

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25702030

研究課題名(和文)化学修飾ナノカーボンを活用した新規細胞機能制御技術の開発

研究課題名(英文)Control of cellular functions by chemically functionalized nanocarbons

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・ナノ材料研究部門・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) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年の細胞研究の発展はめざましく、特に光を活用した細胞機能制御技術に注目が集まっている。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用いて遺伝子改変を行う必要がある。本研究目的では、生体透過性の高い近赤外光により容易に発熱するカーボンナノホーンの光発熱機能を活用することで、遺伝子改変なしに、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する。本研究は、根治不可能といわれるパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患や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普遍的な技術となる。

研究成果の概要(英文)：A single organism comprises diverse types of cells. To acquire a detailed understanding of the biological functions of each cell, a comprehensive control and analysis of homeostatic processes at the single-cell level are required. In this study, we develop a new type of light-driven nanomodulator comprising dye-functionalized carbon nanohorns (CNHs) that generate heat and reactive oxygen species under biologically transparent near-infrared (NIR) laser irradiation. By exploiting the chemico-physical properties of the nanohorns, cellular calcium ion flux and membrane currents were successfully controlled at the single-cell level. In addition, the nanomodulator allows a remote bioexcitation of tissues during NIR laser exposure making this system a powerful tool for single-cell analyses and innovative cell therapies.

研究分野：ナノバイオ工学

キーワード：カーボンナノチューブ 光発熱特性 近赤外光 細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の細胞研究の発展はめざましく、特にオプトジェネティクスを代表とする光を活用した細胞機能制御技術に注目が集まっている。オプトジェネティクスを用いると、光のスイッチを切り換えるだけで細胞同士の接続や特定の細胞集団の機能を操作できるため、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、基本的に、紫外光や可視光などの生体透過性の低い光を用いるため、生体深部にある細胞の機能を制御できない。また、ウイルスを用いて遺伝子改変を行う必要があるため、医療への応用は難しいという課題がある。

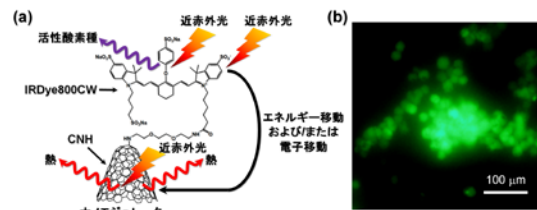
2. 研究の目的

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用いて遺伝子改変を行う必要がある。従って、本研究目的では、生体透過性の高い近赤外光により容易に発熱するカーボンナノホーン (CNH) の光発熱機能を活用することで、遺伝子改変なしに、生体深部の細胞機能をナノメーターレベルで光により制御する技術を構築する (図 1)。本研究は、根治不可能といわれるパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患や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普遍的な技術となる。

3. 研究の方法

本研究期間において下記 3 つの研究を実施し、遺伝子改変なしで、かつ生体深部における細胞膜電位を制御可能な新しい細胞機能制御技術を開発する (概念図)。

- (1) 光熱機能化 CNH 複合体の合成
- (2) 細胞膜電位制御技術の開発
- (3) 生体内の細胞膜電位制御技術の開発と生体適合性評価



(a) 近赤外レーザー光で熱と活性酸素種を同時に発生するナノモジュレーター概念図
(b) ナノモジュレーターによってカルシウム流入が起こり蛍光を発する神経細胞

4. 研究成果

CNH は生体透過性の高い近赤外の波長領域 (700~1100 nm) のレーザー光により容易に発熱する。今回開発したナノモジュレーターは、CNH 表面に水溶性の近赤外蛍光色素 (IRDye800CW) と水溶性のジアミノトリエチレングリコールを化学修飾してある。図 1 に、合成したナノモジュレーターの水中への分

散性と光発熱特性の評価結果を示す。CNH は水などに分散させようとしても、そのままでは分子間の強い相互作用により、粒状に凝集してしまう。CNH の光発熱特性を最大限に発揮させるには、CNH を凝集させずに水などにナノレベルで分散させる必要があるが、表面の水溶性分子により、今回開発したナノモジュレーターの水中での分散安定性は高く、凝集物の形成は観察されなかった (図 1a)。また、IRDye800CW とジアミノトリエチレングリコールの両方を化学修飾した CNH (Dye-CNH) 分散液、ジアミノトリエチレングリコールだけを化学修飾した CNH (NH₂-CNH) 分散液、IRDye800CW だけの溶液、細胞培養液のそれぞれに波長 800 nm のレーザー光を照射したところ、Dye-CNH 分散液で最大の温度上昇が見られた (図 1b)。NH₂-CNH 分散液では温度上昇するものの Dye-CNH よりも小さかった。一方、IRDye800CW だけの溶液、細胞培養液では、温度はほとんど上昇しなかった。Dye-CNH 分散液が最大の温度上昇を示したのは、CNH の水中分散性、光発熱特性、近赤外光を吸収した IRDye800CW から CNH へのエネルギー移動や電子移動に伴う光発熱特性の増強効果によると考えられる。

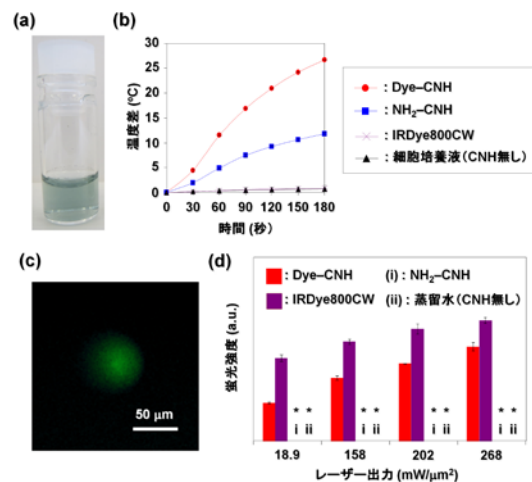


図 1 ナノモジュレーターの (a) 水中分散性、(b) 光発熱特性、(c, d) 活性酸素種発生特性

一方、IRDye800CW などの多くの近赤外蛍光色素は、近赤外光を照射すると活性酸素種を発生することが知られている。Dye-CNH 分散液に、活性酸素種が存在すると緑色の蛍光を発する色素を溶解させ、近赤外レーザーを照射したところ蛍光顕微鏡により緑色蛍光が観察できた (図 1c)。さらに、Dye-CNH 分散液に加えて NH₂-CNH 分散液、IRDye800CW だけの溶液、蒸留水のそれぞれに蛍光色素を溶解させ、レーザー照射して蛍光顕微鏡により蛍光強度を測定したところ、Dye-CNH 分散液と IRDye800CW 溶液にだけレーザー出力に応じた強度の緑色蛍光が観察された (図 1d)。これらは、今回開発したナノモジュレーター、Dye-CNH は、近赤外レーザー光によって効果的に熱と活性酸素種を発生することを示している。活性酸素種は、細胞内外へのイオン

の出し入れに関わるタンパク質の活性を制御することで、ストレス、ホルモン伝達、免疫応答といった生命活動に欠かせないプロセスに参与しているため、ナノモジュレーターによる細胞機能制御が期待される。

今回開発したナノモジュレーターを用いて、細胞内へのカルシウムイオンの流入挙動を観測するため、マウス神経芽細胞腫とラット神経のハイブリッド細胞 (ND7/23)、マウスマクロファージ (RAW264.7)、ヒト子宮頸部癌細胞 (HeLa) に、ナノモジュレーターを取り込ませた。細胞内には、カルシウムイオンと結合すると緑色蛍光を発する指示薬も入れてある。波長 808 nm の近赤外レーザー光を照射し、蛍光顕微鏡により観測したところ、3 種類すべての細胞が効果的に蛍光を発光することから、ナノモジュレーターによりカルシウム流入が制御できることがわかった (図 2a)。

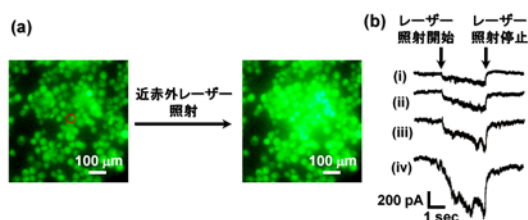


図 2 (a) ナノモジュレーターによる RAW264.7 細胞へのカルシウムイオン流入 (図中の赤丸はレーザー照射位置) と (b) 各レーザー出力に対応した DRG 細胞の細胞膜に流れる電流の変化

また、ナノモジュレーターを細胞内に導入したラット脊髄後根神経節 (DRG) に波長 785 nm のレーザー光を照射し、パッチクランプ法によって細胞膜に流れる電流を測定したところ、レーザー出力に対応した電流の変化が見られ、ナノモジュレーターによる細胞膜の電流の制御の可能性も示された (図 2b)。

今回開発した技術では、生体透過性の高い近赤外光を利用するため、従来は不可能であった生体深部の細胞機能制御が可能と考えられる。また、ウイルスを用いた遺伝子操作を必要としない。これらの利点は、例えば、ワイヤレス、ウイルスフリーで脳深部の特定領域の細胞を活性化させるなど、光を用いた細胞機能制御技術の性能を向上でき、さらに医療応用の可能性も高める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1) Svetlana A. Chechetka, Eijiro Miyako*, “Bioinspired polyaniline-functional natural hairs for pollen protection” *ChemistrySelect* in press (2016).

2) 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.* in press (2016).

3) Svetlana A. Chechetka, Eijiro Miyako*, “Light-active carbon nanodots from autoclaved bioresources” *ChemistrySelect* **3**, 608-611 (2016).

4) Wuxiao Ding*, Svetlana A. Chechetka, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, Masaru Aoyagi, Hiroyuki Minamikawa, Eijiro Miyako*, “Lipid nanotube tailored fabrication of unique shaped polydopamine nanofibers as photothermal converters” *Chem. Eur. J.* **22**, 4345-4350 (2016).

5) Eijiro Miyako*, Benoit P. Pichon, Cécilia Ménard-Moyon, Isabella Anna Vacchi, Christophe Lefèvre, Sylvie Bégin-Colin, Alberto Bianco*, “Design, synthesis, characterization and properties of magnetic nanoparticle-nanocarbon hybrids” *Carbon* **96**, 49-56 (2016).

6) Eijiro Miyako*, Svetlana A. Chechetka, Motomichi Doi, Eiji Yuba, Kenji Kono, “In vivo remote control of reactions in *Caenorhabditis elegans* by using supramolecular nanohybrids of carbon nanotubes and liposomes” *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 9903-9906 (2015).

7) Svetlana A. Chechetka, Minfang Zhang, Masako Yudasaka, Eijiro Miyako*, “Physicochemically functionalized carbon nanohorns for multi-dimensional cancer elimination” *Carbon* **97**, 45-53 (2016).

8) Svetlana A. Chechetka, Benoit Pichon, Minfang Zhang, Masako Yudasaka, Sylvie Bégin-Colin, Alberto Bianco, Eijiro Miyako*, “Multifunctional carbon nanohorn complexes for cancer treatment” *Chem. Asian J.* **10**, 160-165 (2015).

9) Eijiro Miyako*, Julie Russier, Matteo Mauro, Cristina Cebrian, Hiromu Yawo, Cécilia Ménard-Moyon, James A. Hutchison, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Luisa De Cola, Alberto Bianco*, “Photofunctional nanomodulators for bioexcitation” *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 13121-13125 (2014).

10) Eijiro Miyako*, Takushi Sugino, Toshiya Okazaki, Alberto Bianco, Masako

Yudasaka, Sumio Iijima, "Self-assembled carbon nanotube honeycomb networks using a butterfly wing template as a multifunctional nanobiohybrid" *ACS Nano* 7, 8736-8742 (2013).

[学会発表] (計 22 件)

[招待・依頼講演 学会・国際]

1) **Ei jiro Miyako**, Photothermal property of nanocarbon complexes for nanobiotechnological applications, E-MRS 2014 SPRING MEETING, Lille, France, 2014/05/29

2) **Ei jiro Miyako**, Photothermal conversion of functional nanocarbons for biotechnological applications, NT15, 名古屋, 2015/06/28

[招待・依頼講演 学会・国内]

1) **都 英次郎**, Development of Functional Nanocarbon Complex for Photothermal Technology, 第 23 回日本 MRS 年次大会, 横浜, 2013/12/09

[招待・依頼講演 非学会・国際]

1) **Ei jiro Miyako**, Light-driven functional nanocarbon complexes for nanobiotechnological applications, MANA セミナー, つくば, 2014/02/07

[招待・依頼講演 非学会・国内]

1) **都 英次郎**, ナノカーボン材料の光発熱特性, ナノカーボンセミナー, 東京, 2013/12/13

2) **都 英次郎**, 細胞機能制御のための光駆動ナノモジュレーターの開発, 第 14 回 LS-BT 合同研究発表会, つくば, 2014/02/03

3) **都 英次郎**, カーボンナノチューブを医療に生かす ~光熱発電素子の開発~, 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014, 東京, 2014/10/15

[口頭発表 国際]

1) **Ei jiro Miyako**, Functional Nanocarbon Composites for Nanobiotechnology, NIMS Conference 2014, つくば, 2014/07/02

2) **Ei jiro Miyako**, Julie Russier, Matteo Mauro, Cristina Cebrian, Hiromu Yawo, Cécilia Ménard-Moyon, James A. Hutchison, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Luisa De Cola, Alberto Bianco, Photofunctional nanomodulators for spatiotemporal bioexcitation, 第 47 回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム, 名古屋, 2014/09/03

3) **Ei jiro Miyako**, Photothermal property of

nanocarbon complexes for nanobiotechnological applications, The 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC2014), つくば, 2014/12/05

4) **Ei jiro Miyako**, Photofunctional nanomodulators for bioexcitation, Pacificchem 2015, Honolulu, 2015/12/16

[口頭発表 国内]

1) **都 英次郎**, 生体内で発電できる光熱発電素子の開発, つくば医工連携フォーラム 2014, つくば, 2014/01/28

2) **都 英次郎**, Development of Functional Nanocarbon Complex for Nanobiotechnology, LS-BT 合同研究発表会, つくば, 2014/02/18

3) **都 英次郎**, ナノバイオテクノロジーのための光で発熱する機能性ナノカーボン高分子複合材料の創製, 日本化学会第 94 春季年会 (2014), 名古屋, 2014/03/28

4) **都 英次郎**, Light-driven functional nanocarbons for nanobiotechnological applications, ナノカーボンバイオシンポジウム, 名古屋, 2014/09/02

5) **都 英次郎**, カーボンナノチューブ-リポソーム複合体による分子伝送システム, 第 2 回 ナノカーボンバイオシンポジウム, 東京, 2015/02/20

8) **都 英次郎**, Chechetka Svetlana, Benoit Pichon, 張 民芳, 湯田坂 雅子, Sylvie Bégin-Colin, Alberto Bianco, Multifunctional carbon nanohorn complexes for cancer treatment, 第 48 回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム, 東京, 2015/02/21

9) **都 英次郎**, カーボンナノチューブ-リポソーム超分子複合体による分子伝送システム, ナノ学会第 13 回大会, 仙台, 2015/05/11

10) **都 英次郎**, バイオセンシングのためのカーボンナノチューブ-モルフォ翅複合材料の創製, 第 3 回 ナノカーボンバイオシンポジウム, 北九州国際会議場, 2015/09/06

11) **都 英次郎**, Chechetka Svetlana, 戸井 基道, 弓場 英司, 河野 健司, Control of bioreactions in living organisms by carbon nanotube supramolecular nanohybrids, 第 49 回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン 総合シンポジウム, 北九州国際会議場, 2015/09/07

12) **都 英次郎**, Chechetka Svetlana, 張 民芳, 湯田坂 雅子, Functional carbon

nanohorn complexes for multi-dimensional cancer elimination, 第4回 ナノカーボンバイオシンポジウム, 東京, 2016/02/19

14) **都 英次郎**, Chechetka Svetlana, 張 民芳, 湯田坂 雅子, 多次元ガン治療のための機能性カーボンナノホーンの開発, 第50回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム, 東京, 2016/02/20

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称: ナノカーボン高分子複合体の製造方法及び該方法で製造されたナノカーボン高分子複合体

発明者: 張民芳、楊梅、湯田坂雅子、都英次郎、国岡正雄

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2014-003358

出願年月日: 2014/01/10

国内外の別: 国内

名称: ナノカーボン高分子複合体の製造方法及び該方法で製造されたナノカーボン高分子複合体

発明者: 張民芳、楊梅、湯田坂雅子、都英次郎、国岡正雄

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2014-038668 (特願 2014-003358 2014/01/10)

出願年月日: 2014/02/28

国内外の別: 国内

○取得状況 (計6件)

名称: カーボンナノホーンの分散方法

発明者: 都英次郎、長田英也、平野研、廣津孝弘

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特 5212954

取得年月日: 2013/03/08

国内外の別: 国内

名称: カーボンナノチューブが分散した光硬化性樹脂コンポジット、並びに当該光硬化性樹脂コンポジット及びイオン液体からなる積層体

発明者: 都英次郎、伊藤民武、廣津孝弘

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特 5288351

取得年月日: 2013/06/14

国内外の別: 国内

名称: カーボンナノチューブの分散方法

発明者: 都英次郎、長田英也、平野研、廣津孝弘

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特 5339379

取得年月日: 2013/08/16

国内外の別: 国内

名称: カーボンナノチューブが分散した光硬化性樹脂コンポジット、並びに当該光硬化性樹脂コンポジット及びイオン液体からなる積層体

発明者: 都英次郎、伊藤民武、廣津孝弘

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特 5515065

取得年月日: 2014/04/11

国内外の別: 国内

名称: カーボンナノチューブの分散体およびその製造方法

発明者: 都英次郎

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特 5550075

取得年月日: 2014/05/30

国内外の別: 国内

名称: 光熱発電素子及び該光熱発電素子を用いた光熱発電方法

発明者: 都英次郎、細川千絵、小島正己、湯田坂雅子、舟橋良次、大石勲、萩原義久、七里元督、高島瑞紀、吉田康一

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特 5652767

取得年月日: 2014/11/28

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

雑誌論文2に関して:

・Very Important Paper に選定
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201602453/abstract>)

雑誌論文4に関して:

・Hot Paper に選定
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chem.201504958/abstract>)
・インサイドカバーに選定
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chem.201600559/full>)

雑誌論文6に関して:

・産業技術総合研究所プレスリリース
(http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2015/pr20150708/pr20150708.html)

-)
- ・つくばサイエンスニュース (WEB) 2015. 07. 08
 - ・J-Net21[中小企業ビジネス支援サイト] (WEB) 2015. 07. 09
 - ・サイエンス - 財経新聞 (WEB) 2015. 07. 10
 - ・ライブドアニュース (WEB) 2015. 07. 10
 - ・ナノテクジャパン (Web) 2015. 07. 17
 - ・日刊工業新聞 2015. 07. 21 朝刊 14 面 (WEB 日刊工業新聞 (2015. 07. 21))
 - ・化学工業日報 2015. 07. 30 朝刊 5 面
 - ・科学新聞 朝刊 6 面 2015. 07. 31
 - ・株式会社科学新聞社 (WEB) 2015. 08. 04

雑誌論文 9 に関して :

- ・産業技術総合研究所プレスリリース
(http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2014/pr20141027_3/pr20141027_3.html)
- ・CNRS プレスリリース
(http://www.cnrs.fr/inc/communication/direct_labos/bianco2.htm)
- ・日刊工業新聞 2015. 11. 20 朝刊 26 面 (WEB 日刊工業新聞 (2015. 11. 20))
- ・医療機器ニュース (WEB) 2014. 11. 20
- ・つくばサイエンスニュース (WEB) 2014. 10. 27

雑誌論文 10 に関して :

- ・アメリカ化学会プレスリリース
(<http://www.acs.org/content/acs/en/pressroom/presspacs/2013/acs-presspac-august-28-2013/butterfly-wings-plus-carbon-nanotubes-equal-new-nanobiocomposite.html>)
- ・New Scientist
(<https://www.newscientist.com/article/dn24129-butterfly-wing-electronics-converts-light-to-heat/>)
- ・Science Daily
(<https://www.sciencedaily.com/releases/2013/08/130828103448.htm>)
- ・Nanowerk
(<http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=23793.php>)
- ・・・他多数

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都 英次郎 (MIYAKO EIJIRO)

研究者番号 : 70443231

国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・主任研究員

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :