

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19902

研究課題名（和文）COVID-19による味覚障害を治療するための近赤外光ナノ粒子デバイスの開発

研究課題名（英文）Near-infrared nanoparticle devices for COVID-19 taste disorders treatment

研究代表者

上村 真生（Kamimura, Masao）

東京理科大学・先進工学部機能デザイン工学科・准教授

研究者番号：80706888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、近赤外光に応答して発熱(フォトサーマル効果)するナノ粒子を開発し、味覚にも関連する細胞膜上の温度感受性イオンチャネルを活性化することで、COVID-19による味覚障害を回復させる治療法に向けた基礎的知見を得ることを取り組んだ。作製したフォトサーマルナノ粒子は、優れた生体適合性と生分解性、フォトサーマル効果を示した。また、細胞膜上に存在する代表的な温度感受性イオンチャネルであるTRPV1に結合し、近赤外光照射下において神経細胞へのナトリウムイオン流入の促進と膜電位の上昇が観察された。これらの結果から、本研究で開発したナノ粒子は、味細胞を含む神経細胞の活性化に適用できると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス感染者の後遺症などにみられる味覚・嗅覚障害は、その症状が長期間に渡って残る場合もあり、味覚・嗅覚障害を治療する技術の開発が社会的にも強く期待されている。ナノ粒子を用いた医用生体材料はこれまでも、低分子薬物などの既往技術では難しかったさまざまな治療技術を可能にしてきた。本研究で開発した技術についても、生体に害のないナノ粒子材料と光照射を用いることによって、患者の体に副作用がない安全な治療が実現できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this research, we developed nanoparticles that generate heat (photothermal effect) in response to near-infrared light and activate temperature-sensitive ion channels on cell membranes that are also involved in taste, providing basic knowledge for treatments that restore taste. The prepared photothermal nanoparticles exhibited excellent biocompatibility, biodegradability, and photothermal effects. These also bound to TRPV1, a typical temperature-sensitive ion channel on the cell membrane, and promoted the influx of sodium ions into neurons and increasing the membrane potential under near-infrared irradiation. Based on these results, it is expected that the photothermal nanoparticles developed in this research can be applied to activate nerve cells including taste cells.

研究分野：生体医工学

キーワード：ナノ粒子 近赤外光 フォトサーマル効果 TRPチャネル

1. 研究開始当初の背景

COVID-19 に感染した患者の多くに見られる特徴的な症状として、味覚や嗅覚の障害がある。これらの症状は COVID-19 に特異的なものであり、通常の風邪やインフルエンザではみられないため、初期症状として患者自身が感染を自覚するきっかけにもなっているが、その症状は数か月以上の長期間に及ぶ場合も多く、深刻な問題となっている。味覚を感知する「味蕾細胞」は舌やアゴ、ノドなどに存在しているが、物質の味を感知する際には、細胞膜上で細胞内外のイオン流入を制御するゲートである「イオンチャネル」が働いている。細胞膜上のイオンチャネルを任意のタイミングで制御する手法は、細胞機能の操作への応用が期待されている重要技術である。たとえば、神経細胞のイオンチャネルを遠隔操作する有力な技術として、光を用いた活性化手法であるオプトジェネティクスが高い注目を集めている。オプトジェネティクスは、光感受性イオンチャネルを遺伝子導入によって対象の細胞に組み込むことで、光による細胞機能の操作を可能にする技術である。この技術は光照射により神経細胞の活動を遠隔的に制御できるため、脳神経研究を推進する強力なツールとなっている。しかし、現在利用されているオプトジェネティクスのほとんどは、光の透過性が低い青色光を利用したものであり、深部組織で使用するのが困難である。また、遺伝子導入が必要であることから、高度な実験技術が必要であることや、将来的な医療応用が難しいことなどが問題となっている。

この一方で近年、人体の細胞にもともと存在し、熱や力などの外部刺激を感知して活性化するイオンチャネルの存在が注目されている。たとえば、代表的な温度感受性チャネルである TRPV1 は、高温 (>43°C) で活性化することで、陽イオンを取り入れる。これまでに、さまざまな研究者が光照射に応答して熱を発生する (フォトサーマル) 材料を用いた TRPV1 の活性化を報告しており、金ナノロッドや量子ドットなどの様々なフォトサーマルナノ材料の応用が提案されている。しかし、これらの材料の多くは無機・金属系材料であり、体内で使用した後の排泄の問題などが課題となっている。

そして、味覚に関連する味蕾細胞の膜表面にも、TRPM5 という温度感受性イオンチャネルが存在し、この TRPM5 からナトリウムイオンが流入することで味蕾細胞が活性化する (=味覚を得る) が、COVID-19 感染者は何らかの原因で TRPM5 の活性が失われていることが明らかとなっている。この TRPM5 は 40°C 程度以上の温度域に加温することで味蕾細胞内にナトリウムイオンを流入させて味覚を再活性化できると考えられている。

2. 研究の目的

1. でのべた研究背景をふまえ、本研究では、生体適合性に優れた poly(ethylene glycol) (PEG) の片末端に生分解性の poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) のブロック構造を有するポリマー (PEG-*b*-PLGA) から形成されるポリマーミセルのコア部に、米国食品医薬品局にも承認されている生体適合性の有機色素である Indocyanine Green (ICG) を内包したポリマーミセルを作製し、フォトサーマル効果を利用した TRP チャネルの活性化を行うことで、味覚を含む神経細胞の活性化の基礎的知見を得ることを目的とした (図 1)。

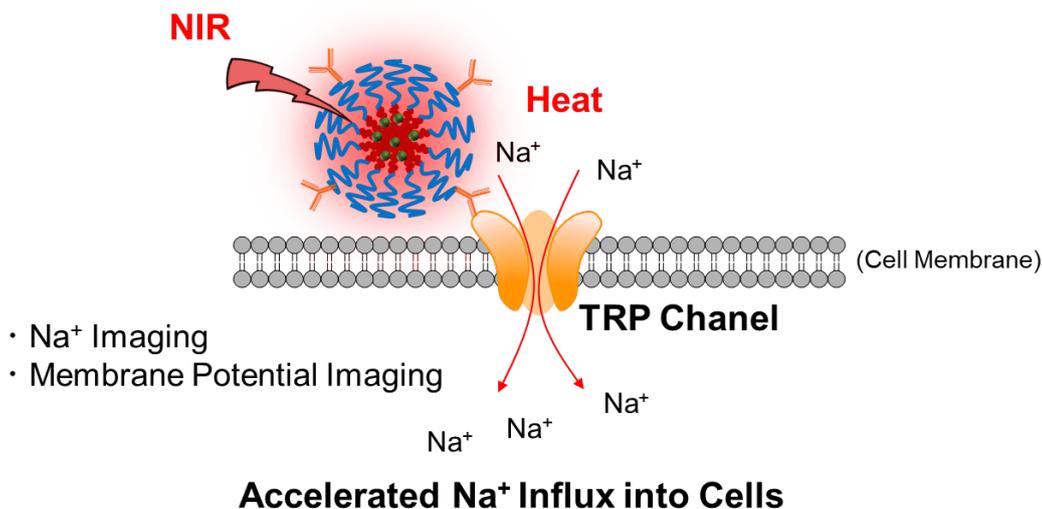


図 1. 近赤外光応答ポリマーミセルを用いた TRP チャネルの活性化。

3. 研究の方法

PEG-*b*-PLGA (Mn: 5000-15000) と PEG 鎖の α 末端にカルボキシ基を有する PEG-*b*-PLGA (COOH-PEG-*b*-PCL) (Mn: 5000-15000)、ICG をアセトニトリルに溶解し、超純水を加えたのち、開放系で攪拌することでアセトニトリルを取り除いた。その後、得られた ICG ミセルを遠心フィルターで精製し、リン酸緩衝液に分散させた。つぎに、EDC、NHS を混合し、抗 TRPV1 抗体導入 ICG ミセルを得た。ICG ミセルの粒径は、動的分散乱 (DLS) 測定装置を使用して測定した。ICG ミセルの吸収スペクトルは、紫外可視分光光度計を使用して測定した。ICG ミセルのフォトサーマル効果は、808 nm レーザー光を照射し、温度計を使用して測定した。ICG ミセルの細胞毒性は WST アッセイによって評価した。細胞膜上への ICG ミセルの導入は、細胞膜染色試薬を利用した蛍光顕微鏡観察で評価した。フォトサーマル効果による TRPV1 チャネルの操作は、マウス神経/ラット脊椎後根神経節由来 ND7/23 細胞をガラスボトムディッシュで培養して接着させた後、抗体導入 ICG ミセルを添加して、ナトリウムイオン蛍光指示薬 (ION NaTRIUM Green™-2 AM) を培地中に添加した後、808 nm レーザーを照射し、蛍光顕微鏡を用いて蛍光像を観察することで評価した。また、ナトリウムイオン流入に伴う膜電位の変化は、膜電位指示薬 (DiBAC4(3)) を培地中に添加し、808 nm レーザーを照射した後、蛍光顕微鏡を用いて蛍光像を観察することで評価した。

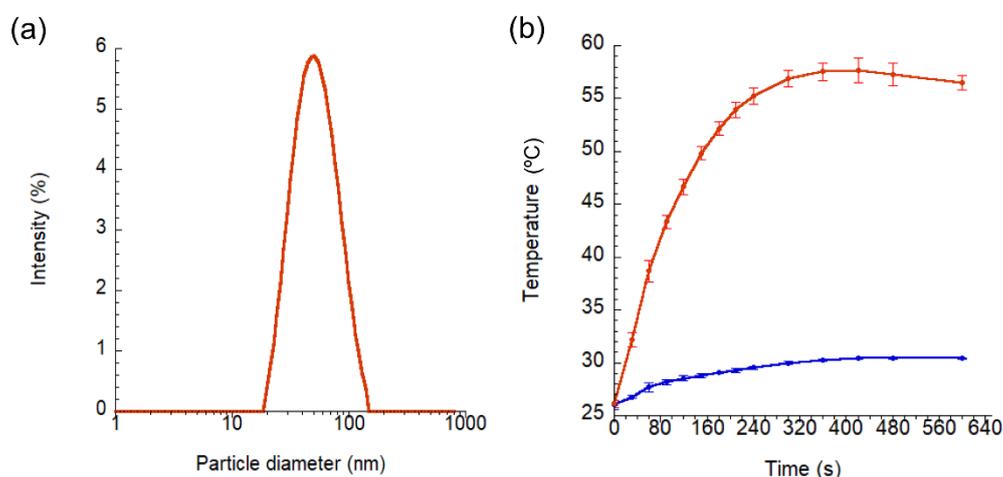


図 2. ICG ミセルの評価。(a)粒径分布、(b) 808 nm レーザー照射下における ICG ミセル分散液の温度変化 (赤 : ICG ミセル、青:水)。

4. 研究成果

DLS 測定の結果より、作製した ICG ミセルの粒径は約 45 nm であった (図 2(a))。得られた ICG ミセルは水中で安定に分散状態を維持し、ICG の漏れ出しは 24 時間以上にわたって確認されなかった。また、ICG ミセルの細胞毒性を WST アッセイで評価した結果、ICG ミセルは ND7/23 細胞に対して、ほとんど毒性を示さないことが明らかとなったため、細胞を用いた種々の評価に安全に利用できると考えられる。つぎに、NIR 光照射下における ICG ミセルのフォトサーマル特性を評価したところ、照射時間に依存した温度上昇が測定されたため、温度感受性イオンチャネルの操作に利用可能であることがわかった (図 2 (b))。

つづいて、ICG ミセルの表面に抗 TRPV1 抗体を導入することで、細胞膜上の TRPV1 チャネルのみに選択的に結合できるナノ粒子 (anti-ICG ミセル) を作製した。作製した anti-ICG ミセルの抗体導入は Micro BCA 法で確認した。

この anti-ICG ミセルを ND7/23 細胞に添加し、808 nm レーザーをしたところ、ICG ミセル未添加の細胞や、リガンド抗体なし ICG ミセルの場合と比較して、顕著なナトリウムイオン流入の様子が観察された。この結果は、ND7/23 細胞の TRPV1 チャネルが、チャネル近傍の局所的なフォトサーマル効果によって活性化することで、細胞内へのナトリウムイオン流入が促進されたと考えられる。さらに、細胞内へのナトリウムイオン流入に伴う膜電位の変化を評価したところ、ICG ミセル未添加の細胞や、リガンド抗体なし ICG ミセルを添加して 808 nm レーザーを照射した場合と比較して、anti-ICG ミセルを添加して 808 nm レーザーを照射した場合には顕著な膜電位の上昇が観察された。これらの結果は、808 nm レーザー照射によって生じたフォトサーマル効果による温度上昇によって、TRPV1 チャネルが活性化されることによってナトリウムイオンの流入が促進され、膜電位が上昇したことによる結果だと考えられる。

この温度感受性イオンチャネルの活性化方法は、TRPV1 以外のチャネルにも適用可能であると考えられ、味蕾細胞の TRPM5 チャネルを遠隔活性化することで、味覚障害の治療技術に応用できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masao Kamimura |
| 2. 発表標題 Stimuli-Responsive Polymer Nanomaterials Based Cell Manipulation |
| 3. 学会等名 5th International Bio/Medical Interface Symposium 2024 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上村 真生 |
| 2. 発表標題 近赤外光で駆動するナノマテリアルによるセラノスティクス |
| 3. 学会等名 第39回日本DDS学会学術大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上村 真生 |
| 2. 発表標題 近赤外光駆動型ナノ粒子によるセラノスティクス |
| 3. 学会等名 第17回日本分子イメージング学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 上村 真生 |
| 2. 発表標題 近赤外光応答型ナノマテリアルによるセラノスティクス |
| 3. 学会等名 第33回日本光線力学学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上村 真生, 菅家 良太, 中島 慶人, 久保田 正和, 山口 弥希, 松下 裕太郎, 尾上 大樹, 陳 威旭 |
| 2. 発表標題 高分子複合化ナノ粒子を用いた細胞の温感・触覚感受性チャネルの遠隔操作 |
| 3. 学会等名 第52回医用高分子シンポジウム |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 東京理科大学先進工学部 上村研究室 https://www.kamimura-lab.jp/ |
|--|

| 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 |
|---------|---------|
| | |