

ミトコンドリア標識に最適な赤色蛍光タンパク質の比較検討

太向勇¹⁾, 高野智圭²⁾, 三木敏生¹⁾

Comparative examination of red fluorescent proteins for labeling mitochondria

Isamu TAIKO¹⁾, Chika TAKANO²⁾, Toshio MIKI¹⁾

要旨

近年, ミトコンドリアトランスファーと呼ばれるミトコンドリアの機能が低下した細胞へ正常なミトコンドリアが輸送される細胞間の相互作用についての研究が, ミトコンドリアの機能不全の治療法への応用として期待されている。ミトコンドリアトランスファーの研究では, ドナーとレシピエントのミトコンドリアをそれぞれ異なった色で標識する必要がある。本研究で我々は4種類の赤色蛍光タンパク質についてミトコンドリアの標識に最も適切なものはどれか比較検討した。その結果, 一部の赤色蛍光タンパク質は凝集体を形成することを発見した。また, 比較した中で最も適切であると判断したTurboRFPを用いて実際にミトコンドリアトランスファーを検出することに成功した。

1. はじめに

ミトコンドリアは細胞内のATP産生をはじめとして, アポトーシスやカルシウムイオンの貯蔵など細胞の生存を左右する様々な細胞の機能に密接に関与しており, ミトコンドリアの機能不全は様々な疾患の原因になることが知られている。しかしながら, 一度低下したミトコンドリアの機能を回復させる現実的な方法は現在のところ確立されておらず, ミトコンドリアの機能不全を根本的に治療することは不可能である。ミトコンドリアの機能を回復させる方法として, ミトコンドリアトランスファーと呼ばれる細胞間におけるミトコンドリアの輸送プロセスの応用が有望視されている¹⁾。ミトコンドリアトランスファーはミトコンドリアゲノムの損傷などによりミトコンドリアの機能が低下した細胞に対して, 健康なミトコンドリアを保持する細胞がミトコ

ンドリアを能動的に輸送する細胞間相互作用である。細胞間でのミトコンドリア輸送の可能性は2005年にKoyanagiらによって血管内皮細胞と心筋細胞との間で最初に報告された²⁾。より決定的な報告として翌年Speesらによって, ミトコンドリアDNAを欠損した(ρ 0) A549ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株に骨髄間葉系間質細胞が健康なミトコンドリアを輸送することが報告された³⁾。またこれにより, ミトコンドリア機能の欠損により失われたはずの, 好気呼吸による酸化的リン酸化を経たATP合成が回復することも報告された。これ以降ミトコンドリアトランスファーに関する研究は, ミトコンドリアの機能不全を回復させる試みを含め, 盛んに行われている。最近では, 2021年にBrestoffらによってマウス生体内で脂肪細胞からマクロファージへとミトコンドリアが輸送されることが示され, ミトコンド

1) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野
2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野
責任者連絡先: 太向勇, taiko.isamu@nihon-u.ac.jp

リアトランスファーの治療への応用の期待が益々高まっている⁴⁾。

ミトコンドリアトランスファーの研究は間葉系間質細胞を中心に行われているがそれ以外にも様々な細胞がミトコンドリア輸送能を持っていることが示されている。中でもヒト羊膜上皮細胞はミトコンドリアトランスファーのドナー細胞として高い潜在性を有していると考えられる。羊膜上皮細胞は胎盤から簡便かつ大量に採取することが可能な胎盤由来の幹細胞である。羊膜上皮細胞は比較的未分化な細胞であり、倫理的な問題は少なく、非侵襲的な方法で得ることができる。また、胎児由来であることから、ゲノムDNAへのダメージの蓄積はほとんどない。さらには腫瘍形成能がないことに加えて免疫回避能力も有している。これらの性質から、今後細胞再生治療への応用が期待され、ミトコンドリアトランスファーのドナーとしても高い有用性があると考えられる^{5,6)}。

細胞間でミトコンドリアが輸送されるプロセスとして、細胞間の直接的な接触による輸送、細胞融合、細胞外小胞輸送等の仮説が考案されている^{7,8)}。中でも、membrane nanotubesあるいはtunneling nanotubes (TNTs) と呼称される細胞間を繋ぐ管状の構造を介した輸送方法は、ドナー細胞からレシピエント細胞への直接的な輸送方法として注目されている⁹⁾。TNTsを介したミトコンドリア輸送では他のメカニズムに比べて、より輸送先の細胞の指定が容易であり、狙った細胞に特異的にミトコンドリアを輸送する方法として最適であると考えられる。しかしながら、TNTsを介したミトコンドリアトランスファーにおいて、ドナー細胞がどのように標的のレシピエント細胞を認識しているのか等の治療への応用に必要な詳しいメカニズムは全く解明されておらず、今後の研究が必要となっている。

ミトコンドリアトランスファーの研究において必須とされるのが、ミトコンドリアの標識方法である。最も一般的に使われるミトコンドリアの標識方法はテトラメチルローダミンメチルエステル (TMRM) やMitoTrackerといった蛍光小分子化合物を用いた方法である。しかしながら、これら蛍光小分子化合物では長期間の標識は不可能であり、通常数日間の培養期間を要するミトコンドリアトランスファーの研究には不向きである。また、これら蛍

光小分子化合物は全くの無毒ということではなく、ミトコンドリアの機能にわずかながら影響を与えることが知られており、ドナー細胞のミトコンドリアの機能を阻害してしまう恐れがある^{10,11)}。これらのことから、ミトコンドリアトランスファーの研究においては、蛍光小分子化合物以外の方法でミトコンドリアを標識する必要がある。その方法として使用されているのが、ミトコンドリアターゲティングシグナルを付加した蛍光タンパク質による標識方法である¹²⁾。特にEGFPは古くから様々な医学生物学研究に用いられており、その有用性は広く知られており、ミトコンドリアの標識にも頻繁に用いられている。EGFPの他にミトコンドリアトランスファーを研究する際にはドナー細胞とレシピエント細胞の両方の細胞を異なった色で標識することが求められる。緑色の次に最もよく使われるのは光学系でも広く普及している赤色であり、特にDsRedはミトコンドリアトランスファーの研究を含めしばしばミトコンドリアの標識に用いられる。しかしながら、DsRedは多量体を形成するタンパク質であり、凝集体を形成することが知られ、ミトコンドリアターゲティングシグナルを付与した場合にも正常にミトコンドリアに局在しない可能性がある¹³⁾。以上のことから、本研究ではミトコンドリアトランスファーの研究に最適なミトコンドリアを標識するための赤色蛍光タンパク質の比較検討を行った。でも

2. 対象及び方法

細胞培養

不死化ヒト羊膜上皮細胞はDMEM (Gibco) に10% FBS (ニチレイ)、200 uM L-Glutamine、1× 非必須アミノ酸、1× Antibiotic-Antimycotic、55 uM 2-mercaptoethanol (いずれもGibco)、10 ng/ml EGF (peprotech) を加えた培地で培養した。HEK293T細胞はコラーゲンコートした培養皿状でDMEM (和光純薬) に10% FBS、2 mM L-Glutamine、ペニシリンストレプトマイシンを加えた培地中で培養した。いずれの細胞も37℃、5% CO₂で培養した。

レンチウイルスの作製及び感染

レンチウイルスはHEK293T細胞に目的遺伝子を保持したレンチウイルスベクターとpsPAX2及びp MD.2G (Addgene12260及び12259) をそれぞれ2:2:1の割合でポリエチレニミン (Polysciences)

を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後16時間で培地を交換し、交換後48時間で培地を回収してウイルス液とした。回収したウイルス液はqPCR Lentivirus Titer Kit (Applied Biological Materials) で力価を計測し、hAECsにはMOI15-30となるように感染させた。

画像取得

ミトコンドリア及びライソソームの染色は100 nMのMitoTracker Green, Orange, CMTMRosもしくはLysoTracker Deep Red (Life Technologies) を37°C 30分のインキュベートにより行った。その後、培地で2回洗浄し37°Cで撮影した。

ミトコンドリアトランスファー実験ではEGFPを導入した細胞をコラーゲン及びポリLリジンでコートしたガラスボトムディッシュに播種し、300uMの過酸化水素を含む培地で60分処理した後、ミトコンドリア局在シグナルを付与したTurboRFPを導入した不死化AE細胞と20時間共培養した。その後MitoTracker Deep Redで上記同様に染色し、画像を取得した。

全ての画像は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP8, ライカ) で取得した。

細胞増殖試験

不死化AE細胞を50,000 cells/wellの密度で24wellプレートに播種後レンチウイルスにより各種遺伝子を導入した。その後96 wellプレートに50,000 cells/wellの密度で播種し、Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用い、488 nmの吸光度をInfinite 200 PROプレートリーダー (Tecan) を測定することで細胞増殖を測定した。

フローサイトメトリー

細胞は488nm (EGFP) と561nm (DsRed, mCherry, TurboRFP and mKO κ) のレーザーを備えた

FACS Aria (BD) で、フィルターの設定はそれぞれ530/30 nm (EGFP) もしくは582/15 nm (for DsRed, mCherry, TurboRFP and mKO κ) で行った。細胞は1週間ごとに継代し、レンチウイルスによる遺伝子の導入後6, 14, 21, 28 及び42日後に測定した。

3. 結果

ミトコンドリア局在タンパク質の設計

蛍光タンパク質はこれまでに様々な生物から様々な性質を持ったものがクローニングされ、度々なる改良により医学生物学研究に応用されている。その中から我々は1.赤色蛍光タンパク質の中でも比較的使用されている頻度の高いDsRedと2.そのモノマー型改良体であるmCherry、3.タンパク質の成熟が早い性質を保持したTurboRFP、4.比較的最近クローニングされたmKO κ の4種類の赤色蛍光タンパク質にEGFPを加えた5種類について、それぞれミトコンドリアターゲティングシグナルを付与することでミトコンドリアに局在させ、その性質を比較した。ミトコンドリアへの過度な外来タンパク質の集積を防ぐために、発現プロモーターは中程度の強さを持つhPGKプロモーターを採用した。また、ミトコンドリアへの局在を確実なものにする為に、ヒトCOX8A遺伝子のミトコンドリア標的シグナルを直列に重複させた。これらをそれぞれレンチウイルスベクターにクローニングし、本研究に用いた (図1)。本研究で使用した赤色蛍光タンパク質の特性を表1に示す。

今回作製したそれぞれのミトコンドリア局在蛍光タンパク質はMitoTrackerと共局在し、検出できるレベルでの細胞質への漏れ込みはなかった。TurboRFPおよびmKO κ に関しては正常なミトコンドリアの形態を保持しており、凝集体等の異常な構造

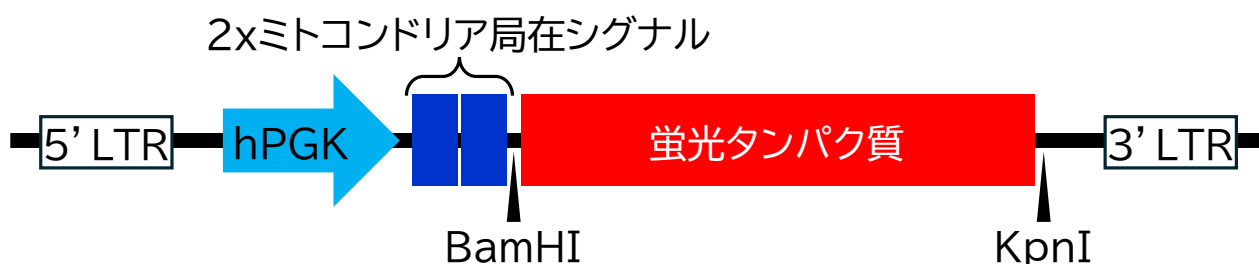


図1 本研究で用いたミトコンドリア局在蛍光タンパク質をコードしたレンチウイルスベクターのマップを示す。蛍光タンパク質はヒトPGKプロモーターにより発現する。それぞれの蛍光タンパク質は制限酵素BamHIとKpnIで交換可能である。

表1. ミトコンドリア局在赤色蛍光タンパク質の特性の比較

蛍光タンパク質の特性

タンパク質名	多量体形成	起源となった生物種	最大励起波長 (nm)	最大蛍光波長 (nm)	モル吸光係数	量子収率	pKa	成熟時間 (分)
EGFP	弱い2量体	Aequorea victoria	488	507	55900	0.6	6	25
DsRed	4量体	Discosoma sp	558	583	72,500	0.68	4.6	1600
mCherry	単量体	Discosoma sp	587	610	72,000	0.22	4.5	15
TurboRFP	2量体	Entacmaea quadricolor	553	574	92,000	0.67	4.4	90
mKO κ	単量体	Verrillifungia concinna	551	563	105,000	0.61	4.2	未報告

は観察されなかった (図2)。一方でDsRed及びmCherryに関してはそれぞれ $37 \pm 4.5\%$ 、 $54 \pm 5.5\%$ の細胞においてMitoTrackerと共染色されない、通常の細胞では観察されることのない球状の凝集体が主に核の周囲に観察された (図3)。凝集体が観察された細胞の多くは正常なミトコンドリアも保持していたが、中には凝集体が支配的な細胞も存在していた。これらの凝集体は正常なミトコンドリアに比べて明るく、蛍光タンパク質が凝集していることが示唆された。またこれらの凝集体は細胞に感染させるレンチウイルス量を極限まで減らしても出現し、ウイルス量に依存しないことから、過度な外来遺伝子

の導入によって起こったものではないことが示唆された。先行研究により、DsRed系列の蛍光タンパク質はしばしばライソソームに局在することが報告されている¹⁴⁾。ミトコンドリアに局在シグナルを付加したmCherryを発現させた不死化AE細胞をライソソーム染色試薬LysoTrackerで染色したところ、典型的なミトコンドリアの形状をしたmCherryは染色されなかった一方で、凝集体は共染色された (図4)。この結果から、ミトコンドリア局在シグナルをDsRed及びmCherryに付加してもライソソームに局在し得ることが示された。

次に我々は5種類の蛍光タンパク質をミトコンド

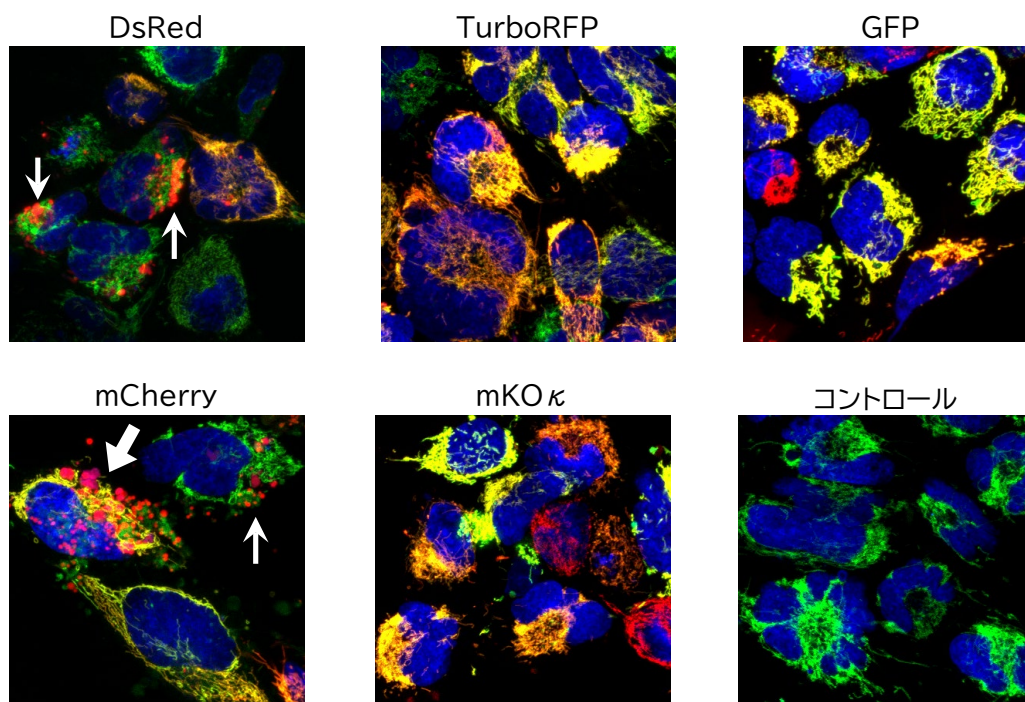


図2 ミトコンドリアに蛍光タンパク質を局在させた不死化AE細胞の蛍光画像。

青:ヘキスト33342。DsRed、mCherry、turboRFP、mKO及びコントロールは、緑:MitoTracker Green、赤:それぞれの蛍光タンパク質。EGFPは、緑:EGFP、赤:MitoTracker Orangeをそれぞれ示す。白い矢印はMitoTrackerと共染色されない凝集体を示す。

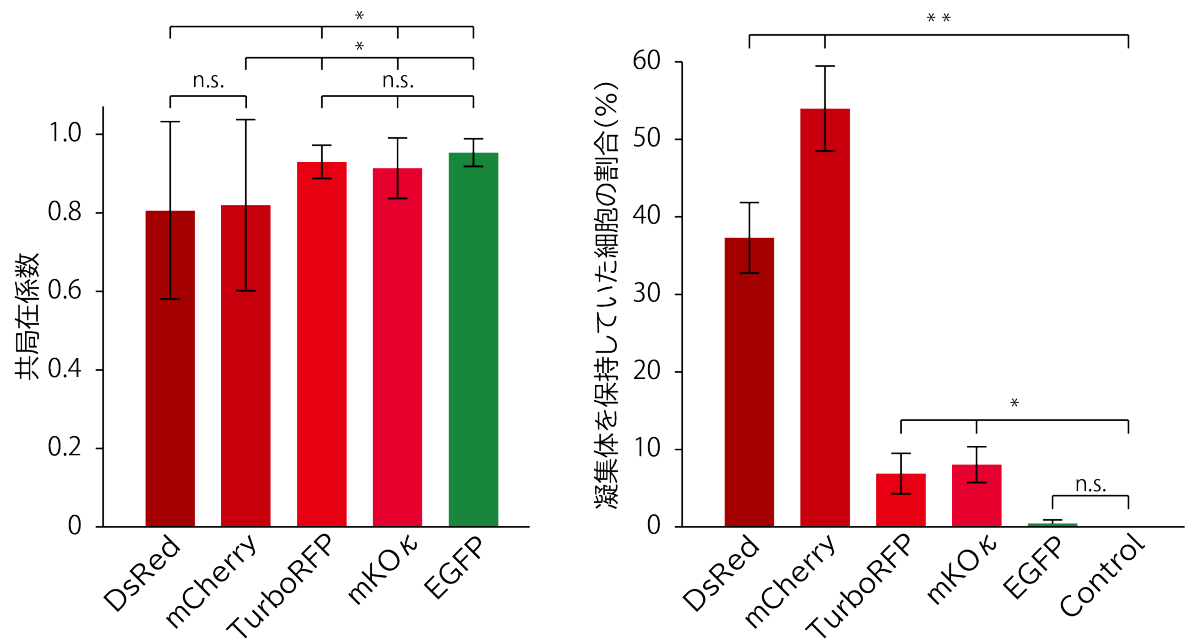


図3 (A) ミトコンドリア局在蛍光タンパク質とMitoTrackerの共局在係数を示す。それぞれ80細胞の平均±標準偏差を示す。*: $p < 10^{-6}$ n.s.: not significant ($p > 0.05$); Tukey's HSD test。(B) 凝集体を保持していた細胞の割合を示す。3回の試行の平均±標準偏差を示す。それぞれの試行は7視野から最低でも80細胞の解析データを含む。**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ n.s.: not significant ($p > 0.05$); Tukey's HSD test

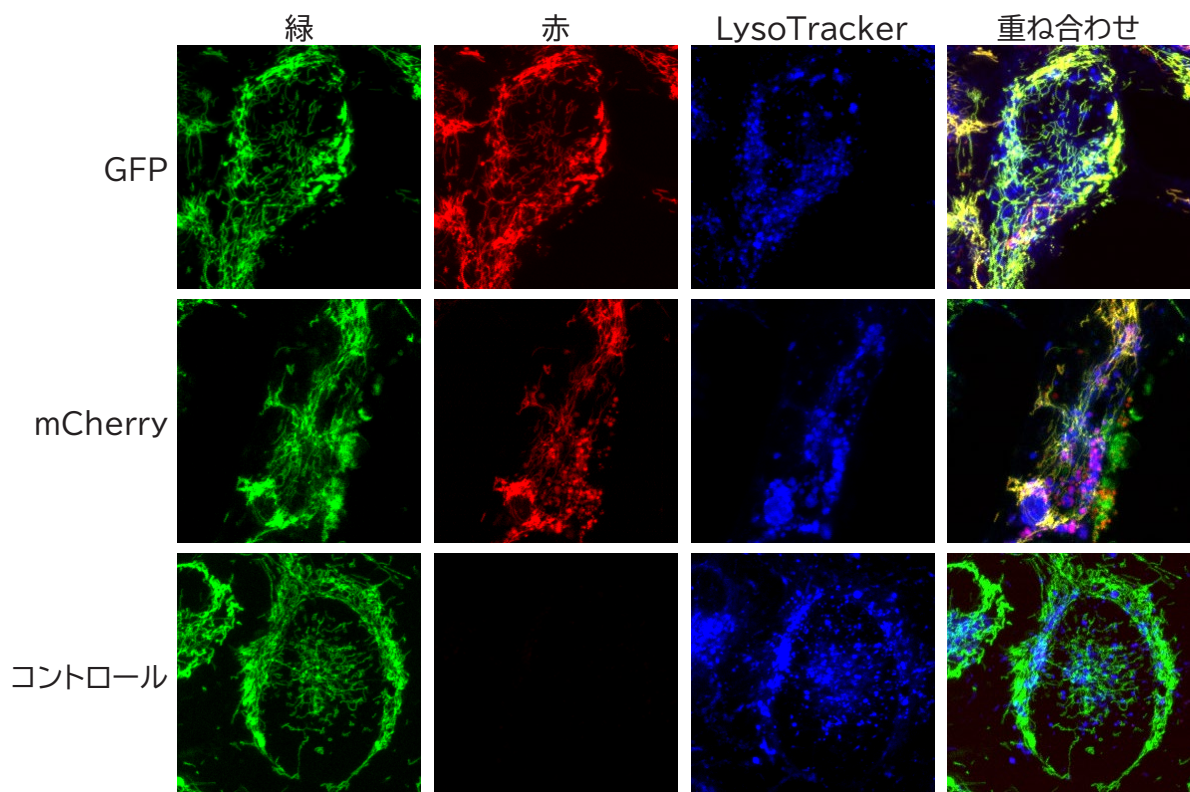


図4 ミトコンドリア局在蛍光タンパク質を発現させた不死化AE細胞をLysoTrackerで染色した蛍光画像を示す。青: LysoTracker blue、mCherry及びコントロール細胞では赤: mCherry、緑: MitoTracker Green、EGFPでは、緑: EGFP、赤: MitoTracker Orangeを示す。

リアに局在させたことによる細胞への影響について調べた。細胞の増殖を比較したところ、意外なことにいずれの蛍光タンパク質をミトコンドリアに局在させても細胞の増殖率に大きな変化はなかった (図5A)。また、いずれの蛍光タンパク質も1か月以上培養しても僅かな蛍光強度の変化は見られたものの、ミトコンドリア局在蛍光タンパク質を保持している細胞の割合に変化はなかった (図5B)。特筆すべきことに、EGFPはミトコンドリアに局在させても1か月以上蛍光強度に変化は見られなかった。

ミトコンドリアトランスファーの研究においては長期間の観察が必要となることから、用いる蛍光タ

ンパク質は十分な明るさのみならず、度重なる励起光の照射による蛍光退色耐性を保持している必要がある。そこで本研究で用いた4種類の赤色蛍光タンパク質について、共通の撮影条件下での蛍光強度と励起光による蛍光退色に対する安定性を比較した。一般的な赤色蛍光の撮影条件下ではTurboRFPが最も高い蛍光強度を示した。また蛍光退色に対する光安定性に関してはいずれも同程度であった (図6)。GFPのようにpH感受性の高い蛍光タンパク質はしばしば、パラホルムアルデヒド等による細胞固定により著しく蛍光強度が低下することが知られている。そこで我々は細胞固定によるそれぞれの蛍光強

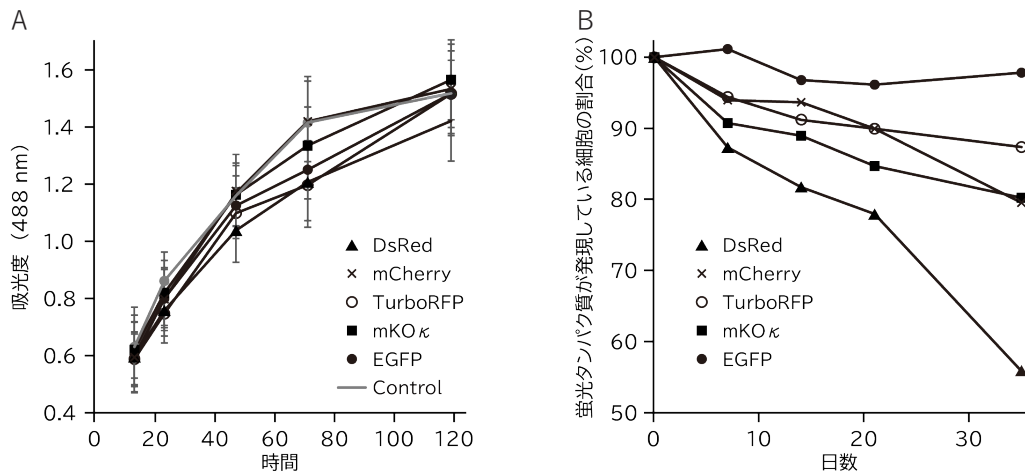


図5 (A) ミトコンドリア局在蛍光タンパク質を発現させた不死化AE細胞の増殖曲線を示す。それぞれ3回の試行の平均±標準偏差を示す。(B) 蛍光タンパク質陽性細胞の割合の時間変化を示す

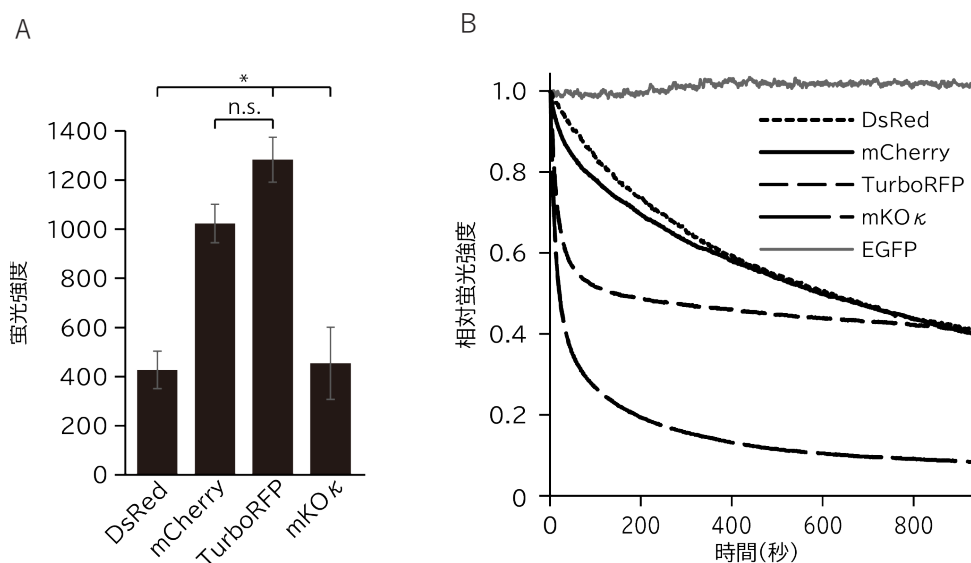


図6 (A) 不死化AE細胞に発現させたミトコンドリア局在蛍光タンパク質の明るさを示す。3回の試行の平均±標準偏差を示す。それぞれの試行は7視野から最低でも80細胞のデータを含む。n.s.: not significant ($p > 0.05$); Tukey's HSD test. (B) 蛍光退色の時間変化を示す。EGFPは488nmレーザーで励起したデータ、他は555nmのレーザーで励起したデータ。

度蛍光強度の変化を調べた。その結果EGFPは著しい蛍光強度の低下が観察されたが、赤色蛍光タンパク質は総じて変化はなかった。以上の結果から我々はTurboRFPがミトコンドリアトランスファーの研究において最適な赤色蛍光タンパク質と判断した。

TurboRFPを用いたミトコンドリアトランスファーの検出

実際にTurboRFPを用いてミトコンドリアトランスファーが検出できるかを検証した。先に述べたように、AE細胞はミトコンドリアトランスファーのドナーとして高い適正を持っている。そこで我々は不死化したAE細胞にミトコンドリア局在シグナルを付与したTurboRFPをレンチウイルスにより導入し、ドナー細胞とした。レシピエント細胞は低濃度の過酸化水素で処理したHEK293T細胞を用いた。ミトコンドリアゲノムは核ゲノムに比べてDNAダメージに感受性が高く、適切な濃度の過酸化水素で処理することで、ミトコンドリアゲノムにのみ損傷を与えることでミトコンドリアトランスファーのレシピエント細胞のモデルを簡易的に作製することができる¹⁵⁾。細胞の識別のためにEGFPで標識したレシピエントHEK293T細胞を100 uMの過酸化水素に60分間曝露した後ミトコンドリアにTurboRFPを発現させた不死化AE細胞と20時間共培養した。その後、膜電位依存的にミトコンドリアを染色でき、かつTurboRFPとEGFP励起・蛍光波長が重複しないMitoTracker Deep Redで染色し、プリズム分光を備えた共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、TurboRFPで標識されかつ、MitoTracker Deep Redでも染色されたミトコンドリアを保持するレシピエントのHEK293T細胞が多数存在することを確

認した。3D再構成画像による確認により、これらのミトコンドリアは単に293T細胞に重なっているのではなく、確かに細胞質内に存在することが確認された。

4. 考察

本研究で我々はミトコンドリア移行シグナルを付与したDsRed及びその単量体化誘導体であるmCherryを細胞に発現させると、ライソソームに局在する明るい凝集体を形成することを示した。これらの凝集体が細胞の機能に深刻な影響を与える証拠は見出せなかった。しかしながら、本来ミトコンドリアに局在することを意図した蛍光タンパク質がライソソームへ誤って局在することは、ミトコンドリアトランスファーの研究においては人為的な偽陽性を生じる得る致命的な問題となる。ライソソームは細胞内の不要物を分解する機能を持っており、その内容物はしばしば細胞外へと放出される。放出された内容物を他の細胞が貪食した場合、それがミトコンドリアトランスファーによって能動的に輸送されたものとの区別は困難である。これまでに、数多くのミトコンドリアトランスファーの研究においてDsRed及びmCherryがミトコンドリアの標識に使われているが^{16,17)}、それらの研究結果には注意を払う必要がある。

本研究ではミトコンドリア局在シグナルを付与したDsRed及びmCherryが何故ライソソームに局在するか明らかにできていない。本研究で用いたミトコンドリア局在シグナルやリンカー配列が影響を及ぼした可能性が考えられるが、他の蛍光タンパク質

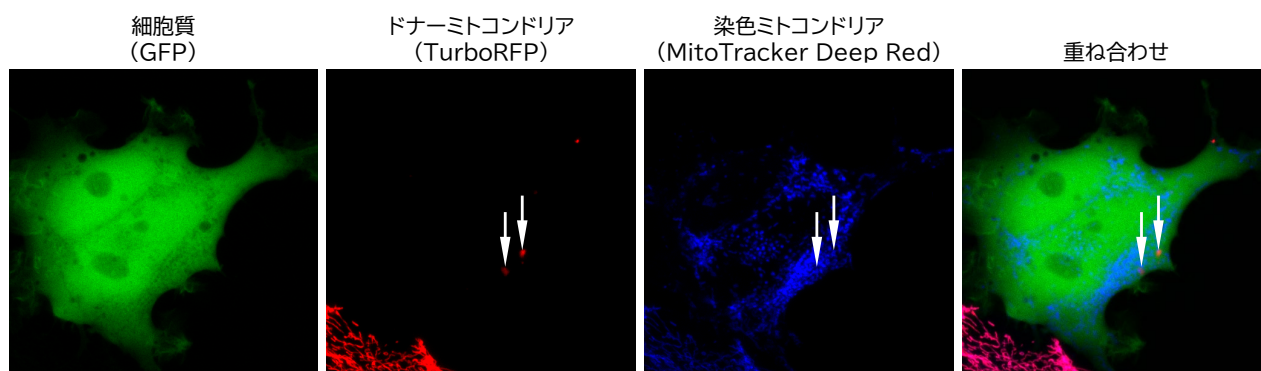


図7 ミトコンドリア局在TurboRFPを発現した不死化AE細胞から過酸化水素で処理した293T細胞にミトコンドリアが輸送された様子。白い矢印は転移したミトコンドリアを示す。

でも全くミトコンドリア局在シグナルとリンカー同じ配列を用いているが、凝集体は確認されていない。また、過度な外来遺伝子の発現はしばしばライソソームへの凝集を引き起こす可能性が考えられる。しかしながら、感染させるウイルスの力価を下げてもライソソームへの凝集は観察されることに加え、本研究では比較的弱いヒトPGKプロモーターにより発現させているためライソソームへの凝集を引き起こすほど多量のタンパク質が発現していることは考えられず、否定される。Katayama等による報告ではゴルジ複合体へのmCherryの局在も同様にライソソームへの凝集を引き起こすことから¹⁴⁾、DsRed及びその誘導体の内在的な性質によるものと推察される。

本研究では、hAECsが過酸化水素で障害を与えた細胞にミトコンドリアを輸送する能力を持つことを示した。本研究で用いたhAECsはミトコンドリアトランスファーのドナー細胞として有用な特性を持っている。第一にhAECsは胎児由来の細胞であるため、加齢や環境によるダメージに晒されていないため、腫瘍原性等様々な疾患の原因となり得るミトコンドリアゲノムへのダメージの蓄積が無く、ほぼ無傷な状態で保たれている。第二に、hAECsは簡便な手法で大量の細胞を倫理的な問題なく採取することが可能である。hAECsは本来廃棄される胎盤から採取可能であるため、非侵襲的な方法で採取が可能であり、また、特別な培養方法も必要なく、トリプシン処理という組織からの細胞採取方法として広く用いられた確立された方法で採取が可能である。第三に、hAECsはレシピエントに安全に移植が可能である。hAECsのゲノムDNAは安定であるため、腫瘍原性を有しておらず、移植しても腫瘍を形成しない^{18,19)}。加えて、hAECsは免疫回避能を持っており、他家移植における拒絶反応や炎症反応を制御するのに有益であると考えられる²⁰⁾。以上のことから、hAECsは細胞移植治療に理想的な細胞であり、hAECsをミトコンドリアのドナー細胞としてミトコンドリアの損傷による疾患の治療への応用に向けた研究がさらに進むことが期待される。

5. 結語

本研究で我々は4種類の赤色蛍光タンパク質についてミトコンドリアに局在させた際の性質について比較検証した。その中でDsRed及びmCherryは少ない確率で細胞のライソソームにも局在することを示した。さらに我々はTurboRFPでミトコンドリアを標識したヒト羊膜上皮細胞がミトコンドリアを損傷した細胞へミトコンドリアを輸送する能力があることを示した。

謝辞

本研究は日本大学若手研究者助成金及び科学研究費補助金の助成の元に行われたものである。

文 献

- 1) Mohammadaliipour A, Dumbali SP, Wenzel PL. Mitochondrial Transfer and Regulators of Mesenchymal Stromal Cell Function and Therapeutic Efficacy. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:1519.
- 2) Koyanagi M, RP Brandes, J Haendeler, AM Zeiher, S Dimmeler. Cell-to-Cell Connection of Endothelial Progenitor Cells With Cardiac Myocytes by Nanotubes. *Circ Res.* 96 2005;96 (10) :1039–1041.
- 3) JL Spees, SD Olson, MJ Whitney, DJ Prockop, Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103 (5) :1283–1288.
- 4) JR Brestoff, et al. Intercellular Mitochondria Transfer to Macrophages Regulates White Adipose Tissue Homeostasis and Is Impaired in Obesity. *Cell Metab* 2021;33 (2) :270-282.e8.
- 5) Miki T, Yasuda S, Kahn M. Wnt/ β -catenin Signaling in Embryonic Stem Cell Self-renewal and Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cell Rev Rep* 2011;7 (4) :836–846.
- 6) Takano, C. et al. Clinical perspective on the use of human amniotic epithelial cells to treat congenital metabolic diseases with a focus on maple syrup urine disease. *Stem Cells Transl Med* 2021;10 (6) :829–835.
- 7) A Acquistapace A. et al. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem Cells* 2011;29 (5) :812–824.
- 8) Islam, M. N. et al. Mitochondrial transfer from bone marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* 18, 759–765 (2012) .
- 9) J Pasquier. et al. Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med* 2013;11:94.
- 10) Zielonka J. et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem Rev* 2017;117 (15) :10043–10120.

- 11) C Sargiacomo, S Stonehouse, Z Moftakhar, F Sotgia, MP Lisanti. MitoTracker Deep Red (MTDR) Is a Metabolic Inhibitor for Targeting Mitochondria and Eradicating Cancer Stem Cells (CSCs) , With Anti-Tumor and Anti-Metastatic Activity In Vivo. *Front Oncol* 2021;11:678343.
- 12) R Rizzuto, M Brini, P Pizzo, M Murgia, T Pozzan. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr Biol* 1995;5 (6) :635–642.
- 13) RE Campbell. et al. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99 (12) :7877–7882.
- 14) H Katayama, A Yamamoto, N Mizushima, T Yoshimori, A Miyawaki. GFP-like Proteins Stably Accumulate in Lysosomes. *Cell Struct Funct* 2008;33 (1) :1-12.
- 15) SW Ballinger. et al. Hydrogen Peroxide- and Peroxynitrite-Induced Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 2000;86 (9) :960–966.
- 16) L Gao, Z Zhang, J Lu, Pei G. Mitochondria Are Dynamically Transferring Between Human Neural Cells and Alexander Disease-Associated GFAP Mutations Impair the Astrocytic Transfer. *Front Cell Neurosci* 2019;13:316.
- 17) L-F Dong, et al. Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *eLife* 2017;6:e22187.
- 18) T Miki, T Lehmann, H Cai, DB Stolz, SC Strom. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells* 2005;23 (10) :1549–1559.
- 19) S Ilancheran, et al. Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential. *Biol Reprod* 2007;77 (3) :577–588.
- 20) T Miki. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2018;80 (4) :e13003.