

ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の開発

北海道大学大学院薬学研究院

山田 勇磨

Mitochondria, which have a variety of functions, are attracting the interest of scientists, since they are organelles that can contribute to the realization of innovative disease treatments, the maintenance of beauty and health, and development in the life sciences. To date, data related to commercially available cosmetic products that deliver functional molecules to mitochondria to exert cosmetic effects have not been reported. The aim of this study is to develop a nanocapsule-type functional cosmetic product that targets mitochondria. To accomplish this, we propose to use a nanocapsule (MITO-Porter) to deliver molecules to mitochondria in human skin cells. The proposal includes "Construction of drug-encapsulated nanocapsules", "Verification of cellular uptake and mitochondrial delivery of the nanocapsule" and "Functional evaluation of mitochondria".

1. 緒言

多彩な機能を有するミトコンドリアは、革新的疾患治療の実現、美容・健康の維持、ライフサイエンスの発展に寄与するオルガネラとして注目されている。本オルガネラは、抗酸化効果およびアンチエイジング効果に深く関連する、活性酸素シグナル調節、エネルギー（ATP）産生を担うため、化粧品のターゲットとしても注目される。現在までに市販されている化粧品において、細胞内部のオルガネラに機能性分子を送達・作用させ、美容効果を発揮させた商品の報告例は皆無である。

本研究では、皮膚細胞のミトコンドリアに作用して細胞のATP産生能・代謝能を亢進させるアンチエイジング効果の獲得、ミトコンドリアで産生される余剰活性酸素を除去し抗酸化能の獲得を可能とする『ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品』の開発を目指す。ミトコンドリアの分子送達に関しては、ミトコンドリア標的型ナノカプセル・MITO-Porter¹⁻³⁾を基盤カプセルとし、ヒト由来皮膚細胞のミトコンドリア内部に機能性分子を送達する戦略を試みる。送達分子候補としては、ATP酸性の補酵素であり抗酸化能を有するコエンザイムQ₁₀ (CoQ₁₀)などを用いる。

本申請研究では、「薬剤封入ナノカプセルの構築 (1. CoQ₁₀-MITO-Porterの構築)」、「細胞導入、ミトコンドリアへの分子送達の検証 (2. 培養細胞を用いた細胞内動態観察)」、および「機能評価 (3. ミトコンドリアの機能評

価)」の順に研究を進めた。本報告書では、特に、「1. CoQ₁₀-MITO-Porterの構築」および「2. 培養細胞を用いた細胞内動態観察」について詳細を報告する。

2. 方法

2.1. CoQ₁₀-MITO-Porterの調製

2.1.1. マイクロ流体デバイスを利用したナノカプセル調製の検討

本研究では、ATP酸性の補酵素であり抗酸化能を有するCoQ₁₀をMITO-Porter¹⁾に内封したCoQ₁₀-MITO-Porterの調製を行った。MITO-Porterは北海道大学・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）で開発したミトコンドリア標的型ナノカプセルであり、ミトコンドリア膜融合を有する脂質二重膜小胞(リボソーム)からなる (Fig. 1)。MITO-Porterを用いた戦略では、ミトコンドリア膜との膜融合を介して内封分子を放出させるため、送達分子の種類やサイズによらない送達が可能となる²⁻⁴⁾。

当研究室では、CoQ₁₀-MITO-Porterの構築を種々の調製法を用いて検討を進めていた。単純水加法、逆相蒸発法、エタノール希釈法を用いた検討において、エタノール希釈法（以下、従来法）を用いた際に、CoQ₁₀の搭載率が高いCoQ₁₀-MITO-Porterを構築できることを報告していた⁵⁾。



Development of nanocapsule-type functional cosmetics for targeting mitochondria

Yuma Yamada

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

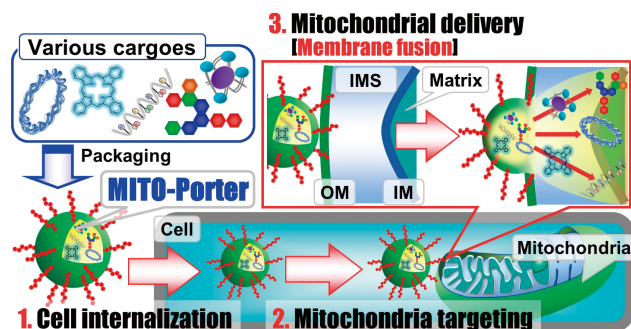


Fig. 1 Mitochondrial delivery using a MITO-Porter system

一方で、CoQ₁₀の難水溶性により、リポソーム調製の効率を低下させ、粒子径が不均一であり、1回の調製に得られる収量が微量であることなどが問題であった。

本申請研究では、実用化を見据え、均一性の高いナノ粒子を無菌的に大量調製が可能なマイクロ流体デバイスを利用した粒子調製を試みた。具体的には、共同研究者である北海道大学・大学院工学研究院・渡慶次学教授、真栄城正寿助教が開発したマイクロ流体デバイス (invasive lipid nanoparticle production (iLiNP) device) を用いて、エタノール希釈法の原理を利用したCoQ₁₀-MITO-Porterの構築を検討した⁶⁾。エタノール希釈法では、脂質のエタノール溶液に水系緩衝液を加え脂質の溶解度を下げることで脂質の自己集合化を促し脂質を粒子化する。iLiNPによって脂質懸濁液 (CoQ₁₀を含む) と緩衝液を急速に混合・攪拌することで均一な粒子調製、連続調製を可能とする (Fig. 2)。

iLiNPを用いた脂質粒子調製では、①脂質相の組成、②水相の種類、③総流速、④流速比 (水相/脂質相の流速の比率=EtOH希釈濃度に相当)を変化させることにより多彩な粒子設計が可能となる。①脂質相の組成には、MITO-Porterを構成するナノカプセル材料 [1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) / sphingomyelin (SM) / 1,2-Dimyristoyl-sn-glycerol, methoxy polyethylene glycol 2000 (DMG-PEG 2000) / Stearylated R8 (STR-R8)] およびCoQ₁₀を含有するエタノール懸濁液を準備した。②水相には、phosphate buffered saline (PBS) (-) およびHEPES glucoseを用いて検討を進めた。③総流速は500 μL/minに固定し、④流速比は、EtOH希釈濃度が10%、20%、30%、40%となるように設定して検討を進めた。最

終工程として、iLiNPで調製したCoQ₁₀-MITO-Porter溶液は、透析 (2時間、4℃) を行い含有するエタノールを除去した。粒子物性の測定方法については次項に記載する。

2. 1. 2. CoQ₁₀-MITO-Porterの物性評価および保存安定性の検証

前項に記載の方法で、CoQ₁₀を含有したCoQ₁₀-MITO-Porterを調製し、粒子径、PdI (均一性の指標であり、値が小さい方が均一性が高い)、ゼータ電位 (表面電位) を測定し、構築した粒子物性の最適化を図った。粒子径およびPdIは動的光散乱法を、ゼータ電位は電気泳動法を利用した原理に基づき、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, WR, UK)を用いて測定した。

また、調製した粒子の安定性を評価するために、4℃および25℃、遮光下にて14日間保管し、経時的に物性を評価した。

2. 2. 培養細胞を用いた細胞内動態観察

マイクロ流体デバイスで用いて調製したCoQ₁₀-MITO-Porter [μ] および従来法で調製したCoQ₁₀-MITO-Porter [ED] の細胞内動態を観察した。ヒト由来皮膚細胞を含む培養細胞で検討を行ったが、特許出願準備中のため、ここではヒト子宮頸がん由来細胞 (HeLa細胞) を用いた研究成果を紹介する。

2. 2. 1. 細胞取り込み能評価

CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] および従来法で調製したCoQ₁₀-MITO-Porter [ED] の細胞導入能を評価するために、蛍光標識 (DOPE-N- (7-nitro-2-1,3-benzoxadiazole-4-yl) (NBD-DOPE) を脂質量の0.5mol%含有) を施した。粒子を

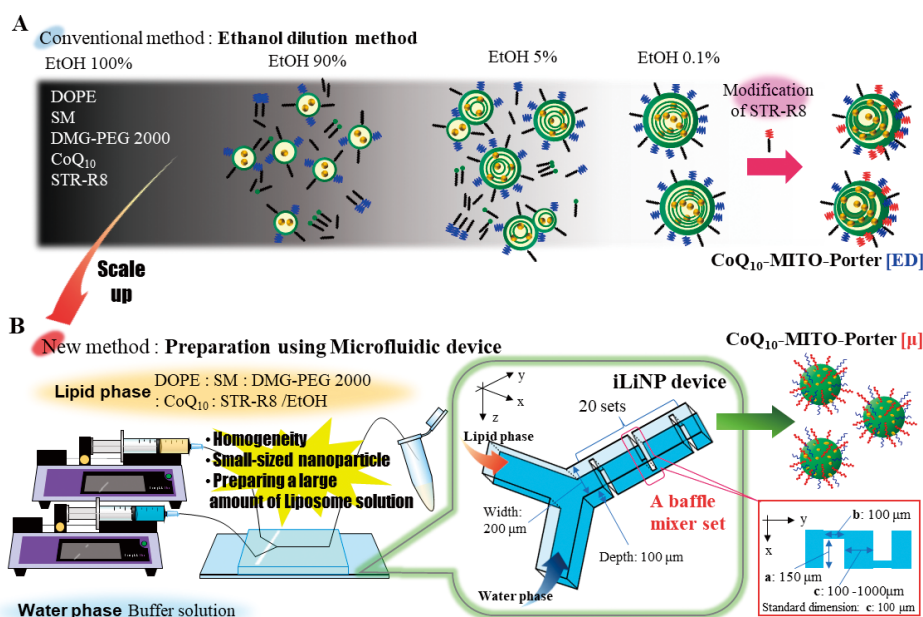


Fig. 2 Schematic image showing the preparation of the CoQ₁₀-MITO-Porter by ethanol dilution (A) and by using microfluidic device named iLiNP device (B).

HeLa細胞に添加し、1時間インキュベーションした(37℃, 5% CO₂)。細胞に取り込まれた粒子の蛍光量をフローサイトメリー(FACS)(Gallios; Beckman Coulter Inc., Pasadena, MA, USA)を用いて平均蛍光強度を測定し、細胞取り込み能を評価した。

2.2.2. 細胞内局在観察

上記に従い調製した蛍光標識粒子(緑色)をHeLa細胞添加し、インキュベーションした(37℃, 5% CO₂)。赤色のミトコンドリア染色試薬Mito Tracker Deep Red(Thermo Fisher Scientific)でミトコンドリアを染色した後、粒子添加より3時間後の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いて観察した。緑色の粒子が赤色に染色したミトコンドリアに局在した場合には、黄色のシグナルとして観察される。また、画像解析を行い、下記の式1に従い、ミトコンドリア占有率を算出した。

$$\text{ミトコンドリア占有率 (\%)} = \frac{1 \text{細胞中の黄色領域(共局在)の面積平均}}{1 \text{細胞中の赤色領域(染色したミトコンドリア)の面積平均}} \times 100 \quad \cdots \text{式1}$$

2.3. ミトコンドリアの機能評価

CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] 添加時のミトコンドリア機能

を評価するために、ミトコンドリア酸素消費量(OCR)をAgilent Seahorse XFp extracellular flux analyzer(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて評価した。ミトコンドリア機能の指標として基礎呼吸能(mitochondrial basal respiration)および最大呼吸能(Maximal respiration)を計測した。本評価の詳細な方法は既報を参考にして頂きたい⁷⁾。

3. 結果・考察

3.1. CoQ₁₀-MITO-Porterの調製

3.1.1. マイクロ流体デバイスを利用したナノカプセル調製の検討

iLiNPを用いたCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の調製において、①脂質相の組成、②水相の種類、③総流速、④流速比(水相/脂質相の流速の比率=EtOH希釈濃度に相当)の条件を検討した。Fig. 3に検討結果を示す⁶⁾。本検討では、①脂質相にはMITO-Porterを構成するナノカプセル材料[DOPE/SM/DMG-PEG/STR-R8]およびCoQ₁₀を含有するエタノール懸濁液を充填し、③総流速は500 μL/minに固定して検討を進めた。

④流速比は、エタノール希釈濃度が10%、20%、30%、

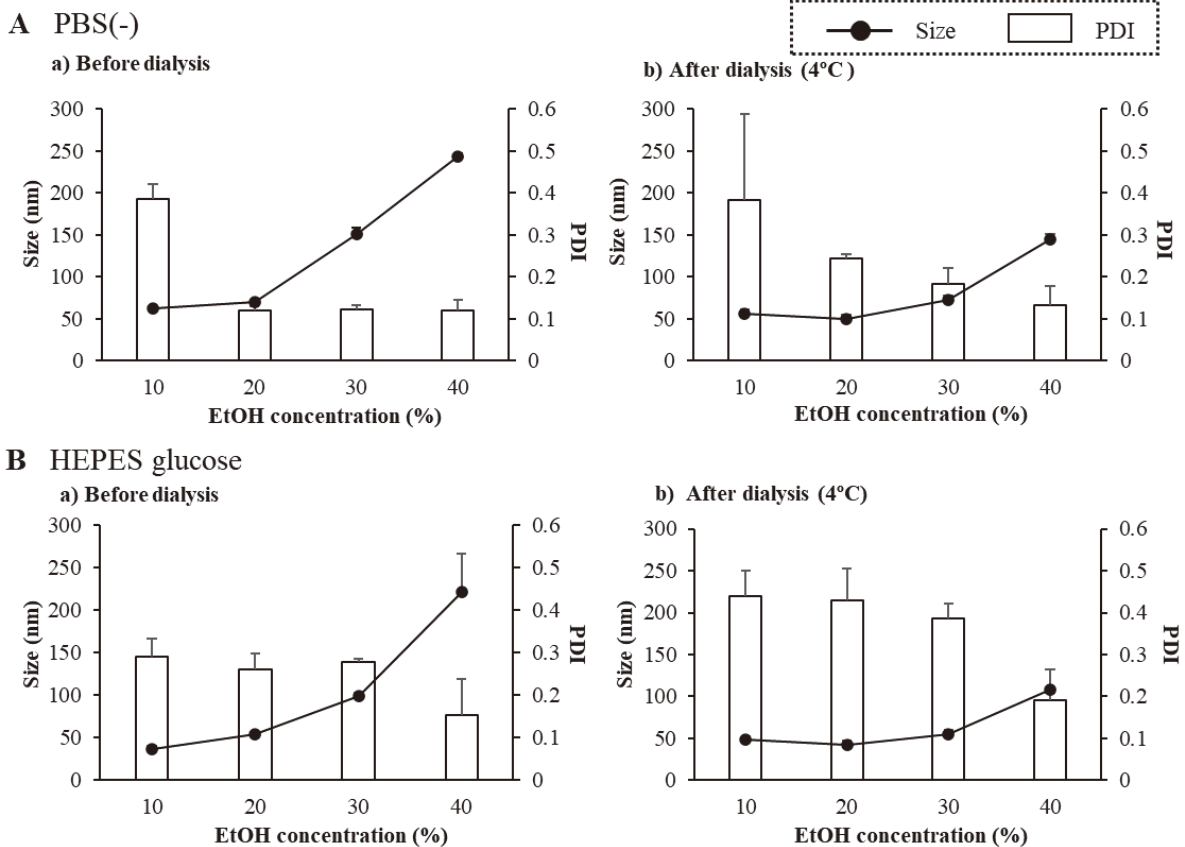


Fig. 3 Effect of ethanol dilution concentration on the physicochemical properties of the CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]. Particle size and PDI of the CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] prepared in PBS (-) (A) and HEPES glucose (B) are shown.

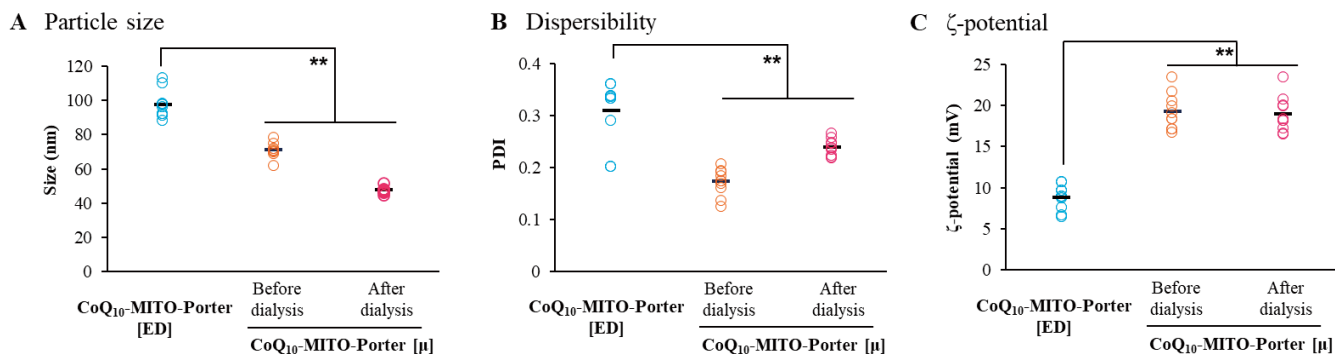


Fig. 4 Comparison of physicochemical properties between the CoQ₁₀-MITO-Porter [ED] and the CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]. The particle size (A), dispersibility (B) and ζ-potential (C) are shown.

40%となるように検討を進めた。②水相の種類をPBS(-)とした際の粒子形成後の物性評価結果をFig. 3A(a)に、HEPES glucoseとした際の結果をFig. 3B(a)に提示する。エタノール希釈濃度の低下に依存して粒子径が小さくなった。水相にPBS(-)を用いた群では、エタノール希釈濃度が20~30%の時、PdIは約0.12と単分散であったが、エタノール希釈濃度10%では他の希釈濃度よりも多分散であった(Fig. 3A(a))。一方、水相にHEPES glucoseを用いた場合には、PBS(-)群と比較してPdI値が大きく単分散性は低かった(Fig. 3B(a))。

最終工程として、iLiNPで調製したCoQ₁₀-MITO-Porter溶液を透析した際の粒子物性を(Fig. 3A(b))および(Fig. 3B(b))に示す。粒子径は両溶媒とも小さくなる傾向を認めたが、PdIについては増加が認められた。特にHEPES glucoseを用いた際には、PdIの増加が顕著であった。ここまでの検討より、②水相の種類をPBS(-)、④流速比を20%に設定しCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]を調製することとした。

3. 1. 2 CoQ₁₀-MITO-Porterの物性評価および保存安定性の検証

従来技術を用いて調製したCoQ₁₀-MITO-Porter [ED]と比較し、iLiNPを用いた調製したCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]は、粒子径が小さく(Fig. 4A)、PdIも小さい傾向にあった(Fig. 4B)。特に透析後は、均一な精度の高い粒子が調製できた⁶⁾。iLiNPを用いることにより粒子径は約50nmと従来技術より1/2倍小さな粒子となった(Fig. 4A)。ゼータ電位においても約+20mVであり(Fig. 4C)、ほぼ一定して正電荷ペプチドであるOctaarginine (R8)を修飾できたと考えられる。

調製したCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の安定性を評価するために、4℃および25℃、遮光下にて14日間の安定性試験を行った⁶⁾。その結果、25℃においては経時的に粒子径が増大した。一方、4℃では粒子径が約50nm付近を維持し、安定なCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の保存には4℃が適切な

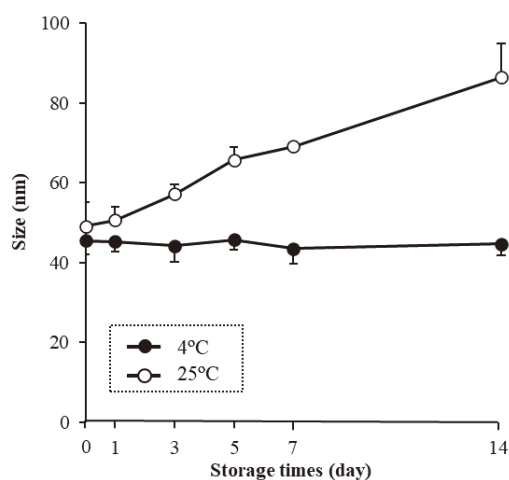


Fig. 5 Evaluation of the stability of CoQ₁₀-MITO-Porter [μ].

保存温度であることを確認した(Fig. 5)。

調製量も従来技術ではμLオーダーであったが、iLiNPを用いた方法では実験室でもLオーダーでの大量調製が見込める。調製時間も大容量になるほどiLiNPを用いた調製法の方が、短時間で調製ができる。従って、iLiNPを用いたCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]調製は微小化・均一・大量調製を可能にする技術として期待できる。

3. 2. 培養細胞を用いた細胞内動態観察

3. 2. 1 細胞取り込み能評価

CoQ₁₀-MITO-Porter [μ] (粒子径 48nm) および従来法で調製したCoQ₁₀-MITO-Porter [ED] (粒子径 96nm) の細胞導入能を評価した⁶⁾。その結果、50nm程度のCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の細胞取り込みを評価した結果、従来型MITO-Porter (100nm程度)と比較して有意に高い細胞取り込みを確認した(Fig. 6)。

3. 2. 2 細胞内局在観察

CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]の細胞内局在を観察した⁶⁾。その結果、従来法(CoQ₁₀-MITO-Porter [ED])と比較して細胞内に多くの緑蛍光シグナルが観察され、細胞への導入効

率が優れていることを確認した(Fig. 7A(a), (c))。さらに、緑色のCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]と赤色に染色したミトコンドリアとの共局在を示す黄色シグナルが観察され(Fig. 7A(b), (d))、CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]がミトコンドリアに集積することを確認した。

顕微鏡で取得した画像を解析し、粒子のミトコンドリア占有率を算出した結果をFig. 7Bに示す。その結果、CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]は、CoQ₁₀-MITO-Porter [ED]と比べて優位に高いミトコンドリア占有率を示した。

過去の報告で、理論計算および実験データより、効率の良い細胞取り込みに最適な粒子径は40~60nmとの報告がある。従って、iLiNPで調製した約50nmのCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]、効率よく細胞に取り込まれ、ミトコンドリアへ集積量も向上したと推察される。

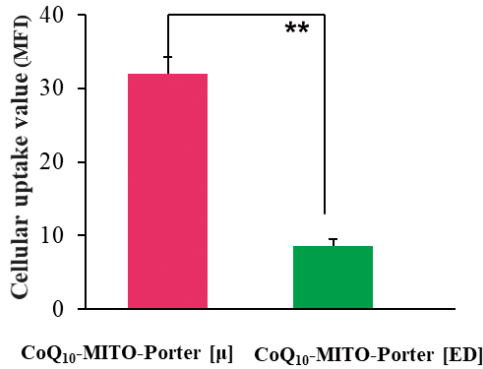


Fig. 6 Cellular uptake of the CoQ₁₀-MITO-Porter by HeLa cells.

3. 3. ミトコンドリアの機能評価

CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]をヒト由来皮膚細胞に添加し、その後ミトコンドリア機能の指標としてミトコンドリア基礎呼吸能およびミトコンドリア最大呼吸能を計測した。特許出願準備中のため、詳細は開示できないが、構成を最適化したCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]を用いた際には、CoQ単独投与では観察されなかったミトコンドリア機能の向上が確認されている。

4. 総 括

本報告書では、以下の内容を報告した。

- (1) マイクロ流路デバイスを利用して微小なCoQ₁₀-MITO-Porter [μ]を調製することに成功した。
- (2) CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]が高効率に細胞に取り込まれミトコンドリアへ集積することを確認した。
- (3) CoQ₁₀-MITO-Porter [μ]が細胞のミトコンドリア機能を向上させることを確認した。

市販されている化粧品には、抗酸化効果やアンチエイジング効果を宣伝している商品があるが、機能性分子が作用部位である皮膚細胞膜や細胞内部に導入されていることは示されていない。美容効果が得られることは確認されていると思われるが、その能力を最大限には発揮できていないと思われる。さらに、細胞内部のオルガネラに機能性分子を送達・作用させ、美容効果を発揮させた商品の報告例は皆無である。そのため、抗酸化効果およびアンチエイジング効果に深く関連するミトコンドリアに機能性分子を導入

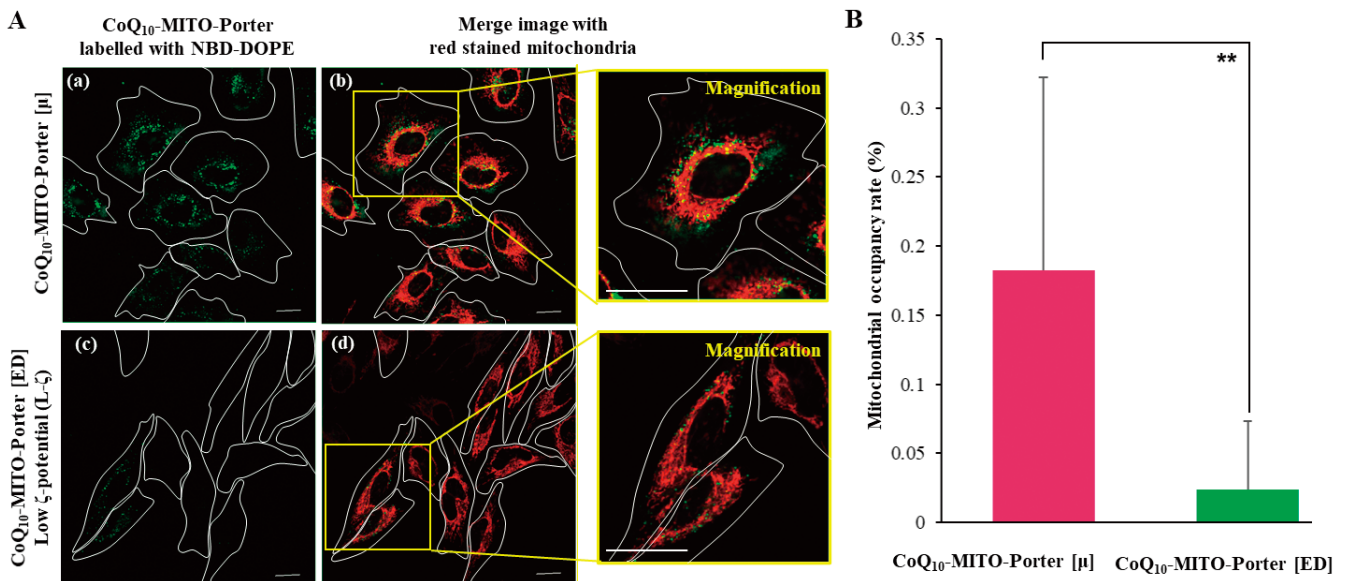


Fig. 7 Intracellular trafficking of the CoQ₁₀-MITO-Porter. Intracellular observation of the CoQ₁₀-MITO-Porter using CLSM (A). Based on such images, mitochondrial occupancy rate (B) was estimated.

する本研究で開発するナノカプセル型機能性化粧品は、化粧品分野に新たな市場を創生すると確信している。

現在は、「皮膚組織を用いたナノカプセルの皮膚細胞ミトコンドリアへの分子送達の検証」を進めており、3D細胞培養法を用いた新しい評価法を確立中である。今後は、本研究をさらに発展させ、ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の基盤技術の確立を目指す。

謝 辞

ここで紹介した研究成果は北海道大学・大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室【Team Mitochondria】に所属する学生諸氏の日々の努力の賜物であり、学生各位に心より感謝する。また、本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団のご支援を頂きましたことに深く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Y. Yamada *et al.*, *Biochimica et biophysica acta*, **1778**, 423-432 (2008).
- 2) Y. Yamada, H. Harashima, *Adv Drug Deliv Rev*, **60**, 1439-1462 (2008).
- 3) Y. Yamada *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev*, **154-155**, 187-209 (2020).
- 4) Y. Yamada *et al.*, *J Control Release*, **327**, 533-545 (2020).
- 5) Y. Yamada *et al.*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **40**, 2183-2190 (2017).
- 6) M. Hibino *et al.*, *J Pharm Sci*, **108**, 2668-2676 (2019).
- 7) Y. Yamada *et al.*, *Mitochondrion*, **55**, 134-144 (2020).