0.336±0.002 および透析後が 0.221±0.003 であり、マイクロ流体デバイスを用いた方が従来法よりも均一な粒子形成が可能であった。ゼータ電位は、従来法が 11.1±6.4 mV および透析後が 21.5±1.8 mV であり、マイクロ流体デバイスを用いることで安定的な STR-R8 の修飾に成功した。また調製量は、従来法の上限が約 400 µL であるのに対し、マイクロ流体デバイスを用いた調製法では、実験室レベルにおいても L 単位の調製が可能である。CoQ₁₀ 回収率は従来法が 67.9±19.4 % および透析後が 72.8±6.7 % (透析前:81.2±9.1 %)であった。Drug/Lipid (w/w)は従来法が 0.36±0.06 および透析後

が 0.19 ± 0.03 (透析前: 0.20 ± 0.03) であった。CoQ₁₀ はマイクロ流体デバイスを用いた調製法においても封入が可能であった。

Table 1-2 各パラメーターでの CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] および CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] での物性比較

Parameters	CoQ ₁₀ -MITO-Porter [ED] (Ethanol Dilution Method)	CoQ ₁₀ -MITO-Porter [μ] (After dialysis)
調製量	上限: ~400 μL	L オーダー
CoQ ₁₀ 回収率 (%)	67.9 ± 19.4	72.8 ± 6.7
Drug/Lipid (w/w)	0.36 ± 0.06	0.19 ± 0.03
調製時間	150 min / 400 μL	0.8 min/400 μL (追加時間 (透析): 124 min)

(mean with S.D., n=5-10)

1-5 細胞取り込み評価

各調製法の CoQ₁₀-MITO-Porter の細胞取り込みを評価するために、子宮頸がん HeLa 細胞に脂質量に対して 0.5 mol% の NBD-DOPE を修飾させた CoQ₁₀-MITO-Porter を添加した (Fig. 1-6)。NBD-DOPE 修飾 CoQ₁₀-MITO-Porter の物性は、CoQ₁₀-MITO-Porter[μ] では、粒子径が 46.4 ± 2.2 nm およびゼータ電位が 20.0 ± 0.1 mV であった。比較対象である従来法において、低電位を示した CoQ₁₀-MITO-Porter[ED] (L-ζ) は粒子径が 81.4 ± 5.5 nm およびゼータ電位が 5.7 ± 1.5 mV、高電位を示した CoQ₁₀-MITO-Porter[ED] (H-ζ) は粒子径が 79.1 ± 4.7 nm およびゼータ電位が 16.5 ± 1.6 mV であった (Table 1-3)。フローサイトメーターを用いた細胞取り込み評価より、CoQ₁₀-MITO-Porter[μ] の方が、CoQ₁₀-MITO-Porter[ED] と比較して粒子の取り込みが有意に多かった (Fig. 1-6)。CoQ₁₀-MITO-Porter[ED] においては、電位が高い方が取り込みは高かった。したがって、粒子径は小さく、粒子の表面電位は正に帯電している方が細胞に取り込まれやすいことが示された。

Table 1-3 NBD 標識 CoQ₁₀-MITO-Porter の物性

Sample	平均粒子径 (nm)	ζ-電位 (mV)
CoQ ₁₀ -MITO-Porter [μ]	46 ± 2.2	20 ± 0.1
CoQ ₁₀ -MITO-Porter [ED] (L-ζ)	81 ± 5.5	6 ± 1.5
CoQ ₁₀ -MITO-Porter [ED] (H-ζ)	79 ± 4.7	17 ± 1.6

細胞取り込み評価 (Fig. 1-5) および細胞局在観察 (Fig. 1-6) に用いた NBD 標識 CoQ₁₀-MITO-Porter の物性を示す。(mean with S.D., n=3)

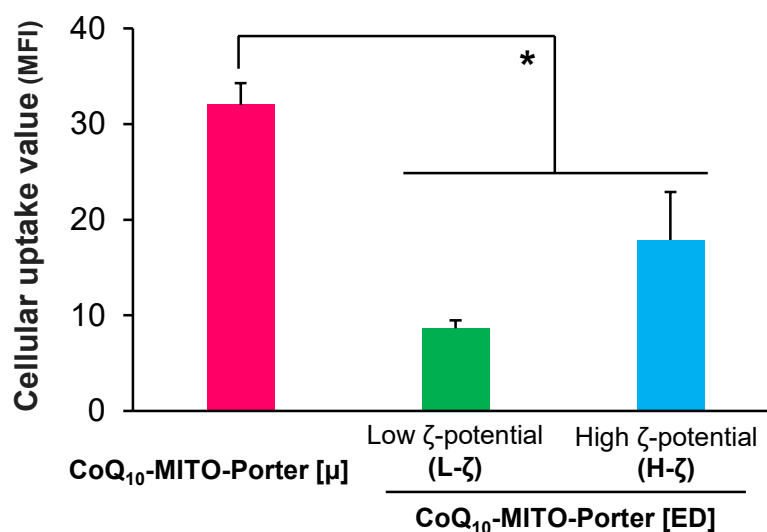


Fig. 1-6 HeLa 細胞における CoQ₁₀-MITO-Porter の細胞取り込み評価

CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]、CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] (L-ζ)および CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] (H-ζ)の細胞取り込みの結果を示す。本実験では、NBD 標識した CoQ₁₀-MITO-Porter を用いた。

(mean with S.D., n=3, *p<0.05, vs. CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] by one-way ANOVA, followed by the Bonferroni test)

1-6 細胞内動態観察

CoQ₁₀-MITO-Porter の細胞内動態を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy: CLSM)を用いて観察した結果、CoQ₁₀-MITO-Porter[ED]と比較して CoQ₁₀-MITO-Porter[μ]は、多くのシグナルが観察された (Fig. 1-7A-a)。さらに、CoQ₁₀-MITO-Porter は、共局在 (yellow dots)が観察されたため、ミトコンドリアへの集積も確認することができた (Fig. 7A-b, d, f)。CoQ₁₀-MITO-Porter[ED]は、ヘテロジェネイティーな細胞内動態であったのに対し (Fig. 7A-c, e)、CoQ₁₀-MITO-Porter[μ]は、ホモジェネイティーな粒子送達が見られた (Fig. 1-7A-a)。顕微鏡観察の結果から、細胞取り込み陽性率およびミトコンドリア占有率を算出した。細胞取り込み陽性率は、CoQ₁₀-MITO-Porter[μ]は 90%以上を示し、CoQ₁₀-MITO-Porter[ED]よりも有意に高かった (Fig. 7B)。ミトコンドリアへの占有率もまた、CoQ₁₀-MITO-Porter[μ]の方が CoQ₁₀-MITO-Porter[ED]よりも有意に高かった (Fig. 7C)。したがってマイクロ流体デバイスが生み出す微小な粒子サイズは、細胞取り込みおよびミトコンドリア導入を大幅に向上させた。

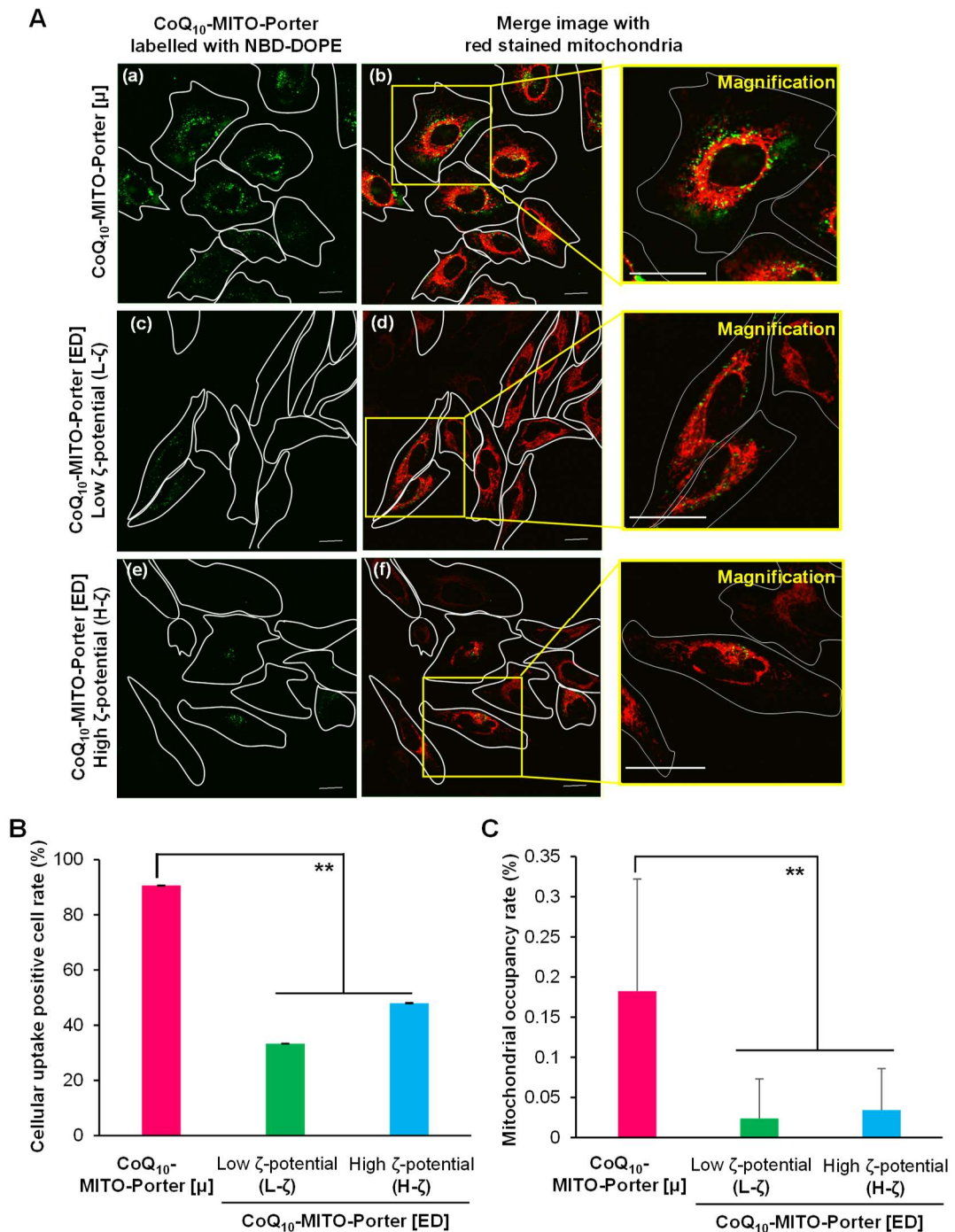


Fig. 1-7 HeLa 細胞における CoQ₁₀-MITO-Porter の細胞内局在観察

HeLa 細胞に NBD 標識した CoQ₁₀-MITO-Porter をそれぞれ添加しインキュベートした。Mito Tracker Deep Red でミトコンドリアを染色し、CLSM にて細胞内局在を観察した。(a) NBD-DOPE (緑色): CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] (a and b), CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] (L- ζ) (c and d), CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] (H- ζ) (e and f), Mito Tracker Deep Red (赤色)、共局在 (黄色)を示す。Scale bars: 20 μ m

顕微鏡画像に基づき、(b) 細胞取り込み陽性率 (n=68-92)、(c) ミトコンドリア占有率 (n=20-30)を算出した。

(**p<0.01, vs. CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] by one-way ANOVA, followed by the Bonferroni test)

考察

マイクロ流体デバイスを用いた調製法により、エタノール希釈濃度が 20 %の時、粒子径が約 70 nm となり、透析後は約 50 nm の均一で微小な粒子が形成された (Fig. 1-2A-a)。この時の CoQ₁₀ 回収率は 81.2±9.1% (n=10)であり、Drug/Lipid (w/w)が 0.20±0.03 (n=10)であったので、CoQ₁₀ の封入にも成功した。水相に用いる緩衝液のような水溶液による急速な脂質溶液の希釈は、微細なサイズの粒子形成を可能にする^{63, 68)}。本研究で使用したマイクロ流体デバイス (iLiNP)は、10 組のバップル構造を有しており、総流速 500 μL/min において十分に緩衝液と脂質溶液が混合されることを確認している⁶⁷⁾。エタノール濃度の狭い濃度勾配では、脂質二重層が臨界エタノール濃度でしか会合できないので、粒子径が小さく、粒度分布もシャープな粒子が調製される。エタノール希釈濃度が 10%の時、62.6±0.1 nm と最も粒子径が小さくなったものの、PDI は、0.385±0.038 となり、粒度分布からも多分散であった (Fig. 1-2A-a)。これは、今回使用した脂質濃度や CoQ₁₀ 濃度が高かったために、急速なエタノールの希釈により粒子形成に関与できなかった材料が析出し、または粒子同士が凝集した可能性がある。

透析をすると粒子径が減少する要因は、脂質ナノ粒子溶液からエタノールが除去され、完全に透析溶媒に置換され、脂質間の疎水性相互作用が強まるからである。さらに CoQ₁₀ は難水溶性分子なので水溶液との接触を避けようとするため、より一層疎水性相互作用が強まり、粒子径が小さくなったと考えられた。

水相と透析に用いる溶媒には、PBS (-)が最適であった (Fig. 1-2A)。本研究は、ナノ医薬品化を目指した CoQ₁₀-MITO-Porter の注射剤化への橋渡しの検討である。注射剤を生体に用いる時は浸透圧や p に注意して投与する必要がある。注射剤を等張化するには、塩化カリウムや塩化ナトリウムなどの電解質、またはブドウ糖や D-マンニトールなどの糖類を含有させる。一般的に生理食塩水は、輸液および注射剤として使われるので、リン酸緩衝液 PBS (-)を 1 つの候補として試みた。一方で、PBS (-)による塩の影響を考慮し、塩を含まない HEPES glucose や糖を含まない HEPES buffer での検討を行ったが、PBS (-)よりも PDI が増大する傾向にあった (Fig. 1-2B, Fig. 1-3)。したがって、分散性を安定させるためには、glucose による粘性も重要な場合もあるが、HEPES のような有機物化合物が含有していない PBS (-)の方が適していた。

透析温度の検討は、4℃と 25℃を試みた。4℃は生理活性物質が失活せず、衛生面からも無菌的である。一方、25℃は温度管理が容易で、低コストで扱いが簡便である。その結果、PBS (-)を用いた時、透析温度の違いによる粒子径と PDI の大きな変化は見られなかった (Fig. 1-2A-b, c)。これは温度に依存せず、良好な粒子を得ることができるので、調製したい粒子の状況に合わせて温度を選択できることになる。難水溶性分子である CoQ₁₀は温度が高いほど溶解性が良好である。今回は、マイクロ流体デバイスを用いた調製は室温下で行っているため、急激な温度変化を避け、CoQ₁₀の溶解性を保持するために 25℃で透析操作を行うこととした。

安定性試験を行った結果、4°C で保存した方が 25°C よりも粒子径が増大せず、安定であった (Fig. 1-4)。温度が高いと熱運動が盛んになるため、粒子間の衝突頻度が上がり、粒子の凝集や崩壊が起こり、25°C では粒子径が増大したと考えられた。一方、4°C 条件下では、分子の熱運動を抑制できるため粒子径が約 50 nm のまま推移したと思われた。したがって、ナノカプセル製剤を保存するためには、4°C が適していることが示された。

従来法およびマイクロ流体デバイスを用いた調製法での粒子の物性を比較した結果、マイクロ流体デバイスを用いた調製により、均一性が向上し、微小な粒子が再現よく調製できた (Fig. 1-5, Table 1-1)。透析後の CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]における CoQ₁₀ 回収率は、72.8±6.7 %であり、Drug/Lipid (w/w)は 0.19±0.03 なので、CoQ₁₀は脂質ナノ粒子に封入できている (Table 1-2)。従来法では、最大調製量が約 400 μL であり、限外ろ過過程において凝集物が析出するとフィルターに目詰まりが生じやすく、調製時間を制限しており、最短で 150 min/400 μL である。一方、マイクロ流体デバイスを用いた調製法では、500 μL/min で粒子調製ができ、短時間で大量の調製が可能である。マイクロ流体デバイスの流速は 1 デバイスあたり最大で 1000 μL/min まで上げられる。今後、最適な薬物の可溶化方法やマイクロ流体デバイスの開発の検討が必要である。

調製量の違いによる検討において、従来法では調製ボリュームによってゼータ電位の値が一定とならず、これは電荷を有する STR-R8 の修飾の成否に問題があることが判明した (Table 1-2)。従来法にて STR-R8 を確実に表面修飾させるには、100 μL という少量単位で行わなければならない。これは、スケールアップの面から重大な問題となり得る。一方、マイクロ流体デバイスを用いた調製法では、容量に依存することなく、粒子径、PDI およびゼータ電位において均一な調製が可能であった。また、400 μL よりも多い調製量であっても再現性の高い粒子調製が可能であることを確認している (データ非表示)。したがって、マイクロ流体デバイスを用いた調製法は、均一・微小化・大量調製を実現するだけでなく、STR-R8 のような機能性素子を粒子表面に修飾させるためにも有用であることが示唆された。

マイクロ流体デバイスにて調製した粒子と従来法で調製した粒子とで細胞取り込み能およびミトコンドリア局在を評価したところ、CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の方が、細胞導入能およびミトコンドリア移行能の両方で CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]よりも優れていた (Fig. 1-6, Fig. 1-7)。理論的および実験的な研究より、効率の良い細胞取り込みを達成するための最小粒子半径は、約 20~30 nm (最小粒子径:約 40~60 nm)であった⁷⁰⁾。したがって、CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]は、従来法よりも粒子径が 1/2 倍小さい約 50 nm であるため、効率良くエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれ、さらに取り込まれる粒子数も多くなったと考えられた。

従来法での低電位と高電位の粒子の細胞取り込み評価の結果より、正に帯電した粒子の方が取り込み量は多かった (Fig. 1-6)。STR-R8 は細胞透過性ペプチドであり、細胞での Rac たんぱく質の活性化を誘導し、アクチン骨格の重合を促し、細胞膜表面で波打ち構造を生じることでマクロピノサイトーシスを引き起こす^{71,72)}。今回の研究では、脂質量を揃えて HeLa 細胞に CoQ₁₀-MITO-Porter を添加した。細胞に取り込まれる粒子サイズと粒子数はナノ粒子上に発現するリガンドの密度に依存する⁷³⁾。マイクロ流体デバイスで調製したような微小な粒子は、表面積が大きくなるため、

細胞膜との接触が増えると思われる。粒子表面の STR-R8 との接触も増え、効率的なマクロピノサイトーシスが起きたと思われた。

従来法で調製した粒子はゼータ電位が安定していないことから、マイクロ流体デバイスで調製した粒子とは STR-R8 の粒子表面への組み込まれ方が異なるため、効率的なマクロピノサイトーシスを誘導できなかったのかもしれない。マイクロ流体デバイスで調製した粒子は粒子サイズと正に帯電した STR-R8 の相乗効果により、HeLa 細胞への取り込みが増大したと推察される。細胞への取り込みメカニズムは、今後も詳細な検討が必要である。

Y. Morikawa らは、BCS クラス 4 に属するクルクミンをモデル薬物とし、約 200 nm の polyoxyethylene (PEG) 化 Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) ナノ粒子の調製に成功している⁷³⁾。マイクロ流体デバイスを用いた CoQ₁₀-MITO-Porter の調製は、BCS クラス 4 薬物である CoQ₁₀ の封入を達成した。BCS クラス 4 薬物は難水溶性が原因となり、注射剤化することが困難である。医薬品開発では本来、注射剤から始まり、バイオアベイラビリティがよいものを経口剤に剤形変化することが主流である。しかし、難水溶性分子はその流れに逆行するしかない。したがって、本技術は、既存薬だけでなく、BCS クラス 4 に分類されるような多くの難水溶性分子を含む開発候補薬物の可溶化技術として利用拡大に貢献でき、注射剤への応用も期待される。

今回使用した難水溶性薬物のモデルである CoQ₁₀ は一般的に安全な物質であり、治療効果を得るために多量の CoQ₁₀ を投与することが可能である。しかし、毒性の強い薬物を投与した場合、副作用を軽減する観点から、特定の組織への標的化が非常に重要な課題となる。さらに、先行研究において、細胞内動態を制御することにより CoQ₁₀ のミトコンドリアへの集積を促進させることが大きな治療効果を示すことが報告されている^{44, 74-77)}。本技術は、ナノ粒子を適切な機能素子で修飾することにより薬物の生体内分布と細胞内動態を制御することが可能である。これにより、CoQ₁₀ のような難水溶性薬物を標的部位に高濃度で集積させ、副作用を回避して治療効果を高めることが期待できる。

脂質ナノ粒子の製造工程のスケールアップは、実用化に向けて非常に重要な課題である。マイクロ流体工学において NanoAssemblr™ は、スケールアッププロセスでの使用に適したデバイスとしてよく知られている⁷⁸⁾。NanoAssemblr™ にはカオテックミキサー構造が導入されており、本研究で用いた iLiNP にはバップルミキサー構造が導入されている。ミキサー構造は異なるが、iLiNP は、混合効率は優れているため、スケールアッププロセスでの使用に適していると結論づけた。現在、iLiNP を用いたスケールアップに関する研究を実施中である。

第二章

In vivo に適した CoQ₁₀ 搭載 ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子の構築

緒言

脂質ナノ粒子やリポソームなどのナノキャリアは、物質を内封することによって、標的部位での有効成分の吸収や持続性の向上、副作用の軽減および安定性の向上などの効果がある。さらにナノキャリアは、低分子、高分子、タンパク質、核酸など多様な物質の内封が可能であり、サイズ制御や粒子表面への機能性素子の修飾により、目的に応じた設計が自在である^{59,60)}。1995年にドキシル(ドキソルビシン封入 polyethylene glycol (PEG)化リポソーム)が脂質を基本組成とする製剤として承認されて以来、ナノ医薬品は欧米で 27 個の製剤が承認され⁷⁸⁻⁸²⁾ (Fig. 2-1)、coronavirus disease (COVID)-19 ワクチンの登場により、DDS のポテンシャルを再認識させ、現在も治験や医薬品開発が盛んに行われている⁷⁸⁻⁸³⁾。

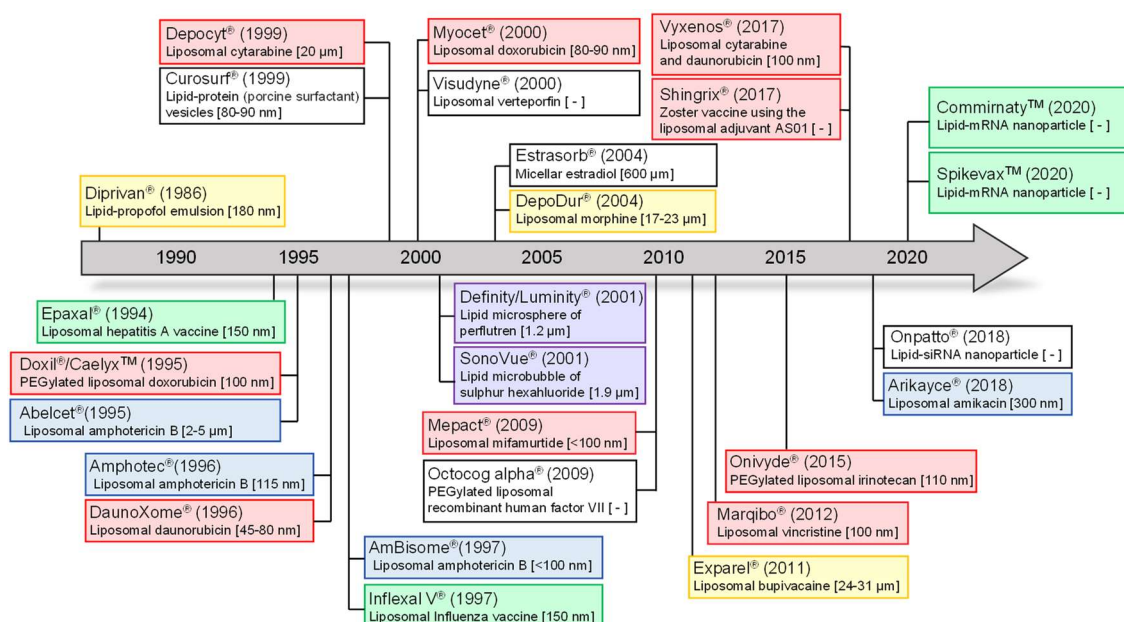


Fig. 2-1 欧米諸国で承認されている代表的なナノ医薬品

欧米諸国で承認されたナノ医薬品の商品名、承認年、製剤形態および粒子径 (不明なものは未記載)を記す⁷⁸⁻⁸³⁾。赤枠: 抗がん剤・がん免疫治療薬、青枠: 抗真菌薬・抗生物質、緑枠: ワクチン、黄色枠: 麻酔薬・鎮痛薬、紫枠: 超音波造影剤、白枠: その他

近年、マイクロ流体デバイスはナノ粒子の調製技術として注目されている。流体制御および脂質溶液と緩衝液との混合による製剤化手法は、1 つの工程で容易にナノ粒子調製が可能である。マイクロ流体デバイスを用いた調製法は、実験室から good manufacturing practice (GMP)レベルへのスケールアップや連続的な大量調製が可能である。さらに、総流速、混合する溶液の総流速、使用する溶媒といった調製パラメーターを設定することで、ナノ粒子のサイズ制御や再現性の高い製剤を得ることができる⁸⁴⁻⁸⁶⁾。

マイクロ流体デバイスを用いて難水溶性分子をナノ粒子搭載した例は、Poly-Lactide-co-Glycolide Acid (PLGA)、固体脂質ナノ粒子、ニオソームなどのナノキャリアを用いられることが多い^{87, 88, 90, 93)}、リン脂質を主要構成成分とする脂質ナノ粒子やリポソームへの応用例は少ない^{62, 89, 91, 92)}(Table 2-1)。難水溶性薬物である CoQ₁₀ モデル薬物としてマイクロ流体デバイスを用いてナノキャリアに搭載した例は固体分散体をベースとしたエマルションであり、粒子径が 150 nm で薬物搭載率は低い⁹³⁾。

マイクロ流体デバイスを用いて、ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子である“MITO-Porter”に CoQ₁₀ の搭載成功し (CoQ₁₀-MITO-Porter)、スケールアップとともに高い調製の再現性を実現した⁹⁴⁾。さらに CoQ₁₀-MITO-Porter は粒子径制御が可能となり、約 50 nm の微小粒子は細胞取り込みやミトコンドリア移行性の向上を確認した。本章では、マイクロ流体デバイスを用いた CoQ₁₀-MITO-Porter における PEG 脂質および R8 の関連性を検証した。さらに、CoQ₁₀-MITO-Porter の限外ろ過による濃縮法の構築を試み、*in vivo* への適応が可能か acetaminophen (APAP)肝障害マウスを用いて評価した。

Table 2-1 マイクロ流体デバイスを用いた難水溶性分子の搭載例

モデル薬物	BCSクラス	研究目的 (物性)	ナノキャリア	マイクロ流体デバイス	物性	機能評価	Refs.
プロポフォール	2	可溶性 (単純水和法との比較)	リポソーム	カオテックミキサー	粒子径: 50~450 nm 薬物搭載率: 41 mol% 2カ月間安定 (4°C, 25°C)		62
バクリタキセル	2	・粒子径制御 (微小化) ・薬物搭載効率改善	PLGA (ミセル)	クロスフローチップ (X字) マイクロミキサーチップ (Y字)	粒子径: 30~130 nm クロスフローチップ: 80 nm, 3.4 wt% マイクロミキサーチップ: 40 nm, 1.8 wt%		87
BRP-187	-	製剤の最適化 (可溶性、薬物搭載率向上)	PLGA (ミセル)	カオテックミキサー	粒子径: 121~259 nm PDI: 0.05~0.2 薬物搭載率: 0.5~7.29 %		88
18- α -グリチルリチン酸	-	・可溶性 ・皮膚浸透性向上	エタノール含有 リポソーム	マイクロミキサーチップ (T字)	粒子径: 200 nm 薬物回収率: 63% 30日間安定 (4°C)	・ヒト角化細胞株 (HaCaT) に対する細胞毒性なし ・ヒト皮膚機微膜を用いた皮膚透過試験 → 皮膚透過性向上 (薬物懸濁液の8倍)	89
バラノカルボール	-	製剤の最適化 (可溶性、BA向上)	ニオソーム	カオテックミキサー	粒子径: 175 nm PDI: 0.088 薬物封入効率: 40%	卵巣癌細胞株 (A2780) およびヒト乳癌細胞株 (ZR-75-1) における抗腫瘍活性	90
クルクミン	4	製剤の最適化 (可溶性、BA向上)	リポソーム リポデイスク	カオテックミキサー	粒子径: 110 nm (リポソーム) 40 nm (リポデイスク) 薬物封入効率: 80 %, 8日間安定 (4°C)	<i>in vivo</i> ラットにおける薬物動態評価 → 製剤化により薬物動態 (AUC、クリアランス、分布容積) 改善	91
クルクミン	4	・薬物搭載効率改善 ・安定性向上 ・単純水和法との比較	脂質ナノ粒子	カオテックミキサー	粒子径: 120 nm 薬物搭載率: 17 wt% 3週間安定 (4°C)	担癌モデルマウスに対する シスプラチン+クルクミン併用療法 → 抗腫瘍効果向上、シスプラチンによる腎毒性軽減	92
コエンザイムQ ₁₀	4	・有効成分の光安定性 ・安定性向上	固体分散体 (エマルジョン)	高圧式マイクロ流体デバイス	粒子径: 151 nm 薬物搭載率: 2.5 %, 封入効率: 100 % 光安定性 (24時間)、1年間安定 (室温)	ラット皮膚を用いた皮膚透過試験 → 表皮浸透性の向上	93

AUC: area under the concentration-time curve, BA: bioavailability.

BRP-187: 4-(4-chlorophenyl)-5-(4-(quinoline-2-ylmethoxy)phenyl)isoxazol-3-carboxylic acid (ロイコトリエン合成阻害薬)

結果

2-1 CoQ₁₀-MITO-Porter の構造評価

マイクロ流体デバイスを用いて調製した CoQ₁₀-MITO-Porter の構造評価を行った。透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope: TEM) 観察の結果、CoQ₁₀-MITO-Porter は約 50 nm の球形の粒子が観察された (Fig. 2-2A)。さらに粒子の内部構造を評価するために小角 X 線散乱 (small angle X-ray scattering: SAXS) 測定を行った (Fig. 2-2B)。SAXS 測定では、散乱プロファイルから粒子の粒度分布、粒子形状、粒子構造などを予測することができる。測定には CoQ₁₀ 搭載の有無により脂質ナノ粒子形成に違いがみられるか比較するために CoQ₁₀-MITO-Porter および empty-MITO-Porter の 2 種類を用いた。CoQ₁₀-MITO-Porter (青プロファイル) は 0.8 nm^{-1} 、empty-MITO-Porter (赤プロファイル) は 0.9 nm^{-1} にブロードなピークが出現した。SAXS 測定において、ラメラ構造を有するナノ粒子ではシャープなピーク、周期構造を有さない不規則なナノ粒子ではブロードなピークが確認される^{95, 96)}。CoQ₁₀-MITO-Porter および empty-MITO-Porter は、ブロードなピークが確認されたことから、ラメラ構造を有さない密な構造体であると推察された。これは TEM 観察の結果と相関していた。また CoQ₁₀ の有無により、MITO-Porter の内部構造は変化しないことが分かった。さらにピークの位置は粒子サイズを反映し、小さな粒子である程、ピークは広角側にシフトする⁹⁷⁾。empty-MITO-Porter は CoQ₁₀-MITO-Porter よりもピークが広角側にシフトしているため、粒子径が小さいと予想され、これは物性評価の結果と一致した (Table 2-2)。

したがって、CoQ₁₀-MITO-Porter は約 50 nm の球形の粒子形状をしており、その内部は非ラメラ構造を形成していることが示唆された。

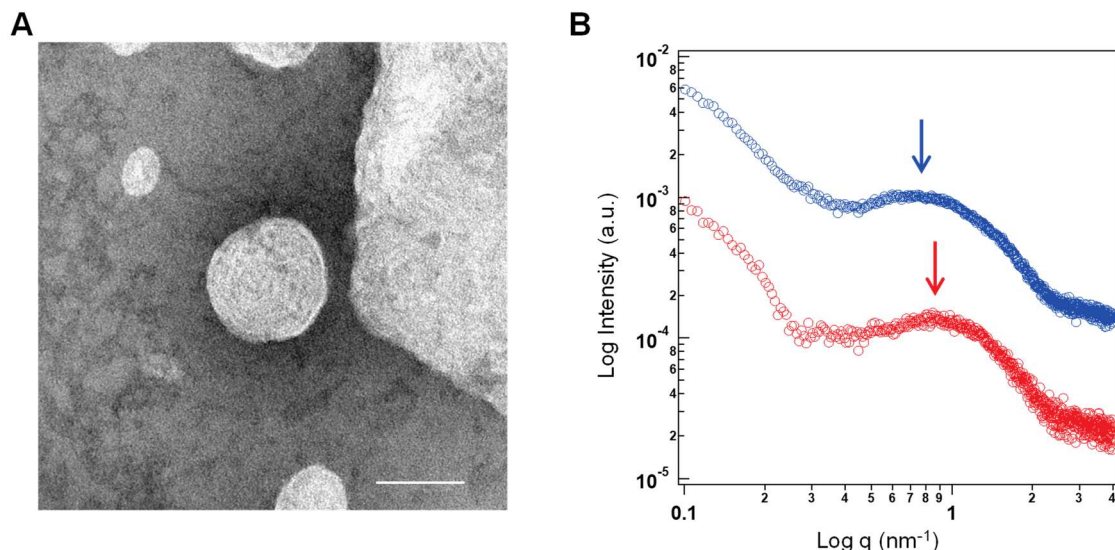


Fig. 2-2 CoQ₁₀-MITO-Porter の TEM 観察および SAXS 測定

(A) マイクロ流体デバイスにて調製した CoQ₁₀-MITO-Porter を電子顕微鏡にて観察した。Scale bar: 50 nm

(B) CoQ₁₀-MITO-Porter および empty-MITO-Porter の SAXS 測定をした。CoQ₁₀-MITO-Porter (青プロファイル) および empty-MITO-Porter (赤プロファイル) のピークは矢印で示す。

Table 2-2 SAXS 測定に用いた各 MITO-Porter

Sample	平均粒子径 (nm)	PDI	ζ-電位 (mV)
CoQ ₁₀ -MITO-Porter	51.5	0.327	8.5
Empty-MITO-Porter	40.8	0.371	11.2

調製した各 MITO-Porter の平均粒子径 (nm)、polydispersity index (PDI)、ζ-電位 (mV)を示す。(n=1)

2-2 マイクロ流体デバイスを用いた粒子調製における PEG および R8 の影響

CoQ₁₀-MITO-Porter の脂質組成は DOPE/SM/CoQ₁₀/STR-R8/DMG-PEG2000=9/2/1.8/1.1/0.33 であり、脂質に対して PEG は 3%、R8 は 10%の比率で含有させている。MITO-Porter の脂質の構造式を Fig.2-3 に示した。DOPE は 1 級アミンカチオンとリン酸水素イオン、SM は 4 級アミンカチオンとリン酸水素イオンをそれぞれ持つ中性脂質である。STR-R8 は塩基性アミノ酸であるアルギニンとステアリル基から成る機能性素子である。STR-R8 は正電荷を付与するため、粒子表面に配置することで静電的反発力により、安定な分散体の形成が見込める。PEG 脂質は負に帯電し、静電的反発力とともに、水和層も形成するため、粒子表面に優先的に配置されやすく、表面積対体積比を増加させることで、粒子サイズを減少させる特徴をもつ。DMG-PEG2000 は、PEG 脂質の中でも比較的短い炭素鎖であるミリストイル基を持つため、脱離しやすく、血中滞留性よりも製剤の安定性やナノ粒子の微小化を目的に組成に組み込まれることが多い⁷⁷⁾。CoQ₁₀-MITO-Porter のような脂質ナノ粒子が溶液中で安定な分散系を維持するためには、粒子間の静電的反発力や水和層の形成が影響すると思われる。そこで、マイクロ流体デバイスを用いた粒子調製における PEG および R8 の影響を評価した (Fig. 2-4, 2-5)。CoQ₁₀ の有無による影響も考えるために、empty-MITO-Porter も調製した。粒子径は動的光散乱 (Dynamic Light Scattering:DLS)を使用して測定され、DLS において多分散性指数 (polydispersity index:PDI)は、粒度分布の幅の指標である。PDI は、0~1 の範囲で定義され、値が小さいほど単分散で良好な粒子形成が見込まれ、0.5 以上の値は多分散と評価され、ナノキャリア製剤として不適切とされる。

マイクロ流体デバイスで調製後の CoQ₁₀-MITO-Porter の粒子径は、PEG 有 R8 有が 43.9±2.1 nm、PEG 無 R8 有が 899.9±393.3 nm、PEG 有 R8 無が 37.2±4.4 nm、PEG 無 R8 無が 4075.3±1467.8 nm であった (Fig. 2-4A-a)。マイクロ流体デバイスで調製後の CoQ₁₀-MITO-Porter の PDI は、PEG 有 R8 有が 0.233±0.007、PEG 無 R8 有が 0.266±0.065、PEG 有 R8 無が 0.183±0.025、PEG 無 R8 無が 0.860±0.156 であった (Fig. 2-4A-b)。そして、透析後の CoQ₁₀-MITO-Porter の粒子径は、PEG 有 R8 有が 54.4±4.8 nm、PEG 無 R8 有が 387.9±54.2 nm、PEG 有 R8 無が 56.4±3.6 nm、PEG 無 R8 無が 7447.5±1302.1 nm であった (Fig. 2-4B-a)。透析後の CoQ₁₀-MITO-Porter の PDI は、PEG 有 R8 有が 0.233±0.007、PEG 無 R8 有が 0.266±0.065、PEG 有 R8 無が 0.183±0.025、PEG 無 R8 無が 0.860±0.156 であった (Fig. 2-4B-b)。CoQ₁₀-MITO-Porter の調製において、粒子を微小化し、安定な分散性を維持するためには、PEG 脂質の有無が大きく影響していることが示された。一方で、マイクロ流体デバイスで調製後の empty-MITO-Porter の粒子径は、PEG 有 R8 有が 34.2±6.7 nm、PEG 無 R8 有が 60.1±2.4 nm、PEG 有 R8 無が 35.2±4.2 nm、PEG 無 R8 無が 1433.3±352.0 nm であった (Fig. 2-4C-a)。マイクロ流体デバイスで調製後の empty-MITO-Porter の PDI は、PEG 有 R8 有が 0.257±0.017、PEG 無 R8 有が 0.131±0.02、PEG 有 R8 無が 0.280±0.005、PEG 無 R8 無が 0.652±0.238 であった (Fig. 2-4C-b)。そして、透析後の empty-MITO-Porter の粒子径は、PEG 有 R8 有が 59.3±2.9 nm、PEG 無 R8 有が 75.4±1.8 nm、PEG 有 R8 無が 54.9±3.8 nm、PEG 無 R8 無が 5077.8±558.5 nm であった (Fig. 2-4D-a)。透析後の empty-MITO-Porter の PDI は、PEG 有 R8 有が 0.528±0.028、PEG 無 R8 有が 0.118±0.015、PEG 有 R8 無が 0.342±0.104、

PEG 無 R8 無が 0.593 ± 0.260 であった (Fig. 2-4D-b)。EmptyCoQ₁₀-MITO-Porter において、PEG 脂質または R8 のどちらか一方を組成に含有させることで良好な粒子調製が可能であった。empty-MITO-Porter の PEG 有 R8 有では、粒子径は微小であるが、PDI が透析後に増加した。今回の PEG 脂質および R8 の比率は CoQ₁₀-MITO-Porter の調製のために最適化された条件であり、より物性の安定した empty-MITO-Porter を得るには、改良が必要である。またゼータ電位は、CoQ₁₀-MITO-Porter および empty-MITO-Porter とで同様の傾向が見られた。

次に粒子溶液の濁度を評価した (Fig. 2-5)。特定の濁度と粒子径の間には、良好な相関関係があると言われる⁹⁸⁾。CoQ₁₀-MITO-Porter は、CoQ₁₀ に由来する淡黄色を呈した溶液となるため、測定する吸光度は、色調に影響されない 660 nm とした。CoQ₁₀-MITO-Porter および empty-MITO-Porter の濁度は、物性評価の粒子径と相関していた。CoQ₁₀-MITO-Porter は PEG 脂質が含有することで低い値を示したが、R8 のみでは高い値を示した (Fig. 2-5A)。CoQ₁₀-MITO-Porter の PEG 無 R8 無では、マイクロ流体デバイスで調製後に凝集体、透析後にはチューブの底に沈殿物が観察された (Fig. 2-5C, 拡大図)。したがって、これらの析出物により、溶液中の濃度が変化したため、吸光度が PEG 無 R8 有よりも低値となったと考えられた。Empty-MITO-Porter は PEG 脂質または R8 の組成への含有により、低い値を示した (Fig. 2-5B)。Empty-MITO-Porter の PEG 無 R8 無では、CoQ₁₀-MITO-Porter のような析出は起こらなかったが、吸光度は約 0.8 を示した (Fig. 2-5D)。

マイクロ流体デバイスを用いた粒子調製では、粒子の分散性を確保するために、PEG 脂質または R8 を組成に含有させることが不可欠であった。さらに、CoQ₁₀ のような難水溶性分子を搭載した脂質ナノ粒子の安定化には、粒子表面に水和層を形成する PEG 脂質が良好な粒子調製をもたらすことが示唆された。

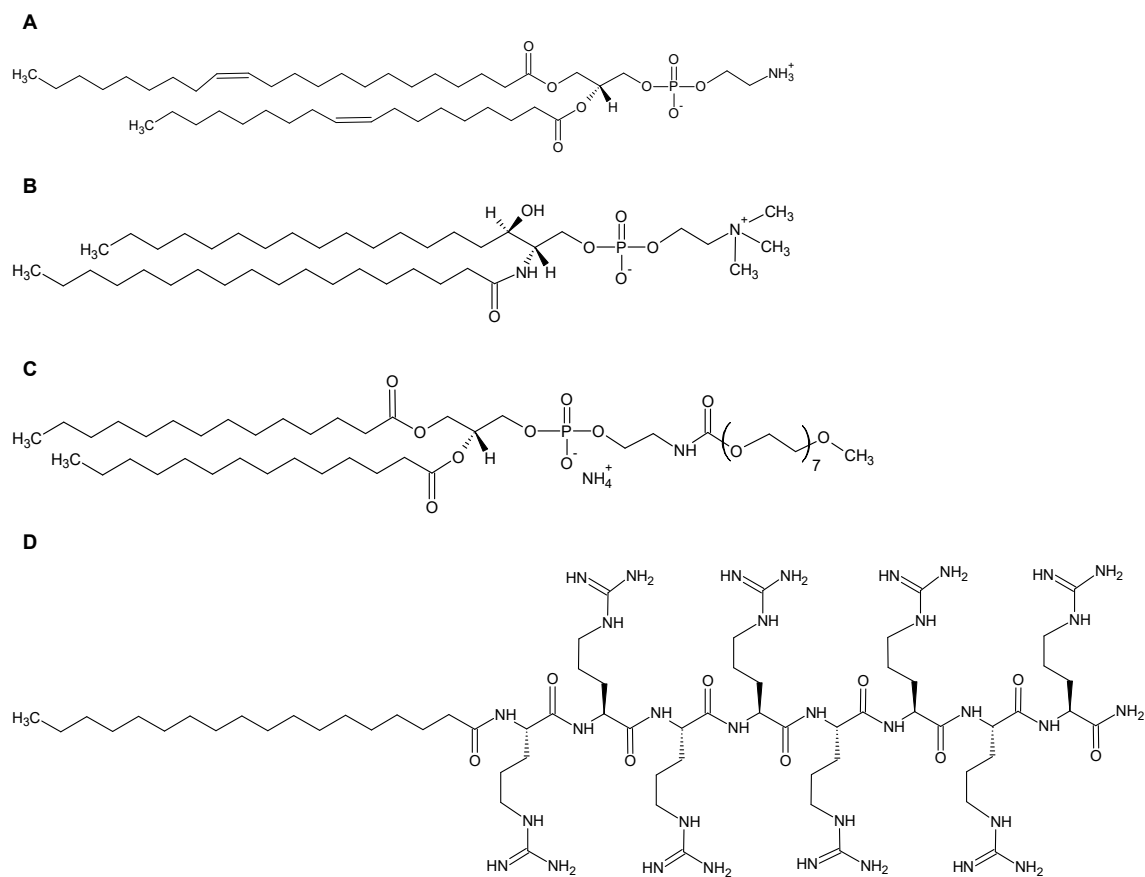


Fig. 2-3 MITO-Porter 組成に用いる脂質の構造式

(A) 1,3-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)、(B) Sphingomyelin (SM)、(C) 1,3-Dimyristoyl-*sn*-glycerol, methoxy polyethylene glycol 2000 (DMG-PEG 2000)、(D) stearyl octaarginine (STR-R8)

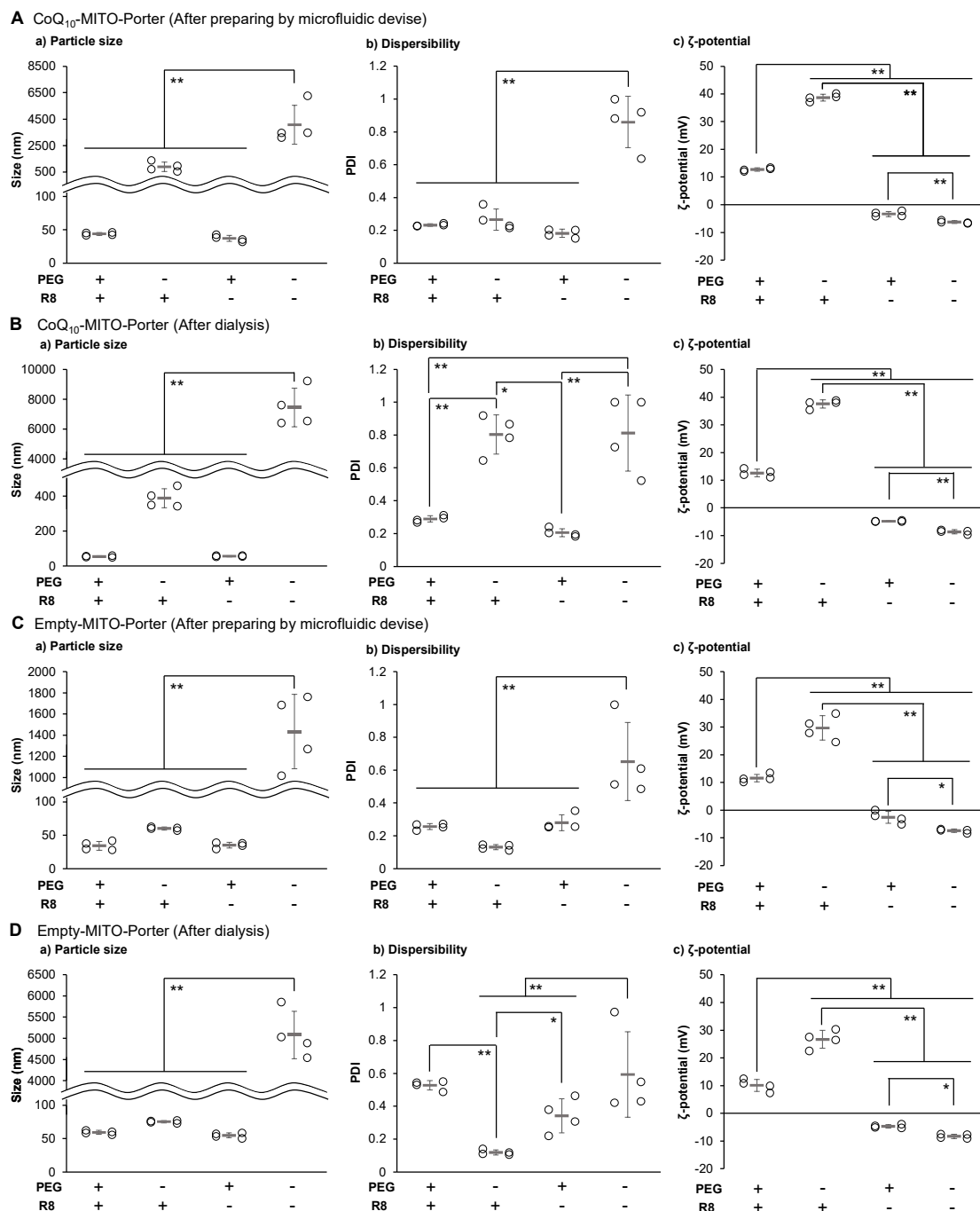


Fig. 2-4 粒子調製における PEG および R8 の影響

PEG 脂質および R8 の有無を変化させて粒子調製を行った。(A) マイクロ流体デバイスで調製後の CoQ₁₀-MITO-Porter、(B) 透析後の CoQ₁₀-MITO-Porter、(C) マイクロ流体デバイスで調製後の empty-MITO-Porter および(D) 透析後の empty-MITO-Porter における(a) 粒子径、(b) PDI および(c) ζ -電位を示す。

(mean with S.D., n=4, *p<0.05, **p<0.01 by ANOVA followed by SNK test)

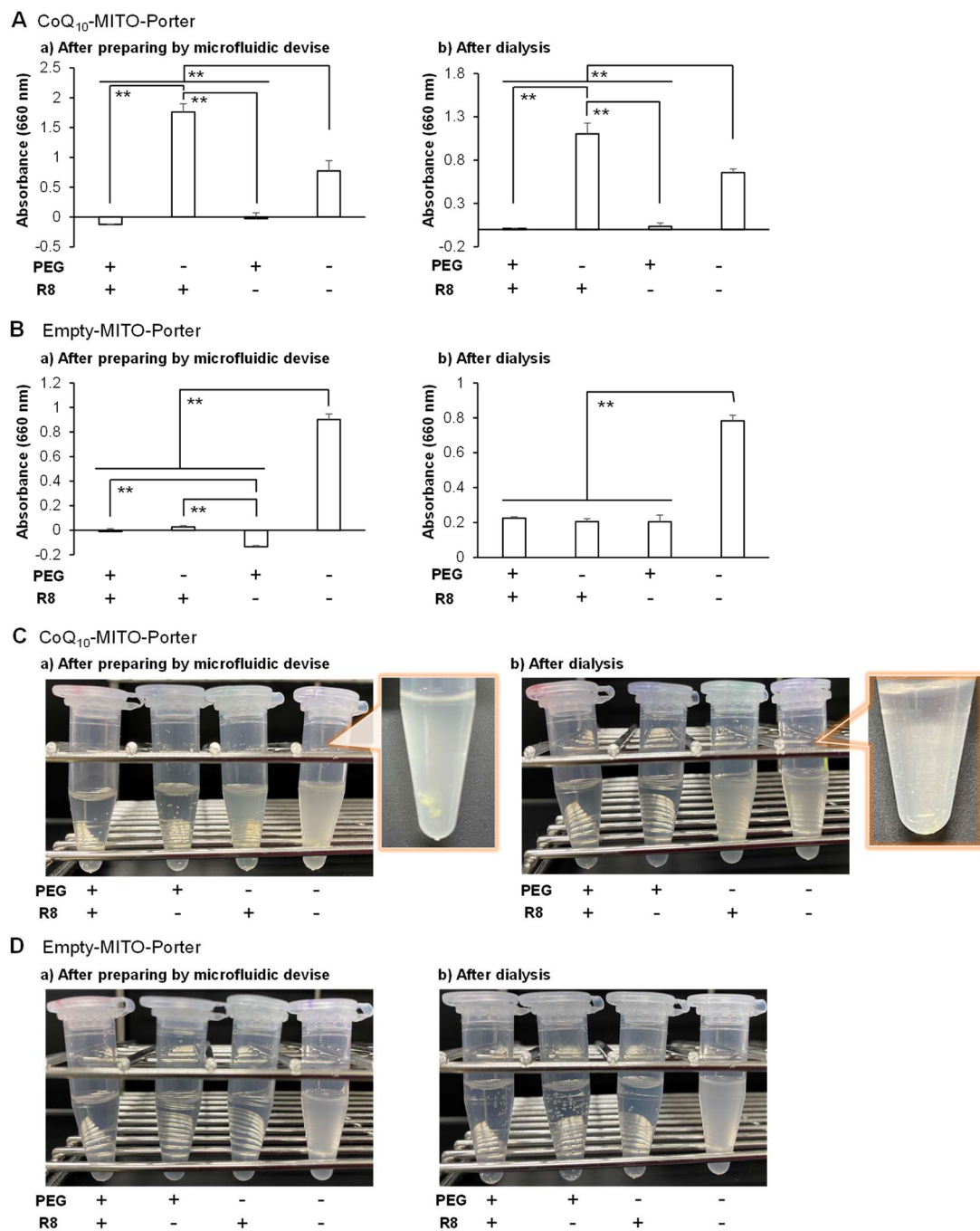


Fig. 2-5 粒子溶液の濁度と外観

調製後の粒子溶液の濁度 (吸光度 660 nm)を測定し、外観を観察した。(A) CoQ₁₀-MITO-Porter および(B) empty -MITO-Porter における濁度測定の測定結果を示す。さらに(C) CoQ₁₀empty-MITO-Porter および(D) empty-MITO-Porter における外観を観察した。(a) マイクロ流体デバイスで調製後および(b) 透析後の結果を示す。(mean with S.D., n=4, *p<0.05, **p<0.01 by ANOVA followed by SNK test)

2-3 CoQ₁₀-MITO-Porter の濃縮操作の構築

第一章で確立した条件によるマイクロ流体デバイスにて調製した CoQ₁₀-MITO-Porter をマウスに投与すると、CoQ₁₀ 投与量は 0.53 mg/kg (8 μ L/g)となる。CoQ₁₀ 投与量を増加させたい場合は、投与する容量を増やすことも一案であるが、実験動物への負担は大きくなり、実験手技にも影響が出る可能性がある。粒子特性を変化させることなく濃縮するために Amicon®システムを用いた限外ろ過を試みた (Fig. 2-6)。サンプルを 1.5 mL チューブに入れて遠心操作したが、溶液量は約 1mL となり、ほとんど変わらなかった。そこでサンプルに PBS (-)を添加して濃縮操作を行うことにした。添加する PBS (-)は、容量が 3.5、8.5 および 13.5 mL の 3 種類を試みた。検討温度は、粒子調製時の温度である 25°C と保存温度である 4°C の 2 種類で比較することにした。その結果、PBS (-)の添加により溶液量が約 200 μ L に減少し、濃縮に成功した。粒子物性を (Table 2-3)に示した。PBS (-)の温度は、25°C よりも 4°C の方が粒子径および PDI が大きくなった。PBS (-)の量は、添加量が増えるにつれて粒子径および PDI が増大する傾向にあった。25°C PBS (-)添加時の吸光度法による CoQ₁₀ 濃度は、3.5 mL が 105.4 μ M、8.5 mL が 111.0 μ M および 13.5 mL が 120.6 μ M であった (Table 2-4)。粒子物性と濃縮後の CoQ₁₀ 濃度の結果を考慮し、添加する PBS (-)は 25°C で 8.5 mL が最適であると判断した。High performance liquid chromatography (HPLC)法を用いた CoQ₁₀ の定量では、CoQ₁₀-MITO-Porter は透析後が 76.1 $\pm$ 7.5 μ M、濃縮後が 786.9 $\pm$ 126.8 μ M となり、約 10 倍濃度が高くなった (Fig. 2-7)。また、濃縮後の CoQ₁₀-MITO-Porter の性状は、PBS (-)組成を維持しており、浸透圧比 1 であるため、血管障害性が低いことを確認した (Table 2-5)。

PBS (-)の添加により、CoQ₁₀-MITO-Porter の濃縮法を確立し、CoQ₁₀ 投与量は最大 5.4 mg/kg (8 μ L/g)で投与でき、生体に適応可能な製剤であると示唆された。

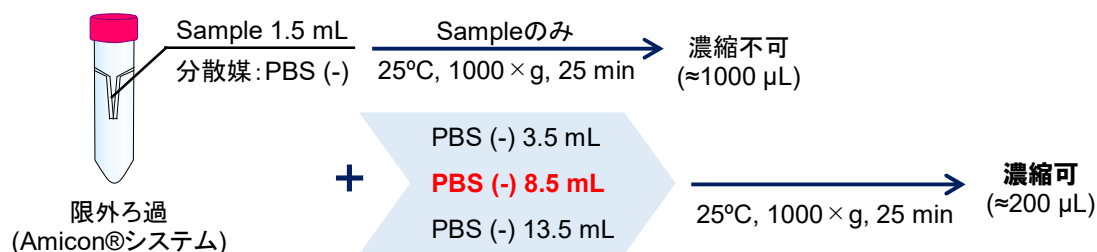


Fig. 2-6 CoQ₁₀-MITO-Porter の濃縮操作の概要図

CoQ₁₀-MITO-Porter 1.5 mL をチューブに入れ、さらに 3.5、8.5 および 13.5 mL の PBS (-)を添加し、濃縮操作を行った。

Table 2-3 各 MITO-Porter の物性

Sample		平均粒子径 (nm)	PDI	ζ-電位 (mV)
マイクロ流体デバイス調製後		67.1 ± 8.3	0.208 ± 0.06	16.5 ± 2.0
透析後		46.5 ± 3.0	0.282 ± 0.05	16.4 ± 1.7
PBS (-)				
温度 (°C)	添加量 (mL)			
25	3.5	45.0 ± 3.2	0.221 ± 0.03	22.6 ± 1.8
	8.5	47.8 ± 4.4	0.233 ± 0.04	24.4 ± 1.8
	13.5	50.7 ± 4.3	0.269 ± 0.06	25.8 ± 2.0
4	3.5	52.3 ± 1.4	0.374 ± 0.04	19.4 ± 3.5
	8.5	58.2 ± 2.3	0.396 ± 0.04	23.2 ± 3.7
	13.5	63.7 ± 3.7	0.419 ± 0.03	25.4 ± 1.5

調製した各 MITO-Porter の平均粒子径 (nm)、polydispersity index (PDI)、ζ-電位 (mV)を示す。
(mean with S.D., n=4-8)

Table 2-4 吸光度法 (275 nm)による CoQ₁₀ 濃度

Sample	CoQ ₁₀ 濃度 (μM)
マイクロ流体デバイス調製後	49.5
透析後	42.5
3.5 mL	105.4
25°C PBS (-) 8.5 mL	111.0
13.5 mL	120.6

(n=2)

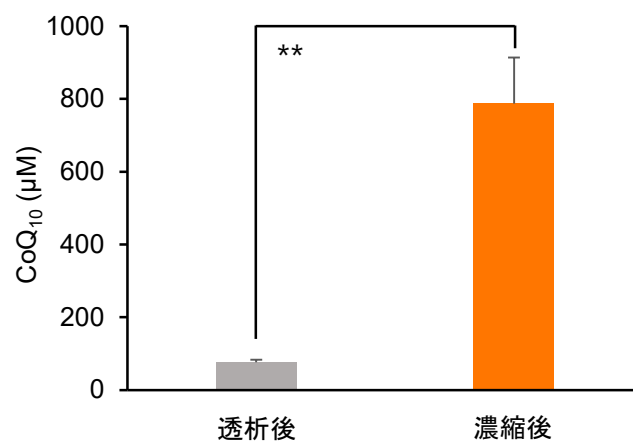


Fig. 2-7 HPLC 法を用いた CoQ₁₀-MITO-Porter における CoQ₁₀ 濃度の定量

CoQ₁₀-MITO-Porter に搭載された CoQ₁₀ 量を定量した。

(mean with S.D., n=6-14, **p<0.01 by unpaired Student's t-test)

Table 2-5 CoQ₁₀-MITO-Porter の性状

	マイクロ流体デバイス調製後 (EtOH 20%含有)	濃縮後
Na ⁺ (meq/L)	251	154
K ⁺ (meq/L)	5.4	4.1
Cl ⁻ (meq/L)	223	138
pH	7.7	7.3
浸透圧 (mOsm/L)	≈480 (浸透圧比 1.7)	≈300 (浸透圧比 1)

2-4 APAP 肝障害における CoQ₁₀-MITO-Porter の組織移行性

CoQ₁₀-MITO-Porter の生体内分布を APAP 肝障害モデルマウスに投与して評価した (Fig. 2-8)。投与した CoQ₁₀-MITO-Porter の物性を Table 2-6 に示した。APAP 負荷の 1 hr 後に DiD 標識した CoQ₁₀-MITO-Porter の尾静脈投与および 3 hr 後に各組織の観察をした。CoQ₁₀-MITO-Porter は肝臓に有意に集積し、脾臓、肺、腎臓、心臓の順に集積を確認した。

したがって、CoQ₁₀-MITO-Porter は APAP 肝障害のような肝疾患治療への適応が可能であることが示唆された。

Table 2-6 投与した DiD 標識 CoQ₁₀-MITO-Porter の物性

Sample	平均粒子径 (nm)	PDI	ζ-電位 (mV)
DiD CoQ ₁₀ -MITO-Porter	52.8 ± 2.7	0.269 ± 0.03	9.5 ± 1.3

調製した CoQ₁₀-MITO-Porter の平均粒子径 (nm)、polydispersity index (PDI)、ζ-電位 (mV)を示す。

(mean with S.D., n=3)

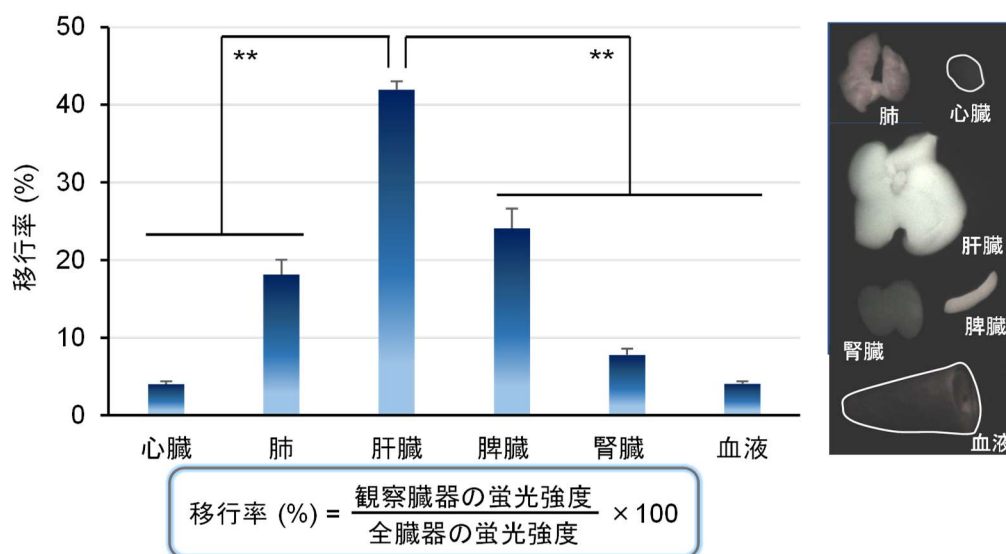


Fig. 2-8 APAP 肝障害における CoQ₁₀-MITO-Porter の *ex vivo* イメージング

21 ± 3 hr 絶食したマウスに APAP 200 mg/kg を腹腔内投与し、脂質の 0.5% となるように DiD 標識した CoQ₁₀-MITO-Porter を、マウスに尾静脈投与 (脂質量 ≈ 20 nmol/8 μL/g, CoQ₁₀ 0.9 mg/kg) し、3 hr 後に各組織の摘出を行い、蛍光観察をした。

(mean with S.E., n=3, **p<0.01 by ANOVA followed by SNK test)

2-5 後期 APAP 肝障害モデルに対する CoQ₁₀-MITO-Porter の治療効果の検証

CoQ₁₀-MITO-Porter の APAP 肝障害に対する治療効果の検証をした。APAP 肝障害モデルマウスでは、APAP 負荷をかけてから早期 (6~8 hr)、中期 (12 hr) および後期 (24 hr) で評価されることが多い⁹⁹⁻¹⁰²⁾。そこで、今回は CoQ₁₀-MITO-Porter による肝障害保護効果の持続性を確認するために 24 hr を評価時間とした。CoQ₁₀-MITO-Porter は、濃縮操作を施したものを使用し、目的の CoQ₁₀ 投与量となるように希釈してから投与した。C57BL/6 J マウス (10 週齢、体重約 21g、21±3 hr 絶食) に APAP 200 mg/kg を腹腔内投与した。APAP 負荷の 1hr 後に PBS (-)、CoQ₁₀ 懸濁液 (CoQ₁₀: 2 mg/kg) および CoQ₁₀-MITO-Porter (CoQ₁₀: 0.9 mg/kg, 8μL/g) の投与をし、24hr 後に血清 alanine aminotransferase (ALT) を測定した (Fig. 2-9)。その結果、PBS (-) 群は 3812.2±198.4 IU/L、CoQ₁₀ 懸濁液は 4505.3±927.0 IU/L となり、血清 ALT 値の上昇が見られた。一方、CoQ₁₀-MITO-Porter 群は 470.3±179.5 IU/L となり、有意な肝障害抑制効果を示した。

APAP 肝障害における CoQ₁₀-MITO-Porter の投与は有効であることが示された。

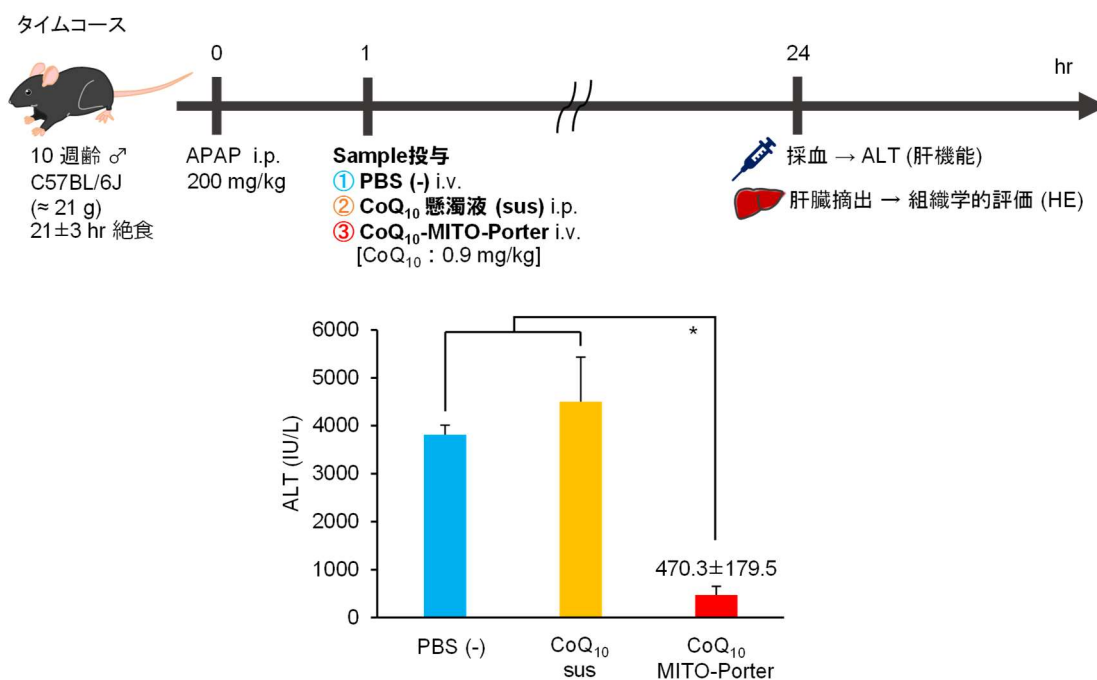


Fig. 2-9 APAP 肝障害に対する治療効果の検証

21±3 hr 絶食したマウスに APAP 200 mg/kg 腹腔内投与し、その 1 hr 後に各サンプルを投与した。その後 APAP 負荷から 24 hr 後に採血し、血清 ALT を測定した。

(mean with S.E., n=3-6, **p<0.01 by ANOVA followed by post t-test)

2-6 組織学的評価

APAP 負荷後、各サンプルを投与し、24 hr にて肝臓組織を摘出し、組織損傷の度合いを hematoxylin and eosin (HE)染色にて評価した (Fig. 2-10)。PBS (-)群および CoQ₁₀ 懸濁液群では門脈周辺の白色に変色した壊死領域が観察され (青点線部位)、拡大図においても細胞の損傷が見られた。一方、CoQ₁₀-MITO-Portert 群は壊死所見が少なく、細胞の空洞化もほとんど観察されなかった。

したがって、組織学的評価からも CoQ₁₀-MITO-Porter によって APAP 肝障害が軽減したことを確認した。

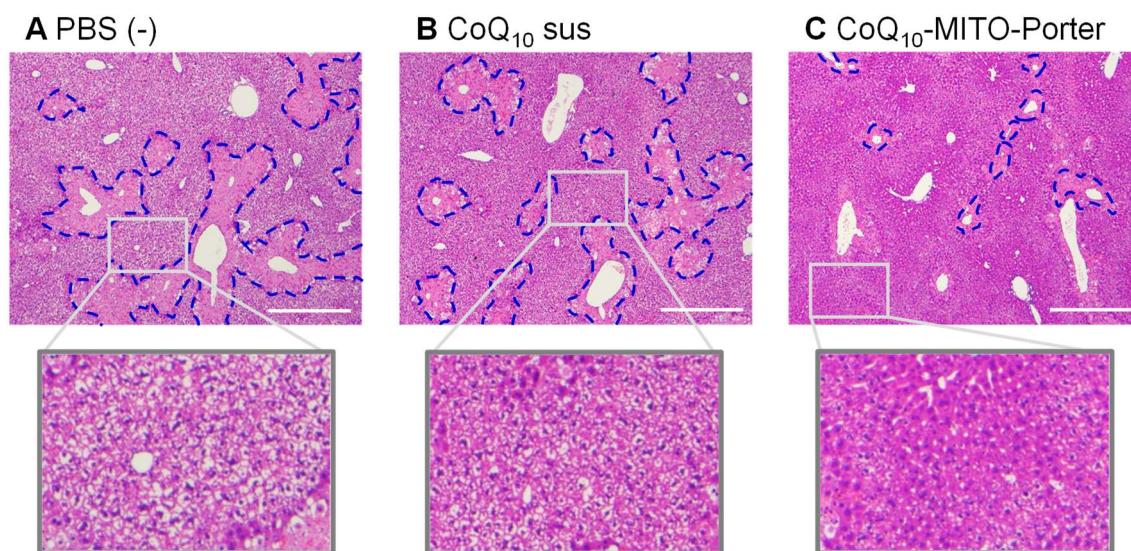


Fig. 2-10 APAP 肝障害モデルマウスにおける CoQ₁₀-MITO-Porter の傷害抑制効果

21±3 hr 絶食したマウスに APAP 200 mg/kg 腹腔内投与し、その 1 hr 後に各サンプルを投与した。APAP 負荷から 24 hr 後に肝臓を摘出し、HE 染色をした。(A) PBS (-)、(B) CoQ₁₀ 懸濁液 (sus)、(C) CoQ₁₀-MITO-Porter

Scale bars: 100 μm、青点線:壊死領域、四角:拡大部分

考察

CoQ₁₀-MITO-Porter の構造評価より、約 50 nm の球形の粒子が観察された (Fig. 2-2A)。CoQ₁₀-MITO-Porter は、ブロードなピークが確認されたことから、ラメラ構造を有さない密な構造体であると推察された (Fig. 2-2B)。Empty-MITO-Porter においても同様のブロードなピークが見られたことから、CoQ₁₀ の有無による内部構造への影響はないと考えられた。従来法であるエタノール希釈法で調製した CoQ₁₀-MITO-Porter は、TEM 観察においてラメラ構造を有するリボソームが形成される³⁵⁾。従来法では、エタノール濃度を段階的に希釈することで粒子調製することから層状構造を形成すると予想される。一方で、マイクロ流体デバイスによる脂質/アルコール溶液の急速な希釈は脂質ディスクが十分な周期構造を形成する前に粒子形成を促進する可能性がある。また従来法では、CoQ₁₀-MITO-Porter に STR-R8 を後付け修飾して調製する。マイクロ流体デバイスを用いた調製法では、脂質溶液に STR-R8 を含有させている。DOPE や SM の頭部構造のアミンと正に帯電する STR-R8 が静電的に反発することで、ラメラ構造の形成を阻害する可能性も考えられた。

マイクロ流体デバイスを用いた調製では、PEG 脂質や R8 を組成に組み込まないと粒子が析出または凝集してしまうことが明らかとなった。マイクロ流体デバイスを用いた CoQ₁₀-MITO-Porter の調製は、脂質組成に PEG 脂質を含有させることで、微小かつ良好な分散性を保持した粒子調製を可能にした (Fig. 2-4, 2-5)。マイクロ流体デバイスによる脂質/アルコール溶液と水性緩衝液の急速混合は、自己組織的な粒子形成を促進させる反面、急激な極性変化に伴い、脂溶性分子は過飽和状態に晒され、凝集体を形成し、熱力学的に不安定な粒子は会合し、安定化しようとする。広義的に考えると、R8 修飾ナノ粒子は疎水コロイド、PEG 修飾ナノ粒子は親水コロイドと捉えることができる。一般的に親水コロイドの方が疎水コロイドよりも分散媒での安定性が高い。CoQ₁₀-MITO-Porter の調製において R8 は、静電的反発により凝集体の過形成を抑制すると考えられたが、粒子の微小化作用は弱かった。CoQ₁₀-MITO-Porter は CoQ₁₀ の搭載により、疎水コロイドの性質が高まったため、R8 よりも PEG 脂質の方が粒子を安定化させるには相性が良好だと考えられた。PEG 脂質は粒子外層に配置して水和層を形成し、粒子間の凝集を抑制し、安定化させる。さらに、PEG 脂質は粒子の微小化に寄与し、PEG 脂質の含有量によって脂質ナノ粒子のサイズ制御ができる⁷⁾。マイクロ流体デバイスを用いた粒子調製には、分散性を担保する PEG 脂質の存在が重要であり、特に難水溶性分子を搭載した脂質ナノ粒子にも不可欠である。

CoQ₁₀-MITO-Porter は Amicon®システムを用いた限外ろ過による濃縮操作において、サンプルに PBS (-)を添加させることで解決した (Table 2-3, 4, Fig. 2-7)。濃縮操作に影響を与える要素は、サンプル濃度、開始容量、溶質の化学的性質、相対遠心力、温度などがあげられる。Amicon®システムを用いた限外ろ過では、遠心力が働くと上部の緩衝液が下部の限外ろ過デバイスに補充され、脂質ナノ粒子などの溶質は対流しながら濃縮される。開始容量が少ないと、デバイス内の対流の発生が不十分となり、フィルターへの目詰まりにつながると考えられた。また、CoQ₁₀-MITO-Porter は、緩衝液組成に影響を与えることなく、濃縮された (Table 2-5)。

In vivo 評価において CoQ₁₀-MITO-Porter は、尾静脈投与により肝臓への集積が確認された (Fig. 2-8)。さらに、APAP 肝障害モデルにおいて CoQ₁₀-MITO-Porter は、血清 ALT の上昇を抑制し、肝臓組織の壊死領域が縮小し、肝障害を軽減させた (Fig. 2-9, 2-10)。CoQ₁₀-MITO-Porter の生体内分布および肝障害抑制効果に関しては、次章で詳細に述べる。

CoQ₁₀-MITO-Porter は、ラメラ構造を有さない密な球状の粒子であり、CoQ₁₀の有無により内部構造が変化しないことを確認した。マイクロ流体デバイスを用いた粒子調製では、粒子表面の水和層の形成や静電的反発力の付与が安定した粒子形成を促進するために、不可欠であった。特に脂質ナノ粒子に対する PEG 脂質の粒子安定化や微小化への寄与は大きく、CoQ₁₀のような難水溶性薬物の分散安定性にも効果があることを確認した。CoQ₁₀-MITO-Porter の濃縮法の確立により、CoQ₁₀の投与量を調節でき、投与液量による生体への負担や血管障害性が少なく、*in vivo*に適応可能な製剤となった。APAP 肝障害に対する CoQ₁₀-MITO-Porter の投与は、APAP 負荷から 24 hr が経過しても、肝障害抑制効果が持続した。したがって、CoQ₁₀-MITO-Porter は疾患治療が可能な製剤であることが示された。

第三章

CoQ₁₀ 搭載ミトコンドリア標的型脂質ナノ粒子 の薬物性肝障害への応用

緒言

Acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol: APAP)は、小児、妊婦およびインフルエンザ患者など幅広い世代に適応可能である安全な解熱鎮痛剤として世界中で使用されている。APAP の過剰摂取は、重度の肝障害を引き起こし、急性肝不全に進行する可能性がある。APAP 肝障害は欧米諸国などの先進国での報告が多く、特にアメリカでは急性肝不全症例の約 50%を占めている^{103, 104)}。

APAP 肝障害に対する治療は、glutathione (GSH)の補充を目的とした *N*-acetylcysteine (NAC)の投与のみである。NAC による解毒作用を得るためには、高用量での投与が継続的に必要である。NAC が十分な効果を発揮できないのは、バイオアベイラビリティ (6~10%)の低さが原因である^{105, 106)}。生理的 pH7.35~7.45 において、NAC のカルボキシル基は脱プロトン化されることで負電荷を帯び、生体膜の透過性が妨げられる。また、APAP 肝障害からの脱出には、早期発見が治療の奏功に結び付く。肝機能状態を判断するバイオマーカーとして血清 alanine aminotransferase (ALT) および血清 aspartate aminotransferase (AST)が汎用される。しかし、APAP 肝障害の進行とバイオマーカーの上昇にはタイムラグがあり、治療前の予測や治療中の判断を困難にさせている。そこで、薬剤性肝障害のより正確な予測が可能なバイオマーカーの探索や NAC 以外の解毒薬の開発が期待されている¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾。

APAP 肝障害発症のトリガーは、APAP が CYP2E1 によって生じる活性代謝物 *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI)の過剰産生である。通常、APAP の適正量で発生する NAPQI は生体内にある GSH によって不活性化される。しかし過剰産生した NAPQI は、GSH を枯渇させ、反応性の高い求電子性を有することから細胞内タンパク質と共有結合することで、酸化ストレスやミトコンドリア機能障害などを起こし、肝臓での小葉中心性壊死をもたらす¹¹⁰⁾。NAPQI によってもたらされる肝障害増悪の分子メカニズムとして、ミトコンドリア障害、オートファジーによる損傷ミトコンドリアの除去能低下、小胞体ストレスによるミトコンドリア損傷、c-Jun N-terminal kinase (JNK)経路の活性化、ミトコンドリアからの apoptosis inducing factor (AIF)およびエンドヌクレアーゼ G 放出による核 DNA の断片化および肝細胞破壊による二次的免疫応答の活性化が考えられている¹¹¹⁾。NAPQI の標的タンパク質は、ミトコンドリアタンパク質であることは明らかとなっており^{112, 113)}、ミトコンドリアが毒性発現の主要な役割を担っている。

ミトコンドリアへの NAPQI の結合は、酸化ストレスを誘発し、酸化的リン酸化の機能低下やミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore: MPTP)からの AIF の放出を引き起こす。したがって、APAP 肝障害において、ミトコンドリアを標的することは治療戦略として有効である可能性がある。これまでに APAP 肝障害に対するミトコンドリアを標的した治療分子や方法として、複合体 I を阻害する methylene blue、複合体 II を阻害する metformin、ミトコンドリア呼吸障害を改善する細胞透過性コハク酸プロドラッグ 1-acetoxyethyl acetoxymethyl succinate (NV241)、ミトコンドリア電位依存性カルシウム-鉄単輸送体 (mitochondrial electrogenic Ca^{2+} , Fe^{2+} uniporter: MCFU)による鉄の取り込みを阻害する ruthenium 360 (Ru360)および minocycline の併用、脂質過

酸化を抑制し、酸化ストレスを軽減する resveratrol、ミトコンドリア標的能を有し、活性窒素種を主要とする酸化ストレスを軽減する 2-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino)-2-oxoethyl) triphenylphosphonium chloride (Mito-TEMPO)および外因性ミトコンドリアと機能不全を起こしたミトコンドリアの置換を目的としたミトコンドリア移植が試みられている^{25, 114-121)}。第二章において、CoQ₁₀-MITO-Porter 投与による APAP 肝障害に対する 24 hr での肝障害抑制効果の持続性を確認した。そこで本章では、APAP 肝障害の主要なメカニズムであるミトコンドリアでの酸化ストレスの発生に対し、CoQ₁₀-MITO-Porter を用いてミトコンドリアへ抗酸化作用と示す CoQ₁₀ を送達することで 6 hr という急性期においても治療効果が得られるか検証した (Fig. 3-1)。

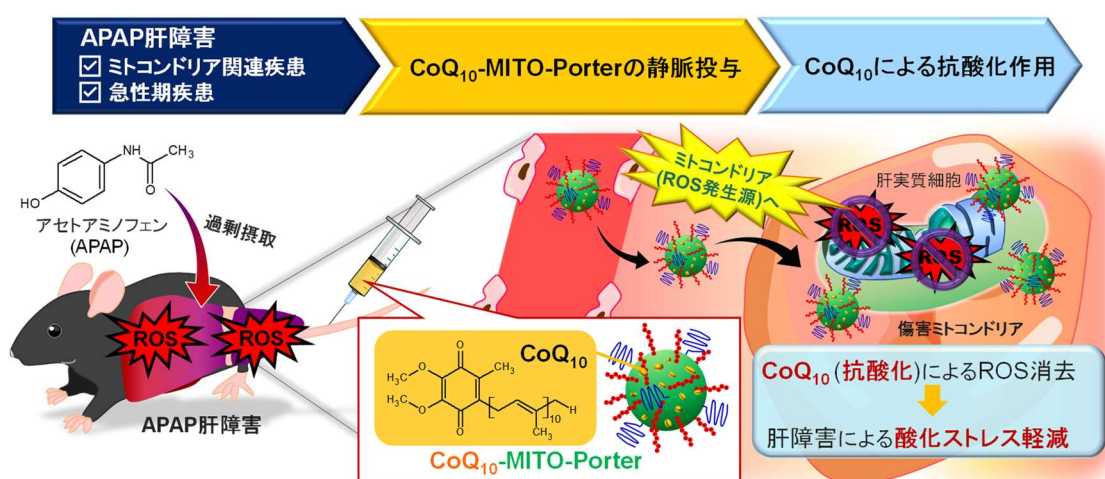


Fig. 3-1 CoQ₁₀-MITO-Porter の APAP 肝障害に対する治療戦略

結果

3-1 *Ex vivo* イメージングによる CoQ₁₀-MITO-Porter の組織移行性

正常マウスに DiD 標識した CoQ₁₀-MITO-Porter を尾静脈投与し、0.5、1、2 および 24 hr 後の各組織への粒子の移行性を *in vivo* イメージングシステムにて評価した (Fig. 3-2)。その結果、CoQ₁₀-MITO-Porter は肝臓に最も集積し、経時的に消失することを確認した。また、CoQ₁₀-MITO-Porter は肝臓に次いで肺への集積も確認された。

したがって、CoQ₁₀-MITO-Porter は肝臓標的に適した特性を有し、経時的に消失することが示唆された。

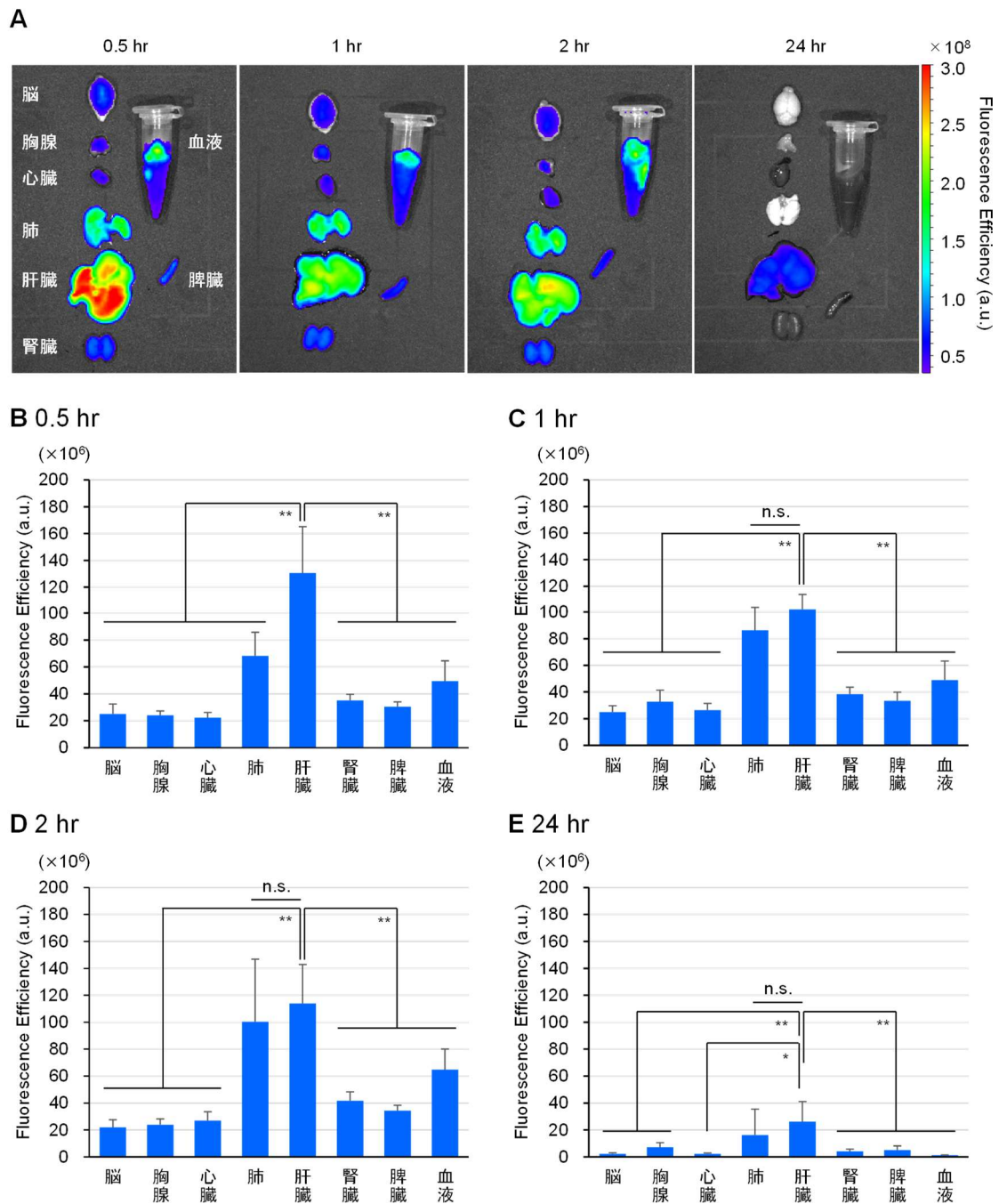


Fig. 3-2 CoQ₁₀-MITO-Porter の Ex vivo イメージング

脂質の 0.5%となるように DiD 標識した CoQ₁₀-MITO-Porter を、正常マウスに尾静脈投与 (脂質量 $\approx$ 4.4 nmol/8.7 μ L/g)し、0.5、1、2 および 24 hr 後に採血および各組織の摘出を行い、IVIS Imaging System にて観察した。投与した粒子物性は Table 2-7 を参照。(A)は代表的なイメージング画像を示した。得られた画像をもとに(B) 0.5 hr、(C) 1 hr、(D) 2 hr および(E) 24 hr での各組織への集積量をグラフ化した。(mean with S.D., n=3-4, **p<0.01 by ANOVA followed by SNK test, n.s., no significant difference)

3-2 APAP 肝障害モデル作製の再検討

第二章で用いた APAP 肝障害モデルマウスは腹腔内投与にて APAP の負荷をかけていた。腹腔内投与は扱いやすい投与方法であるが、腸管内に注射する危険性や安定した血中濃度を得られない可能性がある。そこでより安定的な投与方法として皮下投与を選択し、APAP 肝障害モデルの再構築を行った(Fig. 3-3)。今回の検討では、肝機能マーカーとして血清 ALT を選択した。肝機能マーカーとして血清 AST と血清 ALT が汎用される。血清 AST は心臓、腎臓、骨格筋、赤血球等の多くの臓器に分布する一方、血清 ALT は主に肝臓に含まれる。

まず、腹腔内投与時に用いていた APAP 200 mg/kg を用いて 3、6 および 24 hr にて血清 ALT を測定した結果、 40.8 ± 11.7 、 52.2 ± 54.5 および 40.2 ± 12.9 IU/L を示し、ほぼ正常値であった (Fig. 3-3A)。次に投与量を増やし、400 および 700 mg/kg にて皮下投与すると、24 hr での血清 ALT は $14,541.8 \pm 4,310.1$ および $13,156.8 \pm 4,387.6$ IU/L となり、高度肝障害が引き起こされていることを確認した (Fig. 3-3B)。血清 ALT が 10,000 IU/L 以上を示すような高度肝障害は個体値のばらつきが見られやすいため、3,000~5,000 IU/L 程度の中等度肝障害モデルを作製した方が、再現性の高い評価が行える。他の研究グループにおいても、3,000~5,000 IU/L 程度の中等度肝障害モデルを作製し、治療効果を検証しているため、APAP 肝障害モデルとして妥当だと考えられる^{25, 100)}。そこで APAP 250、300、350 および 400 mg/kg を皮下投与し、6 および 24 hr での血清 ALT を評価した。どの群も肝障害が起きていたが、個体値のばらつきが大きい群も見受けられた(Fig. 3-3C)。個体値のばらつきが、投与経路によるものなのか、それとも急性毒性モデルによる個体の変動性によるものなのかを判断するために APAP 200 および 300 mg/kg で尾静脈投与した。その結果、皮下投与時と同様に個体値のばらつきが見られた (Fig. 3-3d)。したがって、APAP 負荷による個体値の変動性は、急性毒性による個体間のぶれに起因すると考えられた。

そこで APAP 250 mg/kg 6hr (血清 ALT= $6,594.8 \pm 1,901.0$ IU/L) および 300 mg/kg 24 hr (血清 ALT= 4851.0 ± 1215.1 IU/L) の皮下投与条件が比較的安定した病態モデルであったため、APAP 250 mg/kg 6 hr を今後の検討に用いることとした。

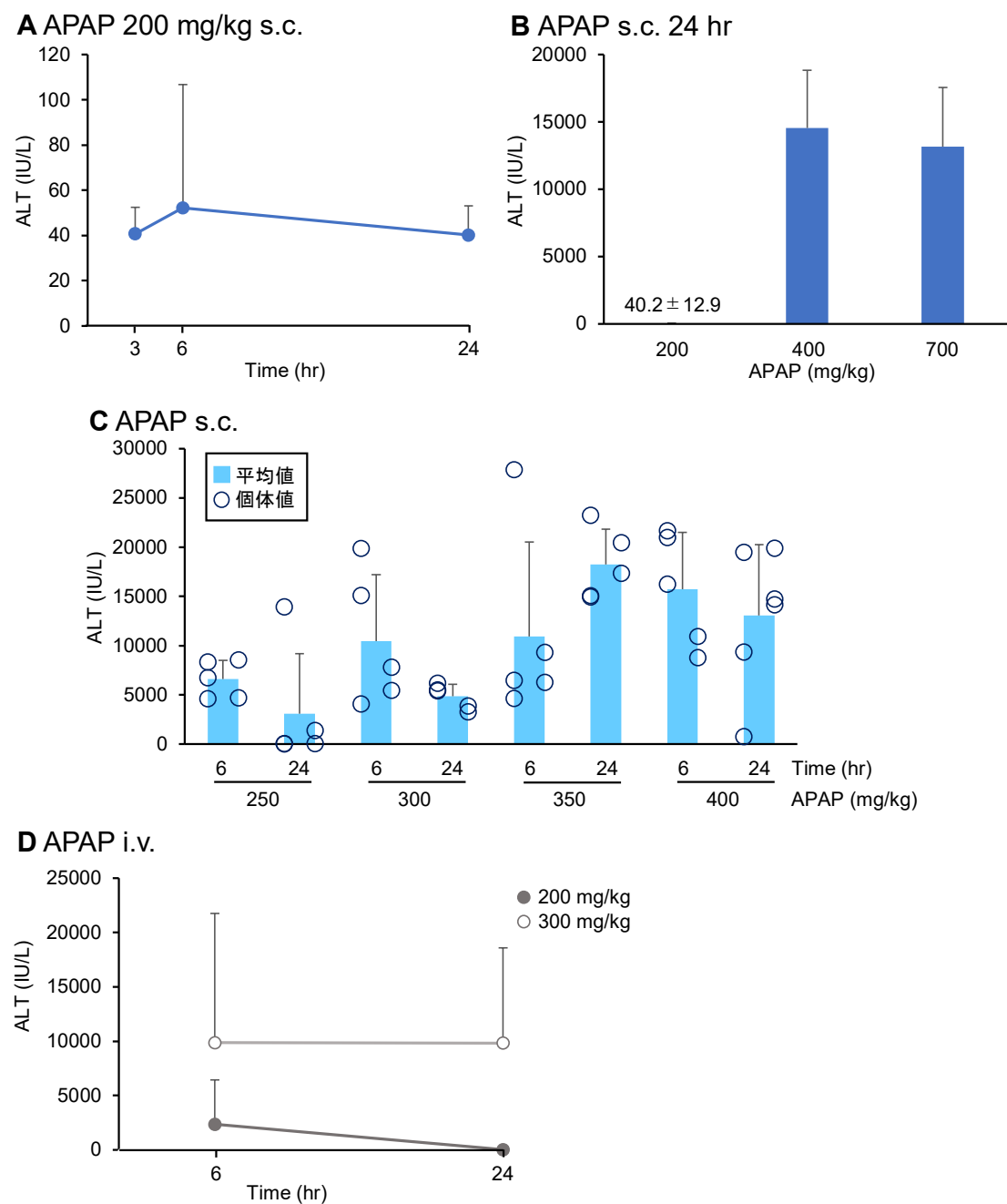


Fig. 3-3 腹腔内投与以外での APAP 肝障害モデルの作製

中等度 APAP 肝障害モデルの作製するために、21±3 hr 絶食したマウスに APAP を皮下投与または尾静脈投与し、各時間での血清 ALT を測定した。(A) APAP 200 mg/kg で皮下投与した際の血清 ALT 推移、(B) APAP を各投与量で皮下投与した際の 24 hr 値、(C) APAP 250~400 mg/kg で皮下投与した際の 6 および 24 hr 値、(D) APAP を尾静脈投与した際の血清 ALT

(A) mean with S.D., n=5, (B) mean with S.D., n=5, (C) mean with S.D., n=5-6, (D) mean with S.D., n=4-

5

3-3 CoQ₁₀-MITO-Porter の血液スクリーニング検査

APAP 肝障害に対する治療効果の検証にあたり、過剰に発生した ROS を消去するためには CoQ₁₀ のような抗酸化分子をある程度の量を投与する必要があるかもしれない。第二章より、濃縮操作を加えた CoQ₁₀-MITO-Porter は最大で 5.4 mg/kg (8 μ L/g) の CoQ₁₀ を投与することができる。そこで CoQ₁₀-MITO-Porter の毒性の有無を確認するために血液スクリーニング検査をした。投与群は PBS (-) 群、CoQ₁₀ 懸濁液群、CoQ₁₀-MITO-Porter 群および CoQ₁₀ を搭載していない empty-MITO-Porter 群の 4 群とした。CoQ₁₀ 懸濁液群および CoQ₁₀-MITO-Porter 群は CoQ₁₀ 投与量を 5.4 mg/kg とした。CoQ₁₀-MITO-Porter 群および empty-MITO-Porter 群は同等の脂質濃度となるように投与した。使用した粒子物性は Table 3-1 に示した。血液スクリーニング検査は全 19 項目行った (Fig. 3-4)。肝機能の指標として血清 AST および血清 ALT に着目した。血清 AST は PBS (-) 群が 45.5 ± 5.2 IU/L、CoQ₁₀ 懸濁液群が 64.8 ± 22.2 IU/L、CoQ₁₀-MITO-Porter 群が 78.2 ± 38.4 IU/L および empty-MITO-Porter 群が 61.8 ± 11.2 IU/L だった。血清 ALT は PBS 群が 25.5 ± 1.2 IU/L、CoQ₁₀ 懸濁液群が 31.2 ± 3.0 IU/L、CoQ₁₀-MITO-Porter 群が 35.7 ± 15.0 IU/L および empty-MITO-Porter 群が 27.8 ± 2.9 IU/L だった (Fig. 3-4a)。したがって CoQ₁₀-MITO-Porter は肝毒性を示さないことを確認した。腎機能の指標として尿素窒素、クレアチニン、電解質および微量元素に着目した。総合的に判断して、CoQ₁₀-MITO-Porter 群は概ね PBS 群と同等の数値を示すことから、腎毒性を示さないことを確認した (Fig. 3-4b)。その他の指標においても CoQ₁₀-MITO-Porter 群は PBS (-) 群と同等の数値を示し、概ね基準範囲内に収まっており、生体に対する安全性が高いと示唆された。

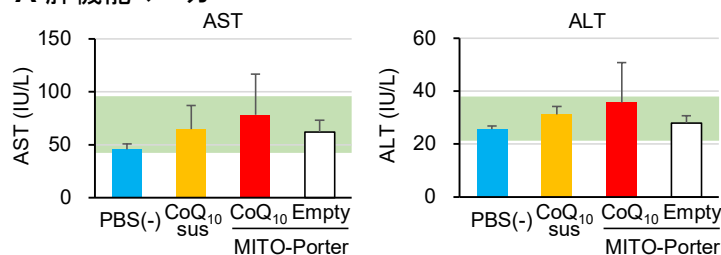
したがって、CoQ₁₀-MITO-Porter の投与は肝毒性および腎毒性を引き起こす可能性が低いことが考えられた。

Table 3-1 血液スクリーニング検査に用いた粒子物性

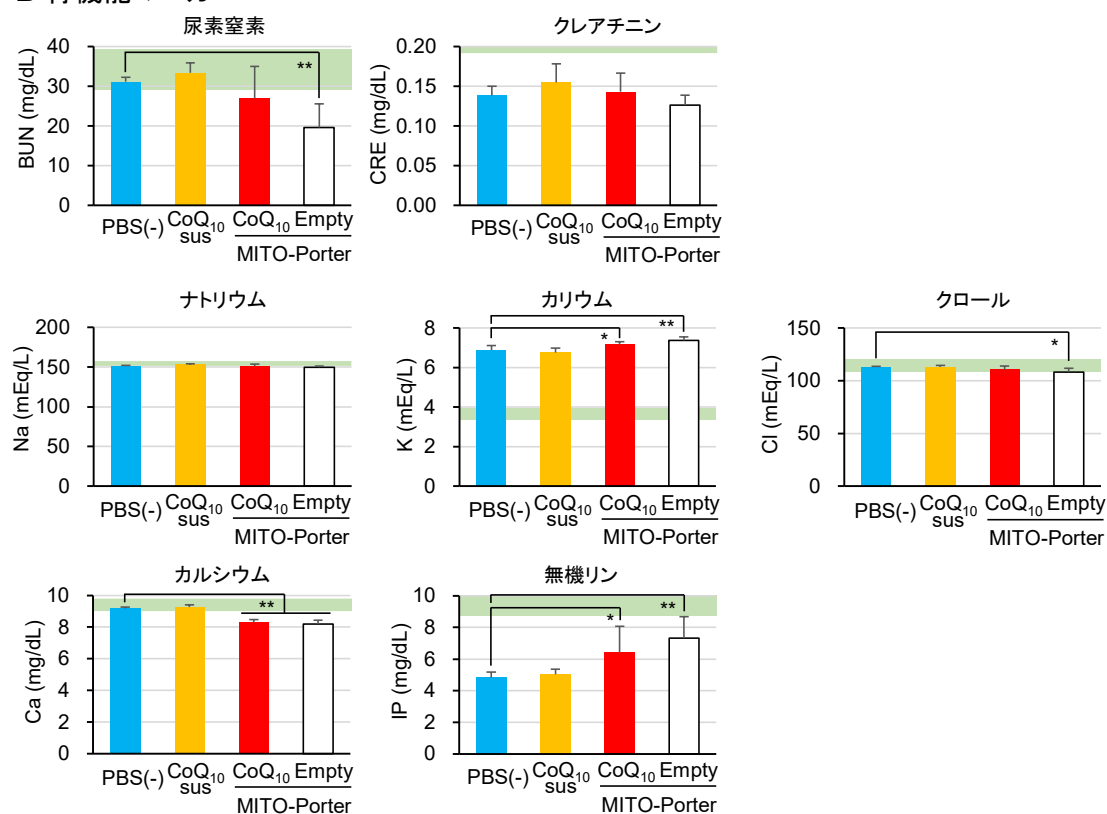
Sample	平均粒子径 (nm)	PDI	ζ-電位 (mV)
CoQ ₁₀ -MITO-Porter	63.8	0.277	12.1
Empty-MITO-Porter	52.1	0.355	13.0

調製した各粒子の平均粒子径 (nm)、polydispersity indexes (PDI)、ζ-電位 (mV)を示す。(n=1)

A 肝機能マーカー



B 腎機能マーカー



C その他のマーカー

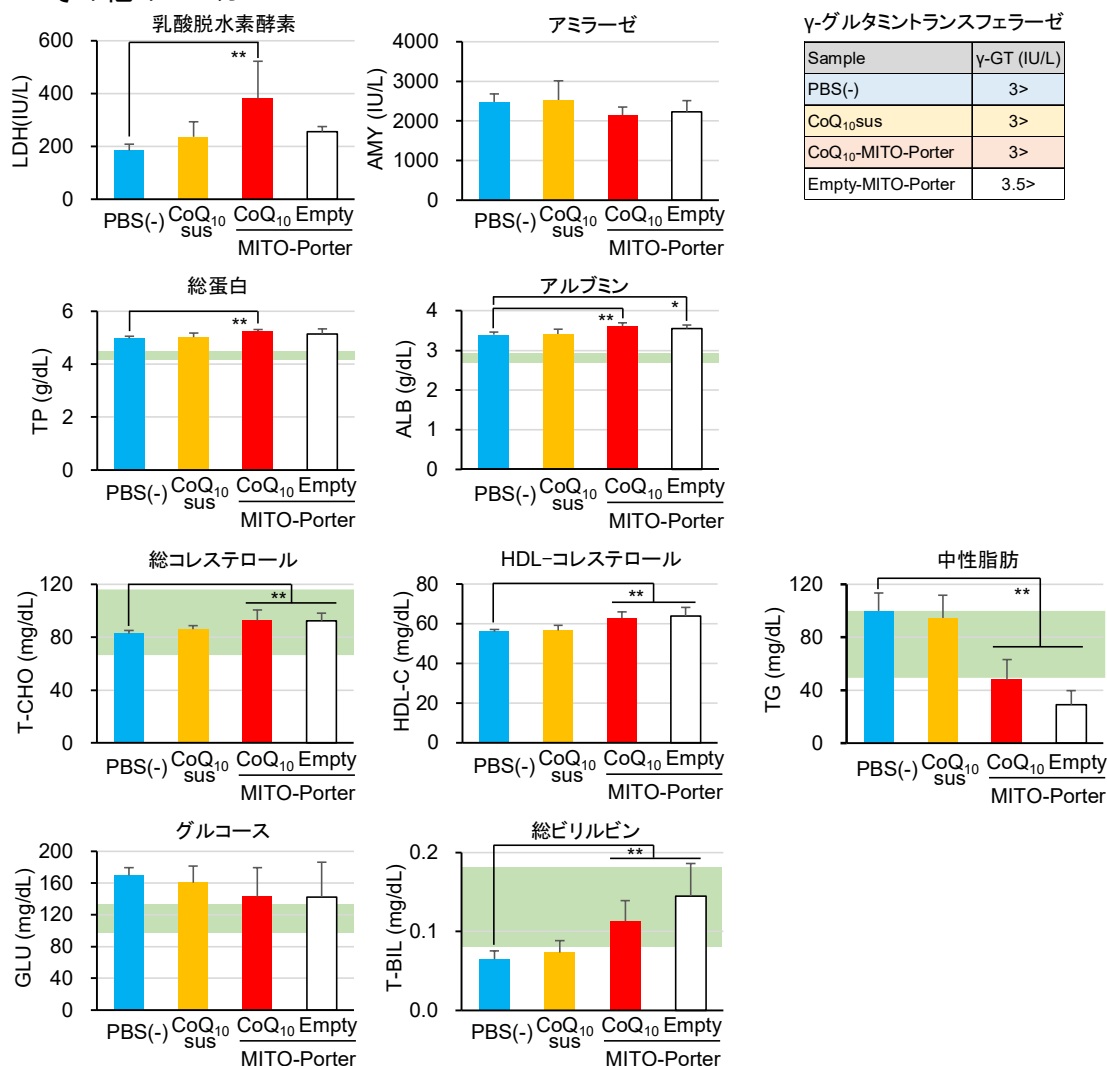


Fig. 3-4 血液スクリーニング検査

21±3 hr 絶食したマウスに各サンプルを尾静脈投与して 5 hr 後に採血し、血液スクリーニング検査 (全 19 項目)を行った。(A) 代表的な肝機能マーカー、(B) 代表的な腎機能マーカー、(C) その他の血液マーカー (mean with S.D., n=6, vs PBS (-), **p<0.01 *p<0.05 by ANOVA followed by Dunnett test)
緑帯: 基準範囲(日本チャールズ・リバー株式会社参照)

3-4 前期 APAP 肝障害モデルに対する CoQ₁₀-MITO-Porter の治療効果の検証

6 hr という早い段階での APAP 肝障害に対する CoQ₁₀-MITO-Porter の治療効果の検証をした。使用した CoQ₁₀-MITO-Porter の物性は Table 3-2 に示した。C57BL/6 J マウス (10 週齢、体重約 21g、21±3 hr 絶食) に APAP 250 mg/kg を皮下投与した。APAP 負荷の 1 hr 後に PBS (-)、CoQ₁₀ 懸濁液 (CoQ₁₀:5.4 mg/kg) および CoQ₁₀-MITO-Porter (CoQ₁₀:5.4 mg/kg) の投与をし、6 hr 後に血清 ALT を測定した (Fig. 3-5A)。その結果、PBS (-) 群は 5,295.6±2,730.5 IU/L、CoQ₁₀ 懸濁液は 5,322.2±4,873.1 IU/L となり、肝障害が確認された。一方、CoQ₁₀-MITO-Porter 群は 47.4±21.3 IU/L となり、肝障害抑制効果が見られた。また、empty-MITO-Porter を投与すると、11,077±8,840 IU/L となり、肝障害を軽減させることはなく、肝臓に移行しやすいという粒子特性が起因したためなのか高い血清 ALT を示した (Fig. 3-5C)。次に CoQ₁₀-MITO-Porter の用量反応性を評価した (Fig. 3-5B)。肝障害抑制効果は、CoQ₁₀ 投与量が増加するにつれて高くなる傾向にあった。血清 ALT の値をもとに CV 値を算出した結果、CoQ₁₀ 投与量が 0.675、1.35、2.7 および 5.4 mg/kg の時、それぞれ 1.47、1.90、1.02 および 0.38 となり、個体値のばらつきが小さくなった。

したがって、APAP 肝障害モデルマウスに対する CoQ₁₀-MITO-Porter の投与は、肝障害を大幅に抑制することができ、最適な CoQ₁₀ 投与量は 5.4 mg/kg であった。

Table. 3-2 投与した CoQ₁₀-MITO-Porter の物性

Sample	平均粒子径 (nm)	PDI	ζ-電位 (mV)
Small CoQ ₁₀ -MITO-Porter	49.7 ± 2.4	0.362 ± 0.03	12.5 ± 1.4
Empty-MITO-Porter	53.0 ± 0.9	0.446 ± 0.13	13.5 ± 0.5

調製した CoQ₁₀-MITO-Porter の平均粒子径 (nm)、polydispersity index (PDI)、ζ-電位 (mV)を示す。

(mean with S.D., n=3)

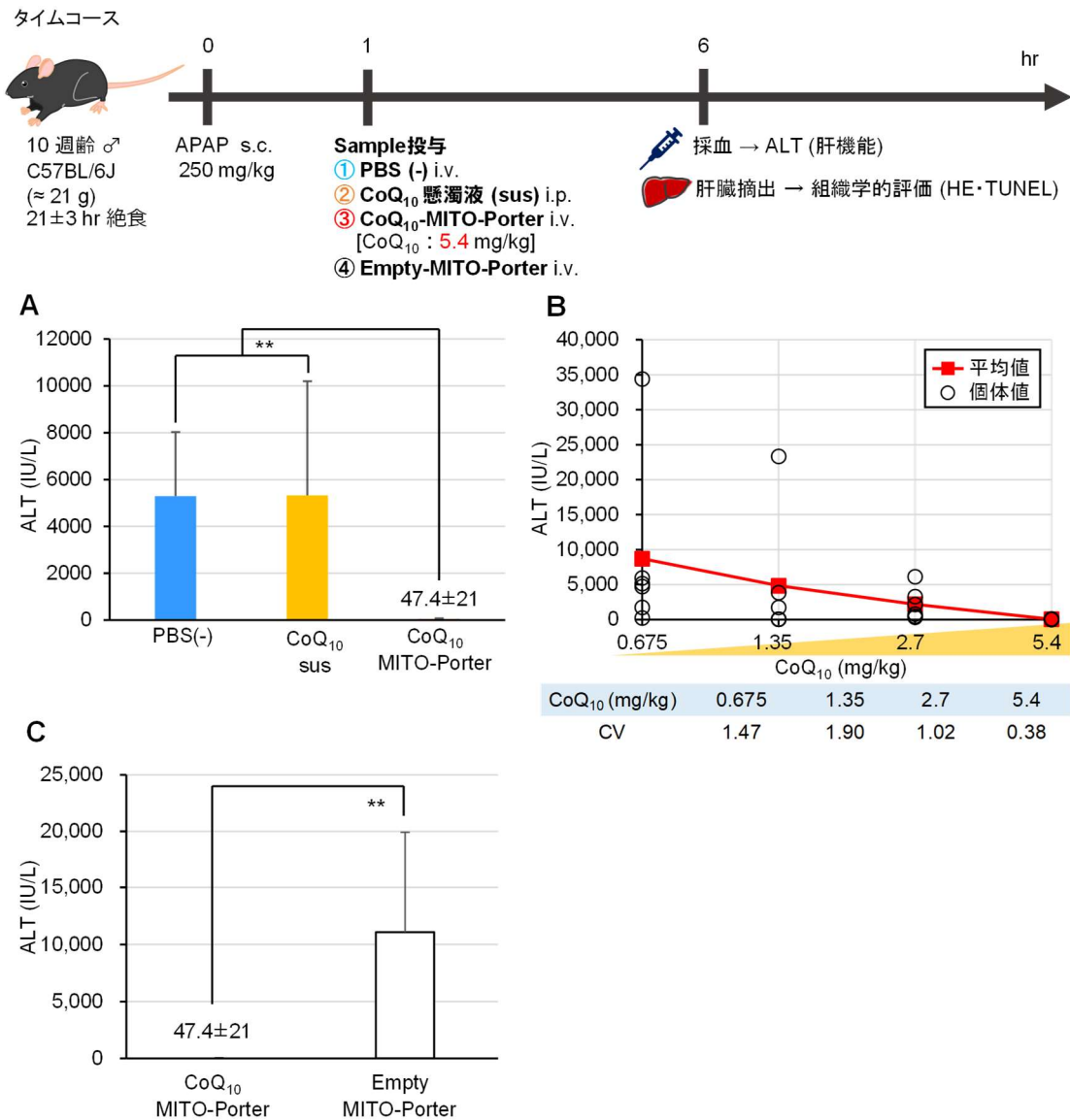


Fig. 3-5 APAP 肝障害に対する治療効果の検証

21±3 hr 絶食したマウスに APAP 250 mg/kg 皮下投与し、その 1 hr 後に各サンプルを投与した。APAP 負荷の 6 hr 後に採血し、血清 ALT を測定した。(A) 各群の血清 ALT、(B) CoQ₁₀-MITO-Porter の用量反応性、(C) CoQ₁₀-MITO-Porter と empty-MITO-Porter との比較

(A) mean with S.D., n=6, **p<0.01 by ANOVA followed by SNK test, (B) n=6, (C) mean with S.D., n=6, **p<0.01 by unpaired Student's t-test

3-5 組織学的評価

APAP 負荷後、各サンプルを投与し、6 hr にて肝臓組織を摘出し、組織損傷の度合いを HE 染色にて評価した (Fig. 3-6)。PBS (-) 群および CoQ₁₀ 懸濁液群では門脈周辺の白色に変色した壊死領域が観察され (青点線部位)、拡大図においても核の破壊や、細胞の空洞化および膨潤といった傷害所見が見られた。一方、CoQ₁₀-MITO-Portert 群では組織傷害所見が観察されず、正常に近い状態であった。さらに、アポトーシスの有無を確認するために TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) 染色をした (Fig. 3-7)。PBS (-) 群および CoQ₁₀ 懸濁液群では血清 ALT に関連したアポトーシス陽性の褐色領域が門脈周辺にて観察された。CoQ₁₀-MITO-Portert 群は褐色領域が広範囲に亘って観察されなかった。

したがって、組織学的評価からも APAP 肝障害に対する CoQ₁₀-MITO-Porter の肝障害抑制効果が示唆された。

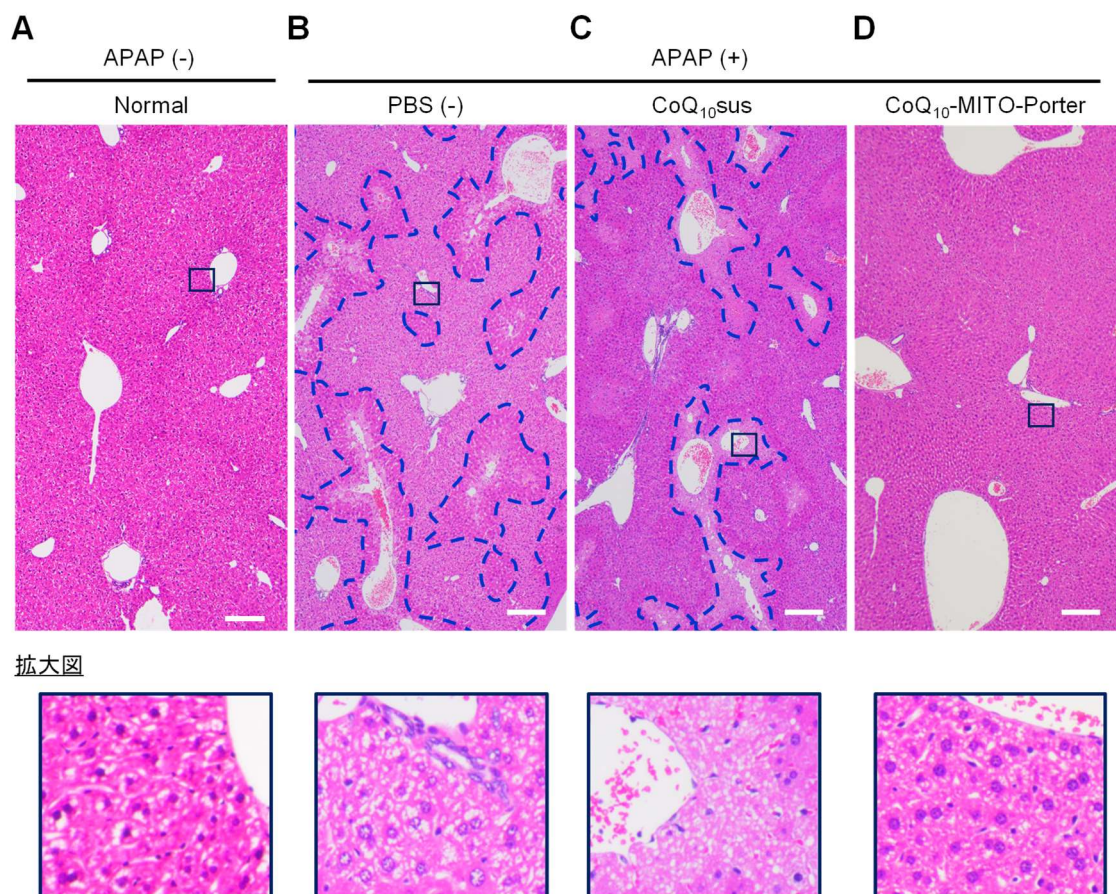


Fig. 3-6 APAP 肝障害モデルマウスにおける CoQ₁₀-MITO-Porter の傷害抑制効果

(A) 正常マウス (APAP 負荷なし)、(B)~(D) 21±3 hr 絶食したマウスに APAP 250 mg/kg 皮下投与し、その 1 hr 後に各サンプルを投与した。APAP 負荷から 6 hr 後に肝臓を摘出し、HE 染色をした。(B) PBS (-)、(C) CoQ₁₀ 懸濁液 (sus)、(D) CoQ₁₀-MITO-Porter

Scale bars: 100 μm、青点線:壊死領域、四角:拡大部分

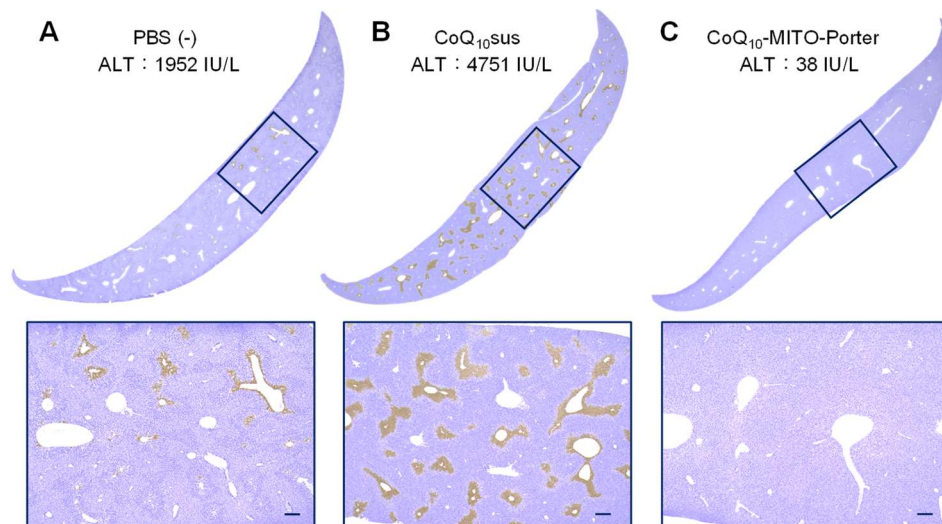


Fig. 3-7 APAP 肝障害モデルマウスにおける CoQ₁₀-MITO-Porter のアポトーシス抑制効果

21±3 hr 絶食したマウスに APAP 250 mg/kg 皮下投与し、その 1 hr 後に各サンプルを投与した。APAP 負荷から 6 hr 後に肝臓を摘出し、TUNEL 染色をした。(A) PBS (-)、(B) CoQ₁₀ sus、(C) CoQ₁₀-MITO-Porter
Scale bars: 100 μm、四角: 拡大部分

3-6 APAP 肝障害モデルへの治療効果に対する粒子物性の影響

CoQ₁₀-MITO-Porter の投与により、APAP 肝障害が軽減した要因として 2 つ考えられた。1 つは肝臓移行性および細胞内動態に影響を与える粒子サイズであり、もう 1 つはミトコンドリア融合性を有する脂質組成である。そこで、CoQ₁₀-MITO-Porter は治療効果の検証で用いた約 50 nm (small CoQ₁₀-MITO-Porter)の粒子サイズの他に、マイクロ流体デバイスの総流速を変化させて 100 nm (middle CoQ₁₀-MITO-Porter:総流速 100 μ L/min、CoQ₁₀-LP との比較として)および 200 nm (large CoQ₁₀-MITO-Porter:総流速 50 μ L/min、マウスのフェネストラ径よりも大きいサイズ)を調製した。CoQ₁₀-MITO-Porter との脂質組成の比較としてミトコンドリア低融合性脂質 (HSPC/Chol)からなる CoQ₁₀-LP も調製した。各粒子の物性は Table 3-3 に示した。APAP 肝障害モデルに各サンプルを投与した結果、血清 ALT は small CoQ₁₀-MITO-Porter が 47.3 ± 19.1 IU/L、middle CoQ₁₀-MITO-Porter が 125.8 ± 108.8 IU/L、large CoQ₁₀-MITO-Porter が 209.5 ± 214.1 IU/L および CoQ₁₀-LP が $2,103.0 \pm 2,985.4$ IU/L であった (Fig. 3-8)。MITO-Porter 組成の方が LP 組成よりも有意に肝障害抑制効果が高くなった。一方で、MITO-Porter のサイズの違いによる有意な差はなかったが、粒子サイズが小さくなるにつれて個体間のばらつきが少なく肝障害が軽減する傾向にあった。

したがって、CoQ₁₀-MITO-Porter の投与により、APAP 肝障害が軽減した要因としてミトコンドリア融合性を有する脂質組成の影響が大きいことが示唆された。

Table 3-3 投与した各粒子の物性

Sample	平均粒子径 (nm)	PDI	ζ-電位 (mV)
Small CoQ ₁₀ -MITO-Porter	49.7 ± 2.4	0.362 ± 0.03	12.5 ± 1.4
Middle CoQ ₁₀ -MITO-Porter	104.2 ± 4.4	0.174 ± 0.06	15.2 ± 1.9
Large CoQ ₁₀ -MITO-Porter	195.1 ± 11.5	0.201 ± 0.01	13.8 ± 0.2
CoQ ₁₀ -LP	109.4 ± 8.6	0.269 ± 0.05	12.4 ± 1.3

調製した各粒子の平均粒子径 (nm)、polydispersity index (PDI)、ζ-電位 (mV)を示す。(mean with S.D., n=3)

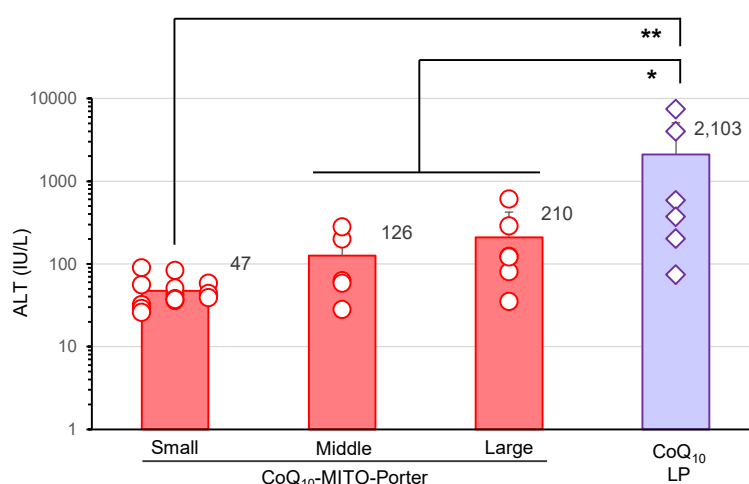


Fig. 3-8 APAP 肝障害における異なる粒子物性による影響

21±3 hr 絶食したマウスに APAP 250 mg/kg 皮下投与し、その 1 hr 後に各サンプルを投与した (CoQ₁₀: 5.4 mg/kg)。APAP 負荷から 6 hr 後に採血し、血清 ALT を測定した。棒グラフ右上の数値は平均値である。(mean with S.D., n=5-14, vs CoQ₁₀-LP, **p<0.01 *p<0.05 by ANOVA followed by Dunnett test)

3-7 粒子の肝臓移行性およびミトコンドリア移行性

粒子間に動態の違いがあるのか確認するために Small CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP に焦点を当て、粒子の肝臓移行性およびミトコンドリア移行性を評価した (Fig. 3-9)。粒子の動態を追うために DiD 標識した粒子を用いた。粒子の物性を Table 3-4 に示した。Small CoQ₁₀-MITO-Porter において、肝臓移行量は 0.5 hr が 19.6±4.5 FI/Liver protein (mg)、3 hr が 26.3±7.0 FI/Liver protein (mg) および 6 hr が 22.2±6.8 FI/Liver protein (mg) であった (Fig. 3-9A)。Small CoQ₁₀-MITO-Porter では 3 hr にピークが見られたため、CoQ₁₀-LP と比較すると 15.3±3.6 FI/Liver protein (mg) であった。したがって、肝臓移行量は Small CoQ₁₀-MITO-Porter の方が CoQ₁₀-LP よりも有意に高かった。次に肝臓ミトコンドリア移行量を評価した (Fig. 3-9B)。Small CoQ₁₀-MITO-Porter は、0.5 hr が 1.5±0.3 FI/ Mitochondria protein (mg)、3 hr が 3.9±1.0 FI/ Mitochondria protein (mg) および 6 hr が 4.0±1.5 FI/ Mitochondria protein (mg) であった。CoQ₁₀-LP は 3 hr で 2.4±0.4 FI/ Mitochondria protein (mg) だった。肝臓移行量と同様、肝臓ミトコンドリア移行量は Small CoQ₁₀-MITO-Porter の方が CoQ₁₀-LP よりも有意に高かった。そして、肝臓移行量と肝臓ミトコンドリア移行量の結果をもとにミ

ミトコンドリア移行率を算出した(Fig. 3-9C)。Small CoQ₁₀-MITO-Porter は、0.5 hr が 0.08 ± 0.01 、3 hr が 0.15 ± 0.04 および 6 hr が 0.18 ± 0.01 であった。3 hr での CoQ₁₀-LP は 0.16 ± 0.03 であった。ミトコンドリア移行率は Small CoQ₁₀-MITO-Porter と Small CoQ₁₀-LP とで有意な差は見られなかった。

したがって、Small CoQ₁₀-MITO-Porter は CoQ₁₀-LP と比較して、肝臓移行量および肝臓ミトコンドリア移行量においては有意な差があったが、ミトコンドリア移行率は同程度であった。

Table 3-4 投与した蛍光標識した各粒子の物性

Sample	平均粒子径 (nm)	PDI	ζ-電位 (mV)
DiD CoQ ₁₀ -MITO-Porter	52.5 ± 4.8	0.289 ± 0.06	13.8 ± 2.1
DiD CoQ ₁₀ -LP	115.0 ± 4.8	0.329 ± 0.04	14.9 ± 2.6

調製した各粒子の平均粒子径 (nm)、polydispersity index (PDI)、ζ-電位 (mV)を示す。(mean with S.D., n=3)

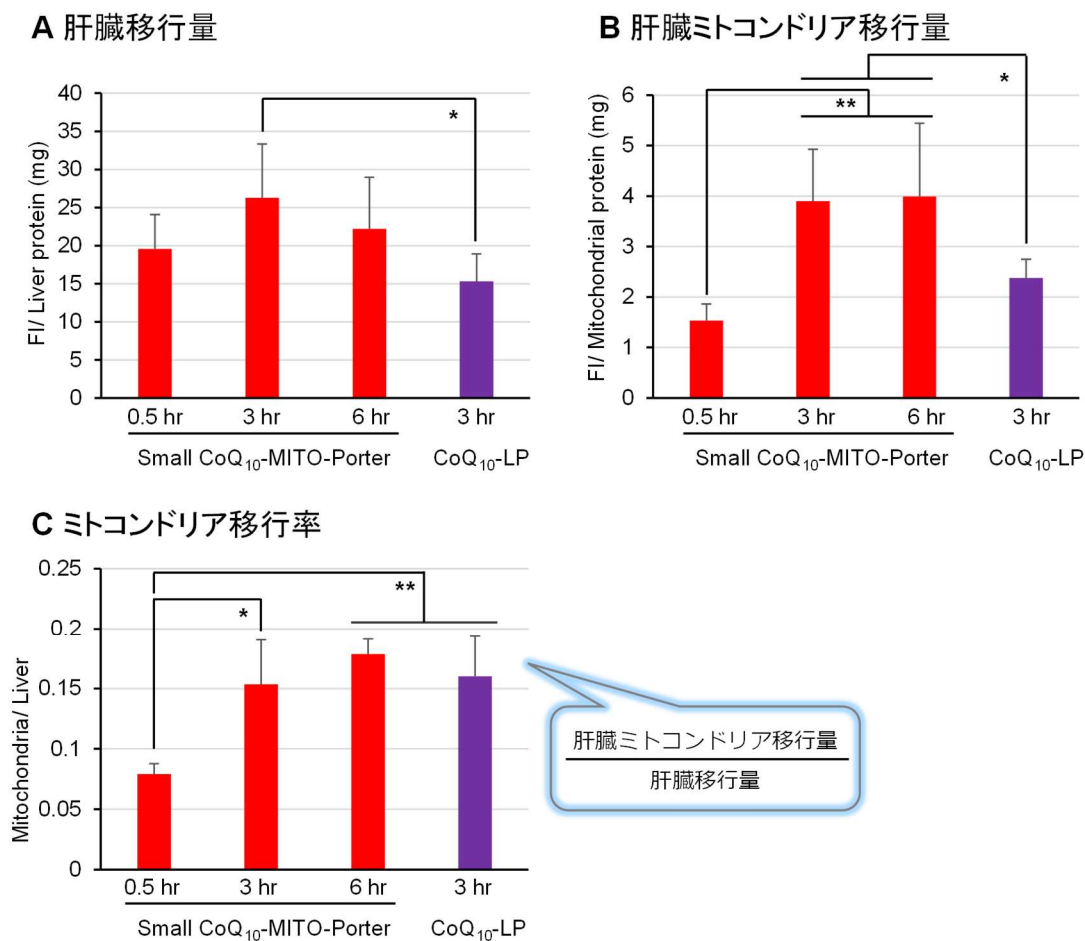


Fig. 3-9 粒子の肝臓移行性およびミトコンドリア移行性

脂質の 1%となるように DiD 標識した CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP を、正常マウスに尾静脈投与 (脂質量 ≈ 30 nmol/6 μ L/g、蛍光強度を揃えてから投与)し、6 hr 後に脱血操作をしてから肝臓を摘出した。肝臓移行性の評価には肝臓ホモジネート液、ミトコンドリア移行性の評価には肝臓からの単離ミトコンドリア液を用いて蛍光強度を測定した。(a) 肝臓移行量、(b) 肝臓ミトコンドリア移行量、(c) ミトコンドリア移行率

mean with S.D., n=3-8, **p<0.01 *p<0.05 by ANOVA followed by SNK test

3-8 CoQ₁₀ のミトコンドリア移行性

粒子のミトコンドリア移行性の結果をもとに、ミトコンドリア移行性が確認できた 3 hr、さらに small CoQ₁₀-MITO-Porter においては APAP 肝障害モデルでの評価時点である 6 hr にて CoQ₁₀ の定量を試みた (Fig. 3-10)。投与群は CoQ₁₀ 懸濁液群、small CoQ₁₀-MITO-Porter 群および CoQ₁₀-LP 群とし、CoQ₁₀ 投与量は 5.4 mg/kg とした。総 CoQ₁₀ は、CoQ₁₀ 懸濁液群が 17.8±4.6 ng/Mitochondria protein (mg)、small CoQ₁₀-MITO-Porter (3 hr)群が 475.0±38.7 ng/Mitochondria protein (mg)、small CoQ₁₀-MITO-Porter (6 hr)群が 405.0±90.4 ng/Mitochondria protein (mg)および CoQ₁₀-LP 群が 356.7±186.1 ng/ Mitochondria protein (mg)であった(Fig. 3-10A)。Small CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP は CoQ₁₀ 懸濁液と比較して CoQ₁₀ のミトコンドリア移行量が有意に高かった。粒子間における CoQ₁₀ のミトコンドリア移行量には有意な差は見られなかった。総 CoQ₁₀ の還元型 CoQ₁₀ と酸化型 CoQ₁₀ が占める比率 (還元型 CoQ₁₀:酸化型 CoQ₁₀)は、CoQ₁₀ 懸濁液群が 19.9%:80.1%、small CoQ₁₀-MITO-Porter (3 hr)群が 78.8%:21.2%、small CoQ₁₀-MITO-Porter (6 hr)群が 33.4%:66.6%および CoQ₁₀-LP 群が 84.1%:15.9%であった(Fig. 3-10C)。投与から 3hr において、CoQ₁₀ 懸濁液群は酸化型 CoQ₁₀ の比率が高かったが、small CoQ₁₀-MITO-Porter 群および CoQ₁₀-LP 群では還元型 CoQ₁₀ の比率の方が高かった。さらに small CoQ₁₀-MITO-Porter 群は 6hr になると酸化型 CoQ₁₀ の比率が高くなった。また CoQ₉ (マウスの内因性 CoQ)を定量したところ、各群において有意な差は見られなかった(Fig. 3-10B)。総 CoQ₉ の還元型 CoQ₉ と酸化型 CoQ₉ が占める比率 (還元型 CoQ₉:酸化型 CoQ₉)は、CoQ₁₀ 懸濁液群が 12.5%:87.5%、small CoQ₁₀-MITO-Porter (3 hr)群が 69.9%:30.1%、small CoQ₁₀-MITO-Porter (6 hr)群が 27.2%:72.8% および CoQ₁₀-LP 群が 64.2%:35.8%であった(Fig. 3-10D)。

したがって製剤的工夫を施していない CoQ₁₀ 懸濁液では、ミトコンドリアへ CoQ₁₀ を送達させることは難しく、CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP といった脂質ナノ粒子化は CoQ₁₀ のミトコンドリアへ送達を可能にした。また総 CoQ₉ において各群で有意差が見られなかったため、マウス内因性の CoQ₉ の生合成に影響を与えないと考えられた。

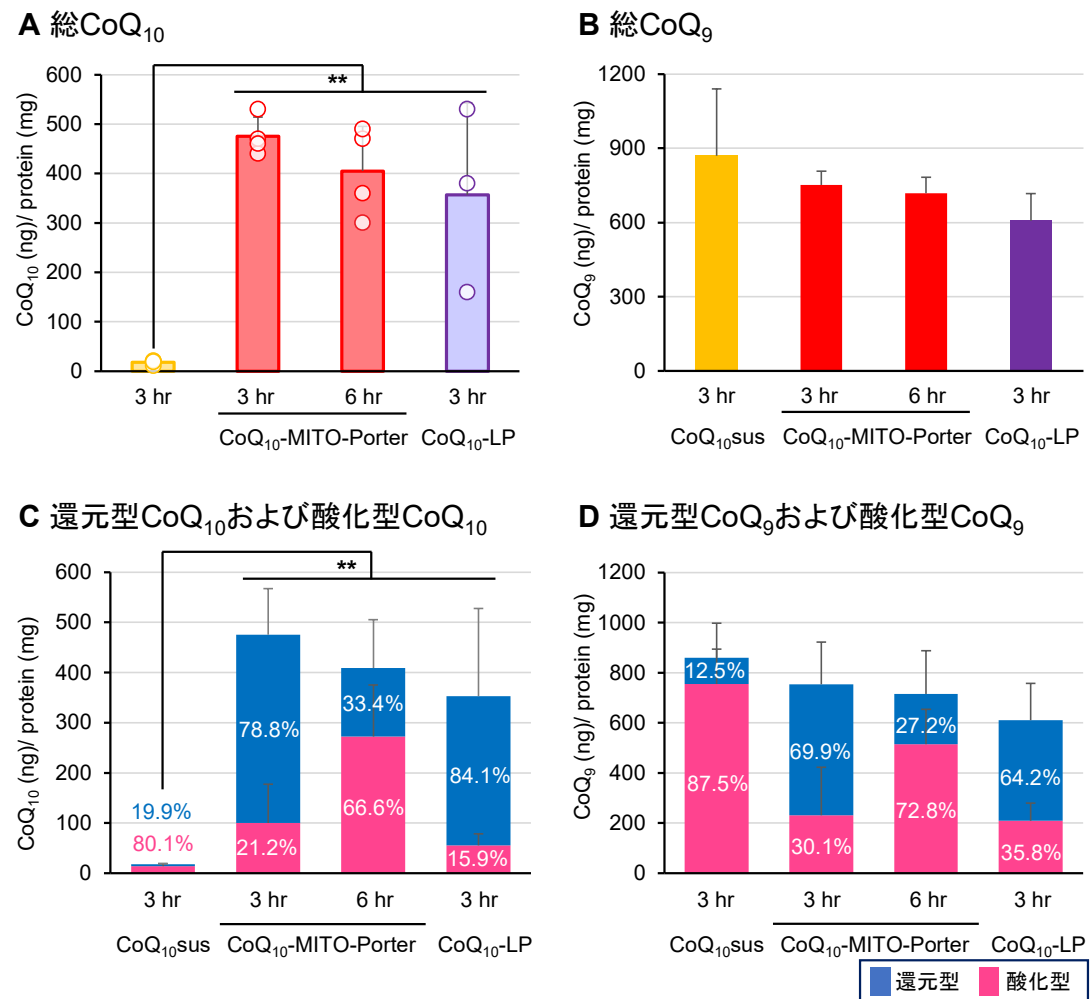


Fig. 3-10 CoQ₁₀ のミトコンドリア移行性

CoQ₁₀ 懸濁液 (suspension:sus)、CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP を、正常マウスに尾静脈投与 (CoQ₁₀:5.4 mg/kg (8 μ L/g))し、6 hr 後に脱血操作をしてから肝臓の摘出を行い、ミトコンドリアを単離し、CoQ₁₀ および CoQ₉ の定量をした。投与に用いた粒子の物性は Table 3-3 を参照。(A) 総 CoQ₁₀ (外因性 CoQ)、(B)総 CoQ₉ (マウス内因性 CoQ)、(C) 還元型 CoQ₁₀ および酸化型 CoQ₁₀、(D) 還元型 CoQ₉ および酸化型 CoQ₉ (mean with S.D., n=3-4, **p<0.01 by ANOVA followed by SNK test)

考察

CoQ₁₀-MITO-Porter は、*ex vivo* イメージングの結果より尾静脈投与後、肝臓に最も集積していた (Fig. 3-2)。CoQ₁₀-MITO-Porter は、R8 が粒子表面に修飾されている。R8 が修飾されたナノ粒子は、肝臓に集積しやすいため¹²¹⁾、CoQ₁₀-MITO-Porter も同様の生体内分布を示したと考えられた。また、カチオン性リポソームは肺に集積する傾向があり¹²²⁾、CoQ₁₀-MITO-Porter は R8 修飾に由来する正電荷を有するため、肝臓に次いで肺への集積も観察されたと推察された。

APAP 肝障害モデルは、単回の薬物負荷により病態を再現できる比較的扱いやすいモデルであるが、遺伝的背景、性別、飼育環境、絶食期間、投与経路などによる変動を考慮する必要がある¹²³⁾。APAP 肝障害モデル作製のために皮下投与および尾静脈投与を試みたが、どの評価時点においても個体値のばらつきが大きい傾向であった (Fig. 3-3)。投与経路による肝障害誘発作用の違いではなく、急性毒性に起因する個体間のぶれによるものと考えられた。APAP 肝障害モデルマウスを用いた検証では血清 ALT が 1,000 IU/L 以下または 3,000～5,000 IU/L を示すモデルで評価する場合が多い^{99, 100)}。そこで血清 ALT が 3,000～5,000 IU/L 付近で、比較的個体値の変動が少なかった APAP 250 mg/kg 6hr という条件を、CoQ₁₀-MITO-Porter の投与による治療効果の検証に用いることにした。

APAP 肝障害モデルに対する CoQ₁₀-MITO-Porter の投与は、生化学的評価および組織学的評価の観点から肝障害抑制効果を示したことを確認した (Fig. 3-5, 3-6, 3-7)。CoQ₁₀-MITO-Porter による治療効果を得るためには最適な投与量があり、CoQ₁₀ 5.4 mg/kg であった。APAP 肝障害に対する異なる粒子サイズ (50、100 および 200 nm) の CoQ₁₀-MITO-Porter の投与は、効果に有意差は見られなかったものの、粒子サイズが小さい方が血清 ALT は正常値に近づき、個体値のぶれが少ない傾向にあった (Fig. 3-8)。マウスに粒子サイズが 60 nm のナノ粒子を投与するとフェネストラを通過し、肝細胞に移行しやすく、120 nm のナノ粒子を投与すると一部がクッパー細胞に除去され、肝細胞への移行が阻害されることで APAP 肝障害における抑制効果に差が出るとの報告がある¹²⁴⁾。APAP 肝障害発症の引き金である代謝活性物 NAPQI は肝細胞にて産生されるため^{103, 125)}、治療分子を肝細胞に送達させることは、重要な治療戦略であると考えられる。先行研究より、200 nm の CoQ₁₀-MITO-Porter を尾静脈投与すると、100 nm のものと比べるとシグナルは弱い、肝細胞への移行が観察されている⁴⁴⁾。マウスのフェネストラは 100～150 nm を中心に広く分布しているため¹²⁶⁾、粒子サイズが多少大きくても肝細胞に取り込まれると考えられた。したがって、3 種類の粒子サイズの CoQ₁₀-MITO-Porter はある一定の効果が見込めたと推察された。

MITO-Porter 組成はミトコンドリア低融合性脂質からなる LP 組成よりも有意に APAP 肝障害を軽減させた。粒子の肝臓移行量および肝臓ミトコンドリア移行量は CoQ₁₀-LP よりも CoQ₁₀-MITO-Porter の方が有意に高かったが、ミトコンドリア移行率には差が見られなかった (Fig. 3-9)。また総 CoQ₁₀ 量においても、CoQ₁₀-MITO-Porter と CoQ₁₀-LP とで有意な差は見られなかった (Fig. 3-10)。先行研究において、CoQ₁₀-MITO-Porter とミトコンドリア低融合性脂質からなる CoQ₁₀ 搭載リポソーム (双方ともミトコンドリア移行性素子である R8 が修飾されている) はミトコンドリアとの結合性は同

程度であるが、融合性は CoQ₁₀-MITO-Porter の方が明らかに高く、融合性の違いが肝虚血再灌流モデルマウスへの傷害抑制効果に影響を及ぼすことを示している⁴⁴⁾。CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP は R8 修飾による正に帯電した粒子であり、ミトコンドリアは負に帯電するため、静電的相互作用によりミトコンドリアへ移行することができる。本研究でのミトコンドリア移行率は先行研究でのミトコンドリア結合率と相関する結果であると考えられた。また、CoQ₁₀-LP はコレステロールを含有している。ミトコンドリアへのコレステロールの蓄積は、膜の流動性低下による輸送担体機能への影響、ROS 産生の増加およびミトコンドリア機能の低下をもたらす¹²⁷⁾。CoQ₁₀-LP の肝障害抑制効果が CoQ₁₀-MITO-Porter よりも劣るのは、粒子に含まれるコレステロールによるミトコンドリア傷害が生じているかもしれない。CoQ₁₀-MITO-Porter と CoQ₁₀-LP とで内封分子である CoQ₁₀ を単離ミトコンドリアにおいて検出できたが、送達量に有意な差はなかった。ミトコンドリアコンパートメントの飽和やマウスの酸化ストレス状態などで CoQ₁₀ の送達量に変化がみられる可能性があるため、CoQ₁₀ の動態について今後さらなる検討が必要である。CoQ₁₀ 懸濁液群はほとんど総 CoQ₁₀ が検出されなかったことから、無処理のマウスと同等と考えられる。外因性の CoQ₁₀ は生体内において還元酵素のより還元型に転ずると言われている¹²⁸⁾。CoQ₁₀ 懸濁液において、わずかにミトコンドリアへ送達した CoQ₁₀ は、消費されて還元型 CoQ₁₀ から酸化型 CoQ₁₀ に転ずる比率が高い。一方で、CoQ₁₀-MITO-Porter と CoQ₁₀-LP では、CoQ₁₀ 懸濁液と比較して総 CoQ₁₀ の送達量が多く、3hr のにおいても還元型 CoQ₁₀ の比率が高い。そして、CoQ₁₀-MITO-Porter は 6hr になると還元型 CoQ₁₀ が減少し、酸化型 CoQ₁₀ が増加した。CoQ₉ の定量結果より、各群において同等の CoQ₉ 量を示し、マウス内因性 CoQ の生合成に影響を与えないと考えられたが、CoQ₁₀ 送達量の違いによって還元型 CoQ₉ と酸化型 CoQ₉ の比率に変化が見られた。CoQ₁₀ 懸濁液では酸化型 CoQ₉ が多いが、CoQ₁₀-MITO-Porter と CoQ₁₀-LP では還元型 CoQ₉ の方が多い。したがって、粒子投与群では外因性の CoQ₁₀ が優先的に消費されたため、還元型 CoQ₉ の比率が酸化型 CoQ₉ よりも高く保持された可能性がある。投与後 3hr の CoQ₁₀ は還元型が多く検出され、酸化ストレスの軽減が期待された。外因性 CoQ₁₀ は経時的に還元型 CoQ₁₀ から酸化型 CoQ₁₀ に変化した。この変化が、酸化ストレスやミトコンドリア代謝によるものなのか、それとも酸化型 CoQ₁₀ から還元型 CoQ₁₀ に変換する効率の低下によるものなのか、さらなる検討が必要である。

CoQ₁₀ のような抗酸化分子がミトコンドリアで効果を発揮するためには、ミトコンドリアへの移行性およびミトコンドリアとの膜融合によるミトコンドリア内部への分子送達が必要である。ROS の主要な発生源はミトコンドリアであり、酸化ストレスの軽減のためにミトコンドリアへ抗酸化分子を送達することは、APAP 肝障害などのミトコンドリア関連疾患において重要な治療戦略の一つであると考えられる。

結語

本研究において得られた成果を以下にまとめる。

1. マイクロ流体デバイスを用いた CoQ₁₀-MITO-Porter の調製法を確立し、従来法と比較して粒子の微小化、均一性の向上および大量調製に成功した⁹⁴⁾。
2. 微小化した CoQ₁₀-MITO-Porter は細胞導入および Mt 移行性が増大した⁹⁴⁾。
3. 急性期疾患である APAP 肝障害への CoQ₁₀-MITO-Porter の投与は、傷害を軽減させることができた。

本研究成果は CoQ₁₀ のような難水溶性薬物の可溶化技術への応用や従来の CoQ₁₀ 製剤では困難であった急性期疾患への適応にも期待され、Mitochondrial Nano Medicine の候補製剤になり得る。

CoQ₁₀-MITO-Porter の実用化を加速させるために、保存安定性を高めた凍結乾燥品などの製剤化の検討や他のミトコンドリア関連疾患での治療実績の積み上げが必要である。

まだまだ課題は山積しているが、本研究で得られた成果がミトコンドリア創薬発展の一助となることを切に願い、本稿を終える。

実験方法

実験試薬・材料

細胞培養関連

HeLa 細胞は RIKEN BioResource Center (Ibaraki, JAPAN)より購入した。DMEM Low glucose、Penicillin (10,000 U/mL)-Streptomycin (10,000 µg/mL)-Amphotericin B (25 µg/mL) Suspension (100×)およびヘパリンナトリウムは FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, JAPAN)より購入した。胎児牛血清 (Fetal bovine serum:FBS)は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)より購入した。PBS タブレットは Takara Bio Inc. (Shiga, JAPAN)より購入した。0.5% Trypsin/5.3 mM EDTA solution は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) より購入した。Cell Banker は Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd. (Fukushima, JAPAN)より購入した。10 cm デイッシュは Corning (NY, USA)より購入した。

粒子調製関連

DOPE および DMG-PEG 2000 は NOF Corporation (Tokyo, JAPAN)より購入した。SM、HSPC および NBD-DOPE は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)より購入した。CoQ₁₀ および D(+)-glucose は FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, JAPAN)より購入した。STR-R8 は Toray Industries, Inc. (Tokyo, JAPAN)より購入した。Chol は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)より購入した。DiD は Funakoshi Co., Ltd. (Tokyo, JAPAN)より購入した。PBS タブレットは Takara Bio Inc. (Shiga, JAPAN)より購入した。HEPES は DOJINDO LABORATORIES (Kumamoto, JAPAN)より購入した。Amicon Ultra-15 (MWCO : 100 kDa)は Merck Millipore Corporation (Darmstadt, Germany)より購入した。Glass syringe (ガスタイトシリンジ (1,000 シリーズ)ルアーロック型 TLL 標準型)は Hamilton Co. (Reno, NV, USA)より購入した。シリンジ用コネクター (ルアーロックタイプシリンジ対応 : ISC-011)は Institute of Microchemical Technology Co., Ltd. (Kawasaki, JAPAN)より購入した。Spectra/Por 4 dialysis membrane (MWCO : 12000-14000)は Spectrum Laboratories Inc. (LA, CA, USA)より購入した。

FACS 関連

アジ化ナトリウム、ヘパリンナトリウムおよびナイロンメッシュは FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, JAPAN)より購入した。0.5% Trypsin/5.3 mM EDTA solution は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) より購入した。

顕微鏡関連

MitoTracker[®] Deep Red は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA) より購入した。

その他

アセトアミノフェン (APAP)は FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, JAPAN)より購入した。イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」は Mylan Seiyaku Ltd. (Tokyo, JAPAN) より購入した。C57BL/6 J マウス (8～10 週齢、雄)は CLEA JAPAN, Inc. (Tokyo, JAPAN) より購入した。

その他の試薬および溶媒については、特に記載がない限り市販の特級または一級のもの、あるいはそれに準ずるものを用いた。

実験機器

細胞培養関連

クリーンベンチ：NS-13B (BIOLABO)、MCV-710ATS (SANYO, Tokyo, JAPAN)
クラス II B 安全キャビネット：VH-1300BH-2B (日本医化器械製作所, Osaka, JAPAN)
自動炭酸ガス細胞培養装置：5400 (NAPCO)、MCO-19AIC, 175 (SANYO, Tokyo, JAPAN)
高圧蒸気滅菌器：BS-325 (TOMY, Tokyo, JAPAN)
乾熱滅菌器：NDS-601D natural sterilizer (EYELA, Tokyo, JAPAN)
アスピレーター：MDA-015 (アルバック機工, Miyazaki, JAPAN)
ユニット恒温槽：SM-05 (TAITEC, Saitama, JAPAN)

粒子調製関連

卓上型冷却トラップ装置：UT-1010 (TOKYO RIKAKIKAI CO, LTD., Tokyo, JAPAN)
真空デシケーター：V-30 59-0162 (伸栄産業株式会社, Nagoya, JAPAN)
超音波洗浄機：AU-25C Ultra sonic cleaner (アイワ医科工業株式会社, Tokyo, JAPAN)
シリンジポンプ：PUMP 11 ELITE (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)

顕微鏡関連

共焦点レーザー走査型顕微鏡：FV10i-LIV (OLYMPUS, Tokyo, JAPAN)
対物レンズ：UPlanSApo 60×/NA=1.2 water OLYMPUS
レーザー：LD laser 405 nm, 473 nm, 559 nm, 635 nm
ダイクロイックミラー：405/473/559/635 OLYMPUS

動物実験関連

余剰ガス回収キャニスター：ENVIRO-PURE® Charcoal Canister (Surgivet, Norwell, MA, USA)
余剰ガス回収装置：NT-10 (NEUROSCEINCE, Tokyo, JAPAN)
小動物用麻酔装置：NS-AN-20 (NEUROSCEINCE, Tokyo, JAPAN)
麻酔導入用ボックス：M-220 (NEUROSCEINCE, Tokyo, JAPAN)

ミトコンドリア単離実験関連

5 mL ホモジナイザーPTEE ペストル (81-0433) (株式会社三商, Tokyo, JAPAN)

10 mL ホモジナイザーPTEE ペストル (81-0434) (株式会社三商, Tokyo, JAPAN)

ホモジナイザー：NZ-1100 (TOKYO RIKAKIKAI CO, LTD., Tokyo, JAPAN)

遠心機器

多本架冷却遠心機：AX-511 (TOMY, Tokyo, JAPAN)

微量高速冷却遠心機は、MX-200, 305 (TOMY, Tokyo, JAPAN)

マイクロ冷却遠心機：3520 (KUBOTA, Osaka, JAPAN)

高速冷却遠心機：himac CR22G III (Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Ibaraki, JAPAN)

アングルローター：A18A (Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Ibaraki, JAPAN)

測定機器

吸光度測定：DU-730 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

フローサイトメーター：FACS Gallios (Beckman Coulter, Indiana, USA)

pH メーター：Docu-pH Meter (Sartorius, Jena, Germany)

粒子径・ゼータ電位分析装置：Zetasizer Nano ZS (Malvern, Herrenberg, Germany)

蛍光・吸光プレートリーダー：Enspire 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, NY, USA)

蛍光・吸光プレートリーダー：Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

高速液体クロマトグラフィー：Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Ltd., Santa Clara, CA, USA)

超微量分光光度計：NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

システム実体顕微鏡：SMZ1270i (Nikon Corporation, Tokyo, JAPAN)

ボルテックスミキサー：VORTEX-GENIE 2(Scientific Industries, NY, USA)

一般試薬調製

本研究で使用した試薬、緩衝液などを以下に示す。フィルターによる濾過滅菌には Advantech DISMIC-25AS 0.20 μm (Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, JAPAN)を用いた。オートクレーブによる高圧蒸気滅菌は 121°C、20 min の条件で行った。

細胞培養関連

非働化 FBS

-20°C で保存された FBS を室温で 10 min 置き、37°C の温浴で解凍し、56°C で 30 min インキュベーションした後、50 mL ずつ分注し、-20°C で保存した。

培地

DMEM Low glucose (FBS-) 450 mL に非働化 FBS 50 mL (最終濃度:10% FBS)と Penicillin (10,000 U/mL)-Streptomycin (10,000 $\mu\text{g/mL}$)-Amphotericin B (25 $\mu\text{g/mL}$) Suspension (100 $\times$) 5 mL (最終濃度:Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 $\mu\text{g/mL}$, Amphotericin B 0.25 $\mu\text{g/mL}$)を混合し、4 °C で保存した。

PBS (-) (pH 7.4)

PBS タブレット (100 mL/tablet)5 個を DDW 500 mL に溶解し、高圧蒸気滅菌を行い、4 °C で保存した。

粒子調製関連

PBS (-) (pH 7.4)

PBS タブレット (100 mL/tablet)5 個を DDW 500 mL に溶解し、4 °C で保存した。

10mM HEPES Buffer (pH 7.4)

HEPES 238.31 mg を DDW で溶解し、1 N NaOH にて pH 7.4 に調整した後、DDW を加え全量 100 mL とし、フィルター濾過滅菌を行い、4 °C で保存した。

10mM HEPES glucose Buffer (pH 7.4)

HEPES 238.31 mg、glucose 5.22 g を DDW で溶解し、1 N NaOH にて pH 7.4 に調整した後、DDW を加え全量 100 mL とし、フィルター濾過滅菌を行い、4 °C で保存した。

7.5 mM DOPE, SM, HSPC, Chol 溶液 (EtOH)

DOPE 55.8 mg、SM 54.82 mg、HSPC 55.8 mg、Chol 29.0 mg をそれぞれ EtOH 10 mL に溶解し、脂質溶液を調製し、-20 °C で保存した。

7.5 mM DMG-PEG 2000 溶液 (EtOH)

DMG-PEG 2000 11.13 mg を EtOH 0.6 mL に溶解し、PEG 脂質溶液を調製し、-20 °C で保存した。

7.5 mM CoQ₁₀ 溶液 (EtOH)

CoQ₁₀ 12.95 mg を EtOH 10 mL に溶解し、CoQ₁₀ 溶液を調製し、遮光して-20 °C で保存した。

20 mg/mL STR-R8 溶液 (EtOH)

STR-R8 粉末に 20 mg/mL となるよう適量の EtOH を加えて溶解し、-20 °C で保存した。

1 mM NBD-DOPE 溶液 (EtOH)

NBD-DOPE 9.24 mg を EtOH 10 mL に溶解し、NBD-DOPE 溶液を調製し、遮光して-20 °C で保存した。

【Ex 460 nm/Em 535 nm】

1 mM DiD 溶液 (EtOH)

DiD 10.52 mg を EtOH 10 mL に溶解し、DiD 溶液を調製し、遮光して-20 °C で保存した。

【Ex 644 nm/Em 665 nm】

その他

FACS buffer

PBS (-)に 0.5%の BSA、0.1%のアジ化ナトリウムを加え、4 °C で保存した。

1 mM MitoTracker Deep Red

MitoTracker Deep Red 50 µg を DMSO (脱水) 92 µL に溶解し、遮光して-20 °C で保存した。

【Ex 644 nm/Em 665 nm】

ヘパリン溶液 (20 units/mL)

PBS (-)50 mL に、ヘパリンナトリウム (130 units/mg)7.68 g を加え、4 °C で保存した。

0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA solution

0.5% Trypsin/5.3 mM EDTA solution 1mL に PBS (-) 9 mL を加え、4 °C で保存した。

10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 溶液

DDW 50 mL に、SDS 5.0 g を加え、4 °C で保存した。

MIB (mitochondria isolation buffer) (EDTA+)

Sucrose 8.56 g、Tris 24.2 mg、EDTA-2Na-2H₂O 37.2 mg を DDW に溶解し、HCl で pH7.4 に調整したあと 100 mL にメスアップし、4 °C で保存した。

MIB (EDTA-)

Sucrose 8.56 g、Tris 24.2 mg を DDW に溶解し、HCl で pH7.4 に調整したあと 100 mL にメスアップし、4 °C で保存した。

実験操作・方法

一般操作

細胞培養

凍結した細胞の培養を開始する際は、37°C に加温した培地を凍結した細胞懸濁液 1 mL に加えて速やかに融解し、9 mL の培地を加えた 50 mL コニカルチューブに移した。100g、4°C、3 min で遠心して上清を除き、細胞を 10 mL の培地で穏やかに再懸濁させ、10 cm 細胞培養用ディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、翌日に培地交換した。培養細胞は 3-4 日毎に継代した。培地を除き、PBS (-) 5 mL で洗浄した後、0.5% Trypsin/5.3 mM EDTA solution 2 mL 加え、37°C、5% CO₂ 条件下で 3 min インキュベートした。細胞が剥がれたことを確認後、培地 8 mL を加えて 50 mL コニカルチューブに回収し、100g、4°C、3 min で遠心して上清を除いた。細胞ペレットを培地 10 mL に懸濁し、この溶液から 10 μ L を取り、等量の 0.03% Trypan blue 溶液と混合した後、血球計測盤に 10 μ L 注ぎ、顕微鏡下で生細胞数を計測した。算出された細胞数に基づき、任意の濃度になるように培地で希釈し、10 cm 細胞培養用ディッシュに播種して、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

EtOH 希釈法 (従来法)による CoQ₁₀-MITO-Porter の調製

使用前に脂質溶液、PBS (-)を全て室温に戻した。CoQ₁₀ 溶液は 50°C、2min で加温して完全に溶解させた。エッペンドルフチューブに脂質溶液*1を調製した。NBD を標識する場合は、1 mM NBD-DOPE (EtOH)を 0.5%になるように添加した(8.24 μ L)。この脂質溶液をボルテックスしながらバッファーを加えて、脂質溶液を 90%に希釈した。添加後 3 sec ボルテックスを続けて、その後すぐに脂質溶液が 5%まで希釈されるようにバッファー中に添加した (全量 6 mL)。この溶液を遠心式フィルターデバイス Amicon® (MWCO : 100 kDa)に加え、さらにバッファーで 12 mL までメスアップし、その後限外濾過を行った (1,000 g、約 10 min、25°C)。適量までリポソーム溶液が濃縮されたら廃液を捨てて新たに 12 mL のバッファーを加えて、再度限外濾過を行った (1,000 g、約 15 min、25°C)。適量 ($\approx$ 400 μ L)までリポソーム溶液が濃縮されたら、アミコン内をよく洗浄し、エッペンドルフチューブにリポソーム溶液を回収した。粒子への STR-R8 の修飾は、CoQ₁₀ の回収率と脂質の回収率が同等と仮定して、CoQ₁₀ の回収率を元に計算された脂質量の 10%になるように、2 mg/mL STR-R8 (DDW)を粒子溶液にボルテックスしながら添加した。その後室温で 30 min インキュベーションした。低電位 CoQ₁₀-MITO-Porter は 400 μ L、高電位 CoQ₁₀-MITO-Porter は 100 μ L の粒子溶液に対して STR-R8 を必要量添加して調製した。

*1 CoQ₁₀-MITO-Porter の脂質溶液の内訳
DOPE/SM/DMG-PEG 2000/CoQ₁₀=9/2/0.33/2

7.5 mM DOPE (EtOH)	180 μ L
7.5 mM SM (EtOH)	40 μ L
1.5 mM CoQ ₁₀ (EtOH)	200 μ L
7.5 mM DMG-PEG 2000 (EtOH)	6.6 μ L
EtOH	3.4 μ L
Total	430 μ L
※NBD を標識する場合	
1 mM NBD-DOPE (EtOH)	8.24 μ L (脂質量の 0.5 mol%)

マイクロ流体デバイスを用いた CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP の調製

使用前に脂質溶液、PBS (-)を全て室温に戻した。CoQ₁₀ 溶液は 50°C、2min で加温して完全に溶解させた。CoQ₁₀-MITO-Porter の調製では、エッペンドルフチューブに脂質溶液*2を調製した。

調製した脂質溶液および PBS をシリンジに充填し、それぞれシリンジポンプに装着した。バッフルミキサー内蔵マイクロデバイス (iLiNP)とシリンジをコネクターで接続し、総流速 50~500 μ L/min にてマイクロ流路内に各溶液を流した。流速比 (水相/脂質相)は最終エタノール希釈濃度が 10-40%となるようにシリンジポンプの流速を制御した。マイクロ流体デバイスは北海道大学大学院工学研究院 生物計測化学研究室准教授 真栄城真寿先生よりご供与いただいた。調製後の粒子溶液は、透析膜 Spectra/Por 4 dialysis membrane (MWCO: 12000-14000)に加え、外水相を PBS (-)として 4、25 °C で 2 時間以上透析した。透析終了後、粒子溶液を回収した。

CoQ₁₀-LP の調製では、エッペンドルフチューブに脂質溶液*3を調製した。

マイクロ流体デバイスを用いた調製では、総流速 500 μ L/min、流速比は最終エタノール希釈濃度が 40%となるようにシリンジポンプの流速を制御した。透析溶媒は 25 °C PBS (-)を用いた。その他の操作は前述した CoQ₁₀-MITO-Porter の調製法と同じである。

*2 CoQ₁₀-MITO-Porter の脂質溶液の内訳

DOPE/SM/DMG-PEG 2000/CoQ₁₀/STR-R8=9/2/0.33/2/1.1

7.5 mM DOPE (EtOH)	180 μ L
7.5 mM SM (EtOH)	40 μ L
1.5 mM CoQ ₁₀ (EtOH)	200 μ L (empty-MITO-Porter の場合は EtOH)
7.5 mM DMG-PEG 2000 (EtOH)	6.6 μ L
20 mg/mL STR-R8(MW1533)	12.6 μ L (脂質量の 10 mol%)
EtOH	3.4 μ L
Total	442.6 μ L
※NBD を標識する場合	
1 mM NBD-DOPE (EtOH)	8.24 μ L (脂質量の 0.5 mol%)

※DiD を標識する場合

1 mM DiD (EtOH)	8.23 μ L(脂質量の 0.5 mol%)
1 mM DiD (EtOH)	16.48 μ L(脂質量の 1 mol%)

* 3 CoQ₁₀-LP の脂質溶液の内訳

HSPC/Chol/DMG-PEG 2000/CoQ₁₀/STR-R8=3/2/0.33/2/1.1

7.5 mM HSPC (EtOH)	66 μ L
7.5 mM Chol (EtOH)	44 μ L
1.5 mM CoQ ₁₀ (EtOH)	100 μ L
7.5 mM DMG-PEG 2000 in EtOH	3.3 μ L
20 mg/mL STR-R8(MW1533)	6.3 μ L (脂質量の 10 mol%)
EtOH	223 μ L
Total	442.6 μ L

※DiD を標識する場合

0.5 mM DiD (EtOH)	8.23 μ L(脂質量の 0.5 mol%)
0.5 mM DiD (EtOH)	16.48 μ L(脂質量の 1 mol%)

粒子径、ゼータ電位測定

粒子径は小容量石英セル (DTS2145)に粒子溶液 50 μ L 加え、Zeta Sizer ZS を用いて測定した。ゼータ電位はキャピラリーセル (DTS1060) に粒子溶液 50 μ L と 10 mM HEPES buffer 450 μ L の混合液 (10 倍希釈)を加え、Zeta Sizer ZS を用いて測定した。

粒子の濃縮操作

CoQ₁₀-MITO-Porter 溶液 (特に small CoQ₁₀-MITO-Porter)1.5 mL と PBS (-) (4, 25 $^{\circ}$ C、3.5, 8.5, 13.5 mL)の混合溶液を Amicon[®]システムによる限外濾過 (25 $^{\circ}$ C、1000g、25 min)により濃縮した。濃縮条件は、PBS (-) (25 $^{\circ}$ C、8.5 mL)を追加した時が効率よく濃縮され($\approx$ 200 μ L)、物性変化が見られなかったため、この条件を他の粒子溶液にも使用することとした。遠心時間は、empty-MITO-Porter が 25 min、middle CoQ₁₀-MITO-Porter が 35 min、large CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP が 60 min とすることで $\approx$ 200 μ L まで濃縮された。

CoQ₁₀ 濃度、CoQ₁₀ 回収率、Drug/Lipid

各試料 (CoQ₁₀ 濃度および CoQ₁₀ 回収率は蛍光標識しない CoQ₁₀-MITO-Porter、Drug/Lipid は NBD-DOPE 標識 CoQ₁₀-MITO-Porter を使用) 50 μ L をデシケーターで溶媒を除去し、その後エタノール 500 μ L に溶解し、1 min 超音波処理した。各試料は Advantech DISMIC-25CS 0.20 μ m (Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, JAPAN)にて濾過し、析出した PBS(-)を除去した。吸光度法による CoQ₁₀ 濃度を定量する場合は、DU-730 を用いて測定波長 275 nm にて測定し

た。また、得られた試料を液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)で分離し、CoQ₁₀ 濃度、仕込んだ CoQ₁₀ の量に対する粒子溶液に含まれる CoQ₁₀ の割合である CoQ₁₀ 回収率および脂質量に対する CoQ₁₀ 量である Drug/Lipid (w/w)を算出した。定量は Agilent 1200 series を用い、以下の条件で行った。

測定波長：275 nm

カラム：COSMOSIL (5C18-AR-II, 4.6×250 mm) (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, JAPAN)

カラム温度：35 °C

移動相：エタノール/アセトニトリル=3/7

注入量：50 µL

保持時間：7 min

Lipid の定量は、Enspire 2300 Multilabel Reader または Varioskan LUX を使用した【Ex 460 nm/Em 535 nm】。

$$\text{CoQ10 回収率} = \frac{\text{CoQ10 amount of sample}}{\text{initial CoQ10 amount}} \times 100$$

$$\text{Drug/Lipid (w/w)} = \frac{\text{final amount of CoQ10 (}\mu\text{g)}}{\text{final amount of total lipid (}\mu\text{g)}}$$

フローサイトメトリー (FACS)を用いた細胞内取り込み評価

サンプルを添加する 24±3 hr 前に細胞を 1×10⁵ cells/well で 6 well plate に播種し、前培養を行った (37°C、5% CO₂)。DMEM (FBS-)にサンプルを 50 µL 混合して 1 mL とし、PBS(-) 1 mL で洗浄した後に細胞に添加し、1 hr インキュベーションした (37°C、5% CO₂)。その後、PBS(-) 1 mL で洗浄し、ヘパリン溶液 (20 units/mL) 500 µL で 2 回洗浄を行った。その後、0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA solution 500 µL 添加し、3 min インキュベーションした (37°C、5% CO₂)。DMEM (FBS+)700 µL を加えエッペンドルフチューブに全量回収した。遠心分離 (700 g、3 min、4°C)後に上清を取り除き、FACS buffer (0.5% BSA)を 1 mL 添加して再度遠心 (700 g、3 min、4°C)した。上清を取り除き、FACS buffer 500 µL で懸濁してナイロンメッシュに通し、プラスチック試験管に移し Galious にて測定した。

共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM)を用いた細胞内動態観察

キャリアを添加する 24±3 hr 前に 3.5 cm glass base dish (IWAKI, Tokyo, JAPAN) 8×10⁴ cells/dish で細胞を播種し、前培養を行った (37°C、5% CO₂)。DMEM (FBS-)にサンプルを 50 µL 混合して 1 mL とし細胞に添加し、1 hr インキュベーションした (37°C、5% CO₂)。DMEM (FBS+)2 mL に培地を交換し、1 hr 40 min インキュベーションした (37°C、5% CO₂)。DMEM を除去後、DMEM (FBS+)で 1 万倍に希釈したミトコンドリア染色試薬を 1 mL 添加し 20 min インキュベーションした (37°C、5% CO₂)。DMEM (FBS+)1 mL で洗浄した後、DMEM (FBS+)2 mL に培地を交換し

OlympusFV10i-LIV を用いて観察を行った。得られた画像をもとに細胞取り込み陽性率およびミトコンドリア占有率を算出した。

細胞取り込み陽性率

$$= \frac{\text{The number of cells that contained NBD – DOPE – labeled nanocarrier (green)}}{\text{the number of total cells}} \times 100$$

ミトコンドリア占有率

$$= \frac{\text{The average area of a colocalized region (yellow) between mitochondria (red) and nanocarrier (green)}}{\text{the average area for the stained mitochondria (red)}} \times 100$$

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

測定は、株式会社東海電子顕微鏡解析 (Aichi, JAPAN) に委託した。JEM-1400 Plus (JEOL Ltd., Tokyo, JAPAN) を用いて TEM (Transmission Electron Microscope) 測定を行った。サンプルはカーボン支持膜を張った銅グリッド (400 メッシュ) に吸着させ、2 %リンタングステン酸 (pH = 7.0) によるネガティブ染色を 15 sec 行った後、加速電圧 80 kV の条件下で観察を行った。

小角 X 線散乱 (SAXS) 測定

測定は、北海道大学大学院工学研究院 生物計測化学研究室准教授 真栄城真寿先生に依頼した。高エネルギー加速器研究機構 (Tsukuba, JAPAN) 放射光科学研究施設 (Photon Factory) に設置された BL15A2 を使用した。サンプルは前述した濃縮操作処理を行い (脂質濃度 ≈ 5.2 mM)、露光時間 1 sec、積算枚数 1,200 images で測定を行った。得られた結果は、縦軸：散乱強度、横軸：散乱ベクトル ($0.1 < q < 4 \text{ nm}^{-1}$) でプロットした。

粒子溶液の濁度測定

濁度測定は、DU-730 を用いて色調に影響を受けない測定波長 660 nm にて測定した。

動物実験

国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に基づき実施した。動物は SPF 環境下で飼育し、1 週間馴化させた後に使用した。

Ex vivo イメージング

第二章での粒子の組織移行性評価は、C57BL/6 J マウス (8-10 週齢、雄性、 21 ± 3 hr 絶食) に APAP 200 mg/kg (10 $\mu\text{L/g}$) を腹腔内投与し、APAP 負荷から 1hr 後に 0.5 mol% DiD 標識 CoQ₁₀-MITO-Porter (濃縮操作したもの、脂質量 ≈ 20 nmol/8 $\mu\text{L/g}$ 、CoQ₁₀ 0.9 mg/kg) を尾静脈投

与し、3 hr 後に心採血および各臓器の摘出を行い、小動物用前臨床画像システム FluorVivo 300 (INDEC BioSystems, Los Altos, CA, USA)を用いて蛍光観察した【Ex 644 nm, Em 665 nm】。

第三章での粒子の組織移行性評価は、C57BL/6 J マウス (10 週齢、雄性、非絶食)に 0.5 mol% DiD 標識 CoQ₁₀-MITO-Porter (濃縮操作なし、脂質量 $\approx$ 4.4 nmol/8.7 μ L/g)で尾静脈投与し、0.5、1、2 および 24hr 後に各臓器および血液を回収後、小動物用前臨床画像システム IVIS Lumina XRMS Series III(Caliper Life Sciences [Xenogen], Alameda, CA, USA) を用いて蛍光観察した【Ex 644 nm, Em 665 nm】。

APAP 肝障害モデルマウスでの評価

第二章では、腹腔内投与による APAP 負荷を行った。C57BL/6 J マウス (10 週齢、雄性、21 $\pm$ 3 hr 絶食)に 20 mg/mL APAP 溶液 (APAP 400 mg 秤量して PBS (-) 20 mL を加え、60 $^{\circ}$ C、30 min の加温で溶解させたもの)を 200 mg/kg (10 μ L/g) 腹腔内投与した。APAP 負荷から 1hr 後に各サンプルを腹腔内または尾静脈投与し(CoQ₁₀ 0.9 mg/kg (8 μ L/g))、24 hr 後に心採血および肝臓摘出を行った。

第三章では、皮下投与による APAP 負荷を行った。C57BL/6 J マウス (10 週齢、雄性、21 $\pm$ 3 hr 絶食)に 25 mg/mL APAP 溶液 (APAP 500 mg 秤量して PBS (-) 20 mL を加え、60 $^{\circ}$ C、30 min の加温で溶解させたもの)を 250 mg/kg (10 μ L/g) 腹腔内投与した。APAP 負荷から 1hr 後に各サンプルを腹腔内または尾静脈投与し(CoQ₁₀ 5.4 mg/kg (8 μ L/g))、6 hr 後に心採血および肝臓摘出を行った。

CoQ₁₀ 懸濁液は CoQ₁₀ 粉末を PBS (-)に分散させ、超音波処理 1 min と 50 $^{\circ}$ C、5 min の加温を行い、調製した。

血液検査 (血清 ALT)は第一岸本臨床検査センター (Sapporo, JAPAN)に委託した。試薬はピュアオート SALT-L (積水メディカル株式会社, Tokyo, JAPAN)を使用した。

組織学的評価は、第二章では凍結切片作製によるヘマトキシリン・エオジン (HE)染色を行った。第三章ではパラフィンブロック作製による HE 染色および TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)染色を行った。ブロックの作製と標本化は株式会社モルフォテクノロジー (Sapporo, JAPAN)に委託した。切片の厚さは 5 μ m で依頼した。サンプルは SMZ1270i を用いて観察を行った。

マウス肝臓組織における凍結切片の作製

マウスを心採血によって全血採取し、右心耳を切断し、失血させ、心尖部に注射針を刺し、4%パラホルムアルデヒド (4 $^{\circ}$ C) 10 mL にて脱血をし、肝臓を摘出し、4 $^{\circ}$ C で一晩保存した。その後、4 時間毎に 4 $^{\circ}$ C 条件下で 10、20、30 %の順にスクロース置換し、一晩静置した。組織を埋没皿に入れ、組織切片埋没剤 O.C.T.Compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, JAPAN)で充填した。さらに液体窒素を用いて組織を凍結させた。凍結した試料は、LEICA CM3050S (Leica Biosystems, Vista, CA, USA)にて 20 μ m の厚さでスライスし、凍結切片を作

製した。

切り出した切片はよく乾燥させ、HE 染色を行った。まず、ヘマトキシリンにて 8 min 染色させ、10 min 流水水洗した。次にエオジンにて 3 min 染色させ、軽く水洗した。その後、70、90、100%の順に 3-4 回程度エタノールに曝して脱水し、キシロールに浸した。乾燥後、ソフトマウントを用いて封入した。

血液スクリーニング検査

血液スクリーニング検査はオリエンタル酵母工業株式会社 (Tokyo, JAPAN)に委託し、スクリーニングセット (19 項目)を評価した。測定装置は日立 7180 型自動分析装置 (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, JAPAN)を使用した。使用試薬は以下に記す。

使用試薬

総蛋白 (total protein :TP)

総蛋白-HR II (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)

アルブミン (albumin:ALB)

アルブミン II HA-テストワコー (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)

血中尿素窒素 (blood urea nitrogen :BUN)

名称不明 (オリエンタル酵母工業株式会社, Tokyo, JAPAN)

クレアチニン (creatinine:CRE)

L タイプワコー CRE・M (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)

ナトリウム (natrium:Na)

日立イオン電極用試薬 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)

カリウム (kalium:K)

日立イオン電極用試薬 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)

クロール (chloride:Cl)

日立イオン電極用試薬 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)

カルシウム (calcium:Ca)

アキュラスオート Ca II (株式会社シノテスト, Tokyo, JAPAN)

無機リン (inorganic phosphorus:IP)

デタミナーL IP II (Minaris Medical Co., Ltd., Tokyo, JAPAN)

aspartate aminotransferase (AST)

L タイプワコー AST・J2 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)

alanine aminotransferase (ALT)

L タイプワコー ALT・J2 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)

乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase:LDH)

L タイプワコー LD・J (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)

アミラーゼ (amylase:AMY)

L タイプワコー アミラーゼ (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)
γ-グルタミルトランスフェラーゼ (γ-glutamyl transferase: γ-GT)
L タイプワコー γ-GT・J (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)
総コレステロール (total cholesterol: T-CHO)
L タイプワコー CHO・M (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)
中性脂肪 (triglyceride: TG)
L タイプワコー TG・M (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, JAPAN)
HDL-コレステロール (high density lipoprotein cholesterol: HDL-C)
コレテスト N HDL (積水メディカル株式会社, Tokyo, JAPAN)
総ビリルビン (total bilirubin: T-BIL)
ネスコート VL T-BIL (Alfresa Corporation, Tokyo, JAPAN)
グルコース (glucose: GLU)
クイックオート ネオ GLU-HK (株式会社シノテスト, Tokyo, JAPAN)

マウス肝臓からのミトコンドリア単離

マウスを心採血によって全血採取し、右心耳を切断し、失血させ、心尖部に注射針を刺し、PBS (-) (4°C) 10 mL にて脱血をし、肝臓を摘出した。肝臓を PBS (-) (4°C) で洗浄後、水気を取って重量を測定した。これ以降の操作は氷上で行う。肝臓を試薬皿に入れて MIB (+EDTA) 2 mL を加え、ハサミ 2 本で肝臓を約 3 min 細断した。試料液の全量 3 mL と洗いこみの分で約 5 mL の試料液を 10 mL ホモジナイザーに移した。NZ-1100 を使用し、ホモジナイザーの目盛を 550 rpm に合わせ、ペッスルを 3 回上下させて肝臓をホモジネートした。肝臓ホモジネート溶液を必要とする場合は、この時点での溶液を 200 μL 別のエッペンドルフチューブに移した。残りの肝臓ホモジネート溶液を 50 mL ファルコンチューブに移し、MIB (+EDTA) を用いて約 10 mL にメスアップし、遠心分離をした (4°C、800 g、5 min)。遠心分離後の溶液の上清を 7.5 mL 分取し、50 mL ファルコンチューブに加えて、遠心分離をした (4°C、7,500 g、10 min)。遠心分離後の溶液の上清を捨てて、ファルコンチューブの壁面に付着した脂肪分をキムワイプで取り除いた。1 mL の MIB (+EDTA) を加えてペッスルで軽く懸濁後、5 mL ホモジナイザーに移し、MIB (+EDTA) を用いて全量 5 mL とし、3 回ミトコンドリアをホモジネートした。懸濁した溶液を 50 mL ファルコンチューブに移し、遠心分離した (4°C、16,000 g、10 min)。遠心分離後の溶液の上清を捨てて、1 mL の MIB (-EDTA) を加えてペッスルで軽く懸濁後、5 mL ホモジナイザーに移し、MIB (-EDTA) を用いて全量 5 mL とし、3 回ミトコンドリアをホモジネートした。懸濁した溶液を 50 mL ファルコンチューブに移し、遠心分離した (4°C、16,000 g、10 min)。遠心分離後の溶液の上清を捨てて、250 μL の MIB (-EDTA) を加えてペッスルで軽く懸濁後、5 mL ホモジナイザーに移し、MIB (-EDTA) を用いて全量 500 μL とし、3 回ミトコンドリアをホモジネートし、エッペンドルフチューブに移し、単離ミトコンドリア溶液とした。

なお、ペッスルでミトコンドリアペレットを懸濁しホモジナイザーに移す各過程では、沈殿中に含まれる血液は懸濁しないようにした。

粒子の肝臓移行性およびミトコンドリア移行性評価

脂質の 1%となるように DiD 標識した CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP を、正常な C57BL/6 J マウス (10 週齢、雄性、非絶食)に尾静脈投与 (濃縮操作したもの、脂質量≈30 nmol/6 μL/g、蛍光強度を揃えてから投与)し、0.5、3、6 hr 後に前述したマウス肝臓からのミトコンドリア単離操作を行った。得られた肝臓ホモジネート液および単離ミトコンドリア溶液は遠心分離し (4°C、16,000 g、10 min)、ペレットにした。上清を除去し、1% SDS 溶液 250 μL を加え、1 min ボルテックスし、1-2 min 超音波処理することで完全に溶解させ、測定溶液とした。測定溶液は NanoDrop の BSA モードでタンパク定量をし、Varioskan LUX を用いて蛍光強度を測定した【Ex 644 nm, Em 665 nm】。

$$\text{肝臓移行量} = \frac{\text{Fluorescence Intensity (FI)}}{\text{Liver protein (mg)}}$$

$$\text{肝臓ミトコンドリア移行量} = \frac{\text{Fluorescence Intensity (FI)}}{\text{Mitochondrial protein (mg)}}$$

$$\text{ミトコンドリア移行率} = \frac{\text{肝臓ミトコンドリア移行量}}{\text{肝臓移行量}}$$

CoQ₁₀ および CoQ₉ のミトコンドリア移行性評価

CoQ₁₀ 懸濁液、CoQ₁₀-MITO-Porter および CoQ₁₀-LP を、正常な C57BL/6 J マウス (10 週齢、雄性、非絶食)に尾静脈投与 (CoQ₁₀ : 5.4 mg/kg (8 μL/g))し、3、6 hr 後に前述した肝臓ミトコンドリア単離操作と測定溶液の調製を行った。測定溶液は調製後、液体窒素で急速凍結し、-80°C で保存した。CoQ₁₀ および CoQ₉ の定量は、KANEKA TECHNO RESEARCH CORPORATION (Osaka, JAPAN)に委託した。

試料を適宜 1% SDS 溶液で希釈後、2-プロパノールで除タンパクをした。さらに 2-プロパノールで希釈し、内標準溶液 (酸化型 CoQ₇)を添加し、0.2 μm PTFE 製メンブレンフィルターで濾過後、液体クロマトグラフ質量分析計(Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry : LC-MS/MS)分析をした。測定条件を以下に示す。

装置 : Qtrap 5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Framingham, MA, USA)

HPLC 条件

カラム : ODS カラム 2.0×50 mm (YMC CO., LTD., Kyoto, JAPAN)

カラム温度 : 30 °C

移動相 : ギ酸アンモニウム含有溶液

注入量 : 10 μL

測定時間：5 min

MS/MS 条件

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法

検出モード：正イオンモード、Multiple Reaction Monitoring

モニタリングイオン：

成分名	Q1 Mass (Da)	Q2 Mass (Da)
還元型 COQ ₁₀	882.6	197.1
酸化型 COQ ₁₀	880.5	196.9
還元型 COQ ₉	814.5	197.1
酸化型 COQ ₉	812.5	196.9
酸化型 COQ ₇	676.5	196.9

アンモニウム付加体として検出

$$\text{試料中 CoQ 濃度 (}\mu\text{g/mL)} = \text{液中 CoQ 濃度 (ng/mL)} \times \text{タンパク希釈率} \times \text{抽出液希釈率} \times \frac{\text{抽出液量 (mL)}}{\text{試料量 (mL)} \times 1000}$$

$$\text{タンパク量あたりの試料中 CoQ 濃度 (}\mu\text{g/mL)} = \text{試液中 CoQ 濃度 (}\mu\text{g/mL)} \times \frac{1000}{\text{タンパク濃度 (mg/mL)}}$$

$$\text{総 CoQ10 (ng/mg)} = \text{還元型 CoQ10 (ng/mg)} + \text{酸化型 CoQ10 (ng/mg)}$$

$$\text{総 CoQ9 (ng/mg)} = \text{還元型 CoQ9 (ng/mg)} + \text{酸化型 CoQ9 (ng/mg)}$$

参考文献

参考文献

1. Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*. 2006;125(7):1241-52.
2. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat Immunol*. 2017;18(5):488-98.
3. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells*. 2011;32(6):491-509.
4. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015;6:472-85.
5. Di Carlo M, Giacomazza D, Picone P, Nuzzo D, San Biagio PL. Are oxidative stress and mitochondrial dysfunction the key players in the neurodegenerative diseases? *Free Radic Res*. 2012;46(11):1327-38.
6. Cenini G, Lloret A, Cascella R. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:2105607.
7. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1066-77.
8. Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med*. 2019;51(12):1-13.
9. Karkucinska-Wieckowska A, Simoes ICM, Kalinowski P, Lebieczinska-Arciszewska M, Zieniewicz K, Milkiewicz P, et al. Mitochondria, oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: A complex relationship. *Eur J Clin Invest*. 2021:e13622.
10. Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(9).
11. Prakash YS, Pabelick CM, Sieck GC. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest*. 2017;152(3):618-26.
12. Gentric G, Kieffer Y, Mieulet V, Goundiam O, Bonneau C, Nemati F, et al. PML-Regulated Mitochondrial Metabolism Enhances Chemosensitivity in Human Ovarian Cancers. *Cell Metab*. 2019;29(1):156-73 e10.
13. Yamada Y, Takano Y, Satrialdi, Abe J, Hibino M, Harashima H. Therapeutic Strategies for Regulating Mitochondrial Oxidative Stress. *Biomolecules*. 2020;10(1).
14. Yamada Y, Satrialdi, Hibino M, Sasaki D, Abe J, Harashima H. Power of mitochondrial drug delivery systems to produce innovative nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;154-155:187-209.

15. Murphy MP. Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. *Trends Biotechnol.* 1997;15(8):326-30.
16. Trnka J, Elkalaf M, Andel M. Lipophilic triphenylphosphonium cations inhibit mitochondrial electron transport chain and induce mitochondrial proton leak. *PLoS One.* 2015;10(4):e0121837.
17. Szeto HH. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents. *Aaps j.* 2006;8(3):E521-31.
18. Szeto HH. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol.* 2014;171(8):2029-50.
19. Zhao K, Zhao GM, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW, et al. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J Biol Chem.* 2004;279(33):34682-90.
20. Szeto HH, Birk AV. Serendipity and the discovery of novel compounds that restore mitochondrial plasticity. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(6):672-83.
21. Escribano-Lopez I, de Maranon AM, Iannantuoni F, Lopez-Domenech S, Abad-Jimenez Z, Diaz P, et al. The Mitochondrial Antioxidant SS-31 Modulates Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy in Type 2 Diabetes. *J Clin Med.* 2019;8(9).
22. Mo Y, Deng S, Zhang L, Huang Y, Li W, Peng Q, et al. SS-31 reduces inflammation and oxidative stress through the inhibition of Fis1 expression in lipopolysaccharide-stimulated microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;520(1):171-8.
23. Saad A, Herrmann SMS, Eirin A, Ferguson CM, Glockner JF, Bjarnason H, et al. Phase 2a Clinical Trial of Mitochondrial Protection (Elamipretide) During Stent Revascularization in Patients With Atherosclerotic Renal Artery Stenosis. *Circ Cardiovasc Interv.* 2017;10(9).
24. Jelinek A, Heyder L, Daude M, Plessner M, Krippner S, Grosse R, et al. Mitochondrial rescue prevents glutathione peroxidase-dependent ferroptosis. *Free Radic Biol Med.* 2018;117:45-57.
25. Du K, Farhood A, Jaeschke H. Mitochondria-targeted antioxidant Mito-Tempo protects against acetaminophen hepatotoxicity. *Arch Toxicol.* 2017;91(2):761-73.
26. Brenza TM, Ghaisas S, Ramirez JEV, Harischandra D, Anantharam V, Kalyanaraman B, et al. Neuronal protection against oxidative insult by polyanhydride nanoparticle-based mitochondria-targeted antioxidant therapy. *Nanomedicine.* 2017;13(3):809-20.
27. Wu M, Liao L, Jiang L, Zhang C, Gao H, Qiao L, et al. Liver-targeted Nano-MitoPBN normalizes glucose metabolism by improving mitochondrial redox balance. *Biomaterials.* 2019;222:119457.
28. Velichkovska M, Surnar B, Nair M, Dhar S, Toborek M. Targeted Mitochondrial COQ10 Delivery Attenuates Antiretroviral-Drug-Induced Senescence of Neural Progenitor Cells. *Mol Pharm.* 2019;16(2):724-36.

29. Sharma A, Liaw K, Sharma R, Zhang Z, Kannan S, Kannan RM. Targeting Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Activated Microglia using Dendrimer-Based Therapeutics. *Theranostics*. 2018;8(20):5529-47.
30. Yamada Y, Akita H, Kamiya H, Kogure K, Yamamoto T, Shinohara Y, et al. MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(2):423-32.
31. Yasuzaki Y, Yamada Y, Harashima H. Mitochondrial matrix delivery using MITO-Porter, a liposome-based carrier that specifies fusion with mitochondrial membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;397(2):181-6.
32. Yamada Y, Furukawa R, Yasuzaki Y, Harashima H. Dual function MITO-Porter, a nano carrier integrating both efficient cytoplasmic delivery and mitochondrial macromolecule delivery. *Mol Ther*. 2011;19(8):1449-56.
33. Yamada Y, Harashima H. Delivery of bioactive molecules to the mitochondrial genome using a membrane-fusing, liposome-based carrier, DF-MITO-Porter. *Biomaterials*. 2012;33(5):1589-95.
34. Yamada Y, Nakamura K, Furukawa R, Kawamura E, Moriwaki T, Matsumoto K, et al. Mitochondrial delivery of bongkreikic acid using a MITO-Porter prevents the induction of apoptosis in human HeLa cells. *J Pharm Sci*. 2013;102(3):1008-15.
35. Yamada Y, Burger L, Kawamura E, Harashima H. Packaging of the Coenzyme Q(10) into a Liposome for Mitochondrial Delivery and the Intracellular Observation in Patient Derived Mitochondrial Disease Cells. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(12):2183-90.
36. Yamada Y, Ishimaru T, Ikeda K, Harashima H. Validation of the mitochondrial delivery of vitamin B1 to enhance ATP production using SH-SY5Y cells, a model neuroblast. *J Pharm Sci*. 2021.
37. Furukawa R, Yamada Y, Kawamura E, Harashima H. Mitochondrial delivery of antisense RNA by MITO-Porter results in mitochondrial RNA knockdown, and has a functional impact on mitochondria. *Biomaterials*. 2015;57:107-15.
38. Ishikawa T, Somiya K, Munechika R, Harashima H, Yamada Y. Mitochondrial transgene expression via an artificial mitochondrial DNA vector in cells from a patient with a mitochondrial disease. *J Control Release*. 2018;274:109-17.
39. Kawamura E, Hibino M, Harashima H, Yamada Y. Targeted mitochondrial delivery of antisense RNA-containing nanoparticles by a MITO-Porter for safe and efficient mitochondrial gene silencing. *Mitochondrion*. 2019;49:178-88.
40. Kawamura E, Maruyama M, Abe J, Sudo A, Takeda A, Takada S, et al. Validation of Gene Therapy for Mutant Mitochondria by Delivering Mitochondrial RNA Using a MITO-Porter. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;20:687-98.
41. Yamada Y, Maruyama M, Kita T, Usami SI, Kitajiri SI, Harashima H. The use of a MITO-

Porter to deliver exogenous therapeutic RNA to a mitochondrial disease's cell with a A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene results in an increase in mitochondrial respiratory activity. *Mitochondrion*. 2020;55:134-44.

42. Satrialdi, Munechika R, Biju V, Takano Y, Harashima H, Yamada Y. The optimization of cancer photodynamic therapy by utilization of a pi-extended porphyrin-type photosensitizer in combination with MITO-Porter. *Chem Commun (Camb)*. 2020;56(7):1145-8.

43. Yoshimura I. 医薬品としてのコエンザイム Q₁₀ の開発. *Vitamins (Japan)*. 2020;94(3):203-5.

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

45. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol*. 2010;62(11):1607-21.

46. Chavda HV, Patel CN, Anand IS. Biopharmaceutics classification system. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2010;1(1).

47. Pepe S, Marasco SF, Haas SJ, Sheeran FL, Krum H, Rosenfeldt FL. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. *Mitochondrion*. 2007;7 Suppl:S154-67.

48. Hargreaves IP. Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;49:105-11.

49. Gane EJ, Weilert F, Orr DW, Keogh GF, Gibson M, Lockhart MM, et al. The mitochondria-targeted anti-oxidant mitoquinone decreases liver damage in a phase II study of hepatitis C patients. *Liver Int*. 2010;30(7):1019-26.

50. Snow BJ, Rolfe FL, Lockhart MM, Frampton CM, O'Sullivan JD, Fung V, et al. A double-blind, placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2010;25(11):1670-4.

51. Zinovkin RA, Zamyatnin AA. Mitochondria-Targeted Drugs. *Curr Mol Pharmacol*. 2019;12(3):202-14.

52. Williamson J, Hughes CM, Cobley JN, Davison GW. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ, attenuates exercise-induced mitochondrial DNA damage. *Redox Biol*. 2020;36:101673.

53. Yamada Y, Harashima H. Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(13-14):1439-62.

54. Yamada Y, Harashima H. MITO-Porter for Mitochondrial Delivery and Mitochondrial Functional Analysis. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;240:457-72.

55. Verma DD, Hartner WC, Thakkar V, Levchenko TS, Torchilin VP. Protective effect of coenzyme Q10-loaded liposomes on the myocardium in rabbits with an acute experimental myocardial infarction. *Pharm Res*. 2007;24(11):2131-7.

56. Agmo Hernandez V, Eriksson EK, Edwards K. Ubiquinone-10 alters mechanical properties and increases stability of phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1848(10 Pt A):2233-43.
57. Xia F, Jin H, Zhao Y, Guo X. Preparation of coenzyme Q10 liposomes using supercritical anti-solvent technique. *J Microencapsul*. 2012;29(1):21-9.
58. Lee WC, Tsai TH. Preparation and characterization of liposomal coenzyme Q10 for in vivo topical application. *Int J Pharm*. 2010;395(1-2):78-83.
59. Yamada Y, Akita H, Harashima H. Multifunctional envelope-type nano device (MEND) for organelle targeting via a stepwise membrane fusion process. *Methods Enzymol*. 2012;509:301-26.
60. Sato Y, Nakamura T, Yamada Y, Harashima H. Development of a multifunctional envelope-type nano device and its application to nanomedicine. *J Control Release*. 2016;244(Pt B):194-204.
61. Khattab A, Hassanin L, Zaki N. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Coenzyme (Q10) with Improved Dissolution, Bioavailability, and Protective Efficiency on Liver Fibrosis. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(5):1657-72.
62. Kastner E, Verma V, Lowry D, Perrie Y. Microfluidic-controlled manufacture of liposomes for the solubilisation of a poorly water soluble drug. *Int J Pharm*. 2015;485(1-2):122-30.
63. Maeki M, Kimura N, Sato Y, Harashima H, Tokeshi M. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;128:84-100.
64. Maeki M, Fujishima Y, Sato Y, Yasui T, Kaji N, Ishida A, et al. Understanding the formation mechanism of lipid nanoparticles in microfluidic devices with chaotic micromixers. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187962.
65. Khan IU, Serra CA, Anton N, Vandamme TF. Production of nanoparticle drug delivery systems with microfluidics tools. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(4):547-62.
66. Martins JP, Torrieri G, Santos HA. The importance of microfluidics for the preparation of nanoparticles as advanced drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018;15(5):469-79.
67. Kimura N, Maeki M, Sato Y, Note Y, Ishida A, Tani H, et al. Development of the iLiNP Device: Fine Tuning the Lipid Nanoparticle Size within 10 nm for Drug Delivery. *ACS Omega*. 2018;3(5):5044-51.
68. Sato Y, Note Y, Maeki M, Kaji N, Baba Y, Tokeshi M, et al. Elucidation of the physicochemical properties and potency of siRNA-loaded small-sized lipid nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release*. 2016;229:48-57.
69. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2718-39.
70. Futaki S, Nakase I, Tadokoro A, Takeuchi T, Jones AT. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 4):784-7.
71. Nakase I, Noguchi K, Aoki A, Takatani-Nakase T, Fujii I, Futaki S. Arginine-rich cell-

penetrating peptide-modified extracellular vesicles for active macropinocytosis induction and efficient intracellular delivery. *Sci Rep*. 2017;7(1):1991.

72. Yuan H, Li J, Bao G, Zhang S. Variable nanoparticle-cell adhesion strength regulates cellular uptake. *Phys Rev Lett*. 2010;105(13):138101.

73. Morikawa Y, Tagami T, Hoshikawa A, Ozeki T. The Use of an Efficient Microfluidic Mixing System for Generating Stabilized Polymeric Nanoparticles for Controlled Drug Release. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(6):899-907.

74. McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011;31(44):15703-15.

75. Mercer JR, Yu E, Figg N, Cheng KK, Prime TA, Griffin JL, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases features of the metabolic syndrome in ATM^{+/+}/ApoE^{-/-} mice. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(5):841-9.

76. Smith RA, Murphy MP. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1201:96-103.

77. Belliveau NM, Huft J, Lin PJ, Chen S, Leung AK, Leaver TJ, et al. Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012;1:e37.

78. Fan Y, Marioli M, Zhang K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;192:113642.

79. Kraft JC, Freeling JP, Wang Z, Ho RJ. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci*. 2014;103(1):29-52.

80. Mousseau F, Puisney C, Mornet S, Borgne RL, Vacher A, Airiau M, et al. Supported pulmonary surfactant bilayers on silica nanoparticles: formulation, stability and impact on lung epithelial cells. *Nanoscale*. 2017;9(39):14967-78.

81. Helbert A, Gaud E, Segers T, Botteron C, Frinking P, Jeannot V. Monodisperse versus Polydisperse Ultrasound Contrast Agents: In Vivo Sensitivity and safety in Rat and Pig. *Ultrasound Med Biol*. 2020;46(12):3339-52.

82. Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, Tam YK, Chen J, Du X, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(34):8529-33.

83. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm*. 2021;601:120586.

84. Carugo D, Bottaro E, Owen J, Stride E, Nastruzzi C. Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Sci Rep*. 2016;6:25876.

85. Filipczak N, Pan J, Yalamarty SSK, Torchilin VP. Recent advancements in liposome

technology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;156:4-22.

86. Roces CB, Lou G, Jain N, Abraham S, Thomas A, Halbert GW, et al. Manufacturing Considerations for the Development of Lipid Nanoparticles Using Microfluidics. *Pharmaceutics.* 2020;12(11).
87. Lallana E, Donno R, Magri D, Barker K, Nazir Z, Treacher K, et al. Microfluidic-assisted nanoprecipitation of (PEGylated) poly (d,l-lactic acid-co-caprolactone): Effect of macromolecular and microfluidic parameters on particle size and paclitaxel encapsulation. *Int J Pharm.* 2018;548(1):530-9.
88. Behnke M, Vollrath A, Klepsch L, Beringer-Siemers B, Stumpf S, J AC, et al. Optimized Encapsulation of the FLAP/PGES-1 Inhibitor BRP-187 in PVA-Stabilized PLGA Nanoparticles Using Microfluidics. *Polymers (Basel).* 2020;12(11).
89. Tiboni M, Benedetti S, Skouras A, Curzi G, Perinelli DR, Palmieri GF, et al. 3D-printed microfluidic chip for the preparation of glycyrrhetic acid-loaded ethanolic liposomes. *Int J Pharm.* 2020;584:119436.
90. Obeid MA, Gany SAS, Gray AI, Young L, Igoli JO, Ferro VA. Niosome-encapsulated balanocarpol: compound isolation, characterisation, and cytotoxicity evaluation against human breast and ovarian cancer cell lines. *Nanotechnology.* 2020;31(19):195101.
91. Levy ES, Yu J, Estevez A, Mao J, Liu L, Torres E, et al. A Systematic Approach for Liposome and Lipodisk Preclinical Formulation Development by Microfluidic Technology. *AAPS J.* 2021;23(6):111.
92. Hamano N, Bottger R, Lee SE, Yang Y, Kulkarni JA, Ip S, et al. Robust Microfluidic Technology and New Lipid Composition for Fabrication of Curcumin-Loaded Liposomes: Effect on the Anticancer Activity and Safety of Cisplatin. *Mol Pharm.* 2019;16(9):3957-67.
93. Chen S, Liu W, Wan J, Cheng X, Gu C, Zhou H, et al. Preparation of Coenzyme Q10 nanostructured lipid carriers for epidermal targeting with high-pressure microfluidics technique. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013;39(1):20-8.
94. Hibino M, Yamada Y, Fujishita N, Sato Y, Maeki M, Tokeshi M, et al. The Use of a Microfluidic Device to Encapsulate a Poorly Water-Soluble Drug CoQ10 in Lipid Nanoparticles and an Attempt to Regulate Intracellular Trafficking to Reach Mitochondria. *J Pharm Sci.* 2019;108(8):2668-76.
95. Neunert G, Tomaszewska-Gras J, Siejak P, Pietralik Z, Kozak M, Polewski K. Disruptive effect of tocopherol oxalate on DPPC liposome structure: DSC, SAXS, and fluorescence anisotropy studies. *Chem Phys Lipids.* 2018;216:104-13.
96. Aburai K, Hatanaka K, Takano S, Fujii S, Sakurai K. Characterizing an siRNA-Containing Lipid-Nanoparticle Prepared by a Microfluidic Reactor: Small-Angle X-ray Scattering and Cryotransmission Electron Microscopic Studies. *Langmuir.* 2020;36(42):12545-54.

97. Carrasco MJ, Alishetty S, Alameh MG, Said H, Wright L, Paige M, et al. Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. *Commun Biol*. 2021;4(1):956.
98. Garbuzenko O, Barenholz Y, Prieve A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chem Phys Lipids*. 2005;135(2):117-29.
99. McGill MR, Lebofsky M, Norris HR, Slawson MH, Bajt ML, Xie Y, et al. Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: dose-response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;269(3):240-9.
100. Zhang P, Chen S, Tang H, Fang W, Chen K, Chen X. CoQ10 protects against acetaminophen-induced liver injury by enhancing mitophagy. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021;410:115355.
101. Shimizu D, Ishitsuka Y, Miyata K, Tomishima Y, Kondo Y, Irikura M, et al. Protection afforded by pre- or post-treatment with 4-phenylbutyrate against liver injury induced by acetaminophen overdose in mice. *Pharmacol Res*. 2014;87:26-41.
102. Du K, Ramachandran A, Weemhoff JL, Woolbright BL, Jaeschke AH, Chao X, et al. Mito-tempo protects against acute liver injury but induces limited secondary apoptosis during the late phase of acetaminophen hepatotoxicity. *Arch Toxicol*. 2019;93(1):163-78.
103. McGill MR, Hinson JA. The development and hepatotoxicity of acetaminophen: reviewing over a century of progress. *Drug Metab Rev*. 2020;52(4):472-500.
104. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Acetaminophen (APAP or N-Acetyl-p-Aminophenol) and Acute Liver Failure. *Clin Liver Dis*. 2018;22(2):325-46.
105. Borgström L, Kågedal B, Paulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1986;31(2):217-22.
106. Grinberg L, Fibach E, Amer J, Atlas D. N-acetylcysteine amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(1):136-45.
107. Chowdhury A, Nabila J, Adelusi Temitope I, Wang S. Current etiological comprehension and therapeutic targets of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res*. 2020;161:105102.
108. Aitio ML. N-acetylcysteine -- passe-partout or much ado about nothing? *Br J Clin Pharmacol*. 2006;61(1):5-15.
109. McGill MR, Jaeschke H. Biomarkers of drug-induced liver injury. *Adv Pharmacol*. 2019;85:221-39.
110. Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*. 2012;44(1):88-106.
111. Ishitsuka Y, Kondo Y, Kadowaki D. Toxicological Property of Acetaminophen: The Dark Side of a Safe Antipyretic/Analgesic Drug? *Biol Pharm Bull*. 2020;43(2):195-206.

112. Xie Y, McGill MR, Du K, Dorko K, Kumer SC, Schmitt TM, et al. Mitochondrial protein adducts formation and mitochondrial dysfunction during N-acetyl-m-aminophenol (AMAP)-induced hepatotoxicity in primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;289(2):213-22.
113. Bruderer R, Bernhardt OM, Gandhi T, Miladinovic SM, Cheng LY, Messner S, et al. Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues. *Mol Cell Proteomics.* 2015;14(5):1400-10.
114. Lee KK, Imaizumi N, Chamberland SR, Alder NN, Boelsterli UA. Targeting mitochondria with methylene blue protects mice against acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology.* 2015;61(1):326-36.
115. Saeedi Saravi SS, Hasanvand A, Shahkarami K, Dehpour AR. The protective potential of metformin against acetaminophen-induced hepatotoxicity in BALB/C mice. *Pharm Biol.* 2016;54(12):2830-7.
116. Piel S, Chamkha I, Dehlin AK, Ehinger JK, Sjoval F, Elmer E, et al. Cell-permeable succinate prodrugs rescue mitochondrial respiration in cellular models of acute acetaminophen overdose. *PLoS One.* 2020;15(4):e0231173.
117. Hu J, Kholmukhamedov A, Lindsey CC, Beeson CC, Jaeschke H, Lemasters JJ. Translocation of iron from lysosomes to mitochondria during acetaminophen-induced hepatocellular injury: Protection by starch-desferal and minocycline. *Free Radic Biol Med.* 2016;97:418-26.
118. Du K, McGill MR, Xie Y, Bajt ML, Jaeschke H. Resveratrol prevents protein nitration and release of endonucleases from mitochondria during acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2015;81:62-70.
119. Abdullah-Al-Shoeb M, Sasaki K, Kikutani S, Namba N, Ueno K, Kondo Y, et al. The Late-Stage Protective Effect of Mito-TEMPO against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mouse and Three-Dimensional Cell Culture Models. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(10).
120. Shi X, Bai H, Zhao M, Li X, Sun X, Jiang H, et al. Treatment of acetaminophen-induced liver injury with exogenous mitochondria in mice. *Transl Res.* 2018;196:31-41.
121. Khalil IA, Hayashi Y, Mizuno R, Harashima H. Octaarginine- and pH sensitive fusogenic peptide-modified nanoparticles for liver gene delivery. *J Control Release.* 2011;156(3):374-80.
122. Hattori Y, Nakamura M, Takeuchi N, Tamaki K, Shimizu S, Yoshiike Y, et al. Effect of cationic lipid in cationic liposomes on siRNA delivery into the lung by intravenous injection of cationic lipoplex. *J Drug Target.* 2019;27(2):217-27.
123. Mossanen JC, Tacke F. Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Lab Anim.* 2015;49(1 Suppl):30-6.
124. Vogler J, Bottger R, Al Favez N, Zhang W, Qin Z, Hohenwarter L, et al. Altering the intra-liver distribution of phospholipid-free small unilamellar vesicles using temperature-dependent size-

tunability. *J Control Release*. 2021;333:151-61.

125. Jaeschke H, Duan L, Nguyen N, Ramachandran A. Mitochondrial Damage and Biogenesis in Acetaminophen-induced Liver Injury. *Liver Res*. 2019;3(3-4):150-6.

126. Wisse E, Jacobs F, Topal B, Frederik P, De Geest B. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther*. 2008;15(17):1193-9.

127. Elustondo P, Martin LA, Karten B. Mitochondrial cholesterol import. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(1):90-101.

128. Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G, Ernster L. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Arch Biochem Biophys*. 1992;295(2):230-4.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室教授 原島秀吉先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導、御助言と数多くの温い励ましを賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室准教授 山田勇磨先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有益なる御助言、御指導を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室助教 中村孝司先生、同助教 佐藤 悠介先生ならびに未来創剤学研究室特任助教 イクラミイブラヒム先生に深く感謝致します。

本論文を審査して頂き、貴重なご指導を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬物病態解析学研究室教授 菅原満先生、同講師 佐藤夕紀先生に深く感謝致します。

マイクロ流体デバイスの御供与ならびに有益なる御助言、御指導を賜りました、北海道大学大学院工学研究院 生物計測化学研究室教授 渡慶次学先生、同准教授 真栄城正寿先生に深く感謝致します。

アセトアミノフェン肝障害モデル作製の有益なる御助言、御指導を賜りました、熊本大学大学院生命科学研究部 薬剤情報分析学分野教授 入江徹美先生、同准教授 石塚洋一先生に深く感謝致します。

イメージング機器の利用に御協力を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室教授 小川美香子先生に深く感謝致します。

研究室生活において貴重な御指導、御助言と温かい励ましを賜り、様々な面で支えとなっていた頂きました北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室ならびに未来創剤学研究室の皆様そして北海道大学医学部小児科 小児循環器グループの先生方に心より感謝申し上げます。

最後に、これまで温かく見守り、大きな心で支えて頂いた家族に心より感謝いたします。