

令和元年5月10日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03834

研究課題名(和文) 生体内高精度細胞機能制御のためのナノ複合体の創製

研究課題名(英文) Nanocomplexes for in vivo control of cellular functions

研究代表者

都 英次郎 (Miyako, Eijiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：70443231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：生命現象の解明を目指した高精度な細胞機能制御技術の開発は、生命科学研究における究極の目的の一つである。なかでも光を活用した細胞機能制御技術は、簡便性や細胞応答性の高さから注目を集めている。しかし、従来技術は、生体透過性の低い光を利用するため生体深部領域の細胞機能を制御することはできない。また、安全性の低いウイルスを利用するため医療応用が難しい。従って、本研究目的では、生体透過性の高い近赤外光によって発熱可能なナノカーボン材料と特定の温度で内包分子を放出する温度感受性リポソームを組み合わせることで、ウイルスフリーで、かつ生体深部の細胞機能をナノメートルレベルで光により制御する技術に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来のオプトジェネティクスやケージド化合物では不可能であった生体深部領域の生理活性制御が可能となるため、細胞機能のより詳細かつ厳密な分子メカニズムが解明できるようになる。このような分子メカニズムの解明は、とりわけがんのための分子標的医薬品の開発における重要な知見を与えることができる。このように本研究で提案する概念は、光による細胞機能制御研究に新境地を開き、先進医療分野において世界の科学・技術を大きくリードすることができるため学術的意義や社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In the last decade, there has been great progress in technologies for the remote control of organisms through physical and chemical manipulation. In particular, methods involving lasers have proven useful for the control of biological functions in living organisms through simple manipulation with laser beams. Ultraviolet, short-wavelength visible, and infrared light are generally used in optical techniques for the control of biological functions in organisms. However, these types of light do not efficiently penetrate biological tissues. It is well known that near-infrared (NIR) rays can penetrate tissues because biological systems are relatively transparent to these wavelengths of light. We have developed NIR-laser-driven nanocomplexes for remote control of cellular functions. I believe that the technologies will help to create a new state-of-the-art tool for the comprehensive analysis of "real" biological molecular information at the single-cell level.

研究分野：生物工学

キーワード：ナノ材料 ナノチューブ・フラーレン ナノバイオ 細胞・組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光によって細胞膜電位を制御できるオプトジェネティクスは、魅力的な細胞機能制御技術の一つである。オプトジェネティクスは、神経や心筋といった特定の細胞に遺伝子工学的手法を用いて、光活性化イオンチャネルを強制発現させた後、これらの細胞に紫外あるいは可視光を照射することにより、標的とする細胞を興奮または抑制させる。オプトジェネティクスを用いると、細胞同士の接続や特定の細胞集団の機能を光のスイッチを切り換えて遠隔操作することができる。このためオプトジェネティクスは、未知の細胞ネットワークを解き明かし、病気の治療にも役立つと期待されている。しかし、オプトジェネティクスで制御できるのは活動電位発生の有無のみであり、一種類の細胞内シグナル伝達経路、あるいは一種類のタンパク質の活性化など、より厳密な細胞機能制御を行うことはできない。また、紫外や可視光といった生体透過性の低い光を利用するため生体深部領域の細胞機能を制御することはできない。さらに、安全性の低いウイルスベクターを用いて遺伝子改変を行う必要があるため医療への実用化は難しい。一方、生理活性物質に光照射により脱保護される保護基を有機化学的に導入し、その生理活性を一時的に失わせたケージド化合物を用いる細胞機能制御技術がある。本手法は、小分子による様々な細胞機能を選択的に制御でき、ウイルスによる遺伝子改変が必要ない点が魅力であるが、当該化合物を合成するには卓越した技術が必要であり、脱保護に紫外線か可視光線を利用するため生体深部領域の細胞機能制御には不向きである。

一方、ナノカーボン材料(カーボンナノチューブ(CNT)やカーボンナノホーン(CNH))は、数多くの優れた物理的・化学的特性を有することから 21 世紀の基盤技術を支える材料として世界から期待を寄せられている。最近、申請者は、生体透過性が高く、光毒性の低い近赤外レーザーにより容易に発熱するナノカーボン材料の光発熱特性と特定の温度で内包分子を放出する温度感受性リポソームが、線虫 *Caenorhabditis elegans* 体内の細胞機能制御に有用であることを見出した。具体的には、ナノカーボン材料とリポソームからなる分子複合体を用意し、線虫体内に分子複合体を注入後、さらに近赤外光を照射した。その結果、ナノカーボン材料の光発熱特性により発した熱で、リポソームの構造変化が起こり、内包薬物が放出することで、この薬物の効果により標的とするタンパク質(ナトリウムイオンチャネル)の働きを阻害することに成功した。このナノカーボン材料の光発熱特性とリポソームの温度応答性を活用する方法は、ウイルスを用いる遺伝子改変を伴わないため、より安心・安全な細胞の機能制御技術を構築することができる。従って、本研究では、当該技術をさらに発展させることで、遺伝子改変を伴わず、より高次な機能を有するマウスの生体深部における様々な種類の生理活性を光熱と小分子で制御可能な新しい細胞機能制御技術を開発する。

2. 研究の目的

生命現象の解明を目指した高精度な細胞機能制御技術の開発は、生命科学における究極の目的の一つである。なかでも光を活用した細胞機能制御技術は、簡便性や細胞応答性の高さから注目を集めている。しかし、従来技術は、生体透過性の低い光を利用するため生体深部領域の細胞機能を制御することはできない。また、安全性の低いウイルスを利用するため医療応用が難しい。従って、本研究目的では、生体透過性の高い近赤外光によって発熱可能な CNH と特定の温度で内包分子を放出する温度感受性リポソームを組み合わせることで、ウイルスフリーで、かつ生体深部の細胞機能をナノメートルレベルで光により制御する技術を構築した(図1)。本研究は、とりわけガンや神経変性疾患に対する新しい分子標的医薬や先進医療技術のための普遍的な技術となる。

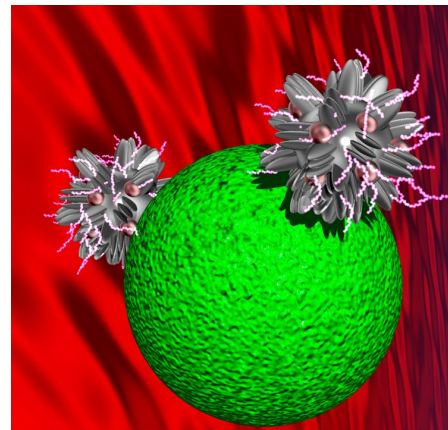


図1. 本研究の概念図

3. 研究の方法

本研究では、最終構想にマウス生体中の細胞内酵素反応制御が可能な機能性ナノ複合体の開発を掲げており、本最終構想を達成するために、まず、コア技術となる細胞・組織集積能を強化した CNH とリポソームから成るナノ複合体を開発した。次に、作製した機能性ナノ複合体を細胞内に導入し、800 nm の近赤外レーザーを照射することで酵素反応制御効果を検証し、最大の蛍光強度変化量が得られる最適条件を探索した。最後に、当該ナノ複合体をマウス静脈に注入し、レーザー照射に伴う血管内での細胞機能制御効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 機能性ナノ複合体の合成

CNH とリポソームから成るナノ複合体の特定細胞・組織への集積能力を強化することができれば、生体深部のより効果的な細胞機能制御が可能になる(図2)。本研究では、磁石に反応するマグネタイト(四酸化三鉄)ナノ粒子(MAG)を酸化CNH(CNH_{ox})内部ならびに表面に充填した。また、水中で本ナノ複合体の光発熱特性と温度応答性を最大限に発現させるために、水溶性高分子(ポリエチレンイミド(PEI))を表面に化学修飾した。アビジンとビオチンの相互作用を利用することでCNHとリポソームを結合した。

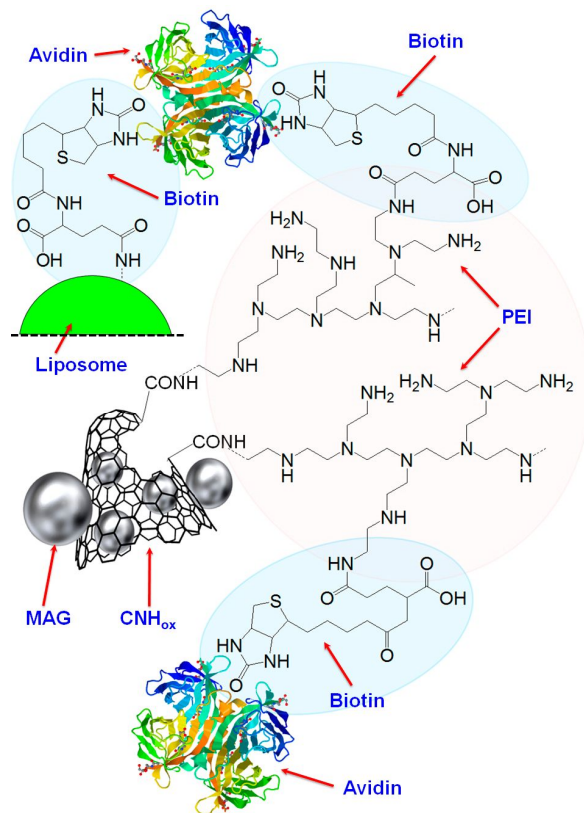


図2. ナノ複合体の構造

(2) 細胞機能制御技術の開発

本研究では、モデル細胞機能として -ガラクトシダーゼによる細胞内蛍光発現反応を利用する。なお、-ガラクトシダーゼはガン細胞が特異的に発現しているため、本技術は、とりわけガンに対する新しい分子標的医薬や先進医療技術のためのマイルストーンになると期待している。本蛍光検出原理は以下の通りである。まず、

-ガラクトシダーゼ非存在下では無蛍光の基質(フルオレセイン Di-β-D-ガラクトピラノシド(FDG))を封入したナノ複合体をヒト -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入

したマウス線維芽細胞株に磁石により効果的に取り込ませる。次に、近赤外レーザー(800 nm)照射によりナノ複合体からFDGを放出させ、狙った細胞内の -ガラクトシダーゼと反応させることで緑色蛍光を発現させるという仕組みである。当該メカニズムを介してレーザー照射後に緑色に光る細胞を蛍光顕微鏡で観察することに成功した。

(3) 生体内の細胞機能制御技術の開発

本研究項目においてもモデル反応として -ガラクトシダーゼによる蛍光検出を利用した。ナノ複合体分散液をヒト -ガラクトシダーゼを強発現するトランスジェニックマウスの静脈に注射後、永久磁石によって耳の血管内に集積させた。なお、標的部位を耳にしたのは、他の器官に比較して薄く、蛍光顕微鏡による血管内部の観察が容易だからである。磁石を数分間置いた後、マウス耳の毛細血管がナノ複合体に由来する強い蛍光を観察することができた。磁石を置かないコントロール実験では、マウスの毛細血管は蛍光を発現していないことから、磁力によってナノ複合体を生体内で集積化できることが明らかとなった。

次に、血管内の狙った細胞めがけて近赤外レーザー(800 nm)を照射することで細胞内の蛍光発現挙動を観察した。この結果、レーザー照射後に酵素反応に由来する蛍光をリアルタイム観察することに成功した。本システムは、上記のオプトジェネティクスやケージド化合物を用いる従来システムと比較して生体内で効率良く、かつレーザーによるピンポイント照射が可能のため、結果として細胞の機能制御効果が飛躍的に向上できると期待している。

5. 主な発表論文等

*は責任著者

1) Svetlana A. Chechetka, Eiji Yuba, Kenji Kono, Masako Yudasaka, Alberto Bianco, **Eijiro Miyako***

“Magnetically- and near infrared light-powered supramolecular nanotransporters for the remote control of enzymatic reactions”

Angew. Chem. Int. Ed. 55, 6476-6481 (2016).

Elected as "Very Important Paper (VIP)".

2) Svetlana A. Chechetka, **Eijiro Miyako***

“Bioinspired polyaniline-functional natural hairs for pollen protection”

ChemistrySelect 1, 1061-1065 (2016).

3) Svetlana A. Chechetka, **Eijiro Miyako***

“Optical regulation of carbon nanodots by chemical functionalization”

Chem. Lett. 45, 854-856 (2016).

4) Svetlana A. Chechetka, Motomichi Doi, Benoit P. Pichon, Sylvie Bégin-Colin, **Eijiro Miyako***

“Photothermal and mechanical stimulation of cells via dualfunctional nanohybrids”
Nanotechnology 27, 475102-475112 (2016).

Highlighted in Nanotechweb.

5) Yan Lyu, Chen Xie, Svetlana A. Chechetka, **Eijiro Miyako***, Kanyi Pu*

“Semiconducting polymer nanobioconjugates for targeted photothermal activation of neurons”

J. Am. Chem. Soc. 138, 9049-9052 (2016).

Elected as the "top 1%" highly cited paper by Web of Science.

6) Eri Hirata*, **Eijiro Miyako**, Nobutaka Hanagata, Natsumi Ushijima, Norihito Sakaguchi, Julie Russier, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Alberto Bianco, Atsuro Yokoyama

“Carbon nanohorns allow acceleration of osteoblast differentiation via macrophage activation”

Nanoscale 8, 14514-14522 (2016).

7) Yue Yu, **Eijiro Miyako***

“Manipulation of biomolecule-modified liquid-metal blobs”

Angew. Chem. Int. Ed. 56, 13606-13611 (2017).

8) Svetlana A. Chechetka, Yue Yu, Xu Zhen, Manojit Pramanik, Kanyi Pu, **Eijiro Miyako***

“Light-driven liquid metal nanotransformers for biomedical theranostics”

Nature Communications 8, 15432 (2017).

9) Svetlana A. Chechetka, Yue Yu, Masayoshi Tange, **Eijiro Miyako***

“Materially engineered artificial pollinators”

Chem 2, 224-239 (2017).

Elected as "Front Cover Art". Highlighted in Preview of Chem. Press released in Cell Press.

Highlighted in a lot of information media (ABC.au, ABC Radio.au, ABC.es, the Australian.au, Boing Boing, Christian Science Monitor, C & EN, China Science Daily.cn, CNN, The Conversation, Daily Caller, Daily Dot, Daily Mail.uk, Discovery Channel Seeker, the Economist, Forbes, Geek, Gizmodo, Huffington Post.au, i.uk, IFLscience, Inhabitat, International Business Times, Kurier.at, LiveScience, Los Angeles Times, the Mary Sue, Mashable, NBC News, New Scientist, Newsweek, Newsy (video), New York Post, NZZ.ch, Orf.at, le Parisien.fr, Popular Mechanics, Popular Science, la Presse.ca, Quartz, the Register.uk, San Diego Union-Tribune, San Francisco Gate, Science/AAAS, Scientific American, Smithsonian, Standard.at, Sueddeutsche.de, Technology Review, Times.uk, the Verge, Vesti.ru, VICE Motherboard, VNexpress.vn, Wired.de, Wired.it, Wired.uk, Wyborcza.pl, Yahoo! News, ZDnet, Zeit.de, etc.).

10) Yue Yu, Shashank P. Katiyar, Durai Sundar, Zeenia Kaul, **Eijiro Miyako**, Zhen Zhang, Sunil C. Kaul*, Roger R. Reddel, Renu Wadhwa*

“Withaferin-A kills cancer cells with and without telomerase: Chemical, computational and experimental evidences”

Cell Death & Disease 8, e2755 (2017).

11) Arun Kumar Prabhakar, Michael G. Potroz, Soohyun Park, **Eijiro Miyako***, Nam-Joon Cho*

“Spatially controlled molecular encapsulation in natural pine pollen microcapsules”

Particle & Particle Systems Characterization 35, 1800151 (2018).

Elected as "Front Cover Art".

12) Yue Yu, **Eijiro Miyako***

“Alternating-magnetic-field-mediated wireless manipulations of a liquid metal for therapeutic bioengineering”

iScience 3, 134-148 (2018).

Elected as "Front Cover Art".

13) Yue Yu, **Eijiro Miyako***

“ Recent advances in liquid metal manipulation toward soft robotics and biotechnologies”
Chem. Eur. J. 24, 9456-9462 (2018).

Invited Review Article. Elected as "Reviews Showcase".

14) Yue Yu, Masahiro Nishikawa, Ming Liu, Takahiro Tei, Sunil C. Kaul, Renu Wadhawa, Minfang Zhang, Junko Takahashi, **Ejiro Miyako***

“ Self-assembled nanodiamond supraparticles for anticancer chemotherapy”

Nanoscale 10, 8969-8978 (2018).

Elected as "Back Cover Art".

15) Yue Yu, Xi Yang, Ming Liu, Masahiro Nishikawa, Takahiro Tei, **Ejiro Miyako***

“ Title will be shortly announced after online publication”

ACS Applied Materials & Interfaces accepted (2019).

16) Hokyun Chin, Jurriaan J. J. Gillissen, **Ejiro Miyako**, Nam-Joon Cho*

"Microfluidic liquid cell chamber for scanning probe microscopy measurement application"

Review of Scientific Instruments 90, 046105 (2019).

17) Teng-Fei Fan, Michael G. Potroz, Ee-Lin Tan, Jae H. Park, **Ejiro Miyako***, Nam-Joon Cho*

"Human blood plasma catalyses the degradation of Lycopodium plant sporoderm microcapsules"

Scientific Reports 9, 2944 (2019).

〔雑誌論文〕(計 17 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。