

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2022

課題番号：18KK0398

研究課題名（和文）多様な動物種の細胞エネルギーフロー解析と生物普遍的な治療法の探索

研究課題名（英文）Analysis of the energy flow in various cell types and the development of a universal therapeutic way

研究代表者

新井 敏（Arai, Satoshi）

金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授

研究者番号：70454056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,200,000円

渡航期間： 3ヶ月

研究成果の概要（和文）：本国際共同研究では、今までに開発してきた細胞内の温度やATPを可視化できる蛍光センサーを自在に組み合わせ、様々な生物種の細胞のエネルギーマップを描くことを目標としている。結果、エネルギーマップの取得には至っていないが、幾つかの細胞種の調製と蛍光センサー導入に成功した。また、併せて開発してきた細胞内に極小の熱源を作ることができる技術を開発させ、生体親和性の高い材料で光熱変換ナノ粒子を作りこみ、がん細胞の細胞死誘導や筋収縮の誘導など、将来の光温熱療法に展開できる予備的な知見を得ることができた。付随的に発展した共同研究で、光温熱と無電解メッキを組み合わせた材料合成に成功したことも成果の1つである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本国際共同研究の基礎研究の大きな柱として「熱とATPの視点からの様々な動物種の細胞のエネルギーマップ作成」を設定してきた。体温が異なる非モデル生物等は、獣医学、生態学の枠組みでのみ、研究が行われるのが常であり、異分野との共同研究は、国内外においてほとんど進んでいないことから、基礎生物学分野の裾野を広げる点で極めて重要な異分野融合研究と言える。また、実践的な応用を強く意識した研究として「普遍的で汎用性の高い動物治療法の開発」に繋がることも、社会的意義の大きい研究課題である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this international collaboration study is to obtain the energy maps inside the cells derived from various species, which is achieved by combining fluorescent sensors that can visualize intracellular temperature and ATP. As a result, although energy maps have not yet been obtained, several cell types have been successfully cultured and then fluorescent sensors could be introduced into the cells. In addition, by developing a technology that can create a tiny heat source inside the cell, which has also been developed in conjunction with this research, we have created photothermal nanoparticles with highly biocompatible materials and obtained preliminary findings that can be extended to future photothermal therapy such as the efficient induction of cell death and muscle contraction. Another additional achievement was the successful synthesis of materials combining photothermal heating and electroless plating, which was generated by an incidentally happened collaboration.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光温度センサー 熱産生 光温熱療法

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

1.1) 細胞レベルでの温度計測と制御

細胞システムは、系外から化学エネルギーを獲得、一部をアデノシン三リン酸 (ATP) の形に変換して、細胞内の生物学的仕事の燃料として消費していく。一方で、仕事として使わなかった残りのエネルギーは、特に恒温動物の場合、これを積極的に使い体温のリソースとしている。細胞内の化学反応や生体分子の集合形成は、熱力学の法則に支配されていることから、1細胞レベルで温度マップを取得することは、細胞がどのように動的機能を発揮しているかを知る大きな手掛かりとなる。申請者らは、本国際共同研究の科研費の申請に至る前、ミクロの世界で生じる温度変化を蛍光強度 (又は、蛍光寿命) に変換する蛍光温度センサーを開発してきた (図 1: Sci. Rep., 2014, 2017, Chem. Commun.2015)。生命システムにおいて、サブセルレベルで生じる熱が、多細胞から成る組織レベルへどのように広がっていくのか。その異なる階層を横断する熱の時空間ダイナミクスは未だ解明されていない。また、恒常性・温度という視点からは、恒温動物だけが着目されがちであるが、外気温と体温が同じである変温動物にとっても、体温は生命システムを維持するために決定的に重要な物理量であることに変わりはない (爬虫類は、体温維持のために日向ぼっこしている)。更に、積極的にこのエネルギーのフローに介入することができれば、新しい細胞機能操作法へ展開もできる。その代表例が、温熱刺激でがんや筋肉の治療を施す温熱療法である。申請者らは、光を熱に変換できる極小の光熱変換材料を細胞や動物組織に導入して、光で狙ったところに人工的に熱源を作ることを利用する光温熱療法 (PTT) の開発にも取り組んできた。これにより、がんの高速細胞死誘導のほか、熱による筋肉の収縮誘導などが可能であることを示してきた (ACS Nano 2017)。

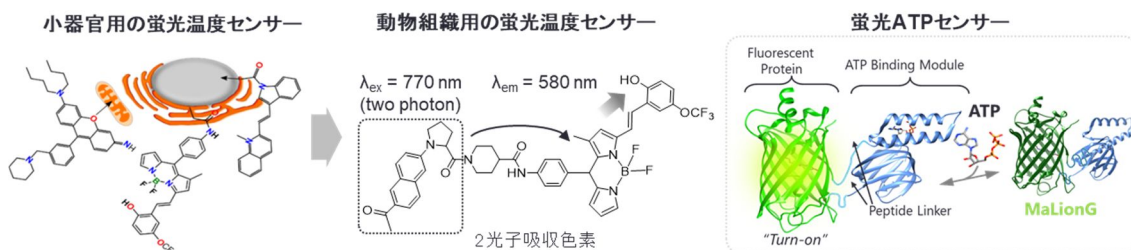


図 1 今までに開発してきた蛍光温度・ATP センサー

1.2) エネルギーマップへの拡張

前項で述べた通り、細胞が獲得するエネルギーのフローを理解する上で、当然ながら、ATP の定量も重要になってくる (細胞のエネルギーフロー・バランス)。人間社会もエネルギーフローの破綻で社会が健全さを失うように、細胞にとっても、この破綻は深刻である。例えば、エネルギー消費量よりも摂取量が過多になった場合、肥満等に繋がるし、ATP の枯渇は、生命活動の維持に深刻なダメージとなる。そこで、「温度マッピング」の作成から、より細胞全体を俯瞰的に捉える「エネルギーマップの作成」へと研究を大きく発展的させたい (図 2)。これは、前述の蛍光温度センサーに加えて、本科研費申請時に、申請者が蛍光の ATP センサーを開

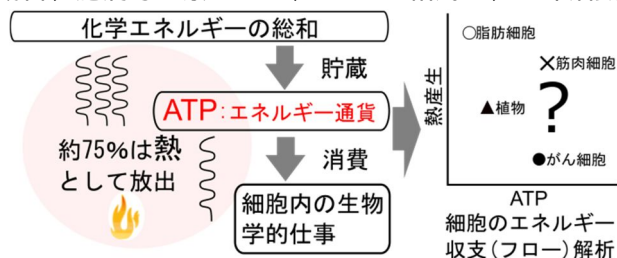


図 2 細胞のエネルギーフロー

発していたことに関連しており (Angew. Chem. 2018)、これらを自在に組み合わせることで、細胞が獲得した総エネルギーの流れを丸ごと可視化できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本申請課題では、前段階の科研費課題を踏まえ、開発してきた ATP や温度の蛍光センサーを活用し、国際共同研究を通して更に研究を発展させる。まず、恒温・変温動物を問わず、あらゆる生物種のエネルギーマップを作成する将来展開を見据えて、様々な動物の細胞を調製し、センサーの導入を試みる。また、種を超えた光温熱療法を目指して、細胞内に極小の熱源を作る技術開発にも取り組む。これらを、シンガポールの研究機関や南洋理工大学との共同で実施する。

研究開始当初、動物の手術時に付随的に回収できる細胞サンプルの準備等を進めていたが、新型コロナウイルスの影響で、シンガポールへの渡航制限が発生し、予定していた滞在日数を見込めないことが分かり、期間延長を申請したものの、大幅な研究計画の変更を迫られた。特に、海外渡航の旅費の変更を行い、物品費 (化学実験や生物実験の消耗品、光学機器の部品、先方への消耗品の郵送など) へ振り替えて、国内で可能な限り、化学合成や細胞実験を進めた。細胞サンプルの調製はリモートで議論しながら進めた。前述した大きな研究の方針は変わらないが、規模を縮小して、以下の研究テーマに絞って遂行した。方法と結果を併せて、項目ごとに報告する。

3. 研究の方法

3.1) 各種細胞の培養条件の検討

先方の研究機関で、細胞を培養するために、必要な消耗品を送り、研究進捗状況を確認しながら、培養を進めた。特に、本研究で手にはいるサンプルは、細胞培養の際にコンタミしやすいため、難易度が高く、期間を通じて、困難を伴った。採取したサンプルの保管方法を工夫したり、インキュベーターの温度や CO₂ の濃度を対象の動物に応じて変化させたりしながら、結果、幾つかの種に関して細胞培

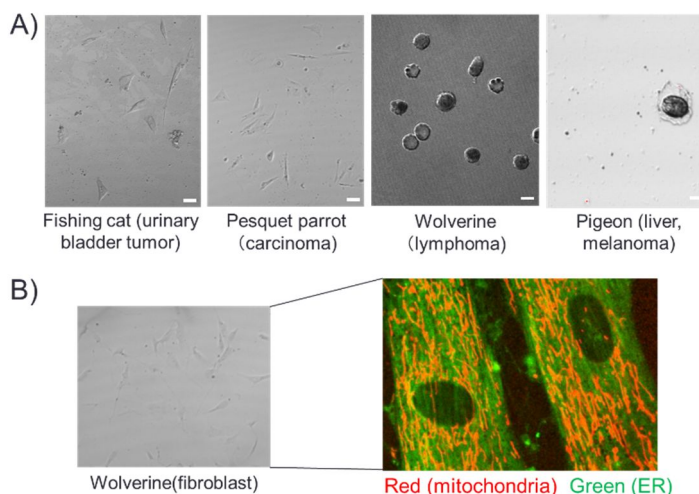


図 3 様々な動物の細胞。A) 培養に成功した細胞種。B) Wolverine (クズリ) の繊維芽細胞。ミトコンドリアや ER を染色。

養に成功した (図 3)。更に、低分子の蛍光センサーを用いた染色も、通常の哺乳類由来の細胞と同様に可能であることを確認した。蛍光 ATP センサーについては遺伝子導入を行ったが、効率が著しく低かった。そのため、導入方法を変更して、センサータンパク質を一度精製し、タンパク質導入試薬を用いてこれを細胞に導入する手法に切り替えて研究を進め、一部、細胞内への導入を確認している。

3.2) 光熱変換材料を用いた光温熱療法のための細胞実験

申請者らは、今までに、近赤外線レーザー照射で光熱変換できるナノ粒子を用いて、がんの細胞死誘導や骨格筋の収縮誘導することに成功している。がんの温熱治療については、生分解性の材料を用いた光熱変換ナノ粒子を日本側でも合成し、細胞実験までその評価を終えた (熱による

細胞死誘導の評価)。当初、動物実験等も先方で検討していたが、コロナ禍で困難になってしまったため、国内の共同研究者と、新たに動物実験を開始しており、近赤外線レーザーデバイスの最適化も含め、順調に進行している。特に、抗がん剤も同時に担持して、温熱と薬剤効果のシナジーで腫瘍サイズが著しく小さくなったことを確認した。

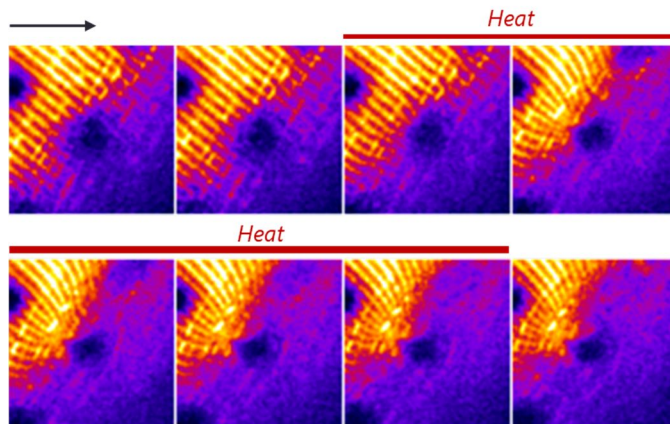


図4 熱による鶏の筋肉の収縮誘導

また、シンガポール研究機関から

提供された鶏の筋肉を用いて、グリセロール筋を作製、これに光熱変換機能を持つ粒子を導入した。近赤外レーザーの照射に伴い、筋肉の構造が収縮の様子が明確に観察できた。グリセロール筋は、収縮に関わるタンパク質のみで構成されていることから、熱による筋収縮は、その収縮に関わるタンパク質の相互作用が温度変化で制御されていることに由来することが明らかになった。

3.3) 無電解メッキによる新しい材料合成の展開

初年度の渡航中に、南洋理工大の佐藤教授らと研究を進めていく過程で、申請者らの人工熱源を作る技術と、温度変化に应答して内包物を徐放できる温熱リポソームを組み合わせた新しい共同研究が生まれた。温熱リポソームに金属メッキを誘導できる試薬を、それぞれ封入しておき、このリポソーム溶液をガラス基板上にキャストして、狙ったところに近赤外レーザーを照射すると、光照射スポットのみ、メッキが出来る仕組みである。将来的には、これで生まれるナノ金属材料を光温熱治療用の光熱変換材料として使ったり、或いは、細胞をメッキ処理したりするような新たな展開が期待できる。なお、得られた結果は、国際共同研究の成果として論文報告した (ACS Appl. Nano Mater. 2020, 3, 6, 5098–5106)。

4. 研究成果

以上、研究開始当初、想定していた結果には、滞在期間も含め、及ばなかったが、最低限、次の展開への足掛かりを作ることにはできた。特に、一部の細胞種に関しては培養に成功しているため、今後も引き続き、ATP・温度センサーを用いてエネルギーマップの作成を進めていく。また、光温熱治療を可能にするナノ粒子についても、国内での共同研究を通して、技術基盤は確立できたため、機をみて先方との国際共同研究を展開していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jing Zhan, Ming Lin, Satoshi Arai, Wan Wei Yang, Keitaro Sou, and Hiroataka Sato	4. 巻 3
2. 論文標題 Electrochemical System Encapsulated by Nanoscale Liposomes Enabling On-Demand Triggering of Electroless Deposition at Selected Areas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Appl. Nano Mater.	6. 最初と最後の頁 5098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.0c00366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Satoshi Arai
2. 発表標題 Local Manipulation of Cellular Functions using Nanoheater and Nanothermometer
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry, Kota Kinabalu (Online) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Arai
2. 発表標題 Intracellular thermometry and nanoheating using functional dyes toward cell thermal engineering
3. 学会等名 International symposium on mechanobiology for human health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 永島 計 分担執筆 新井敏	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 384
3. 書名 温度ストレスによる生体応答ダイナミクス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

当初計画していた渡航期間は、コロナ禍の入国制限により達成できず、3か月に留まっているが（最終年度報告の滞在期間に記載ミス有）、オンラインでの打ち合わせやサンプル輸送など工夫をして、最低限の研究成果を達成した。また、短い間に新たな国際共同研究ネットワークも広がった。また、3年の期間中に相手側の研究者の異動があった。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
シンガポール	南洋理工大学			
シンガポール	シンガポール動物園			
シンガポール	A*STAR			