



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ナノカプセルを用いた骨格筋ミトコンドリアを標的とした治療法の開発に関する研究
Author(s)	片山, 貴史
Description	配架番号 : 2449
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13435号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13435
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91683
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Katayama.pdf



学 位 論 文

ナノカプセルを用いた 骨格筋ミトコンドリアを標的とした 治療法の開発に関する研究

(Studies on a mitochondrial delivery system
using liposome-based nanocarriers that target myoblast cells)

2019年3月

北海道大学

片山 貴史

学 位 論 文

ナノカプセルを用いた 骨格筋ミトコンドリアを標的とした 治療法の開発に関する研究

(Studies on a mitochondrial delivery system
using liposome-based nanocarriers that target myoblast cells)

2019年3月

北海道大学

片山 貴史

目次

1. 発表論文目録および学会発表目録	1
2. 要旨	2
3. 略語表	5
4. 緒言	7
4.1 骨格筋ミトコンドリア治療の重要性	7
4.2 ミトコンドリア異常に対する治療戦略	10
4.3 ミトコンドリアへの物質送達と骨格筋ミトコンドリア	13
4.4 実験概要	16
5. 方法	20
5.1 実験試薬・材料	20
5.2 実験機器	24
5.3 一般試薬調製	26
5.4 共通実験操作	28
5.5 実験 1. 骨格筋芽細胞内取込能が高いカチオン脂質の検討	31
5.6 実験 2. Resveratrol 投与とミトコンドリア機能の検討	32
5.7 実験 3. 骨格筋芽細胞のミトコンドリア移行性が高い修飾の検討	35
5.8 統計学的解析	38
6. 結果	39
6.1 実験 1. 骨格筋芽細胞内取込能が高いカチオン脂質の検討	39
6.2 実験 2. Resveratrol 投与とミトコンドリア機能の検討	41
6.3 実験 3. 骨格筋芽細胞のミトコンドリア移行性が高い修飾の検討	46
7. 考察	54
7.1 実験 1. 骨格筋芽細胞内取込能が高いカチオン脂質の検討	54
7.2 実験 2. Resveratrol 投与とミトコンドリア機能の検討	54
7.3 実験 3. 骨格筋芽細胞のミトコンドリア移行性が高い修飾の検討	56
7.4 臨床応用における課題	57
8. 結論	59
9. 謝辞	61
10. 利益相反	62
11. 引用文献	63

1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部（実験 1, 3）は以下の論文に投稿中である.

1. Takashi Katayama, Shintaro Kinugawa, Shingo Takada, Takaaki Furihata, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Toshihisa Anzai, Hideyoshi Harashima, Yuma Yamada. A mitochondrial delivery system using liposome-based nanocarriers that target myoblast cells. Mitochondrion.

本研究の一部（実験 1, 3）は以下の学会に発表した.

1. Takashi Katayama, Shintaro Kinugawa, Shingo Takada, Katsuma Yamanashi, Yoshikuni Obata, Hideo Nambu, Satoshi Maekawa, Ryosuke Shirakawa, Takayuki Nakajima, Junichi Matsumoto, Masaya Tsuda, Takaaki Furihata, Akimichi Saito, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Toshihisa Anzai, Hideyoshi Harashima, Yuma Yamada. Mitochondrial delivery in skeletal muscle cells. Cell symposium, June 4, 2018, San Diego, CA, USA.

2. 要旨

【背景と目的】

慢性心不全をはじめとする多くの慢性疾患患者において、身体活動能力の指標である運動耐容能が低下している。慢性心不全患者では心機能以上に骨格筋の萎縮や線維型の変化、骨格筋ミトコンドリア異常によって、骨格筋機能が低下し、運動耐容能低下から生命予後不良につながっている。運動療法による骨格筋機能や運動耐容能の改善が図られているが、重症心不全患者や高齢の患者においては身体活動機能が高度に制限されているため、十分な運動療法を行うことができない。運動療法に代わる骨格筋機能低下への治療の開発が喫緊の課題である。骨格筋ミトコンドリアはエネルギー産生の主体であり骨格筋機能に直結することから治療ターゲットとして期待される。

ミトコンドリア異常への治療には、正常ミトコンドリアの移植、異常ミトコンドリアの選択的除去、ミトコンドリアへの薬物や核酸の送達といった方法が考えられているが、効率性や安全性などの面で障壁が多い。いかに効率よくミトコンドリアへ介入や物質送達するかが大きな課題となっている。物質送達の手段の一つとして、脂質二重膜のリポソームにミトコンドリア指向性修飾を施したナノカプセルによるミトコンドリア送達を検証されている。この方法は、送達物質の分子量や性質の制限が少なく、脂質組成や修飾を工夫することにより多様な特性をもたせられる特長がある。HeLa 細胞などを対象にナノカプセルによるミトコンドリア送達の研究が進んでいるが、細胞の種類によって細胞表面の性状や組織の周囲環境が異なるため、ナノカプセルが細胞外から細胞内のミトコンドリアまで送達する能力や効率については、細胞や組織の種類ごとに検討する必要がある。

本研究の目的は、骨格筋ミトコンドリアへの治療物質送達を細胞レベルで検証し確立すること、およびこの送達により骨格筋細胞のミトコンドリア機能を向上させることである。そして将来的な目標は、動物の組織レベルでの治療物質送達および骨格筋ミトコンドリア機能向上である。

【材料と方法】

実験 1 では、骨格筋芽細胞 C2C12 を用いて、細胞内への取り込み能が高いナノカプセルを、各種脂質組成について探索し開発した。他の細胞で細胞内取込能が高いことが明らかとなっている脂質組成「 β -MEND」をもとにカチオン脂質を入れ替えたリポソームを作製し、骨格筋芽細胞 C2C12 への細胞内取込能がより高いリポソームについて比較検討した。細胞内取込能は、リポソームへ修飾した蛍光の細胞内における強度をフローサイトメトリーで測定し評価した。

実験 2 では、実験 1 で最も骨格筋芽細胞内取込能が高かった β -MEND に、ミトコンドリア呼吸鎖の酵素複合体 I を活性化させる作用をもつ resveratrol を封入し、骨格

筋芽細胞 C2C12 へ投与すると複合体 I 活性が向上するという仮説を立て、検証した。実験においては未投与群のほか、 β -MEND を用いず resveratrol 単独で投与した群、resveratrol を封入しない空の β -MEND を投与した群とも比較検討した。

実験 3 では、ミトコンドリア移行性を高めるものとして知られているいくつかのペプチドを修飾し、骨格筋芽細胞 C2C12 へのミトコンドリア移行性を比較検討した。KALA ペプチドは細胞膜貫通性を有するペプチドであり、MITO-Porter への修飾によってミトコンドリア移行性が改善することが他の細胞で明らかとなっている。S2 ペプチドは細胞浸透性を有する Szeto-Schiller ペプチドの 2 量体で、ミトコンドリア指向性を有する。RNase P RNA から得られた RP アプタマーはミトコンドリアへ特異的に結合する。本実験ではこれら 3 つの候補を修飾し、ミトコンドリア移行性が高いナノカプセルの作製を試みた。核内では終止コドンのため発現せずミトコンドリア内のみで本来の発光蛋白を発現するよう配列したプラスミド DNA をリポソームへ封入し、投与後の発光量からミトコンドリア移行性を評価した。また共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてミトコンドリアとリポソームの局在を画像的に評価した。

【結果】

実験 1 において、脂質組成 R8/DOPE/SM のリポソーム「R8-MITO-Porter」、脂質組成 DC-Chol/EPC/SM のリポソーム「 β -MEND」、および脂質組成 DDAB/EPC/SM のリポソームは、脂質組成 DOPE/SM のリポソームと比較し、骨格筋芽細胞 C2C12 への細胞内取込能が有意に高かった。実験 2 において、 β -MEND を用いることによる resveratrol の複合体 I 活性化作用増強効果の有無について検証したが、有意な効果が確認されず、仮説を立証することができなかった。実験 3 において、プラスミド DNA 封入 KALA 修飾 β -MEND は、プラスミド DNA 単独と比較し、骨格筋芽細胞 C2C12 のミトコンドリアへのプラスミド DNA 送達能が有意に高かった。

【考察】

骨格筋芽細胞においてミトコンドリア内へリポソームを用いて効率が高い核酸送達を実証した報告は初めてである。

各脂質組成のリポソームの細胞内へ取り込まれる性質は細胞の種類によって異なり、結果としてミトコンドリアへの移行性や送達能も細胞種によって異なる。これまでは子宮頸癌由来培養細胞 HeLa やマウス脾 β 細胞由来培養細胞 MIN6 など限られた種類の細胞で検証されてきた。本研究はミトコンドリア異常が臨床的に問題となっている骨格筋を標的とした検証であり、送達物質の制限が少ないリポソームによる骨格筋細胞ミトコンドリアへの物質送達実績は今後の臨床への応用が期待される。

実験 2 ではリポソーム β -MEND を用いた薬物送達による薬物作用増強効果を確認できなかったが、実験 3 の結果を踏まえ、よりミトコンドリア移行性が高い KALA 修飾 β -MEND を用いることにより、送達薬物の治療効果増強を示せる可能性がある。

本研究はマウス骨格筋由来の培養細胞である骨格筋芽細胞を研究対象としたが、今後の臨床応用に向けて、細胞レベルではなく動物における骨格筋組織を対象とした研究への進展が望まれる。心疾患などで骨格筋ミトコンドリア機能が低下した動物モデルへ治療薬物や正常遺伝子等を搭載したナノカプセルを筋肉注射または静脈注射することにより、運動耐容能や予後を改善させる研究の展開が期待される。

【結論】

KALA ペプチドを修飾した β -MEND リポソームは、骨格筋芽細胞へ取り込まれミトコンドリアへ核酸を送達させることができた。このリポソームによって核酸や治療薬物を骨格筋ミトコンドリアへ送達することで、骨格筋ミトコンドリア異常を治療することができる可能性が示された。

3. 略語表

本文中および図中で使用した略語は下記のとおりである.

AMPK	AMP-activated protein kinase
CMV	cytomegalovirus
CRISPR-Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated proteins 9
DC-Chol	3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol (lipid)
DDAB	dimethyldioctadecylammonium bromide (lipid)
DiO	3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate (fluorescent)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (lipid)
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (lipid)
DOTMA	1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane (lipid)
EPC	egg yolk phosphatidyl choline (lipid)
FBS	fetal bovine serum
FCCP	carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
<i>g</i>	gravity
LP	liposome
mitoTALENs	mitochondria-targeted transcription activator-like effector nucleases
MTS	mitochondrial targeting sequence
mtZFN	mitochondrial zinc-finger nucleases
NBD	7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (fluorescent)
N/P	nitrogen/phosphate
Nrf2	nuclear factor (erythroid 2)-like 2 (NFE2L2)
NT	non-treat
PBS	phosphate buffered saline (without calcium and magnesium)
pDNA	plasmid DNA
PDT	photodynamic therapy
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
R8	octaarginine
RLU	relative light unit
RP	RNase P
SM	sphingomyelin (lipid)
SS	Szeto-Schiller
TAE	Tris, acetic acid, EDTA
TIM	translocate of the inner mitochondrial membrane
TOM	translocate of the outer mitochondrial membrane

TPP	triphenylphosphonium
w/v%	weight/volume%
β -MEND	multifunctional envelope-type nano device for pancreatic β cells, DC-Chol/EPC/SM (molar ratio 4:3:4)

本文中および図中で使用した単位の略語は下記のとおりである.

国際単位系 (SI) 基本単位

kg	kilogram
m	meter
mol	mole
s	second

固有の名称と記号で表される国際単位系 (SI) 組立単位

$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
V	Volt

国際単位系 (SI) に属さないが併用される単位

h	hour
L	liter
min	minute

国際単位系 (SI) 接頭語

k	kilo
m	milli
n	nano
μ	micro

4. 緒言

4.1 骨格筋ミトコンドリア治療の重要性

慢性心不全，慢性腎不全，2 型糖尿病，慢性閉塞性肺疾患など多くの慢性疾患患者において，身体活動能力の指標である運動耐容能が低下していることが広く知られている (Fukushima et al., 2016; Fukushima et al., 2014; Matsumoto et al., 2018; Nishikawa et al., 2015; Ohta et al., 2011; Suga et al., 2014; Takada et al., 2014; Takada et al., 2013; Takada et al., 2015; Takada et al., 2016; Yokota et al., 2009). 運動耐容能は骨格筋，呼吸機能，心血管機能によって規定されるが (図 4-1-1)，慢性心不全患者では心機能以上に骨格筋機能が低下し運動耐容能低下に至っているとされている (図 4-1-2) (Okita et al., 2013; Takada et al., 2016). 骨格筋は人体で最大の組織であり，運動や姿勢維持の機能だけでなく，筋収縮による熱の発生と体温の維持，そしてマイオカインと呼ばれる蛋白を分泌する内分泌器官としての働きもあるなど，多くの疾患や臓器に影響を及ぼす重要な役割を持つ (Covington et al., 2016). 運動耐容能低下と生命予後不良とは密接に相関することから (図 4-1-3) (Mancini et al., 1991)，これらの疾患において運動耐容能改善のための治療的介入が重要である．有酸素運動やレジスタンストレーニングを中心とした運動療法は，慢性心不全において骨格筋機能や運動耐容能を改善することで生命予後を改善させる (図 4-1-4) (Piepoli et al., 2004). しかし，重症心不全患者や高齢の患者においては，身体活動機能が高度に制限されているため，十分な運動療法を行うことができない．運動療法に代わる骨格筋機能低下への治療の開発が喫緊の課題である．

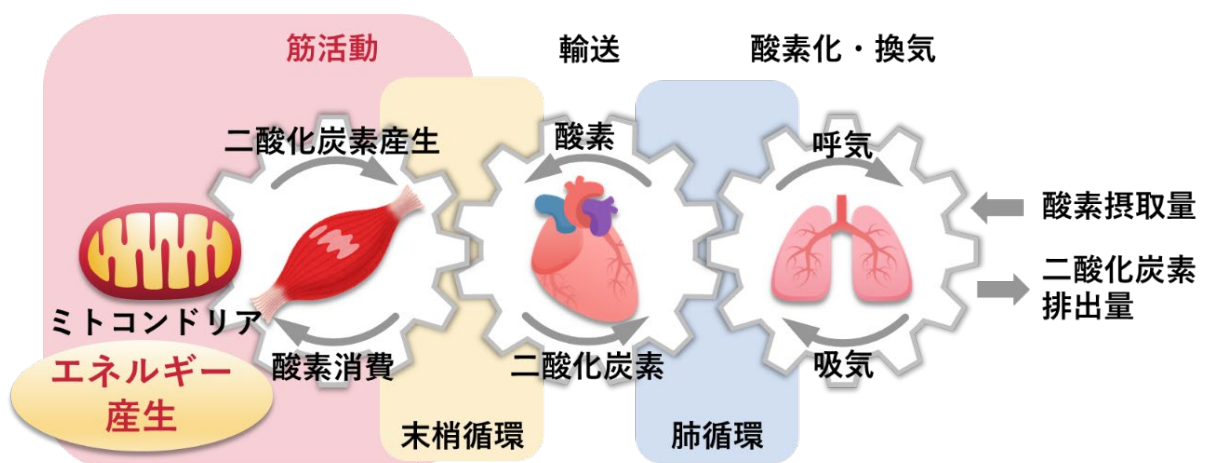
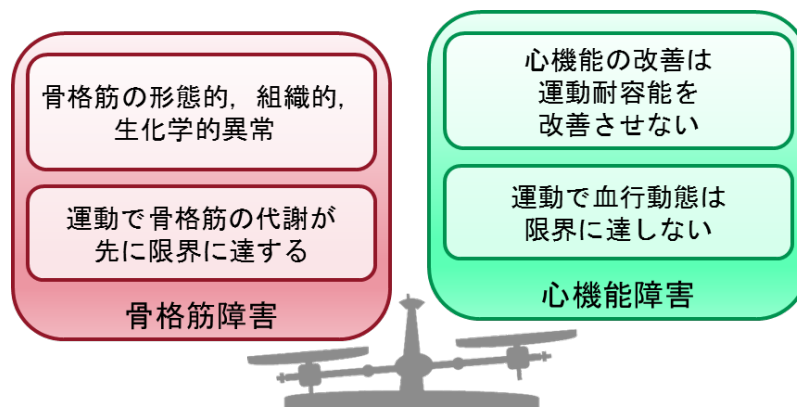


図 4-1-1 運動耐容能の規定因子(Wasserman の歯車)．身体活動能力の指標である運動耐容能は，骨格筋だけでなく心血管機能や呼吸機能により複合的に規定され，筋においてもそのエネルギー産生の主体であるミトコンドリアが大きく関与している．



心不全患者において
骨格筋障害は運動耐容能を規定する

図 4-1-2 心不全患者における運動規定因子(文献 (Okita et al., 2013) より引用改変)

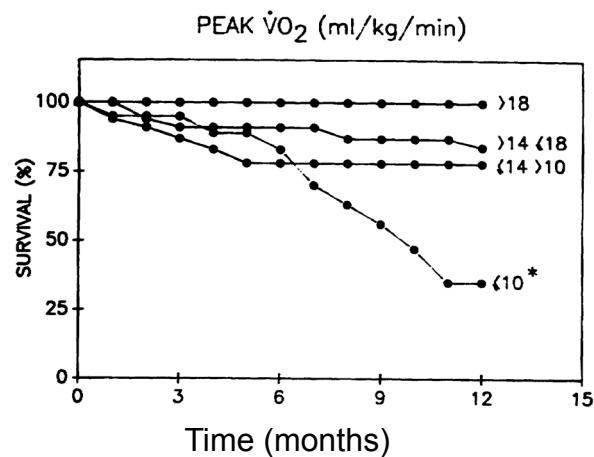


図 4-1-3 運動耐容能と予後(文献 (Mancini et al., 1991) より引用)

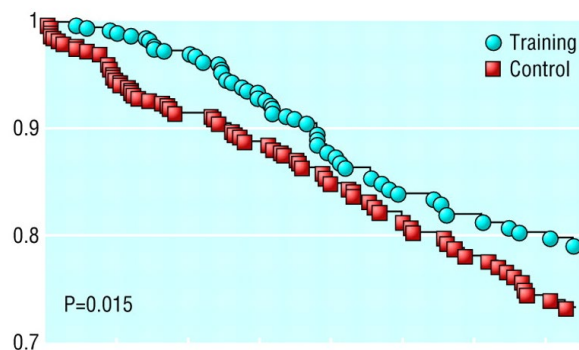


図 4-1-4 慢性心不全患者の運動療法による生命予後改善効果(文献 (Piepoli et al., 2004) より引用)

慢性心不全患者における骨格筋異常には、筋線維萎縮などの形態学的異常のほか、線維型の変化をはじめとする組織学的異常、ミトコンドリア機能をはじめとするエネルギー代謝などの生化学的異常がある（表 4-1-1）。心筋梗塞モデルマウスの骨格筋で活性酸素種が増加していることを示唆させる報告もあり（Tsutsui et al., 2001），活性酸素種の主要な産生源であるミトコンドリアにおいて電子伝達系（呼吸鎖）がうまく稼働していないことが推測される（図 4-1-5）。当研究室の研究においても心筋梗塞モデルマウス群の骨格筋ミトコンドリアにおいて、偽手術群と比較し、ミトコンドリア電子伝達系（呼吸鎖）の酵素複合体 (complex) I の活性が有意に低下していた（未発表データ）。

特にミトコンドリアはエネルギー産生の主体であり骨格筋機能に直接大きく関与することから、ミトコンドリア異常は慢性心不全患者に対する運動療法に代わる治療ターゲットとして期待される（図 4-1-5）。

表 4-1-1 心不全患者の臨床的に観察された骨格筋異常（文献（Okita et al., 2013）より引用改変）

形態学的異常	組織学的異常	生化学的異常
筋力低下	Type I 線維の減少	酸化系酵素の減少
筋線維萎縮 (type IIb)	Type II 線維の増加	解糖系酵素の増加
	Type IIa→IIb への変化	
	毛細血管密度の減少	MHC1 から MHC2 への変化
	ミトコンドリア量の減少	内皮型 NO 合成酵素低下
	アポトーシスの増加	

MHC, myosin heavy chain.

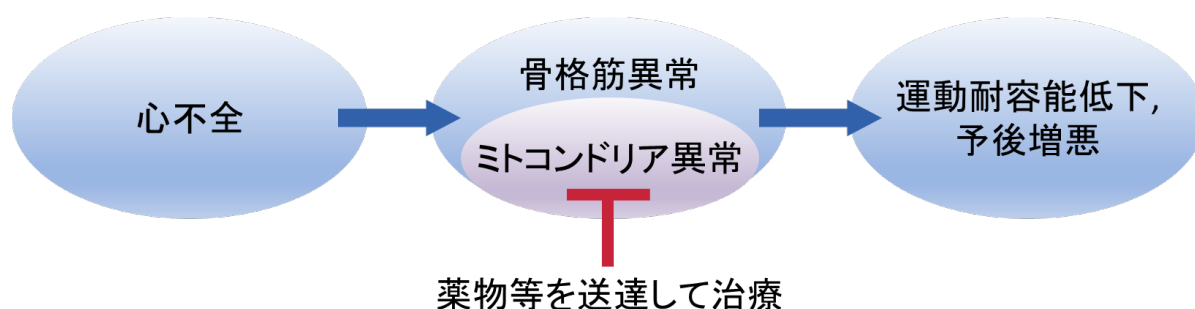


図 4-1-5 心不全における骨格筋ミトコンドリア治療の意義

4.2 ミトコンドリア異常に対する治療戦略

ミトコンドリア異常に対する治療アプローチとして主に、(1) 正常ミトコンドリアを移植する方法、(2) 異常ミトコンドリアを選択的に減らす方法、(3) ミトコンドリアへ薬物や蛋白や核酸を送達する方法が考えられている (表 4-2-1). 単離ミトコンドリアの細胞質内移植, または細胞質ごとの移植については, 細胞レベルでの研究に限定され, ヒトへの臨床応用は難しい. 単離ミトコンドリアを静脈注射により全身投与すると組織内に送達されたとする報告もあるが, ごくわずかの送達率であり, 機序も明らかではない (Masuzawa et al., 2013). 異常ミトコンドリアを減らす方法としては, 異常な DNA を判別して切断等により除去する戦略が考えられる. ミトコンドリア標的化させた mitochondrial zinc-finger nucleases (mtZFN) や mitochondria-targeted transcription activator-like effector nucleases (mitoTALENs) をマウスへ静脈注射等することにより, 心筋などの異常ミトコンドリア遺伝子を切断し, 異常ミトコンドリア DNA 量が低下しミトコンドリア呼吸能の指標が改善したとする報告もあるが (Bacman et al., 2018; Gammage et al., 2018), 細胞内への取込手段としてアデノ随伴ウイルスを用いるためヒトへの応用はリスクを伴う. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR-associated proteins 9 (CRISPR-Cas9) を用いたゲノム編集も考えられているが, 大きな蛋白である guide RNA component をミトコンドリア内へ送達させることは困難である. 光線力学療法 (photodynamic therapy, PDT) は, 光感受性物質を細胞内へ送達しレーザー光照射によって光感受性物質周囲で酸素分子から活性酸素種へ変化させ, それにより細胞アポトーシスを引き起こさせる治療戦略である (Castano et al., 2004). 光感受性物質を膜電位や pH などの違いから選択的に異常ミトコンドリアのみへ送達できれば, 異常ミトコンドリアが多い細胞のみをアポトーシスへ誘導できると考えられるが, 送達の選択性が課題である.

表 4-2-1 ミトコンドリア異常に対する治療戦略の概要

(1) 正常ミトコンドリアを増やす

- (1.1) 正常ミトコンドリアを多く含む細胞質を細胞内へ融合
 - (1.1.1) 細胞ごとに顕微注入 (Knowles, 1974)
 - (1.1.2) 光熱ナノブレードで一時的に細胞膜を破壊 (Wu et al., 2015)
- (1.2) 正常ミトコンドリアを単離して投与
 - (1.2.1) 共培養 (*in vitro*) (Katrangi et al., 2007)
 - (1.2.2) 静脈注射による全身投与 (Masuzawa et al., 2013)
- (1.3) 細胞間ミトコンドリア移動
 - (1.3.1) 細胞膜ナノチューブ (tunneling nanotubes, TNTs) を経由した輸送 (Ahmad et al., 2014; Li et al., 2014)

(2) 異常ミトコンドリアを減らす

- (2.1) 変異型ミトコンドリア DNA を選択的に切断除去
 - (2.1.1) 制限酵素を細胞内へ輸送 (Bayona-Bafaluy et al., 2005; Srivastava and Moraes, 2001; Tanaka et al., 2002)
 - (2.1.2) mtZFN でミトコンドリア DNA の特定部位をメチル化し切断 (Minczuk et al., 2006)
 - (2.1.3) mitoTALENs で変異型ミトコンドリア DNA を除去 (Reddy et al., 2015)
 - (2.1.4) CRISPR-Cas9 によるミトコンドリア DNA 編集 (Jo et al., 2015)
- (2.2) 異常ミトコンドリアへの選択的物質送達による除去
 - (2.2.1) 光感受性物質を送達し光線力学療法 (PDT) で選択的に障害除去

(3) ミトコンドリアへ物質を送達する

- (3.1) 薬物を送達
 - (3.1.1) 抗酸化物質を投与し活性酸素種を抑制
 - (3.1.2) ミトコンドリア生合成に関与する因子 (Nrf2, PGC-1 α , sirtuin) を活性化する物質を投与
 - (3.1.3) ミトコンドリア補酵素 (coenzyme Q) を補う (Klopstock et al., 2011)
 - (3.1.4) 電子伝達系の基質 (succinate 等) を補う (Ehinger et al., 2016)
- (3.2) 核酸を送達
 - (3.2.1) ミトコンドリア tRNA を細胞外から送達 (Mahata et al., 2005; Wang et al., 2010)
 - (3.2.2) 核でのミトコンドリア tRNA 発現を促進
 - (3.2.3) ミトコンドリア DNA を細胞外から送達

CRISPR-Cas9, Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR-associated proteins 9; mitoTALENs, mitochondria-targeted transcription activator-like effector nucleases; mtZFN, mitochondrial zinc-finger nucleases; Nrf2, nuclear factor (erythroid 2)-like 2; PDT, photodynamic therapy; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator 1-alpha.

ミトコンドリアへ治療薬物を送達することによりミトコンドリア機能を改善させる試みも数多く報告されている。活性酸素種は核 DNA, ミトコンドリア DNA, 蛋白, 脂質などを障害し細胞アポトーシスを引き起こす一因となるが, 活性酸素種が最も多く産生されるのはミトコンドリア内である。そのためミトコンドリア内へ抗酸化物質を送達することによりミトコンドリア内で生成された活性酸素種を抑制する方法が試みられている。抗酸化物質の例として, ビタミン C, ビタミン E 類似体 (EPI-743) (Martinelli et al., 2012), α リポ酸, N-acetylcysteine (NAC), resveratrol, ミトコンドリア移行性を有する Szeto-Schiller (SS) ペプチドの一つ SS-31 (elamipretide, MTP-131, or Bendavia) (Zhao et al., 2004), そしてミトコンドリアの補酵素である coenzyme Q₁₀ やその類似体 (idebenone) (Klopstock et al., 2011), ミトコンドリア移行性をもつ triphenylphosphonium (TPP) を coenzyme Q₁₀ へ修飾した MitoQ (Jauslin et al., 2003) がある。また, 酸化ストレスに応答し制御する転写因子 nuclear factor (erythroid 2)-like 2 (NFE2L2, Nrf2) を活性化させる薬物として合成 triterpenoid である omaveloxolone (RTA 408) がある (Creelan et al., 2017)。エネルギー産生などに関連する遺伝子発現を制御しミトコンドリア生合成に大きく関与する peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) も治療対象として注目されている。PPAR のアゴニスト等として PGC-1 α を活性化させる脂質異常症治療薬 bezafibrate, PGC-1 α を脱アセチル化させミトコンドリア生合成を高める sirtuin 1, また sirtuin 1 の活性を規定する NAD⁺, NAD⁺の前駆体である nicotinamide riboside (Khan et al., 2014) や nicotinamide mononucleotide (NMN) (Zhang et al., 2017) が治療薬物の候補としてあげられる。しかしこれらのヒトへの投与において臨床効果が十分確認された薬物はなく, その原因の一つとしてミトコンドリアへの効率的な薬物送達が確立されていないことがあげられている。また高用量を投与するとミトコンドリアより先に腎臓や肝臓など集積しやすい臓器への毒性が顕著になってしまう場合も多い。例えば抗酸化物質を有する resveratrol は脂溶性のため経口投与では吸収されにくく (Walle et al., 2004; Yu et al., 2002) ミトコンドリアへはほとんど到達できないと推測され, その非効率性を補うために高用量経口投与すると腎障害を生じてしまうことが報告されている (Crowell et al., 2004; Popat et al., 2013)。

4.3 ミトコンドリアへの物質送達と骨格筋ミトコンドリア

ミトコンドリアへ物質を送達するための戦略には、静電氣的相互作用によってミトコンドリアへ接近する脂溶性カチオン物質の修飾、ミトコンドリア移行性ペプチドの修飾、ミトコンドリア蛋白の修飾、物質を内包させたナノ粒子への各種修飾がある（表 4-3-1）。

表 4-3-1 ミトコンドリアへの物質送達戦略の代表例

送達戦略	名称	概要	送達物質	代表的な文献
脂溶性カチオン物質	Triphenylphosphonium (TPP)	カチオン	抗酸化物質等	
ミトコンドリア移行性ペプチド	核由来ミトコンドリア移行性シグナル配列 (mitochondrial targeting sequence, MTS)	TOM/TIM 複合体	ペプチド核酸 (peptide nucleic acid, PNA)	(Flierl et al., 2003)
	Mitochondria penetrating peptidase (MPP)	脂溶性カチオン	シスプラチン等	(Horton et al., 2008)
	Szeto-Schiller (SS) 31	ペプチド配列		(Zhao et al., 2004)
ミトコンドリア蛋白	RNA import complex (RIC)	輸送蛋白	RNA	(Mahata et al., 2006)
ナノ粒子	両親媒性デカリニウム (DQAsome)	カチオン	pDNA	(Weissig et al., 2001; Weissig et al., 2000)
	PLGA-b-PEG-TPP	ポリマー修飾	抗癌剤等	(Marrache and Dhar, 2012)
	MITO-Porter	膜融合性脂質二重膜	GFP, DNase I, ODN	(Yamada et al., 2008)

GFP, green fluorescent protein; ODN, oligodeoxynucleotides; pDNA, plasmid DNA; PEG, poly(ethylene glycol); PLGA-b, poly(d,l-lactic-co-glycolic acid)-block.

低分子薬物に脂溶性カチオン物質を修飾することにより、細胞内で負電荷を有するミトコンドリアへ静電氣的相互作用により接近する戦略がある（図 4-3-1）。この方法は送達物質が脂溶性低分子に制限され、またミトコンドリア表面に接着することは確認されているものの内部にまで能動的に送達できているかは明らかではない。またミトコンドリアの外膜や内膜に存在する蛋白輸送装置「ミトコンドリア外膜トランスロカーゼ (translocase of outer membrane, TOM) 複合体」および「ミトコンドリア内膜ト

ランスロカーゼ (translocate of inner membrane, TIM) 複合体」を通過する性質を持つペプチドであるミトコンドリア移行性シグナル配列 (mitochondrial targeting sequence, MTS) を薬物へ修飾することによりミトコンドリア内へ送達する試みもあるが、薬物が TOM/TIM 複合体を通過できる低分子サイズに制限されるなどの制約がある。また上記のような各種方法のいずれにおいても、特にミトコンドリア内部への移行について、臨床的に有意な治療効果を発揮するほど十分な送達効率には至っていないため、ヒトへの治療方法として確立されていない。



図 4-3-1 ミトコンドリアへの静電的送達

薬物の分子サイズが制限されないミトコンドリア送達として、薬物等を小胞 (vesicle) へ内包あるいはナノ粒子化などの方法がある。両親媒性デカリニウム DQAsome は正電荷を有するデカリニウムでプラスミド DNA (pDNA) を囲むナノ粒子であり、ミトコンドリア近傍に核酸を送達する (Weissig et al., 2001; Weissig et al., 2000). また脂質二重膜で構成されるリポソーム「MITO-Porter」は、アルギニン 8 重合体 (occtaarginine, R8) の表面修飾によりミトコンドリア外膜と融合し内封物質をミトコンドリア内へ送達するという特徴がある (図 4-3-2) (Yamada et al., 2008). また高濃度の R8 は細胞傷害性を有することから、R8 に追加または置き換える形で、より毒性が少ないミトコンドリア移行性ペプチド配列を修飾し、ミトコンドリア移行性を高めたリポソームもある。

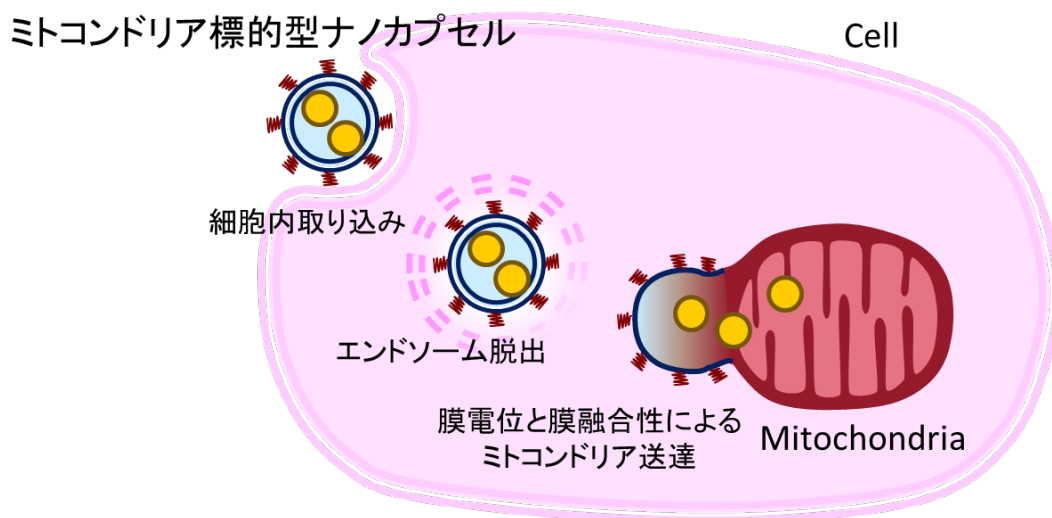


図 4-3-2 MITO-Porter のミトコンドリア膜融合を介したミトコンドリア送達

これらのミトコンドリアを標的とした送達の研究のほとんどは、研究対象としたミトコンドリアを有する細胞や組織の種類に注目しておらず、ヒト子宮頸癌を起源とし培養が容易な HeLa 細胞や、質量あたりのミトコンドリアが多い動物心筋を代表的な実験対象として用いていることが多い。しかし、細胞表面の性状や組織の周囲環境は種類によって大きく異なるため、同じ送達方法でも細胞外から細胞内のミトコンドリアまで送達する能力や効率とは同等ではないと推測される。例えばミトコンドリア標的型ナノカプセル MITO-Porter は、細胞の種類によって細胞への取込能が異なることが明らかとなっている (Ishikawa et al., 2018; Yamada et al., 2014)。ミトコンドリアを標的とした治療を臨床応用へつなげていくにあたって、細胞や組織の種類ごとの検討は必須の課題である。

骨格筋ミトコンドリアを直接標的とした薬物送達および治療の報告はごくわずかである。筆者の共同研究先である北海道大学薬学研究院薬剤分子設計学研究室において、ラットの下肢を駆血し DNA を急速静脈注射するハイドロダイナミクス法により、下肢骨格筋から単離したミトコンドリア内に DNA からの蛋白発現が確認されたことを過去に報告した (Yasuzaki et al., 2013)。この方法を体重 50 kg のヒトに行う場合、800 mL の DNA 溶液を 20 秒間で急速静脈注射することになり、組織損傷や心負荷の危険性が高く臨床的に困難であることが課題となっていた。

本研究では骨格筋ミトコンドリアへの薬物送達を細胞レベルから検証・確立し、マウスやラットにおける組織レベルでの薬物送達およびミトコンドリア機能向上を目標として、実験を計画し進行させた。

4.4 実験概要

4.4.1 実験 1. 骨格筋芽細胞内取込能が高いカチオン脂質の検討

実験 1 の目的は、骨格筋芽細胞 C2C12 を用いて、細胞内への取り込み能が高いナノカプセルを開発することである。マウス膵 β 細胞由来培養細胞 MIN6 で細胞内取込能が高いことが明らかとなっている脂質組成「 β -MEND (Yamada et al., 2014)」をもとにカチオン脂質を入れ替えたリポソームを作製し、骨格筋芽細胞 (C2C12) への細胞内取込能がより高いリポソームについて比較検討した。細胞内取込能は、リポソームへ修飾した蛍光の細胞内における強度をフローサイトメトリーで測定し評価した (図 4-4-1)。

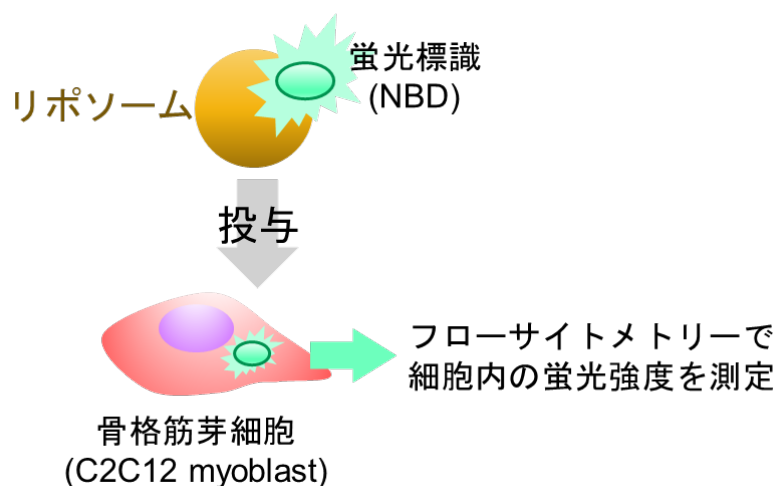


図 4-4-1 実験 1 における細胞内取込能の評価。NBD, 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole.

4.4.2 実験 2. Resveratrol 投与とミトコンドリア機能の検討

実験 1 で得られた結果から、ミトコンドリアへの治療物質送達に最も有利と考えられるリポソームの脂質組成を決定した。ミトコンドリア機能を向上させる薬物をその細胞内取込能が高いリポソーム内へ封入して骨格筋芽細胞 (C2C12) へ投与すれば、薬物によるミトコンドリアへの効果は増強するという仮説を立て、実験 2 において検証した。心筋梗塞モデルマウスにおいて骨格筋のミトコンドリア複合体 I 機能は低下していることから (図 4-4-2)、抗酸化作用がありミトコンドリア複合体 I を活性化させる resveratrol (レスベラトロール) を治療薬物として用いた (Desquirit-Dumas et al., 2013) (図 4-4-3)。最初に resveratrol 封入 β -MEND を投与して複合体 I の活性化がみられる最小の濃度を確認し、その後同等の濃度の resveratrol 単独投与群と比較するこ

とで、 β -MEND によるミトコンドリア送達性向上および resveratrol 効果向上を証明する方針とした (図 4-4-4)。

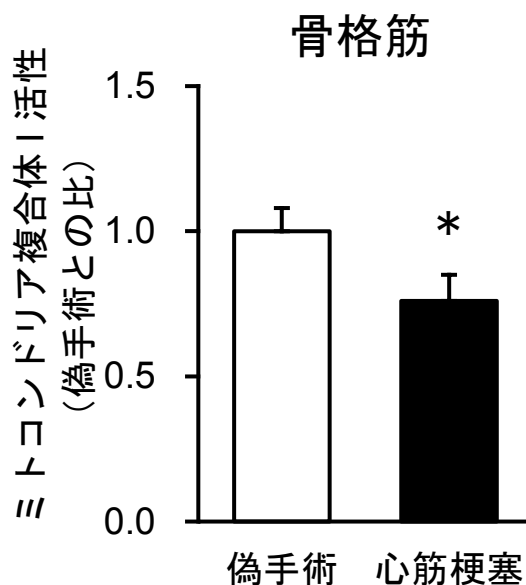


図 4-4-2 心筋梗塞モデルマウスにおいて骨格筋のミトコンドリア複合体Ⅰ機能は低下している (Takada et al, unpublished).

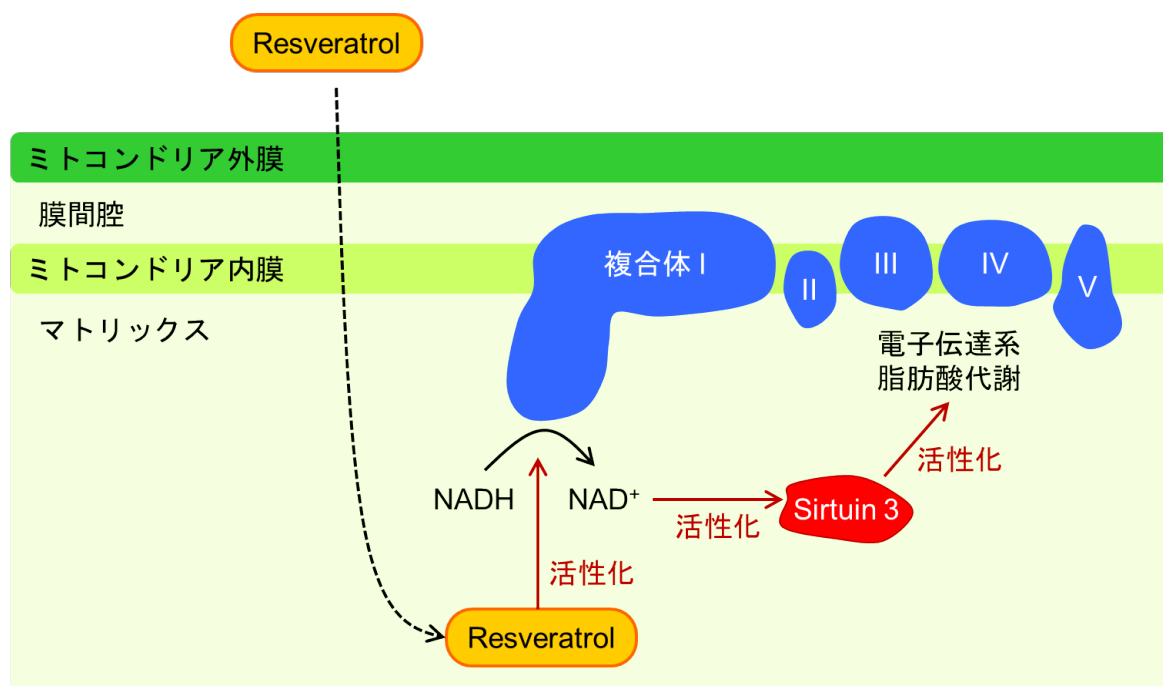


図 4-4-3 Resveratrol はミトコンドリア複合体Ⅰを活性化させる (文献 (Desquiere-Dumas et al., 2013) より引用改変)

仮説

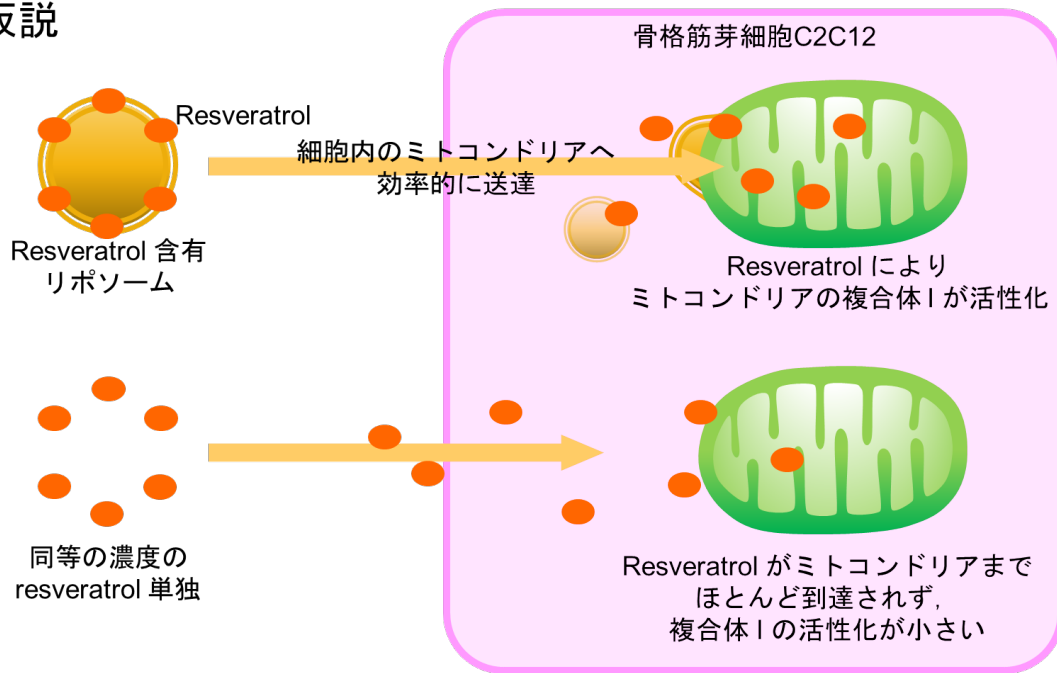


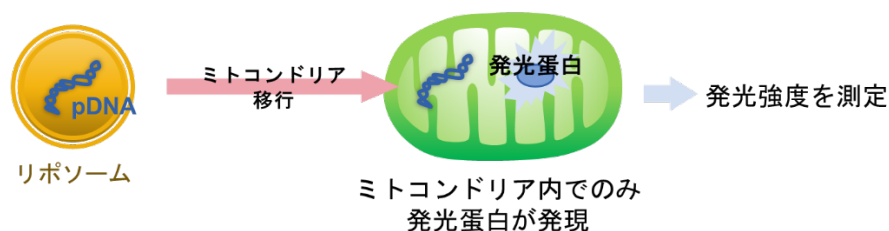
図 4-4-4 実験 2 の仮説.

4.4.3 実験 3. 骨格筋芽細胞のミトコンドリア移行性が高い修飾の検討

実験 3 の目的は、骨格筋芽細胞においてミトコンドリア移行性が高いナノカプセルを検証し開発することである。実験方法としては、ミトコンドリア移行性を高めるものとして知られているいくつかのペプチドを修飾し、骨格筋芽細胞 (C2C12) へのミトコンドリア移行性を比較検討した。KALA ペプチド (Stearyl-KALA, WEKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA-NH₂) は pH 感受性で膜貫通性を有するペプチドとして報告されたが (Shaheen et al., 2011), MITO-Porter への修飾によってミトコンドリア移行性が改善することが HeLa 細胞 (Yamada et al., 2017) やヒト皮膚由来線維芽細胞 (Ishikawa et al., 2018) で明らかとなっている。S2 ペプチド (Stearyl Dmt-D-Arg-FK-Dmt-D-Arg-FK-NH₂ (Dmt = 2,6-dimethyltyrosine), Stearyl-S2) は、細胞浸透性を有する抗酸化物質 Szeto-Schiller (SS) ペプチド (Szeto and Schiller, 2011) の 2 量体で、ミトコンドリア指向性を有するとされる (Kawamura et al., 2013)。RP アプタマー ([5'-UCUCCCUGAGCUUCAGG-3'], Chol-RP) は、RNase P RNA から得られたペプチド配列であり、ミトコンドリアへ特異的に結合する (Wang et al., 2010)。RP アプタマーを KALA ペプチドとともに MITO-Porter に修飾するとヒト皮膚由来線維芽細胞におけるミトコンドリア移行性が改善すると報告されている (Ishikawa et al., 2018)。本実験ではこれら 3 つの候補を修飾し、ミトコンドリア移行性が高いナノカプセルの作製を試みた。核内では終止コドンのため発現せずミトコンドリア内のみで本来の発光蛋白を発現するよう配列した pDNA をリポソームへ封入し、投与後の発光量からミトコンド

リア移行性を評価した（図 4-4-5 上）．また共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてミトコンドリアとリポソームの局在を画像的に評価した（図 4-4-5 下）．

- 発光強度を定量測定



- 共焦点レーザー走査型顕微鏡で画像的に評価



図 4-4-5 実験 3 におけるミトコンドリア移行性の評価

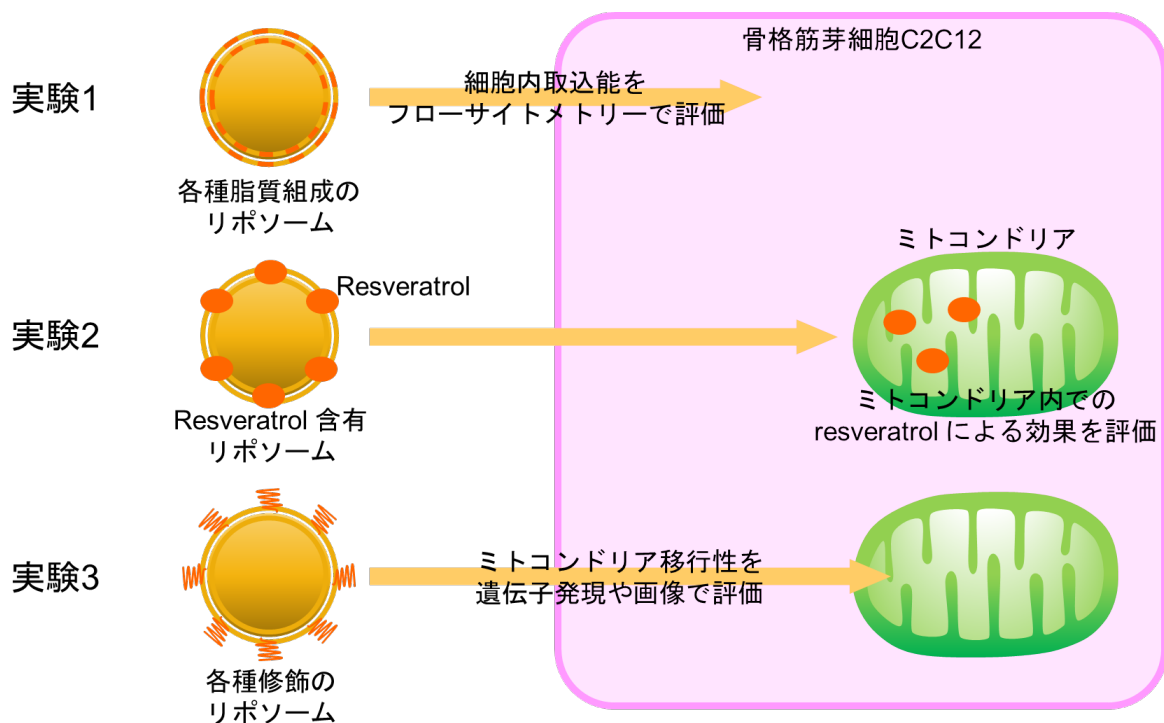


図 4-4-6 実験全体の概要

5. 方法

5.1 実験試薬・材料

5.1.1 培養細胞

細胞はマウス横紋筋由来の継代培養細胞 C2C12 (ATCC® CRL-1772TM, Manassas, MA, USA) を用いた。細胞培養には下記の試薬等を用いた。

高グルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)

D5796 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS)

171012 (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

ウマ血清

16050 (Gibco-Life Technologies)

ペニシリン・ストレプトマイシン溶液

15070063 (Gibco-Life Technologies)

0.05%トリプシン・EDTA

(Gibco-Life Technologies)

0.4% トリパンプルー溶液

(Gibco-Life Technologies)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

D8418 (Sigma-Aldrich)

5.1.2 蛋白定量

Protein Assay Reagent A

(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)

Protein Assay Reagent B

(Thermo Fisher Scientific)

2 mg/mL BSA standards

(Thermo Fisher Scientific)

5.1.3 大腸菌培養と核酸精製

E. coli

E. coli DH5α Competent cells (タカラバイオ, 草津市, 日本)

Bacto Tryptone

(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)

Yeast Extract

(Becton, Dickinson and Company)

Ampicillin

Ampicillin sodium salt (ナカライテスク, 京都, 日本)

Plasmid Mega kit

(QIAGEN N.V., Venlo, Netherlands)

pDNA は、GENEWIZ (South Plainfield, NJ, USA) にて目的の発現カセット部分を pBluescript II SK(-) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) へ導入し作製した。プロモーター領域はサイトメガロウイルスを由来とし、続けてマウス ND4 遺伝子配列 (bases 10,168 – 11,544 in GenBank: JF286601.1), FLAG tag, 「mtLuc (CGG)」領域, 5' 非翻訳領域, tRNA^{Asp} の順に構成している (図 5-1-1)。mtLuc (CGG) 部分では NanoLuc luciferase gene

of pNL1.1 [NLuc] (bases 100 – 615 in GenBank: JQ437370.1) の 36 番目に点変異 TGG→TGA を導入して核では終止コドンとなるがミトコンドリアでは本来の Trp が発現されるように、また 133 番目に点変異 AGG→CGG を導入してミトコンドリアで停止せず核と同じ Arg が発現されるようにした。これにより、核では終止コドンのため発光蛋白発現がされず、ミトコンドリア内でのみ本来の発光蛋白が発現される配列とした。組み込んだ配列を下記のとおり示す。mtLuc (CGG) 領域を青色とし、点変異を施した箇所を下線で示している。

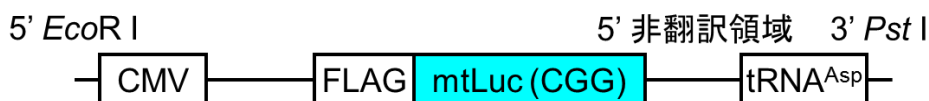


図 5-1-1 本実験で用いた pDNA の構成. CMV, cytomegalovirus; pDNA, plasmid DNA.

(5' *EcoR* I) -

```
ctgcagattaatagtaatcaattacggggcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgct
ggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca
atgggtggagttattacggtaaactgccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaaagtcgccccctattgacgtcaatgacgg
aaatggcccgctggcattatgccagttacatgaccttaccggactttcctacttggcagttacatctacgtattagtcgctattacat
gctgatgcggttttggcagttacacaaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgg
gagtttgtttggcacaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaataaccccgccccgttgacgcaaattgggcggttaggcgtgtac
ggtgggaggtctatataagcagacgtcgtttagtaacctgctaaaaattattcttccctcactaatgctactaccactaacctgactatca
agccctaaaaaacctgaacaaacgtaacctcatatagttttctaattagtttaaccagcctaacacttctatgacaaaccgacgaaaatta
taaaaacttttcaaatatattctcctcagacccccctatccacaccattaattattttaacagcctgattactgccactaatattaatagctagcc
aaaaccacctaataaaagataataacgtactacaaaactctacatctcaataactaatcagcttacaattctcctaatacattttcag
caactgaactaatatattttatattttgaagcaaccttaacccaacactattattattaccgatgagggaaccaaactgaacgccta
aacgcagggatttatttctattttataccctaatacgggtctattccactgctaattgcctcatcttaacccaaacatgtaggaaccctaaa
cctcataattttatcattcacaacacacaccttagacgcttcatgactaacaacttactatggttggcatgcataatagcatttcttataaaat
accatttataggagttcacctatgactacaaaagcccatgttgaagctccaattgctgggtcaataattctagcagctatttcttataaatta
ggtagttacggaataattcgcattctcattattctagaccactaacaataatagcatacccttcatccttctcctatgaggaataa
ttataactagctcaatctgcttacgccaacagatttaaaatcactaatcgcctactcctcagttagccacatagcacttgttattgcatcaat
cataatccaaactccatgaagttcataggagcaacaataactaataatgcacatggcctcacatcatcactcctattctgcctagcaaaact
ccaactacgaacggatccacagccgtactataatcatggcccaggacttcaaatgggtctccacttatagccacatgatgactgatag
caagtctagctaatctagctctaccccttcaatcaatctaataaggagaattattcattaccatatcatttttcttgatcaaaactttaccattatt
cttataggaattaacattattattacaggtatatactcaatatacataaattattaccaccaacgcggcaaaactaaccaacatataattaacc
tccaacctcacacacacgagaactaacactaatagcccttcacataattccacttattcttctaactaccaatccaaaactaattacaggc
ctgacaatagattacaaggatgacgacgataagatggtgttccacactgaagatttctgtggggactgAcgacagacagccgggtaca
acctggaccaagtccttgaacagggaggtgtgtccagtttgtttcagaactcgggggtgtccgtaactccgatccaaCggattgtcctga
```

gcggtgaaaatgggctgaagatcgacatccatgcatcatcccgatgaaggtctgagcggcgaccaaaggccagatcgaaaaa
 ttttaagggtggtgtaccctgtggatgatcatcactttaagggtgatcctgcactatggcacactggtaatcgacgggggttacgccgaacatg
 atcgactatttcggacggccgatgaaggcatcgccgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaac
 aaaattatcgacgagcgctgatcaaccccgacggctccctgctgttcgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggtgtgc
 gaacgcattctggcgtaa gaaaggaaggaatcgaaacccctaaaattggtttcaagccaatctcatatcctatgtctttctcaataagat
 attagtaaatcaattacataactttgtcaaagttaaattatagatcaataatctatatcttatctgcag - (3' *Pst* I)

5.1.4 制限酵素処理とアガロースゲル電気泳動

超純水	UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific)
H buffer	(タカラバイオ)
制限酵素	<i>Eco</i> R I (タカラバイオ) <i>Pst</i> I (タカラバイオ)
アガロース	NE-AG2 (日本ジェネティクス, 東京, 日本)
TAE buffer	UltraPure DNA Typing Grade 50× TAE Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
サイズマーカー	EZ load 8353, 8354 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
Loading buffer	5× Nucleic Acid Sample Buffer (Bio-Rad)
核酸染色	SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)

5.1.5 リポソーム調製

DOPE	(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA)
SM	(Avanti Polar Lipids)
R8	Stearyl-RRRRRRRR-NH ₂ (倉敷紡績, 大阪, 日本)
KALA	Stearyl-WEKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA-NH ₂ (倉敷紡績)
RP アプタマー	Chol-(RNase P) (北海道システム・サイエンス, 札幌, 日本) RNase P 配列: 5'-UCUCCCUGAGCUUCAGG-3'
S2 ペプチド	Stearyl-Dmt-(D-Arg)-Phe-Lys-Dmt-(D-Arg)-Phe-Lys-NH ₂ (Dmt = 2,6-dimethyltyrosine) (東レリサーチセンター, 東京, 日本)
Resveratrol	(富士フイルム和光純薬工業, 大阪, 日本)
Protamine	Protamine sulfate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
NBD	18:1 NBD PE (Avanti Polar Lipids)
DiO	DiOC ₁₈ (3) (Invitrogen)

5.1.6 フローサイトメトリー

ヘパリン	ヘパリンナトリウム (エイワイファーマ, 東京, 日本)
BSA	(富士フイルム和光純薬工業)

アジ化ナトリウム (ナカライテスク)

5.1.7 ミトコンドリア呼吸能測定

EGTA	E4378 (Sigma-Aldrich)
MgCl ₂	19-0190-5 (Sigma-Aldrich)
Taurine	T0625 (Sigma-Aldrich)
KH ₂ PO ₄	104873 (Millipore, Billerica, MA, USA)
HEPES	H7523 (Sigma-Aldrich)
D(+)-Sucrose	4621 (Carl-Roth, Karlsruhe, Germany)
Pottasium lactobionate	153516 (Sigma-Aldrich)
FCCP (Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone)	C2920 (Sigma- Aldrich)

5.1.8 Resveratrol 封入率測定

SDS (東洋紡, 大阪, 日本)

5.1.9 ルシフェラーゼアッセイ

細胞溶解剤	Reporter Lysis 5 × buffer (Promega, Madison, WI, USA)
発光酵素	Nano-Glo Luciferase assay (Promega)

5.1.10 共焦点レーザー走査顕微鏡

MitoTracker Red FM	(Thermo Fisher Scientific)
DMEM	21063029 (Thermo Fisher Scientific)

5.2 実験機器

5.2.1 細胞培養

75 cm ² 細胞培養容器	CELLSTAR (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria)
6 穴プレート	Coster 3516 (Corning, Corning, NY, USA)
24 穴プレート	Coster 3526 (Corning)
96 穴プレート	Cellstar Cell Culture Plates sterile, F-bottom (Greiner bio-one)
ディスポーザブル細胞計算盤	C-Chip DHC-N01 (NanoEnTek, Seoul, Korea)
バイオクリーンベンチ	PCV-1605BRG3 (日立産機システム, 東京, 日本)
真空ポンプ	Linicon LV-435A (日東工器, 東京, 日本)
自動炭酸ガス細胞培養装置	SCA-165DS (アステック, 志免, 日本)
高圧蒸気滅菌器	LSX-300 (トミー精工, 東京, 日本)
恒温振盪水槽	NTS-4000BH (東京理化器械, 東京, 日本)

5.2.2 リポソーム調製

丸底ガラス試験管	P-12M (日電理化硝子, 神戸, 日本)
真空デシケーター	V-30 (伸栄産業, 大東, 日本)
ダイヤフラム型真空ポンプ	EVP-1100 (東京理化器械)
卓上型冷却トラップ装置	UT-1000 (東京理化器械)
卓上型超音波洗浄器	AU-25C (アイワ医科工業, 東京, 日本)

5.2.3 顕微鏡

実体顕微鏡	SZ61 (オリンパス, 東京, 日本)
共焦点レーザー走査型顕微鏡	FV10i-LIV (オリンパス)
対物レンズ	UPlanSApo 60×/NA = 1.2 water
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 nm
35 mm ガラス底面培養容器	3911-035 (AGC テクノグラス, 吉田, 日本)

5.2.4 アガロースゲル電気泳動

電気泳動装置	Mupid-2plus (ミューピッド, 東京, 日本)
撮像	Chemi Doc XRS+ (Bio-Rad)

5.2.5 フローサイトメトリー

フローサイトメーター	Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
解析ソフト	Kaliza (version 1.2) (Beckman Coulter)
48 μ m フィルターネット	N-No.305T (三商, 東京, 日本)
プラスチック試験管	2523749 (Beckman Coulter)

5.2.6 ルシフェラーゼアッセイ

発光測定装置	Luminescencer AB-2200 (アトー, 東京, 日本)
セルスクレーパー	9000-220 (AGC テクノグラス)
測定用試験管	Tube, 5 mL, 75 $\times$ 12 mm, PS (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

5.2.7 汎用機器

超純水製造装置	Milli-Q Advantage A 10 systme (Millipore)
卓上型 pH メーター	LAQUA F-71 (HORIBA, 京都, 日本)
定温恒温乾燥機	NOD-700 (東京理化器械, 東京, 日本)
ラボシェーカー	BC-740 (バイオクラフト, 東京, 日本)
ボルテックスミキサー	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
高精度分析電子天びん	BM-252 (エー・アンド・デイ, 東京, 日本)

5.2.8 遠心機

冷却遠心機	5911 (久保田製作所, 東京, 日本)
超遠心機	Himac CS150CX (日立工機, 東京, 日本)
超遠心機	CR21G III (日立工機)

5.2.9 その他の測定機器

粒子径・ゼータ電位分析装置	Zetasizer Nano ZS (Malvern, Malvern, UK)
解析ソフト	Zetasizer Software (version 7.11) (Malvern)
プレートリーダー (吸光度測定)	MultiskanTM GO (Thermo Fisher Scientific)
プレートリーダー (発光量測定)	Enspire 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)
高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置	Oxygraph-2k (Oroboros, Innsbruck, Austria)
解析ソフト	Datlab software (version 7.0.0.2) (Oroboros)

5.3 一般試薬調製

高圧蒸気滅菌は 121℃, 20 分間で行い, フィルター滅菌は DISMIC-25AS 0.20 μm (アドバンテック東洋, 東京, 日本) を用いて行った.

本研究で使用した試薬組成および調整法を以下に示す.

5.3.1 細胞培養

FBS は -20°C で保存し, 4°C で溶解して 56°C の湯浴中で 30 分間非働化した.

細胞培養用培地は, DMEM 450 mL, FBS 50 mL, $100\times$ ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 5 mL を混合し, 最終濃度を FBS 10%, ペニシリン 100 U/mL, ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g/mL}$ とした.

C2C12 分化用培地は, DMEM 490 mL, ウマ血清 10 mL, $100\times$ ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 5 mL を混合し, 最終濃度をウマ血清 2%, ペニシリン 100 U/mL, ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g/mL}$ とした.

PBS は, 細胞接着に必要なカルシウムやマグネシウムを含まない, いわゆる PBS (一) 溶液を作製し使用した. 137 mmol/L NaCl, 8.1 mmol/L Na_2HPO_4 , 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH_2PO_4 を混合し, 滴定して pH 7.4 にした. 高圧蒸気滅菌後に使用した.

5.3.2 大腸菌培養

50 mg/mL ampicillin 溶液は, ampicillin sodium salt 500 mg を超純水 10 mL に溶解して作製した. フィルター濾過滅菌後に分注して -20°C で保存した.

LB 培地は, Bacto Tryptone 12.5 g, Yeast extract 5.0 g, NaCl 6.25 g を超純水 1 L に溶解し, 1 mol/L NaOH 2 mL を加えて pH 7.2 前後に調整し, オートクレーブにより滅菌後, 50 mg/mL ampicillin 溶液 1 mL を添加し作製した. 4°C で保存した.

5.3.3 フローサイトメトリー

20 単位/mL ヘパリン溶液は, 1000 単位/mL ヘパリン 1 mL を PBS 49 mL に加えて 50 倍希釈し作製した. 4°C で保存した.

フローサイトメトリー測定用液は, PBS 50 mL に BSA 250 mg, アジ化ナトリウム 50 mg を添加し作製した. 4°C , 遮光で保存した.

5.3.4 Resveratrol 封入ナノカプセル

10% SDS 溶液は, SDS 粉末 10 g を超純水 100 mL へ溶解し作製し, 室温で保存した.

5.3.5 ミトコンドリア呼吸能測定

MiR05 buffer は、最終濃度として 0.5 mmol/L EGTA, 3 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L taurine, 10 mmol/L KH₂PO₄, 20 mmol/L HEPES, 110 mmol/L sucrose, 60 mmol/L potassium lactobionate, 1 g/L BSA になるよう混合し、pH 7.1 になるよう滴定し作製した.

5.3.6 共焦点レーザー走査顕微鏡

観察中に使用する細胞用培地には、HEPES 含有、フェノールレッドフリーの高グルコース含有 DMEM を用い、細胞培養用と同様に FBS, ペニシリン・ストレプトマイシン溶液を混合した.

5.4 共通実験操作

5.4.1 細胞培養

液体窒素で凍結保存した細胞懸濁液へ、37℃に加温した培地を少しずつ加えながら速やかに融解した。合計 10 mL として 50 mL コニカルチューブへ移し、400×g, 4℃で 3 分間遠心して上清を除去した。その後細胞ペレットを新たな培地 12 mL に穏やかに懸濁させ、75 cm² 細胞培養用フラスコに播種し、37℃, 5% CO₂ 条件下で培養した。

培養細胞は 2～3 日ごとに継代した。培地を除去し、PBS で洗浄後、0.05% トリプシン・EDTA 2 mL を加え、37℃, 5% CO₂ 条件下で 3 分間処理した。細胞が剥がれたことを顕微鏡下で確認後、培地 10 mL を加えてピペッティングしトリプシンを不活化させ、50 mL コニカルチューブへ回収した。400×g, 4℃で 3 分間遠心して上清を除去後、細胞ペレットを培地 10 mL に懸濁した。次の継代の時点で 70%コンフルエントになる細胞数（およそ 4～5×10⁵）を 75 cm² 細胞培養用フラスコに播種し、37℃, 5% CO₂ 条件下で培養した。

細胞数の計算には細胞計算盤を用いた。細胞懸濁液から 10 μL を取り、等量の 0.03% トリパンプルー溶液と混合後、細胞計算盤に注入し、顕微鏡下で生細胞数を計算した。

細胞の保存は、1×10⁶ 個/mL となるよう細胞を 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) 含有培地に懸濁し、1 mL ずつスクリーキャップマイクロチューブに分注後、-80℃で凍結させたのちに液体窒素中で保管した。

5.4.2 蛋白濃度測定

抽出したサンプル蛋白の濃度測定は、ビスンコニン酸 (Bicinchoninic acid) を用いた下記手順により施行した。

- 1) Protein Assay Reagent A と Protein Assay Reagent B を体積比 50:1 の割合で混合し、96 穴プレートの各ウェルに 100（または 200）μL ずつ分注した
- 2) 各サンプルの蛋白上清を 20 μL ずつ各ウェルへ加えた
- 3) 蛋白濃度の検量線を求めるため、2 mg/mL BSA standards を標準試薬として、1.0～10 μL (2～20 μg) の範囲で各ウェルへ加え、それぞれへウェル内の合計混合液量が同量になるよう調整した
- 4) 37℃で 30 分間反応させた
- 5) プレートリーダーを用いて、562 nm の吸光度を測定した
- 6) 標準試薬の吸光度から得られる検量線をもとに各サンプルの蛋白濃度を算出した

5.4.3 単純水和法によるリポソーム調製

丸底ガラス試験管に、エタノールで脂質濃度 1 mmol/L に溶解した各種脂質の混合液 120~650 μ L, 必要に応じ 0.5 mol%相当の蛍光脂質試薬を添加し, さらに有機溶媒としてクロロホルム 125 μ L を添加して, 真空デシケーターで溶媒を留去することで, ガラス試験管内面に脂質薄膜を作製した (図 5-4-1). 10 mmol/L HEPES または調整済みの pDNA ナノ粒子含有 HEPES 溶液を加え, 15 分間室温に置き水和させた. 卓上型超音波洗浄器を用いてガラス試験管ごと 20~30 秒間超音波処理し, リポソームを生成させた. 必要に応じ, ペプチド溶液を加えてリポソームへ修飾した.

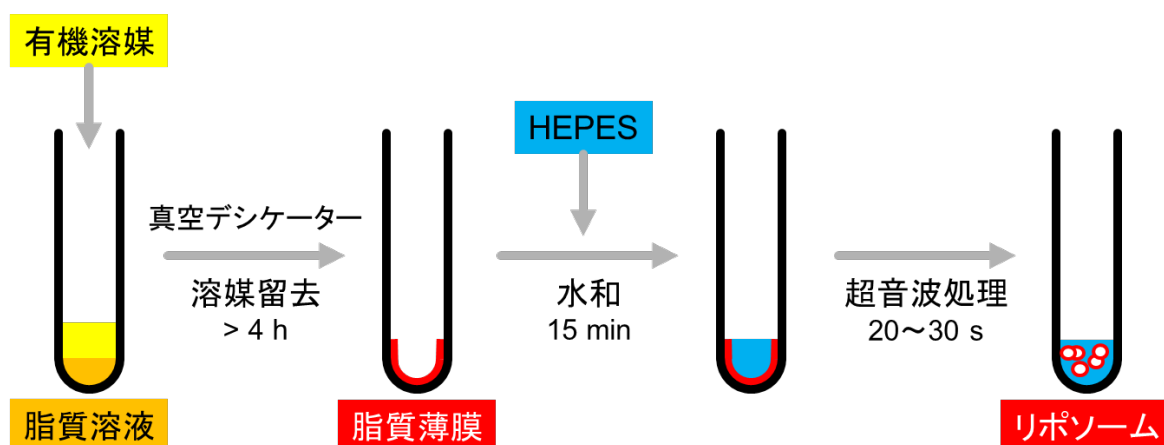


図 5-4-1 単純水和法によるリポソーム調製

5.4.4 フローサイトメトリーによる細胞内取込能評価

マウス骨格筋芽細胞 C2C12 を 6 穴プレートへ 2×10^5 cells ずつ播種し, 血清含有 DMEM 2 mL, 37°C, 5% CO₂ 条件下で前培養した. 24 時間後, 培養液を PBS で洗浄し, 蛍光標識済みのリポソーム溶液を添加した血清フリーの DMEM 1 mL に置換して, 37°C, 5% CO₂ 条件下で 1 時間処理した. PBS 1 mL で洗浄し, さらに 20 単位/mL ヘパリン溶液 0.5 mL で 2 回洗浄し細胞周囲に付着したカチオン性リポソームを除去した. 0.05%トリプシン溶液 0.5 mL を添加して 37°C, 5% CO₂ 条件下で 3 分間処理した. 血清含有 DMEM 0.7 mL を添加してトリプシンを不活化させ, 以後氷上で処理した. 全量をマイクロチューブ内に回収し, 700 $\times$ g, 4°Cで 3 分間遠心分離し, 上清を除去した. フローサイトメトリー測定用液 1 mL で洗浄し再度 700 $\times$ g, 4°Cで 3 分間遠心分離, 上清を除去した. フローサイトメトリー測定用液 0.5 mL で細胞を懸濁し, ナイロンメッシュの 48 μ m フィルターネットに通して測定用プラスチック試験管に移した. フローサイトメーターを用いて, 励起波長 488 nm, 検出器 FL1 (525 nm) で細胞内の蛍光標識 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD) (Excitation 460 nm, Emission 534

nm) の蛍光強度を測定し、幾何平均値を算出した。リポソームを投与しておらず蛍光が含まれていない細胞における蛍光強度幾何平均値で除すことで算出された相対値を比較した (図 5-4-2)。解析ソフトには Kaliza (version 1.2) (Beckman Coulter) を用いた。測定に際しては、前方散乱光および側方散乱光の値を用いて測定対象とする骨格筋芽細胞を設定し、細胞以外の破片等を除外した。

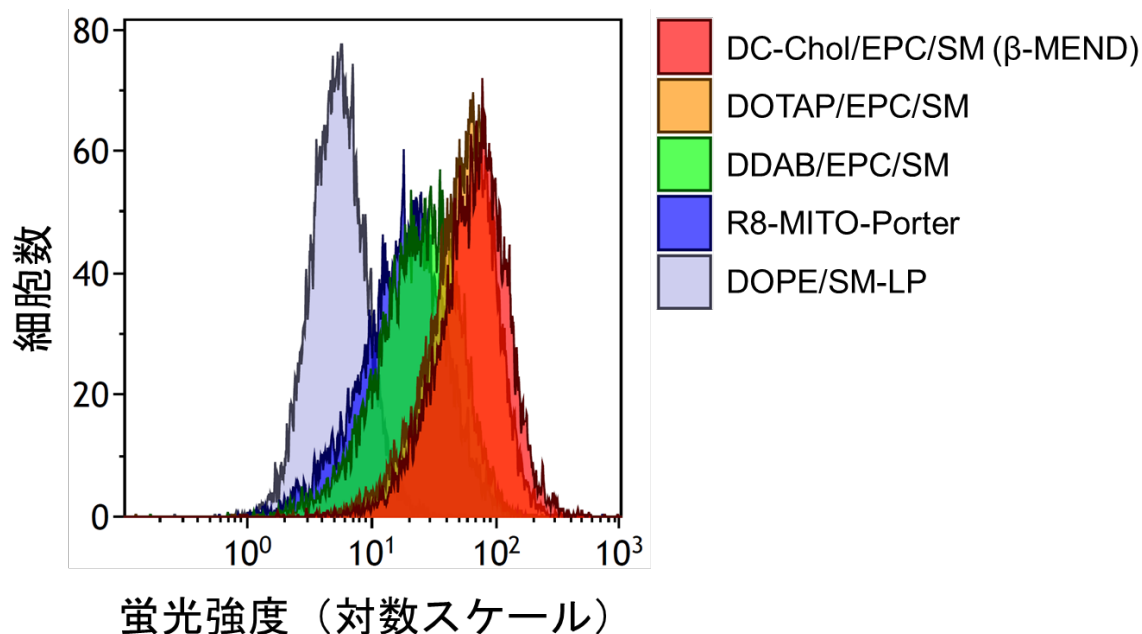


図 5-4-2 フローサイトメトリーによる細胞内取込能評価の一例。蛍光標識した各種脂質組成のリポソームを骨格筋芽細胞へ投与し、細胞から検出される蛍光強度を測定してそれぞれの強度における細胞数の分布を示している。それぞれの群の蛍光強度の幾何平均値を、非投与群すなわち外的蛍光標識が含まれていない細胞群における蛍光強度の幾何平均値で除すことで相対値を算出し結果とした。

5.5 実験 1. 骨格筋芽細胞内取込能が高いカチオン脂質の検討

5.5.1 ナノカプセルの作製

骨格筋培養細胞内への取込能が高い脂質組成を検証するため、いくつかの種類のリポソームを作製した. 最初に “MITO-Porter” として報告されたミトコンドリア移行性リポソームの脂質組成は, Stearyl R8/DOPE/SM であり (Yamada et al., 2008), 今回の実験での検証対象とした. またこの MITO-Porter にはカチオン性で細胞膜貫通性を有する R8 が修飾されているが, R8 を除いた DOPE/SM 組成についても検証対象とした. 膵 β 細胞由来細胞で細胞内取込能が高いことが明らかとなっている “ β -MEND (Yamada et al., 2014)” はカチオン脂質 DC-Chol を含む脂質組成だが, DC-Chol を他のカチオン脂質 DOTAP, DDAB, DOTMA へ入れ替えた各種リポソームについても作製し検証した.

5.6 実験 2. Resveratrol 投与とミトコンドリア機能の検討

5.6.1 Resveratrol 封入ナノカプセルの作製と封入率測定

丸底ガラス試験管内にて， β -MEND の脂質組成として脂質溶液 DC-Chol, EPC, SM およびエタノールで溶解した resveratrol を，モル比 3 : 4 : 3 : 1.82 となるよう混合した．0.5 mol%相当の蛍光脂質試薬 NBD-DOPE を加えた．その後は前述の手順に従って，脂質濃度 0.55 mmol/L，理論値での resveratrol 濃度 0.1 mmol/L のリポソーム溶液を作製した（図 5-6-1）．

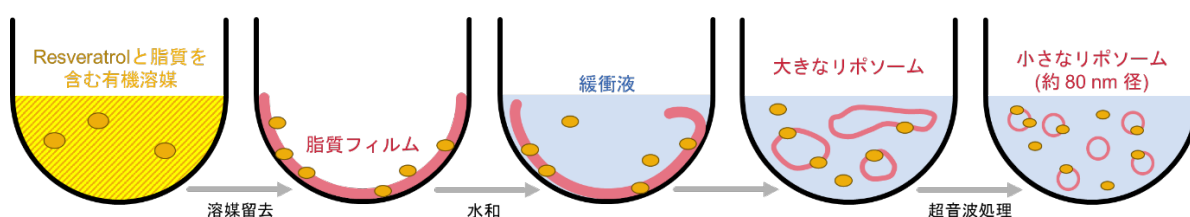


図 5-6-1 Resveratrol 封入リポソーム溶液の作製手順

このリポソーム溶液はリポソーム内に封入されず遊離した resveratrol を含んでいるため，resveratrol 封入リポソームのみの溶液へ精製した（図 5-6-2）．遠心管 1 本あたり 600 μ L 以内となるようリポソーム溶液を遠心管へ分注し，74,000 $\times g$ ，4 $^{\circ}$ C，20 分間で超遠心し，リポソームのみを沈降させ，リポソームに封入されていない resveratrol を含む上清を全体積の半分除去した．その後除去した体積と同じ量の HEPES buffer を添加し，元の容量へ戻した．この遠心によって未封入 resveratrol を除去し resveratrol 封入リポソームのみに濃縮していく操作を合計 3 回繰り返し，精製後の resveratrol 封入リポソーム溶液を得た．

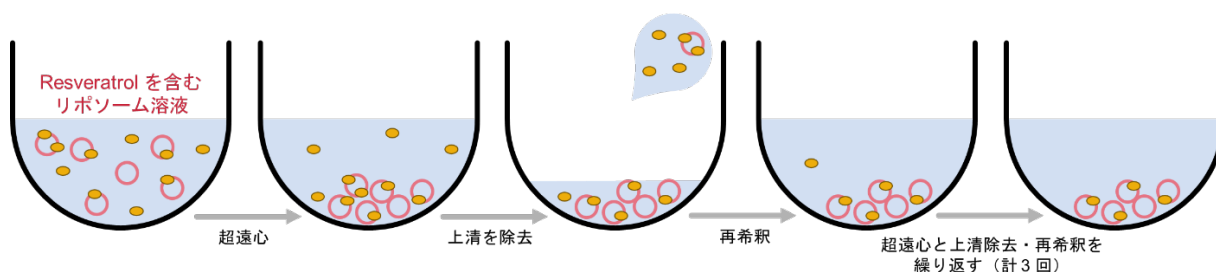


図 5-6-2 Resveratrol 封入リポソーム溶液の精製手順

Resveratrol 封入率を、次の手順で算出した。精製前後のそれぞれのリポソーム溶液から 12.2 μL ずつ採取し、HEPES buffer 42.8 μL を加えて 4.5 倍希釈リポソーム溶液 55 μL とした。ここから 10 μL を採取し、HEPES buffer 90 μL 、10 weight/volume% (w/v%) 界面活性剤 SDS を 11 μL 加え、1 w/v% SDS 含有 50 倍希釈リポソーム溶液 111 μL とし、リポソームに含まれる蛍光 NBD の蛍光強度を測定した。ブランクには 1 w/v% SDS 含有 HEPES buffer を用いた。精製前後の蛍光強度の比から、リポソーム（脂質）回収率を求めた。次に残りの 4.5 倍希釈リポソーム溶液 45 μL に 10 w/v% SDS 5 μL を加え、1 w/v% SDS 含有 5 倍希釈リポソーム溶液 50 μL とし、resveratrol の最大吸光波長 306 nm における吸光度を測定した。ブランクには 1 w/v% SDS 含有 HEPES buffer を用いた。既知の濃度の resveratrol 溶液で検量線を求め、精製前後のリポソーム溶液の resveratrol 濃度を算出し、濃度比から精製前後の resveratrol 回収率を求めた。Resveratrol 回収率をリポソーム（脂質）回収率で除し、resveratrol 封入率を算出した。

5.6.2 細胞の複合体 I 機能評価

最初に下記の手順で細胞へ resveratrol を投与し一定時間経過後に細胞を回収した。マウス骨格筋芽細胞 C2C12 を 75 cm^2 細胞培養容器 5×10^5 cells ずつ播種し、血清含有 DMEM 12 mL、37°C、5% CO_2 条件下で 24 時間前培養した。培養液を PBS で洗浄後、各濃度の resveratrol 溶液を添加した DMEM 12 mL、または各濃度の resveratrol 封入リポソーム溶液を添加した血清フリーの DMEM 12 mL へ置換して、37°C、5% CO_2 条件下で 1~48 時間（血清フリーの場合は 6 時間以内）処理した。PBS で洗浄し、リポソームを添加していた場合はさらに 20 単位/mL ヘパリン溶液で 2 回洗浄し細胞周囲に付着したカチオン性リポソームを除去した。0.05%トリプシン溶液 2 mL を添加して 37°C、5% CO_2 条件下で 3 分間処理した。血清含有 DMEM 10 mL を添加してトリプシンを不活化させ、400 $\times$ g、4°Cで 3 分間遠心して上清を除去後、細胞ペレットを PBS 10 mL に懸濁し、再度 400 $\times$ g、4°Cで 3 分間遠心して上清を除去後、2 mL あたりの細胞数 1.0×10^6 個の濃度になるよう、氷冷した MiR05 buffer に懸濁および調製した。

Resveratrol によるミトコンドリア呼吸能への効果、特に複合体 I の機能を測定するため、高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置 Oxygraph-2k の容積約 2 mL の密閉されたチャンバー内へ下記の手順で試薬および細胞を添加し、細胞膜透過処理後の各種呼吸基質存在下での酸素消費速度を測定した (Makrecka-Kuka et al., 2015)。濃度はチャンバー内投与後の最終濃度を示す。

- 1) 呼吸能測定用の MiR05 buffer でチャンバー内を満たし 37°C で安定させた
- 2) 1.0×10^6 個の細胞を添加した
- 3) Digitonin 5 mmol/L を添加し細胞膜を透過処理した。この処理によりミトコンドリアを含む細胞小器官の構造や相互関係を保持したまま、外因性投与した物質を細

胞内まで到達できるようにした

- 4) 複合体 I に関連する基質である malate (リンゴ酸) 2 mmol/L と glutamate (グルタミン酸) 10 mmol/L を添加した
 - 5) Pyruvate (ピルビン酸) を添加し、安定したところで複合体 I 関連基質存在下のプロトンリーク (MGP_L) を測定した
 - 6) 塩化マグネシウム, ADP を添加し、安定したところで複合体 I の酸化的リン酸化による呼吸能 (MGP_P) を測定した
 - 7) Cytochrome c を添加し、投与前後で酸素消費速度が 10%以上増加した場合はミトコンドリア外膜の構造が保たれていないと判断しすべての測定結果を除外した
 - 8) 脱共役剤である carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) を 1 $\mu\text{mol/L}$ ずつ滴定し、電子伝達系による最大の呼吸能 (MGP_E) を測定した
 - 9) Antimycin A を添加して複合体 III を阻害し、安定したところでミトコンドリア以外による残存酸素消費速度 (residual oxygen consumption, ROX) を測定した
- 上記手順の各段階でそれぞれ測定した酸素消費速度から、細胞数あたりのミトコンドリア呼吸能、特に複合体 I の機能を算出した。

5.6.3 β -MEND の骨格筋芽細胞内取込の時間的検証

マウス骨格筋芽細胞への resveratrol 投与において、投与に用いる β -MEND がどれくらいの時間で細胞内に到達するのかを検証した。正電荷である β -MEND は表面電位が負のアルブミンと凝集し細胞内取込に支障を生じるため、血清を含まない培養液とともに細胞へ投与した。

細胞回収 24 時間前にマウス骨格筋芽細胞 C2C12 を 6 穴プレートへ 4.2×10^5 cells ずつ播種し、血清含有 DMEM 2 mL, 37°C, 5% CO₂ 条件下で前培養した。細胞回収 1, 3, 6 時間前に、培養液を PBS で洗浄し、蛍光標識済みの β -MEND 溶液を添加した血清フリーの DMEM 1 mL に置換して、37°C, 5% CO₂ 条件下で処理した。一部は 1 時間後に、残りは細胞回収時に、PBS 1 mL で洗浄し、さらに 20 単位/mL ヘパリン溶液 0.5 mL で 2 回洗浄し細胞周囲に付着したカチオン性の β -MEND を除去した。細胞回収まで時間がある場合は血清含有 DMEM 2 mL へ戻し、37°C, 5% CO₂ 条件下とした。細胞回収以後の処理および細胞内取込能測定は、前述のフローサイトメトリーによる細胞内取込能評価の手順に従った。

なお resveratrol が単独投与されてから細胞内へ到達するまでの時間は、C2C12 骨格筋芽細胞を用いた先行研究で 30 分程度であった (Kaminski et al., 2012)。Resveratrol が投与されてから細胞内で効果を示すまでの時間は、同様に先行研究では 30 分程度であった (Park et al., 2012)。したがって本実験における投与時間は 1 時間とした。

5.7 実験 3. 骨格筋芽細胞のミトコンドリア移行性が高い修飾の検討

ナノカプセルのミトコンドリア移行性を測定するため、ミトコンドリア内でのみ発光蛋白を発現する pDNA をナノカプセルへ封入し、その細胞内導入後の発光量を測定した。

5.7.1 pDNA の大量調製

目的の pDNA を形質転換した *E. coli* DH5 α 株を、白金耳を用いて LB 培地 10 mL に植菌し、37°C で 8 時間以上振盪培養した。この培養液を LB 培地 1 L に混合し、37°C で 16 時間振盪培養した。超遠心機用試薬瓶 2 本に分注し、4°C、6,000 $\times g$ で 15 分間遠心して菌体ペレットを得た。冷却した Buffer P1 を 25 mL ずつ 2 本の試薬瓶へ添加し、細胞塊がなくなるまでボルテックスまたはピペッティングしてペレットを完全に再懸濁させた。Buffer P2 を 25 mL ずつ 2 本の試薬瓶へ添加し 4~6 回転倒混和した。5 分間室温に放置し溶菌反応させた。冷却した Buffer P3 を 25 mL ずつ 2 本の試薬瓶へ添加し 4~6 回転倒混和し、ゲノム DNA、蛋白、細胞の破片などが含まれる白色綿毛状の物質が形成されるのを確認した。その後の cartridge の目詰まりを防ぐため、溶菌液（ライセート）の粘稠がなくなるまでよく混和した。QIAfilter Mega-Giga Cartridge をオートクレーブ済みの 500 mL ガラス瓶に装着し、試薬瓶 2 本分の溶菌液（ライセート）を注ぎ、室温で 10 分間静置した。吸引装置を接続してすべての溶液をガラス瓶内へ通過させた。Buffer FWB2 を 50 mL、cartridge に添加して、再度吸引装置で通過させた。滅菌済みのへらなど静かに攪拌しフィルター通過を促進させた。溶液が完全に通過され、ガラス瓶に回収された pDNA を含む清澄化溶菌液を得た。Buffer ER を 12.5 mL 溶菌液に添加し、約 10 回転倒混和後、氷上で 30 分間静置した。QIAGEN-tip 2500 に Buffer QBT を 35 mL 加え、カラムが空になるまで自然落下させ平衡化した。溶菌液約 200 mL を QIAGEN-tip に添加し、自然落下によりカラムへ浸透させた。Buffer QC を 50 mL ずつ 4 回 tip に添加して自然落下させ、夾雑物を除去した。50 mL 遠心チューブを tip 下に設置し、Buffer QN を 35 mL 入れて DNA を溶出し、回収した。遠心チューブ 2 本に分け、それぞれに 70%イソプロパノールを 12.25 mL ずつ加えて混和した。ただちに 4°C、15,000 $\times g$ で 30 分間遠心した。透明なペレットが剥がれないよう注意深くデカントで上清除去した。70%エタノールを 3.5 mL ずつ加えてペレットを洗浄し塩を除去した。4°C、15,000 $\times g$ で 10 分間遠心し、デカントで上清除去し、過度な乾燥に気を付けながら 10~20 分間空気乾燥した。超純水を 600 μ L ずつ加え 30 分~1 時間室温に置いてペレットを緩徐に溶解させた。pDNA の濃度は、波長

260 nm における吸光度 A_{260} を測定し下記計算式から算出した.

$$\text{DNA 濃度 } [\mu\text{g/mL}] = A_{260} \times 50$$

5.7.2 エタノール沈殿による核酸精製

核酸（本実験においては pDNA）溶液に対し，2.0～2.5 倍量の冷却した 100%エタノールを加えエタノール濃度約 70%となるようにし，混和した．20 分の 1 量の 4 mol/L NaCl を添加し， $-20 \sim -80^{\circ}\text{C}$ で 10～120 分間静置した． $20,400 \times g$ ， 0°C で 20 分間遠心分離後，上清を除去した．さらに冷却した 70%エタノール 1 mL を添加し，ペレットに含まれる塩を洗浄した後，再度 $20,400 \times g$ ， 0°C で 20 分間遠心分離し，上清を除去した．数分間かけて風乾し，超純水で穏やかに溶解させた．

5.7.3 pDNA の制限酵素処理とアガロースゲル電気泳動

下記の手順のとおり，精製した pDNA について，適当な制限酵素で処理後，アガロースゲル電気泳動により分子量を確認した．

評価する pDNA 溶液を pDNA 0.25 μg 相当と， $10 \times \text{H buffer}$ 1 μL ，制限酵素 1 μL を混合し，合計 10 μL になるよう超純水を添加した． 37°C で 2 時間以上置いて制限酵素処理し，その後 on ice とした．

アガロースを濃度 1%～1.5% (w/v) になるよう TAE buffer へ添加し，市販の電子レンジで加熱沸騰し溶解させた．オスグッド式ゲル作製機のゲルトレイへ薄く注ぎ，室温で自然冷却し固めて，アガロースゲルを作製した．

電気泳動装置の泳動槽に TAE buffer を注ぎ入れ泳動緩衝液とし，アガロースゲルを水面下に沈めた．pDNA サンプル 10 μL と $10 \times \text{loading buffer}$ 1.1 μL を混合し，アガロースゲルのウェル内へ静かに添加した．100 V で 30～40 分間電気泳動させた，DNA 染色液 SYBR Safe を TAE buffer で 1 万倍に希釈し，泳動後のゲルを浸して 30 分間ゆっくり振盪させ，ゲルの DNA を染色した．撮像機で撮像し目的のバンドを検出した．

5.7.4 ナノカプセルへの pDNA 封入

pDNA は負電荷のリン酸基を多く含むため互いに反発し合い，小さいナノカプセルに封入しにくい．そのため，適切な割合で protamine を混合し，protamine を構成するアミノ酸のうち 6 割を占めるアルギニンのグアニジノ基とイオン結合させ，protamine の α -ヘリックスが二重らせんの溝に沿うように結びつき，pDNA が小さく凝集するように工夫した（図 5-4-1）．混合比はアルギニン残基数とリン酸基数の比 nitrogen / phosphate (N/P) で表した．N/P 比は，protamine の分子量 $MW_p = 4250$ ，pDNA のヌクレオチド 1 つあたりの平均分子量 $MW_D = 330$ ，protamine のアルギニン残基数 $n_R = 21$

として、下記の計算式から算出した。

N/P ratio

$$\begin{aligned}
 & \text{Protamine の質量 } M_p[\text{mg}] \times \frac{\text{Protamine のアルギニン残基数 } n_R}{\text{Protamine の分子量 } MW_p} \\
 = & \frac{\text{pDNA の質量 } M_D[\text{mg}] \times \frac{\text{pDNA のヌクレオチド 1 つあたりのリン酸基 (PO}_4^-) \text{ 数}}{\text{pDNA のヌクレオチド 1 つあたりの平均分子量 } MW_D}}{M_D \times \frac{1}{310}} = \frac{M_p}{M_D} \times 1.53
 \end{aligned}$$

0.1 g/L protamine 含有 10 mmol/L HEPES 溶液を 1.5 mL マイクロチューブへ適量入れ、ボルテックスミキサーで攪拌させながら、適量の 0.1 g/L pDNA 含有 10 mmol/L HEPES 溶液を徐々に添加し、任意の N/P 比の pDNA ナノ粒子含有 HEPES 溶液を作製した。

単純水和法によるリポソーム調製の、水和の段階において、上記で作製した pDNA ナノ粒子含有 HEPES 溶液を加え、同様に超音波処理することで、pDNA 封入リポソームを作製した。

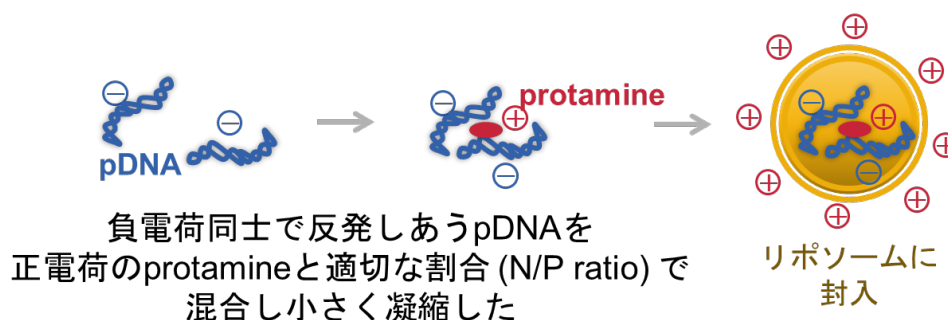


図 5-4-1 pDNA の protamine による凝集

5.7.5 ルシフェラーゼアッセイ法によるミトコンドリア移行性測定

ミトコンドリア移行性を有するナノカプセルを作製するため、実験 1 で得られた細胞取込能が高い脂質組成リポソームに対し、ミトコンドリア移行性を有するとされる各種ペプチドを修飾した。

マウス骨格筋芽細胞 C2C12 を 24 穴プレートへ 4×10^4 cells ずつ播種し、血清含有 DMEM 500 μL , 37°C, 5% CO₂ 条件下で前培養した。培養液を PBS で洗浄後、pDNA 封入済みのリポソーム溶液を添加した血清フリーの DMEM 250 μL に置換して、37°C, 5% CO₂ 条件下で 3 時間処理した。再び血清含有 DMEM 500 μL に戻し 21 時間培養継

続した．PBS で洗浄除去し，細胞溶解剤 Reporter Lysis buffer を 75 μ L 添加し，プレートごと -80°C で 30 分間置いて凍結させた．室温に 10～15 分間置いて解凍し，氷上でセルスクレーパーを用いて細胞を剥離した．得られた細胞含有液をマイクロチューブ内へ回収し， $20,630\times g$ ， 4°C で 2 分間遠心分離した．蛋白上清を回収し，このうち 20 μ L を発光酵素 Nano-Glo Luciferase assay reagent 50 μ L と測定用試験管内で緩徐に混合し，発光測定装置で発光量を速やかに測定した．30 秒間に検出測定された発光量を，単位 relative light unit (RLU) を用いて示した．蛋白上清を含まない場合の発光量も測定し，その値でブランク減算した．

5.7.6 共焦点レーザー走査型顕微鏡による細胞内動態観察

35 mm ガラス底面培養容器に 2×10^5 cells を播種し，血清含有 DMEM 2 mL， 37°C ，5% CO_2 条件下で前培養した．培養液を PBS で洗浄後，蛍光修飾後のリポソーム溶液を添加した血清フリーの DMEM 1 mL に置換して， 37°C ，5% CO_2 条件下で 1 時間処理した．再び血清含有 DMEM 2 mL に戻し 2 時間培養継続した．ミトコンドリア染色試薬 MitoTracker を 0.1 mmol/L の濃度になるよう添加し 30 分間処理した．培養液をフェノールレッドフリーの DMEM で洗浄・置換後，共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した．

5.8 統計学的解析

統計処理は，統計解析ソフトウェア JMP Pro (version 14.0) (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて行った．データは，平均値 $\pm$ 標準偏差で表した．多群間の平均値の差の検定は analysis of variance (ANOVA) にて行い，有意差が認められた場合に事後解析として対照群に対する多重比較の Dunnett の検定を行った．一部では Tukey-Kramer の多重比較法による HSD 検定を行った． $p < 0.05$ をもって統計学的有意と判定した．

6. 結果

6.1 実験 1. 骨格筋芽細胞内取込能が高いカチオン脂質の検討

6.1.1 ナノカプセルの作製

骨格筋培養細胞内への取込能が高い脂質組成を検証するため、表 6-1-1 に示すようにカチオン脂質 (DC-Chol, DOTAP, DDAB, DOTMA) のみを入れ替えて構成した各種リポソームを作製した。いずれのリポソームも粒径が 100 nm 前後であった。DC-Chol, DOTAP は粒径およびそのばらつきが比較的大きかった。溶液中の粒子の表面（液体流動のすべり面）の電荷を表すゼータ電位は、カチオン脂質により正となった。

表 6-1-1 カチオン脂質を入れ替えた各種リポソームの物性

リポソームの種類	脂質組成(モル比)	粒径, nm	ゼータ電位, mV
カチオン脂質			
1 DC-Chol	DC-Chol/EPC/SM (3:4:2)	105 ± 21	+36 ± 24
2 DOTAP	DOTAP/EPC/SM (3:4:3)	103 ± 26	+56 ± 11
3 DDAB	DDAB/EPC/SM (3:4:3)	90 ± 7	+49 ± 12
4 DOTMA	DOTMA/EPC/SM (3:4:3)	84 ± 1	+33 ± 13
参考(MITO-Porter 組成)			
5 DOPE	DOPE/SM (9:2)	128 ± 7	-15 ± 9
6 R8-DOPE	Stearyl-R8/DOPE/SM (1.1:9:2)	139 ± 7	+19 ± 21

値は平均値±標準偏差. n = 3-8.

6.1.2 フローサイトメトリーによる細胞内取込能評価

カチオン脂質別に作製し蛍光修飾したリポソームを骨格筋芽細胞 C2C12 へ投与し、細胞内の蛍光強度を測定することでそのリポソームの細胞内取込能を評価した（図 6-1-1）。一元配置分散分析を用いて群間の平均値の差を検定し、DOPE/SM-LP 群を対照群とした Dunnett 法による多重比較検定を行ったところ、R8-MITO-Porter 群のほか、DC-Chol 群、DDAB 群において、カチオン性ではない対照群 DOPE/SM-LP と比較し細胞内取込能が有意に高かった。DOTAP 群は平均値が高かったもののばらつきが大きく有意差がなかった。DC-Chol 群、DOTAP 群はいずれもばらつきが大きく、粒径のばらつきが大きいことと一致した。

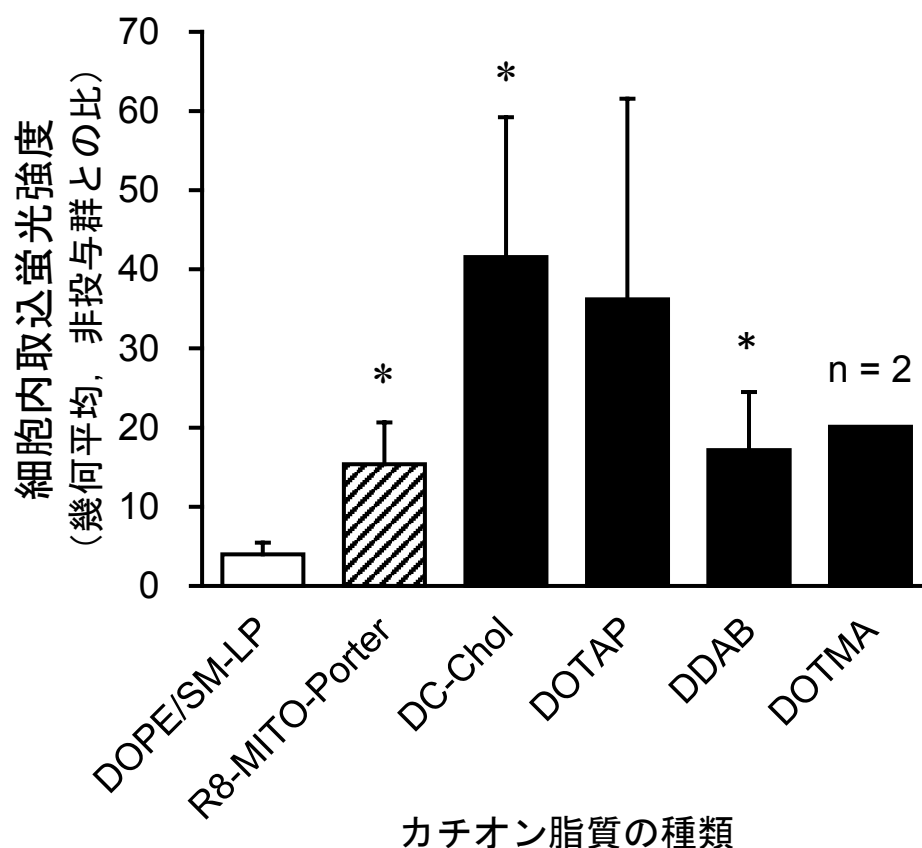


図6-1-1 カチオン脂質別の各種リポソームにおける骨格筋芽細胞への細胞内取込能. 蛍光標識したリポソームを骨格筋芽細胞 C2C12 へ 1 時間投与した後, 細胞の蛍光強度をフローサイトメリーで測定し, 幾何平均の非投与群との比を算出した. 結果は群の平均値±標準偏差で示した. DOTMA 群は $n = 2$, それ以外の群は $n = 4-5$. * 群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い, DOPE/SM-LP 群を対照群として Dunnett 法による多重比較検定を行った.

以上の結果から, 実験 1 の目的である, 骨格筋芽細胞内への取り込み能が高いナノカプセルを開発することができた.

本結果において, 骨格筋芽細胞への細胞内取込能が有意差をもって高く, 特に平均値が高いカチオン脂質 DC-Chol を含む脂質組成 DC-Chol/EPC/SM を, その後の実験検証に用いることとした. この組成は先行研究 (Yamada et al., 2014) で膵 β 細胞由来培養細胞へ取り込まれやすいことから multifunctional envelope-type nano device for pancreatic β cells (β -MEND) と名づけられており, 本稿でも以降「 β -MEND」と呼称する.

6.2 実験 2. Resveratrol 投与とミトコンドリア機能の検討

ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の活性を向上させる薬物 resveratrol を細胞内取込能が高いリポソーム β -MEND 内へ封入して骨格筋芽細胞 (C2C12) へ投与すれば resveratrol による複合体 I 活性化の効果は増強するという仮説について、実験 2 で検証した。Resveratrol 封入 β -MEND を投与して複合体 I の活性化がみられる最小の濃度を確認した後、同等の濃度の resveratrol 単独投与群と比較することで、 β -MEND によってミトコンドリア送達性が高まり resveratrol 効果発現の効率性が向上することを証明する方針とした。

6.2.1 Resveratrol 封入ナノカプセルの作製と封入率測定

脂質回収率、すなわちリポソーム回収率は 0.267 (標準誤差 0.007)、resveratrol 回収率は 0.167 (標準誤差 0.006)、封入率は 0.629 (標準誤差 0.034) であった ($n = 5$)。

6.2.2 細胞の複合体 I 機能評価

Resveratrol 濃度で換算した各濃度の resveratrol 封入 β -MEND を、骨格筋芽細胞 C2C12 へ 1 時間投与し、その細胞を回収して容器内に密閉した。容器内にミトコンドリアの基質を加え、細胞の酸素消費速度を測定することで、細胞数あたりのミトコンドリア呼吸能を評価した。本実験においてはミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I に関連する基質である malate (M) および glutamate (G) を用いることで複合体 I の機能評価に着目した。実験のいずれにおいても cytochrome c の外からの投与による酸素消費速度の有意な上昇 (投与前の 10%以上) がないことからミトコンドリア外膜の損傷は否定的であった。Malate (M), glutamate (G), pyruvate (P) を加えた状態 (ステート) でのプロトン (H^+) リークを MGP_L, ADP を添加した後のステートでの ADP 依存性酸化リン酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) を MGP_P, cytochrome c を加えた後さらに FCCP で滴定し電子伝達系 (electron transport system, ETS) が最大機能となったステートを MGP_E として、それぞれの酸素消費速度 (O_2 flux) すなわちミトコンドリア呼吸能を測定した。複合体 III 阻害剤である antimycin A を投与しミトコンドリアに關係する酸素消費を停止させた後の値を残存酸素消費速度 (residual oxygen consumption, ROX) として求め減算し補正することでより正確なミトコンドリア呼吸能を評価した (図 6-2-2 (A))。またミトコンドリアの質の指標として、MGP_P の値を MGP_L の値で除した呼吸調節比 (respiratory acceptor control ratio, RCR) を評価した (図 6-2-2 (B))。それぞれのステートにおいて、一元配置分散分析を用いて各投与濃度群の平均値の差を検定し、0 μ mol/L を対照群とした Dunnett 法による多重比較検定

を行ったが、いずれのステートにおいても有意差はなかった。

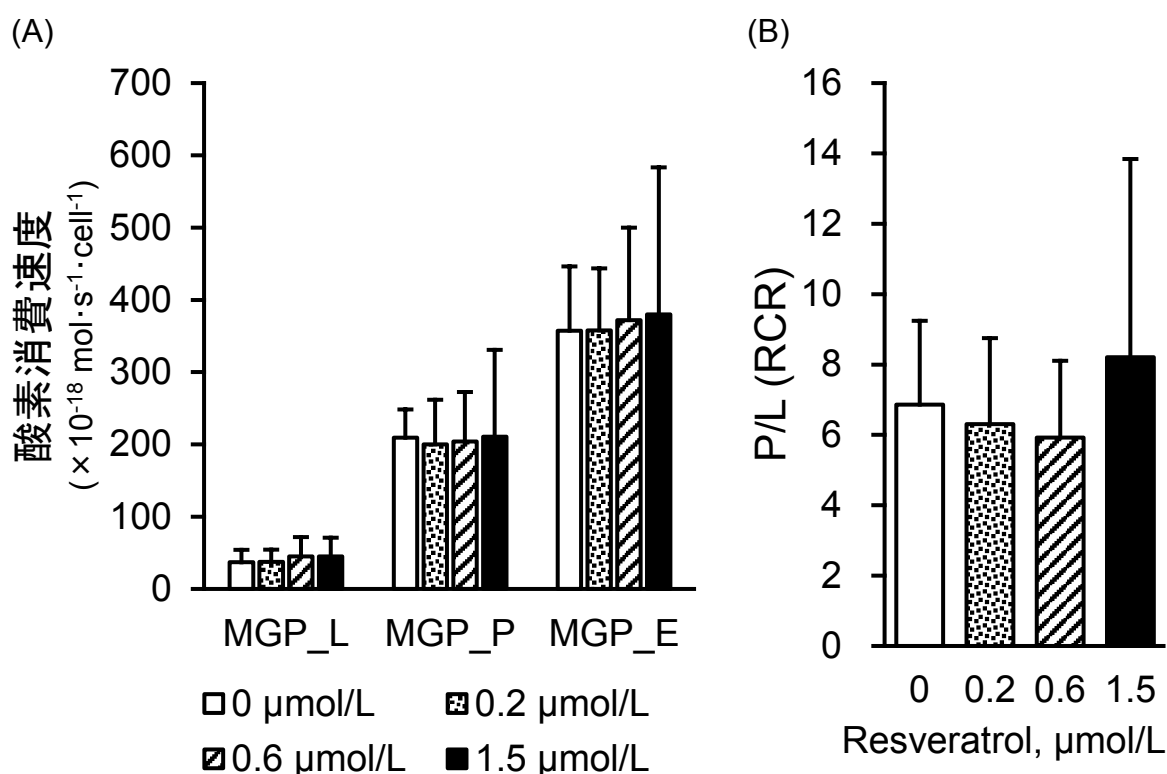


図 6-2-2 Resveratrol 封入ナノカプセルを各濃度投与したときの骨格筋芽細胞 C2C12 ミトコンドリア複合体 I 機能. 封入された resveratrol の投与中における細胞培養液あたりの濃度を 0, 0.2, 0.6, 1.5 $\mu\text{mol/L}$ に群分けし, 各種基質を加えたそれぞれの状態(ステート)MGP_L, MGP_P, MGP_E における酸素消費速度を測定した. (A) 残存酸素消費速度を減算し補正した各ステートおよび各 resveratrol 投与濃度の酸素消費速度. (B) MGP_P を MGP_L で除して求めた呼吸調節比 (RCR). それぞれ平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. 各群 $n = 5$. 各ステートにおいて, 各投与濃度群間の平均値の差の検定を一元配置分散分析で行い, 0 $\mu\text{mol/L}$ を対照群として Dunnett 法による多重比較検定を行ったが, いずれも有意差はなかった. M, malate; G, glutamate; P, pyruvate; L, leak; P, oxidative phosphorylation; E, electron transport system; RCR, respiratory acceptor control ratio.

以上の結果から, resveratrol を β -MEND 内へ封入して骨格筋芽細胞へ投与することで resveratrol による複合体 I 活性化の効果が増強するという仮説について, 立証することができなかった。

6.2.3 β -MEND の骨格筋芽細胞内取込の時間的検証

β -MEND 投与中は培養液を血清がない状態にする必要があるが, 血清がない状態で 6 時間以上経過すると, その後骨格筋芽細胞の接着が不良となり浮遊する, いわゆる

死細胞の状態となり，細胞数が通常より減少する（図 6-2-3）．このように血清フリーの状態が長時間続くと細胞の生理活動に影響を及ぼすことから，先の実験では投与時間を 1 時間とした．しかし投与時間が短いために resveratrol 含有 β -MEND の細胞内への送達が不十分でミトコンドリア複合体 I における効果が検出できなかった可能性が考えられた．そこで，投与に用いる β -MEND がどれくらいの時間で細胞内に到達するのかを，フローサイトメトリーによる細胞内蛍光強度を測定することにより検証した（図 6-2-4）．一元配置分散分析を用いて群間の平均値の差を検定し，Tukey-Kramer の HSD 検定を使ったすべてのペアの比較を行なったところ，すべてのペアにおいて有意差があり，投与時間が長くなるほど β -MEND はより多く細胞内へ取り込まれていた．

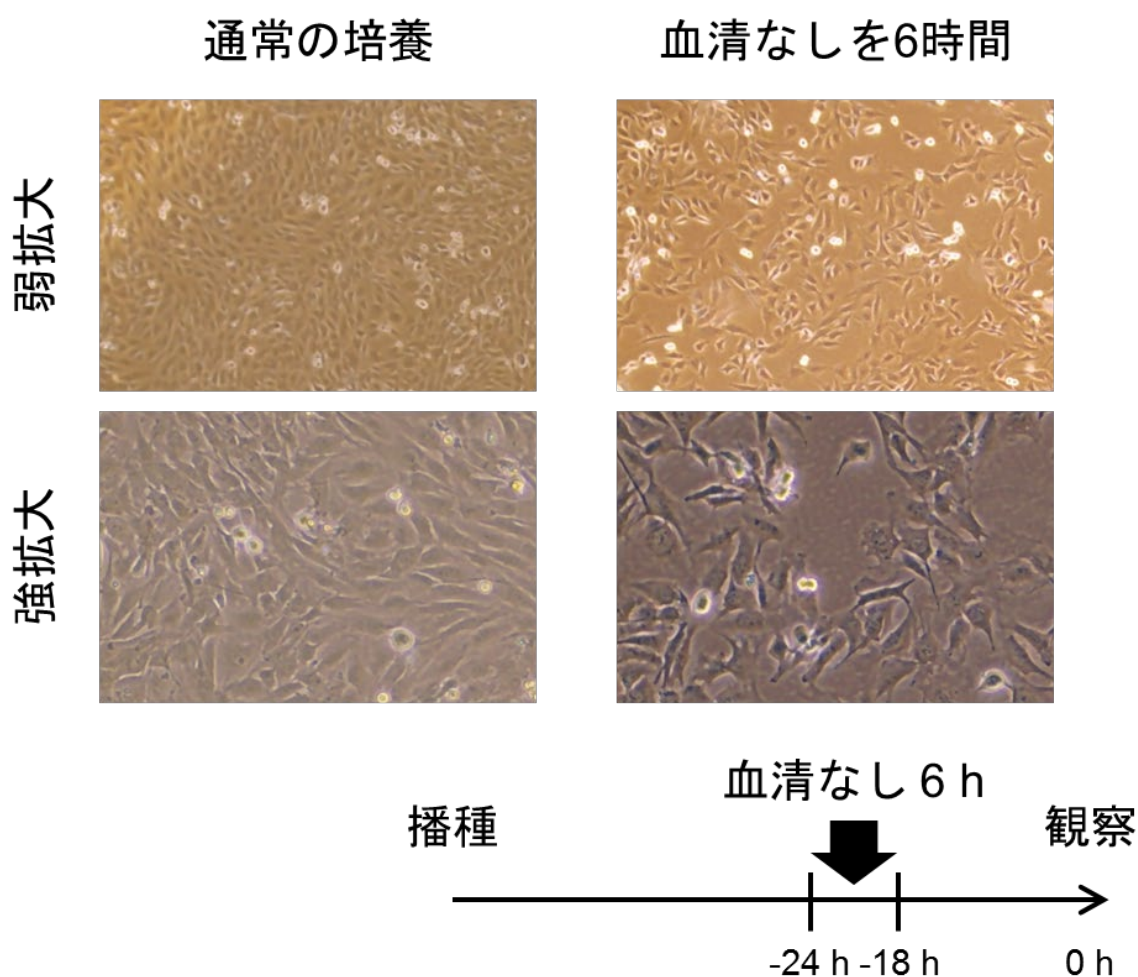


図 6-2-3 血清の有無による骨格筋芽細胞 C2C12 の変化．血清なしの状態を 6 時間はさんだ場合には，通常の培養時と比較して浮遊した細胞が多く（高明度で小さい細胞），通常の細胞の数は少なく疎である．

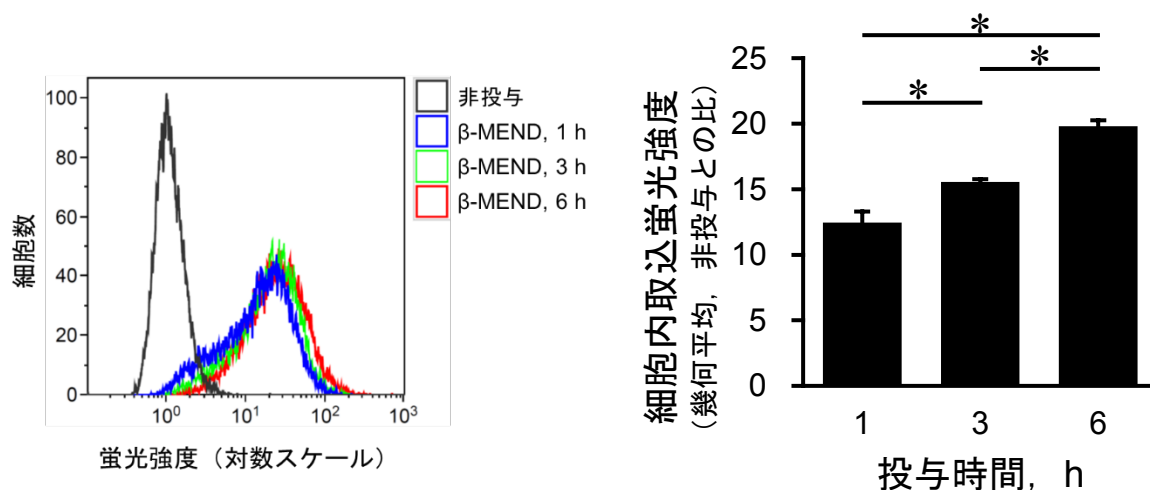
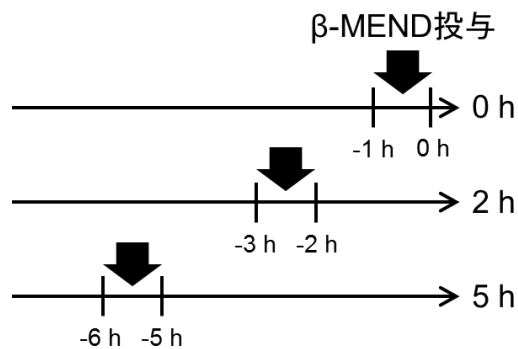


図 6-2-4 β -MEND の投与時間と細胞内取込能の関係. 蛍光標識した β -MEND を骨格筋芽細胞 C2C12 へ 1, 3, 6 時間投与した後, それぞれの細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定し, 幾何平均の非投与群との比を算出した. 結果は群の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. 各群 $n = 3$. * 群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い, Tukey-Kramer の HSD 検定を用いたすべてのペアの比較を行なった.

次に, β -MEND を 1 時間投与した後の, β -MEND が細胞から外へ排出される程度について, 図 6-2-5 (A) に記載のタイムコースで検証した. それぞれのタイムコースにおける細胞内蛍光強度は図 6-2-5 (B) の通りとなった. 群間の平均値の差についての検定は一元配置分散分析を用いて行い, Tukey-Kramer の HSD 検定を用いたすべてのペアの比較を行なった. β -MEND 投与終了から 2 時間以上経過すると, β -MEND 由来蛍光標識の細胞内からの検出は, 投与直後と比較して有意に減少した. 蛍光標識および resveratrol はいずれも脂溶性で, リポソームを構成する脂質二重膜に一体化して存在することから, リポソーム resveratrol も蛍光標識とともに細胞外へ出ていると推測された.

(A)

実験のタイムコース



(B)

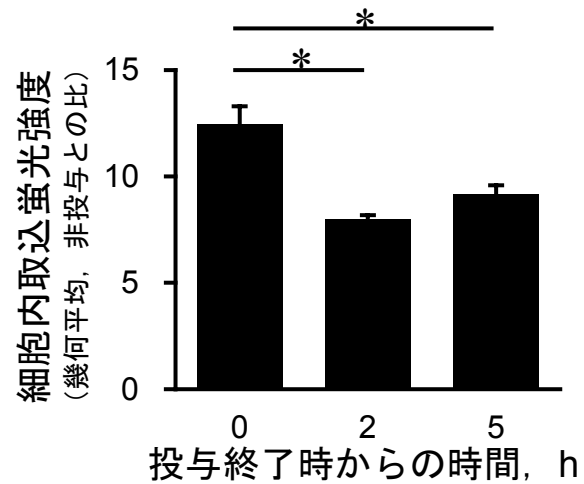


図 6-2-5 β-MEND を骨格筋芽細胞 C2C12 へ 1 時間投与したときの、投与終了時からの時間と細胞内取込の関係. (A) 本実験のタイムコース. β-MEND の投与時間を 1 時間に固定し、投与終了時から細胞回収および測定までの時間を 0, 2, 5 時間の群へ分けた. (B) 投与終了時からの時間と β-MEND の細胞内取込. 骨格筋芽細胞 C2C12 へ取り込まれた蛍光標識 β-MEND の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定し、幾何平均の非投与群との比を算出した. 結果は群の平均値±標準偏差で示した. 各群 $n = 3$. * 群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い, Tukey-Kramer の HSD 検定を用いたすべてのペアの比較を行なった.

6.3 実験 3. 骨格筋芽細胞のミトコンドリア移行性が高い修飾の検討

6.3.1 pDNA 封入ナノカプセルの作製

ミトコンドリアのみで発光蛋白を発現するよう設計した pDNA を, 大腸菌を用いて大量精製した. 吸光度による濃度測定結果から 0.5 mg/mL に希釈調製した. 得られた pDNA について, 制限酵素処理の上でアガロースゲル電気泳動にて処理後の核酸の分子量を評価した (図 6-3-1). *EcoR* I で 1 か所を切断し線状とした場合, 理論値 5597 bp と同程度の分子量の核酸が検出された. また *Pst* I で 2 か所を切断した場合, 理論値 2958 bp および 2639 bp と同程度の分子量の核酸が検出された. 以上より目的の pDNA が精製されていることを確認した.

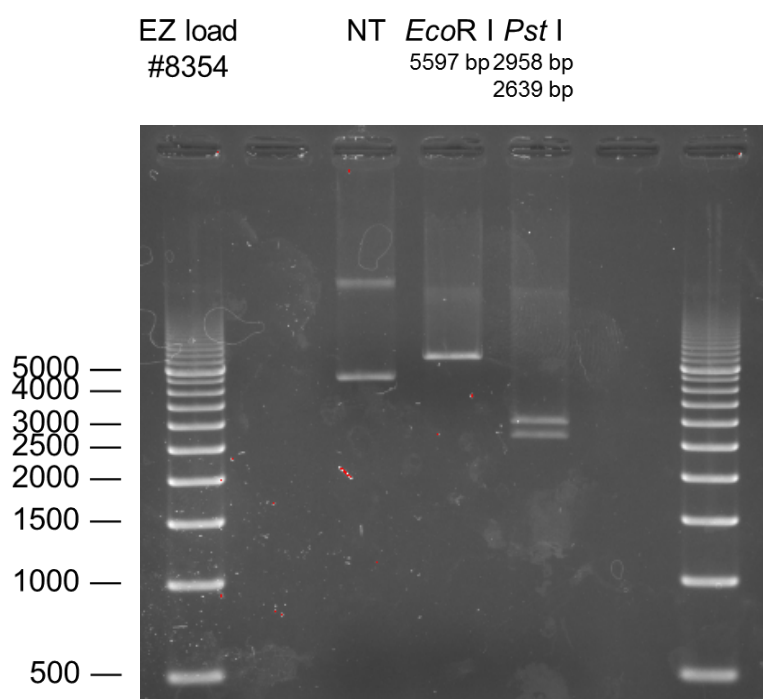


図 6-3-1 アガロースゲル電気泳動. pDNA を制限酵素 *EcoR* I または *Pst* I で処理後, アガロースゲル電気泳動により分子量を測定した. 両端は分子量マーカーEZ load (#8354). NT, non-treat.

上記で得られた pDNA をリポソーム内へ封入した. 封入にあたって, 負の電荷を帯び反発しあう pDNA を小さく凝集するため, 正電荷の protamine を適切な割合で pDNA に混合し, コア粒子を作製した. 正電荷のリポソーム内に封入されやすいようゼータ電位が負となり, かつ粒径が小さく凝集するような protamine の割合 (N/P 比) を検討した (図 6-3-1). N/P 比 0.6~1.2 で粒径が 90 nm 前後と小さく, またゼータ電位が負

でカチオン性のリポソームへの封入が有利と考えられた。この結果から、N/P 比 0.9 の pDNA コア粒子をリポソームへの封入に用いることとした。

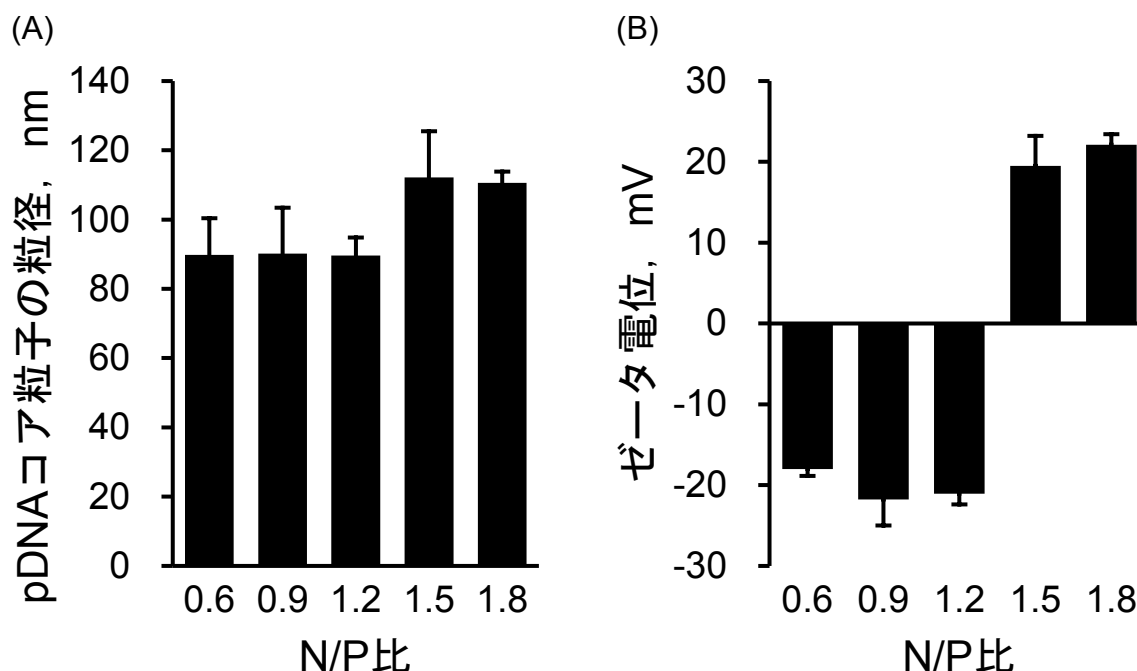


図 6-3-1 pDNA コア粒子の protamine と混合した各 N/P 比と, (A) 粒径, (B) ゼータ電位との関係. それぞれ平均値±標準偏差で示した. 各群 n = 3. N/P, nitrogen/phosphate.

N/P 比 0.9 で凝集させた pDNA コア粒子を各修飾 β -MEND へ封入したときの粒径およびゼータ電位を表 6-3-1 に示す。修飾は、MITO-Porter への修飾によってミトコンドリア移行性が高まる KALA ペプチド、ミトコンドリア指向性を有する S2 ペプチド、ミトコンドリアへ特異的に結合する RP アプタマーの 3 種類を用いた。pDNA コア粒子を封入することにより、後述 (表 6-3-2) の未封入時と比較し粒径が大きくばらつきも大きくなった。

表 6-3-1 pDNA を封入した各修飾 β -MEND の物性

リポソームの種類	修飾の種類	粒径, nm	ゼータ電位, mV
pDNA core (N/P 0.9)		84.0 ± 4.6	-19.0 ± 4.1
1 β -MEND	(unmodified)	328.8 ± 80.1	+47.5 ± 2.0
2 KALA- β -MEND	10 mol% KALA peptide	294.2 ± 59.5	+49.7 ± 4.8
3 S2- β -MEND	10 mol% S2 peptide	312.5 ± 59.6	+52.2 ± 5.7
4 RP- β -MEND	2.5 mol% RP aptamer	240.3 ± 30.5	+49.4 ± 1.7

β -MEND は脂質組成 DC-Chol/EPC/SM (モル比 3:4:3) のリポソームの呼称である。pDNA コア粒子は N/P 比 0.9 で作製した。値は平均値±標準偏差。n = 3-4。

6.3.2 ルシフェラーゼアッセイ法によるミトコンドリア移行性測定

本実験で用いた pDNA は、核では終止コドンとなり発現せずミトコンドリアのみで本来の発光蛋白を発現するよう点変異を導入し設計している。発光蛋白から生じる発光量を測定することで、ナノカプセルによってミトコンドリアへ送達された pDNA の量、すなわちナノカプセルのミトコンドリア移行性が評価できる。KALA ペプチド、S2 ペプチド、RP アプタマーそれぞれで修飾した pDNA 封入 β -MEND のほか、無修飾の β -MEND、pDNA 単独、pDNA と protamine を凝集させたコア粒子についても投与しミトコンドリア移行性を比較した。投与に際して pDNA 換算濃度 4, 6, 10 $\mu\text{g/mL}$ となるように骨格筋芽細胞 C2C12 へ投与した。結果を図 6-3-2 に示す。ばらつきが大きいものの、KALA 修飾 β -MEND においてミトコンドリア移行性が高い傾向があり、また投与した pDNA の濃度が高いとミトコンドリア移行性も高くなる傾向がみられた。pDNA 濃度 6 $\mu\text{g/mL}$ でおおよそ頭打ちとなっていることから、6 $\mu\text{g/mL}$ の場合のみで検証することとした。比較の対照群は封入や凝集によるコア粒子形成をしていない pDNA 単独の群とし、無修飾および各修飾 β -MEND とミトコンドリア移行性について比較検定したところ、KALA 修飾 β -MEND のみが有意に高いミトコンドリア移行性を有していた (図 6-3-3)。

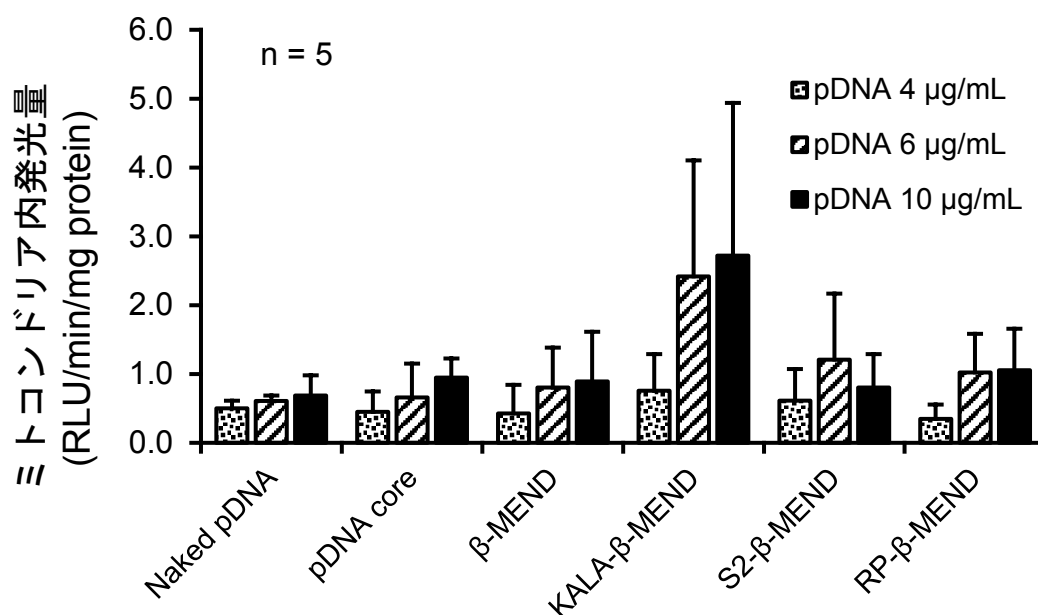


図 6-3-2 骨格筋芽細胞 C2C12 における pDNA, pDNA コア粒子および各修飾 β -MEND の投与濃度別ミトコンドリア内発光量。ミトコンドリアでのみ発光蛋白が発現する pDNA を各修飾 β -MEND に封入し、pDNA 換算濃度 4, 6, 10 $\mu\text{g/mL}$ となるよう骨格筋芽細胞 C2C12 へ投与し、ルシフェラーゼアッセイ法により発光量を測定することで各種 β -MEND のミトコンドリア移行性を評価した。pDNA は protamine と nitrogen/phosphate (N/P) 比 0.9 で凝集させ β -MEND へ封入した。 β -MEND は脂質組成 DC-Chol/EPC/SM (モル比 3:4:3) のリポソームの呼称。平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。各群 n = 5。

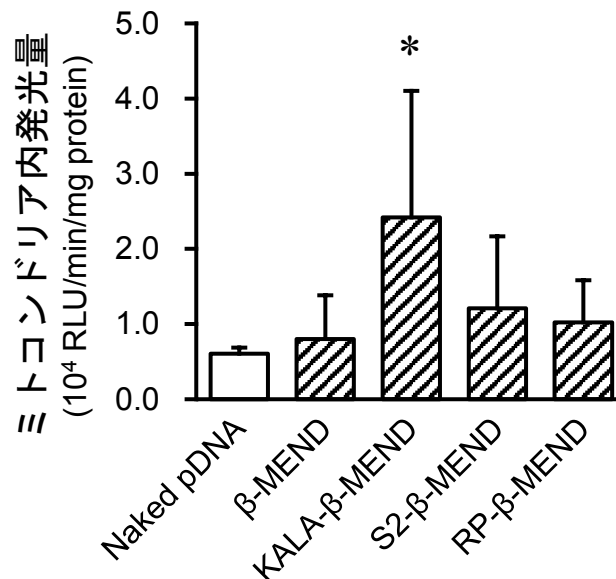


図 6-3-3 骨格筋芽細胞 C2C12 における pDNA 単独および各修飾 β-MEND のミトコンドリア内発光量(図 6-3-2 の一部条件のみを抽出し再掲). pDNA 6 μg/mL の結果のみを抽出し, naked pDNA を対照群として各修飾 β-MEND を比較した. 結果は群の平均値±標準偏差で示した. 各群 n = 5. * 群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い, naked pDNA 群を対照群として Dunnett 法による多重比較検定を行った.

6.3.3 細胞内取込能評価

前項では各種ペプチドおよびアプタマーで修飾した β-MEND のミトコンドリア移行性を比較したが, ミトコンドリア移行性が細胞取込能と相関するかは不明のため, 細胞内取込能についてもフローサイトメトリーを用いて検証した.

前項で用いた各種ペプチドおよびアプタマーで修飾し, pDNA は封入していない β-MEND の粒径およびゼータ電位を表 6-3-2 に示す.

表 6-3-2 各修飾 β-MEND の物性(pDNA 未封入)

リポソームの種類	修飾の種類	粒径, nm	ゼータ電位, mV
1 β-MEND	(unmodified)	104.5 ± 2.0	+47.6 ± 9.3
2 KALA-β-MEND	10 mol% KALA peptide	106.3 ± 1.8	+53.0 ± 2.5
3 S2-β-MEND	10 mol% S2 peptide	104.2 ± 4.5	+53.5 ± 3.2
4 RP-β-MEND	2.5 mol% RP aptamer	120.4 ± 7.4	-51.8 ± 3.2

β-MEND は脂質組成 DC-Chol/EPC/SM(モル比 3:4:3)のリポソームの呼称である. 値は平均値±標準偏差. n = 5.

次にフローサイトメトリーを用いて骨格筋芽細胞 C2C12 における細胞内取込能を評価した。結果を図 6-3-4 に示す。非修飾 β -MEND と比較し、KALA, S2, RP のいずれの修飾においても細胞内取込能は低下した。特に RP 修飾 β -MEND においては細胞内への取込がほとんどなかった。

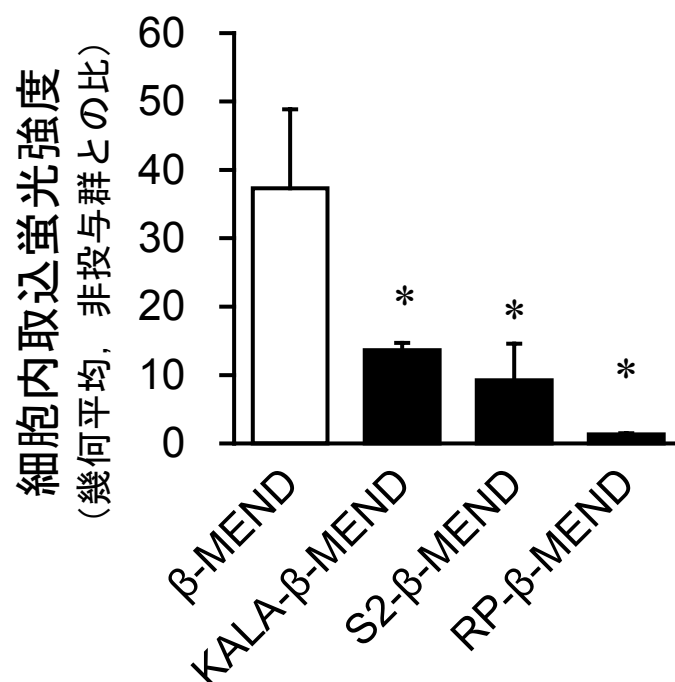


図 6-3-4 各修飾 β -MEND における骨格筋芽細胞への細胞内取込能。非修飾, KALA 修飾, S2 修飾, RP 修飾それぞれの β -MEND へ蛍光標識し骨格筋芽細胞 C2C12 へ 1 時間投与した後, 細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定し, 幾何平均の非投与群との比を算出した。結果は群の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。各群 $n = 5$ 。* 群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い, β -MEND 群を対照群として Dunnett 法による多重比較検定を行った。

6.3.4 共焦点レーザー走査型顕微鏡による細胞内動態観察

リポソームのミトコンドリアへの移行を画像的にも評価するため, 画像分解能が高くミトコンドリアへの局在が評価できる共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて蛍光標識リポソームの細胞内動態を観察した。リポソームの蛍光標識について, フローサイトメトリーで使用した蛍光 NBD は共焦点レーザー走査型顕微鏡での観察においては褪色が問題となるため, 褪色しにくい蛍光標識 DiO を用いた。リポソームは非修飾, KALA 修飾, S2 修飾, RP 修飾の β -MEND および DOPE/SM-LP を用い比較した。結果を図 6-3-5 に示す。(A) β -MEND はフローサイトメトリーで評価した細胞内取込

能が高かったが，共焦点レーザー走査型顕微鏡においても細胞内へ多数の β -MEND（緑色）が確認され，結果が一致した．(B) KALA- β -MEND は細胞内取込能が低く細胞内に観察されるのも少数のみであったが，ミトコンドリア（赤色）と共局在し黄色を示す箇所が複数みられ（矢印），ルシフェラーゼアッセイ法で評価した高いミトコンドリア移行性と一致する結果であった．(C) S2- β -MEND および (D) RP- β -MEND は細胞内にほとんど確認されず，ミトコンドリアとの共局在を示す黄色の箇所もないことから，細胞内取込能，ミトコンドリア移行性ともに低い所見であり，これらもフローサイトメトリーおよびルシフェラーゼアッセイ法での結果と一致した．図 6-3-6 で蛍光強度のプロファイルでは，緑の線が表す KALA- β -MEND からの蛍光強度と赤の線が示すミトコンドリアからの蛍光強度が同一部位で高く，KALA- β -MEND がミトコンドリアに共局在していることが確認された．

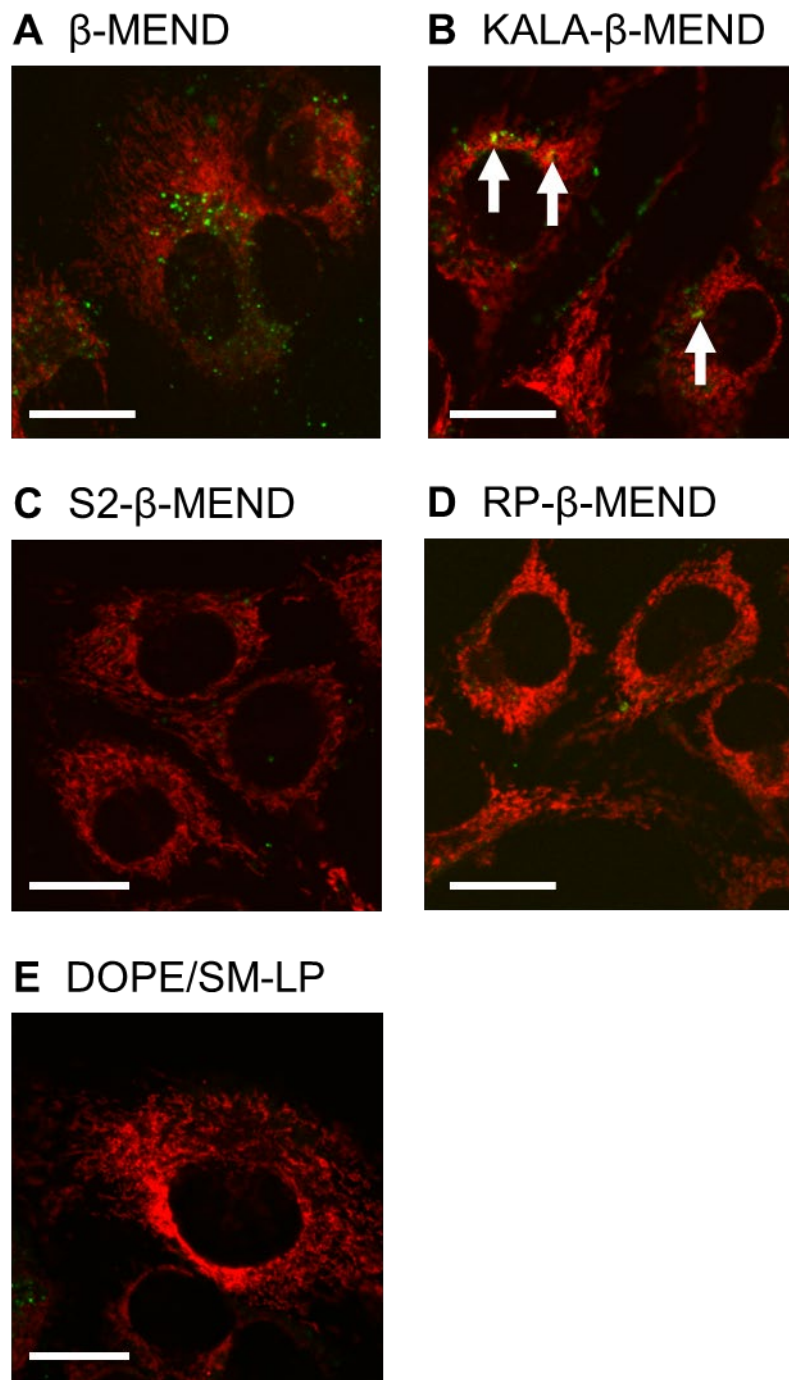


図 6-3-5 各修飾 β -MEND および DOPE/SM-LP の骨格筋芽細胞内動態.
 β -MEND (A), KALA- β -MEND (B), S2- β -MEND (C), RP- β -MEND (D) および DOPE/SM-LP (E) へ蛍光 DiO を標識し, 骨格筋芽細胞 C2C12 へ 1 時間投与した後, 2 時間後に共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した. 赤はミトコンドリア (MitoTracker Red FM), 緑はリポソーム (DiO) を示す. 矢印が示す黄色の部分は KALA- β -MEND がミトコンドリアへ局在していることを示す. バーは 20 μ m.

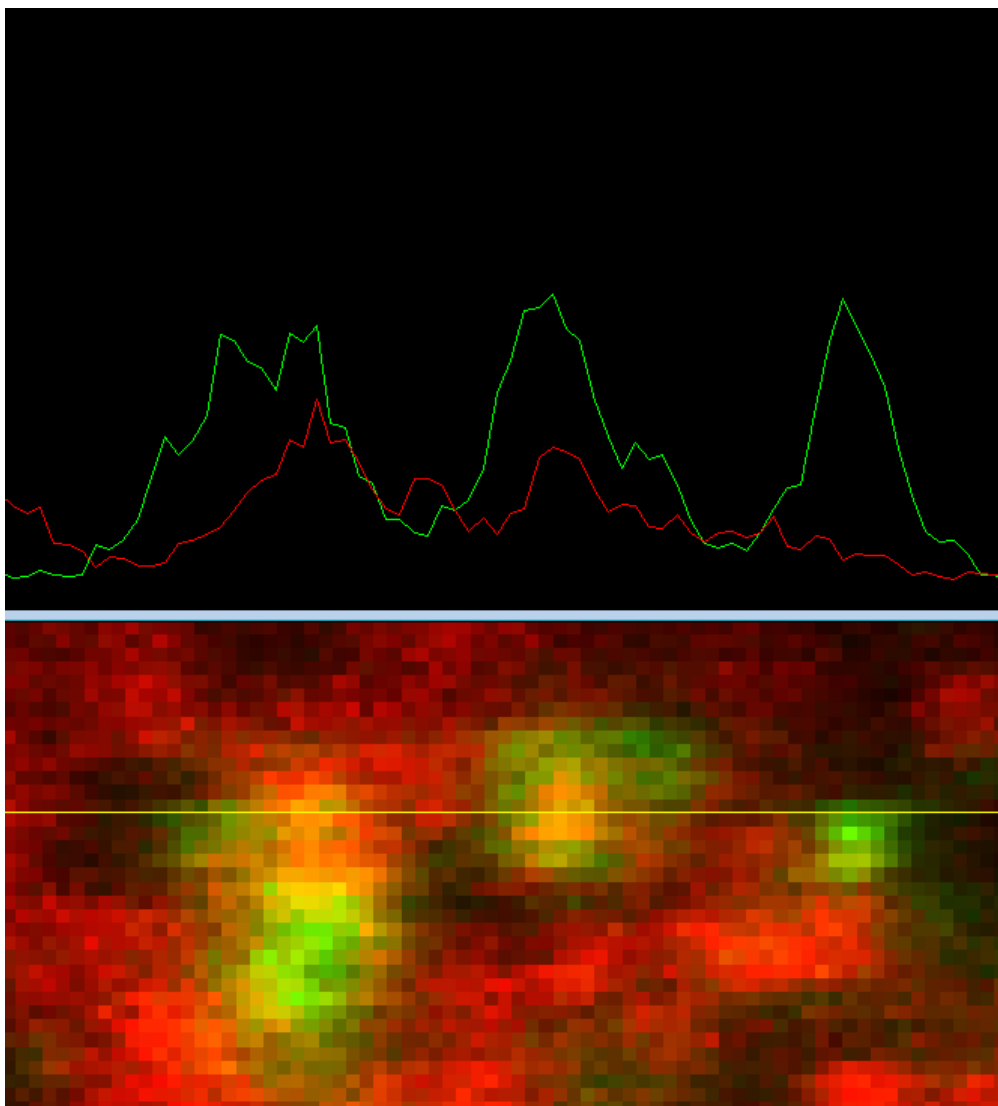


図 6-3-6 図 6-3-5 (B) の拡大図とその黄色線上の簡易的な蛍光強度プロファイル. 下図において赤はミトコンドリア (MitoTracker Red FM), 緑は KALA- β -MEND (DiO) を示す. 黄色の線上における蛍光強度のプロファイルを上を示す.

7. 考察

7.1 実験 1. 骨格筋芽細胞内取込能が高いカチオン脂質の検討

実験 1 で骨格筋芽細胞への細胞内取込能が高い脂質組成を明らかにする目的を達成でき、その後のミトコンドリア移行性が高いナノカプセルの開発につながる成果が得られた。

本実験で平均の細胞内取込能が最も高かった脂質組成「 β -MEND」は、すでにマウス膵 β 細胞由来培養細胞 MIN6 でも細胞内取込能が高いことが報告されている (Yamada et al., 2014). 一方で MITO-Porter は細胞の種類によって、細胞内取込能が異なることが報告されている (Ishikawa et al., 2018; Yamada et al., 2014). 細胞の種類によってリポソームの細胞内取込能が異なる理由は明らかではない。MITO-Porter が細胞内へ取り込まれる機序は、MITO-Porter を修飾する R8 の研究からマクロピノサイトーシスが主体であることが明らかになっているが (Khalil et al., 2006), R8 を含まない β -MEND などのリポソームにおいてもその細胞内へ取り込まれる機序を確認し、また細胞種ごとに検証することで、細胞の種類と脂質組成との関係も明らかになると考えられる。

7.2 実験 2. Resveratrol 投与とミトコンドリア機能の検討

実験 2 にあたっては、resveratrol を β -MEND 内へ封入して骨格筋芽細胞へ投与することで resveratrol によるミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I 活性化の効果が増強するという仮説を立て、検証したが、resveratrol の効果を確認することができなかった。

7.2.1 投与条件の最適化

効果を検出できない理由として、投与時間が足りない可能性が考えられた。Resveratrol が単独投与された場合の C2C12 骨格筋芽細胞内へ到達するまでの時間は、先行研究で 30 分程度であることが明らかになっている (Kaminski et al., 2012). ただし本実験では resveratrol を β -MEND に封入して細胞へ投与しているため、 β -MEND がエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれるまでの時間が不明である。そこで図 6-2-4 のように投与時間と細胞内取込との関係について検証した。投与時間が長くなるほど細胞内へ取り込まれる β -MEND の量は増えことが明らかになった。一方で投与中は血清がない状態とすることにより図 6-2-3 が示すような細胞傷害をもたらす

てしまう。

投与から細胞内取込までの時間、および細胞内へ取り込まれてからミトコンドリアへ到達し複合体 I へ作用して活性化させるまでの時間を確保するため、投与している時間自体を 1 時間に固定し、細胞回収および複合体 I 活性の測定までの時間を設ける方法を考えた。1 時間投与した後、ミトコンドリアへ作用するまで待つ間に resveratrol を含む β -MEND が逆に細胞外へ排出されてしまう可能性があるため、図 6-2-5 に示すように投与後からの時間と細胞内に残存する resveratrol 含有 β -MEND の量の関係について検証した。投与直後と比較し投与終了 2 時間後の時点で細胞内の β -MEND は有意に低下していた。以上のように、細胞内へ取り込まれるまでに必要な時間、投与終了からしばらくすると細胞内へ取り込まれた β -MEND の一部が細胞外へ排出されてしまう点、および無血清による細胞への影響を考慮しながら、resveratrol による複合体 I への効果が検出できる最適な投与時間および活性測定のタイミングの検証を今後予定している。

Resveratrol の投与濃度についても検討が必要である。過去の報告では、細胞へ投与する resveratrol の濃度は 1~50 $\mu\text{mol/L}$ と幅広い (Desquiret-Dumas et al., 2013; Lagouge et al., 2006; Price et al., 2012)。このうち 1 $\mu\text{mol/L}$ 投与時に複合体 I が活性化したという報告を根拠に、細胞内取込能が高い β -MEND へ搭載することでより低濃度の投与でも効果を発揮すると推測し、本実験では投与濃度を 0.2, 0.6, 1.5 $\mu\text{mol/L}$ の 3 通りで設定して検証した (Desquiret-Dumas et al., 2013)。しかし高濃度にすればするほど効果が現れやすいというわけではなく、高濃度になると resveratrol の作用効果が変化するという報告もある (Price et al., 2012)。 β -MEND による送達を用いた場合、どの程度の投与濃度に相当するかは推測できないことから、 β -MEND の場合における resveratrol 投与濃度と効果との関係について検証が必要である。

本実験では骨格筋芽細胞への細胞内取込能が高い β -MEND を用いた。しかし実験 3 においては、 β -MEND のミトコンドリア移行性は高くなく、KALA 修飾によってミトコンドリア移行性が向上することが明らかになった。今後は KALA 修飾 β -MEND を用いて resveratrol を送達し resveratrol の効果を検出する予定である。

7.2.2 Resveratrol の作用点

Resveratrol はミトコンドリア複合体 I を直接活性化すると報告されているが (Desquiret-Dumas et al., 2013)、それをその後検証した報告はない。また resveratrol は sirtuin 1 蛋白の活性化を介して AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化や NAD^+ 上昇をもたらすと報告されており (Price et al., 2012)、ミトコンドリア外での resveratrol による作用効果が間接的にミトコンドリア内の複合体 I を活性化させている可能性もある。Resveratrol の効果の検証にあたっては、本実験で用いたミトコンドリア呼吸能

の直接的な測定による評価方法だけでなく、古典的に NAD^+/NADH 比の吸光度変化から求めた複合体 I 活性測定、あるいは NAD^+ 依存性脱アセチル化酵素である sirtuin 1 の免疫沈降法またはイムノブロット法による測定を用いた方が検出しやすい可能性がある。

Resveratrol が作用するのはミトコンドリア内のみではない。特に高濃度の resveratrol においては、AMPK や PGC-1 α へ作用することで間接的にミトコンドリア機能へ影響を及ぼしていると報告されている (Price et al., 2012)。したがって、ミトコンドリア内へ送達されなかった resveratrol がミトコンドリア内に送達された場合と同様に複合体 I を活性化させるのであれば、ナノカプセルに搭載してミトコンドリアへ送達する意義が失われてしまう。実験 3 で用いた pDNA のように、ミトコンドリア内へ送達されることで初めて効果が現れる物質を用いた方が、本研究のミトコンドリア指向性ナノカプセルの特性を生かすことができる。ミトコンドリア内膜上にある複合体 I を直接活性化させる NAD^+ 、ミトコンドリア遺伝子から発現しミトコンドリア内膜で複合体を構成する蛋白、ミトコンドリア遺伝子それ自体など、ミトコンドリア内で働く物質が送達候補としてあげられる。今後これらの候補についてリポソーム内への封入や細胞レベル・動物レベルでの投与、投与による効果の検出などの実験を計画していく。

7.3 実験 3. 骨格筋芽細胞のミトコンドリア移行性が高い修飾の検討

実験 3 では、骨格筋芽細胞のミトコンドリアへ最も効率的に移行するナノカプセルを明らかにする目的を達成することができた。また細胞内動態についても検証することができた。

7.3.1 ルシフェラーゼアッセイ法による検証

ミトコンドリア移行性の検証においては、ミトコンドリア内でのコドンが核内と異なることを利用し、核内では発光蛋白が発現せずミトコンドリア内でのみ転写され発光蛋白が発現する外来 pDNA を送達することで、ミトコンドリアへの核酸送達を示した。一か所の終止コドンの存在のみでは、終止コドンの読み飛ばしを生じて蛋白発現してしまう可能性も考えられる (Keeling et al., 2014)。過去の研究では、終止コドン 3 つ配置し読み飛ばしによる意図しない発現を防ぐ工夫をした pDNA でも検証したところ、終止コドン 1 つの pDNA と比較し同程度に発現が低い結果であったことが示されている (Yamada et al., 2017)。本実験においては上記のような配列の pDNA を用意しておらず検証できなかったが、今後検討する。

7.3.2 共焦点レーザー走査型顕微鏡による検証

ミトコンドリア移行を確認するもう一つの方法として、共焦点レーザー走査型顕微鏡による検証を行った。共焦点レーザー走査型顕微鏡は、点光源（レーザー光）、試料、像位置のすべてが共役位置にある共焦点光学系を特徴とし、焦点位置以外の光は観察時に除かれるため、深さ方向（Z 方向）への分解能も保たれる。しかし、一般的な共焦点レーザー走査型顕微鏡の能力として、水平方向の分解能が 200 nm 前後であるのに比較すると、深さ方向の分解能は 500~700 nm 程度と低い。ミトコンドリアの直径が 500 nm 程度であり本研究で用いたナノカプセルの直径が 100 nm 前後であることを考えると、水平方向への共局在は確認できても、それが深さ方向、つまりミトコンドリアの上や下ではなく中にナノカプセルがある可能性については十分立証できていない可能性がある。本研究に際して超解像顕微鏡（誘導放出制御, STED）による観察も試してみたが、撮像に必要な励起光が強くミトコンドリア染色試薬が著明に褪色するため、観察は困難であった。共焦点レーザー走査型顕微鏡が生細胞を観察できるという利点を生かし、現在はナノカプセルがミトコンドリア内へとどまる時間やミトコンドリア内外への出入りの頻度について画像的および時間的に検証中である。

7.3.3 KALA 修飾の特徴

本実験では KALA ペプチドを修飾した β -MEND が最もミトコンドリア移行性を有する結果となった。KALA ペプチドは酸性条件で構造変化により膜傷害性を高めることから、KALA ペプチド修飾ナノカプセルは細胞膜を介してエンドソームとして細胞内へ取り込まれたのちにそのエンドソームを傷害し、エンドソーム内から細胞質内へ脱出すると考えられる (Shaheen et al., 2011; Wan et al., 2016)。

R8 が修飾された MITO-Porter は、さらに KALA を修飾することで HeLa 細胞におけるミトコンドリア移行性が高くなることが報告されているが (Yamada et al., 2017), ヒト皮膚由来線維芽細胞においては MITO-Porter に KALA および RP アプタマーの両方を修飾すると細胞内取込能およびミトコンドリア移行性が著明に上昇することが報告されている (Ishikawa et al., 2018)。本実験では β -MEND に対し単一の修飾のみで検討したが、 β -MEND に対しても KALA と RP アプタマーのペアをはじめ複数の修飾の組み合わせにより細胞内取込能やミトコンドリア移行性の改善の有無を検証する予定である。

7.4 臨床応用における課題

臨床応用にあたっては細胞内および臓器における送達特異性の問題がある。

本研究でミトコンドリア移行性を高めることが示された KALA ペプチドは、膜貫通性を有することによりミトコンドリア移行性を発揮していると考えられるが、一方でその膜貫通性から細胞への毒性も無視できない。細胞に投与された MITO-Porter のうち細胞内へ取り込まれるのが 28%、さらにミトコンドリア内まで送達されるのは 22%程度と報告されている (Yamada et al., 2016)。ミトコンドリアに到達せず細胞内にとどまったナノカプセルおよびそれに搭載された薬物が、細胞へどのような影響を及ぼすか、あらかじめ検証しておく必要がある。

また骨格筋を標的として動物へ静脈注射などの方法で投与した場合においても、ある程度の割合で骨格筋以外へ分布すると考えられる。静脈注射時の血中滞留性を維持するため、また骨格筋への選択性を高めるために、ナノカプセルへのさらなる修飾や、リポソーム構造の多重化といった工夫を施し検証していく必要がある。

8. 結論

8.1.1 本研究全体から得られた新知見

- ・ 脂質組成 R8/DOPE/SM のリポソーム「R8-MITO-Porter」、脂質組成 DC-Chol/EPC/SM のリポソーム「 β -MEND」、および脂質組成 DDAB/EPC/SM のリポソームは、脂質組成 DOPE/SM のリポソームと比較し、骨格筋芽細胞 C2C12 への細胞内取込能が有意に高かった。
- ・ pDNA 封入 KALA 修飾 β -MEND は、pDNA 単独と比較し、骨格筋芽細胞 C2C12 のミトコンドリアへの pDNA 送達能が有意に高かった。

8.1.2 新知見の意義

骨格筋芽細胞においてミトコンドリア内へリポソームを用いて効率が高い核酸送達を実証した報告は初めてである。

各脂質組成のリポソームの細胞内へ取り込まれる性質は細胞の種類によって異なり、結果としてミトコンドリアへの移行性や送達能も細胞種によって異なる。これまでは子宮頸癌由来培養細胞 HeLa やマウス膵 β 細胞由来培養細胞 MIN6 など限られた種類の細胞で検証されてきた。本研究はミトコンドリア異常が臨床的に問題となっている骨格筋を標的とした検証であり、送達物質の制限が少ないリポソームによる骨格筋細胞ミトコンドリアへの物質送達実績は今後の臨床応用へ直結する。

8.1.3 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

心疾患によって骨格筋ミトコンドリア機能が低下した動物モデルへ治療薬物や正常遺伝子等を搭載したナノカプセルを筋肉注射または静脈注射することにより、運動耐容能や予後を改善させる研究へ展開していく。また将来はヒトへ応用していく。

8.1.4 今後の課題

細胞の種類によってリポソームの細胞内取込能が異なる理由は明らかではない。骨格筋以外の細胞も含めて細胞内へ取り込まれるエンドサイトーシスの機序を確認することで、細胞の種類と脂質組成との関係も明らかになると考えられる。

実験 2 の resveratrol 投与によるミトコンドリア機能検討の実験において、骨格筋芽細胞への細胞内取込能が高い β -MEND を用いたが、実験 3 の結果に基づきミトコンドリア移行性がより高い KALA 修飾 β -MEND を用いて resveratrol を送達し、resveratrol

の効果を検証する必要がある。

ミトコンドリア機能を改善させうる候補物質として、本研究で用いた **resveratrol** 以外の、ミトコンドリア遺伝子から発現しミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する蛋白やミトコンドリア遺伝子それ自体についても、ナノカプセルへ封入しミトコンドリア送達および機能改善について検証していく。

本研究はマウス骨格筋由来の培養細胞である骨格筋芽細胞を研究対象としたが、今後の臨床応用に向けて、細胞レベルではなく動物における骨格筋組織を対象とした研究へ進展させる。

9. 謝辞

北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 安斉俊久教授に感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり 2016 年まで多くのご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 筒井裕之前教授に感謝申し上げます。博士課程での研究全般に渡り多くのご指導を賜りました絹川真太郎講師に深く感謝申し上げます。本研究の遂行および基礎論文作成にあたり多大なるご指導とご助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学教室 山田勇磨准教授に深く感謝申し上げます。

本研究にあたり日頃より多くのご指導とご助力をいただきました北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室の横田卓特任助教，福島新助教，高田真吾博士，齋藤晶理博士，水島航博士，降旗高明博士，津田正哉博士，松本純一博士，中島孝之博士，白川亮介学士，前川聡学士，南部秀雄学士，尾畑嘉一学士，山梨克真学士，角谷尚哉修士，仲野一平学士，阿部隆宏様，教室の皆様に感謝申し上げます。

本研究にあたりご支援やご助力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 原島秀吉教授に深く感謝申し上げます。本研究において有益なるご助言とご助力をいただ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 河村恵理子博士，阿部二郎博士，福田豊修士，Laila Burger 修士，石川卓哉修士，宗近玲那修士，大工原伸之輔学士，藤下直樹様，石丸拓也学士，宗宮加奈学士，Satrialdi 修士，佐々木大輔学士，丸山美奈子様，日比野光恵学士に感謝申し上げます。

本論文作成にあたりご多忙の中ご助言賜りました審査員の先生方に深く感謝申し上げます。

本研究の実験遂行にあたり多大なご助力をいただきました循環病態内科学教室実験助手の山根美和子様，木村友紀様，池田則子様，小川ちひろ様，また秘書室の皆様に深く感謝申し上げます。

これまでご支援いただいた両親，智史，勝史に感謝いたします。そしてこの研究生生活をあらゆる面で支えてくれた妻と 2 人の子に心より感謝いたします。

10. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない.

11. 引用文献

- Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Kumar, M., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, A.P., et al. (2014). Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J.* 33, 994-1010.
- Bacman, S.R., Kauppila, J.H.K., Pereira, C.V., Nissanka, N., Miranda, M., Pinto, M., Williams, S.L., Larsson, N.G., Stewart, J.B., and Moraes, C.T. (2018). MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA(Ala) levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nat. Med.*
- Bayona-Bafaluy, M.P., Blits, B., Battersby, B.J., Shoubridge, E.A., and Moraes, C.T. (2005). Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14392-14397.
- Castano, A.P., Demidova, T.N., and Hamblin, M.R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1, 279-293.
- Covington, J.D., Tam, C.S., Bajpeyi, S., Galgani, J.E., Noland, R.C., Smith, S.R., Redman, L.M., and Ravussin, E. (2016). Myokine expression in muscle and myotubes in response to exercise stimulation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 48, 384-390.
- Creelan, B.C., Gabrilovich, D.I., Gray, J.E., Williams, C.C., Tanvetyanon, T., Haura, E.B., Weber, J.S., Gibney, G.T., Markowitz, J., Proksch, J.W., et al. (2017). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral omaveloxolone (RTA 408), a synthetic triterpenoid, in a first-in-human trial of patients with advanced solid tumors. *Onco Targets Ther.* 10, 4239-4250.
- Crowell, J.A., Korytko, P.J., Morrissey, R.L., Booth, T.D., and Levine, B.S. (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol. Sci.* 82, 614-619.
- Desquiret-Dumas, V., Gueguen, N., Leman, G., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Chupin, S., Chevrollier, A., Vessieres, E., Ayer, A., Ferre, M., et al. (2013). Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. *J. Biol. Chem.* 288, 36662-36675.
- Ehinger, J.K., Piel, S., Ford, R., Karlsson, M., Sjoval, F., Frostner, E.A., Morota, S., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Cornell, C., et al. (2016). Cell-permeable succinate prodrugs bypass mitochondrial complex I deficiency. *Nat. Commun.* 7, 12317.
- Flierl, A., Jackson, C., Cottrell, B., Murdock, D., Seibel, P., and Wallace, D.C. (2003). Targeted delivery of DNA to the mitochondrial compartment via import sequence-conjugated peptide nucleic acid. *Mol. Ther.* 7, 550-557.
- Fukushima, A., Kinugawa, S., Takada, S., Matsumoto, J., Furihata, T., Mizushima, W., Tsuda, M., Yokota, T., Matsushima, S., Okita, K., et al. (2016). Direct renin inhibitor ameliorates insulin resistance by improving insulin signaling and oxidative stress in the skeletal muscle from post-infarct heart failure in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 779, 147-156.
- Fukushima, A., Kinugawa, S., Takada, S., Matsushima, S., Sobirin, M.A., Ono, T., Takahashi, M., Suga, T., Homma, T., Masaki, Y., et al. (2014). (Pro)renin receptor in skeletal muscle is involved in the development of insulin resistance associated with postinfarct heart failure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 307, E503-514.
- Gammage, P.A., Viscomi, C., Simard, M.L., Costa, A.S.H., Gaude, E., Powell, C.A., Van Haute,

- L., McCann, B.J., Rebelo-Guiomar, P., Cerutti, R., et al. (2018). Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nat. Med.*
- Horton, K.L., Stewart, K.M., Fonseca, S.B., Guo, Q., and Kelley, S.O. (2008). Mitochondria-penetrating peptides. *Chem. Biol.* 15, 375-382.
- Ishikawa, T., Somiya, K., Munechika, R., Harashima, H., and Yamada, Y. (2018). Mitochondrial transgene expression via an artificial mitochondrial DNA vector in cells from a patient with a mitochondrial disease. *J. Control. Release* 274, 109-117.
- Jauslin, M.L., Meier, T., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2003). Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *FASEB J.* 17, 1972-1974.
- Jo, A., Ham, S., Lee, G.H., Lee, Y.I., Kim, S., Lee, Y.S., Shin, J.H., and Lee, Y. (2015). Efficient mitochondrial genome editing by CRISPR/Cas9. *Biomed Res. Int.* 2015, 305716.
- Kaminski, J., Lancon, A., Aires, V., Limagne, E., Tili, E., Michaille, J.J., and Latruffe, N. (2012). Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1251-1259.
- Katrangi, E., D'Souza, G., Boddapati, S.V., Kulawiec, M., Singh, K.K., Bigger, B., and Weissig, V. (2007). Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human rho0 cells can improve respiratory function. *Rejuvenation Res.* 10, 561-570.
- Kawamura, E., Yamada, Y., Yasuzaki, Y., Hyodo, M., and Harashima, H. (2013). Intracellular observation of nanocarriers modified with a mitochondrial targeting signal peptide. *J. Biosci. Bioeng.* 116, 634-637.
- Keeling, K.M., Xue, X., Gunn, G., and Bedwell, D.M. (2014). Therapeutics based on stop codon readthrough. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 15, 371-394.
- Khalil, I.A., Kogure, K., Futaki, S., and Harashima, H. (2006). High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 3544-3551.
- Khan, N.A., Auranen, M., Paetau, I., Pirinen, E., Euro, L., Forsstrom, S., Pasila, L., Velagapudi, V., Carroll, C.J., Auwerx, J., et al. (2014). Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Mol. Med.* 6, 721-731.
- Klopstock, T., Yu-Wai-Man, P., Dimitriadis, K., Rouleau, J., Heck, S., Bailie, M., Atawan, A., Chattopadhyay, S., Schubert, M., Garip, A., et al. (2011). A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 134, 2677-2686.
- Knowles, J.K. (1974). An improved microinjection technique in *Paramecium aurelia*. Transfer of mitochondria conferring erythromycin-resistance. *Exp. Cell Res.* 88, 79-87.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., et al. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127, 1109-1122.
- Li, X., Zhang, Y., Yeung, S.C., Liang, Y., Liang, X., Ding, Y., Ip, M.S., Tse, H.F., Mak, J.C., and Lian, Q. (2014). Mitochondrial transfer of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells to airway epithelial cells attenuates cigarette smoke-induced damage. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51, 455-465.
- Mahata, B., Bhattacharyya, S.N., Mukherjee, S., and Adhya, S. (2005). Correction of translational defects in patient-derived mutant mitochondria by complex-mediated import of a cytoplasmic tRNA. *J. Biol. Chem.* 280, 5141-5144.

- Mahata, B., Mukherjee, S., Mishra, S., Bandyopadhyay, A., and Adhya, S. (2006). Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science* 314, 471-474.
- Makrecka-Kuka, M., Krumschnabel, G., and Gnaiger, E. (2015). High-resolution respirometry for simultaneous measurement of oxygen and hydrogen peroxide fluxes in permeabilized cells, tissue homogenate and isolated mitochondria. *Biomolecules* 5, 1319-1338.
- Mancini, D.M., Eisen, H., Kussmaul, W., Mull, R., Edmunds, L.H., Jr., and Wilson, J.R. (1991). Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* 83, 778-786.
- Marrache, S., and Dhar, S. (2012). Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16288-16293.
- Martinelli, D., Catteruccia, M., Piemonte, F., Pastore, A., Tozzi, G., Dionisi-Vici, C., Pontrelli, G., Corsetti, T., Livadiotti, S., Kheifets, V., et al. (2012). EPI-743 reverses the progression of the pediatric mitochondrial disease--genetically defined Leigh Syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 107, 383-388.
- Masuzawa, A., Black, K.M., Pacak, C.A., Ericsson, M., Barnett, R.J., Drumm, C., Seth, P., Bloch, D.B., Levitsky, S., Cowan, D.B., et al. (2013). Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304, H966-982.
- Matsumoto, J., Takada, S., Kinugawa, S., Furihata, T., Nambu, H., Kakutani, N., Tsuda, M., Fukushima, A., Yokota, T., Tanaka, S., et al. (2018). Brain-derived neurotrophic factor improves limited exercise capacity in mice with heart failure. *Circulation* 138, 2064-2066.
- Minczuk, M., Papworth, M.A., Kolasinska, P., Murphy, M.P., and Klug, A. (2006). Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19689-19694.
- Nishikawa, M., Ishimori, N., Takada, S., Saito, A., Kadoguchi, T., Furihata, T., Fukushima, A., Matsushima, S., Yokota, T., Kinugawa, S., et al. (2015). AST-120 ameliorates lowered exercise capacity and mitochondrial biogenesis in the skeletal muscle from mice with chronic kidney disease via reducing oxidative stress. *Nephrol. Dial. Transplant.* 30, 934-942.
- Ohta, Y., Kinugawa, S., Matsushima, S., Ono, T., Sobirin, M.A., Inoue, N., Yokota, T., Hirabayashi, K., and Tsutsui, H. (2011). Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H1637-1644.
- Okita, K., Kinugawa, S., and Tsutsui, H. (2013). Exercise intolerance in chronic heart failure--skeletal muscle dysfunction and potential therapies. *Circ. J.* 77, 293-300.
- Park, S.J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H., Ke, H., Rehmann, H., Taussig, R., Brown, A.L., et al. (2012). Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* 148, 421-433.
- Piepoli, M.F., Davos, C., Francis, D.P., Coats, A.J., and ExTra, M.C. (2004). Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ* 328, 189.
- Popat, R., Plesner, T., Davies, F., Cook, G., Cook, M., Elliott, P., Jacobson, E., Gumbleton, T., Oakervee, H., and Cavenagh, J. (2013). A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and or refractory multiple myeloma. *Br. J.*

- Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, B.J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J.S., et al. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* 15, 675-690.
- Reddy, P., Ocampo, A., Suzuki, K., Luo, J., Bacman, S.R., Williams, S.L., Sugawara, A., Okamura, D., Tsunekawa, Y., Wu, J., et al. (2015). Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell* 161, 459-469.
- Shaheen, S.M., Akita, H., Nakamura, T., Takayama, S., Futaki, S., Yamashita, A., Katoono, R., Yui, N., and Harashima, H. (2011). KALA-modified multi-layered nanoparticles as gene carriers for MHC class-I mediated antigen presentation for a DNA vaccine. *Biomaterials* 32, 6342-6350.
- Srivastava, S., and Moraes, C.T. (2001). Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 3093-3099.
- Suga, T., Kinugawa, S., Takada, S., Kadoguchi, T., Fukushima, A., Homma, T., Masaki, Y., Furihata, T., Takahashi, M., Sobirin, M.A., et al. (2014). Combination of exercise training and diet restriction normalizes limited exercise capacity and impaired skeletal muscle function in diet-induced diabetic mice. *Endocrinology* 155, 68-80.
- Szeto, H.H., and Schiller, P.W. (2011). Novel therapies targeting inner mitochondrial membrane--from discovery to clinical development. *Pharm. Res.* 28, 2669-2679.
- Takada, S., Hirabayashi, K., Kinugawa, S., Yokota, T., Matsushima, S., Suga, T., Kadoguchi, T., Fukushima, A., Homma, T., Mizushima, W., et al. (2014). Pioglitazone ameliorates the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 690-696.
- Takada, S., Kinugawa, S., Hirabayashi, K., Suga, T., Yokota, T., Takahashi, M., Fukushima, A., Homma, T., Ono, T., Sobirin, M.A., et al. (2013). Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *J. Appl. Physiol.* (1985) 114, 844-857.
- Takada, S., Kinugawa, S., Matsushima, S., Takemoto, D., Furihata, T., Mizushima, W., Fukushima, A., Yokota, T., Ono, Y., Shibata, H., et al. (2015). Sesamin prevents decline in exercise capacity and impairment of skeletal muscle mitochondrial function in mice with high-fat diet-induced diabetes. *Exp. Physiol.* 100, 1319-1330.
- Takada, S., Masaki, Y., Kinugawa, S., Matsumoto, J., Furihata, T., Mizushima, W., Kadoguchi, T., Fukushima, A., Homma, T., Takahashi, M., et al. (2016). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improved exercise capacity and mitochondrial biogenesis in mice with heart failure via activation of glucagon-like peptide-1 receptor signalling. *Cardiovasc. Res.* 111, 338-347.
- Tanaka, M., Borgeld, H.J., Zhang, J., Muramatsu, S., Gong, J.S., Yoneda, M., Maruyama, W., Naoi, M., Ibi, T., Sahashi, K., et al. (2002). Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria. *J. Biomed. Sci.* 9, 534-541.
- Tsutsui, H., Ide, T., Hayashidani, S., Suematsu, N., Shiomi, T., Wen, J., Nakamura, K., Ichikawa, K., Utsumi, H., and Takeshita, A. (2001). Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation* 104, 134-136.
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M.H., Oatis, J.E., Jr., and Walle, U.K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* 32, 1377-1382.

- Wan, Y., Moyle, P.M., Christie, M.P., and Toth, I. (2016). Nanosized, peptide-based multicomponent DNA delivery systems: optimization of endosome escape activity. *Nanomedicine (Lond.)* 11, 907-919.
- Wang, G., Chen, H.W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., Smith, G.M., Fan, K.C., Hong, J.S., French, S.W., McCaffery, J.M., et al. (2010). PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell* 142, 456-467.
- Weissig, V., D'Souza, G.G., and Torchilin, V.P. (2001). DQAsome/DNA complexes release DNA upon contact with isolated mouse liver mitochondria. *J. Control. Release* 75, 401-408.
- Weissig, V., Lizano, C., and Torchilin, V.P. (2000). Selective DNA release from DQAsome/DNA complexes at mitochondria-like membranes. *Drug Deliv.* 7, 1-5.
- Wu, Y.C., Wu, T.H., Clemens, D.L., Lee, B.Y., Wen, X., Horwitz, M.A., Teitell, M.A., and Chiou, P.Y. (2015). Massively parallel delivery of large cargo into mammalian cells with light pulses. *Nat. Methods* 12, 439-444.
- Yamada, Y., Akita, H., Kamiya, H., Kogure, K., Yamamoto, T., Shinohara, Y., Yamashita, K., Kobayashi, H., Kikuchi, H., and Harashima, H. (2008). MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 423-432.
- Yamada, Y., Furukawa, R., and Harashima, H. (2016). A dual-ligand liposomal system composed of a cell-penetrating peptide and a mitochondrial RNA aptamer synergistically facilitates cellular uptake and mitochondrial targeting. *J. Pharm. Sci.* 105, 1705-1713.
- Yamada, Y., Ishikawa, T., and Harashima, H. (2017). Validation of the use of an artificial mitochondrial reporter DNA vector containing a Cytomegalovirus promoter for mitochondrial transgene expression. *Biomaterials* 136, 56-66.
- Yamada, Y., Tabata, M., Yasuzaki, Y., Nomura, M., Shibata, A., Ibayashi, Y., Taniguchi, Y., Sasaki, S., and Harashima, H. (2014). A nanocarrier system for the delivery of nucleic acids targeted to a pancreatic beta cell line. *Biomaterials* 35, 6430-6438.
- Yasuzaki, Y., Yamada, Y., Kanefuji, T., and Harashima, H. (2013). Localization of exogenous DNA to mitochondria in skeletal muscle following hydrodynamic limb vein injection. *J. Control. Release* 172, 805-811.
- Yokota, T., Kinugawa, S., Hirabayashi, K., Matsushima, S., Inoue, N., Ohta, Y., Hamaguchi, S., Sobirin, M.A., Ono, T., Suga, T., et al. (2009). Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1069-1077.
- Yu, C., Shin, Y.G., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, J.W., Lee, Y.S., Hirschelman, W.H., Pezzuto, J.M., Mehta, R.G., and van Breemen, R.B. (2002). Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm. Res.* 19, 1907-1914.
- Zhang, R., Shen, Y., Zhou, L., Sangwung, P., Fujioka, H., Zhang, L., and Liao, X. (2017). Short-term administration of Nicotinamide Mononucleotide preserves cardiac mitochondrial homeostasis and prevents heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 112, 64-73.
- Zhao, K., Zhao, G.M., Wu, D., Soong, Y., Birk, A.V., Schiller, P.W., and Szeto, H.H. (2004). Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 279, 34682-34690.