



Title	ミトコンドリア標的型ドラッグデリバリーシステムを用いた間葉系幹細胞のミトコンドリア機能改変
Author(s)	丸尾, 優爾
Description	配架番号 : 3003
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16910号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16910
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99755
Type	doctoral thesis
File Information	MARUO_Yuji.pdf, 全文



学 位 論 文

ミトコンドリア標的型ドラッグデリバリーシステム
を用いた間葉系幹細胞のミトコンドリア機能改変

(Mitochondrial Activation of Mesenchymal Stem Cells Using a Mitochondria-
Targeted Drug Delivery System)

2026 年 3 月

北 海 道 大 学

丸 尾 優 爾

学 位 論 文

ミトコンドリア標的型ドラッグデリバリーシステム
を用いた間葉系幹細胞のミトコンドリア機能改変

(Mitochondrial Activation of Mesenchymal Stem Cells Using a Mitochondria-
Targeted Drug Delivery System)

2026 年 3 月

北 海 道 大 学

丸 尾 優 爾

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	8 頁
方法	13 頁
結果	27 頁
考察	40 頁
結論	44 頁
謝辞	46 頁
利益相反	48 頁
引用文献	49 頁

発 表 論 文 目 録 お よ び 学 会 発 表 目 録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yuji Maruo, Masahiro Shiraishi, Mitsue Hibino, Jiro Abe, Atsuhito Takeda, Yuma Yamada
“Activation of Mitochondria in Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Delivery of Coenzyme Q₁₀”
Biological and Pharmaceutical Bulletin. 47(8):1415-1421 (2024)

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. Yuji Maruo, Masahiro Shiraishi, Mitsue Hibino, Jiro Abe, Atsuhito Takeda, Yuma Yamada
“Mitochondrial activation in mesenchymal stem cells by delivering CoQ₁₀ to mitochondria”
The 40th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System, 9–11 July, 2024, Tsukuba, Japan
2. 丸尾 優爾、白石 真大、佐々木 大輔、阿部 二郎、武田 充人、山田 勇磨
「ミトコンドリア標的型 Drug Delivery System を使用した移植幹細胞の機能
改変と心疾患治療への応用」
第 72 回日本心臓病学会学術集会（日本小児循環器学会・日本心臓病学会ジ
ョイントシンポジウム：不全心、心筋症に対する非薬物療法）、仙台、2024
年 9 月 27 日–9 月 29 日
3. Yuji Maruo, Masahiro Shiraishi, Mitsue Hibino, Jiro Abe, Atsuhito Takeda, Yuma Yamada
“Establishment of mitochondrial-activated mesenchymal stem cells through CoQ₁₀
delivery to mitochondria”
The 128th Annual Meeting of the Japan Pediatric Society, 18–20 April, 2025, Nagoya
Japan

4. Yuji Maruo, Masahiro Shiraishi, Mitsue Hibino, Daisuke Sasaki, Jiro Abe, Atsuhito Takeda, Yuma Yamada
“Enhancing Mesenchymal Stem Cells with a Mitochondria-Targeted Drug Delivery System for Cardiac Disease Treatment”
AEPC 2025, the 58th Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology, Young Investigator Award Session, 28–31 May, 2025, Hamburg, Germany
5. 丸尾 優爾, 白石 真大, 日比野 光恵, 佐々木 大輔, 阿部 二郎, 武田 充人, 山田 勇磨
「心疾患治療への応用を目指したミトコンドリア標的型 Drug Delivery System による移植幹細胞の機能改変」
第 61 回日本小児循環器学会総会・学術集会（シンポジウム 4：今改めて考える 再生医療発展の礎となる心臓発生と多能性幹細胞研究）、三重、2025 年 7 月 10 日–7 月 12 日
6. Yuji Maruo, Masahiro Shiraishi, Mitsue Hibino, Daisuke Sasaki, Jiro Abe, Atsuhito Takeda, Yuma Yamada
“Enhancing Mesenchymal Stem Cells with a Mitochondria-Targeted Drug Delivery System for Cardiac Disease Treatment”
The 61st Annual Meeting of Japanese Society of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery (AEPC-YIA Session), 10–12 July, 2025, Mie

要 旨

【背景と目的】間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は、成体組織に存在する多能性細胞であり、骨、軟骨、脂肪組織、腱、筋肉など多様な細胞系列へ分化する能力を有している。さらに、MSC はサイトカイン放出を介して免疫細胞と相互作用することにより抗炎症作用を示すことが知られている。自家および同種 MSC 移植の有効性は、さまざまな疾患において報告されている。しかし、移植後の MSC は酸化ストレスやエネルギー代謝障害にさらされることで生存率や治療効果が制限されることがあり、ミトコンドリア機能の改善が移植効果向上に寄与する可能性がある。我々はこれまでに、ミトコンドリアを標的としたドラッグデリバリーシステムである MITO-Porter を開発しており、これは膜融合を介して多様な分子をミトコンドリアへ輸送することを可能にする。我々は以前、マイクロ流体デバイスを用いて、コエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) を内包した MITO-Porter の大量調製に成功している。さらに、我々はヒト心臓由来細胞 (CDC) を CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter で処理することでミトコンドリア呼吸能を増強し、そのミトコンドリア機能活性化 CDC を静脈内投与することによって心筋虚血再灌流マウスモデルにおいて治療効果を実証することに成功している。本研究では、CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter が MSC のミトコンドリア機能を増強し、MSC の細胞移植療法の改善につながるか検証することを目的とした。

【材料と方法】本研究では、高純度のヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (rapidly expanding clone: REC) を使用した。MITO-Porter への CoQ₁₀ 内包量を制御するために、マイクロ流体デバイスを用いて、従来型の CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter (MP-(CoQ₁₀))、CoQ₁₀ を従来型の約 2 倍および 3 倍内包する MITO-Porter (MP-(2x CoQ₁₀), MP-(3x CoQ₁₀))、および CoQ₁₀ を含まない対照粒子 (MP-(Empty)) を作製した。各粒子の平均粒子径、ポリ分散指数 (PDI)、ゼータ電位を動的光散乱法で測定し、脂質および CoQ₁₀ の回収率、薬物/脂質比を算出した。REC に対して最終脂質濃度 20 μ M となるように各 MITO-Porter を 24 時間添加し、細胞内取り込みは DiI 蛍光標識 MITO-Porter を用いてフローサイトメトリーで評価し、細胞内のミトコンドリア共局在の評価には、DiI 蛍光標識および MitoTracker Deep Red を用いた共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) で評価した。REC のミトコンドリア呼吸能の評価は、酸素消費速度 (OCR) を指標として、Oligomycin、FCCP、Rotenone/Antimycin A の順次添加により測定し、基礎呼吸能および最大呼吸能の相対 OCR を Non-treatment (NT) 群を基準として算出

した。また、MITO-Porter の細胞毒性は WST-1 アッセイにより細胞生存率として評価した。各解析は適切な対照群 (PBS 処理群、MP-(Empty) 群) と比較して行った。

【結果】本研究において、我々はまず、CDC におけるミトコンドリア機能活性化を報告した先行研究に従い、最終脂質濃度 50–60 μM の MP-(CoQ₁₀) を 24 時間 REC に添加し、ミトコンドリア機能の増強を試みた。しかし、細胞外フラックスアナライザーによる評価の結果、ミトコンドリア呼吸能に有意な変化はみられなかった。REC におけるミトコンドリア呼吸能を増強するため、我々はマイクロ流体デバイスを用いて、より多くの CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter の調製を試み、その結果、CoQ₁₀ 懸濁液の濃度を変化させることにより、従来型の約 2 倍および 3 倍量の CoQ₁₀ を含有する MP-(2x CoQ₁₀) および MP-(3x CoQ₁₀) の作製に成功した。MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、および MP-(3x CoQ₁₀) の平均粒子径は 41–58 nm、PDI は 0.18–0.22、ゼータ電位は 18–20 mV であり、安定した脂質ナノ粒子が得られた。脂質回収率は 75–85%、CoQ₁₀ 回収率は 75–80% であり、薬物/脂質比は MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、MP-(3x CoQ₁₀) でそれぞれ 0.16 ± 0.01 、 0.36 ± 0.06 、 0.55 ± 0.07 (平均値 $\pm$ SD) であった。フローサイトメトリ解析により、各 MITO-Porter は NT 群と比較して REC に有意に取り込まれることが示唆された。また、CLSM を用いた評価により、MITO-Porter は REC のミトコンドリアと共局在することが示唆された。REC に対して MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を最終脂質濃度 20 μM で処理した 24 時間後に OCR を測定したところ、MP-(2x CoQ₁₀) 処理群での REC の OCR が最大となった。REC に対して最終脂質濃度 20 μM となるように MP-(2x CoQ₁₀) を 24 時間処理したところ、NT 群および MP-(Empty) 処理群と比較して最大呼吸能が有意に増加した。WST-1 による細胞生存率評価では、最終脂質濃度 10–40 μM の範囲内において各 MITO-Porter の細胞毒性は認められなかった。

【考察】本研究では、従来型の MP-(CoQ₁₀) では REC におけるミトコンドリア呼吸能を増強できなかったため、より多量の CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter を、マイクロ流体デバイスシステムを用いて新たに調製した。MITO-Porter 調製前に CoQ₁₀ 懸濁液の濃度を変更することにより、CoQ₁₀ を豊富に内包する MITO-Porter を調製し、REC のミトコンドリア呼吸能を増強することに成功した。本研究により、マイクロ流体デバイスを活用することで MITO-Porter に内包される CoQ₁₀ 量を精密に制御できることが示された。このことは、MSC 移植療法において、ミトコンドリア機能改善が治療効果の向上に寄与する可能性があることを示唆している。

【結論】本研究により、マイクロ流体デバイスを用いることで MITO-Porter に

内包される CoQ₁₀ 量を精密に制御できることを明らかにした。また、CoQ₁₀ を豊富に内包した MITO-Porter により、MSC のミトコンドリア機能を活性化できることを示した。これらの知見は、MITO-Porter システムがミトコンドリア機能を人為的に制御し得ることを示すものであり、MSC 移植療法の治療効果を高める新たな技術基盤となる可能性が示唆された。今後は *in vivo* 評価を含めた安全性および有効性検討を進めることで、再生医療応用への展開が期待される。

略 語 集

ATP	adenosine triphosphate
AMSC	amnion-derived mesenchymal stem cell
BP	band-pass
BSA	bovine serum albumin
CDC	cardiosphere-derived cell
CH ₃ CN	acetonitrile
CLSM	confocal laser scanning microscope
CO ₂	carbon dioxide
CoQ ₁₀	coenzyme Q ₁₀
DDW	double-distilled water
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMG-PEG 2k	1,2-dimyristoyl-rac-glycerol-polyethylene glycol (MW 2000)
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovine serum
FCCP	carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FGF	fibroblast growth factor
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	high-performance liquid chromatography
MFI	mean fluorescence intensity
Milli-Q	ultrapure water purified by Milli-Q system
MSC	mesenchymal stem cell
NT	non-treatment
OCR	oxygen consumption rate
PBS	phosphate-buffered saline
PDI	polydispersity index
PFS	perfect focus system
REC	rapidly expanding clones
SD	standard deviation

SM	sphingomyelin
STR-R8	stearylated octa-arginine
VC	vibration compensation
WI	water immersion

緒 言

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は、成体組織に存在する多能性細胞であり、骨、軟骨、脂肪組織、腱、筋肉など多様な細胞系列へ分化する能力を有している (Pittenger et al, 1999; Zuk et al, 2001)。さらに、MSC はサイトカイン放出を介して免疫細胞と相互作用することにより抗炎症作用を示すことが知られている (Uccelli et al, 2008; Shi et al, 2010)。自家および同種 MSC 移植の有効性は、さまざまな疾患において報告されている (Han et al, 2019; Tavakoli et al, 2020)。加えて、MSC の免疫抑制特性は臨床応用されており、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease) の治療薬として市販されている。しかし、移植後の MSC は酸化ストレスやエネルギー代謝障害にさらされることで生存率や治療効果が制限されることがあり (Denu et al, 2016; Salazar-Noratto et al, 2020; Prakash et al, 2021)、ミトコンドリア機能の改善が移植効果向上に寄与する可能性がある。

我々はこれまでに、ミトコンドリアを標的としたドラッグデリバリーシステムである MITO-Porter を開発しており、これは膜融合を介して多様な分子をミトコンドリアへ輸送することを可能にする (Yamada et al, 2008; Yamada et al, 2020a; Yamada et al, 2020b; Yamada et al, 2022) (図 1)。

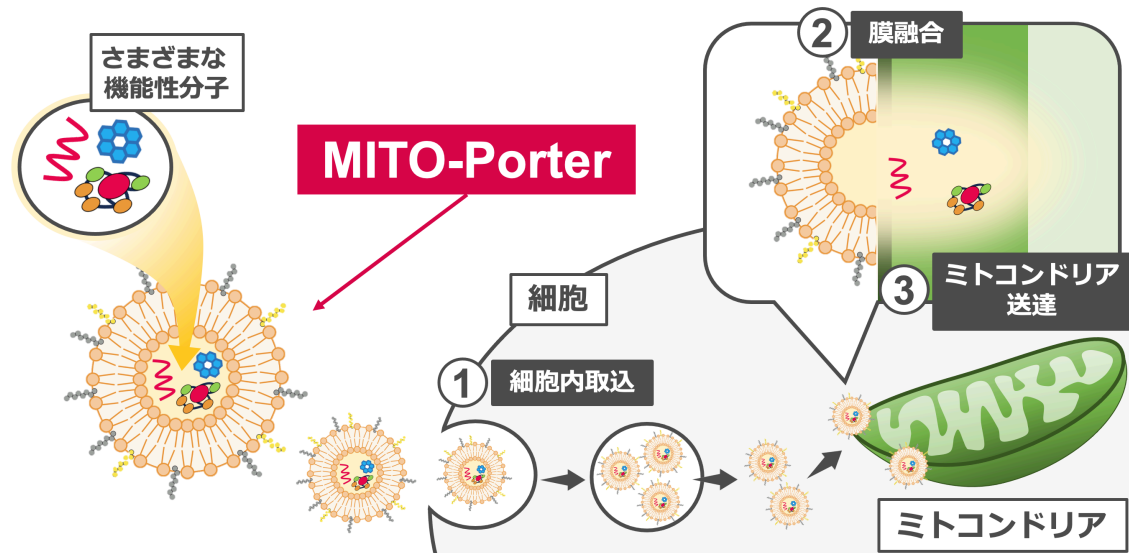


図 1 ミトコンドリア標的型ドラッグデリバリーシステムである
MITO-Porter の模式図

ミトコンドリアを標的としたドラッグデリバリーシステムである MITO-Porter は膜融合を介して多様な分子をミトコンドリアへ輸送することを可能にする。

単純水和法により調製したミトコンドリア機能性分子であるレスベラトロールを MITO-Porter に内包し、心臓由来細胞 (cardiosphere-derived cell: CDC) へ添加することで、ミトコンドリア活性化心臓由来細胞 (MITO cell) を作製することに成功した (Abe et al, 2018) (図 2)。さらに、ドキソルビシン心筋症および心筋虚血再灌流マウスモデルに対して、それぞれ心筋内注射による MITO cell 移植の予防的・治療的効果を実証した (Abe et al, 2018; Sasaki et al, 2022) (図 2)。しかしながら、単純水和法によるレスベラトロール封入 MITO-Porter の大量調製は困難であり、また MITO cell 樹立のためには侵襲的なヒト心筋単離の工程が必須であり、これらは臨床応用を妨げる要因となっていた。

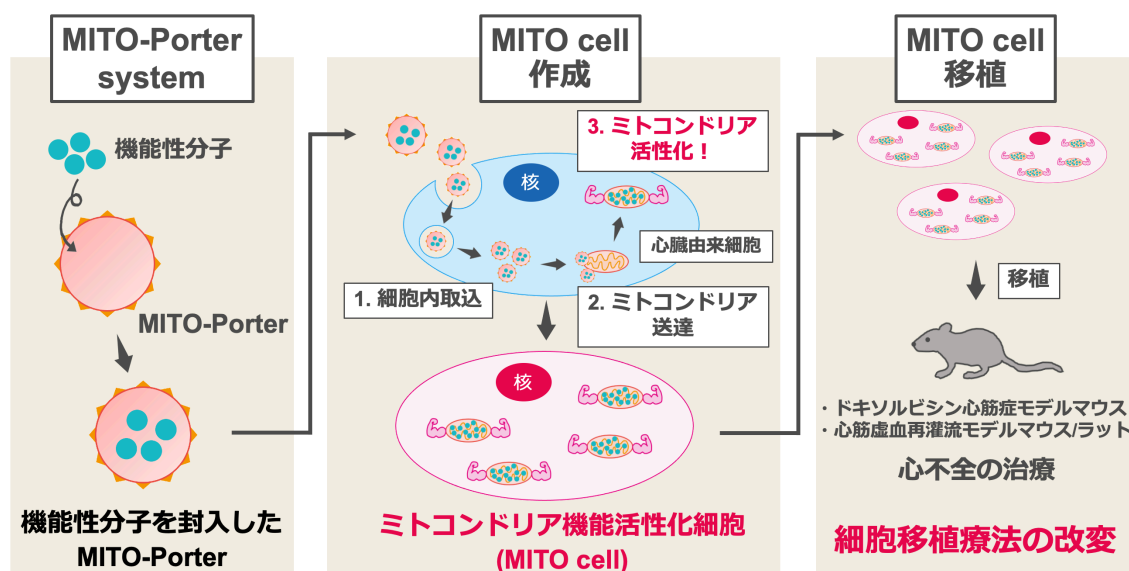


図 2 MITO cell 作製、MITO cell 移植の模式図

ミトコンドリア機能性分子を MITO-Porter に内包し、心臓由来細胞へ添加することで、ミトコンドリア活性化心臓由来細胞 (MITO cell) を作製することに成功した。さらに、ドキソルビシン心筋症および心筋虚血再灌流マウスモデルに対して、それぞれ心筋内注射による MITO cell 移植の予防的・治療的効果を実証した。

臨床応用に向けての大量調製に対して、北海道大学工学部で開発された基盤技術から、基板上に形成されたマイクロチャネル内で脂質ナノ粒子を形成可能なマイクロ流体デバイスを用いて MITO-Porter を調製する共同研究が開始された (Maeki et al, 2018)。しかし、レスベラトロールは疎水性が高く膜透過性も強いため、マイクロ流体デバイスを用いた効率的な内包化は達成できなかった。一方で、水溶性が低いミトコンドリア機能性分子であるコエンザイム Q_{10} (CoQ₁₀) はマイクロ流体デバイスを用いて MITO-Porter に内包 (MP-(CoQ₁₀) と称す) することが可能であり、大量調製も実現可能となった (Hibino et al, 2019; Hibino et al, 2023)。さらに、ヒト CDC を MP-(CoQ₁₀) で処理することでミトコンドリア呼吸能を増強し、そのミトコンドリア機能活性化 CDC を静脈内投与することによって心筋虚血再灌流マウスモデルにおいて治療効果を実証することに成功した (Shiraishi et al, 2024)。

ヒト心臓はその機能維持のために大量のアデノシン三リン酸 (ATP) を消費しており、心筋におけるエネルギー産生の 90% 以上はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に依存している (Allard et al, 1994; Da Dalt et al, 2023; Menendez-

Montes et al, 2023)。これに対し、MSC は主に解糖系に依存していると考えられており (Yan et al, 2021)、CDC と比較して MSC におけるミトコンドリア機能を高めるには、より多くの CoQ₁₀ をミトコンドリアに送達する必要がある可能性がある。

本研究では、CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter が MSC のミトコンドリア機能を増強し、MSC の細胞移植療法の改善につながるか検証することを目的とした (図 3)。

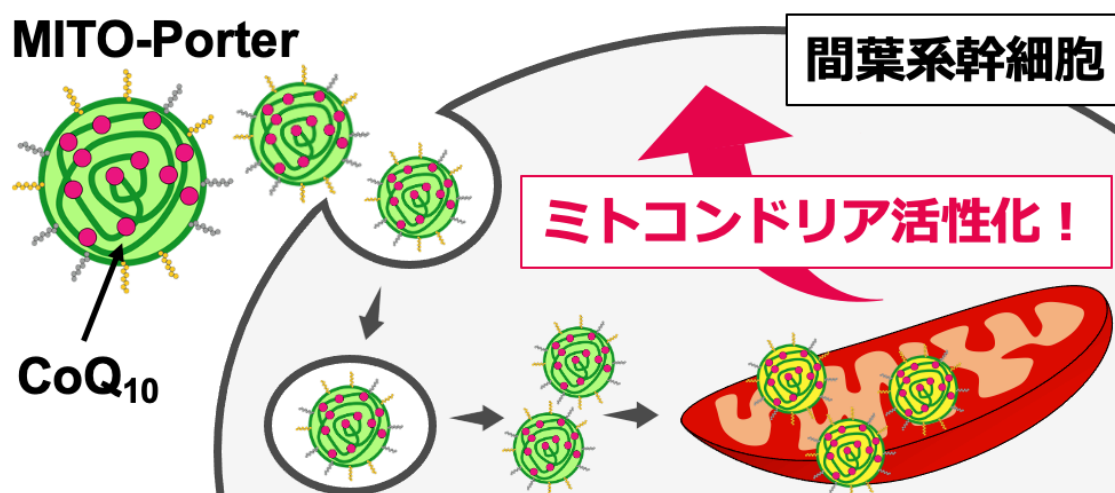


図 3 CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter による間葉系幹細胞の
ミトコンドリア機能強化の模式図

本研究では、CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter が間葉系幹細胞のミトコンドリア機能を活性化するかについて検証した。

具体的には、市販されている高純度かつクローン原性ヒト骨髄由来 MSC (rapidly expanding clone: REC) を用い (Mabuchi et al, 2013; Mabuchi et al, 2016; Ukeba et al, 2022)、これに CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter を添加し、その細胞内取り込み、ミトコンドリアとの共局在、ミトコンドリア呼吸能の変化、および細胞毒性を評価した。さらに、マイクロ流体デバイスシステムを活用することで、MITO-Porter に内包される CoQ₁₀ 量の制御および増量を目指した (図 4)。

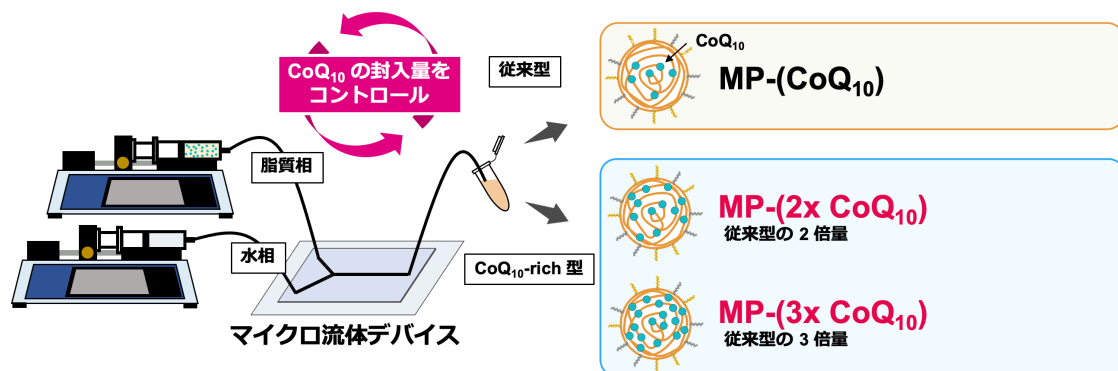


図 4 マイクロ流体デバイスを用いたコエンザイム Q₁₀ (CoQ₁₀) 内包
MITO-Porter の調製と CoQ₁₀ 内包量の制御

MITO-Porter に内包される CoQ₁₀ 量は、マイクロ流体デバイスを用いて制御した。CoQ₁₀ 懸濁液の初期濃度を変化させることにより、従来の MP-(CoQ₁₀) と比較して、CoQ₁₀ 量が約 2 倍の MITO-Porter (MP-(2x CoQ₁₀)) および約 3 倍の MITO-Porter (MP-(3x CoQ₁₀)) を作製した。

方 法

1. 実験試薬・材料

1-1. 細胞培養・フローサイトメトリー・顕微鏡関連

REC: PuREC (Shimane, Japan)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; low glucose, with L-glutamine and phenol red): Wako (Osaka, Japan)

Fetal Bovine Serum (FBS): Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Penicillin-streptomycin: Thermo Fisher (Massachusetts, USA)

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES): Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)

Basic fibroblast growth factor (bFGF): PeproTech (NJ, USA)

Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.25%): Thermo Fisher (Massachusetts, USA)

Phosphate-buffered saline (PBS): TAKARA Bio Inc. (Shiga, Japan)

Heparin: Wako (Osaka, Japan)

Sodium azide: Wako (Osaka, Japan)

Bovine Serum Albumin (BSA): Wako (Osaka, Japan)

MitoTracker Deep Red: Invitrogen Molecular Probes (Oregon, USA)

DMEM (Low Glucose) with Sodium Pyruvate: Wako (Osaka, Japan)

WST-1 reagent: Takara Bio Inc. (Shiga, Japan)

1-2. 粒子調製関連

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE): Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)

Sphingomyelin (SM): Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)

1,2-dimyristoyl-rac-glycerol-polyethylene glycol (MW 2000) (DMG-PEG 2k): NOF Co. (Tokyo, Japan)

Stearylated octa-arginine (STR-R8): Toray Industries (Tokyo, Japan)

CoQ₁₀: Wako (Osaka, Japan)

1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI): Thermo Fisher (Massachusetts, USA)

Ethanol (EtOH): Wako (Osaka, Japan)

Milli-Q (ultrapure water purified by Milli-Q system) (double-distilled water (DDW)): Merck Millipore

HEPES: Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)

Methanol: Wako (Osaka, Japan)

Acetonitrile (CH₃CN): Wako (Osaka, Japan)

1-3. 酸素消費速度関連

Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

XF DMEM Medium: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

XF Calibrant: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

1.0 mM glucose solution: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

100 mM pyruvate solution: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

200 mM glutamic acid solution: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

Seahorse XFp Cell Culture Miniplates: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

Seahorse XFp Extracellular Flux Cartridges: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

2. 実験機器

2-1. 細胞培養・フローサイトメトリー・顕微鏡関連

Corning 100 mm TC-treated culture dish: Corning (NY, USA)

Corning Costar 6-well Clear TC-treated multiple well plates: Corning (NY, USA)

Corning Costar 48-well Clear TC-treated multiple well plates: Corning (NY, USA)

Conical tube (15 mL, 50 mL): AS ONE Corporation (Osaka, Japan)

Autoclave (LBS-325): TOMY

CO₂ incubator (5400): NAPCO

CO₂ incubator (MCO-19AIC, MCO-175): SANYO

Clean bench (NS-13B): BIOLABO

Clean bench (MCV-710ATS): SANYO

Refrigerated centrifuge (EX-125): PerkinElmer

35 mm glass-bottom dish: IWAKI (Shizuoka, Japan)

2-2. 粒子調製関連

Spectra/Por 4 dialysis membrane: Spectrum Laboratories

Glass syringe (1 mL, 2.5 mL): HAMILTON

Standard Infusion Only Pump 11 Elite: HARVARD APPARATUS

Microfluidic device (iLiNP): Faculty of Engineering, Hokkaido University

96-well black plate, non-treated surface, no lid, non-sterile: Thermo Fisher (Massachusetts, USA)

COSMOSIL 5C18ARII column: Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)

2-3. 測定機器関連

Zetasizer Nano ZS: Malvern (Malvern, UK)

pH Meter (D-71): HORIBA (Kyoto, Japan)

Varioskan LUX multimode micro plate reader: Thermo Fisher (Massachusetts, USA)

Arc™ HPLC system: Waters (Tokyo, Japan)

CytoFLEX: Beckman Coulter (Tokyo, Japan)

ECLIPSE Ti series: NIKON (Tokyo, Japan)

Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer: Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

CellDrop: DeNovix (DE, USA)

2-4. その他

Vortex-Genie 2: Scientific Industries (NY, USA)

3. 試薬調製

3-1. 細胞培養・フローサイトメトリー・顕微鏡関連

- 胎牛血清 (FBS) の熱不活化

FBS は 37℃の水浴で解凍し、続いて 56℃ で 30 分間加熱処理した後、50 mL ずつ分注し、-20℃で保存した。

- HEPES 緩衝液 (1,000 mM、pH 7.4)

HEPES (2.38 g) を 二重蒸留水 (DDW) に溶解し、NaOH で pH 7.4 に調整した後、10 mL にメスアップし、フィルター濾過により滅菌した。調製後は 4℃で保存した。

- REC 培地

熱不活化 FBS (100 mL) および抗生物質 (ペニシリン 50,000 単位およびストレプトマイシン 50 mg、5 mL)、HEPES 緩衝液 (1,000 mM、pH 7.4、5 mL) を、DMEM (低グルコース、L-グルタミンおよびフェノールレッド含有、400 mL) に添加した。調製後は 4℃で保存した。

- 線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 溶液 (4 µg/mL)

Basic FGF (10 µg) を 5 mM Tris 緩衝液 (100 µL) に溶解し、2.4 mL の REC 培地と混合した。調製後は -20℃で保存した。

- PBS 溶液

PBS タブレット (1 L 用) 1 個を DDW 1,000 mL に溶解し、オートクレーブにより滅菌した。調製後は 4℃で保存した。

- FACS 緩衝液

BSA (75 mg) および 0.1% アジ化ナトリウム (15 mg) を PBS 溶液 15 mL に溶解した。調製後は 4℃で保存した。

3-2. 粒子調製関連

- **HEPES 緩衝液 (10 mM、pH 7.4)**

HEPES (119 mg) を DDW に溶解し、NaOH で pH 7.4 に調整した後、50 mL にメスアップし、フィルター濾過により滅菌した。調製後は 4 °C で保存した。

- **DOPE 溶液 (7.5 mM)**

DOPE (55.81 mg) を EtOH 10 mL に溶解した。調製後は -20 °C で保存した。

- **SM 溶液 (7.5 mM)**

SM (57 mg) を EtOH 10 mL に溶解した。調製後は -20 °C で保存した。

- **DMG-PEG 2k 溶液 (7.5 mM)**

DMG-PEG 2k (18.825 mg) を EtOH 1 mL に溶解した。調製後は -20 °C で保存した。

- **STR-R8 溶液 (20 mg/mL)**

STR-R8 (5 mg) を EtOH 250 μ L に溶解した。調製後は -20 °C で保存した。

- **CoQ₁₀ 溶液 (1.5 mM)**

CoQ₁₀ (12.95 mg) を EtOH 10 mL に溶解した。調製後は -20 °C で保存した。

- **CoQ₁₀ 溶液 (3.0 mM)**

CoQ₁₀ (7.77 mg) を EtOH 3 mL に溶解した。調製後は -20 °C で保存した。

- **CoQ₁₀ 溶液 (5.0 mM)**

CoQ₁₀ (12.95 mg) を EtOH 3 mL に溶解した。調製後は -20 °C で保存した。

- **CoQ₁₀ 溶液 (7.0 mM)**

CoQ₁₀ (6.05 mg) を EtOH 1 mL に溶解した。調製後は -20 °C で保存した。

- **CoQ₁₀ 溶液 (9.0 mM)**

CoQ₁₀ (7.77 mg) を EtOH 1 mL に溶解した。調製後は -20 °C で保存した。

3-3. 酸素消費速度関連

- **ランニング培地**

1.0 mM グルコース溶液 (55 μ L)、200 mM グルタミン酸溶液 (200 μ L)、および 100 mM ピルビン酸溶液 (125 μ L) に XF DMEM 培地を加え、10 mL にメスアップした。調製後は 4 $^{\circ}$ C で保存した。

- **オリゴマイシン (Oligomycin) ストック溶液 (50 μ M)**

Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit 内のオリゴマイシンにランニング培地 (252 μ L) を加えて溶解した。調製後は 4 $^{\circ}$ C で保存した。

- **Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) ストック溶液 (50 μ M)**

Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit 内の FCCP にランニング培地 (288 μ L) を加えて溶解した。調製後は 4 $^{\circ}$ C で保存した。

- **ロテノン/アンチマイシン A (Rotenone/Antimycin A) ストック溶液 (25 μ M)**

Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit 内のロテノン/アンチマイシン A にランニング培地 (216 μ L) を加えて溶解した。調製後は 4 $^{\circ}$ C で保存した。

- **オリゴマイシン (Oligomycin) 溶液 (20 μ M)**

オリゴマイシン (Oligomycin) ストック溶液 (80 μ L) をランニング培地 (120 μ L) で希釈した。

- **FCCP 溶液 (15 μ M)**

FCCP ストック溶液 (60 μ L)、XF 100 mM ピルビン酸溶液 (60 μ L) およびランニング培地 (80 μ L) を混合した。

- **ロテノン/アンチマイシン A (Rotenone/Antimycin A) 溶液 (5 μ M)**

ロテノン/アンチマイシン A (Rotenone/Antimycin A) ストック溶液 (40 μ L) をランニング培地 (160 μ L) で希釈した。

4. 実験操作・方法

4-1. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (REC)

REC は島根大学バイオベンチャー企業である PuREC 社より継代 5 の段階で購入した。REC セルストック (0.5 mL) を 37 °C に加温し、REC 培地 (9.5 mL) で溶解しながら回収後、遠心分離 (4 °C、200 × g、5 分) した。上清をアスピレーターで除去し、REC 培地 (10 mL) で再懸濁した後、 $5-10 \times 10^4$ cells/mL となるよう 10 cm 培養皿 に 10 mL を播種し、Basic FGF (4 µg/mL、50 µL) を加えて 37 °C、5% CO₂ 下でインキュベートした。細胞の継代は 80% コンフルエントになった際に行った。

継代時は、培地を除去し、PBS 溶液 (5 mL) で洗浄後、0.05% トリプシン溶液 (2 mL) を加えて 37 °C、5% CO₂ 下 で 2-3 分間インキュベートした。REC 培地 (8 mL) を加えて細胞懸濁液を回収後、遠心分離 (4 °C、200 × g、5 分) し、上清を除去した。REC 培地 (10 mL) で再懸濁し、セルカウントを行った後、必要量を 10 cm 培養皿に 10 mL となるように播種し、Basic FGF (4 µg/mL、50 µL) を加えて 37 °C、5% CO₂ 下で培養した。培地は週 2-3 回交換し、実験には継代 7-11 の REC を使用した。

4-2. EtOH 中における CoQ₁₀ の溶解性の評価

MITO-Porter に内包可能な CoQ₁₀ 量の限界を検討するため、EtOH 中における CoQ₁₀ の溶解性を評価した。CoQ₁₀ 溶液は 1.5、3.0、5.0、7.0、9.0 mM となるよう調製し、室温で 12 時間静置した。

4-3. MITO-Porter の調製

MITO-Porter は、脂質 DOPE:SM:DMG-PEG 2k:STR-R8 をモル比 9:2:0.33:1.1 で 4.2 mM 含む EtOH 懸濁液を用いて構築した。また、0.7、1.3、および 2.2 mM の CoQ₁₀ を含む EtOH 懸濁液を用い、従来の MP-(CoQ₁₀) と比較してそれぞれ約 2 倍 (MP-(2x CoQ₁₀))、3 倍 (MP-(3x CoQ₁₀)) の CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter を調製した。さらに、ネガティブコントロールとして CoQ₁₀ を含まない MITO-Porter (MP-(Empty)) も作製した。

CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter の調製は、まず CoQ₁₀ 溶液を調製した後、脂質懸濁液と混濁する手順で行った。具体的には、1.5、3.0、5.0 mM の CoQ₁₀ 溶液を脂質懸濁液に加え、それぞれ最終濃度 0.7、1.3、2.2 mM の CoQ₁₀ を含有する MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、MP-(3x CoQ₁₀) を構築した。

蛍光標識のため、実験条件に応じて総脂質量あたり 0.1 または 0.5 mol% の DiI を EtOH 懸濁液に添加した。MITO-Porter の調製は、マイクロ流体デバイスシステムを用いて EtOH 中の脂質と PBS 溶液を混合し、合計流速 500 μ L/min (脂質相 100 μ L/min、PBS 相 400 μ L/min、EtOH 濃度 20%) で行った。流速の制御にはシリンジポンプ (Harvard Apparatus) を用いた。得られた懸濁液は、Spectra/Por 4 透析膜 (分子量カットオフ 12–14 kDa) を用いて PBS に対して 2 時間透析した。

4-4. MITO-Porter の物性測定

平均粒子径、ポリ分散指数 (PDI)、およびゼータ電位は Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) を用いて測定し、粒径は体積分布として示した。粒径測定にはサンプル (50 μ L) を測定用セルに注入して測定した。ゼータ電位はサンプル (50 μ L) と HEPES 緩衝液 (pH 7.4、450 μ L) を混合した溶液を測定用セルに注入して測定した。

脂質量の推定は、総脂質量の 0.5 mol% で DiI 標識したリポソームの蛍光強度を、Varioskan LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific Life Science) を用いて測定することにより行った (励起波長 549 nm、蛍光波長 565 nm)。

MITO-Porter に内包された CoQ₁₀ 量の確認は、既報の方法に従い、ArcTM HPLC system を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した (Hibino et al, 2019)。回収率は以下の式で算出した：回収率 (%) = (試料中の脂質または CoQ₁₀ 量/初期脂質または CoQ₁₀ 量) $\times$ 100。

さらに、脂質量に対する薬物含有量を確認するため、薬剤/脂質比 (w:w) を以下の式により算出した：薬剤/脂質比 = 試料中の CoQ₁₀ 量 (μ g)/試料中の脂質量 (μ g)。

4-5. MITO-Porter の安定性評価

MITO-Porter の安定性を評価するため、MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x

CoQ₁₀)、MP-(3x CoQ₁₀) を遮光条件下、4 °C で 4 週間保存した。粒子特性は、所定の時間間隔 (0 日、2 日、1 週、2 週、3 週、4 週) で測定した。

4-6. フローサイトメトリーを用いた細胞内取り込み評価

REC (1.0×10^5 cells/well) を 6 ウェルプレートに播種し、37 °C、5% CO₂ 下で REC 培地を用いて 24 時間培養した。その後、PBS 溶液 (Non-treatment 群: NT 群)、MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を添加した。各 MITO-Porter は 0.5 mol% DiI で標識されており、ウェル内での最終脂質濃度は 20 μM とした。

添加後、37 °C、5% CO₂ 下でさらに 24 時間培養し、細胞を PBS 溶液 (1 mL) で 1 回、ヘパリン (20 U/mL) を含む PBS 溶液 (500 μL) で 2 回洗浄した。続いてトリプシン処理により細胞を回収し、REC 培地に懸濁した。遠心分離 (4°C、700 × g、4 分) 後、上清を除去し、FACS 緩衝液に再懸濁した。得られた細胞懸濁液はナイロンメッシュで濾過し、CytoFLEX (Beckman Coulter) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。解析には Kaluza ソフトウェア (Becker Coulter) を使用した。

DiI は 561 nm で励起し、582/42 バンドパスフィルター (BP) を用いて蛍光を検出した。細胞内取り込みは平均蛍光強度 (MFI) として評価した。

4-7. 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いた細胞内動態観察

REC (2.0×10^4 cells/well) を 35 mm ガラスボトムディッシュに播種し、37 °C、5% CO₂ 下で REC 培地を用いて 24 時間培養した。その後、PBS 溶液 (NT 群)、MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を添加した。各 MITO-Porter は 0.1 mol% DiI で標識されており、最終脂質濃度は 20 μM とした。

添加後、37 °C、5% CO₂ 下でさらに 24 時間培養後、培地を REC 培地に交換し、MitoTracker Deep Red (最終濃度 60 nM) で 30 分間ミトコンドリアを染色した。続いて、フェノールレッドを含まない DMEM で 2 回洗浄し、20% FBS を含むフェノールレッドフリー DMEM に交換した。

細胞内動態は、ECLIPSE Ti 顕微鏡を搭載した A1 R シリーズ共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM、Nikon)、水浸対物レンズ (Plan Apo Vibration Compensation (VC) 60x/1.20 Perfect Focus System (PFS) Water Immersion (WI))、および二色分光

ミラー (DM405/488/561/640) を用いて観察した。DiI 標識 Mito-Porter は 561 nm 励起で検出し、MitoTracker Deep Red で染色したミトコンドリアは 638 nm 励起で検出した。蛍光検出チャンネルは以下の条件で設定した：Ch1：595/50 BP (緑：DiI 用)、Ch2：700/75 BP (赤：MitoTracker Deep Red 用)。得られたデータは NIS-Elements ソフトウェア (Nikon) により解析した。

4-8. REC のミトコンドリア呼吸能の評価

酸素消費速度 (OCR) は、Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies) を用いて評価した。

REC (1.0×10^4 cells/well) を 8 ウェルプレート (Agilent Technologies) に播種し、REC 培地を用いて 37 °C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。その後、細胞に PBS 溶液 (NT 群)、MP-(Empty)、または MP-(CoQ₁₀) を最終脂質濃度 50–60 μM で添加し、37 °C、5% CO₂ 下でさらに 24 時間培養した。

解析前に、細胞をランニング培地 (グルコース、ピルビン酸、およびグルタミンをそれぞれ最終濃度 55、12.5、40 mM 含む、フェノールレッド非含有 DMEM) に置換し、37 °C、CO₂ 非存在下で 1 時間インキュベートした。OCR は、Oligomycin、FCCP、および Rotenone/Antimycin A を順次添加することにより測定した (最終濃度はそれぞれ 2.0、1.5、0.5 μM) (図 5)。なお、ピルビン酸枯渇を防ぐため、FCCP 添加時にはピルビン酸を追加し、最終濃度 15.0 mM とした。

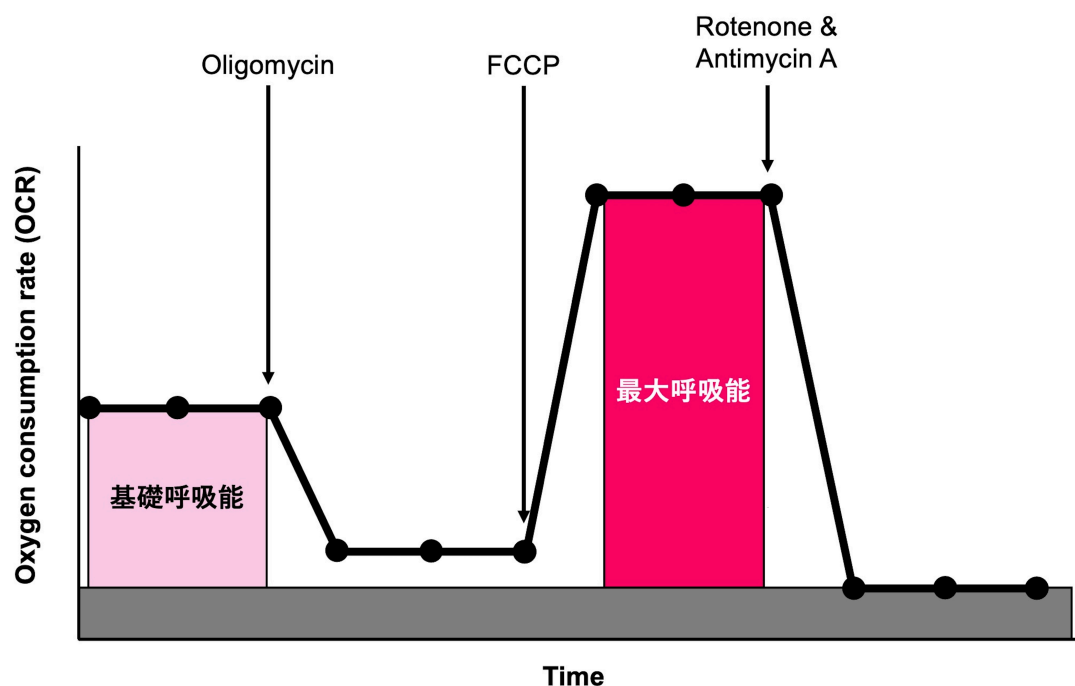


図 5 細胞外フラックスアナライザーを用いた酸素消費速度測定の様式図
 酸素消費速度 (OCR) は、Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies) を用いて評価した。基礎および最大 OCR は、Oligomycin (複合体 V 阻害剤)、FCCP (ミトコンドリアの酸化的リン酸化を脱共役し、ミトコンドリア呼吸鎖を最大化する薬剤)、ならびに Rotenone (複合体 I 阻害剤)/Antimycin A (複合体 III 阻害剤) を順次添加することにより算出した。

OCR 測定後、各ウェルの細胞をトリプシン処理により回収し、細胞数を計測した。得られた OCR 値は細胞数で正規化し、 $\text{pmol}/\text{min}/10^4 \text{ cells}$ として表記した。さらに、基礎呼吸能 (Basal respiration) および最大呼吸能 (Maximal respiration) の相対 OCR は、NT 群 (対照) の OCR を基準として算出した。

4-9. 従来型の MP-(CoQ₁₀) より多くの CoQ₁₀ を内包する MITO-Porter を添加した REC のミトコンドリア呼吸能評価

OCR は、Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies) を用いて評価した。

REC ($8.0 \times 10^3 \text{ cells}/\text{well}$) を 8 ウェルプレート (Agilent Technologies) に播種

し、REC 培地を用いて 37 °C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。その後、細胞に PBS 溶液 (NT 群)、MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を最終脂質濃度 20 μM で添加し、37 °C、5% CO₂ 下でさらに 24 時間培養した。

解析前に、細胞をランニング培地 (グルコース、ピルビン酸、およびグルタミンをそれぞれ最終濃度 55、12.5、40 mM 含むフェノールレッド非含有 DMEM) に置換し、37 °C、CO₂ 非存在下で 1 時間インキュベートした。OCR は、Oligomycin、FCCP、および Rotenone/Antimycin A を順次添加することにより測定した (最終濃度はそれぞれ 2.0、1.5、0.5 μM) (図 5)。なお、ピルビン酸枯渇を防ぐため、FCCP 添加時にはピルビン酸を追加し、最終濃度 15.0 mM とした。

OCR 測定後、各ウェルの細胞をトリプシン処理により回収し、自動細胞カウンター CellDrop (DeNovix) を用いて細胞数を算定した。得られた OCR 値は細胞数で正規化し、pmol/min/10⁴ cells として表記した。さらに、基礎呼吸能 (Basal respiration) および最大呼吸能 (Maximal respiration) の相対 OCR は、NT 群 (対照) の OCR を基準として算出した。

4-10. WST-1 assay を用いた MITO-Porter の細胞毒性解析

MITO-Porter の REC に対する細胞毒性は、WST-1 試薬を用いた細胞生存率 (Cell viability) アッセイにより評価した。吸光度の測定は、Varioskan LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific Life Science) を用いて測定した。

REC (8.0 × 10³ cells/well) を 48 ウェルプレートに播種し、REC 培地を用いて 37 °C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。その後、PBS 溶液 (NT 群)、MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を最終脂質濃度 10、20、40 μM で添加し、37 °C、5% CO₂ 下でさらに 24 時間培養した。培養後、PBS 溶液 (250 μL) で洗浄し、REC 培地に WST-1 試薬 (Takara Bio) を添加して 37 °C、5% CO₂ 下で 2 時間インキュベートした。

細胞生存率はメーカーの指示に従い Varioskan LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific Life Science) により吸光度を測定し、以下の式で算出した：細胞生存率 (%) = $V_S/V_U \times 100$ 。ここで、 V_S は各試料の吸光度に基づく生存率、 V_U は未処理細胞 (コントロール) の生存率を示す。

5. 統計解析

データは、実施した実験回数に基づき平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で示した。2 群間の差は Student の t 検定により解析し、多群間の差は一元配置分散解析 (one-way ANOVA) に続き Student-Newman-Keuls 検定で解析した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter の調製

1-1. 既報の方法を用いた REC のミトコンドリア呼吸能の評価

本研究において、我々はまず、CDC におけるミトコンドリア機能活性化を報告した先行研究 (Shiraishi et al, 2024) に従い、最終脂質濃度 50–60 μM の MP-(CoQ₁₀) を 24 時間 REC に添加し、ミトコンドリア機能の増強を試みた。しかし、細胞外フラックスアナライザーによる評価の結果、ミトコンドリア呼吸能に有意な変化はみられなかった (図 6)。これらの結果から、CDC と比較して REC におけるミトコンドリア機能の活性化はより困難であり、従来の MP-(CoQ₁₀) では十分な効果が得られない可能性が示唆された。

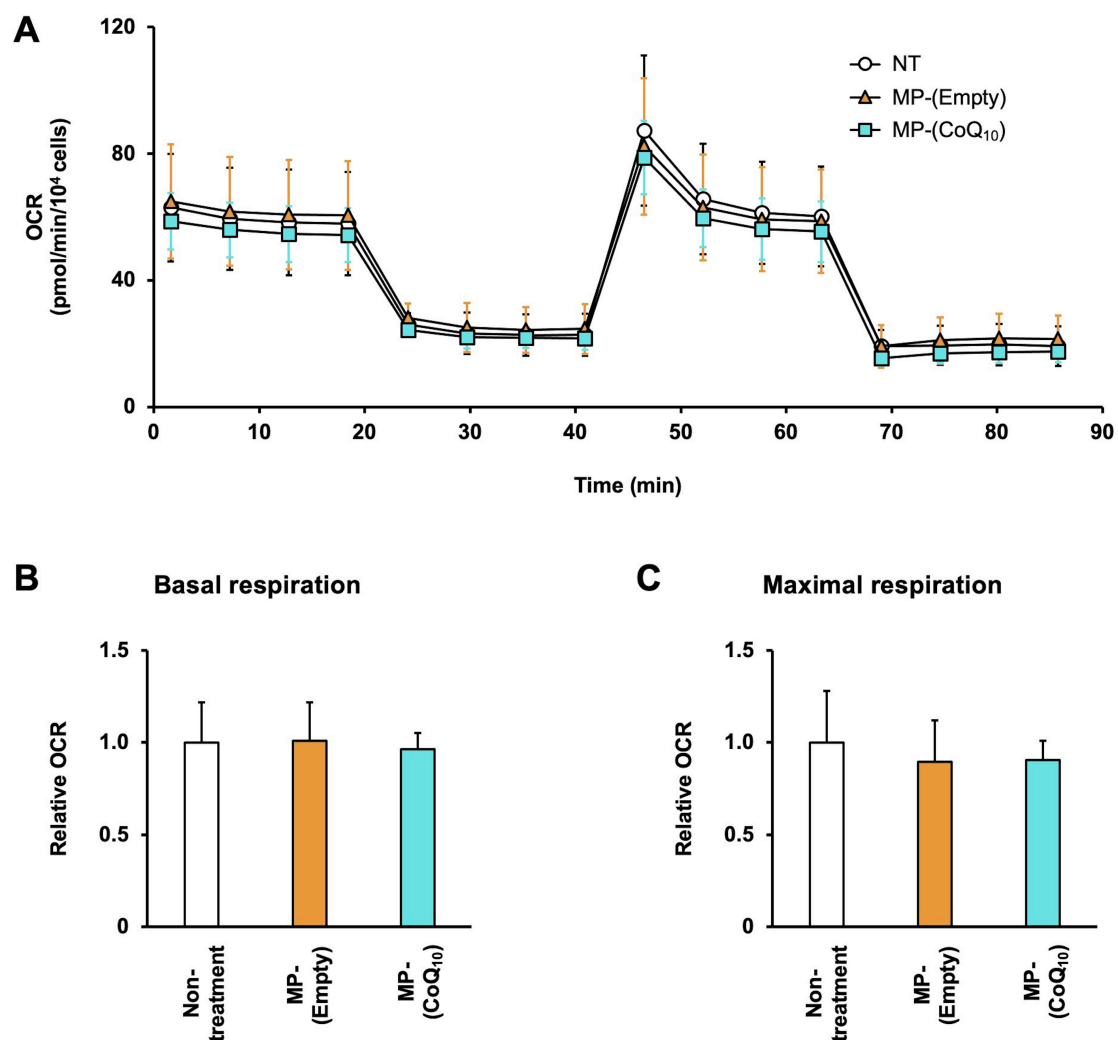


図 6 心臓由来細胞においてミトコンドリア呼吸能を活性化した先行手法を用いた REC のミトコンドリア呼吸能評価

酸素消費速度 (OCR) は、最終脂質濃度 50–60 μM にて MP-(Empty) または従来型 MP-(CoQ₁₀) で処理した後、Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies) を用いて評価した (A)。基礎呼吸 (B) および最大呼吸 (C) における OCR は、無処理 (Non-treatment: NT) 群の OCR を基準として算出した。MP-(CoQ₁₀) 処理後において、OCR に有意な変化は認められなかった。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) で示した。有意差は一元配置分散解析 (one-way ANOVA) 後、Student-Newman-Keuls 検定により算出した。

1-2. EtOH に溶解可能な CoQ₁₀ 量の評価

MITO-Porter に内包可能な CoQ₁₀ 量の限界を検討するため、まず EtOH における CoQ₁₀ の溶解可能量を評価した。1.5、3.0、5.0、7.0、9.0 mM の濃度で CoQ₁₀ 溶液を調製し、室温で 12 時間静置したところ、7.0 mM および 9.0 mM では肉眼的に沈殿が確認された (図 7)。一方、1.5–5.0 mM では沈殿は認められなかった。これらの結果から、CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter の調製において、EtOH 中の適正な最大 CoQ₁₀ 濃度は 5.0 mM であると考えられた。したがって、MITO-Porter に内包可能な CoQ₁₀ の最大量は、従来の MP-(CoQ₁₀) の約 3 倍に相当すると推定された。

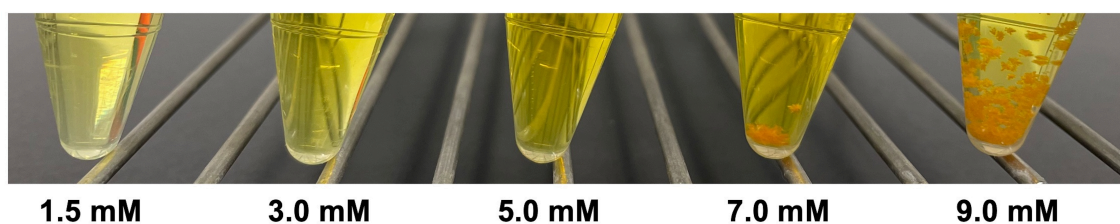


図 7 EtOH 中における CoQ₁₀ 溶解量の評価

1.5、3.0、5.0、7.0、9.0 mM の濃度で CoQ₁₀ 溶液を調製し、室温で 12 時間静置したところ、7.0 mM および 9.0 mM では肉眼的に沈殿が確認された。

1-3. 従来型の MP-(CoQ₁₀) より多くの CoQ₁₀ を内包する MITO-Porter の調製

REC におけるミトコンドリア呼吸能を増強するため、我々はマイクロ流体デバイスを用いて、より多くの CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter の調製を試みた (図 4)。その結果、CoQ₁₀ 懸濁液の濃度を変化させることにより、従来型の約 2 倍および 3 倍量の CoQ₁₀ を含有する MP-(2x CoQ₁₀) および MP-(3x CoQ₁₀) の作製に成功した。また、ネガティブコントロールとして CoQ₁₀ を含まない MP-(Empty) も併せて調製した。

1-4. MITO-Porter の物性評価

平均粒子径、粒径分布を示す指標であるポリ分散指数 (PDI)、およびゼータ電位を表 1 に示した。MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、MP-(3x CoQ₁₀) の粒子径はそれぞれ 41 ± 2.7 nm、 51 ± 7.2 nm、 57 ± 4.4 nm、 58 ± 6.2 nm であり、内包された CoQ₁₀ 量の増加に伴い粒子径も増大する傾向が認められた。MITO-Porter は STR-R8 による粒子表面修飾により正電荷を帯びていた。各粒子の PDI およびゼータ電位は、それぞれおおよそ 0.180–0.220 および 18–20 mV であった。

脂質および CoQ₁₀ の回収率を表 1 に示した。MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、MP-(3x CoQ₁₀) の脂質回収率は 75–85% であり、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、MP-(3x CoQ₁₀) の CoQ₁₀ 回収率は 75–80% であった。さらに、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、MP-(3x CoQ₁₀) の薬物/脂質比 (重量比) は、それぞれ 0.16 ± 0.01 、 0.36 ± 0.06 、 0.55 ± 0.07 であった。これらの結果から、マイクロ流体デバイスを用いることで MITO-Porter に内包される CoQ₁₀ 量を制御可能であり、REC におけるミトコンドリア機能の改変に有用である可能性が示唆された。

表 1 MITO-Porter の粒子特性

	調製用 CoQ ₁₀ 初期量	平均 粒子 径	PDI	ゼータ 電位	脂質 回収 率	CoQ ₁₀ 回収 率	薬物/ 脂質比
	(mM)	(nm)		(mV)	(%)	(%)	(w:w)
MP- (Empty)	—	41 ± 2.7	0.182 ± 0.043	20 ± 1.4	79 ± 3.3	—	—
MP- (CoQ ₁₀)	0.7	51 ± 7.2	0.219 ± 0.013	20 ± 1.8	86 ± 7.1	75 ± 4.0	0.16 ± 0.01
MP- (2x CoQ ₁₀)	1.3	57 ± 4.4	0.202 ± 0.025	19 ± 0.6	78 ± 11.5	77 ± 1.3	0.37 ± 0.06
MP- (3x CoQ ₁₀)	2.2	58 ± 6.2	0.179 ± 0.021	18 ± 1.8	85 ± 9.2	80 ± 2.9	0.57 ± 0.07

1-5. MITO-Porter の安定性解析

MITO-Porter の安定性を評価するために、MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、および MP-(3x CoQ₁₀) を遮光条件下で 4℃ にて 4 週間保存した。粒子特性は所定の時点 (0 日、2 日、1、2、3、4 週) で測定した。その結果、粒子径は 4℃ で 4 週間保存してもほとんど変化がみられなかった。PDI およびゼータ電位 (ζ -potential) は時間の経過に伴い徐々に増加する傾向を示したが、特に保存初週においては概ね安定していた (図 8)。

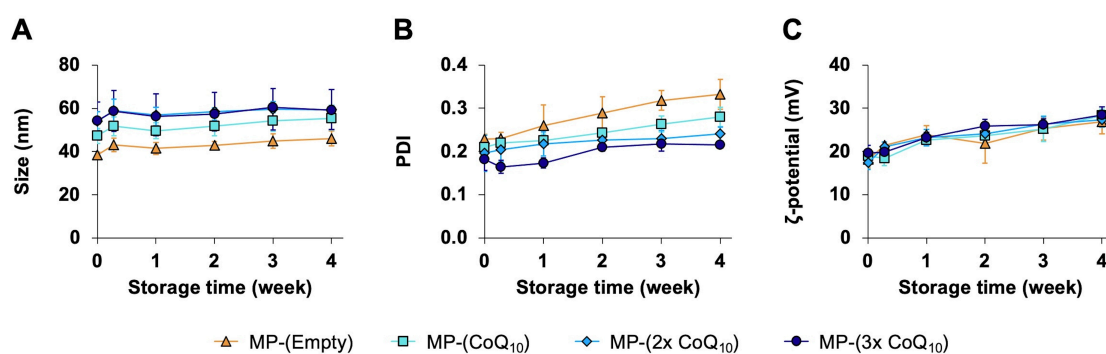


図 8 MITO-Porter の安定性

MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、および MP-(3x CoQ₁₀) を遮光条件下で 4℃ にて 4 週間保存した。粒子径は 4℃ で 4 週間保存してもほとんど変化がみられなかった。PDI およびゼータ電位 (ζ -potential) は時間の経過に伴い徐々に増加する傾向を示したが、特に保存初週においては概ね安定していた。

2. フローサイトメトリーを用いた細胞内取り込みの評価

細胞内への MITO-Porter の取り込みはフローサイトメトリー解析により評価した。REC に対し、蛍光色素 DiI で標識した MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を最終脂質濃度 20 μ M で 24 時間処理し、その取り込みによる蛍光強度を測定した (図 9)。

その結果、MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、および MP-(3x CoQ₁₀) の細胞内取り込みは、無処理群 (NT 群) と比較して有意に増加していた。一方で、CoQ₁₀ の内包により MITO-Porter の細胞内取り込みは有意に低下し、内包した CoQ₁₀ 量の増加に伴ってさらに減少した。これらの結果は、CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter が REC に取り込まれているものの、その取り込みは CoQ₁₀ の存在によって部分的に影響を受けるということが示唆された。

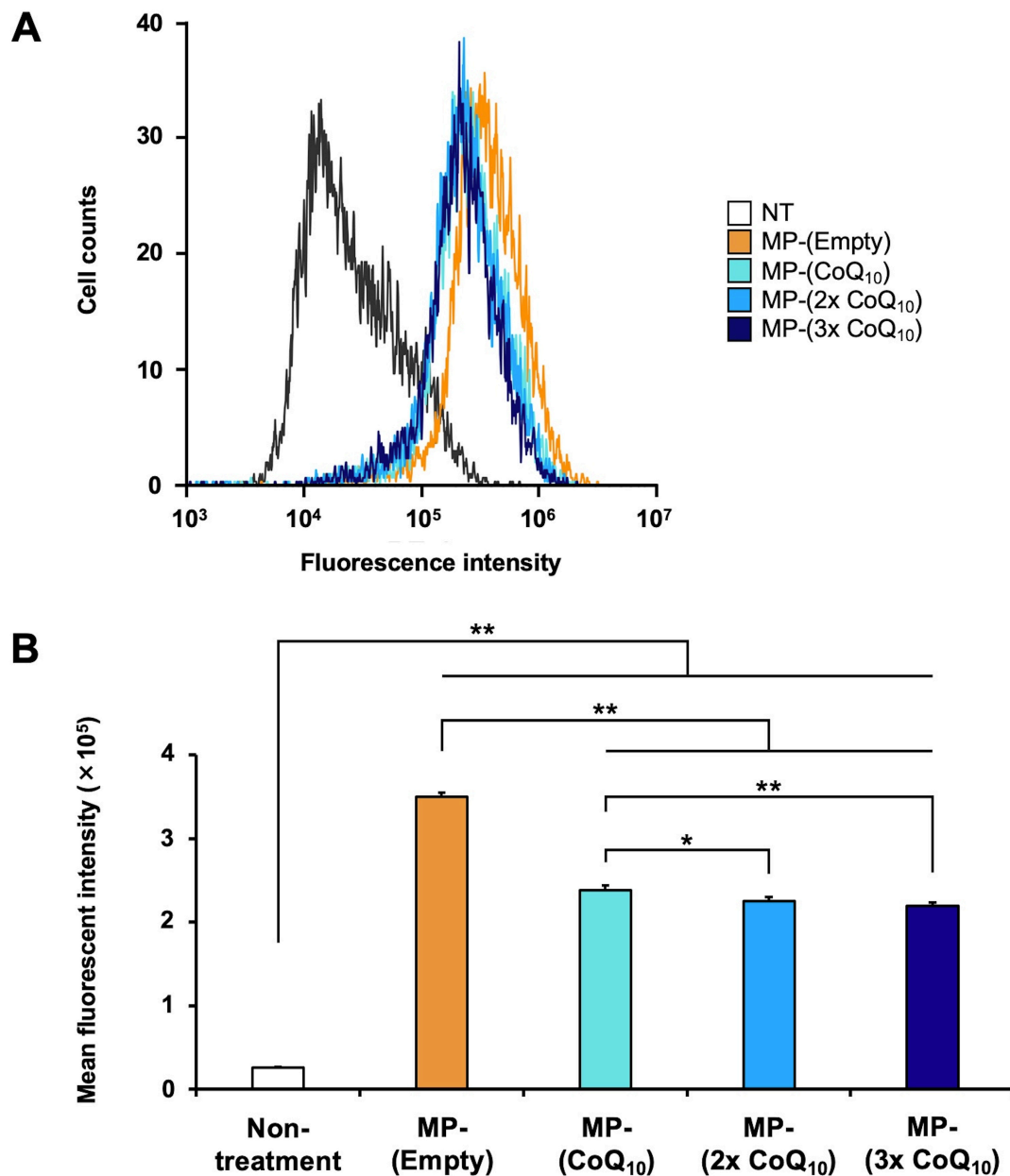


図 9 フローサイトメトリーによる Mito-Porter の細胞内取り込み評価
 (A) 最終脂質濃度 20 μ M にて MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) で処理した後に、REC に取り込まれた DiI の蛍光強度を、無処理 (Non-treatment: NT) 群と比較して示したヒストグラム。
 (B) 平均蛍光強度として表した細胞内取り込み量。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示した。有意差 (*p<0.05、**p<0.01) は、一元配置分散解析 (one-way ANOVA) 後、Student-Newman-Keuls 検定により算出した。

3. CLSM による細胞内動態の観察

DiI で標識した MITO-Porter の細胞内局在および動態を、CLSM を用いて評価した。ミトコンドリアを MitoTracker Deep Red で赤色蛍光標識した REC に対し、緑色蛍光標識した MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を最終脂質濃度 20 μ M で 24 時間処理し、CLSM により観察した (図 10)。

REC における緑色点の存在により、各 MITO-Porter の細胞内取り込みが可視化され、いずれの MITO-Porter も細胞内取り込み能を有することが示唆された。さらに、赤色蛍光で標識されたミトコンドリアと緑色蛍光の MITO-Porter の共局在が、黄信号として観察され、一部の MITO-Porter がミトコンドリア内に取り込まれていることが示唆された。

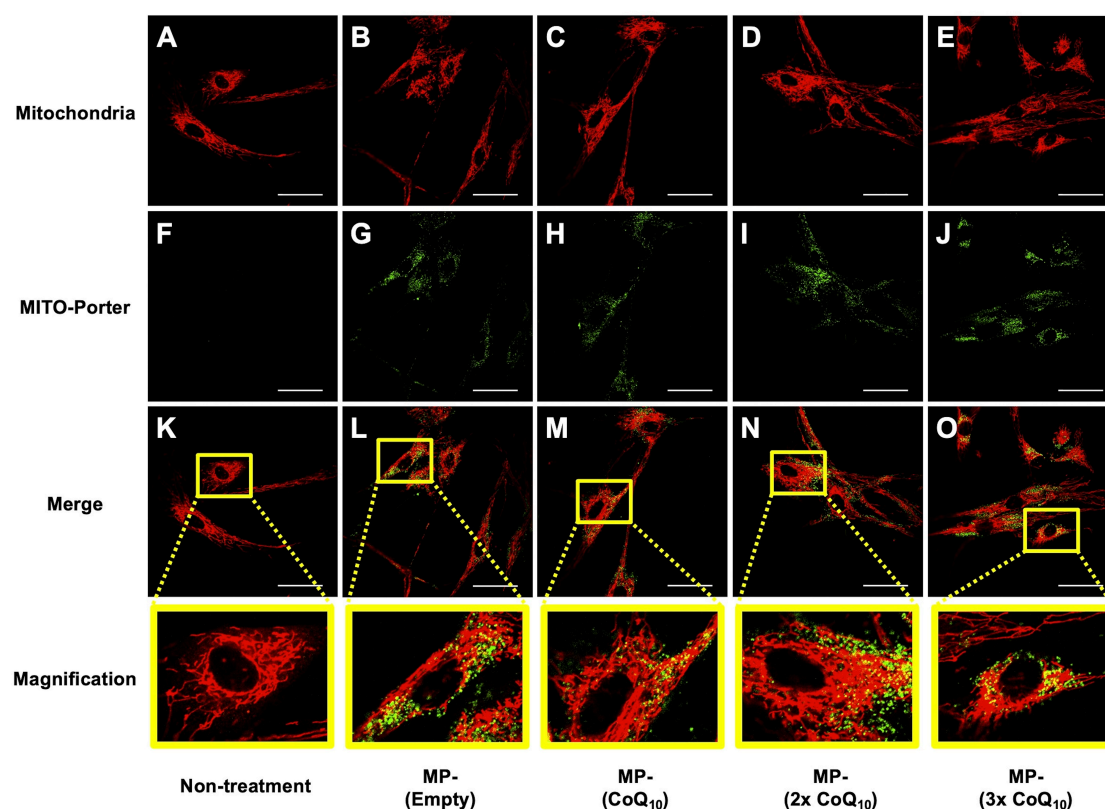


図 10 共焦点レーザー走査型顕微鏡による MITO-Porter の細胞内観察
ミトコンドリア (赤色蛍光、A-E) と MITO-Porter (緑色蛍光、F-J) との共局在は、マージ画像 (K-O) において黄色のシグナルとして可視化された。
スケールバーは 50 μ m。

4. REC におけるミトコンドリア呼吸能の細胞外フラックス解析による評価

REC におけるミトコンドリア呼吸能は、細胞外フラックス解析により OCR を測定することで評価した。まず、REC のミトコンドリア呼吸能を増強するための最適な CoQ₁₀ 内包量を検証する実験を行った (図 11)。MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を最終脂質濃度 20 μ M で処理した 24 時間後に OCR を測定したところ、MP-(2x CoQ₁₀) 処理群での REC の OCR が最大となった。

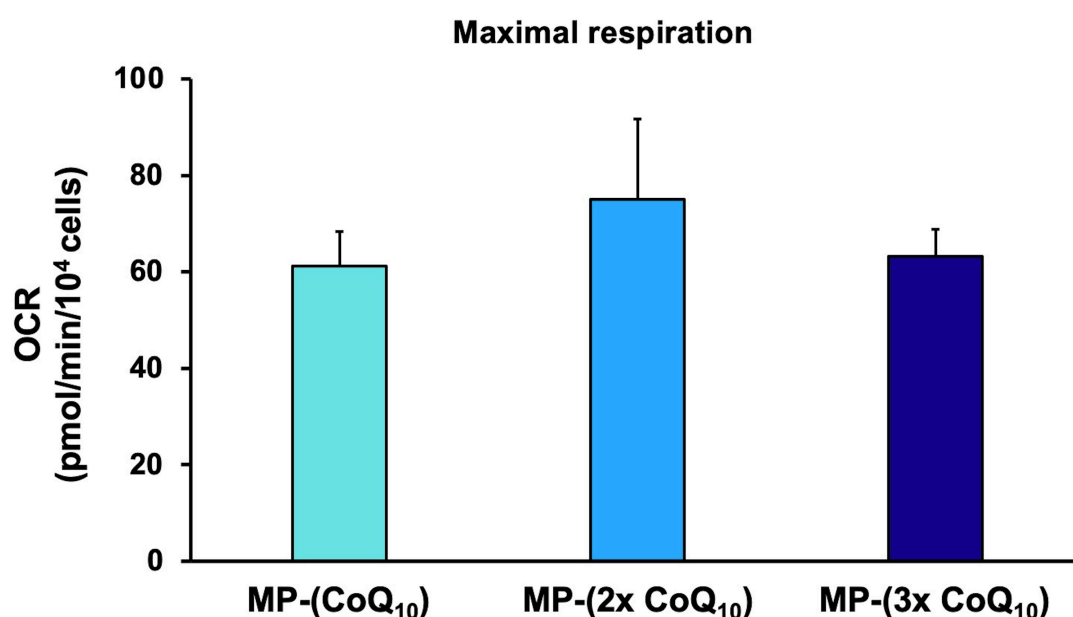


図 11 REC におけるミトコンドリア呼吸能増強のための
MITO-Porter に内包する CoQ₁₀ 最適量の検証

最大酸素消費速度 (OCR) は、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を最終脂質濃度 20 μ M で処理した後、Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies) を用いて評価した。最大 OCR の増加は MP-(2x CoQ₁₀) 処理群が最も高かったが、その差は有意ではなかった。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示した。有意差は、一元配置分散解析 (one-way ANOVA) 後、Student-Newman-Keuls 検定により算出した。

次に、無処理群 (NT 群)、MP-(Empty) 処理群、および MP-(2x CoQ₁₀) 処理の REC に対して、最終脂質濃度 20 μ M で 24 時間処理後の OCR を測定した (図 12)。基礎呼吸能 (Basal respiration) に関しては各群間で有意な変化は認められなかった。しかし、最大呼吸能 (Maximal respiration) は、MP-(2x CoQ₁₀) 処理群において NT 群および MP-(Empty) 処理群と比較して有意に増加した。これらの結果は、MP-(2x CoQ₁₀) が REC におけるピーク時のミトコンドリア呼吸能に最も大きな効果を示す一方で、基礎呼吸能には影響を及ぼさないということが示唆された。

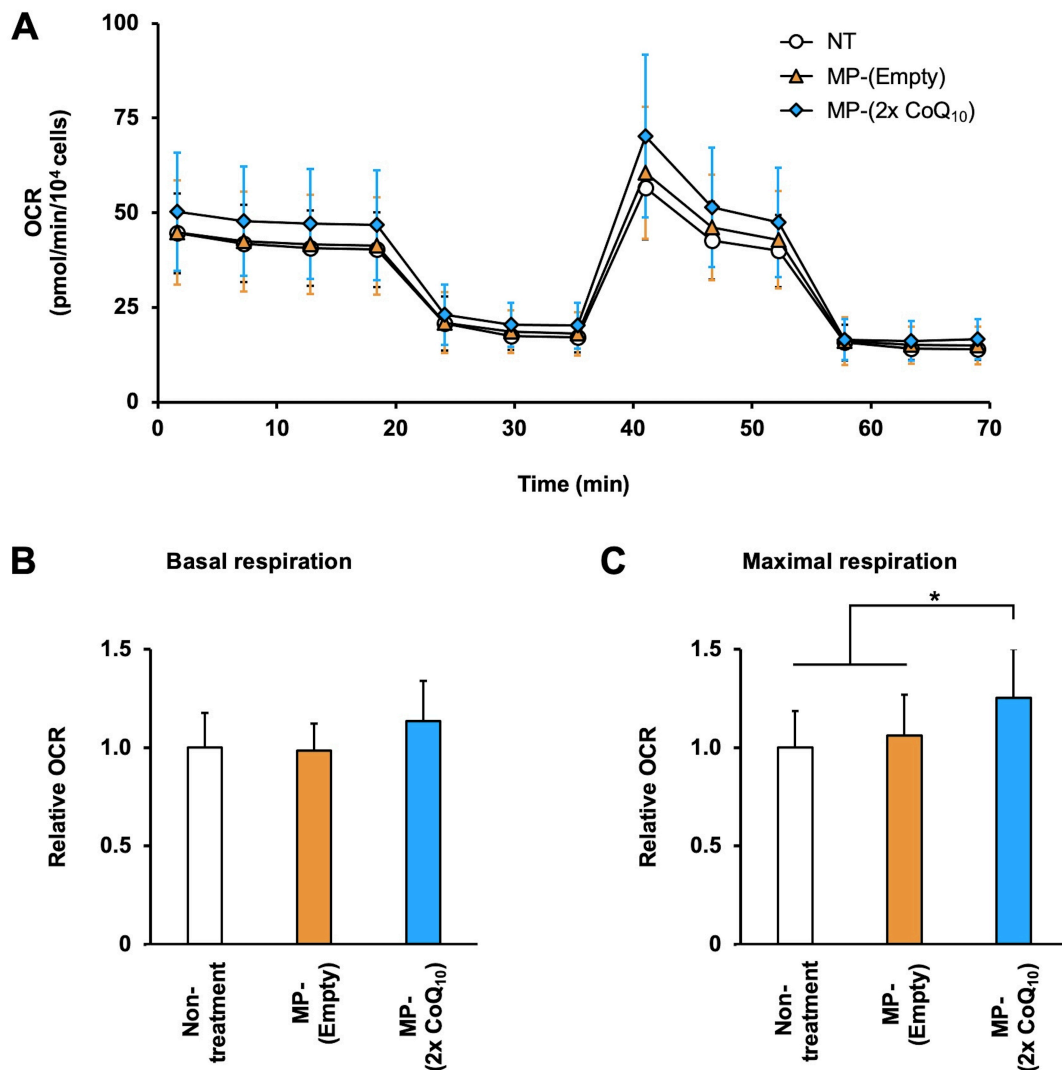


図 12 MP-(Empty) および MP-(2x CoQ₁₀) 処理後のミトコンドリア呼吸能の細胞外フラックス解析による評価

酸素消費速度 (OCR) は、無処理 (Non-treatment: NT) 群、MP-(Empty)、または MP-(2x CoQ₁₀) で処理した後に評価した (A)。基礎呼吸 (B) および最大呼吸 (C) における OCR は、NT 群の OCR で正規化して算出した。最大 OCR は、NT 群および MP-(Empty) 群と比較して、MP-(2x CoQ₁₀) 処理群において有意に増加した。データは平均値 ± 標準偏差 (n = 12) で示した。有意差 (*p<0.05) は、一元配置分散解析 (one-way ANOVA) 後、Student-Newman-Keuls 検定により算出した。

5. WST-1 assay による MITO-Porter の細胞毒性評価

MITO-Porter の細胞毒性は、WST-1 試薬を用いた細胞生存率 (Cell viability) の評価により検討した。MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、または MP-(3x CoQ₁₀) を 24 時間処理した REC の生存率を無処理群 (NT 群) と比較した (図 13)。

最終脂質濃度 10 μ M では、それぞれの MITO-Porter 群の細胞生存率は、 $108 \pm 10.4\%$ 、 $95 \pm 10.4\%$ 、 $103 \pm 5.3\%$ 、 $102 \pm 5.2\%$ であり、最終脂質濃度 20 μ M では $102 \pm 13.4\%$ 、 $101 \pm 7.6\%$ 、 $97 \pm 2.2\%$ 、 $104 \pm 8.2\%$ 、最終脂質濃度 40 μ M では $103 \pm 8.2\%$ 、 $94 \pm 11.0\%$ 、 $93 \pm 4.0\%$ 、 $91 \pm 6.5\%$ であった。NT 群の細胞生存率は $100 \pm 4.6\%$ であった。最終脂質濃度 10–40 μ M の範囲において、NT 群、MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、MP-(3x CoQ₁₀) 間で細胞生存率に有意差は認められなかった。これらの結果から、CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter は、内包量の増加に関わらず REC の生存率に影響を及ぼさないことが示唆された。

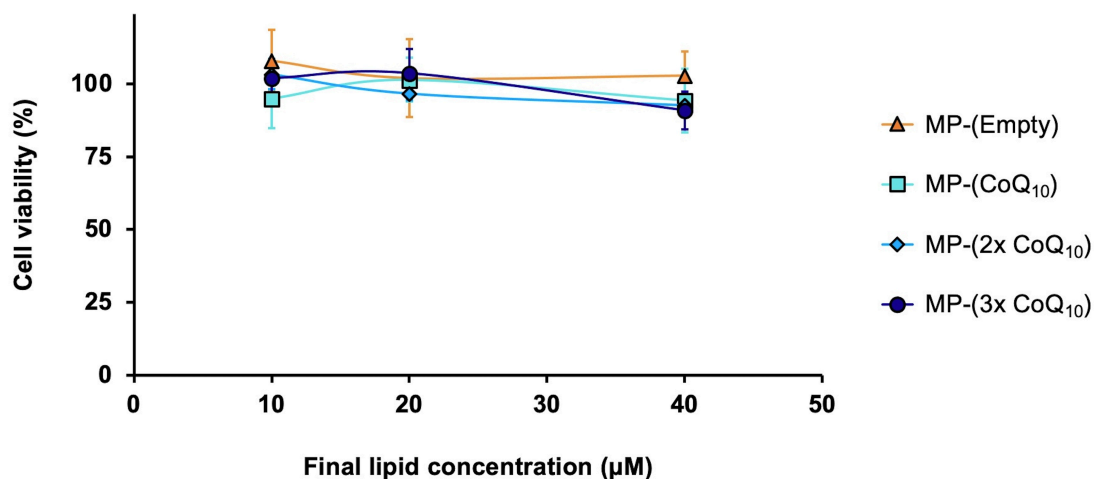


図 13 WST-1 assay による MITO-Porter の細胞毒性評価

MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、および MP-(3x CoQ₁₀) の細胞毒性は、WST-1 試薬を用いた細胞生存率試験により評価し、Varioskan LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific Life Science) で測定した。最終脂質濃度 10–40 μ M の範囲において、MP-(Empty)、MP-(CoQ₁₀)、MP-(2x CoQ₁₀)、および MP-(3x CoQ₁₀) の各群間で細胞生存率に有意な差は認められなかった。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示した。有意差は一元配置分散解析 (one-way ANOVA) 後、Student-Newman-Keuls 検定により算出した。

考 察

本研究では、従来型の MP-(CoQ₁₀) では REC におけるミトコンドリア呼吸能を増強できなかったため、より多量の CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter を、マイクロ流体デバイスシステムを用いて新たに調製した。MITO-Porter 調製前に CoQ₁₀ 懸濁液の濃度を変更することにより、CoQ₁₀ を豊富に内包する MITO-Porter を調製し、REC のミトコンドリア呼吸能を増強することに成功した。

以前の報告では、MP-(CoQ₁₀) による処理がヒト心臓由来細胞およびラット骨格筋におけるミトコンドリア呼吸能を増加させることが示されていた (Sato et al, 2024; Shiraishi et al, 2024)。一方、本研究では、薬物：脂質比 0.16 ± 0.01 の MP-(CoQ₁₀) による処理では、REC の最大呼吸能は有意に増加しなかったが、薬物：脂質比 0.37 ± 0.06 の MP-(2x CoQ₁₀) による処理では、REC の最大呼吸能が有意に増加した。さらに、MP-(2x CoQ₁₀) 処理による REC の最大呼吸能の増加は、ヒト CDC に対する MP-(CoQ₁₀) 処理時の増加量よりも小さかった (Shiraishi et al, 2024)。これらの結果は、MSC におけるミトコンドリア呼吸能の増強が依然として困難であることを示唆している。実際、REC におけるエネルギー産生の約 40–50% は解糖系に依存しており (図 14)、CDC よりも高い割合である可能性がある (Allard et al, 1994; Da Dalt et al, 2023; Menendez-Montes et al, 2023)。本研究の結果は、マイクロ流体デバイス技術を用いて MITO-Porter に内包する CoQ₁₀ 量を調整することで、任意の細胞種におけるミトコンドリア機能を制御できる可能性を示している。

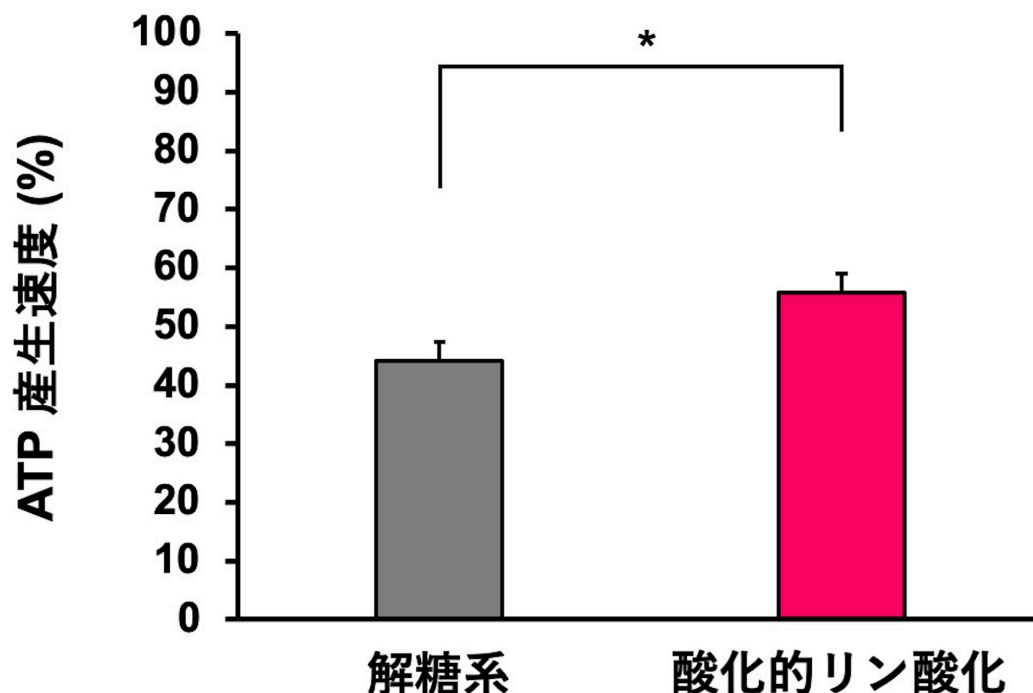


図 14 REC におけるエネルギー代謝の評価（細胞外フラックスアナライザーを用いた解析）

解糖系および酸化的リン酸化による ATP 産生率は、Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies) を用いて評価した。ATP 産生率は酸化的リン酸化において有意に高かったが、REC におけるエネルギー代謝の 40–50% は解糖系が担っていた。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n = 3$) で示した。有意差 (* $p < 0.05$) は Student の t 検定により算出した。

REC における最大呼吸能の増加は、MP-(2x CoQ₁₀) の方が MP-(3x CoQ₁₀) よりも高かった。その理由は判然としないが、CoQ₁₀ の供給量が REC の処理能力を超えたためにミトコンドリア呼吸能がプラトーに達した可能性が考えられる。また、WST-1 assay では細胞生存率は変化しなかったが、CoQ₁₀ の過剰供給がミトコンドリアに対して毒性を示した可能性も考えられる。さらに、MITO-Porter に CoQ₁₀ を過剰に内包することで、粒子の組成に構造変化が生じ、CoQ₁₀ 放出に影響し、その効果が低下した可能性も考えられる。実際、以前の報告では、脂質ナノ粒子に封入する分子量の増加は内部構造の変化をもたらし、その作用に影響を及ぼす可能性があるということが報告されている (Satrialdi et al, 2021;

Kubota et al, 2023)。

フローサイトメトリー解析では、REC における MITO-Porter の細胞内取り込みは、CoQ₁₀ の内包によって低下することが示された。先行研究では、ナノ粒子の最小半径が小さくなるほど、粒子と膜との結合エネルギーが増加することが示されている (Zhang et al, 2009; Canton et al, 2012)。CoQ₁₀ 内包による粒子サイズの増加が、REC における細胞内取り込みに影響した可能性がある。また、粒子の剛性が細胞内取り込みに影響し、内部分子を含む脂質ナノ粒子は空の粒子よりも剛性が高くなることが報告されている (Kimura et al, 2024)。本研究では、MITO-Porter に CoQ₁₀ を内包することで粒子剛性が変化し、REC における細胞内取り込みに影響を与えた可能性がある。

骨髄由来未分化 MSC では、解糖系遺伝子発現を促進する低酸素誘導因子 1 α (HIF-1 α) が高発現しており、骨髄由来 MSC の骨形成または脂肪形成分化中には HIF-1 α および解糖系酵素の発現が低下することが報告されている (Zhang et al, 2013; Shum et al, 2016; Yan et al, 2021)。したがって、MSC の分化は解糖系依存低下およびミトコンドリア酸化的リン酸化の増加と関連していると考えられる (Yan et al, 2021)。CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter によるミトコンドリア機能の増強は、MSC の分化に影響を与え、MSC の細胞移植療法に有益な効果をもたらす可能性がある。MSC の生理的環境である低酸素条件は、MSC の増殖、生存、遊走を促進することが報告されている (Yang et al, 2022; Yang et al, 2023)。一方で、移植部位は心筋のように必ずしも低酸素環境ではない可能性がある (Da Dalt et al, 2023)。我々の以前の研究では、CDC に CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter を処理することで抗酸化能を改善することができたことを示している (Shiraishi et al, 2024)。したがって、MSC における CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter 処理によるミトコンドリア機能の増加が最小限または認められない場合でも、抗酸化物質である CoQ₁₀ を細胞に補充することは、特に移植先が低酸素環境でない場合に細胞生存に寄与する可能性がある。この点については、今後 *in vitro* および *in vivo* でのさらなる検討が必要である。

近年、分娩後に医療廃棄物として従来は破棄されてきた羊膜が、有用な MSC の供給源として注目されている (Alviano et al, 2007; Kawakubo et al, 2016)。動物実験においては、羊膜由来間葉系幹細胞 (amniotic-derived mesenchymal stem cell: AMSC) の移植が、移植片対宿主病 (Yamahara et al, 2014)、心筋炎 (Ohshima et al, 2012)、糸球体腎炎 (Tsuda et al, 2010)、膵炎 (Kawakubo et al, 2016)、Duchenne 型筋ジストロフィー (Nitahara-Kasahara et al, 2023)、脊髄損傷 (Takamiya et al, 2022) など、さまざまな疾患に対して有効であることが報告されている。また、AMSC は北海道大学病院臨床研究開発センター細胞プロセッシング室において使用実績を有している。このことから、北海道大学病院において本細胞を用いた臨床研

究を実施する際には、既存の体制や経験を活用できる点で有利であると考えられる。

本研究で得られた知見を踏まえ、ミトコンドリア機能を活性化した MSC の将来的な臨床応用を見据え、AMSC のミトコンドリア機能を強化する研究を新たに開始した。我々は、CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter を用いた AMSC 機能改変の予備的検討として *in vitro* アッセイを実施し、良好な結果を得ている。具体的には、CoQ₁₀ 内包 MITO-Porter が AMSC に取り込まれることを確認するとともに、AMSC のミトコンドリア呼吸能および抗酸化能の向上を示唆する結果を得た。

今後は、*in vitro* 研究において、ミトコンドリア機能改変型の AMSC を確立することを目指す。さらに、MITO-Porter システムを用いて AMSC のミトコンドリア機能を改変し、動物モデルを用いた有効性の検証を経て、北海道大学におけるヒトへの臨床応用を目指す。本研究は、後任研究者と連携しつつ、北海道大学大学院医学研究院小児科学教室、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室との共同研究として実施していく。

結 論

本研究全体から得られた新知見

- マイクロ流体デバイスを用いることで、MITO-Porter に内包される CoQ₁₀ 量を精密に制御することが可能となった。
- CoQ₁₀ を豊富に内包した MITO-Porter による処理により、MSC のミトコンドリア呼吸能を活性化することに成功した。
- 臨床応用に向けて、市販されている MSC を用いて新たな MITO cell の創成に成功した。

新知見の意義

本研究により、マイクロ流体デバイスを用いることで MITO-Porter に内包される CoQ₁₀ 量を精密に制御できることを明らかにした。また、CoQ₁₀ を豊富に内包した MITO-Porter により、MSC のミトコンドリア機能を活性化できることを示した。これらの知見は、MITO-Porter システムがミトコンドリア機能を人為的に制御し得ることを示すものであり、MSC 移植療法の治療効果を高める新たな技術基盤となる可能性が示唆された。

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

本研究では、CoQ₁₀ を内包した MITO-Porter によって MSC を改変することができるかを検証し、そのミトコンドリア機能を活性化することに成功した。

本研究で得られた知見を踏まえ、ミトコンドリア機能を活性化した MSC の将来的な臨床応用を見据え、AMSC のミトコンドリア機能を強化する研究を新たに開始した。MITO-Porter system を用いて AMSC のミトコンドリア機能を改変し、動物モデルを用いた有効性の検証を経て、北海道大学におけるヒトへの臨床応用を目指す。本研究は、後任研究者と連携しつつ、北海道大学大学院医学研究院小児科学教室、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室との共同研究として実施していく。

今後は、別種の間葉系幹細胞や他種の幹細胞のミトコンドリア機能改変についても挑戦し、ドラッグデリバリーシステムと細胞移植療法を融合させる新たなプラットフォームの構築を目指したい。その先に、ヒトへの臨床応用へ向けた革新的な橋渡し研究を北海道大学で行うことを目標としている。

今後の課題

本研究にはいくつかの課題が存在する。まず、MITO-Porter に内包可能な CoQ₁₀ の量には限界があり、粒子径や安定性への影響を避けるため、EtOH 中の溶解性の制約により最大内包量は制限される。さらに、本研究で用いた REC では、従来の MP-(CoQ₁₀) によるミトコンドリア活性化効果が限定的であったことから、細胞種によって効果の再現性や効率が異なる可能性がある。また、MITO-Porter の長期的な安定性や輸送条件については十分に検証ができておらず、保存期間中の粒子の凝集や CoQ₁₀ の分解リスクが残ることも課題である。加えて、本研究では *in vitro* での効果を確認したにとどまり、*in vivo* における分布、投与効率、ミトコンドリアへの送達の精度、さらには MSC 移植療法との併用効果や安全性については未検証である。これらの点について、今後の研究で検討する必要がある。

謝 辞

本研究遂行するにあたり、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室に 2 年間に在籍する機会をいただき、終始ご指導と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・山田勇磨教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、共同研究の機会を賜り、快く迎え入れてくださるとともに、ご指導を賜りました金沢大学大学院医薬保健学科総合研究科・中村孝司教授、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室・佐藤悠介准教授に深く感謝申し上げます。

また、さまざまな実験手技や薬学の基礎知識を丁寧にご教授いただくとともに、2 年間にわたり充実した実験生活を送ることができたのは、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室のスタッフ、学生、事務補佐員ならびに研究支援員の皆様のおかげであり、ここに深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究の機会を賜り、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室に留学することをお許しくださいました、北海道大学大学院医学研究院小児科学教室・真部淳教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、マイクロ流体デバイス (iLiNP デバイス) をご提供いただきました北海道大学大学院工学研究院マイクロシステム科学研究室渡慶次学教授、真栄城正寿准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究の立ち上げからさらなる発展を目指し、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室に留学するお許しをくださり、数多くのご助言を賜りました北海道大学大学院医学研究院小児科学教室・武田充人准教授に深く感謝申し上げます。

また、留学を快くお許しくださいました小児科学教室循環器グループの先生方に対し、深く感謝申し上げます。

本研究の審査に際し、ご多忙の中、貴重なご助言とご指導を賜りました審査員の先生方に心より深く感謝申し上げます。

なお、本研究は、文部科学省科学研究費助成事業・基盤研究 (A) (課題番号：23H00541、山田勇磨)、科学技術振興機構 (JST) FOREST (課題番号：JPMJFR203X、山田勇磨)、JST SPRING (課題番号：JPMJSP2119、丸尾優爾および白石真大)、武田科学振興財団 (山田勇磨)、および日本医療研究開発機構 (AMED) (課題番号：JP24ym0126801、山田勇磨) の支援を受けて実施されました。

一部の図は、Maruo et al., Biol. Pharm. Bull., 47(8):1415–1421, 2024 より引用し、CC BY-NC 4.0 ライセンスに基づき使用しました。

利 益 相 反

所属 北海道大学大学院医学院医学専攻博士課程 小児科学教室
氏名 丸尾 優爾 (学生番号 52225074)

本学位論文に対し開示すべき利益相反状態はありません。

引用文献

- Allard MF, Schönekeess BO, Henning SL, English DR and Lopaschuk GD (1994) Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 267, H742-50.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-7.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP and Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-28.
- Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, et al (2007) Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* 7, 11.
- Uccelli A, Moretta L and Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726-36.
- 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, 423-32.
- Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G and Suresh S (2009) Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv Mater* 21, 419-424.
- Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, Xu C, Chen X, Huang Y, Zhu Z, et al (2010) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 20, 510-8.
- Tsuda H, Yamahara K, Ishikane S, Otani K, Nakamura A, Sawai K, Ichimaru N, Sada M, Taguchi A, Hosoda H, et al (2010) Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F1004-13.
- Canton I and Battaglia G (2012) Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev* 41, 2718-39.
- Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato

M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, et al (2012) Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 53, 420-8.

Zhang Y, Marsboom G, Toth PT and Rehman J (2013) Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 8, e77077.

Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H and Matsuzaki Y (2013) LNGFR(+)THY-1(+)VCAM-1(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports* 1, 152-65.

Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, et al (2014) Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 9, e88319.

Denu RA and Hematti P (2016) Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2989076.

Shum LC, White NS, Mills BN, Bentley KL and Eliseev RA (2016) Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Dev* 25, 114-22.

Mabuchi Y and Matsuzaki Y (2016) Prospective isolation of resident adult human mesenchymal stem cell population from multiple organs. *Int J Hematol* 103, 138-44.

Abe J, Yamada Y, Takeda A and Harashima H (2018) Cardiac progenitor cells activated by mitochondrial delivery of resveratrol enhance the survival of a doxorubicin-induced cardiomyopathy mouse model via the mitochondrial activation of a damaged myocardium. *J Control Release* 269, 177-188.

Kawakubo K, Ohnishi S, Fujita H, Kuwatani M, Onishi R, Masamune A, Takeda H and Sakamoto N (2016) Effect of Fetal Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rats With Acute and Chronic Pancreatitis. *Pancreas* 45, 707-13.

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

Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F and Ding J (2019) Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells* 8.

Hibino M, Yamada Y, Fujishita N, Sato Y, Maeki M, Tokeshi M and Harashima H (2019) The Use of a Microfluidic Device to Encapsulate a Poorly Water-Soluble Drug CoQ(10) in Lipid Nanoparticles and an Attempt to Regulate Intracellular Trafficking to Reach Mitochondria. *J Pharm Sci* 108, 2668-2676.

Tavakoli S, Ghaderi Jafarbeigloo HR, Shariati A, Jahangiryan A, Jadidi F, Jadidi Kouhbanani MA, Hassanzadeh A, Zamani M, Javidi K and Naimi A (2020) Mesenchymal stromal cells; a new horizon in regenerative medicine. *J Cell Physiol* 235, 9185-9210.

Salazar-Noratto GE, Luo G, Denoeud C, Padrona M, Moya A, Bensidhoum M, Bizios R, Potier E, Logeart-Avramoglou D and Petite H (2020) Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells* 38, 22-33.

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

Yamada Y, Munechika R, Satrialdi, Kubota F, Sato Y, Sakurai Y and Harashima H (2020b) Mitochondrial Delivery of an Anticancer Drug Via Systemic Administration Using a Mitochondrial Delivery System That Inhibits the Growth of Drug-Resistant Cancer Engrafted on Mice. *J Pharm Sci* 109, 2493-2500.

Satrialdi, Takano Y, Hirata E, Ushijima N, Harashima H and Yamada Y (2021) An effective in vivo mitochondria-targeting nanocarrier combined with a π -extended porphyrin-type photosensitizer. *Nanoscale Adv* 3, 5919-5927.

Yan W, Diao S and Fan Z (2021) The role and mechanism of mitochondrial functions and energy metabolism in the function regulation of the mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 12, 140.

Prakash R, Fauzia E, Siddiqui AJ, Yadav SK, Kumari N, Singhai A, Khan MA, Janowski M, Bhutia SK and Raza SS (2021) Oxidative Stress Enhances Autophagy-Mediated Death Of Stem Cells Through Erk1/2 Signaling Pathway - Implications For Neurotransplantations. *Stem Cell Rev Rep* 17, 2347-2358.

Yang Y, Lee EH and Yang Z (2022) Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. *Tissue Eng Part B Rev* 28, 966-977.

Yamada Y, Ishimaru T, Ikeda K and Harashima H (2022) Validation of the Mitochondrial Delivery of Vitamin B(1) to Enhance ATP Production Using SH-SY5Y Cells, a Model Neuroblast. *J Pharm Sci* 111, 432-439.

Ukeba D, Yamada K, Suyama T, Lebl DR, Tsujimoto T, Nonoyama T, Sugino H, Iwasaki N, Watanabe M, Matsuzaki Y, et al (2022) Combination of ultra-purified stem cells with an in situ-forming bioresorbable gel enhances intervertebral disc regeneration. *EBioMedicine* 76, 103845.

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

Takamiya S, Kawabori M, Yamazaki K, Yamaguchi S, Tanimori A, Yamamoto K, Ohnishi S, Seki T, Konno K, Tha KK, et al (2022) Intravenous transplantation of amnion-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery and alleviates intestinal dysfunction after spinal cord injury. *PLoS One* 17, e0270606.

Kubota F, Satrialdi, Takano Y, Maeki M, Tokeshi M, Harashima H and Yamada Y (2023) Fine-tuning the encapsulation of a photosensitizer in nanoparticles reveals the relationship between internal structure and phototherapeutic effects. *J Biophotonics* 16, e202200119.

Da Dalt L, Cabodevilla AG, Goldberg IJ and Norata GD (2023) Cardiac lipid metabolism, mitochondrial function, and heart failure. *Cardiovasc Res* 119, 1905-1914.

Menendez-Montes I, Garry DJ, Zhang JJ and Sadek HA (2023) Metabolic Control of Cardiomyocyte Cell Cycle. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* 19, 26-36.

Hibino M, Maeki M, Tokeshi M, Ishitsuka Y, Harashima H and Yamada Y (2023) A system that delivers an antioxidant to mitochondria for the treatment of drug-induced liver injury. *Sci Rep* 13, 6961.

Yang Y, Wu Y, Yang D, Neo SH, Kadir ND, Goh D, Tan JX, Denslin V, Lee EH and Yang Z (2023) Secretive derived from hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration and mitigate joint inflammation via extracellular vesicles. *Bioact Mater* 27, 98-112.

Nitahara-Kasahara Y, Nakayama S, Kimura K, Yamaguchi S, Kakiuchi Y, Nito C, Hayashi M, Nakaishi T, Ueda Y and Okada T (2023) Immunomodulatory amnion-derived mesenchymal stromal cells preserve muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Stem Cell Res Ther* 14, 108.

Sato I, Hibino M, Takeda A, Harashima H and Yamada Y (2024) Activation of Mitochondrial Oxygen Consumption Rate by Delivering Coenzyme Q(10) to Mitochondria of Rat Skeletal Muscle Cell (L6). *J Pharm Sci*.

Kimura N, Tanaka Y, Yamanishi Y, Takahashi A and Sakuma S (2024) Nanoparticles Based on Natural Lipids Reveal Extent of Impacts of Designed Physical Characteristics on Biological Functions. *ACS Nano* 18, 1432-1448.

Shiraishi M, Sasaki D, Hibino M, Takeda A, Harashima H and Yamada Y (2024) Human cardiosphere-derived cells with activated mitochondria for better myocardial regenerative therapy. *J Control Release* 367, 486-499.