

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18192

研究課題名（和文）生体ガスポンプ・プローブ法の開発と一酸化窒素拡散挙動と血管機能相関の可視化

研究課題名（英文）Bioactive gas pump-probe method elucidates the relationship of nitric oxide diffusion with vascular function

研究代表者

古川 修平（Furukawa, Shuhei）

京都大学・高等研究院・教授

研究者番号：90452276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内におけるNO産生と検出を同期させた「生体ガスポンプ・プローブ法」にむけた基礎技術の開発を目的とした。特に、金属ナノワイヤーを用いた細胞内視鏡技術とNO放出多孔性金属錯体を組み合わせたシステムを構築した。直径約100nmの一次元プラズモニック金属ナノワイヤーにより、表面増強ラマン散乱（RE-SERS）の遠隔励起が可能となり、この導波路を細胞内での遠隔分子放出に応用した。光応答性NO放出多孔性金属錯体（NOF-1）を用いて、遠隔操作で細胞内の特定場所にNOを放出する技術を開発した。実際にヒト平滑筋細胞内でNO放出を行い、蛍光プローブによる検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内で産生されるNOは、血管弛緩・拡張を惹起することが知られており、その効果を活用した治療薬への応用が期待されている。本研究では平滑筋細胞内へのNO放出と検出に成功した。今後NOをより汎用性の高い治療薬として活用するため、本技術を用いて治療部位でのNOガス拡散の時空間的挙動と血管機能の相関を解明し、必要最低限のNOの利用へとつなげることが可能になる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop fundamental technology for the "biological gas pump-probe method," which synchronizes NO production and detection within cells. Specifically, we constructed a system that combines intracellular endoscopy technology using metal nanowires with NO-releasing metal-organic frameworks (MOFs). Using one-dimensional plasmonic metal nanowires with a diameter of approximately 100 nm, we enabled remote excitation of surface-enhanced Raman scattering (RE-SERS) and applied this waveguide for remote molecular release within cells. By utilizing a light-responsive NO-releasing MOF (named NOF-1), we developed a technology for remotely releasing NO at specific locations within cells. We successfully performed NO release within human smooth muscle cells and detected NO using a fluorescence probe.

研究分野：材料化学

キーワード：一酸化窒素 多孔性材料 ナノマテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

心疾患と脳血管疾患は、長年日本における死因の第2,3位を占めており(厚生労働省、人口動態調査より)、今後社会の高齢化が加速する中で、その治療は公衆衛生上最も重要な課題の一つである。これら疾患では、血管内皮細胞の機能低下が共通して認められ、その結果、血管の狭窄・閉塞を経て虚血性壊死により死に至る。このような中、生体内で産生されるNOは、血管弛緩・拡張を惹起することが知られており、その効果を活用した治療薬への応用が期待されている。例えば、狭心症発作薬として使用されているニトログリセリンや硝酸イソソルビドは、細胞内でニトロ基が遊離しNOへ変換されることで薬理特性を示す。さらに最近では、COVID-19は血栓性疾患を引き起こすため、NOの血管拡張作用が治療の一つとして注目されている(*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, 16.)。しかしながら、現在の治療法ではNOを体内の狙った場所へ伝達することが困難であり、高濃度NO摂取が呼吸器症状を惹起する危険性がある。今後、NOをより汎用性の高い治療薬として活用するためには、治療部位でのNOガス拡散の時空間的挙動と血管機能の相関を解明し、必要最低限のNOの利用へとつなげる必要がある。

しかしながら、NOが気体という特殊な状態であるが故、克服すべき課題がある。NOは血管内皮細胞中のNO合成酵素(eNOS)で産生され、隣接した血管平滑筋細胞内へ拡散、可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化、cGMPを生成することで血管弛緩反応を引き起こす。このプロセスにおいて、現在の方法での問題点は以下の2点である。(1)NO産生タイミングの制御：eNOS活性化ではNO産生の時間制御ができない、(2)NO検出の空間分解能：NO検出蛍光プローブ分子自体が拡散するためNO検出位置の特定ができない。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記課題を克服するために細胞内におけるNO産生と検出を同期させた「生体ガスポンプ・プローブ法」にむけた基礎技術の開発を目的とした。特に、細胞内の任意の場所でNO産生を行うため、金属ナノワイヤーを用いた細胞内視鏡技術とNO放出多孔性金属錯体を組み合わせた細胞内NO放出システムの構築を行った。

ここでは、直径約100nmの一次元プラズモン導波路の特性により、表面増強ラマン散乱(RE-SERS)の遠隔励起が可能である。また、ナノワイヤー形状により、単一生細胞内や細胞膜上の特定の部位にアクセスしやすくなる。このナノワイヤーを用いた細胞内視鏡技術により、細胞内での分子検出が可能である。特にRE-SERSは、プラズモン励起用レーザーによるバックグラウンド効果を避け、高いS/N比で高感度の分子検出を実現する(H. Uji-I, et al. *Adv. Mater.* **2014**, 5124.)。本研究では、このプラズモン導波路を細胞内での遠隔分子放出に応用した。NO放出材料としては、紫外可視光の照射により化学反応を起こし、NOを放出できる多孔性金属錯体である光応答性NO放出多孔性金属錯体(Nitric oxide framework-1: NOF-1)を用いた(S. Furukawa et al. *Nat. Commun.* **2013**, 2684.)。本研究では、プラズモン導波路を覆った金属ナノワイヤーをNOF-1で被覆し、プラズモン導波路を用いたNO放出により、遠隔操作による細胞内の狙った場所でのNO放出を目指した(図1)。

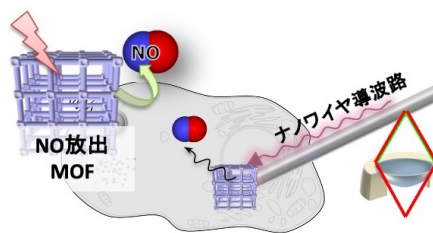


図1. 本研究の目的

## 3. 研究の方法

### NOF-1で被覆した金属ナノワイヤーの合成(図2)

本研究では、ナノワイヤー表面のプラズモン結合点を増加させるために、金エッチング銀ナノワイヤー(AuAgNW)を利用した。まず、PVP修飾銀ナノワイヤー(AgNW)をポリオール法で合成した。その後、ガルバニック置換反応(GRR)によって金エッチングしたAuAgNWを作製し、表面構造を粗くすることで、ナノワイヤー表面のプラズモン結合点の密度を高めた。その後、多孔性金属錯体 $[Zn(2nIm)]_{2n}$ (NOF-1)をAuAgNW表面に修飾した。NOF-1は、2-ニトロイミダゾール(2-nIm)に存在するニトロ基が光反応により分解することでNOラジカルを放出する多孔性材料である。AuAgNWへのNOF-1被覆は、AuAgNWとNOF-1前駆体溶液を室温で反応することで行った。得られたAuAgNW@NOF-1の同定を、エネルギー分散型X線分光法(EDS)とX線回折分析(XRD)によって行った。詳細な検討の結果、配位結合によってAuAgNW上にNOF-1が成長し、AuAgNW@NOF-1のコアシェル構造を形成していることが確認された。ナノワイヤー表面のPVPは、NOF-1被覆を行う上で、重要であることも明らかにした。NOF-1被覆には、反応直前にナノワイヤーをPVPで再度修飾する必要がある、この過程を行わなければ

NOF-1 をナノワイヤー上に被覆することはできなかった。この結果は、ナノワイヤー上の PVP がまず Zn と配位し NOF-1 の核形成を促進していることを示唆している。

### バルク状態の AuAgNW@NOF-1 の光誘起 NO 放出特性

光照射下における AuAgNW@NOF-1 粉末の NO 放出特性を、NO 選択的オゾンケミルミネッセンス法を用いて測定した (図 3)。波長 370nm、 $7.6\text{mW cm}^{-2}$  の連続光照射下での NO 放出能を調べたところ、AuAgNW@NOF-1 は NOF-1 そのものと同様の光応答性 NO 放出特性を示した。AuAgNW@NOF-1 のオン・オフ光応答は数サイクルにわたって NOF-1 と同様の速いオン・オフ応答が示された。

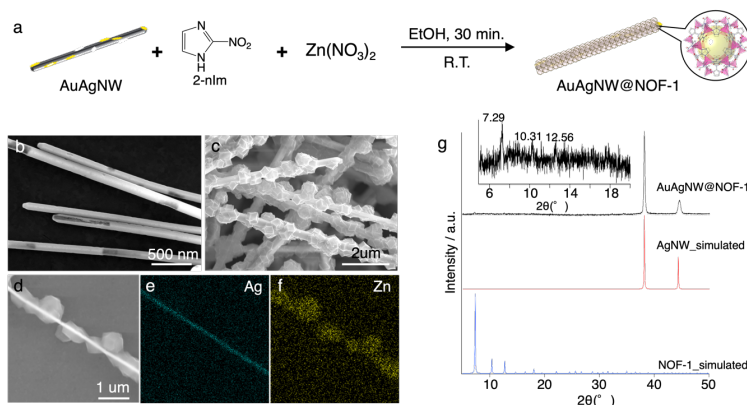


図2. NOF-1 で被覆された AuAgNW. a. 反応スキーム. b. AuAgNW の SEM 画像. c. AuAgNW@NOF-1 の SEM 画像. d. AuAgNW の TEM 画像. e, f. EDS マッピング. g. XRD データ.

### プラズモン効果を用いた AuAgNW@NOF-1 の NO 放出

近年、プラズモンを介した化学反応は、従来の光化学や熱化学を凌ぐ潜在的な利点があるため注目されている。プラズモン効果により AuAgNW 上の NOF-1 から NO 放出が可能であるかを調査した。AuAgNW@NOF-1 と NOF-1 をそれぞれガラス基板表面にスピコートした。その後、NO 蛍光指示薬であるジアミノフルオレセイン-FM (DAF-FM) を含むポリメタクリル酸 (PMMA) をスピコートし、AuAgNW@NOF-1 を PMMA マトリックス中に完全に埋め込んだ。部位特異的な NO 放出は、イメージング・システムを備えた光学顕微鏡上で、単一 AuAgNW@NOF-1 または NOF-1 結晶の一部に集光レーザーを照射して行った。

AuAgNW@NOF-1 結晶と NOF-1 結晶の両方で、375nm のレーザー照射による蛍光強度の増加が観察された。何もない領域に 375nm のレーザーを照射した場合には蛍光強度の増加は観察されず、PMMA フィルムに埋め込まれた DAF-FM の蛍光強度の増加を測定することで、光誘起 NO 放出を検出できることが確認された。以前の研究で、NOF-1 が近赤外 2 光子吸収により NO を放出することを報告しており、AuAgNW@NOF-1 に関しても実験を行った。光の表面プラズモンポラリトン (SPP) 結合の効率が光の偏光に強く依存することは広く認識されているが、これは光-表面プラズモンポラリトン結合における位相整合の必要性に起因する。本研究では、単一 AuAgNW@NOF-1 および NOF-1 について、800nm の 2 光子レーザー光を異なる偏光で照射した場合の NO 放出特性を調べた。光照射時の励起偏光は、ワイヤー長手軸に平行な偏光を p 偏光、ワイヤー長手軸に垂直な偏光を s 偏光と定義した。図 4 は、AuAgNW@NOF-1 と NOF-1 の 800 nm 光照射前後の蛍光画像と、レーザー照射前後の蛍光強度の差分画像である。AuAgNW@NOF-1 の場合、光照射前後の蛍光強度の差から、AuAgNW@NOF-1 に s 偏光の 800nm レーザー光を集光した場合のみ蛍光強度の急激な増大が明瞭に観察された。AuAgNW@NOF-1 の表面プラズモンと s 偏光カップリングが、効率的な NO 放出に大きく寄与したことを示唆している。

観察された現象を包括的に理解するために、AuAgNW@NOF-1 と純粋な NOF-1 の NO 放出特性を 633nm の 1 光子レーザー照射によって調べた。s 偏光 633nm 照射により AuAgNW@NOF-1 は明確な NO 放出を示したが、NOF-1 そのものからは蛍光強度の増加はほとんど観察されなかった。7.58  $\text{mW cm}^{-2}$  の最高レーザー出力でも、NOF-1 から NO はほぼ放出されなかった。NOF-1 は 633 nm の吸収帯を持たないので、AuAgNW のプラズモン熱効果は主に AuAgNW@NOF-1 からの NO 放出特性に影響する。実際に NOF-1 バルク試料の熱効果による NO 放出は確かに観察された。これらの結果から、2 光子照射は、光と熱の両方の効果によって AuAgNW@NOF-1 から NO 放出を効率的に誘導できることが確認された。AuAgNW@NOF-1 の低いレーザー出力での効率的な NO 放出は、ナノワイヤープローブとしての生物学的応用への適性を示している。

### AuAgNW@NOF-1 内視鏡プローブの作製と単一細胞レベルでの時空間制御 NO 放出 (図 3)

本研究では、新たに開発した AuAgNW@NOF-1 を内視鏡プローブとして応用し、ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC) の細胞膜上での部位特異的な NO 放出を実証した。ナノワイヤー内視鏡プローブを作製するために、1 本のナノワイヤーを先鋭化したタングステン (W) チップに取り付けた。NOF-1 被覆が存在するため、AuAgNW@NOF-1 を W チップに直接取り付けることはできないため、AuAgNW を W チップに取り付けた後に NOF-1 シェルを成長させた。

細胞内への NO の透過性を考慮し、AuAgNW@NOF-1 プローブを用いて細胞膜にアクセスし、膜上の特定の位置で AuAgNW@NOF-1 プローブからの光誘起 NO 放出を行った。個々の



HASMC 細胞内を NO 検出蛍光指示薬である DAF-FM DA で染色し、AuAgNW@NOF-1 の光照射前後での DAF-FM DA 蛍光強度の変化を観察した。最初に、800nm の光照射を用いて、細胞膜上の特定の場所から NO を放出させることを試みた。NO 放出前にも各 HASMC で蛍光が観察された。これは、DAF-FM DA 固有のわずかな蛍光と内因性 NO の影響によると考えられる。光照射による細胞への影響を避けるため、リモート励起による NO 放出を行った。AuAgNW@NOF-1 に光を照射すると、細胞内での蛍光強度の増加が観測された。NOF-1 が存在しない AuAgNW プローブに光を照射した場合と比較して大きな蛍光強度の増加が観測されたことから、この細胞内傾向増加は、AuAgNW からのプラズモンにより NOF-1 から NO 放出が達成されたことを示唆している。これにより、リモート励起により細胞内へと NO を導入できる新しいシステムの構築に成功した。

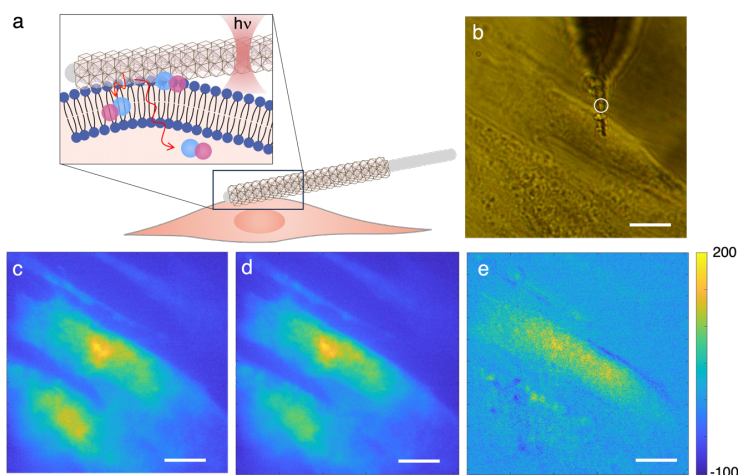


図3. 2光子800 nm照射(3.6 mW、7秒)下での、ヒト平滑筋細胞の細胞膜上でのリモート励起によるNO放出。a. 概念図。b. 光学顕微鏡像。c. 2光子照射前の平滑筋細胞の蛍光像(DAF-FM DAで染色) d. 2光子照射後の平滑筋細胞の蛍光像(DAF-FM DAで染色) e. 2光子照射後と照射前の蛍光強度差の差分画像。すべての画像のスケールバーは10μm。

#### 4. 研究成果

本研究で得られた成果は、現在論文執筆中である。一方で、本研究を進めるにあたり、様々な多孔性金属錯体の合成、さらにはNO放出材料の創成に成功し論文を発表した。以下に、その論文を示す。

[1] “Reversible Discrete-to-Extended Metal-Organic Polyhedra Trans-formation by Sulfonic Acid Surface Functionalization”

Javier Troyano, Satoshi Horike, Shuhei Furukawa  
*J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 19475-19484

[2] “Porous supramolecular gels produced by reversible self-gelation of ruthenium-based metal-organic polyhedra”

Javier Troyano, Fuerkai Tayier, Pithchayapha Phattharaphuti, Takuma Aoyama, Kenji Urayama, Shuhei Furukawa  
*Chem. Sci.* **2023**, *14*, 9543-9552.

[3] “Dual photoresponsive & water-triggered nitric oxide-releasing materials based on rhodium-based metal-organic polyhedra”

Francisco J Carmona, Thiago Negrão Chuba, Elí Sánchez-González, Jenny Pirillo, Yuh Hijikata, Shuhei Furukawa  
*J. Mater. Chem. B* **2024**, *12*, 233-239.

[4] “Pore-Networked Soft Materials Based on Metal–Organic Polyhedra”

Zaoming Wang, Shuhei Furukawa  
*Acc. Chem. Res.* **2024**, *57*, 327-337.

[5] “Redox-active ruthenium-organic polyhedra with tunable surface functionality and porosities”

Fuerkai Tayier, Javier Troyano, Shun Tokuda, Zaoming Wang, Masa-aki Haga, Shuhei Furukawa  
*Inorg. Chem.* **2024**, *63*, 5559–5567.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Troyano Javier, Horike Satoshi, Furukawa Shuhei	4. 巻 144
2. 論文標題 Reversible Discrete-to-Extended Metal-Organic Polyhedra Transformation by Sulfonic Acid Surface Functionalization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19475 ~ 19484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c07978	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
1. 著者名 Troyano Javier, Tayier Fuerkaiti, Phattharaphuti Phitchayapha, Aoyama Takuma, Urayama Kenji, Furukawa Shuhei	4. 巻 14
2. 論文標題 Porous supramolecular gels produced by reversible self-gelation of ruthenium-based metal-organic polyhedra	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 9543 ~ 9552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3SC02888G	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
1. 著者名 Carmona Francisco J., Negrao Chuba Thiago, Sanchez-Gonzalez Eli, Pirillo Jenny, Hijikata Yuh, Furukawa Shuhei	4. 巻 12
2. 論文標題 Dual photoresponsive & water-triggered nitric oxide releasing materials based on rhodium-based metal-organic polyhedra	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 233 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3TB02162A	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
1. 著者名 Wang Zaoming, Furukawa Shuhei	4. 巻 57
2. 論文標題 Pore-Networked Soft Materials Based on Metal-Organic Polyhedra	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 327 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.3c00655	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 -

1. 著者名 Tayier Fuerkaiti、Troyano Javier、Tokuda Shun、Wang Zaoming、Haga Masa-aki、Furukawa Shuhei	4. 巻 63
2. 論文標題 Redox-Active Ruthenium-Organic Polyhedra with Tunable Surface Functionality and Porosities	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 5559 ~ 5567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.3c04530	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8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shuhei Furukawa
2. 発表標題 Metal-Organic Cage Assembly for Gel Engineering
3. 学会等名 MOF2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuhei Furukawa
2. 発表標題 Metal-Organic Cage Assembly for Gel Engineering
3. 学会等名 2nd UNIST-KU Joint Symposium on Chemistry and Materials Science (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuhei Furukawa
2. 発表標題 Reversible discrete-to-extended metal-organic polyhedra transformation
3. 学会等名 AsCA2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川修平
2. 発表標題 PCP/MOFのソフトマテリアル化
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 徳田 駿、古川 修平
2. 発表標題 金属錯体八面体を集積した3次元ファンデルワールスフレームワークの創成
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田 彩名、徳田 駿、古川 修平
2. 発表標題 金属錯体八面体の自己集合化による多孔性ナノファイバーゲルの合成
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fuerkaiti TAYIER, Javier Troyano, Shuhei Furukawa
2. 発表標題 Synthesis of porous gels assembled from ruthenium-based metal-organic polyhedra
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Phitchayapha Phattharaphuti, Javier Troyano, Shuhei Furukawa
2. 発表標題 Heterometallic Metal-Organic Cages: Characterising the Complexity of a Confined System
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	猪瀬 朋子 (Inose Tomoko) (10772296)	京都大学・白眉センター・特定准教授  (14301)	
研究分担者	亀井 謙一郎 (Kamei Ken-ichiro) (00588262)	京都大学・高等研究院・研究員  (14301)	
研究分担者	雲林院 宏 (Uji-i Hiroshi) (40519352)	北海道大学・電子科学研究所・教授  (10101)	

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
---------	---------