

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K13309

研究課題名(和文)機能性ナノカーボンを活用した次世代止血材料の開発

研究課題名(英文)Hemostatic material based on functional nanocarbon complexes

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：血友病は、血液凝固因子の不足により血液の凝固異常が起きる遺伝病であり、出血性ショックによる死傷の危険性が高い。カーボンナノチューブ(CNT)は、その優れた物理的・化学的特性によって次世代材料としての様々な応用が世界中で期待されている。本研究では、最終構想に血友病モデルマウスの出血を光熱によって止血が可能なCNT複合体の開発を掲げている。本最終構想を達成するために、コア技術となるリポソーム-CNT複合体の開発を目指した。また、当該リポソーム-CNT複合体の性能を評価するために、モデル生物として線虫を用い、近赤外レーザー照射に伴う生体反応を調査した。

研究成果の概要(英文)：We describe a carbon nanotube-liposome-based supramolecular nanohybrid capable of permeation through cells with high biocompatibility. The nanohybrid can be loaded with a variety of functional molecules and is structurally controlled by near-infrared laser irradiation for the release of molecules from the nanohybrids in a targeted manner via microscopy. We implemented the controlled release of molecules from nanohybrids and demonstrated their efficacy in remote regulation of photo-induced nanohybrid functions. As a proof of principle, nanohybrids loaded with amiloride were successfully used in spatiotemporal blocking of targeted amiloride-sensitive mechanosensory neurons in living *Caenorhabditis elegans*. Our prototype could inspire new designs with biomimetic parasitism and symbiosis and biologically active nanorobots for higher-level manipulation of organisms.

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 止血材料 近赤外光

1. 研究開始当初の背景

血友病における効果的な体内止血法の開発は急務である。現在、出血に対する処置は、血液凝固因子を含む製剤の投与が主流である。しかし、非加熱製剤による薬害エイズ事件やC型肝炎訴訟、製剤自身のアレルギー反応によるアナフィラキシーショック等が社会問題となっている。本研究目的は、生体透過性の高い近赤外領域 (700~1200 nm) のレーザー光線により容易に発熱するナノカーボンの特性 (光発熱特性) を、ペプチドナノファイバーによって水溶液をゲル化可能な酵素反応に組み込むことで、生体内の狙った場所でのピンポイント止血が可能な新しい血液凝固技術を開発することである。本研究は、血友病の体内出血に対する“光熱”による安心・安全な止血を可能にする普遍的技術の基礎になる。

2. 研究の目的

血友病は、血液凝固因子の不足により血液の凝固異常が起きる遺伝病であり、出血性ショックによる死傷の危険性が高い。重篤化する出血様式は生体深部出血が中心で、有効な治療法は確立されていない。一方、カーボンナノチューブ (CNT) は、その優れた物理的・化学的特性によって次世代材料としての様々な応用が世界中で期待されている。本研究では、酵素反応を光熱で制御し、生体深部における血液凝固を惹起可能な新しい生体内ナノ止血技術を開発する。

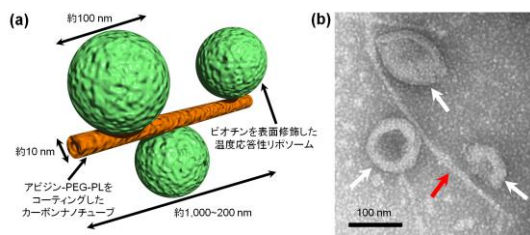
3. 研究の方法

本研究では、最終構想に血友病モデルマウスの出血を光熱によって止血が可能なナノカーボン複合体の開発を掲げている。本最終構想を達成するために、まずは、コア技術となるリポソーム-CNT 複合体の開発を目指した。また、当該リポソーム-CNT 複合体の性能を評価するために、モデル生物として線虫を用い、近赤外レーザー照射に伴う生体反応を調査した。また、リポソーム-CNT 複合体の線虫に与える影響を検証した。

4. 研究成果

CNT は、そのまま水中に分散させようとすると、強い分子間の相互作用により束状や粒状に凝集してしまう。産総研ではCNTの用途に応じた分散性向上のための研究開発が行われているが、本研究では、CNTの光発熱特性を最大限に利用し、かつ、リポソームと組み合わせ分子複合体を作製するために、アビジン、ポリエチレングリコール (PEG)、リン脂質 (PL) からなる分子 (アビジン-PEG-PL) を単層CNT (SWCNT) の表面にコーティングし、水中へ分散させた。一方、リポソームには、温度感受性 (42℃付近で構造変化) を与えるため、各種リン脂質とコレステロールの配合量を調整のうえ、アビジンと強く結合できるビオチンを表面に結合させた。そして、ア

ビジンとビオチンの結合を利用した自己組織化により、CNTとリポソームからなる分子複合体を作製した (概念図)。この分子複合体は、近赤外領域の光エネルギーを与えると内包している分子 (薬物など) を放出し、この薬物により細胞機能を制御できる。



(a) CNTとリポソームからなるナノ複合体の概念図と(b) ナノ複合体の電子顕微鏡写真

白い矢印はリポソーム、赤い矢印はCNTを示す

およそ1000個の細胞からなる線虫を用いて、今回開発したCNTとリポソームの複合分子体の運動抑制効果を検証した (図1(a))。温度感受性リポソームに、ナトリウムチャンネル阻害剤であるアミロライドを内包させたナノロボットを水溶液に分散させ、線虫の体内にマイクロインジェクターを用いて注入した。近赤外レーザー光 (波長808nm) をアミロライド感受性のナトリウムチャンネルが存在する尾部に照射したところ、素早く動いていた線虫の動きが徐々に遅くなり、最終的には動きを完全に止めた (図1(b))。これは、近赤外レーザー光を照射すると、CNTの光発熱特性によって、CNT近くの温度が急激に上昇して温度感受性リポソームの構造が変化し、内部のアミロライドが放出され、線虫のアミロライド感受性チャンネルタンパク質が阻害されたと考えられる。なお、アミロライドを内包した温度感受性リポソームだけを注入した場合は、近赤外レーザーを照射しても、アミロライドの放出や線虫の運動障害が起こらなかった。

次に、ヒト子宮頸部類上皮がん細胞 (HeLa細胞) と線虫を用いて、今回開発したナノロボットの細胞毒性と生体適合性を評価した。まず、ナノ複合体、CNT、リポソームのそれぞれを分散させた3種の培養液をHeLa細胞に投与し、WST-1法により4時間後と24時間後に生きているHeLa細胞の割合を測定した (図2(a))。この結果、いずれの場合も投与による細胞生存率の低下は見られなかった。また、これらの物質を線虫体内に投与し、線虫のライフサイクルにあたる5日間にわたって生体適合性評価 (生死判定、産卵力判定) を行ったところ、いずれの検査でもナノ複合体とリポソームが線虫に与える影響は極めて少なかった (図2(b))。なお、CNTを単体で線虫体内に投与した場合には、線虫生存率が60%となったが、これは線虫体内においてCNTが異物とみなされる通常の生体応答と考えられ、CNTの表面に結合したリポソームが生体適合性をさらに向上させることが明らかとなった。

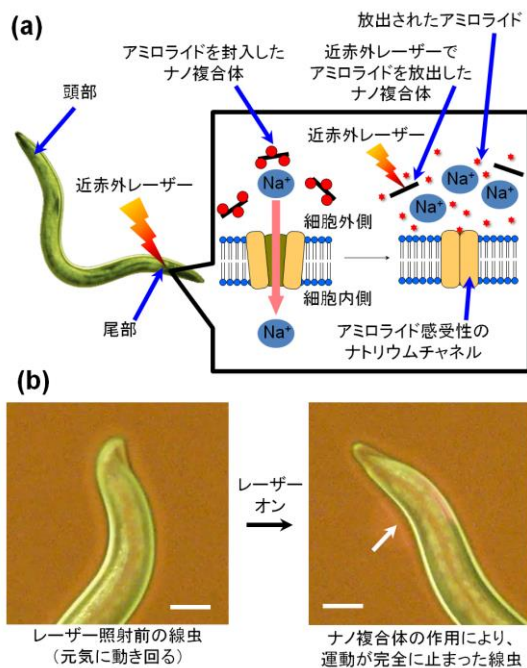


図1 ナノロボットによる細胞機能制御の概念図(a)と線虫の運動抑制効果(b)
スケールバー：50 μ m

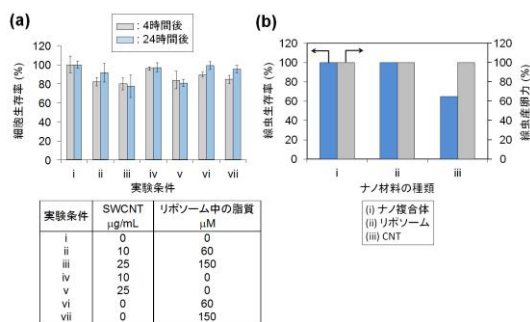


図2 ナノ複合体の細胞毒性(a)と生体適合性(b)

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9件)

- 1) Svetlana A. Chechetka, Eihiro Miyako*, “Optical regulation of carbon nanodots by chemical functionalization” *Chem. Lett.* in press (2016).
- 2) Svetlana A. Chechetka, Eihiro Miyako*, “Bioinspired polyaniline-functional natural hairs for pollen protection” *ChemistrySelect* **1**, 1061-1065 (2016).
- 3) Svetlana A. Chechetka, Eiji Yuba, Kenji Kono, Masako Yudasaka, Alberto Bianco, Eihiro Miyako*, “Magnetically- and near infrared light-powered supramolecular nanotransporters for the remote control of enzymatic reactions” *Angew. Chem. Int. Ed.* in press (2016).
- 4) Svetlana A. Chechetka, Eihiro Miyako*,

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

- 5) Wuxiao Ding*, Svetlana A. Chechetka, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, Masaru Aoyagi, Hiroyuki Minamikawa, Eihiro Miyako*, “Lipid nanotube tailored fabrication of unique shaped polydopamine nanofibers as photothermal converters” *Chem. Eur. J.* **22**, 4345-4350 (2016).
 - 6) Eihiro 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).
 - 7) Eihiro 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).
 - 8) Svetlana A. Chechetka, Minfang Zhang, Masako Yudasaka, Eihiro Miyako*, “Physicochemically functionalized carbon nanohorns for multi-dimensional cancer elimination” *Carbon* **97**, 45-53 (2016).
 - 9) Svetlana A. Chechetka, Benoit Pichon, Minfang Zhang, Masako Yudasaka, Sylvie Bégin-Colin, Alberto Bianco, Eihiro Miyako*, “Multifunctional carbon nanohorn complexes for cancer treatment” *Chem. Asian J.* **10**, 160-165 (2015).
- [学会発表] (計7件)
[招待・依頼講演 学会・国際]
- 1) Eihiro Miyako, Photothermal conversion of functional nanocarbons for biotechnological applications, NT15, 名古屋、2015/06/28
- [口頭発表 国際]
- 2) Eihiro Miyako, Photofunctional nanomodulators for bioexcitation, Pacificchem 2015, Honolulu, 2015/12/16
- [口頭発表 国内]
- 1) 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

2) **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

3) **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

4) **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

5) **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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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 - 財經新聞 (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

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：