

令和元年6月13日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02085

研究課題名(和文)カーボンナノチューブによる褐色脂肪組織の近赤外光造影

研究課題名(英文)Near infrared fluorescent imaging of brown adipose tissues with carbon nanotubes

研究代表者

湯田坂 雅子 (Yudasaka, Masako)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・招聘研究員

研究者番号：70159226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近赤外(NIR)蛍光を発する単層カーボンナノチューブ(CNT)の表面を適切に被覆し、NIR蛍光造影剤として用いると、マウスの褐色脂肪組織(BAT)の選択的造影が可能であり、さらに、外的刺激により起こるBATの状態変化をモニターできることを明らかにした。また、近赤外蛍光顕微鏡によりCNTのBAT内での細胞レベルでの分布を明らかにしたところ、絶食させたマウスのBATでは、CNTの血管外漏出が認められた。遺伝子解析から絶食時にはBATでタンパク質分解酵素増産され、それにより細胞外マトリックスを形成するコラーゲンが脆弱化し、血管基底膜も脆弱化し血管外漏洩が促進されたと推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪を燃焼させる褐色脂肪組織(BAT)は、肥満や糖尿病などのメタボリックシンドロームのための新規予防・治療法開発の標的組織として近年注目されている。これまでBATに対しては、簡便な可視化手段がないという問題があったが、本研究では、近赤外(NIR)蛍光造影剤として知られている単層カーボンナノチューブ(CNT)がその表面被覆を制御することで優れたBAT選択的な蛍光造影剤になることを明らかにした。また、NIR蛍光顕微鏡を用いたCNT分布の細胞レベルでの観察により、未知なBAT機能を明らかにできた。こうした成果は、CNTを用いたBAT造影がBAT研究の発展に寄与することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：This study has revealed that near infrared (NIR) fluorescence imaging with single-walled carbon nanotubes (CNTs) can selectively image brown adipose tissue (BAT) and monitor the BAT changes in mice induced by the external stimulation when the surfaces of CNTs are properly coated. Furthermore, it has been shown that the NIR fluorescence microscopy enables the observation of CNT distribution in cellular levels, revealing that the BAT vascular permeability is enhanced under fasting in mice. Gene analysis indicated that protease was upregulated under the fasting, which suggested that basal membranes of capillary/arteriolar walls were degenerated as demonstrated by the disarranged or broken collagen bands in the extracellular matrix.

研究分野：材料化学、ナノバイオ科学

キーワード：カーボンナノチューブ 褐色脂肪組織 近赤外蛍光造影剤 イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪組織(Brown Adipose Tissue; BAT)では、褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜に発現したUCP1 (uncoupling protein 1) が脱共役呼吸により、ATPを経ずに脂肪酸の化学エネルギーを熱に変換するというメカニズムにより、体熱産生している。BATは肩甲骨間部・頸部・腋窩部などに局在し、密な毛細血管網と、BA細胞が豊富に含有するミトコンドリアにより肉眼的に褐色を呈する。疫学研究からBATが「肥満防止」と「代謝改善」に寄与することが示唆され、メタボリックシンドロームの新規予防・治療開発の標的組織として注目されている。

BAT研究の推進にはBATの体内分布を非侵襲的に可視化する技術の開発が鍵となるが、本研究開始時点において、簡便な造影手法はなかった。核医学検査ではPET-CT(Positron Emission Tomography[陽電子放出断層撮影]とComputed Tomography[コンピュータ断層映像法]を融合させた検査)によりBATを可視化しているが、感度や選択性が低いことに加え、経済的課題(高額医療機器を要する)や倫理的課題(BAT検出率が高い若年ボランティアへの放射線被曝)がある。また、BATを光学的にイメージングするために800 nm付近で近赤外(NIR)発光する色素を用いる手法も提案されていたが、BAT造影の精度と選択性は低かった。他方、単層カーボンナノチューブ(CNT)は、近赤外(NIR)光のなかでも生体透過性がよい波長1000 nm以上の光を発光し、マウス体内の血管が鮮明に造影できることが知られていた。そこで、本研究ではCNTを用いてBATを蛍光造影することの価値は高いと考え、CNTをBAT造影剤として開発研究することにした。CNTは、他の蛍光剤と異なり退色しにくく、組織に留まる時間が長いので、BAT内のCNT分布を細胞レベルで微視的観察することが可能であるが、それに必要なNIR蛍光顕微鏡が十分に開発されていなかったため、その開発にも取り組んだ。

2. 研究の目的

動物実験用に、CNTを用いたBAT造影剤を作製し、BATの選択的造影やBATに反映される身体状態の変化をモニターできるようにし、CNTのBAT造影剤としての優れた機能を示すことを目的とした。また、CNTがBATに集積するメカニズムを解析し、CNTの造影剤として発展性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

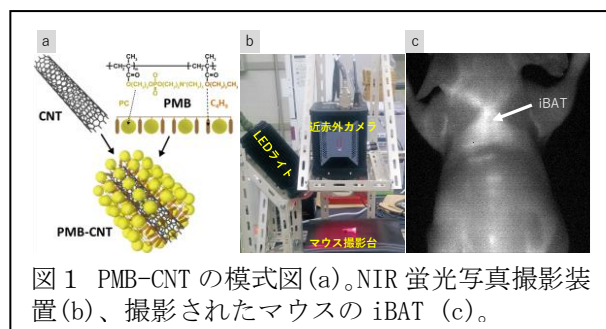
CNTは水溶液に分散して用いたが、その際のCNT表面被覆材には、CNTの高い発光強度を維持するために必要な単一分散が可能で、かつ、生体親和性が高いものを用いた。得られたCNT分散液をマウスに静脈内投与し、マウス全身をNIR蛍光撮影し、BAT選択的造影を確認した。実用化に向けた基盤を築くため、CNTのBATへの選択的集積とそのメカニズムを明らかにした。さらに、マウスの身体状態を反映したBATの変化がCNTを用いてモニターできることを示し、身体状態を反映するメカニズムをも検討した。

4. 研究成果

(1) CNTによるBAT選択的NIR蛍光造影¹⁾

MPC(2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)ポリマーの一種であるpoly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate; PMB)は、ホスホリルコリン(PC)基を持つため生体親和性が高く、免疫系細胞に認識されにくいという特徴を持つ。

PMBは、CNTの界面活性剤として用いられたことはなかったが、PMB被覆したCNT(PMB-CNT)は、水中での分散安定性が高く、細胞実験においてはマクロファージによる被食率が低く、生体応用に適した特性を備えていた(未発表)。本研究では、PMB-CNT(図1a)をマウス(ヌードマウス: BALB/cAJ1-nu/nu、メス)に尾静脈投与した後、自作の撮像システム(図1b)を用いて、730 nmの高輝度LED光をマウス全身に照射し、波長1000 nm以上の蛍光像をNIRカメラにて撮影した。その結果、肩甲骨間部にあるBAT(iBAT)(図1c)や他の部位のBATが明るく造影されることがわかった。また、白色脂肪組織ではベージュ細胞(BA細胞と同様に熱産生する)の混在量に応じてPMB-CNTにより明るく造影されることも明らかになった。



その結果、肩甲骨間部にあるBAT(iBAT)(図1c)や他の部位のBATが明るく造影されることがわかった。また、白色脂肪組織ではベージュ細胞(BA細胞と同様に熱産生する)の混在量に応じてPMB-CNTにより明るく造影されることも明らかになった。

PMB-CNTがBATに集積する理由を明らかにするために、PMB-CNTのBAT内での分布を観察した。観察には空間分解能が数マイクロメートル程度の自作NIR蛍光顕微鏡を使用した(図2a)。PMB-CNT投与3時間後に得たマウスのiBATの組織切片に対して、CD34を用いて毛細血管内皮細胞を染色し、蛍光像(図2b)を観察した。CNTのNIR蛍光像(図2c)と重ね合わせたところ、毛細血管とCNTの分布がよく一致していた(図2d)。組織の透過電子顕微鏡観察では、CNTが毛細血管内皮細胞に内包されているのが確認された。従って、PMB-CNTはiBAT毛細血管の内皮細胞に集積していると考えられた。

PMBの特徴からして、PMB-CNTが毛細血管内皮細胞に捕らえられることは考えにくい。そこで、

疎水性の CNT をコアとして親水性の PC が被覆している構造がリポプロテインの構造に類似していることに着目し、血液中からアポリポプロテ

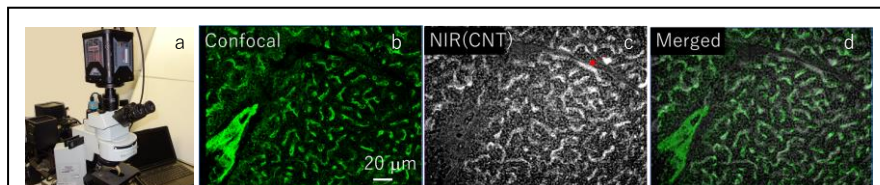


図2 自作 NIR 蛍光顕微鏡(a)、CD34 染色した iBAT の共焦点レーザー顕微鏡写真(b)、NIR 蛍光顕微鏡写真(c)、(b)と(c)の重ね合わせ写真(d)。

インが PMB-CNT に移行する可能性があると考えた。実際に、血清中の ApoB や ApoE が PMB-CNT に移行することが電気泳動実験などにより認められた。PMB-CNT は血中で ApoB/PMB-CNT や ApoE/PMB-CNT に変化し、BAT の毛細血管内皮細胞に発現している ApoB や ApoE の受容体に捕獲され毛細血管内皮細胞に取り込まれると推定された(図 3)。

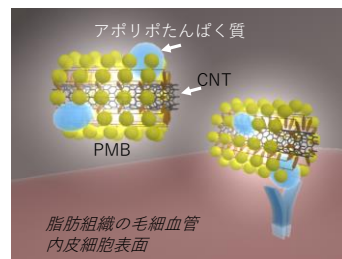


図3 BAT 毛細血管内皮細胞のアポリポタンパク受容体による ApoB(または ApoE)/PMB-CNT の捕捉を示す概念図。

(2) 絶食によるマウス BAT の血管壁透過性亢進²⁾

リン脂質ポリエチレングリコール (PLPEG) で被覆した CNT (PLPEG-CNT) は水中での分散が良く PEG 基の生体親和性が高いためバイオ関連研究においてよく使われている。PLPEG-CNT(図 4a)をマウス(BALB/cAJ1-nu/nu、メス)に尾静脈内投与し NIR 蛍光造影すると、正常なマウスでは BAT が明るく造影されることはない(図 4b)。しかし、絶食(18-20 時間)させたマウスでは、PLPEG-CNT 投与後、BAT が明るく造影されることを発見した(図 4c)。これは、絶食により BAT に変化が起きており、PLPEG-CNT が蓄積しやすくなったことを示唆している。

絶食がもたらす BAT の変化としては、脂肪細胞内にある脂肪滴のサイズや数の減少が知られているが、そうしたことで BAT での PLPEG-CNT 蓄積量増加は説明しにくいので詳細を検討した。核染色(ケルンエヒトロート染色)した組織の可視光透過顕微鏡像と NIR 蛍光顕微鏡像を重ね合わせると、絶食したマウスでは毛細血管や細動脈の外に CNT が漏出しているのが認められた(図 5)。この現象は、絶食により BAT では血管壁透過性が亢進することを示しているため、組織を構成するのに重要な役割を担っている細胞外結合組織の成分であるコラーゲンに異常が発生したと推定し、タイプ III コラーゲンを見るのに適している鍍銀染色を施して組織観察を行った。その結果、絶食マウスのコラーゲン線維は変形し乱れていて、脆弱化している(図 6A)ことが判明した。更に、透過電子顕微鏡観察では、コラーゲン線維の乱れとともに細胞間距離の増加も認められた(図 6B)。こうした傾向から、絶食による BAT の血管壁透過性亢進は、細胞外マトリックスとともに血管基底膜も脆弱化したことによると考えられる。

絶食による BAT でのコラーゲン線維脆弱化は本研究により始めて見出された現象であり、そのメカニズムは不明であった。そこで、脆弱化が起こるメカニズムを解明するために遺伝子解析を行ったところ、タンパク質分解酵素の一つ(matrix metalloproteinase (MMP) 3)の産生亢進が認められた。従って、絶食による BAT でのコラーゲン線維の脆弱化は、タンパク質分解酵素の産生増加が一因であると推定された。

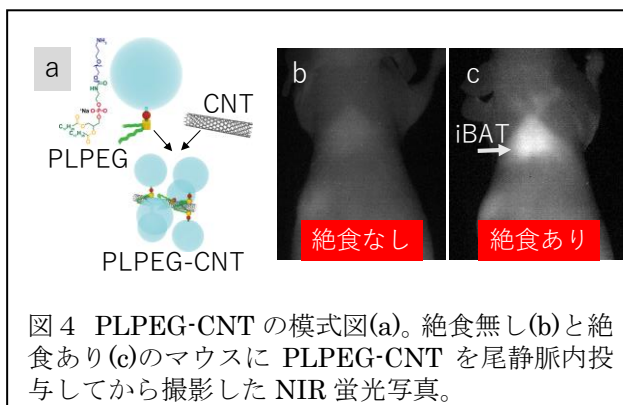


図4 PLPEG-CNT の模式図(a)。絶食無し(b)と絶食あり(c)のマウスに PLPEG-CNT を尾静脈内投与してから撮影した NIR 蛍光写真。

(3) 寒冷刺激によるマウス BAT の血管壁漏出亢進

マウス(BALB/cAJ1-nu/nu、メス)を寒冷刺激(10°C、19 時間)し、PLPEG-CNT を尾静脈投与した後に NIR 蛍光全身撮影や iBAT を採取し組織観察した。寒冷刺激による体重減少や体温低下は認められなかったが、iBAT の比重増加と脂肪滴サイズの縮小は認められ、寒冷刺激は適切に効いていたと判断された。PLPEG-CNT 投与後の全身撮影では寒冷刺激マウスの iBAT は正常マウスの iBAT に比べて明るく、蓄積した PLPEG-CNT 量は寒冷刺激マウスのほうが多いと推定された。iBAT の NIR 蛍光顕微鏡観察では、血管外に CNT の蛍光が多く観察された。さらに、寒冷刺激マウスの iBAT を鍍銀染色して観察したところコラーゲン線維の脆弱化が認められた。従って、寒冷刺激によりコラーゲンが脆弱化し、それにより血管壁透過性が亢進したと推定された。

(4)まとめ

CNT を NIR 蛍光プローブとして用いたマウス全身造影では、PMB で被覆した CNT を尾静脈内投与することにより BAT 選択的造影が可能であった。マウス体内の各所にある BAT を精密に鮮明に造影できる点は、従来の蛍光プローブにくらべて優れていた。血中の ApoB や ApoE が PMB-CNT に移行し、BAT 選択的集積のためのリガンドとして機能したという点は、選択的集積が必須な薬剤送達の研究の発展に役立つかもしれない。

CNT の被覆剤に PLPEG を用いた PLPEG-CNT の BAT 造影能は正常マウスに対しては低かったが、絶食や寒冷といった刺激により BAT の活動が活発になると高くなった。これは、BAT でのタンパク質分解酵素の産生亢進に起因するコラーゲン線維や血管基底膜の脆弱化により、血管壁透過性が亢進したことによると推定された。

こうした結果は、BAT での熱産生活性化を助けるために、燃料である脂肪などが血管壁から漏洩し直接 BA 細胞内に入るというバイパス的経路がありうることを示唆している。このバイパス的経路の出現は、体温維持のための BAT の未知な戦略の一つともみられ、今後詳細な検討が期待される。

(5) 今後の課題

CNT を NIR 蛍光プローブとしてマウスなどの動物実験に使用すると、全身造影により褐色脂肪組織のマクロな知見がえられ、さらにそれに加えて、組織観察においてミクロな知見も得られることが本研究により明らかとなった。また、脂肪組織に限らず、身体各所で起こる血管壁透過性亢進を伴うさまざまな疾病に対しても CNT は有用な NIR 蛍光プローブであると考えられ、疾病治療や予防の研究に広く役立つと期待される。

しかし、NIR 波長領域に対応したカメラや顕微鏡の開発は充分ではない。本研究では、いずれも自作の装置を用いたが、自作 NIR 蛍光顕微鏡には、共焦点顕微鏡のように深さを定めて像をとる機能がないため、像から高精度の情報を得るには限界があった。NIR 光を用いると、可視光を用いた場合に比べて、生体透過性が高く、自家発光と重ならないなどの優れた特徴により、バイオ研究において多くの成果をもたらすことが認識されつつあり、NIR 蛍光剤の開発も盛んになりつつある。今後、CNT やこれから開発される新たな NIR 蛍光剤を使ってバイオ研究を進展させるためには、NIR カメラや NIR 蛍光顕微鏡の進化が期待される。

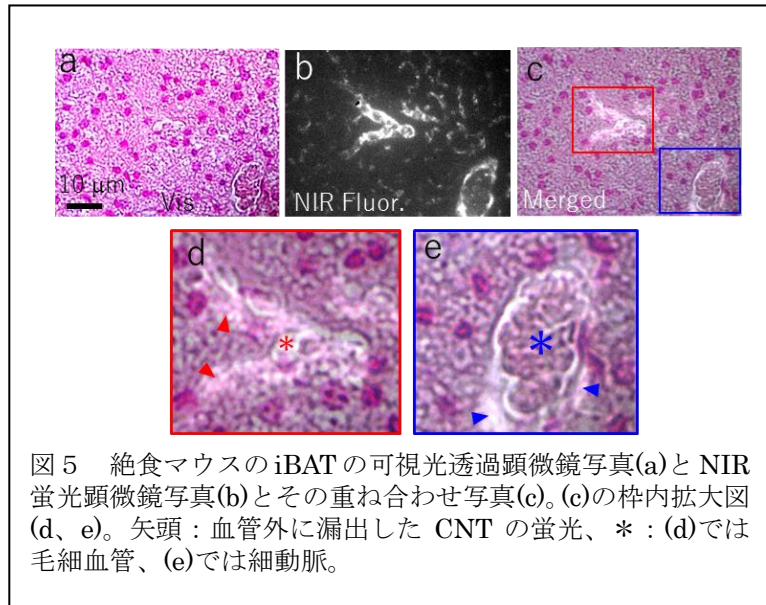


図5 絶食マウスの iBAT の可視光透過顕微鏡写真(a)と NIR 蛍光顕微鏡写真(b)とその重ね合わせ写真(c)。(c)の枠内拡大図(d、e)。矢頭：血管外に漏出した CNT の蛍光、*：(d)では毛細血管、(e)では細動脈。

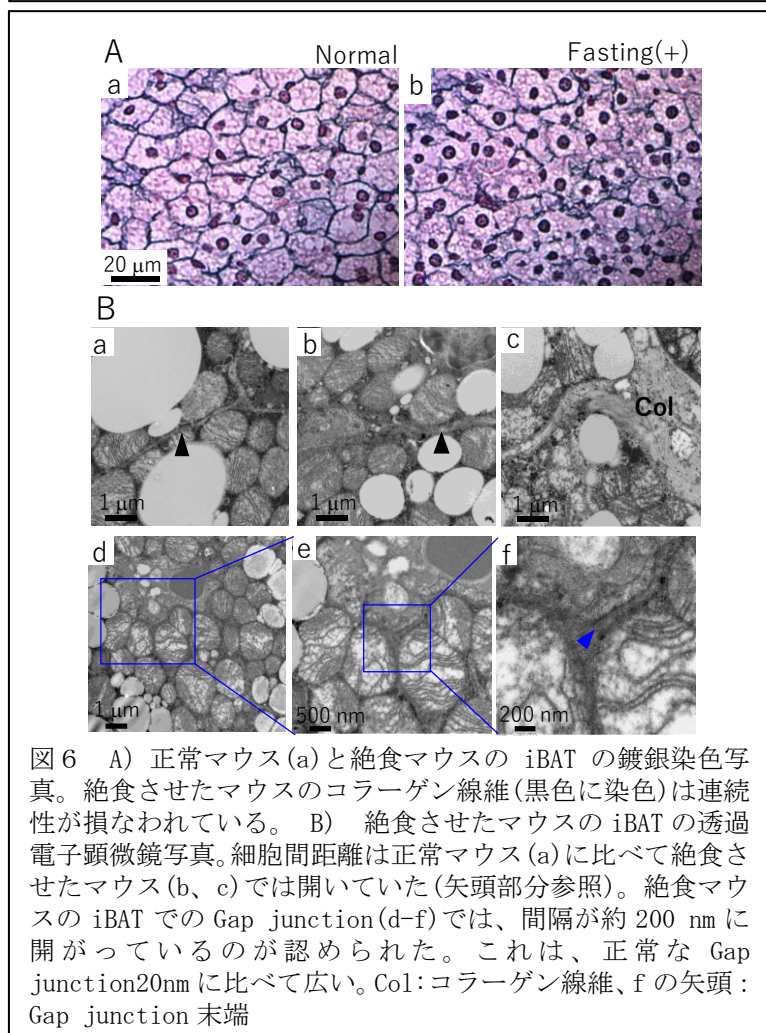


図6 A) 正常マウス(a)と絶食マウスの iBAT の鍍銀染色写真。絶食させたマウスのコラーゲン線維(黒色に染色)は連続性が損なわれている。B) 絶食させたマウスの iBAT の透過電子顕微鏡写真。細胞間距離は正常マウス(a)に比べて絶食させたマウス(b、c)では開いていた(矢頭部分参照)。絶食マウスの iBAT での Gap junction(d-f)では、間隔が約 200 nm に開いているのが認められた。これは、正常な Gap junction20nm に比べて広い。Col:コラーゲン線維、f の矢頭: Gap junction 末端

<引用文献>

- 1) M. Yudasaka, et. al. "Near-Infrared Photoluminescent Carbon Nanotubes for Imaging of Brown Fat". Sci. Reports. (2017) 7:44760, DOI: 10.1038/srep44760
- 2) M. Yudasaka, et al. "Fasting-dependent Vascular Permeability Enhancement in Brown Adipose Tissues Evidenced by Using Carbon Nanotubes as Fluorescent Probes", Sci. Reports. (2018) 8: 14446, DOI:10.1038/s41598-018-32758-8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

① Masako Yudasaka, Yohei Yomogida, Minfang Zhang, Masako Nakahara, Norihiko Kobayashi, Takeshi Tanaka, Yuko Okamatsu-Ogura, Kumiko Saeki, Hikomichi Kataura. Fasting-dependent Vascular Permeability Enhancement in Brown Adipose Tissues Evidenced by Using Carbon Nanotubes as Fluorescent Probes. Sci. Reports. 査読有、8巻、2018、記事番号14446
DOI:10.1038/s41598-018-32758-8

② Masako Yudasaka, Yohei Yomogida, Minfang Zhang, Takeshi Tanaka, Masako Nakahara, Norihiko Kobayashi, Yuko Okamatsu-Ogura, Ken Machida, Kazuhiko Ishihara, Kumiko Saeki, Hikomichi Kataura. Near-Infrared Photoluminescent Carbon Nanotubes for Imaging of Brown Fat. Sci. Reports. 査読有、7巻、2017、記事番号44760
DOI: 10.1038/srep44760

〔学会発表〕(計10件)

① Masako Yudasaka, Yohei Yomogida, Minfang Zhang, Takeshi Tanaka, Masako Nakahara, Norihiko Kobayashi, Yuko Okamatsu-Ogura, Ken Machida, Kazuhiko Ishihara, Kumiko Saeki, Hikomichi Kataura. Near-Infrared Photoluminescent Carbon Nanotubes for Imaging of Brown Fat. 第53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、2017年9月13-15日、京都大学 宇治 おうばくプラザ、宇治。

② Masako Yudasaka, Yohei Yomogida, Minfang Zhang, Takeshi Tanaka, Masako Nakahara, Norihiko Kobayashi, Yuko Okamatsu-Ogura, Ken Machida, Kazuhiko Ishihara, Kumiko Saeki, Hikomichi Kataura. Near-Infrared Photoluminescent Carbon Nanotubes for Imaging of Brown Fat. 11th International Symposium of Nanomedicine、2017年12月13-15日、東北大学 星陵オーデトリウム、仙台(招待講演)(国際学会)

③ 湯田坂雅子、蓬田洋平、張民芳、田中丈士、中原正子、小林徳彦、岡松優子、町田拳、石原一彦、佐伯久美子、片浦弘道、カーボンナノチューブの近赤外発光を利用した褐色脂肪造影、第34回DDS学会学術集会、2018年6月21-22日、長崎パブリックホール、長崎。

④ Masako Yudasaka, Near-Infrared Photoluminescent Carbon Nanotubes for Imaging Brown Adipose Tissue、第55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、2018年9月11-13日、東北大学理学研究科、青葉サイエンスホール、仙台(招待講演)

〔図書〕(計1件)

- ① 湯田坂雅子、佐伯久美子、日経バイオテック、バイオイメージング最前線、「カーボンナノチューブで、褐色脂肪を近赤外光撮影」2017、40

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

① 名称：単層カーボンナノチューブを含む熱産生脂肪組織造影剤

発明者：湯田坂雅子、蓬田陽平、張民芳、田中丈士、片浦弘道

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願2015-194606

出願年：2015年9月30日

国内外の別：国内

② 名称：単層カーボンナノチューブ

発明者：湯田坂雅子、蓬田陽平、張民芳、田中丈士、片浦弘道

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願2017-068481

出願年：2017年3月20日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

プレスリリース(2件)

① https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2017/pr20170321/pr20170321.html
2017/03/21, 脂肪を燃焼させる褐色脂肪組織を簡便な装置でリアルタイム可視化

② https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2018/pr20181011/pr20181011.html
2018/10/11, カーボンナノチューブで褐色脂肪組織内の異常を細胞レベルで検出

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：片浦弘道

ローマ字氏名：KATAURA, hiromichi

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所・

部局名：材料・化学領域

職名：首席研究員

研究者番号（8桁）：30194757

(2)研究分担者

研究分担者氏名：佐伯久美子

ローマ字氏名：SAEKI, kumiko

所属研究機関名：国立研究開発法人国立国際医療研究センター

部局名：疾患制御部・幹細胞試料開発研究室

職名：室長

研究者番号（8桁）：80322717

(3)研究分担者

研究分担者氏名：岡松優子

ローマ字氏名：OKAMATSU, yuko

所属研究機関名：北海道大学・獣医学研究院

部局名：獣医学研究院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90527178

(2)研究協力者

無し

※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。