



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ベルベリン搭載脂質ナノ粒子によるミトコンドリア機能向上と神経内局在制御
Author(s)	堀, 生実
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15319号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15319
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94382
Type	doctoral thesis
File Information	Ikuma_Hori.pdf



博士学位論文

ベルベリン搭載脂質ナノ粒子による ミトコンドリア機能向上と神経内局在制御

堀 生実

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
薬剤分子設計学研究室

2023 年 3 月

目次

略語.....	4
序論.....	6
第一章 ベルベリンによる神経保護作用の検証.....	13
1 はじめに.....	13
1-1 BBR 封入 MITO-Porter (MITO-Porter (BBR))の調製.....	15
1-2 MITO-Porter (BBR)による神経細胞 (Neuro2a)における粒子の細胞取り込みの検証....	15
1-3 MITO-Porter (BBR)による細胞及びミトコンドリアへのベルベリン集積量の検証.....	16
1-4 MITO-Porter (BBR)によるミトコンドリア酸素消費量の減少.....	17
1-5 MITO-Porter (BBR)による ATP 産生量の増加.....	19
1-6 MITO-Porter (BBR)による MITOL 発現量の増加.....	19
1-7 MITO-Porter (BBR)による細胞生存率の検証.....	20
考察.....	22
第二章 神経軸索末端標的型リポソームの調製.....	25
2 はじめに.....	25
2-1 初代培養神経細胞における MITO-Porter の細胞内局在の検証.....	27
2-2 神経軸索末端標的型 LP の調製.....	28
2-3 神経軸索末端標的型 LP による粒子の細胞取り込みの検証.....	29
2-4 初代培養神経細胞の細胞体における神経軸索末端標的型 LP の細胞内局在の検証..	30
2-5 初代培養神経細胞の軸索末端における神経軸索末端標的型 LP の細胞内局在の検証	31
.....	31
考察.....	34
第三章 細胞体及び軸索末端への局所的な薬物送達による神経機能の検証.....	36
3 はじめに.....	36
3-1 局所的な BBR 送達によるミトコンドリア軸索輸送の検証.....	38
3-2 局所的な BBR 送達による軸索長変化への影響.....	39
考察.....	41
結語.....	43
実験方法.....	44
実験試薬・材料.....	45
実験機器.....	47
一般試薬調製.....	49
実験操作・方法.....	52
参考文献.....	59

謝辭.....	65
---------	----

略語

AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside
A β	Amyloid-beta
ATP	Adenosine tri-phosphate
AMP	Adenosine mono-phosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
BBB	Blood-brain barrier
BBR	Berberine
BME	Basal medium eagle
BSA	Bovine serum albumin
CAP	Carbonic anhydrase-related protein
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CNS	Central nervous system
CREB	cAMP response element-binding protein
CRR	Cysteine-rich region
g	gravity
DDS	Drug delivery system
DDW	Deionized distilled water
DiD	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine,4-chlorobenzenesulfonate salt
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMG-PEG-2k	1,2-dimyristoyl-sn-glycerol, methoxyPEG
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
EDTA	Ethylene diamine-N', N', N', N'-tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor-like domains
Em	Emission
EMEM	Eagle's minimum essential medium
EtOH	Ethanol
Ex	Excitation
FBS	Fetal bovine serum
FCCP	Carbonyl cyanide p-tri-fluoromethoxyphenylhydrazone
GABA	γ -aminobutyric acid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid

hr	hour
LNS	Laminin neurexin sex-hormone-binding globulin domain
LP	Liposome
LRRTM	Leucine-rich repeat transmembrane
min	minute
MITOL	Mitochondrial ubiquitin ligase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NBS	Neurexin binding site
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
NRX	Neurexide
OCR	Oxygen consumption rate
PBS	Phosphate-buffered saline
PdI	Polydispersity index
PDZ	Post-synaptic density-95, Disks-large and Zonula occludens-1
R8	Octaarginine
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
S.D.	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
S.E.	Standard error
sec	second
SM	Sphingomyelin
STR-R8	Stearyl octaarginine
STR-CAP	Stearyl carbonic anhydrase-related protein
STR-CRR	Stearyl cysteine-rich region
STR-NBS	Stearyl neurexin binding site
STR-NRX	Stearyl neurexide
TPP	Tri-phenyl-phosphonium
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Trk	Tropomyosin receptor kinase
Znf804a	Zinc finger protein 804A

序論

人間の脳は約 860 億個の神経細胞と約 840 億個のグリア細胞で構成されている [1]。神経細胞は主に情報伝達を行い、グリア細胞は神経細胞の支持、栄養や代謝の調節を行っている。これらのすべてが複雑なネットワークを構築することで思考、動き、経験が生み出される。神経回路の機能を維持するために大量のエネルギーが必要であり、脳内のミトコンドリア呼吸により全身の酸素の 20%を消費している [2]。神経細胞はそのエネルギーの 70%以上を消費し、残りはグリア細胞が消費している [3]。神経細胞におけるエネルギーの大部分はミトコンドリアによって産生されており、生命活動を維持していくための大きな役割をミトコンドリアが担っている [4]。さらに、ミトコンドリアはエネルギー産生のみならず、細胞代謝を調節し、細胞死と生存経路を制御する多様な機能に基づいて、神経細胞の完全性を維持するために必要不可欠なオルガネラである [5-7]。

神経細胞の形態は、分極した軸索と樹状突起を有するために他の細胞とは区別されている。成長した神経細胞は細胞分裂が出来ないため、細胞死を防ぐ必要があり細胞体におけるタンパク質やオルガネラなどの生合成・分解機構の維持や、細胞体から離れた位置にある軸索末端においてタンパク質やオルガネラなどの恒常性を維持することが問題となっている。そこで、神経細胞の恒常性と生存を維持するために、軸索内物質輸送の調節が重要な役割を果たしている (図 1)。軸索輸送機構は、微小管、モータータンパク質、アダプター及びカーゴ因子で構成される [8]。細胞体から軸索末端への順行性輸送は RNA、タンパク質及びオルガネラなどを輸送し恒常性の維持に寄与している。一方、軸索末端から細胞体への逆行性輸送は、損傷した物質を輸送することで神経栄養因子シグナル伝達、オートファジー/リソソーム経路、及び神経損傷への反応などプロセスに不可欠である。軸索輸送はミトコンドリアが産生するエネルギーを駆動力としているため、ミトコンドリアは例外的に軸索内を双方向に移動し、軸索全体のエネルギー恒常性を維持している。

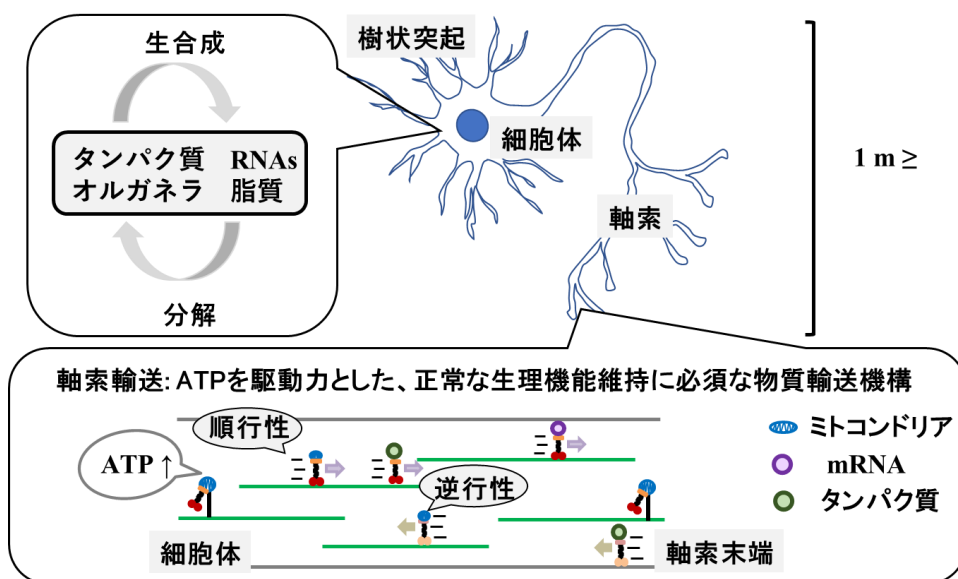


図 1 神経機能の恒常性を維持する軸索輸送機構

神経細胞の発達初期段階において、ミトコンドリアは多くのエネルギーを必要とする軸索形態を制御し [9, 10]、シナプス機能を調節することにより神経機能において重要な役割を果たしている [11]。軸索末端の軸索分枝が伸長し始めると、順行性輸送ミトコンドリアが伸長していないものに比べ 2 倍の頻度でより多くのエネルギーが必要な伸長している軸索分枝に入り、軸索伸長を促進する。また、軸索分枝の成熟は静止したミトコンドリアからの ATP の持続的な生成によって促進する。これは、軸索伸長及び成熟に軸索 mRNA の翻訳及び細胞骨格の再編成に局所的な ATP 供給が必要なためである。細胞のエネルギーセンサーである AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMP-activated Protein Kinase: AMPK) の活性化は、ミトコンドリア軸索輸送と固定のバランスをとるために役立ち、軸索形成に関与している [12]。AMPK の活性化によりミトコンドリアの軸索末端への順行性輸送が増加し、特定の領域にミトコンドリアを蓄積させ、その後新しい軸索分枝を形成させる。

神経細胞の発達が進むに伴い、ミトコンドリア軸索輸送は徐々に低下する [13]。これにより、軸索内でエネルギー需要の特に高い軸索末端でエネルギー恒常性を維持することが難しくなる。損傷したミトコンドリアは除去効率の低下により軸索末端に蓄積し、軸索末端におけるエネルギー恒常性の破綻は軸索輸送障害を引き起こし、輸送因子が異常な形で蓄積することで、軸索変性を引き起こす可能性がある。さらに、損傷したミトコンドリアは局所的なエネルギー不足を引き起こすだけでなく、有害な活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) とアポトーシス因子を放出する [14]。ミトコンドリア軸索輸送障害は初期の病理学的特徴として複数の神経変性疾患で確認され (図 2)、疾患発症において中心的な問題として挙げられている。そのため、ミトコンドリア軸索輸送及び局所的エネルギー代謝を増加させる治療分子送達技術の開発は、神経変性疾患の治療や神経再生を促進するための魅力的な戦略となると期待されている。

イソキノリンアルカロイドとして分類される植物代謝産物であるベルベリン (BBR) は、ミトコンドリアに作用し、代謝調節因子である AMPK の活性化により抗酸化作用や抗炎症作用など、数多くの薬理作用を発揮している。しかし、BBR は正電荷を有しているため、細胞内においてミトコンドリア、核や小胞体に非特異的に集積し [15]、神経保護作用又は細胞傷害作用を示すことが明らかとされている [16-19]。そのため、BBR の細胞内動態が薬理作用に寄与している可能性があるが十分に研究が行われていない。そこで、薬物の細胞内動態制御を効率的に行えるリポソーム (LP) を用いて、BBR の細胞内動態制御を行いエネルギー代謝に重要なミトコンドリア機能に変化がみられるか検証する必要がある。

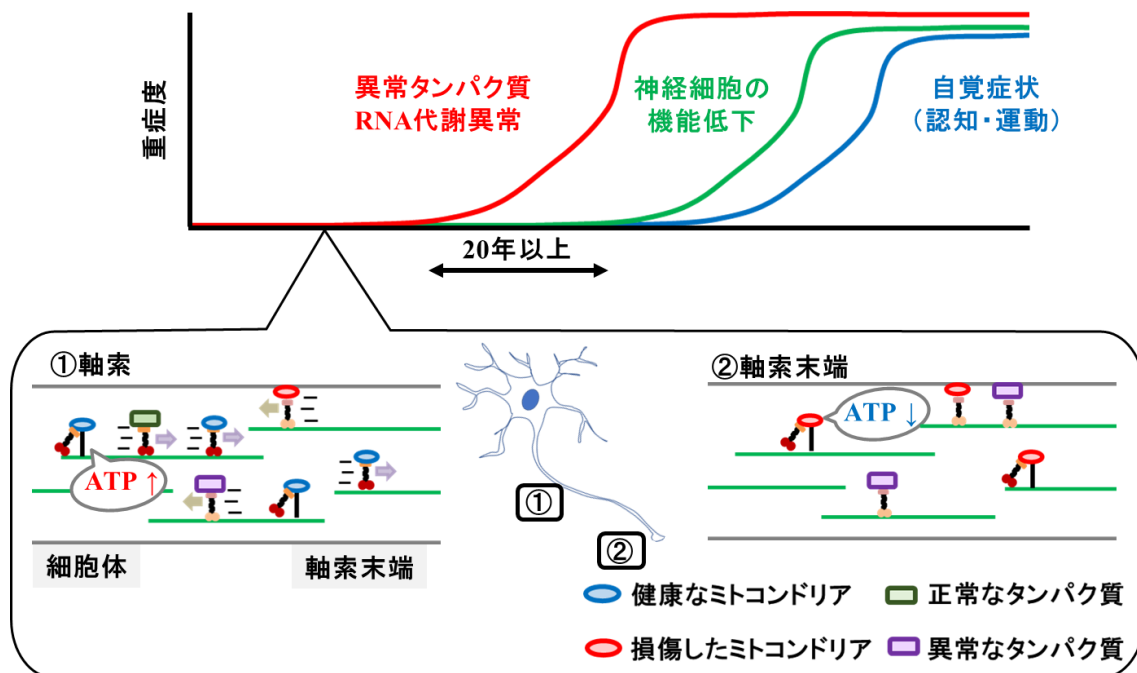


図 2 神経変性疾患とミトコンドリア動態

神経細胞特異的な薬物送達を行う上で、神経細胞特有の構造であるシナプスを標的とすることが近年注目されている。神経突起末端に多く存在するシナプスは神経細胞間のコミュニケーションの基本的な構造であり、ミトコンドリアが産生するエネルギーを用いて神経機能を維持している。シナプスはグルタミン酸や γ -aminobutyric acid (GABA) などの情報伝達物質を含み情報を送るシナプス前部である軸索膨大部と、それらの情報伝達物質の受容体が分布し情報を受け取るシナプス後部の樹状突起がシナプス間隙を挟んで向かい合う (図 3)。これまで、シナプス後部の受容体を介したナノ粒子の送達戦略が試みられている。シナプス後部に発現する N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) を標的化したナノ粒子は、神経毒性からの神経保護作用を増強している [20, 21]。また、Tropomyosin Receptor Kinase (Trk) を標的化することにより神経再生の増強に成功している [22]。シナプス後部の受容体を標的としたことは神経細胞の細胞体への薬物送達を増加させたが、受容体を阻害し神経細胞機能を低下させる可能性が示唆されている [23, 24]。また、受容体を標的としているため、軸索末端への薬物送達は不十分な可能性がある。

軸索末端にはシナプス前部が多く分布し、シナプス機能の調節因子で最も研究が進められているものの 1 つがニューレキシンである。ニューレキシンは軸索末端に多く発現し、細胞外に 3 つの Epidermal Growth Factor-like domains (EGF) と 6 つの Laminin Neurexin Sex-hormone-binding globulin domain (LNS) を持つ細胞接着分子である。ニューレキシンにはニューロリギン [25]、ジストログリカン [26]、セレベリン [27] 及びシナプトタグミン [28] などが結合することで多様なシナプス機能を調節することが知られている (表 1)。シナプス前部においてシナプス小胞は膜から取り出され、再酸性化後に再利用のために神経伝達物質が補充されることで情報伝達機能を維持している。シナプスにおける小胞エンドサイトーシスはクラスリン媒介エンドサイトーシス [29]、バル

クエンドサイトーシス [30]、クラスリン非依存性高速エンドサイトーシス [31]、超高速エンドサイトーシス [32]、及び一時的な融合孔の高速閉鎖による直接的なシナプス小胞再形成 [33]から成る5つの機構により行われている。そのため、ナノ粒子表面にシナプス前部標的因子を修飾することにより、ナノ粒子がシナプス前部に結合すると神経細胞の軸索末端から特異的に取り込まれる可能性がある。さらに、受容体を標的としていないため、ナノ粒子送達による神経毒性を軽減できる可能性がある。しかし、シナプス接着因子を介した軸索末端特異的な薬物送達は試みられていない。

これまで、神経細胞における局所的な細胞内制御の重要性が明らかとされている [34, 35]。LPは神経細胞の局所的な制御が行える可能性が高いにも拘わらず、細胞内での局所的な薬物送達と薬理作用の関係は明らかとされていない。そこで、細胞体と軸索末端に局在するLPを調製することが薬物送達位置の重要性を明らかにするうえで必要不可欠である。細胞体への薬物送達は細胞膜が負に帯電していることを利用してLP表面を正に帯電させることにより行える可能性がある。また、軸索末端への薬物送達はLP表面にニューレキシンと結合するペプチドを修飾することにより行える可能性がある。

表 1 ニューレキシンに結合するタンパク質

タンパク質	結合領域
Neurexophilin	LNS2
Neurologin	LNS6
Dystroglycan	LNS2,6
GABA _A Receptors	LNS6
Leucine-rich repeat transmembrane (LRRTM)	LNS6
Cerebellin	LNS6
Synaptotagmin	Cytosolic domain
Zinc finger protein 804A (znf804a)	Cytosolic domain
CASK	PDZ motif
Mint/X11/Apba	PDZ motif
AF-6	PDZ motif

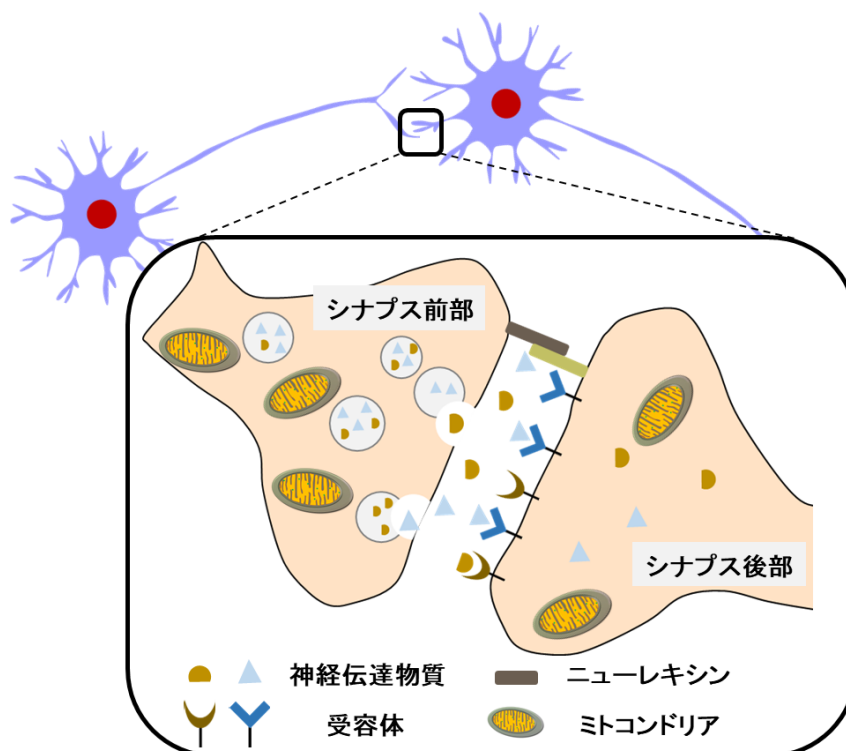


図 3 シナプスの構造

神経細胞のミトコンドリア選択的な Drug Delivery System (DDS)においてカチオン性親油性分子の利用が増えている。カチオン性親油性分子はミトコンドリア外膜の負の膜電位を標的とし、静電的相互作用を介してミトコンドリア標的化を可能性にしている。カチオン性親油性分子の代表的なものとして、Tri-phenyl-phosphonium (TPP)がある。TPP はミトコンドリア内部への取り込みを 100 以上増加させることが報告されている [36]。TPP を修飾したナノ粒子を用いて抗酸化物質をミトコンドリアへ送達することが細胞及びアルツハイマー病モデルマウスにおいて薬理作用を増強している [37]。この戦略によって、低分子、核酸、タンパク質などの治療分子のミトコンドリア送達が可能となっている。

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、当研究室と略す）では、ミトコンドリア標的型 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とする LP』、MITO-Porter の開発に成功している（図 4）。MITO-Porter は、粒子表面に修飾した膜透過性ペプチドであるアルギニン 8 重合体 (Octaarginine: R8)により、細胞表面のプロテオグリカン等との相互作用により、細胞表面に吸着し、マクロピノサイトーシスを介して内在化し、リソソーム分解を回避している。細胞内に取り込み後、MITO-Porter は R8 修飾により粒子の表面電位が正に帯電しているため、ミトコンドリアと結合し膜融合により封入分子の送達を可能にしている [38, 39]。MITO-Porter には様々な分子を封入することが可能であり、これまでに核酸などの高分子化合物やビタミン B₁ などの低分子化合物を細胞内ミトコンドリアに送達したことを確認している [40-42]。

本研究では、AMPK の活性化因子である BBR 搭載 MITO-Porter を構築し、神経細胞に対するミトコンドリアへの BBR 送達検証、機能評価を行うことにより BBR の細胞内動態と薬理作用の関係性を明らかにすることを目的とした。また、神経細胞の軸索末端に多く発現する細胞接着因子を標的とした薬物送達技術の構築を行うことにより、神経細胞特異的な薬物送達を行えるか試みた。さらに、初代培養神経細胞と BBR 搭載ナノキャリアを用いて、粒子の細胞内局在とミトコンドリア軸索輸送と軸索長への薬理作用の関係を明らかにすることを試みた。

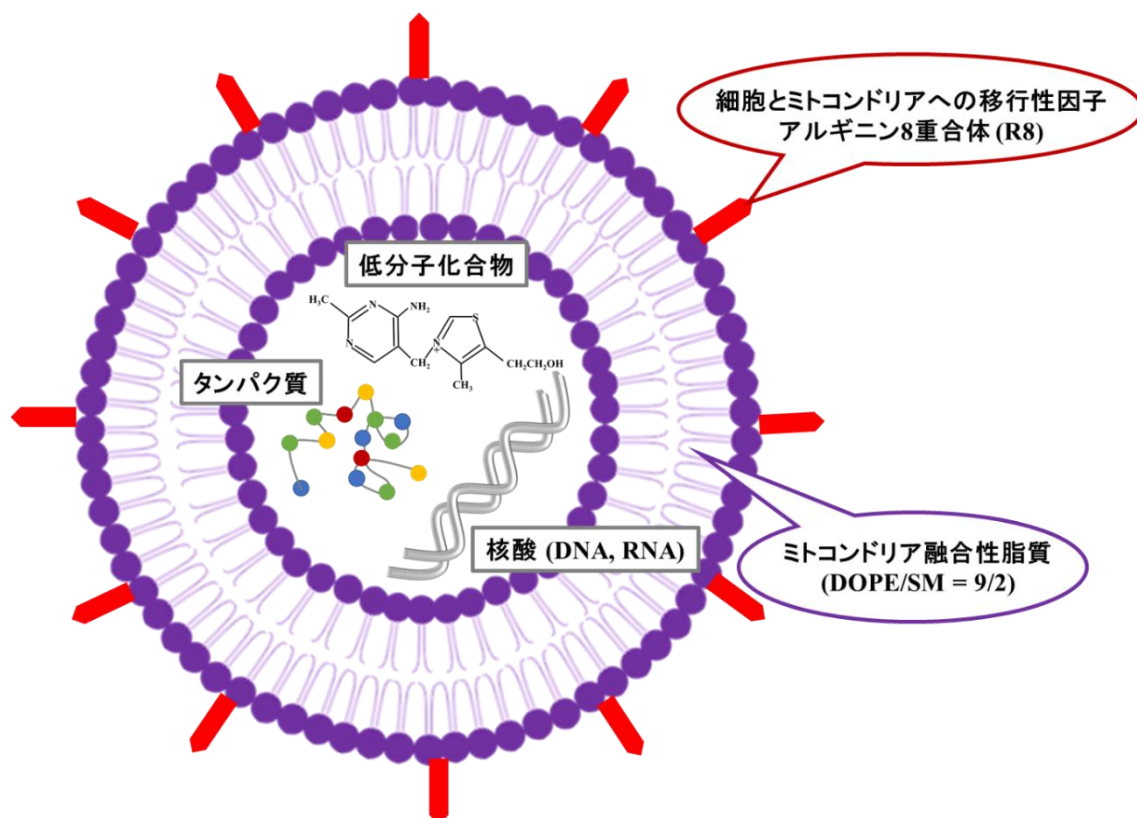


図 4 ミトコンドリアを標的とした LP (MITO-Porter)

第一章

ベルベリンによる神経保護作用の検証

第一章 ベルベリンによる神経保護作用の検証

1 はじめに

イソキノリンアルカロイドとして分類される植物代謝産物である BBR は、ミトコンドリアに作用し、抗酸化作用や抗炎症作用など、数多くの薬理作用を発揮している。神経細胞に対し BBR はアミロイド β ($A\beta$) 誘発性のミトコンドリア機能障害を軽減することが報告されている [43]。さらに、BBR による治療は、アルツハイマー病モデルマウスの $A\beta$ 産生を阻害することにより認知機能を改善し [44]、パーキンソン病モデルマウスのアポトーシスを阻害することにより短期記憶を改善することが報告されている [45]。従って、BBR は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患の治療薬として近年注目されている [46-48]。

細胞に取り込まれた BBR はミトコンドリア、核や小胞体などに集積している [15]。ミトコンドリアに集積した BBR はミトコンドリア呼吸鎖複合体に作用し、エネルギー産生量を減少させ、フィードバック制御によりエネルギー調節因子の活性化を誘導している。さらに、ミトコンドリアや脂質などの代謝経路を調節することにより、最終的にエネルギー産生量を増加させ、神経保護作用に寄与している [18]。一方、核に集積した BBR は DNA との直接的な相互作用と DNA 複製プロセスへの干渉を介して、DNA 損傷の修復を阻害している [16, 19]。また、小胞体に集積した BBR は小胞体ストレスを誘導している [17]。核や小胞体に BBR が集積することは、これらの作用により細胞損傷作用に寄与している。そのため、BBR のミトコンドリア以外への集積は細胞損傷作用の誘発につながる可能性がある。BBR は有益な効果を示すにも拘わらず、細胞内動態を制御できていない点が問題である。

LP などのナノキャリアは薬物の細胞内動態制御を行う有用な技術である。そこで、BBR 搭載ナノキャリアを用いてミトコンドリアへの効率的な薬物送達を行うことにより、ミトコンドリア機能を向上させられる可能性があり、BBR の集積量評価や ATP 産生量評価を行う必要がある。その結果、BBR のミトコンドリアへの集積量増加により BBR がミトコンドリアに多く送達された場合、一時的な呼吸活性減少により、ミトコンドリアストレス応答が誘導されと考えられる。さらに、ミトコンドリアストレス応答によるミトコンドリア機能の改善に伴い、電子伝達系の電子の流れが最適化されたことによる基礎呼吸の減少や ATP 産生量が増加し最終的に mitochondrial ubiquitin ligase (MITOL) の発現量を増加させることが予想される (図 1-1)。MITOL はマイトファージによって損傷したミトコンドリアタンパク質又はミトコンドリアネットワークの一部を排除し、生合成を通じてタンパク質と脂質を追加することにより成分を新しくし、集合的なミトコンドリアターンオーバーによる品質管理に重要な役割を果たしている。

当研究室では、ミトコンドリア標的型 LP である“MITO-Porter”を構築し、低分子・高分子化合物をミトコンドリアに効率的に送達できるかを検証している [49]。MITO-Porter システムを利用し効率的なミトコンドリアへの薬物送達の結果、ミトコンドリア機能を向上させる可能性があることを示した。BBR のミトコンドリアへの送達量を向上させるために MITO-Porter を用いた。従って、本章

では、BBR を封入したナノキャリアを構築し、ミトコンドリアを標的とした BBR を送達することによる BBR の集積量、ミトコンドリア機能への影響を検証した。

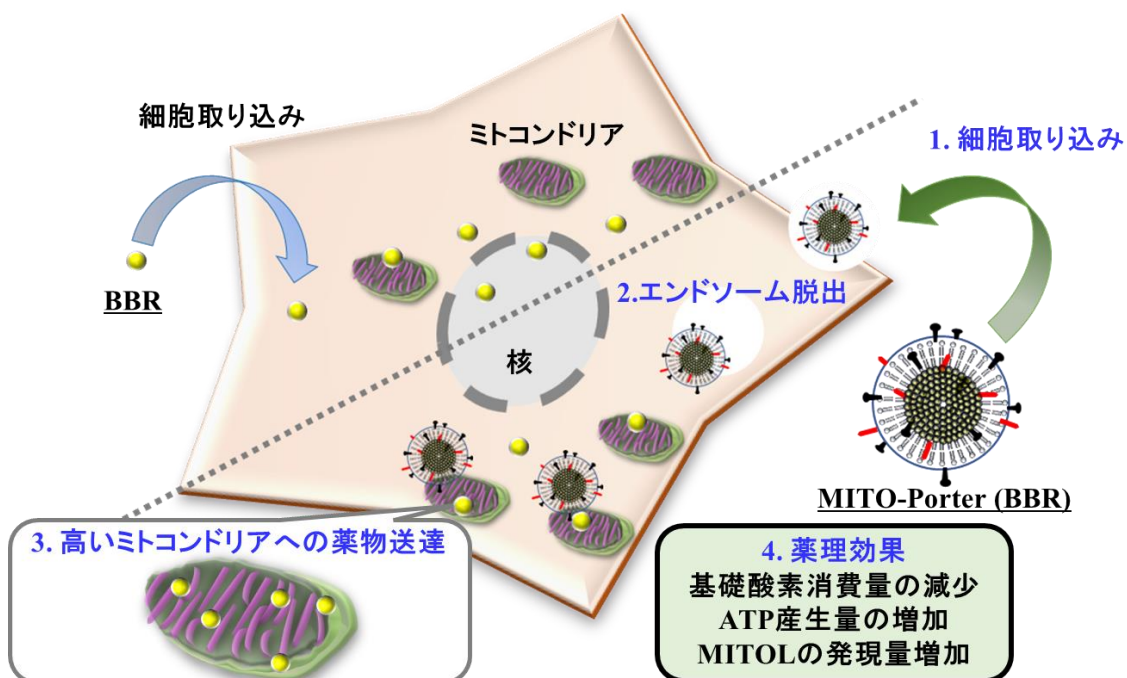


図 1-1 ミトコンドリアを標的とした BBR 送達

MITO-Porter によって BBR がミトコンドリアに多く送達された場合、ミトコンドリアストレス応答を誘発し、ミトコンドリア機能が向上すると考えられる。これに伴い、電子伝達系の電子の流れが最適化されたことによる基礎呼吸の減少や ATP 産生量が増加し最終的に MITOL の発現量増加が引き起こされることが予想される。

結果

1-1 BBR 封入 MITO-Porter (MITO-Porter (BBR))の調製

BBR を封入した MITO-Porter (MITO-Porter (BBR))、BBR を封入していない MITO-Porter 及び粒子表面に R8 を修飾していない空の LP (DOPE/SM-LP: DOPE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, SM: sphingomyelin)は、薄層水和法を用いて調製した。調製した空の DOPE/SM-LP の物性は平均粒子径 102 ± 6.6 nm、PdI 0.21 ± 0.1 、ゼータ電位 -5.36 ± 2.4 mV であることを確認した (表 2)。また、MITO-Porter の物性は平均粒子径 97.6 ± 5.9 nm、PdI 0.26 ± 0.02 、ゼータ電位 29.5 ± 3.7 mV であることを確認した (表 2)。さらに、MITO-Porter (BBR)の物性は平均粒子径 93.6 ± 1.6 nm、PdI 0.28 ± 0.01 、ゼータ電位 30.1 ± 4.8 mV であることを確認した (表 2)。

表 2 薄層水和法により調製した LP の物性

LP type	平均粒子径 (nm)	Polydispersity Index (PdI)	ゼータ電位 (mV)
DOPE/SM-LP	102 ± 6.6	0.21 ± 0.06	-5.36 ± 2.4
MITO-Porter	97.6 ± 5.9	0.26 ± 0.02	29.5 ± 3.7
MITO-Porter (BBR)	93.6 ± 1.6	0.28 ± 0.01	30.1 ± 4.8

調製した LP の脂質組成は DOPE と SM (9:2, molar ratio)である。調製した LP の平均粒子径 (nm)、Polydispersity Index (PdI)、ゼータ電位 (mV)を示す。(mean with S.D., n = 3-9)

調製した粒子から未封入 BBR の除去を試みた。未封入 BBR を除去する方法として、透析法と限外濾過法を比較検証した。検証の結果、透析法では BBR の回収率が $0.33\% \pm 0.16$ 、限外濾過法では BBR の回収率が $12.2\% \pm 4.6$ であることを確認した (表 3)。

表 3 異なる方法による BBR 回収率

方法	BBR 回収率(%)
透析法	0.33 ± 0.16
限外濾過法	12.2 ± 4.6

BBR 封入 MITO-Porter に対する透析法又は限外濾過法を用いて回収した BBR の回収率を示す。(mean with S.D., n = 3)

1-2 MITO-Porter (BBR)による神経細胞 (Neuro2a)における粒子の細胞取り込みの検証

調製した粒子の R8 や BBR の有無による細胞取り込みへの影響を評価するために、マウス神経芽細胞腫である Neuro2a 細胞に対して 0.5 mol% の 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate salt (DiD)を修飾させた粒子を添加した。

細胞取り込み評価はフローサイトメーターを用いて行った。細胞取り込みは DiD 標識した粒子の取り込み量を蛍光強度により算出した。フローサイトメーターを用いた細胞取り込みの結果、MITO-Porter 及び MITO-Porter (BBR)処理は未処理及び DOPE/SM-LP 処理と比較して粒子の細胞取り込みが有意に高かった (図 1-2)。

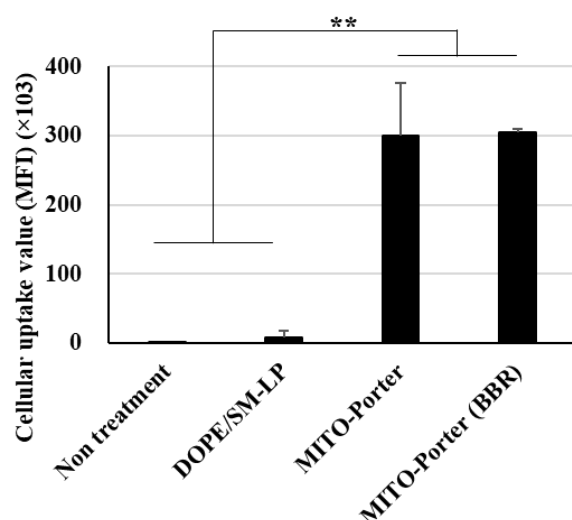


図 1-2 Neuro2a 細胞における LP の細胞取り込み評価

DOPE/SM-LP、MITO-Porter 又は MITO-Porter (BBR)の細胞取り込みの結果を示す。本実験では DiD 修飾した LP を用いて、蛍光強度をもとに細胞取り込みの値を算出した。

(mean with S.D., n=3, **p < 0.01 one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.)

1-3 MITO-Porter (BBR)による細胞及びミトコンドリアへのベルベリン集積量の検証

Naked BBR 又は MITO-Porter (BBR)を Neuro2a 細胞に添加し、1 時間後における細胞への BBR 集積量を吸光度測定により評価した。BBR 濃度及びタンパク質濃度は、それぞれ 350 nm、280 nm の吸収を用いて測定した。測定した値と BBR の検量線を用いて、BBR 濃度を算出した。また、BBR の集積量は、タンパク質濃度に対する BBR 濃度として算出した。その結果、添加後 1 時間において Naked BBR 及び MITO-Porter (BBR)処理では、未処理と比較して BBR の集積量が 7 倍増加することが示された (図 1-3 (A))。

次に、Naked BBR 又は MITO-Porter (BBR)を Neuro2a 細胞に添加し、1 時間後におけるミトコンドリアへの BBR 集積量を吸光度測定により評価した。ミトコンドリアの単離は、サンプル添加後の細胞を用いて行った。BBR の集積量は上記と同様に算出した。その結果、添加後 1 時間において Naked BBR 又は MITO-Porter (BBR)処理では、未処理と比較してそれぞれ BBR の集積量が 3 倍又は 6 倍に増加することが示された (図 1-3 (B))。

最後に、細胞及びミトコンドリアへの BBR 集積量をもとに、相対的ミトコンドリア移行率を算出した。その結果、MITO-Porter (BBR)処理では、Naked BBR 処理と比較して BBR のミトコンドリア移

行率を 1.5 倍増加することが示された (図 1-3 (C))。

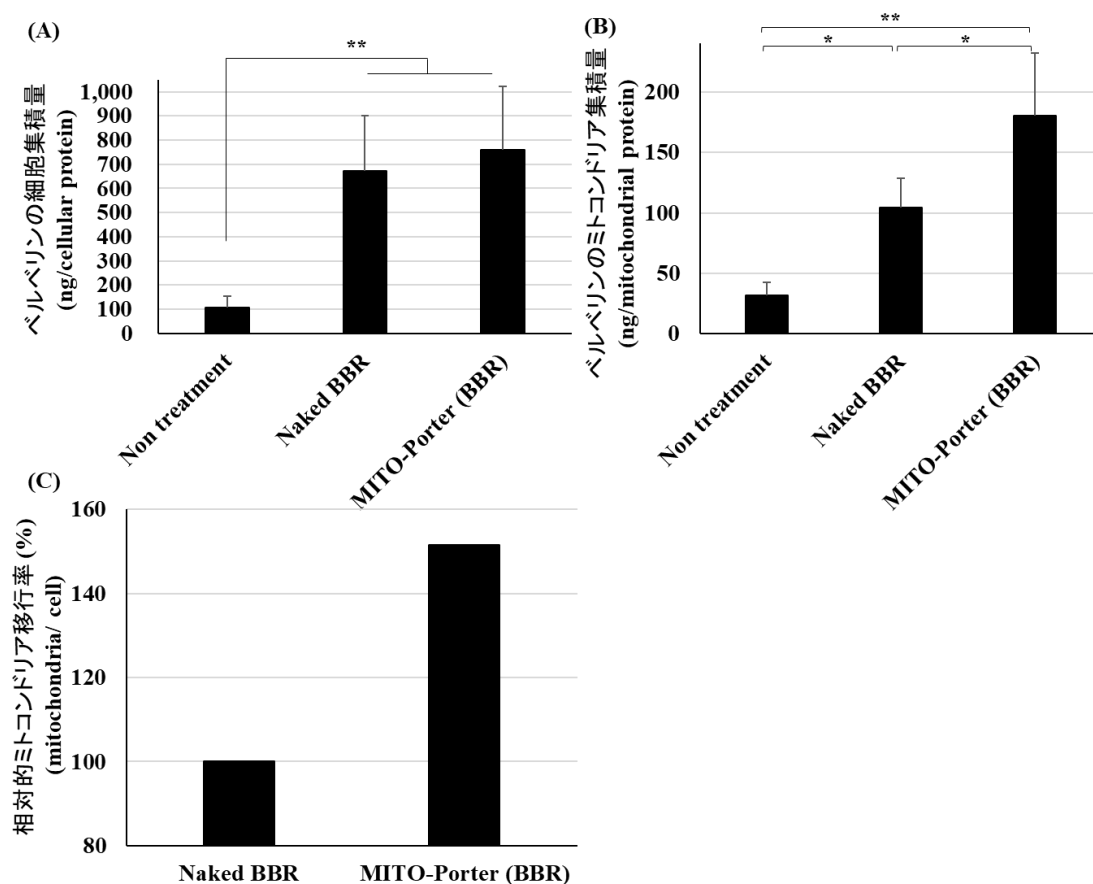


図 1-3 Neuro2a 細胞及びミトコンドリアへの BBR 集積量評価

Naked BBR 又は MITO-Porter (BBR)を Neuro2a 細胞に添加し、1 時間後における細胞 (A)及び単離したミトコンドリア (B)への BBR 集積量を 350 nm の吸収により評価した。Naked BBR 又は MITO-Porter (BBR)を添加し、1 時間後における BBR の相対的ミトコンドリア移行率を算出した (C)。細胞及びミトコンドリアのタンパク質濃度を 280 nm の吸収を用いて算出し、BBR をタンパクで補正した相対値を示す。

(mean with S.D., n=3, *p < 0.05 **p < 0.01 one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.)

1-4 MITO-Porter (BBR)によるミトコンドリア酸素消費量の減少

サンプルを Neuro2a 細胞に添加し、4 時間後におけるミトコンドリアの酸素消費量 (Oxygen Consumption Rate: OCR))を Seahorse analyzer により評価した。ミトコンドリアは酸素を消費して、エネルギー産生を行っているため、OCR はミトコンドリア機能の指標として用いられる。また、BBR はミトコンドリア呼吸鎖複合体に作用するため、OCR に影響を与えることが考えられる。ミトコンドリア OCR は、細胞数を用いて正規化し OCR を算出した (図 1-4 (A))。BBR 濃度として、神経細

胞に対して神経保護作用を示すことが報告されている濃度 (Low)とさらに高い濃度 (High)を用いた。その結果、添加後 4 時間において基礎呼吸が High Naked BBR 及び MITO-Porter (High BBR)処理では、未処理と比較して 50%程度減少したことが示された (図 1-4 (B))。一方、Low Naked BBR 及び MITO-Porter (Low BBR)処理では基礎呼吸が、未処理と比較して 30%程度減少したことが示された。さらに、添加後 4 時間において最大呼吸は、未処理と比較して有意な減少は認められなかった (図 1-4 (C))。

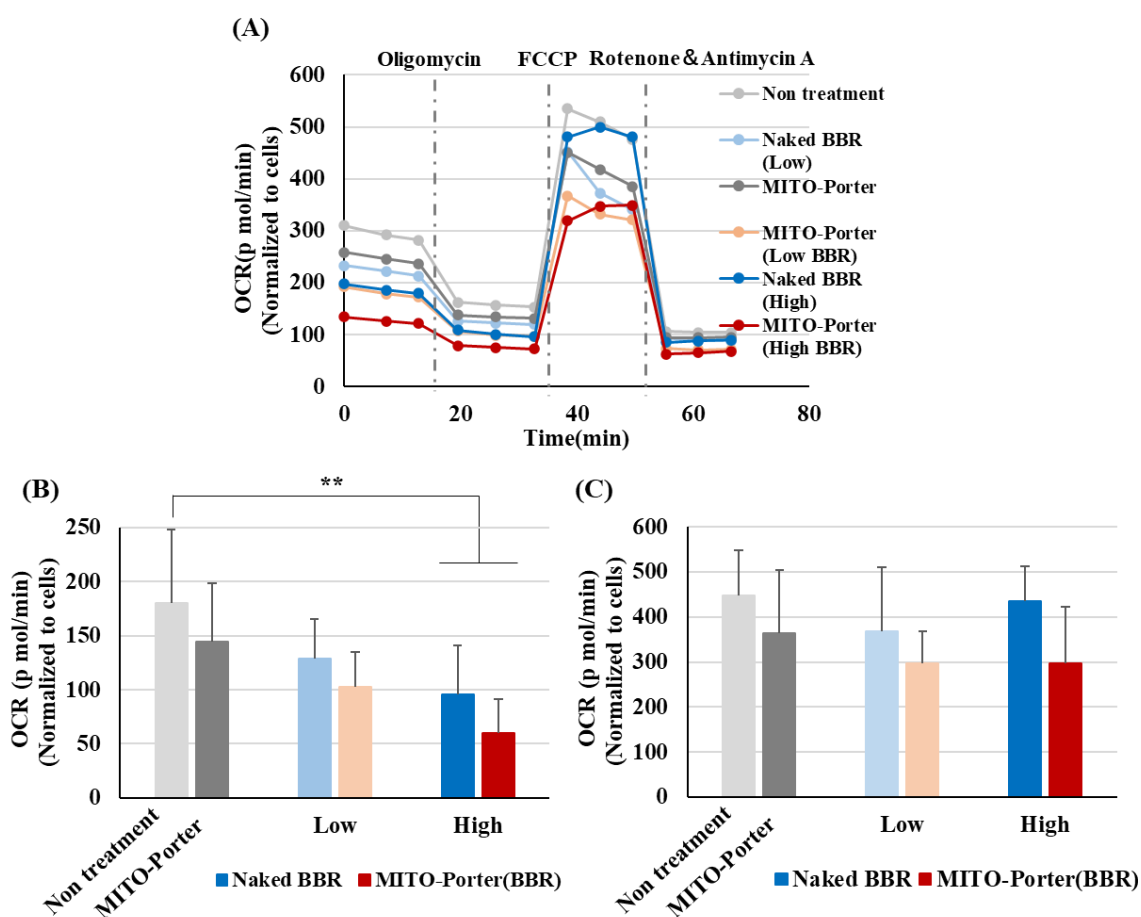


図 1-4 MITO-Porter (BBR)によるミトコンドリア酸素消費量評価

Naked BBR、MITO-Porter 又は MITO-Porter (BBR)を Neuro2a 細胞に添加し、4 時間後におけるミトコンドリア酸素消費量を SeahorseXFp analyzer により評価した。(A) OCR 測定後、細胞をオリゴマイシン (1 μ M)、FCCP (2 μ M)、ロテノン/アンチマイシン A (0.5 μ M)で順次処理した。OCR は細胞数で補正した値を示す。(B) 基礎呼吸は細胞数で補正した値を示す。(C) 最大呼吸は細胞数で補正した値を示す。

(mean with S.D., n=4, **p < 0.01 one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.)

1-5 MITO-Porter (BBR)による ATP 産生量の増加

サンプルを Neuro2a 細胞に添加し、4 時間後における細胞内 ATP 産生量を ATP assay kit を用いて評価した。ATP 濃度は、ATP probe の蛍光強度をもとに算出した。その結果、MITO-Porter (Low BBR)処理では ATP 産生量が、他の群と比較して 30%程度増加することが示された (図 1-5)。一方、MITO-Porter (High BBR)処理では ATP 産生量が、他の群と比較して 50%程度減少することが示された (図 1-5)。

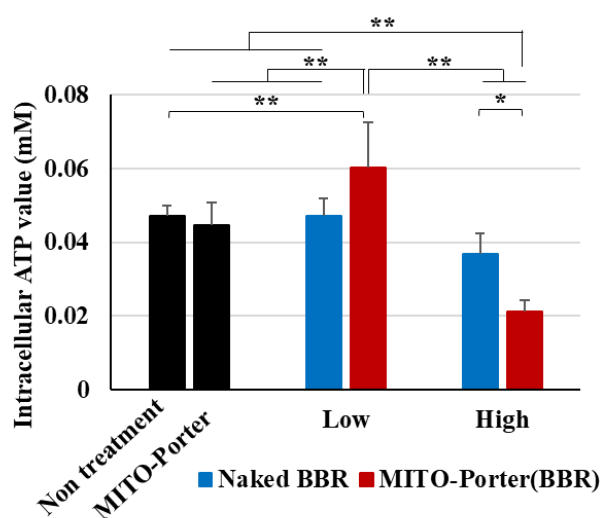


図 1-5 MITO-Porter (BBR)による ATP 産生量評価

Naked BBR、MITO-Porter 又は MITO-Porter (BBR)を Neuro2a 細胞に添加し、4 時間後における細胞内 ATP 産生量を ATP assay kit により評価した。ATP 濃度は ATP probe の蛍光強度をもとに算出した。

(mean with S.D., n=3-6, *p < 0.05 **p < 0.01 one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.)

1-6 MITO-Porter (BBR)による MITOL 発現量の増加

サンプルを Neuro2a 細胞に添加し 24、48 時間後における MITOL mRNA 発現量を定量的 RT-PCR により評価した。核 DNA 由来の β -actin mRNA を内部標準遺伝子として選択し、相対的な MITOL mRNA 発現量を算出した。その結果、添加後 24 時間において MITO-Porter (Low BBR) 処理では MITO-Porter や高濃度 BBR 処理と比較して 30%程度増加することが示された (図 1-6 (A))。一方、添加後 48 時間において MITOL mRNA 発現量に変動は認められなかった (図 1-6 (B))。

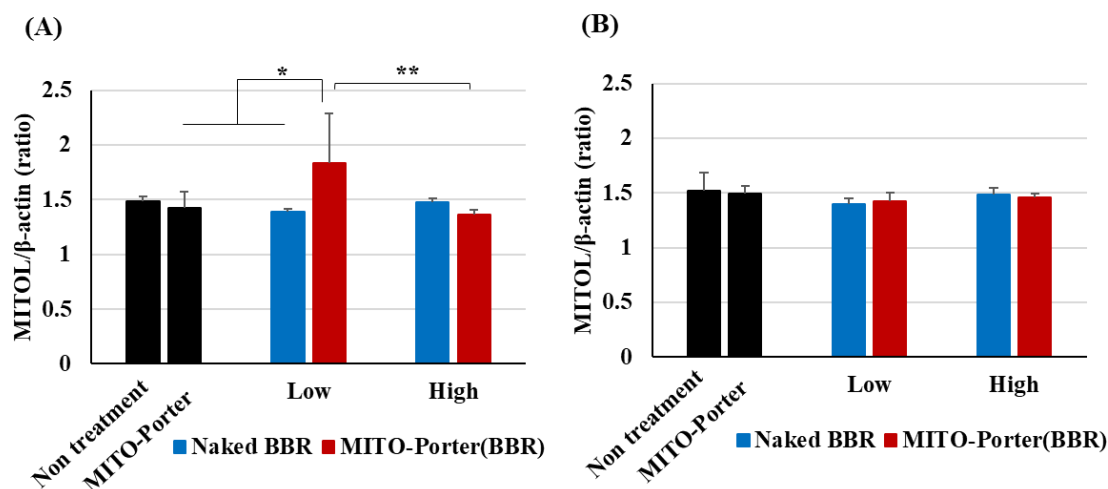


図 1-6 MITO-Porter (BBR)による MITOL 発現量評価

Naked BBR、MITO-Porter 又は MITO-Porter (BBR)を Neuro2a 細胞に添加し、24 時間後 (A)、48 時間後 (B)における MITOL mRNA 発現量を定量的 RT-PCR により評価した。β-actin mRNA を内部標準遺伝子として選択し、相対的な MITOL mRNA 発現量を算出した。

(mean with S.D., n=4-6, *p < 0.05 **p < 0.01 one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.)

1-7 MITO-Porter (BBR)による細胞生存率の検証

サンプルを Neuro2a 細胞に添加し 4 時間後における細胞生存率を WST-1 アッセイにより評価した。細胞生存率は、WST-1 試薬の吸光をもとに、未処理細胞に対する相対的な細胞生存率を算出した。その結果、低濃度 BBR 処理では細胞生存率に変動は認められなかった (図 1-7)。一方、高濃度 BBR 処理では細胞生存率が減少傾向を示したが、有意な差は認められなかった。

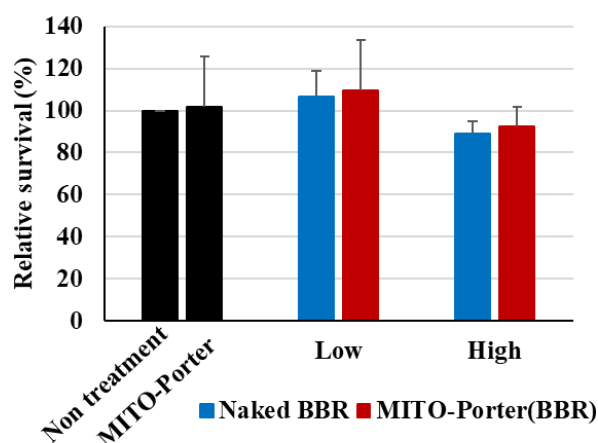


図 1-7 MITO-Porter (BBR)による細胞生存率評価

Naked BBR、MITO-Porter 又は MITO-Porter (BBR)を Neuro2a 細胞に添加し、4 時間後における

る細胞生存率は PremixWST-1 試薬を用いて 350 nm の吸収により評価した。未処理の細胞の細胞生存率を 100%として相対値を示す。

(mean with S.D., n=3-4, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.)

考察

本研究では、ミトコンドリアへの BBR の効率的な送達に MITO-Porter (BBR)を使用できるかという問題に焦点を当てた。はじめにミトコンドリア標的型 LP である MITO-Porter に BBR を封入した MITO-Porter (BBR)の調製を行った。MITO-Porter (BBR)より未封入の BBR を除去する方法として透析法又は限外濾過法を用いた結果、限外濾過法が 40 倍程度高い BBR の回収率を示した(表 3)。透析法では透析膜内外に生じている濃度勾配を分子の受動拡散により平衡状態に近づける。限外濾過法では濃度勾配を利用した受動拡散の透析法と異なり、圧力又は遠心操作により強制的に低分子溶液の膜透過を行い、高分子サンプルは濃縮される。以上のことから、透析法では BBR の除去だけではなく、徐放も同時に起きていたことが回収率低下の要因になったと考えられた。また、限外濾過法では BBR の除去と同時に LP が濃縮されたことが回収率増加の要因になったと示唆された。

BBR はカチオン性を示し、細胞内のミトコンドリア、核及び細胞質などに集積する。BBR はミトコンドリアに作用することでミトコンドリア機能を向上させることが示唆されているがミトコンドリアへの効率的な BBR の送達は行われていなかった。そこで、MITO-Porter を用いた結果、BBR の相対的なミトコンドリア移行率は 1.5 倍増加した(図 1-3 (C))。MITO-Porter は膜融合性の高い脂質組成から構成されている。さらに、LP 表面に膜透過性ペプチドの R8 を修飾することにより細胞透過性及びミトコンドリアへのターゲージングを増強している。以上のことから、MITO-Porter では細胞透過後、ミトコンドリアに多く集積することが BBR のミトコンドリアへの集積量増加の要因になったと考えられた。

ミトコンドリアは化学毒物、生体異物、病原体などの外部ストレスに対する細胞適応において重要な役割を果たしている。ミトコンドリア標的薬による軽度又は亜致死量のミトコンドリアストレスが、その後のより大きなストレス誘発損傷又は細胞死に対して、細胞に有益な効果を示している。しかし、強度のミトコンドリアストレスが細胞適応力を超えると、ミトコンドリアを介した細胞死が引き起こされる可能性がある。これらの作用は BBR が用量依存的にミトコンドリアに作用し神経細胞に対する神経保護作用やアポトーシス誘導作用など相反する効果として確認されている。しかし、BBR の用量依存的な相反する作用に関するメカニズム解明は十分に行われておらず、OCR や ATP 産生量への影響は十分に確認されていない。そこで、異なる濃度の BBR を用いた結果、高濃度 BBR 処理では未処理と比較して 50%程度基礎呼吸が減少した(図 1-4 (B))。さらに、細胞内 ATP 産生量が 50%程度減少した(図 1-5)。一方、低濃度 BBR 処理は細胞内 ATP 産生量を 30%以上増強させた(図 1-5)。この薬理作用の違いは、高濃度 BBR 処理は核や細胞質にも多く集積した結果、遺伝子発現抑制やシグナル伝達によるミトコンドリア機能低下を誘発したことが要因になったと考えられた。これまで、一時的な呼吸活動の低下による ADP の増加は ATP 合成酵素を活性化し、すべての ADP が ATP に変換された結果、ミトコンドリア呼吸が減少すること [50]や低酸素条件下で単離されたミトコンドリアでは電子伝達系における電子の流れが最適化され ATP 産生量が増加したこと [51]が報告されている。以上のことから、低濃度 BBR 処理の結果、AMPK の増加や電子伝達系における電子の流れの最適化がミトコンドリア機能向上の要因にな

ったと示唆された。

ミトコンドリア外膜に存在する MITOL はミトコンドリアダイナミクスや品質管理の重要な調節因子である。ユビキチンはプロテアソーム依存性のタンパク質分解を調節するだけでなく、シグナル伝達、膜タンパク質輸送、選択的オートファジーや老化などの様々な細胞機能を部分的に調節している。低濃度 BBR 処理の結果、MITOL の発現量が 30%程度増加した (図 1-6)。ユビキチン-プロテアソームによる細胞内タンパク質分解は ATP 依存的である [52]。以上のことから、低濃度 BBR 処理による細胞内 ATP 産生量の変化が MITOL 発現量を変化させた要因になったと考えられた。MITOL は、A β オリゴマーの生成をブロックすることでアルツハイマー病の病態を緩和することや [53]、神経変性疾患の治療のための潜在的な創薬ターゲットになることが期待されている [54]。従って、MITO-Porter (BBR) による細胞内 ATP 産生および MITOL 発現レベルの増加は、神経変性疾患の治療のための治療基盤技術として役立つことが期待される。

MITO-Porter が神経細胞に取り込まれミトコンドリア機能を向上させることを確認したが、軸索形成した細胞において粒子の細胞内局在は確認していない。そこで、MITO-Porter が軸索を標的可能かどうか検証する必要がある。MITO-Porter が細胞体に多く局在する場合、軸索内を粒子が輸送する方法として細胞透過性ペプチドの他にモータータンパク質に結合するリガンドを修飾する必要がある。しかし、2 つの異なる粒子表面の機能性素子を用いるには修飾率や細胞機能への影響を慎重に検討しなければいけない。また、細胞体から軸索末端への粒子の輸送は長距離輸送を伴うため、軸索変性や軸索内エネルギー需要の変化により輸送が遮断される可能性がある。そこで、他の方法として粒子に軸索末端へ結合するペプチドを修飾することにより効率的な軸索末端への薬物送達が可能になると考えられた。

第二章

神経軸索末端標的型リポソームの調製

第二章 神経軸索末端標的型リポソームの調製

2 はじめに

脳疾患は長い間、人間の健康に対する深刻な脅威であり、近年の社会人口の高齢化に伴い社会に大きな負担を与えている。さらに、脳疾患は世界中で身体障害や死亡の主な原因である [55]。過去数十年間の発症率の増加にも拘わらず、現在の治療薬は進行を遅らせることしかできず脳疾患の根治療法がない [56, 57]。また、世界中で 15 億人以上の人々が、今後 15 年間でアルツハイマー病、パーキンソン病、脳卒中、精神障害などの脳疾患の少なくとも 1 つ以上に苦しむと推定されている [58]。現在、脳内の標的部位への薬物送達制限されていることが要因となり、中枢神経系 (Central Nervous System: CNS)) に対する多くの治療薬開発が失敗している。脳への薬物送達には大きく 2 つの問題がある [59]。1 つ目の問題は血液脳関門 (Blood-Brain barrier: BBB)) である。BBB は、CNS の恒常性を維持するために、大部分の高分子薬と約 98% の低分子薬が脳に送達することを防いでいる。そこで、世界中で BBB を効率的に突破する技術としてナノ粒子の開発が盛んに行われている。2 つ目の問題は BBB 突破後に特定の病変細胞を標的化することが困難であり、神経細胞やグリア細胞などの細胞やオルガネラに対する薬物の影響が十分に理解されていないことである。そのため、ナノ粒子を用いた BBB 突破後の標的及び非標的細胞やオルガネラに対する毒性や免疫原性の影響を評価することが、薬理作用増強において非常に重要である [60]。そこで、特定の細胞やオルガネラを標的とした薬物送達技術が必要であるが、それに関する報告はほとんどない。

神経細胞は細胞体、樹状突起、軸索から構成されている。タンパク質、RNA、オルガネラなどの生合成・分解は主に細胞体で行われている。そのため、細胞体から遠く離れた軸索末端では、物質代謝が低下しやすい。軸索末端における物質代謝を維持する機構として軸索輸送が存在している。軸索輸送はミトコンドリアが産生するエネルギーを駆動力としているため、ミトコンドリアの質が他の因子を維持する上で重要な役割を果たしている [61]。軸索末端におけるミトコンドリア軸索輸送を調節する方法として、細胞体におけるミトコンドリアの生合成を活性化し間接的に制御する方法や軸索末端のミトコンドリア機能を直接制御する方法がある。局所的なミトコンドリア軸索輸送の調節はオプトジェネティクス [34] やマイクロ流体デバイス [35] を用いた実験により、その有用性は確認されているにも拘わらず、外科的手術が必要であり、人体への影響など解明されていない点が多く臨床応用には至っていない。

LP による局所的なミトコンドリア軸索輸送の調節を行うために、局所的な薬物送達可能な LP を構築することが必要不可欠となる。LP 表面に R8 を修飾した MITO-Porter は、表面電位が正に帯電しているため非選択的に表面積の大きい細胞体に多く粒子が集積すると考えられる。一方、LP 表面に軸索末端に多く存在するシナプス構造の結合類似体を修飾することで、選択的に軸索末端に多く粒子が集積すると予想される (図 2-1)。

第一章で構築した MITO-Porter を用いて神経細胞に対する細胞取り込みを検証している。MITO-Porter システムを利用し効率的なミトコンドリアへの薬物送達の結果、ミトコンドリア機能を

向上させる可能性があることを示した [62]。しかし、初代培養神経細胞における MITO-Porter の細胞内局在は検証されていなかった。従って、本章では初代培養神経細胞を用いた粒子の細胞内局在を検証した。

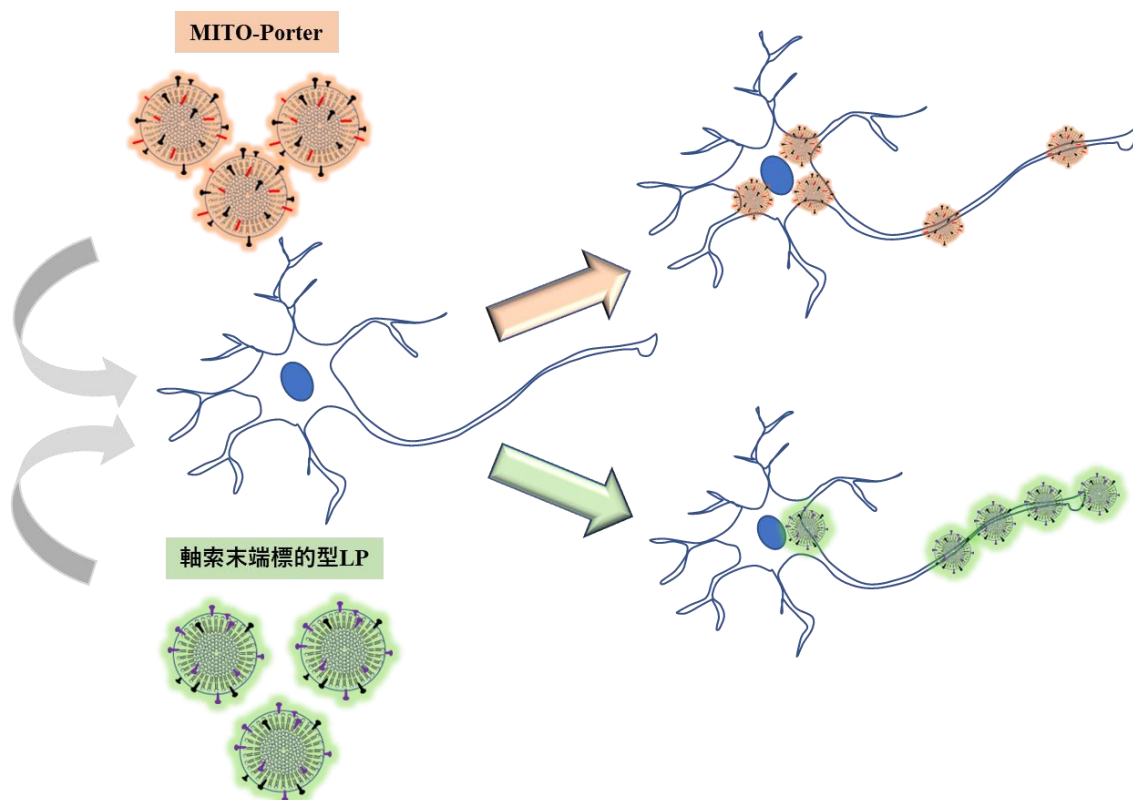


図 2-1 ペプチド修飾 LP の細胞内局在

結果

2-1 初代培養神経細胞における MITO-Porter の細胞内局在の検証

生後 5 日目のマウスから脳を摘出し、顕微鏡観察下にて髄膜などを除去した。その後、DNase I/トリプシン溶液を用いて初代培養神経細胞を単離した。さらに、Ara C 溶液を添加し、グリア細胞の増殖を抑えたものを本実験に用いた (図 2-2 (A))。本実験では細胞体をディッシュ中心に集め、外側に伸びた軸索の末端側を軸索末端と表記した (図 2-2 (B))。調製した MITO-Porter の細胞内局在を確認するために、初代培養神経細胞に対して 0.5 mol% の DiD を修飾させた粒子を添加し、2 時間後の細胞内局在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。観察前に MitoTracker Green でミトコンドリアを染色した。DiD 標識 MITO-Porter をピンク色、ミトコンドリアを水色として疑似カラーを表示した。顕微鏡観察の結果、MITO-Porter は初代培養神経細胞の細胞体に多く粒子が局在している様子が観察された (図 2-2 (C))。一方、MITO-Porter は初代培養神経細胞の軸索末端にほとんど局在しない様子が観察された (図 2-2 (D))。

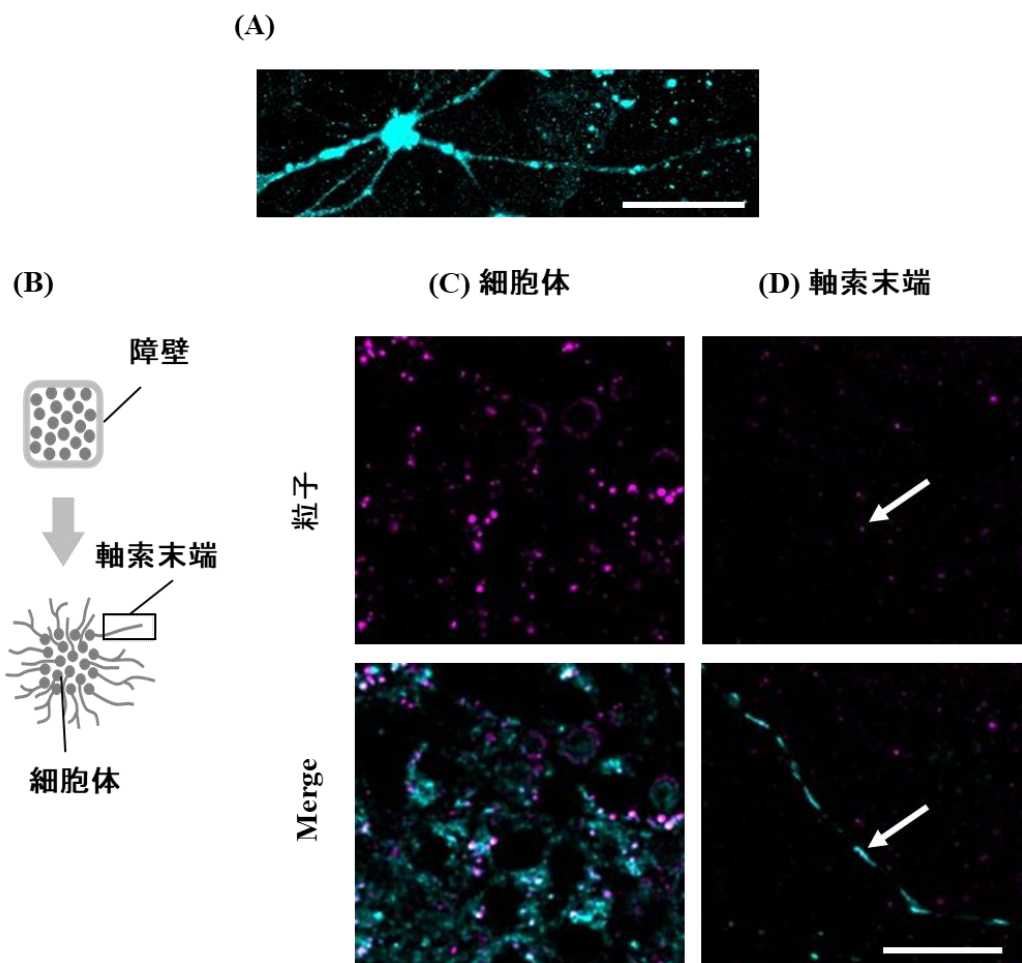


図 2-2 MITO-Porter の細胞局在観察

(A) 単離した初代培養神経細胞の形態を水色の疑似カラーとして示した (Bar 50 μm)。 (B) 観察対象の細胞体と軸索末端の模式図を示した。初代培養神経細胞に MITO-Porter を添加し、2 時間後の細胞体 (C) 及び軸索末端 (D) における細胞内局在を CLSM により観察した。MitoTracker Green (水色)、MITO-Porter (ピンク)、Bar 20 μm

2-2 神経軸索末端標的型 LP の調製

MITO-Porter は初代培養神経細胞の細胞体に多く集積するため、細胞体のミトコンドリアを活性化することが予想される。そこで、軸索末端に多く存在するシナプスの構造に結合する修飾因子を DOPE/SM-LP に結合し、軸索末端への集積を向上することを試みた。軸索末端に存在するニューレキシンに親和性のあるペプチドとして、Carbonic Anhydrase-related Protein (CAP) [63]、Cysteine-Rich Region (CRR) [64]、Neurexide (NRX) [65]、Neurexin Binding Site (NBS) [66] を選定した。ニューレキシンは細胞外に 3 つの EGF と 6 つの LNS を持ち、ペプチドはそれぞれ LNS やスレオニンが多い配列に結合する (図 2-3)。MITO-Porter、CAP 修飾 LP (CAP-LP)、CRR 修飾 LP (CRR-LP)、NRX 修飾 LP (NRX-LP)、NBS 修飾 LP (NBS-LP) 及び粒子表面に R8 を修飾していない DOPE/SM-LP は、薄層水和法を用いて調製した。調製した CAP-LP の物性は平均粒子径 $276 \pm 29 \text{ nm}$ 、PdI 0.57 ± 0.1 、ゼータ電位 $-1.9 \pm 0.5 \text{ mV}$ であることを確認した (表 4)。CRR-LP の物性は平均粒子径 $138 \pm 14 \text{ nm}$ 、PdI 0.22 ± 0.02 、ゼータ電位 $-3.7 \pm 1.0 \text{ mV}$ であることを確認した (表 4)。NRX-LP の物性は平均粒子径 $99 \pm 3.0 \text{ nm}$ 、PdI 0.25 ± 0.03 、ゼータ電位 $22 \pm 0.6 \text{ mV}$ であることを確認した (表 4)。さらに、NSB-LP の物性は平均粒子径 $109 \pm 4.0 \text{ nm}$ 、PdI 0.24 ± 0.01 、ゼータ電位 $-2.4 \pm 1.2 \text{ mV}$ であることを確認した (表 4)。

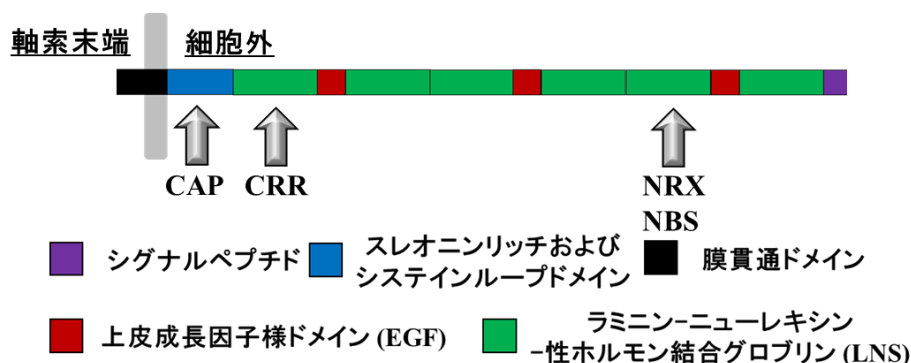


図 2-3 ニューレキシンの構造とペプチドの結合領域

ニューレキシンは細胞外に 3 つの EGF と 6 つの LNS を持つ。軸索末端標的ペプチドはそれぞれ LNS やスレオニンが多い配列に結合する。

表 4 薄層水和法により調製した LP の物性

LNP type	平均粒子径 (nm)	Polydispersity Index (PdI)	ゼータ電位 (mV)
DOPE/SM-LP	102 ± 4	0.21 ± 0.03	-5.3 ± 1.4
CAP-LP	276 ± 29	0.57 ± 0.09	-1.9 ± 0.5
CRR-LP	138 ± 14	0.22 ± 0.02	-3.7 ± 1.0
NRX-LP	99 ± 3	0.25 ± 0.03	22 ± 0.6
NBS-LP	109 ± 4	0.24 ± 0.01	-2.4 ± 1.2
MITO-Porter	93 ± 1	0.28 ± 0.04	25 ± 1.9

調製した LP の脂質組成は DOPE と SM (9:2, molar ratio)である。調製した LP の平均粒子径 (nm)、PdI、ゼータ電位 (mV)を示す。(mean with S.D., n = 3)

2-3 神経軸索末端標的型 LP による粒子の細胞取り込みの検証

調製した粒子のペプチド修飾による細胞取り込みへの影響を評価するために、Neuro2a 細胞に対して 0.5 mol% の DiD を修飾させた粒子を添加した。Neuro2a 細胞は、ニューレキシンが発現していることが報告されている [67]。細胞取り込み評価はフローサイトメーターを用いて行った。細胞取り込みは DiD 標識した粒子の取り込み量を蛍光強度により算出した。フローサイトメーターを用いた細胞取り込みの結果、Neuro2a 細胞に対して軸索末端標的ペプチドとして NBS を用いた NBS-LP は MITO-Porter の細胞取り込みと同程度高かった (図 2-4 (A))。さらに、ペプチドの特異性を評価するために Neuro2a 細胞又は HeLa 細胞に対して 0.5 mol% の DiD を修飾させた粒子を 15 分又は 2 時間添加した。その結果、添加時間の増加に伴い、Neuro2a 細胞において軸索末端標的ペプチドを修飾した粒子の細胞取り込みが HeLa 細胞と比較して増加することが示された (図 2-4 (B))。

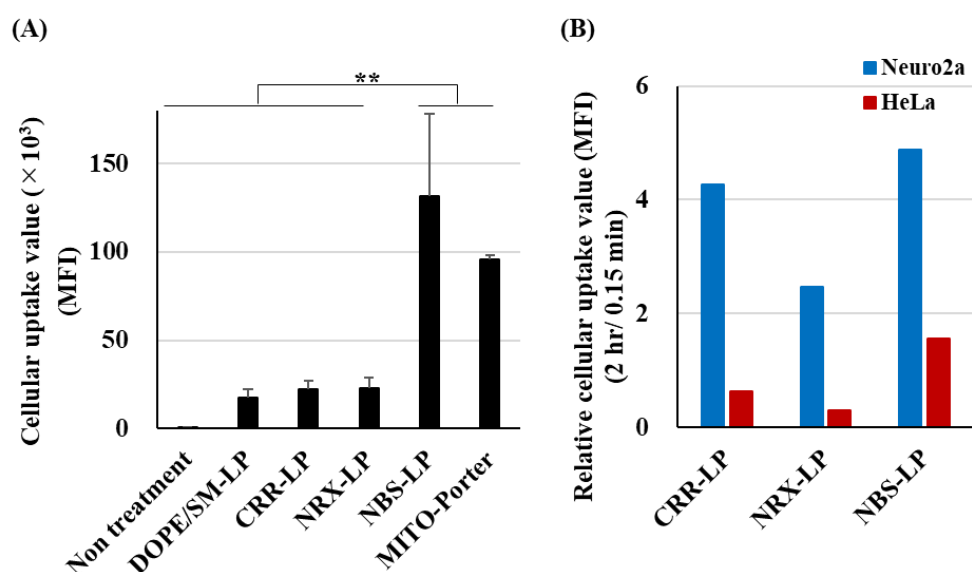


図 2-4 Neuro2a 細胞又は HeLa 細胞における LP の細胞取り込み評価

DOPE/SM-LP、MITO-Porter、CRR-LP、NRX-LP 又は NBS-LP の細胞取り込みの結果を示す。本実験では DiD 修飾した LP を用いて、蛍光強度をもとに細胞取り込みの値を算出した。(A) Neuro2a 細胞に LP を添加し、2 時間後における細胞取り込みを評価した。(** $p < 0.01$ one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.) (B) Neuro2a 細胞又は HeLa 細胞に LP を添加し、細胞取り込みの増加量は 2 時間後における細胞取り込みを 15 分添加した細胞取り込みの値を用いて相対値を算出した。

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

2-4 初代培養神経細胞の細胞体における神経軸索末端標的型 LP の細胞内局在の検証

調製した DOPE/SM-LP、NBS-LP 及び MITO-Porter の細胞内局在を確認するために、初代培養神経細胞に対して 0.5 mol% の DiD を修飾させた粒子を添加し、2 時間後の細胞内局在を CLSM により観察した。観察前に MitoTracker Green でミトコンドリアを染色した。DiD 標識 MITO-Porter をピンク色、ミトコンドリアを水色として疑似カラーを表示した。顕微鏡観察の結果、NBS-LP は初代培養神経細胞の細胞体にほとんど局在しない様子が観察された (図 2-5 (A))。細胞体に取り込まれた粒子量は ImageJ を用いて二値化を行い Analyze particle により粒子量を算出した。その結果、細胞体に取り込まれた粒子量は MITO-Porter が DOPE/SM-LP 又は NBS-LP と比較して 10 倍程度増加することが示された (図 2-5 (B))。

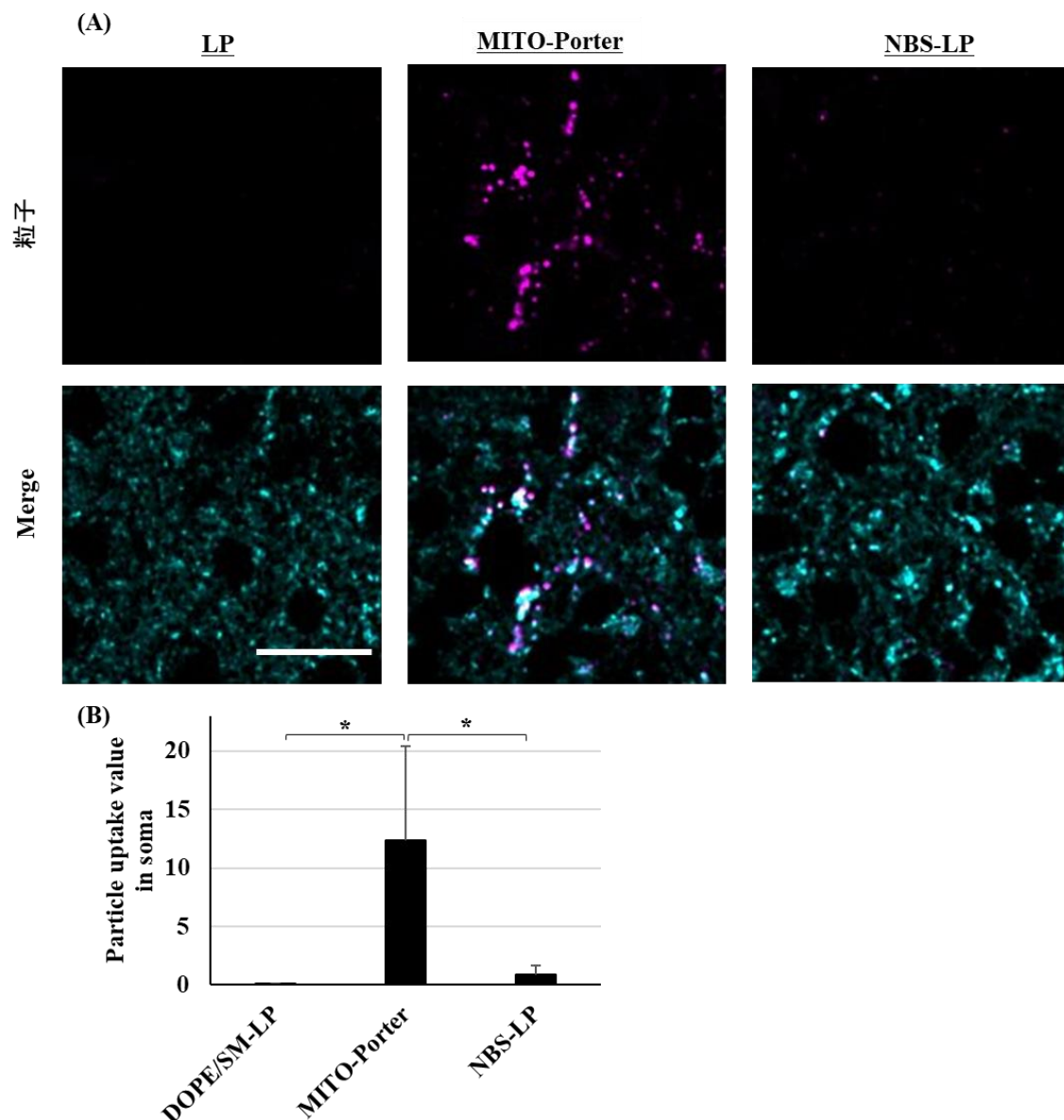


図 2-5 神経軸索末端標的型 LP の細胞内局在評価 (細胞体)

初代培養神経細胞に DOPE/SM-LP、MITO-Porter 又は NBS-LP を添加し、2 時間後の細胞体における細胞内局在を CLSM により観察した (A)。観察された粒子の輝度を ImageJ により二値化を行い Analyze particle を用いて粒子量を解析した。細胞取り込み量は各画像中の全細胞数に対する粒子の局在がみられた細胞数に粒子の細胞取り込み量を掛け算出した (B)。MitoTracker Green (水色)、MITO-Porter (ピンク色)、Bar 20 μm (mean with S.D., $n=3-4$, $*p < 0.05$ one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.)

2-5 初代培養神経細胞の軸索末端における神経軸索末端標的型 LP の細胞内局在の検証

調製した DOPE/SM-LP、NBS-LP 及び MITO-Porter の細胞内局在を確認するために、初代培養

神経細胞に対して 0.5 mol% の DiD を修飾させた粒子を添加し、2 時間後の細胞内局在を CLSM により観察した。観察前に MitoTracker Green でミトコンドリアを染色した。DiD 標識 MITO-Porter をピンク色、ミトコンドリアを水色として疑似カラーを表示した。顕微鏡観察の結果、NBS-LP は初代培養神経細胞の軸索末端に複数個局在している様子が観察された (図 2-6 (A))。軸索末端に取り込まれた粒子量は ImageJ を用いて二値化を行い Analyze particle により粒子量を算出した。その結果、軸索末端に取り込まれた粒子量は NBS-LP が MITO-Porter と比較して 3 倍程度増加することが示された (図 2-6 (B))。

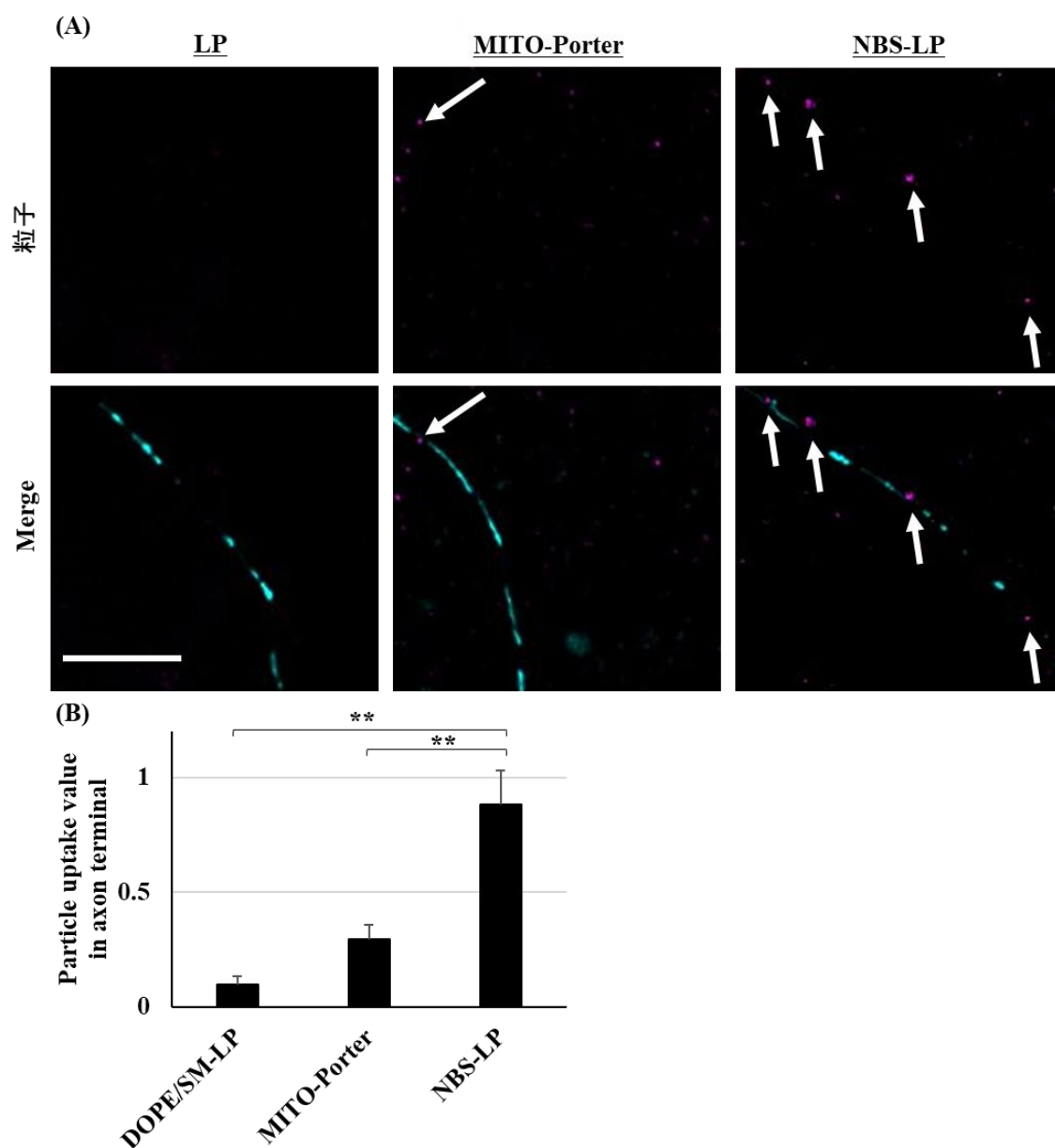


図 2-6 神経軸索末端標的型 LP の細胞内局在評価 (軸索末端)

初代培養神経細胞に DOPE/SM-LP、MITO-Porter 又は NBS-LP を添加し、2 時間後の軸索末

端における細胞内局在を CLSM により観察した (A)。観察された粒子の輝度を ImageJ により二値化を行い Analyze particle を用いて粒子量を解析した。細胞取り込み量は画像中の全軸索数に対する粒子の局在がみられた軸索数に粒子の細胞取り込み量を掛け算出した (B)。MitoTracker Green (水色)、MITO-Porter (ピンク色)、Bar 20 μm
(mean with S.E., n=16-22, **p < 0.01 Tukey's test.)

考察

本研究では、LP 表面に修飾するペプチドを変更し、初代培養神経細胞における粒子の細胞内局在制御を行えるかという問題に焦点を当てた。はじめに初代培養神経細胞における MITO-Porter の細胞内局在評価を行った。MITO-Porter は細胞体で多く局在することが観察され、軸索末端ではほとんど局在しないことが確認された (図 2-2 (B))。MITO-Porter は粒子表面に修飾するペプチドとして R8 を用いたことで、ゼータ電位が正に帯電し、細胞膜やミトコンドリア外膜など膜表面が負に帯電しているものへの結合が増加する。これまで、カチオン性ナノ粒子は神経細胞の細胞体に多く局在することが確認されている [68, 69]。軸索末端にはシナプスが多く存在するため、膜電位は変動している [70]。以上のことから、MITO-Porter は正に帯電しているため膜電位が負に帯電している細胞体に多く結合したことが細胞体への局在増加の要因になったと考えられた。

軸索末端における局所的な変化は神経機能維持に重要な役割を果たすことが示唆されているが、現在報告されている方法には制限があった。そこで、LP を用いた軸索末端局所的な薬物を行うための LP の開発を試みた。軸索末端標的型ペプチドを修飾した LP を用いた結果、HeLa 細胞と比較して Neuro2a 細胞では、粒子の添加時間の増加に伴い取り込みが 4 倍以上増加した (図 2-4 (B))。また、軸索末端標的型ペプチドを修飾した NBS-LP は添加 15 分後において既に取り込み量が CRR 又は NRX を修飾した LP と比較して 5 倍程度高く、その後の取り込み効率と同じ割合で起こっている可能性が示唆された (図 2-4 (A), (B))。Neuro2a 細胞ではニューレキシンが発現しているため、LP 表面のペプチドとの結合が増加したことが取り込み増加の要因になったと考えられた。

ニューレキシンは軸索末端に多く存在するシナプスで発現している。そこで、軸索末端標的ペプチドを LP 表面に修飾した結果、初代培養神経細胞における軸索末端での粒子は MITO-Porter と比較して 3 倍程度増加した (図 2-6 (B))。Neuro2a 細胞においてニューレキシンは細胞膜上に一様に分布しているが、初代培養神経細胞においては細胞体で合成されたニューレキシンは軸索輸送により、軸索末端に輸送され、軸索末端の細胞膜上に多く発現していることが NBS-LP の細胞内局在を変化させる要因になったと考えられた。以上のことから、MITO-Porter 及び NBS-LP はそれぞれ細胞体及び軸索末端に局所的な薬物送達が行えることが予想される。今後、さらに軸索末端における取り込みの特異性を確認するためにシナプスマーカーを用いた共染色やニューレキシンのノックダウンや強制発現により取り込み効率に変化がみられるか調べる必要がある。MITO-Porter は細胞体におけるミトコンドリアへの効率的な薬物送達により、ミトコンドリア機能を調節できる可能性がある。細胞体におけるミトコンドリア機能向上は細胞全体の恒常性維持において重要な役割を果たすが、軸索末端へは長距離輸送が不可欠であるため遠く離れた領域への影響はさらに調べる必要がある。

第三章

細胞体及び軸索末端への局所的な薬物送達による神経機能の検証

第三章 細胞体及び軸索末端への局所的な薬物送達による神経機能の検証

3 はじめに

神経細胞は人体のすべての細胞の中で最も複雑で精巧な構造を有している。長く伸びた軸索を形成し維持するためには、細胞体で生合成された mRNA、タンパク質、脂質及びオルガネラなどを細胞全体に能動的に輸送し、誤って折りたたまれたタンパク質や凝集体を細胞体へ輸送し除去することが不可欠である。これらの輸送にはミトコンドリアが産生する ATP が必要であり、ミトコンドリアが適切に軸索内に配置され、品質を維持することが重要である [61]。細胞体において生合成された健康なミトコンドリアは順行性輸送により軸索末端に輸送され、エネルギー供給することによりエネルギー恒常性に寄与している [71]。一方、軸索末端において損傷したミトコンドリアは逆行性輸送により細胞体に輸送され、分解されることでミトコンドリアの質を維持している [71]。これまで、神経変性疾患の発症に異常タンパクの蓄積や RNA 代謝異常が関与していることが報告されている [72, 73]。これらは、神経細胞の機能低下や自覚症状が現れる前にすでに確認されている。近年、異常タンパク質の蓄積に先行して、軸索末端におけるミトコンドリアの軸索輸送が低下していることが確認されている。そのため、神経変性疾患初期の治療標的として、局所的なミトコンドリア軸索輸送の調節が注目されている。

神経細胞が有する樹状突起と軸索の特殊化は、神経細胞が電気信号を送受信できるようにするシナプスの形成をもたらすため、機能的な神経系の発達において重要である [74]。神経突起伸長の阻害は神経機能喪失に関与し、多くの神経変性疾患につながる [75]。エネルギーを消費する過程である神経突起の伸長は、主な細胞エネルギー供給源であるミトコンドリアに大きく関与している [9]。

BBR は神経保護作用を示すことが確認されているが [44, 76]、神経突起に関しては軸索伸長 [77, 78] や軸索退縮 [79] を促進するという相反する作用が報告されている。軸索伸長に対する BBR の作用は、神経のエネルギー状態に大きく依存している可能性が高い。しかし、BBR の軸索長に対する作用において軸索内エネルギー恒常性の維持に寄与しているミトコンドリア動態に関しては明らかにされていない。

LP による局所的な BBR 送達は軸索末端におけるミトコンドリア動態や軸索長に対して異なる作用を示すと考えられる。細胞体に多く集積する Naked BBR や MITO-Porter (BBR) は、細胞体でのエネルギー需要が大きくなるため軸索末端への影響は小さくなると考えられる。一方、軸索末端に多く集積する NBS-LP (BBR) は、軸索末端でのエネルギー需要が大きくなるため軸索末端への影響が大きくなると予想される (図 3-1)。

第一章では BBR の細胞内動態制御がミトコンドリア機能を向上させることを示した [62]。また、第二章では異なる LP を用いて初代培養神経細胞に対する細胞体又は軸索末端への局所的な薬物送達が可能になることを示した。しかし、初代培養神経細胞に対する局所的な BBR 送達が神経機能に変化を引き起こすか検証していない。従って、本章では、初代培養神経細胞を用いて BBR による神経機能への影響をミトコンドリア動態及び軸索長をもとに検証した。

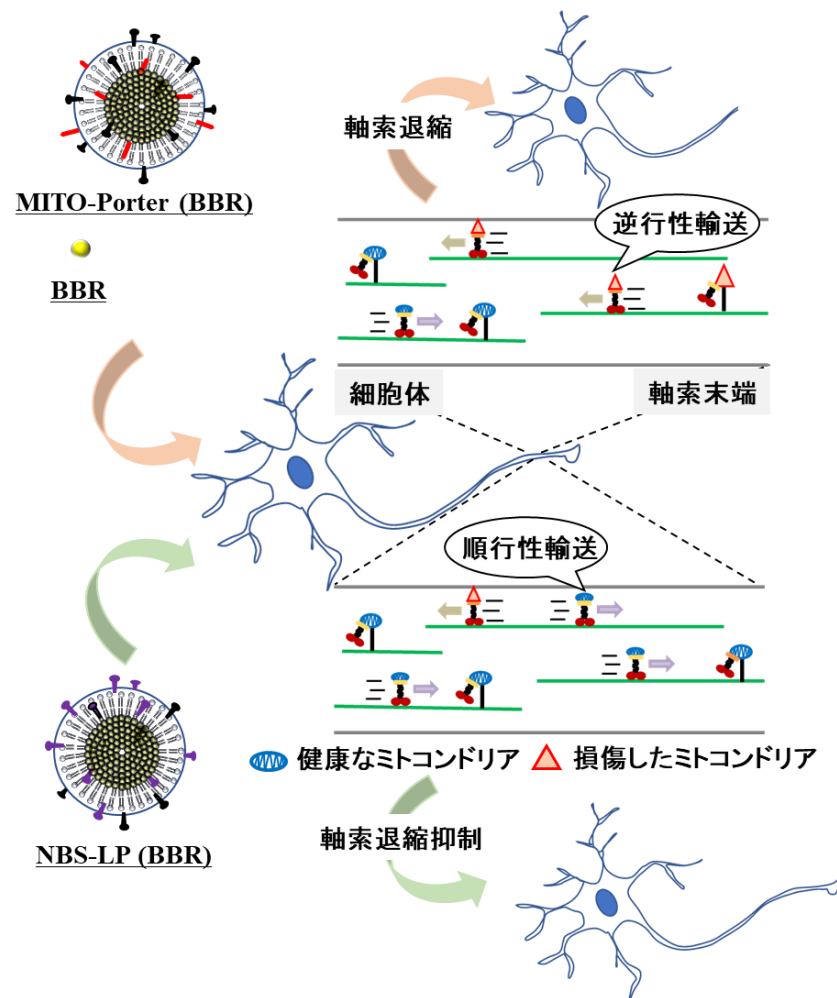


図 3-1 局所的な BBR 送達におけるミトコンドリア軸索輸送及び軸索長への影響

BBR の局所的な薬物送達により、一時的なエネルギー要求が高まりミトコンドリア軸索輸送の変化を介してエネルギー恒常性を維持する。MITO-Porter (BBR)は細胞体へ局所的な BBR 送達を可能とし、細胞体におけるエネルギー要求を満たすため順行性輸送が減少した結果、軸索退縮すると予想される。また、NBS-LP (BBR)は軸索末端へ局所的な BBR 送達を可能とし、軸索末端におけるエネルギー需要を満たすため順行性輸送が増加した結果、軸索退縮を抑制すると予想される。

結果

3-1 局所的な BBR 送達によるミトコンドリア軸索輸送の検証

BBR を封入していない MITO-Porter、BBR を封入した MITO-Porter (MITO-Porter (BBR))、及び BBR を封入していない NBS-LP、BBR を封入した NBS-LP (NBS-LP (BBR))は、薄層水和法を用いて調製した。調製した MITO-Porter の物性は BBB 封入の有無により変化しなかった (表 5)。また、調製した NBS-LP の物性は BBR 封入の有無により変化しなかった (表 5)。

調製した粒子の BBR の有無によるミトコンドリア軸索輸送への影響は、培養 4 日目の初代培養神経細胞に対して粒子を添加し、2 時間後のミトコンドリア軸索輸送を CLSM によりタイムラプス観察 (8 秒間隔 5 分間)し評価した (図 3-2 (A))。観察前に MitoTracker Green でミトコンドリアを染色した。ミトコンドリアを水色として疑似カラーを表示した。ミトコンドリア軸索輸送はタイムラプス画像をもとに Image J により kymograph を作成し (図 3-2 (B))、移動距離が 5 μm 未満のものを静止性ミトコンドリア、移動距離が 5 μm 以上のものを運動性ミトコンドリアと判別し、定量化した。ミトコンドリア軸索輸送評価の結果、Naked BBR 又は MITO-Porter (BBR)処理はミトコンドリア軸索輸送を未処理と比較して 40%程度低下させた (図 3-2 (C))。一方、NBS-LP (BBR)処理はミトコンドリア軸索輸送を変化させず、未処理と同程度のミトコンドリア軸索輸送を維持していることが示された (図 3-2 (C))。さらに、ミトコンドリア軸索輸送の内軸索末端への輸送を示す順行性輸送の割合を定量化した。ミトコンドリア順行性輸送評価の結果、NBS-LP (BBR)処理は Naked BBR 又は MITO-Porter (BBR)処理と比較して 40%程度増加させた (図 3-2 (D))。

表 5 薄層水和法により調製した LP の物性

LNP type	平均粒子径 (nm)	Polydispersity Index (PdI)	ゼータ電位 (mV)
MITO-Porter	112 $\pm$ 4.5	0.27 $\pm$ 0.07	21 $\pm$ 8.3
MITO-Porter (BBR)	105 $\pm$ 4.6	0.22 $\pm$ 0.11	22 $\pm$ 4.4
NBS-LP	117 $\pm$ 16	0.21 $\pm$ 0.12	- 5.7 $\pm$ 2.6
NBS-LP (BBR)	113 $\pm$ 16	0.25 $\pm$ 0.06	- 7.2 $\pm$ 2.9

調製した LP の脂質組成は DOPE と SM (9:2, molar ratio)である。調製した LP の平均粒子径 (nm)、PdI、ゼータ電位 (mV)を示す。(mean with S.D., n = 3)

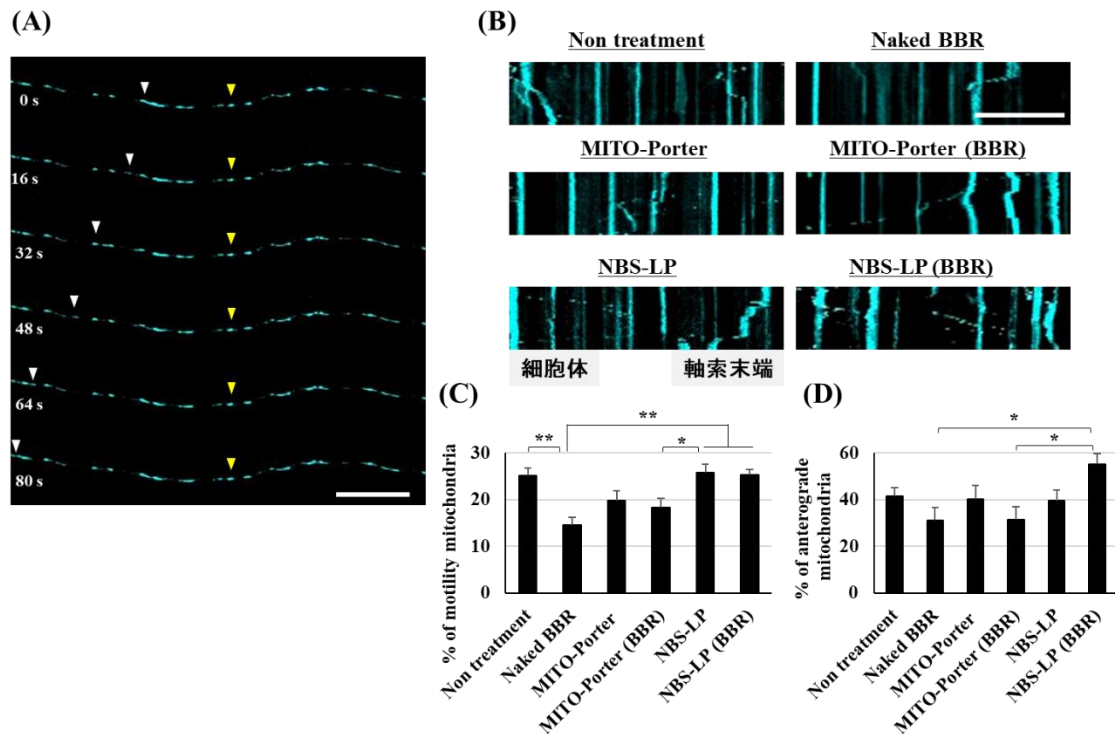


図 3-2 初代培養神経細胞に対するサンプル処理によるミトコンドリア軸索輸送評価

培養 4 日目の初代培養神経細胞に Naked BBR、MITO-Porter、MITO-Porter (BBR)、NBS-LP 又は NBS-LP (BBR)を添加し、2 時間後のミトコンドリア軸索輸送を CLSM によりタイムラプス観察した (8 秒間隔 5 分間)(A)。白色の矢頭は運動性ミトコンドリアを示し、黄色の矢頭は静止性ミトコンドリアを示す。ミトコンドリア軸索輸送は Image J を用いて作成した kymograph をもとに、移動距離が 5 μm 未満のものを静止性ミトコンドリア、移動距離が 5 μm 以上のものを運動性ミトコンドリアと判別し、定量化した (B)。運動性ミトコンドリアは全ミトコンドリアに対する割合として示された (C)。順行性輸送しているミトコンドリアは運動性ミトコンドリアに対する割合として示された (D)。MitoTracker Green (水色)、Bar 20 μm

(mean with S.E., n=24-43, *p < 0.05 **p < 0.01 Tukey's test.)

3-2 局所的な BBR 送達による軸索長変化への影響

調製した粒子の BBR の有無による軸索長への影響は、培養 4 日目の初代培養神経細胞に対して粒子を添加し、直後 (図 3-3 (A))又は 24 時間後 (図 3-3 (B))の軸索を多色蛍光タイムラプス顕微鏡により観察し、単一軸索をランダムに抽出し評価した。軸索長は明視野画像をもとに Image J を用いて定量化した。多色蛍光タイムラプス顕微鏡を用いたサンプル添加 24 後における軸索長評価の結果、Naked BBR 処理は未処理と比較して軸索長を 20%程度減少させた (図 3-3 (C))。また、MITO-Porter (BBR)処理は未処理と比較して軸索長を 10%程度減少させた (図 3-3 (C))。一方、NBS-LP (BBR)処理は未処理と比較して軸索長を 5%程度増加させた (図 3-3 (C))。

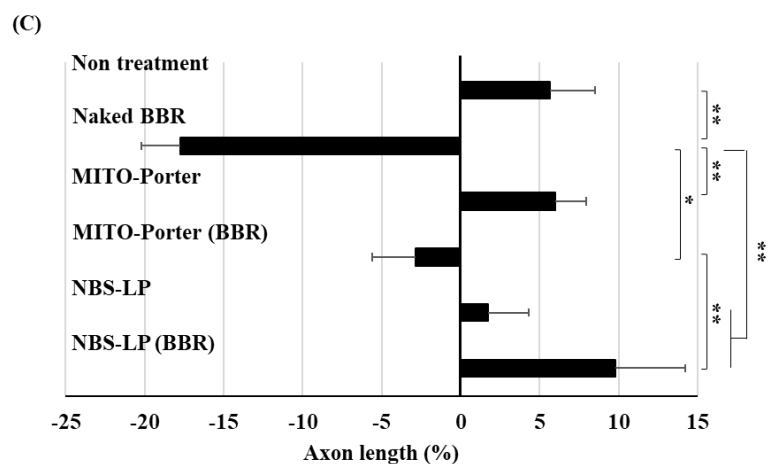
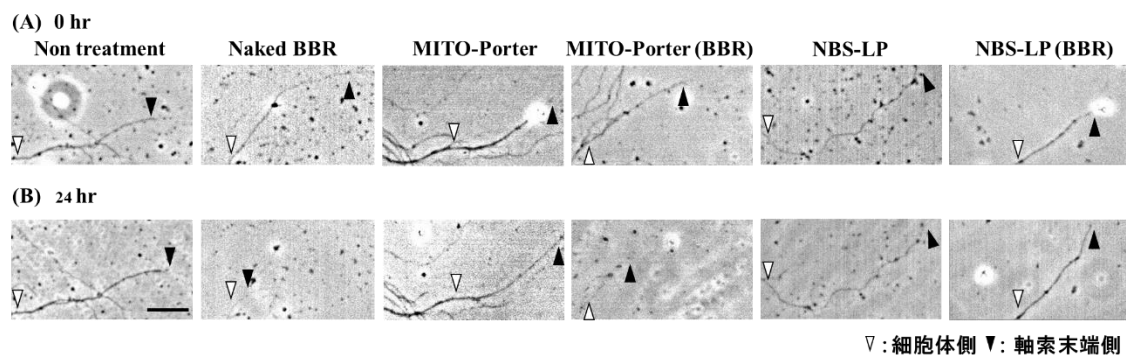


図 3-3 初代培養神経細胞に対するサンプル処理による軸索長評価

培養 4 日目の初代培養神経細胞に Naked BBR、MITO-Porter、MITO-Porter (BBR)、NBS-LP 又は NBS-LP (BBR)を添加し、直後 (A)又は 24 時間後 (B)におけるの軸索長変化を TIRF により観察した。白色の矢頭は細胞体側を示し、黒色の矢頭は軸索末端側を示す。軸索長へのサンプル処理による影響はサンプル処理直後及び 24 時後の明視野画像をもとに Image J を用いて定量化した。軸索長変化はサンプル添加直後における軸索長に対する割合として示された (C)。

Bar 40 μ m

(mean with S.E., n=25-44, *p < 0.05 **p < 0.01 Tukey's test.)

考察

本研究では、LP 表面に修飾するペプチドを変更し、初代培養神経細胞の細胞体及び軸索末端への薬物送達が発現作用に影響を与えるかに焦点を当てた。BBR はミトコンドリアに作用し、細胞内エネルギー恒常性を調節するため、ミトコンドリア軸索輸送への影響に着目した。ミトコンドリア軸索輸送は細胞全体のエネルギー恒常性の維持に寄与しているため、BBR による一時的なエネルギー恒常性の変化は BBR の局在変化によりミトコンドリア軸索輸送が変化すると予想された。第二章において、表面電位が正に帯電している MITO-Porter は非選択的に細胞に取り込まれ細胞体に多く集積することが確認されている。そのため、正に帯電している BBR も同様に非選択的に細胞に取り込まれ細胞体に多く集積すると考えられる。はじめに初代培養神経細胞における局所的な BBR 送達に対する軸索末端におけるミトコンドリア軸索輸送評価を行った。Naked BBR 処理は軸索末端におけるミトコンドリア軸索輸送を 40%程度低下させた (図 3-2 (C))。また、MITO-Porter (BBR)処理はこの低下を一部抑制した。一方、NBS-LP (BBR)処理は軸索末端におけるミトコンドリア軸索輸送を変化させなかった。以上のことから、BBR の局所的な薬物送達がミトコンドリア軸索輸送を変化させるうえで重要であると考えられた。

BBR は AMPK の活性化により、軸索末端へのミトコンドリア輸送を行うモータータンパク質であるキネシンの活性に影響を与える可能性がある。これまで、キネシンの活性化に必要な cAMP response element-binding protein (CREB)が AMPK により発現レベルの調節を行うことが報告されている [80, 81]。そのため、局所的な BBR 送達はモータータンパク質の活性化状態やエネルギー需要の変化に伴いミトコンドリア軸索輸送方向に変化をもたらすと示唆された。また、軸索末端におけるモータータンパク質の活性化の変化は、細胞体における変化と比較してミトコンドリアの移動距離が短くなるため、より軸索末端へのミトコンドリア送達が可能になると考えられた。しかし、現在それに関する報告はない。そこで、初代培養神経細胞を用いてミトコンドリアの軸索輸送方向を評価した。Naked BBR や MITO-Porter (BBR)処理は細胞体に多く集積したことにより、細胞体におけるエネルギー需要を満たすために軸索末端へのミトコンドリア軸索輸送を低下させた可能性が示唆された(図 3-2 (D))。一方、NBS-LP (BBR)処理は軸索末端に多く集積したことで、軸索末端におけるエネルギー需要を満たすために軸索末端へのミトコンドリア軸索輸送を増加させた可能性が考えられた(図 3-2 (D))。また、NBS-LP において軸索末端への輸送は増加していないため、BBR の局所的な送達によりミトコンドリア動態が変化した可能性が示唆された。AMPK の活性化因子である 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR)処理はミトコンドリアの順行性輸送を増加させることが報告されているため [12]、BBR によるミトコンドリア動態への影響は AMPK の活性化に依存している可能性が高いがモータータンパク質や微小管関連タンパク質への影響をさらに調べる必要がある。

これまで、神経変性疾患は細胞体での物質の生合成・分解機構に異常が生じることや軸索変性により発症すると考えられていた。しかし、神経変性疾患が軸索末端で始まり、ミトコンドリア軸索輸送変化がこれに関与していることが近年報告され、新たな疾患発症の仮説として注目されている [82]。軸索末端におけるミトコンドリア軸索輸送の低下は神経変性疾患の進行を加速させる

ため、ミトコンドリア軸索輸送を改善することが初期の治療方法として期待されている [83-85]。以上のことから、ミトコンドリア軸索輸送を調節することは、軸索のエネルギー需要を感知して対処するだけでなく、他の因子の輸送を維持することにより細胞全体の機能を保つため上で重要である可能性が示唆されている。NBS-LPを用いた局所的な薬物送達には軸索末端のミトコンドリア動態を制御できるため、ミトコンドリア動態と神経変性疾患の因果関係を明らかにするために用いることで新規の治療法や診断技術の開発に応用できると考えられた。

神経突起やシナプス形成など大きな構造変化にはエネルギーが必要であるため、これらの変化に応じてミトコンドリア軸索輸送が変化している [86]。そのため、局所的な BBR 送達によるミトコンドリア軸索輸送変化は軸索長に影響を及ぼすと予想された。そこで、初代培養神経細胞を用いて軸索長評価を行った。Naked BBR と MITO-Porter (BBR)処理は未処理と比較して軸索退縮を誘発することが確認された (図 3-3 (C))。しかし、BBR をミトコンドリアへより効率的に送達可能な MITO-Porter はこの作用を一部抑制することが確認された。これは BBR のミトコンドリア以外への集積により、細胞体における DNA やタンパク質などの生合成分解に悪影響を及ぼした可能性が示唆された。一方、NBS-LP (BBR)処理は Naked BBR や MITO-Porter (BBR)と比較して順行性輸送のミトコンドリア軸索輸送増加に伴い、軸索末端におけるエネルギー需要を満たした結果、軸索退縮を抑制した可能性が示唆された (図 3-3 (C))。これは、軸索再生などの先行研究と一致し [87]、局所的なミトコンドリア軸索輸送制御が神経機能を変化させるうえで重要な役割を果たしていると考えられた。また、異なる局所的な BBR 送達による軸索長への影響は、AMPK の活性化が軸索伸長を誘導することや非選択的な Akt の局在が軸索退縮を誘導した報告と一致している [88, 89]。しかし、BBR の細胞への取り込み量依存的にミトコンドリア軸索輸送や軸索長に影響を及ぼしている可能性があるため、Naked BBR と NBS-LP (BBR)処理により細胞へ BBR が取り込まれたもののみを対象として薬理作用をさらに調べる必要がある。

結語

本研究において得られた成果を以下にまとめる。

1. BBR 搭載 MITO-Porter の利用は神経細胞のミトコンドリアへの BBR 集積量増加に成功した。
2. MITO-Porter を用いて BBR を効率的にミトコンドリアへ送達したことで、ATP 産生量や MITOL 発現量の増加に成功した。
3. 初代培養神経細胞に対して細胞体又は軸索末端へ局所的な粒子の局在を示すナノキャリアの構築を実現した。
4. 初代培養神経を用いて軸索末端局所的な薬物送達可能なナノキャリアによる BBR 送達は、ミトコンドリア軸索輸送と軸索退縮抑制作用に対し異なる効果を示すことに成功した。

本研究を通して得られた成果をこの先の研究へと繋げ、さらなる研究の発展を目指すことにより、神経軸索末端やミトコンドリアを標的とした神経変性疾患治療の実現に貢献できることを期待し本稿を終える。

実験方法

実験試薬・材料

細胞培養関連

Neuro2a 細胞 (CCL-131)、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)は ATCC (Manassas, VA, USA)より購入した。Penicillin/ Streptomycin (10,000 U/mL)、10 ×HBSS、D (+)-グルコース及び Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High glucose は FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, JAPAN)より購入した。胎児牛血清 (Fetal Bovine Serum: FBS)、Poly-L-ornithine、L-glutamine、Basal Medium Eagle (BME)及びフェノールレッドナトリウム塩は 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、B-27™ Plus Neuronal Culture System は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA)より購入した。flexiPERM は Sarstedt (Nümbrecht, Germany)より購入した。Cell Banker は Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd. (Fukushima, JAPAN)より購入した。Trypsin (Bovine Pancreas, 2×)、DNase I は Worthington Biochemical Co. (Lakewood, NJ, USA)より購入した。

粒子調製関連

DOPE 及び DMG-PEG-2k は NOF Corporation (Tokyo, JAPAN)より購入した。SM は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)より購入した。STR-R8、STR-CAP、STR-CRR、STR-NRX 及び STR-NBS は TORAY Industries, Inc. (Tokyo, JAPAN)より購入した。DiD は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA)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。Spectra/Por 4 dialysis membrane (MWCO : 12,000-14,000)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、Bovine Serum Albumin (BSA)及びナイロンメッシュは FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, JAPAN)より購入した。

ミトコンドリア単離関連

Sucrose と EDTA は FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, JAPAN)より購入した。Tris は Nacalai Tesque (Kyoto, JAPAN)より購入した。Mitochondrial Isolation Kit for Mammalian Cells は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA)より購入した。

ミトコンドリア呼吸機能測定関連

Seahorse XFp Cell Mito Stress test Kit、XF DMEM Medium、キャリブレーション用液、1.0 mM グルコース溶液、100 mM ピルビン酸塩溶液及び 200 mM グルタミン酸溶液は Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)より購入した。

PCR 関連

RNeasy mini kit は QIAGEN (Hilden, Germany)より購入した。TURBO DNA-free kit と High capacity RNA to cDNA kit は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA)より購入した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix は TOYOBO Co., Ltd. (Osaka, JAPAN)より購入した。使用したプライマー配列を以下に示す。全て 5'→3'として記載しており、100 µM 脱塩精製の状態で購入した。

MITOL;

Forward: GAG CAG TGA CAG TGA TGC AG

Reveres: AGG ACA ACC TAT CCC TGG AA

β-actin;

Forward: AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC

Reveres: CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT

顕微鏡関連

MitoTrackerTM Green FM は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA)より購入した。

その他

ATP assay kit (colorimetric/fluorometric)は Abcam (Cambridge, UK)より購入した。Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System は TAKARA BIO Inc. (Shiga, JAPAN)より購入した。

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 (日本医科器械製作所, Osaka, JAPAN)
自動炭酸ガス細胞培養装置: 5400 (NAPCO)、MCO-19AIS, 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)

PCR 関連

サーマルサイクラー: C1000, S1000 Touch Thermal Cycler (BIOLAB)
リアルタイム PCR システム: Light Cycler 480 (Roche)

顕微鏡関連

多色蛍光タイムラプス顕微鏡: 電動倒立顕微鏡 Ti (Nikon, Tokyo, JAPAN)
共焦点レーザー走査型顕微鏡: 共焦点レーザー顕微鏡システム A1 (Nikon, Tokyo, JAPAN)
対物レンズ: Plan Fluor ×10 objective lens (NA 0.30, Nikon)、Plan Fluor ×40 objective lens (NA 1.30, Nikon)
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 Nikon

その他

多本架冷却遠心機: AX-511 (TOMY, Tokyo, JAPAN)
微量高速遠心機: MX-200, 305 (TOMY, Tokyo, JAPAN)
小型冷却遠心機: himac CR22G III (Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Ibaraki, Japan)
フローサイトメーター: CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, 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 Instruments, Worcestershire, UK)

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

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

細胞外フラックスアナライザー: Seahorse XF HS Mini Analyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, 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, Bohemia, 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。オートクレーブによる高圧蒸気滅菌は 121°C、20 min で行い、フィルター濾過による滅菌は Advantech DISMIC-25AS 0.20 μm (Advantec Toyo Kaisha, Ltd., Tokyo, JAPAN)を用いて行った。

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 静置し、37°Cの温浴で解凍し、56°Cで 30 min 加温後、50 mL ずつ分注し-20°Cで保存した。

培地

Neuro2a 細胞：EMEM 450 mL に非働化 FBS 50 mL (最終濃度：10% FBS) と Penicillin/Streptomycin (10,000 U/mL) 5 mL (最終濃度: 100 U/mL)を混合し 4°Cで保存した。

初代培養神経細胞: B-27™ Plus Neuronal Culture System に Penicillin/Streptomycin (10,000 U/mL) 5 mL (最終濃度: 100 U/mL)を混合し 4°Cで保存した。

PBS (-)

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

1 M HEPES Buffer (pH 7.4 KOH)

HEPES 238.31 g を DDW で溶解後、1 N KOH にて pH 7.4 に調製し、1 L にメスアップしたものにフィルター滅菌濾過を行い 4°Cで保存した。

2.5 M glucose 溶液

D (+)-glucose 90 g を DDW 200 mL で溶解後高圧蒸気滅菌を行い 4°Cで保存した。

1 M NaHCO₃ 溶液

NaHCO₃ 8.401 g を DDW 100 mL で溶解後高圧蒸気滅菌を行い 4°Cで保存した。

HHGN 溶液

10 ×HBSS 50 mL に 1 M HEPES Buffer (pH 7.4 KOH) 1.25 mL、2.5 M glucose 溶液 7 mL 及び DDW を 440 mL 加えて高圧蒸気滅菌を行いクリーンベンチ内で 1 M NaHCO₃ 溶液 2 mL を混合

後 4°Cで保存した。

デオキシリボヌクレアーゼ溶液

DNase I粉末 25 mg に 2 mg/mL となるよう適量の DDW を加えて溶解後、クリーンベンチ内でフィルター滅菌濾過を行い-20°Cで保存した。

DnB 溶液

BME 40 mL にデオキシリボヌクレアーゼ溶液を 2 mL と Trypsin 400 mg を加えて 0.5 N NaOH にて pH 7.4 に調製し、クリーンベンチ内でフィルター滅菌濾過を行い-20°Cで保存した。

TDn 溶液

HHGN 溶液 40 mL にデオキシリボヌクレアーゼ溶液 2 mL と Trypsin 400 mg を加えて 0.5 N NaOH にて pH 7.4 に調製し、クリーンベンチ内でフィルター滅菌濾過を行い-20°Cで保存した。

Poly-L-オルニチン溶液

Poly-L-オルニチン 0.05 g に 1.5 mg/mL となるよう適量の DDW を加えて溶解後、クリーンベンチ内でフィルター滅菌濾過を行い-20°Cで保存した。

Ara-C 溶液

シタラビン 5 mg に DDW 20 mL を加えて溶解後、クリーンベンチ内でフィルター滅菌濾過を行い-20°Cで保存した。

粒子調製関連

10 mM HEPES Buffer (pH 7.4)

HEPES 238.31 mg を DDW で溶解後、1 N NaOH にて pH 7.4 に調製し、100 mL にメスアップしたものにフィルター滅菌濾過を行い 4°Cで保存した。

7.5 mM DOPE, SM 溶液 (EtOH)

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

7.5 mM DMG-PEG 2k 溶液 (EtOH)

DMG-PEG 2k 11.13 mg を EtOH 0.6 mL に溶解し、PEG 溶液を調製後-20°Cで保存した。

0.6 mM BBR 溶液 (HEPES)

BBR 2.231 mg を 10 mM HEPES Buffer 10 mL に溶解し、BBR 溶液を調製後遮光して 4°C で保存した。

20 mg/mL ペプチド溶液

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

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

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

STR-CAP: CAP 粉末に 20 mg/mL となるよう適量の溶液 (water/acetonitrile = 3/1, per volume) を加えて溶解後-20°C で保存した。

STR-NRX: NRX 粉末に 20 mg/mL となるよう適量の溶液 (water/acetonitrile = 3/1, per volume) を加えて溶解後-20°C で保存した。

1 mM DiD 溶液 (EtOH)

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

[Ex 644 nm/Em 665 nm]

その他

FACS Buffer

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

ヘパリン溶液

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

1 mM Mito Tracker Green

Mito Tracker Green 50 µg を DMSO (脱水) 92 µL に溶解し-20°C で保存した。

10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 溶液

DDW に SDS 5.0 g を加えて 4°C で保存した。

実験操作・方法

一般操作

Neuro2a 細胞

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 50 mL コニカルチューブに全量移した。遠心分離 (100 g、4°C、5 min)して上清を除き、細胞を 10 mL の培地で穏やかに懸濁させ 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、トリプシン溶液 (0.5%)を 2 mL 加え、37°C、5%CO₂、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 50 mL コニカルチューブに全量回収し、遠心分離 (800 rpm、4°C、3 min)して上清を除いた。細胞ペレットを培地 10 mL に懸濁し、ここから 10 μ L 取り、等量の 0.03%トリパンプルー溶液と混合した後、血球計算盤に注ぎ、顕微鏡観察下で生細胞数を計測した。算出された生細胞数に基づき、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。

初代培養神経細胞

細胞単離の前日に細胞の接着性を高めるために、Poly-L-オルニチンを用い、35 mm ガラスボトムディッシュ表面にコーティングを行った。本実験では生後 4~6 日のマウス (JcL: ICR) から脳を摘出した。摘出した脳を、表皮細胞の混入を防ぐために、HHGN 溶液の入ったシャーレ内で氷冷しながら実体顕微鏡下で髄膜の除去を行った。髄膜を除去後、15 mL コニカルチューブに脳を移し、HHGN 溶液で 3 回洗浄した後 TDn 溶液 1.5 mL を加えて室温で 20 min 静置した。その後、TDn 溶液を除去し HHGN 溶液で 3 回洗浄した後 DnB 溶液 1.5 mL 加えピペッティングし 5 min 氷冷上にて静置した。上清を 15 mL コニカルチューブに移し、再びペレットに DnB 溶液 1.5 mL 加えピペッティングし 5 min 氷冷上にて静置した。上清を 15 mL コニカルチューブに移し、遠心分離 (800 rpm、4°C、3 min)して上清を除いた。細胞ペレットを培地 5 mL に懸濁し、ここから 10 μ L 取り、等量の 0.03%トリパンプルー溶液と混合した後、血球計算盤に注ぎ、顕微鏡観察下で生細胞数を計測した。算出された生細胞数に基づき、任意の濃度になるように培地で希釈し、flexiPERM を接着した 35 mm ガラスボトムディッシュに播種して、37°C、5%CO₂条件下で培養した。培養 1 日後 flexiPERM を外し Ara-C 溶液を 500 μ L あたり 5 μ L 加え、3 日後にグルコース溶液を 500 μ L あたり 4 μ L 加えた。

薄層水和法による MITO-Porter の調製

ガラス試験管に脂質溶液 (DOPE/SM/DMG-PFG 2k = 9/2/0.33) 125 μ L とクロロホルム 125 μ L を添加し、デシケーターにて有機溶媒を除去して脂質薄膜を形成した。調製した BBR 溶液 250 μ L を加え室温で 15 min 水和させた後、バスタイプソニケーターにより 1 min ソニケーションした。調製

したサンプルにペプチド溶液を修飾するためにペプチド溶液 (脂質量の 10 mol%)を加え室温で 30 min インキュベーションした。調製したサンプルは Zetasizer Nano ZS を用いて粒子径及びゼータ電位を測定した。

未封入 BBR の除去操作

透析法: 調製したサンプルを透析膜に移し、外水相を 10 mM HEPES (pH 7.4)として 25°C、2 hr 透析した。透析終了後、透析膜からサンプルを回収した。

限外濾過法: 調製したサンプルを Amicon ultra-15 100K に移し、10 mM HEPES (pH 7.4)中で遠心分離 (1,000 g、25°C、40 min)した。遠心分離後、サンプルを回収した。

BBR の回収率

回収したサンプル溶液中の BBR の回収率は測定波長 350 nm を吸光度計で測定し、以下の式を用いて算出した。

$$\text{Recovery rate (\%)} = (\text{Final concentration of BBR} / \text{First concentration of BBR}) \times 100$$

フローサイトメーターを用いた細胞内取り込み評価

前培養として、サンプルを添加する 24±3 hr 前に細胞を 6 well plate に 2×10^5 cells/well になるように播種し、インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。サンプル添加前に PBS (-)で洗浄した後、EMEM (FBS-)にサンプルを 50 µL 混合して 1 mL とした混合溶液を添加し、0.5 hr インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。その後、混合溶液を除去しヘパリン溶液で洗浄し細胞表面に吸着した余剰な粒子を取り除き、0.25 %トリプシン溶液 200 µL を加え、3 min インキュベーション(37 °C, 5 % CO₂)した。EMEM (FBS+) 700 µL を加え、各 well の細胞をエッペンドルフチューブに回収し、遠心分離 (700 g、4°C、5 min)し、上清を除去した後、FACS Buffer 1 ml を加えて洗浄した。さらに、遠心分離(700 g、4°C、5 min)し、上清を除去した後、FACS buffer 500 ml を加えた。測定前にサンプルをはナイロンメッシュフィルターを用いて夾雑物の除去を行い、CytoFLEX Flow Cytometer にて DiD 由来の蛍光を測定した。

細胞又はミトコンドリアへの BBR 集積量評価

前培養として、サンプルを添加する 72 hr 前に細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells/well になるように播種し、インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。8 割コンフルエントになったことを確認してサンプル添加前に PBS (-)で洗浄した後、EMEM (FBS-)にサンプルを 50 µL 混合して 1 mL とした混合溶液を添加し、0.5 hr インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。その後、混合溶液を除去しヘパリン溶液で洗浄してセルスクレーパーで細胞をエッペンドルフチューブに回収した。Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells を用いて、製造元のマニュアルに従って回収した細胞からミトコンドリアを単離しました。回収した細胞を遠心分離 (700 g、4°C、3 min)し上清を除去して Reagent A

400 μ L (A 液 742.5 μ L、プロテアーゼ阻害剤 7.5 μ L)を添加後、ボルテックスミキサーにより 5 sec 攪拌させた。氷上で 2 min 静置後、Reagent B 5 μ L を添加し、5 min 氷上で静置した。この時、1 min ごとにボルテックスミキサーにより 5 sec 攪拌させた。その後、Reagent C 400 μ L (C 液 990 μ L、プロテアーゼ阻害剤 9 μ L)を添加し転倒混和後、遠心分離(700 g、4°C、10 min)を行った。上清を回収し再度遠心分離(3,000 g、4°C、15 min)を行い、上清を除去してペレットに Reagent C 100 μ L を添加後、遠心分離(12,000 g、4°C、5 min)して、Tris Buffer に希釈することにより、単離ミトコンドリアを得た。細胞及び単離したミトコンドリアへの BBR 集積量は、細胞及び単離したミトコンドリア溶液に対して 10% SDS 溶液(Tris Buffer/SDS 溶液 = 1/10、per volume)を加えて可溶化した。可溶化した細胞及び単離したミトコンドリア中のタンパク質 (280 nm)および BBR (350 nm)の濃度は、NanoDrop OneC を用いて測定した。BBR 濃度は、タンパク質濃度で正規化することにより計算した。

ミトコンドリア呼吸機能評価

前培養として、サンプルを添加する 24 $\pm$ 3 hr 前に細胞を Agilent Seahorse XFp cell culture Miniplates (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA)に 1.5 $\times$ 10⁴ cells/well になるように播種し、インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。EMEM (FBS-)にサンプルを 10 μ L 混合して 100 μ L とした混合溶液を添加し、0.5 hr インキュベーション (37°C, 5 % CO₂)した。混合溶液を除去し EMEM (FBS+)を加えて 2.5 hr インキュベーション (37°C, 5 % CO₂)した。予め調製したランニング培地 (XF D-MEM Medium 9.62 ml, 1 mM グルコース溶液 55 μ l, 100 mM ピルビン酸溶液 125 μ l, 200 mM グルタミン溶液 200 μ l)により培地交換を行い、1 hr インキュベーション(37°C)し、Agilent Seahorse XFp extracellular flux analyzer にてミトコンドリア呼吸機能を測定した。基礎酸素消費量 (Oxidative Consumption Rate: OCR) の測定後、細胞をオリゴマイシン A (2 μ M)、FCCP (1.5 μ M)、ロテノン/アンチマイシン A (0.5 μ M) で順次処理した。測定後、生存細胞数を数え、OCR を正規化するために使用した。

細胞内 ATP 産生量評価

前培養として、サンプルを添加する 24 $\pm$ 3 hr 前に細胞を 6 well plate に 2 $\times$ 10⁵ cells/well になるように播種し、インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。サンプル添加前に PBS (-)で洗浄した後、EMEM (FBS-)にサンプルを 50 μ L 混合して 1 mL とした混合溶液を添加し、0.5 hr インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。混合溶液を除去し EMEM (FBS+)を加えて 3.5 hr インキュベーション (37°C, 5 % CO₂)して培地を除去しヘパリン溶液で洗浄後 0.25 %トリプシン溶液 200 μ L を加え、3 min インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。EMEM (FBS+) 700 μ L を加え、各 well の細胞をエッペンドルフチューブに回収し、遠心分離 (700 g、4°C、5 min)し、上清を除去した後、ATP Assay Buffer に再懸濁して遠心分離 (13,000 g、4°C、5 min)して上清を回収した。細胞内 ATP 産生量は colorimetric/fluorometric ATP Assay Kit (Abcam, UK)のプロトコルに従い行った。回収した上清を測定用プレートに移し、ATP probe と Reaction Mix を加えて 30 min 室温で遮光下にて静置した。

吸光度は Microplate Reader により 535/587 nm で測定した。サンプル濃度は既知の ATP 標準溶液を用いて作成された検量線により算出した。

mRNA 発現量評価

前培養として、サンプルを添加する 48±3 hr 前に細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells/well になるように播種し、インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。サンプル添加前に PBS (-)で洗浄した後、EMEM (FBS-)にサンプルを 50 µL 混合して 1 mL とした混合溶液を添加し、0.5 hr インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。混合溶液を除去し EMEM (FBS+)を加えて 23.5 hr インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)して培地を除去しヘパリン溶液で洗浄後 0.25 %トリプシン溶液 200 µL を加え、3 min インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。EMEM (FBS+) 700 µL を加え、各 well の細胞をエッペンドルフチューブに回収し、遠心分離 (700 g, 4°C, 5 min)して上清を除去した。

(1) RNA 抽出

RNA の抽出は RNeasy mini kit のプロトコルに従って行った。Buffer RLT 350 µL/well 加えて、ピペッティングにて懸濁した。その後、70 % EtOH 350 µL/well 加えて、ピペッティングにより混和した。2 mL コレクションチューブにセットしたスピンカラムに全量移し遠心分離 (12,000 rpm, 25°C, 15 sec)した。濾液を除去し、Buffer RW1 700 µL/column 加えて遠心分離 (12,000 rpm, 25°C, 15 sec)した。濾液を除去し、Buffer RPE 500 µL/column 加えて遠心分離 (12,000 rpm, 25°C, 15 sec)した。新しい 2 mL コレクションチューブにスピンカラムを移し遠心分離 (12,000 rpm, 25°C, 2 min)した。1.5 mL コレクションチューブにカラムを移し、RNase free DDW を適量加えて遠心分離 (12,000 rpm, 25°C, 5 min)した。濾液をマイクロチューブに移した。

(2) RNA 精製

DNase 処理は TURBO DNA-free kit を用いて行った。上記の濾液の入ったマイクロチューブに 10×TURBO DNase Buffer 5 µL/tube、TURBO DNase 1µL/tube を加え、穏やかに混和し、37°C, 30 min インキュベーションした。再懸濁した DNase Inactivation Reagent 5 µL/tube を加えてよく混和し、室温で 5 min インキュベーションした。その後、遠心分離 (10,000 g, 25°C, 2 min)して上清を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに移した。

(3) 逆転写反応

逆転写反応は High Capacity RNA to cDNA kit を用いて行った。以下の組成の反応液を調製し、65°C/5 min→4°C/∞にて反応後、RT (+)サンプルに 20×RT Enzyme Mix 0.5 µL/sample 加えピペッティングにより混和した。25°C/5 min→42°C/60 min→95°C/5 min→4°C/∞の反応により cDNA を得た。

	RT (-)	RT (+)
Template RNA 0.5 µg (RNase free DDW)	4.5 µL	4.5 µL
2×RT buffer	5.0 µL	5.0 µL
RNase free DDW	0.5 µL	—
20×RT Enzyme Mix	—	0.5 µL
		Total 10 µL/tube

(4) 定量的 PCR

定量的 PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて行った。以下の組成の Master Mix を調製し、適当に希釈したサンプルを混合した。95°C/1 min→(95°C/15 sec→60°C/1 min) の反応を 40 サイクル行った。

Master Mix:	10 µM Forward primer	0.2 µL
	10 µM Reverse primer	0.2 µL
	THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	5.0 µL
	DDW	0.6 µL
Template:		4.0 µL
		Total 10 µL/tube

細胞生存率評価

前培養として、サンプルを添加する 24±3 hr 前に細胞を 6 well plate に 2×10⁵ cells/well になるように播種し、インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。サンプル添加前に PBS (-)で洗浄した後、EMEM (FBS-)にサンプルを 50 µL 混合して 1 mL とした混合溶液を添加し、0.5 hr インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。混合溶液を除去し EMEM (FBS+)を加えて 1 hr インキュベーション (37°C, 5 % CO₂)して培地を除去しヘパリン溶液で洗浄後 PremixWST-1 試薬を加え 2 hr インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。吸光度は Microplate Reader により 440 及び 650 nm で測定した。コントロールの細胞生存率を正規化することにより、細胞生存は以下の式を用いて相対的な細胞生存率を算出した。

$$\text{Cell viability (\%)} = V_t/V_u \times 100$$

V_t: サンプル処理後の細胞の吸光度

V_u: サンプル未処理の細胞の吸光度

共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM)を用いた細胞内観察

(1) 細胞体及び軸索末端における粒子の局在評価

培養 4 日目の初代培養神経細胞に対してサンプル添加前に DMEM High glucose (FBS-)で洗浄した後、DMEM High glucose (FBS-)にサンプルを 50 µL 混合して 1 mL とした混合溶液を添加し、0.5 hr インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。混合溶液を除去し B-27™ Plus Neuronal Culture

Systemを加えて1 hr インキュベーション (37°C, 5 % CO₂)した。培地除去後、DMEM High glucose (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 (37°C, 5 % CO₂)した。DMEM High glucose (FBS+)で洗浄後、DMEM High glucose (FBS+) 2 mL に培地を交換し Nikon 共焦点レーザー顕微鏡システム A1 を用いて観察を行った。得られた画像をもとに ImageJ を用いて二値化を行い Analyze particle により粒子量を算出した。各画像中の重なりのない細胞体及び軸索を解析対象とした。粒子量をもとに細胞体及び軸索末端における粒子取り込み量はそれぞれ以下の式を用いて算出した。

細胞体における粒子取り込み量 = 取り込みがみられた細胞数/全細胞数×取り込まれた粒子量
軸索末端における粒子取り込み量 = 取り込みがみられた軸索数/全軸索数×取り込まれた粒子量

レーザー: 488 nm light from an LD Laser, 蛍光フィルター: BP 490-540

レーザー: 635 nm light from an LD Laser, 蛍光フィルター: BP 660-710

(2) ミトコンドリア動態評価

培養 4 日目の初代培養神経細胞に対してサンプル添加前に DMEM High glucose (FBS-)で洗浄した後、DMEM High glucose (FBS-)にサンプルを 50 µL 混合して 1 mL とした混合溶液を添加し、0.5 hr インキュベーション(37°C, 5 % CO₂)した。混合溶液を除去し B-27™ Plus Neuronal Culture Systemを加えて1 hr インキュベーション (37°C, 5 % CO₂)した。培地除去後、DMEM High glucose (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 (37°C, 5 % CO₂)した。DMEM High glucose (FBS+)で洗浄後、DMEM High glucose (FBS+) 2 mL に培地を交換し Nikon 共焦点レーザー顕微鏡システム A1 を用いてタイム観察 (8 秒間隔 5 分間)を行った。撮影した画像は神経軸索が他の軸索と重ならず軸索の末端から 180 µm 以上あり、動態が確認できるものを解析対象とした。得られた画像をもとに ImageJ を用いて kymograph を作成し 5 µm 以上移動したものを運動性ミトコンドリアとして個数を数えた。運動性及び順行性輸送のミトコンドリアの割合はそれぞれ以下の式を用いて算出した。

運動性ミトコンドリア (%) = 運動性/(静止性+運動性) ×100

順行性ミトコンドリア (%) = 順行性/(順行性+逆行性) ×100

レーザー: 488 nm light from an LD Laser, 蛍光フィルター: BP 490-540

多色蛍光タイムラプス顕微鏡を用いた軸索長評価

培養 4 日目の初代培養神経細胞に対してサンプル添加前に DMEM High glucose (FBS-)で洗浄した後、DMEM High glucose (FBS-)にサンプルを 50 µL 混合して 1 mL とした混合溶液を添加し、Nikon 電動倒立顕微鏡 Ti を用いて明視野画像を撮影し 0.5 hr インキュベーション(37°C, 5 %

CO₂)した。混合溶液を除去し B-27™ Plus Neuronal Culture System を加えて 24 hr インキュベーション (37°C, 5 % CO₂)し Nikon 電動倒立顕微鏡 Ti を用いて明視野画像を撮影した。撮影した画像は神経軸索が他の軸索と重ならないものを解析対象としランダムに抽出した。得られた画像をもとに ImageJ を用いて軸索長を測定した。軸索長変化の割合は以下の式を用いて算出した。

$$\text{軸索長変化 (\%)} = \text{サンプル処理後の軸索長} / \text{サンプル処理前の軸索長} \times 100$$

参考文献

1. Azevedo, F.A., et al., *Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain*. J Comp Neurol, 2009. **513**(5): p. 532-41.
2. Attwell, D. and S.B. Laughlin, *An energy budget for signaling in the grey matter of the brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2001. **21**(10): p. 1133-45.
3. Camandola, S. and M.P. Mattson, *Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration*. EMBO J, 2017. **36**(11): p. 1474-1492.
4. Rangaraju, V., N. Calloway, and T.A. Ryan, *Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function*. Cell, 2014. **156**(4): p. 825-35.
5. Bock, F.J. and S.W.G. Tait, *Mitochondria as multifaceted regulators of cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(2): p. 85-100.
6. Pallafacchina, G., S. Zanin, and R. Rizzuto, *Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake*. F1000Res, 2018. **7**.
7. Singh, A., et al., *Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases*. Molecules, 2019. **24**(8).
8. Maday, S., et al., *Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation*. Neuron, 2014. **84**(2): p. 292-309.
9. Smith, G.M. and G. Gallo, *The role of mitochondria in axon development and regeneration*. Dev Neurobiol, 2018. **78**(3): p. 221-237.
10. Spillane, M., et al., *Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis*. Cell Rep, 2013. **5**(6): p. 1564-75.
11. Chang, D.T. and I.J. Reynolds, *Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons*. Prog Neurobiol, 2006. **80**(5): p. 241-68.
12. Tao, K., N. Matsuki, and R. Koyama, *AMP-activated protein kinase mediates activity-dependent axon branching by recruiting mitochondria to axon*. Dev Neurobiol, 2014. **74**(6): p. 557-73.
13. Lewis, T.L., Jr., et al., *Progressive Decrease of Mitochondrial Motility during Maturation of Cortical Axons In Vitro and In Vivo*. Curr Biol, 2016. **26**(19): p. 2602-2608.
14. Alvarez, S., M. Moldovan, and C. Krarup, *Acute energy restriction triggers Wallerian degeneration in mouse*. Exp Neurol, 2008. **212**(1): p. 166-78.
15. Majidzadeh, H., et al., *Nano-based delivery systems for berberine: A modern anti-cancer herbal medicine*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020. **194**: p. 111188.
16. Katiyar, S.K., et al., *p53 Cooperates berberine-induced growth inhibition and apoptosis of non-small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo*. Mol Carcinog, 2009. **48**(1): p. 24-37.

17. Siow, Y.L., L. Sarna, and K. O, *Redox regulation in health and disease — Therapeutic potential of berberine*. Food Research International, 2011. **44**(8): p. 2409-2417.
18. Yerra, V.G., et al., *Adenosine monophosphate-activated protein kinase modulation by berberine attenuates mitochondrial deficits and redox imbalance in experimental diabetic neuropathy*. Neuropharmacology, 2018. **131**: p. 256-270.
19. Zhao, Y., et al., *Berberine activates caspase-9/cytochrome c-mediated apoptosis to suppress triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo*. Biomed Pharmacother, 2017. **95**: p. 18-24.
20. Lv, W., et al., *Bioengineered Boronic Ester Modified Dextran Polymer Nanoparticles as Reactive Oxygen Species Responsive Nanocarrier for Ischemic Stroke Treatment*. ACS Nano, 2018. **12**(6): p. 5417-5426.
21. Savchenko, A., G.B. Braun, and E. Molokanova, *Nanostructured Antagonist of Extrasynaptic NMDA Receptors*. Nano Lett, 2016. **16**(9): p. 5495-502.
22. Xu, J. and Y. Chau, *Polymeric nanoparticles decorated with BDNF-derived peptide for neuron-targeted delivery of PTEN inhibitor*. Eur J Pharm Sci, 2018. **124**: p. 37-45.
23. Fu, J., et al., *Silica nanoparticle exposure during the neonatal period impairs hippocampal precursor proliferation and social behavior later in life*. Int J Nanomedicine, 2018. **13**: p. 3593-3608.
24. Lima, V.S., et al., *Depression, anxiety-like behavior, and memory impairment in mice exposed to chitosan-coated zein nanoparticles*. Environ Sci Pollut Res Int, 2019. **26**(11): p. 10641-10650.
25. Koehnke, J., et al., *Splice form dependence of beta-neurexin/neurologin binding interactions*. Neuron, 2010. **67**(1): p. 61-74.
26. Sugita, S., et al., *A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain*. J Cell Biol, 2001. **154**(2): p. 435-45.
27. Uemura, T., et al., *Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum*. Cell, 2010. **141**(6): p. 1068-79.
28. O'Connor, V.M., et al., *On the structure of the 'synaptosecretosome'. Evidence for a neurexin/synaptotagmin/syntaxin/Ca²⁺ channel complex*. FEBS Lett, 1993. **326**(1-3): p. 255-60.
29. Logiudice, L., P. Sterling, and G. Matthews, *Vesicle recycling at ribbon synapses in the finely branched axon terminals of mouse retinal bipolar neurons*. Neuroscience, 2009. **164**(4): p. 1546-56.
30. Wu, W. and L.G. Wu, *Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10234-9.
31. Boucrot, E., et al., *Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic*

- pathway. *Nature*, 2015. **517**(7535): p. 460-5.
32. Watanabe, S. and E. Boucrot, *Fast and ultrafast endocytosis*. *Curr Opin Cell Biol*, 2017. **47**: p. 64-71.
 33. Zhang, Q., Y. Li, and R.W. Tsien, *The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles*. *Science*, 2009. **323**(5920): p. 1448-53.
 34. Gutnick, A., et al., *The light-sensitive dimerizer zapalog reveals distinct modes of immobilization for axonal mitochondria*. *Nat Cell Biol*, 2019. **21**(6): p. 768-777.
 35. Huang, N., et al., *Reprogramming an energetic AKT-PAK5 axis boosts axon energy supply and facilitates neuron survival and regeneration after injury and ischemia*. *Curr Biol*, 2021. **31**(14): p. 3098-3114 e7.
 36. Murphy, M.P., *Targeting lipophilic cations to mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1777**(7-8): p. 1028-31.
 37. Gao, C., et al., *Neuronal mitochondria-targeted delivery of curcumin by biomimetic engineered nanosystems in Alzheimer's disease mice*. *Acta Biomater*, 2020. **108**: p. 285-299.
 38. Khalil, I.A., et al., *Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nanoparticles for gene delivery*. *Gene Ther*, 2007. **14**(8): p. 682-9.
 39. Yamada, 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): p. 423-32.
 40. Kawamura, E., et al., *Validation of Gene Therapy for Mutant Mitochondria by Delivering Mitochondrial RNA Using a MITO-Porter*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020. **20**: p. 687-698.
 41. Yamada, Y., T. Ishimaru, and H. Harashima, *Validation of a therapeutic strategy involving the mitochondrial delivery of thiamine pyrophosphate using brain damage induced mouse model*. *Clinical and Translational Discovery*, 2022. **2**(2).
 42. Yamada, Y., et al., *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**: p. 134-144.
 43. Zhao, C., et al., *Berberine Alleviates Amyloid beta-Induced Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Loss*. *Oxid Med Cell Longev*, 2019. **2019**: p. 7593608.
 44. Chen, Y., et al., *Berberine mitigates cognitive decline in an Alzheimer's Disease Mouse Model by targeting both tau hyperphosphorylation and autophagic clearance*. *Biomed Pharmacother*, 2020. **121**: p. 109670.
 45. Mia K, et al., *Berberine prevents nigrostriatal dopaminergic neuronal loss and suppresses hippocampal apoptosis in mice with Parkinson's disease*. *International Journal of*

- Molecular Medicine, 2014 **870-878**.
46. Cheng, Z., et al., *Berberine: A Promising Treatment for Neurodegenerative Diseases*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 845591.
 47. Och, A., R. Podgorski, and R. Nowak, *Biological Activity of Berberine-A Summary Update*. Toxins (Basel), 2020. **12**(11).
 48. Yuan, N.N., et al., *Neuroprotective effects of berberine in animal models of Alzheimer's disease: a systematic review of pre-clinical studies*. BMC Complement Altern Med, 2019. **19**(1): p. 109.
 49. Yamada, Y., et al., *Power of mitochondrial drug delivery systems to produce innovative nanomedicines*. Adv Drug Deliv Rev, 2020. **154-155**: p. 187-209.
 50. Vogt, S., et al., *Mitochondrial respiration is controlled by Allosteric, Subunit Composition and Phosphorylation Sites of Cytochrome c Oxidase: A trailblazer's tale - Bernhard Kadenbach*. Mitochondrion, 2021. **60**: p. 228-233.
 51. Nanadikar, M.S., et al., *O₂ affects mitochondrial functionality ex vivo*. Redox Biol, 2019. **22**: p. 101152.
 52. Huang, H., et al., *Physiological levels of ATP negatively regulate proteasome function*. Cell Res, 2010. **20**(12): p. 1372-85.
 53. Takeda, K., et al., *Mitochondrial ubiquitin ligase alleviates Alzheimer's disease pathology via blocking the toxic amyloid-beta oligomer generation*. Commun Biol, 2021. **4**(1): p. 192.
 54. Shiiba, I., et al., *Overview of Mitochondrial E3 Ubiquitin Ligase MITOL/MARCH5 from Molecular Mechanisms to Diseases*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
 55. Group, G.B.D.N.D.C., *Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet Neurol, 2017. **16**(11): p. 877-897.
 56. Athar, T., K. Al Balushi, and S.A. Khan, *Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease*. Mol Biol Rep, 2021. **48**(7): p. 5629-5645.
 57. Kins, S., K.H. Schafer, and K. Endres, *Drug development for neurodegenerative diseases*. Biol Chem, 2021. **403**(1): p. 1.
 58. Ndemazie, N.B., et al., *Multi-disciplinary Approach for Drug and Gene Delivery Systems to the Brain*. AAPS PharmSciTech, 2021. **23**(1): p. 11.
 59. Gajbhiye, K.R., et al., *PEGylated nanocarriers: A promising tool for targeted delivery to the brain*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020. **187**: p. 110770.
 60. Song, J., et al., *Design and Development of Nanomaterial-Based Drug Carriers to Overcome the Blood-Brain Barrier by Using Different Transport Mechanisms*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(18).

61. Cheng, X.T., N. Huang, and Z.H. Sheng, *Programming axonal mitochondrial maintenance and bioenergetics in neurodegeneration and regeneration*. Neuron, 2022. **110**(12): p. 1899-1923.
62. Hori, I., H. Harashima, and Y. Yamada, *Development of a Mitochondrial Targeting Lipid Nanoparticle Encapsulating Berberine*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(2).
63. Sterky, F.H., et al., *Carbonic anhydrase-related protein CA10 is an evolutionarily conserved pan-neurexin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(7): p. E1253-E1262.
64. Suzuki, K., et al., *A synthetic synaptic organizer protein restores glutamatergic neuronal circuits*. Science, 2020. **369**(6507).
65. Wierda, K.D.B., et al., *The soluble neurexin-1beta ectodomain causes calcium influx and augments dendritic outgrowth and synaptic transmission*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 18041.
66. Wilson, S.C., et al., *Structures of neurexophilin-neurexin complexes reveal a regulatory mechanism of alternative splicing*. EMBO J, 2019. **38**(22): p. e101603.
67. Rozic, G., Z. Lupowitz, and N. Zisapel, *Exonal elements and factors involved in the depolarization-induced alternative splicing of neurexin 2*. J Mol Neurosci, 2013. **50**(1): p. 221-33.
68. Ferrer-Lorente, R., et al., *Cationic Carbosilane Dendrimers Prevent Abnormal alpha-Synuclein Accumulation in Parkinson's Disease Patient-Specific Dopamine Neurons*. Biomacromolecules, 2021. **22**(11): p. 4582-4591.
69. Rungta, R.L., et al., *Lipid Nanoparticle Delivery of siRNA to Silence Neuronal Gene Expression in the Brain*. Mol Ther Nucleic Acids, 2013. **2**(12): p. e136.
70. Raghavan, M., D. Fee, and P.E. Barkhaus, *Generation and propagation of the action potential*. Handb Clin Neurol, 2019. **160**: p. 3-22.
71. Zheng, Y.R., X.N. Zhang, and Z. Chen, *Mitochondrial transport serves as a mitochondrial quality control strategy in axons: Implications for central nervous system disorders*. CNS Neurosci Ther, 2019. **25**(7): p. 876-886.
72. Errea, O., et al., *The disruption of mitochondrial axonal transport is an early event in neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 152.
73. Tesco, G. and S. Lomoio, *Pathophysiology of neurodegenerative diseases: An interplay among axonal transport failure, oxidative stress, and inflammation?* Semin Immunol, 2022: p. 101628.
74. Arimura, N. and K. Kaibuchi, *Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(3): p. 194-205.
75. Reddy, P.H., *Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease*. Brain Res, 2011. **1415**: p. 136-48.

76. Kim, M., et al., *Berberine prevents nigrostriatal dopaminergic neuronal loss and suppresses hippocampal apoptosis in mice with Parkinson's disease*. Int J Mol Med, 2014. **33**(4): p. 870-878.
77. Han, A.M., H. Heo, and Y.K. Kwon, *Berberine promotes axonal regeneration in injured nerves of the peripheral nervous system*. J Med Food, 2012. **15**(4): p. 413-7.
78. Hsu, Y.Y., Y.T. Tseng, and Y.C. Lo, *Berberine, a natural antidiabetes drug, attenuates glucose neurotoxicity and promotes Nrf2-related neurite outgrowth*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **272**(3): p. 787-96.
79. Lu, J., et al., *Berberine regulates neurite outgrowth through AMPK-dependent pathways by lowering energy status*. Exp Cell Res, 2015. **334**(2): p. 194-206.
80. Puthanveetil, S.V., et al., *A new component in synaptic plasticity: upregulation of kinesin in the neurons of the gill-withdrawal reflex*. Cell, 2008. **135**(5): p. 960-73.
81. Thomson, D.M., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family*. J Appl Physiol (1985), 2008. **104**(2): p. 429-38.
82. Arnold, B., et al., *Integrating multiple aspects of mitochondrial dynamics in neurons: age-related differences and dynamic changes in a chronic rotenone model*. Neurobiol Dis, 2011. **41**(1): p. 189-200.
83. Calkins, M.J. and P.H. Reddy, *Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(4): p. 507-13.
84. Guo, B., et al., *Stabilization of microtubules improves cognitive functions and axonal transport of mitochondria in Alzheimer's disease model mice*. Neurobiol Aging, 2020. **96**: p. 223-232.
85. Prots, I., et al., *alpha-Synuclein oligomers induce early axonal dysfunction in human iPSC-based models of synucleinopathies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(30): p. 7813-7818.
86. Sheng, Z.H., *The Interplay of Axonal Energy Homeostasis and Mitochondrial Trafficking and Anchoring*. Trends Cell Biol, 2017. **27**(6): p. 403-416.
87. Wang, B., et al., *Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration*. Front Aging Neurosci, 2021. **13**: p. 650038.
88. Amato, S., et al., *AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization*. Science, 2011. **332**(6026): p. 247-51.
89. Dasgupta, B. and J. Milbrandt, *Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7217-22.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室 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、多大なるご指導、ご助言を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室 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、ご指導、有益なる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研究室 助教 中村孝司先生、同助教 佐藤悠介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 RNA 生物学研究室教授 中川真一先生、同講師 米田宏先生に深く感謝致します。

イメージング機器の利用にご協力を賜りました、北海道大学電子科学研究所 ニコンイメージングセンター 小林健太郎氏に深く感謝致します。

研究室生活において貴重なご指導、ご助言を賜り、あらゆる面で支えとなって頂いた北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室及び未来創剤研究室の皆様並びに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深く感謝致します。

最後に、大学生生活を送るにあたり、常に支えてくれた家族、友人に心より感謝致します。