JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	機能性ナノ複合体を用いた生体内多次元細胞操作の創製（国際共同研究強化）
Author(s)	都，英次郎
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書：1-6
Issue Date	2020-04-24
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/16744
Rights	
Description	国際共同研究加速基金（国際共同研究強化），研究期間：2017～2019，課題番号：16KK0117，研究者番号：70443231，研究分野：生物工学

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

様　式　Ｆ－１９－２

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　２ 年　　４ 月 ２４ 日現在

機関番号：１３３０２
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2017～2019
課題番号：１６ＫＫ０１１７

研究課題名（和文）機能性ナノ複合体を用いた生体内多次元細胞操作の創製（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Multidimensional cellular manipulation by functional nanocomplexes(Fostering Joint International Research)

研究代表者

都　英次郎（Miyako, Eijiro）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：７０４４３２３１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　10,100,000円
渡航期間：　12ヶ月

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。本研究では、熱を感じる温度応答性チャネルタンパク質TRPV2に着眼した新しい細胞刺激技術の開発を目的とする。具体的には、生体透過性の高い近赤外光に応答し、“熱”を発生する機能性ナノ複合体を開発し、当該ナノ複合体を用い、熱による物理刺激をナノメーターレベルで局所的かつ定量的に特定の神経細胞めがけて低侵襲的負荷を与えることが可能な新しい細胞刺激制御技術を創製を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
難病に指定されている神経性疾患の早期の治療法実現が待たれている。現在、光によって細胞刺激可能なオプトジェネティクスが期待されているが、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。本研究では、熱を感じる細胞膜タンパク質（TRPV2）に着眼し、熱を発生する機能性ナノ複合体を活用することで、生体深部をナノメーターレベルで効果的に刺激が可能な新しい細胞刺激技術を目指した。当該技術は、オプトジェネティクス研究に新境地を開き、脳深部刺激療法にブレークスルーをもたらす革新性があり、先進医療分野において世界の科学・技術を大きくリードすることができるだろう。

研究成果の概要（英文）：Stimulating cells by light is an attractive technology to investigate cellular function and deliver innovative cell-based therapy. However, current techniques generally use poorly biopermeable light, which prevents broad applicability. Here, we show that a new type of functional nanocomplexes, synthesized from multi-walled carbon nanohorns, polyglycerol-phospholipid, and antibody, enables photothermal control of Ca2+ influx into cells overexpressing transient receptor potential vanilloid type-2 (TRPV2). The nanohybrid is simply operated by application of highly biotransparent near-infrared light. The technology would revolutionize remote control of cellular function.

研究分野：生物工学

キーワード：ナノ材料　ナノチューブ・フラーレン　ナノバイオ　細胞・組織

※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。

様　式　Ｆ－１９－２

１．研究開始当初の背景

光によって細胞膜電位を制御できるオプトジェネティクスは、魅力的な細胞機能制御技術の一つである。オプトジェネティクスは、神経や心筋といった特定の細胞に遺伝子工学的手法を用いて、光活性化イオンチャネルを強制発現させた後、これらの細胞に紫外あるいは可視光を照射することにより、標的とする細胞を興奮または抑制させる。オプトジェネティクスを用いると、細胞同士の接続や特定の細胞集団の機能を光のスイッチを切り換えて遠隔操作することができる。このためオプトジェネティクスは、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、オプトジェネティクスで制御できるのは活動電位発生の有無のみであり、一種類の細胞内シグナル伝達経路、あるいは一種類のタンパク質の活性化など、より厳密な細胞機能制御を行うことはできない。また、紫外や可視光といった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。さらに、安全性の低いウイルスベクターを用いて遺伝子改変を行う必要があるため医療への実用化は難しい。一方、生理活性物質に光照射により脱保護される保護基を有機化学的に導入し、その生理活性を一時的に失わせたケージド化合物を用いる細胞機能制御技術がある。本手法は、小分子による様々な細胞機能を選択的に制御でき、ウイルスによる遺伝子改変が必要ない点が魅力であるが、当該化合物を合成するには卓越した技術が必要であり、脱保護に紫外線か可視光線を利用するため生体深部領域の細胞機能制御には不向きである。

２．研究の目的

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。本研究では、熱を感じる TRPV2(transient receptor potential, vanilloid family type 2)（52℃以上で活性化）に着眼した新しい細胞刺激技術の開発を目的とする。具体的には、生体透過性の高い近赤外光に応答し、“熱”を発生する機能性ナノ複合体を開発し、当該ナノ複合体を用い、熱による物理刺激をナノメーターレベルで局所的かつ定量的に特定の神経細胞めがけて低侵襲的負荷を与えることが可能な新しい細胞刺激制御技術を創製する。当該技術が実現できれば、これまで不可能であった生体深部領域の細胞機能制御が実現でき、今まで解明が困難であった神経変性疾患における患部特定、分子レベルでの刺激機構の理解ならびに病理解明につながる。

３．研究の方法

３－１．機能性ナノ複合体の合成と物性解析

カーボンナノホーン（CNH）に生体適合性の高いポリエチレングリコール（PEG）-リン脂質を超音波照射により非共有的に結合させた。次いで、PEG-リン脂質末端のスクシンイミジル基と TRPV2 抗体のアミノ基を縮合反応により共有結合させた。当該機能性 CNH 複合体の光吸収性、分散性、ナノ構造などの物性解析は、紫外・可視分光光度計、ウエスタンブロッティング、動的光散乱（DLS）、透過型電子顕微鏡（TEM）によって評価した。また、CNH 複合体の光発熱特性を調べるために、当該分散液に近赤外レーザー光線（1064 nm、連続発振ファイバーカップルタイプ）を照射し、熱電対およびサーモグラフィにより経時的な温度変化を測定した。

３－２．細胞物理刺激制御技術の構築

合成した当該ナノハイブリットを機械的ならびに熱的刺激を感受する TRPV2 を発現させたヒト骨肉腫細胞株（U2OS）に結合させ、培地中の余分なナノ複合体を洗浄後、近赤外レーザー（1064 nm）によって細胞刺激し、Ca^{2+}の流入挙動を Fluo-8 によって蛍光顕微鏡により直接観察した。

４．研究成果

４－１．機能性ナノ複合体の合成と物性解析

機能性 CNH 複合体の調製方法と概念を図 1a に示す。TRPV2 の結合はウエスタンブロッティングにより確認した（図 1b）。機能性 CNH 複合体のナノ構造を TEM により観察した（図 1c）。この結果、CNH 特有のスパイク構造と抗体-PEG-リン脂質に由来する表面被覆が確認できた。機能性 CNH 複合体の粒子径を DLS で測定したところ、抗体の搭載により平均粒子径の増加（86 nm から 95 nm）が見られた（図 1d）。紫外・可視分光光度計により合成した機能性 CNH 複合体は特徴的なピークは見えないものの、使用する近赤外レーザーの波長（1064 nm）に対応する明確な光吸収があることがわかった（図 1e）。また、機能性 CNH 複合体の光発熱特性を評価したところ、わずか 3 分間のレーザー照射［波長 1064 nm、1 W (ca. 50 mW/mm^2)］で 70℃近くまで温度上昇が起こることがサーモグラフィ測定によりわかった（図 1f）。さらに、機能性 CNH 複合体の光発熱特性の濃度依存性も確認できた（図 1g）。

４－２．細胞刺激制御技術の構築

次に、当該機能性 CNH 複合体を活用した細胞刺激制御を試みた。まず、温度応答性チャネルタンパク質（TRPV2）を遺伝子工学的手法により発現させた U2OS 細胞への機能性 CNH 複合体の選択的な結合を蛍光顕微鏡により観察した。機能性 CNH 複合体の有する TRPV2 抗体には緑色蛍光色素 FITC を結合させている。この結果、TRPV2 抗体を搭載した機能性 CNH 複合体が、TRPV2 を発現

する U2OS 細胞に特異的に結合していることが明らかとなった（図 2a）。

本細胞刺激制御の原理は図 2b の通りである。まず、機能性 CNH 複合体と結合した単一の U2OS 細胞に向かって、生体透過性が高く、かつ生体に低侵襲な 1064 nm 近赤外レーザーを照射することで、CNH の光発熱特性を誘起させ、熱を発生させる。この熱が細胞膜上の TRPV2 チャネルに伝わることで開孔化が起こり、Ca^{2+}の流入が起こるという仕組みである。レーザーを照射すると TRPV2 を発現する U2OS は Ca^{2+}の流入に起因する緑色蛍光を観察することができた（図 2c、2d）

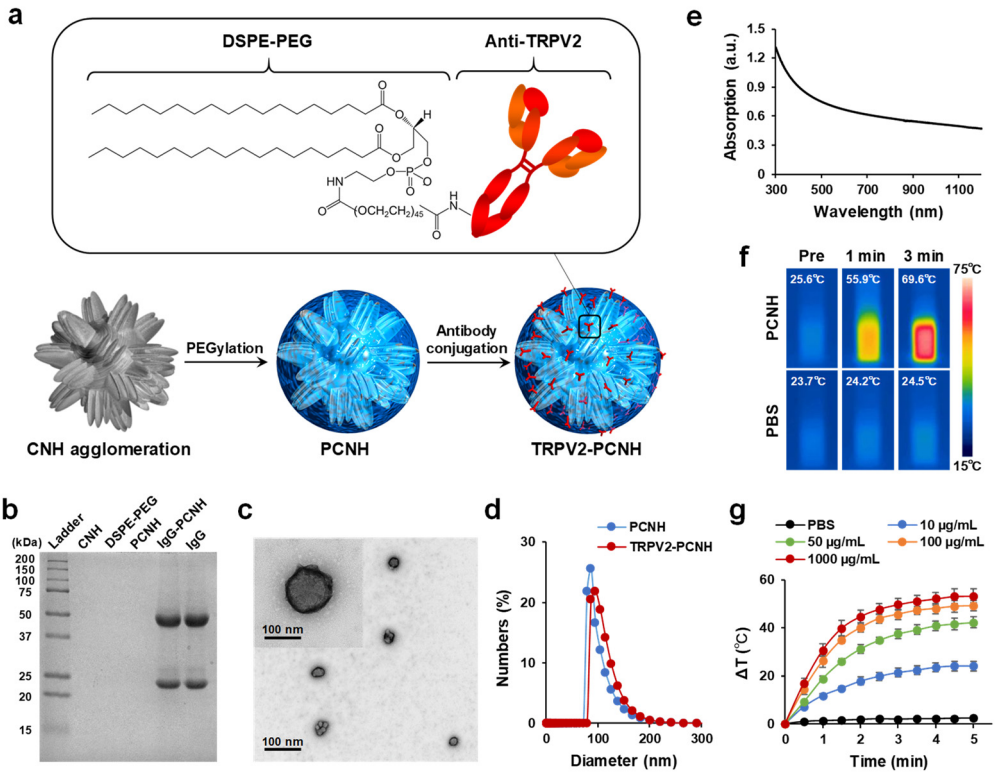

図 1. 機能性ナノ複合体の合成と物性解析。(a) 機能性 CNH 複合体の合成方法と概念図。(b) ウエスタンブロッティング。(c) TEM 観察。(d) DLS 解析。(e) 紫外・可視分光。(f) サーモグラフィ像。(g) レーザー照射に伴う CNH 複合体の各濃度における温度上昇曲線。

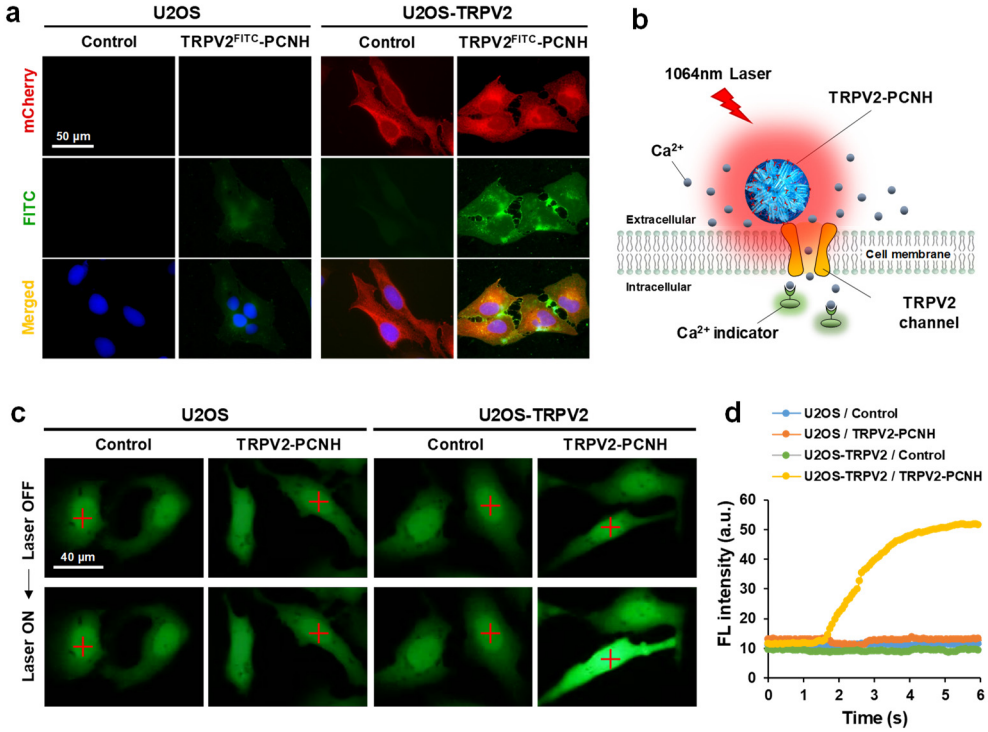

図 2. 機能性ナノ複合体を活用した細胞刺激制御技術。(a) TRPV2 抗体を搭載した機能性 CNH 複合体の TRPV2 を発現した細胞への選択的結合の蛍光顕微鏡観察。(b) 細胞刺激制御の概念図。(c) 細胞刺激の Ca^{2+}インジケーター（Fruo-8）を用いた蛍光顕微鏡観察。(d) 各種実験条件における Ca^{2+}流入挙動。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計10件（うち査読付論文　10件／うち国際共著　3件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Yue Yu, Xi Yang, Ming Liu, Masahiro Nishikawa, Takahiro Tei, Eijiro Miyako	４．巻 1
２．論文標題 Anticancer drug delivery to cancer cells using alkyl amine-functionalized nanodiamond supraparticles	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Nanoscale Advances	６．最初と最後の頁 3406-3412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1039/C9NA00453J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Yue Yu, Xi Yang, Ming Liu, Masahiro Nishikawa, Takahiro Tei, Eijiro Miyako	４．巻 2
２．論文標題 Multifunctional cancer phototherapy using fluorophore-functionalized nanodiamond supraparticles	５．発行年 2019年
３．雑誌名 ACS Applied Bio Materials	６．最初と最後の頁 3693-3705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00603	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 Yue Yu, Jia Wang, Sunil Kaul, Renu Wadhwa, Eijiro Miyako	４．巻 9
２．論文標題 Folic acid receptor-mediated targeting enhances the cytotoxicity, efficacy and selectivity of Withania somnifera leaf extract: In vitro and in vivo evidence	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Frontiers in Oncology	６．最初と最後の頁 602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Yue Yu, Xi Yang, Ming Liu, Masahiro Nishikawa, Takahiro Tei, Eijiro Miyako	４．巻 11
２．論文標題 Amphipathic nanodiamond supraparticles for anticancer drug loading and delivery	５．発行年 2019年
３．雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	６．最初と最後の頁 18978-18987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1021/acsami.9b04792	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 Arun Kumar Prabhakar, Michael G. Potroz, Soohyun Park, Eijiro Miyako, Nam-Joon Cho	4．巻 35
2．論文標題 Spatially controlled molecular encapsulation in natural pine pollen microcapsules	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Particle & Particle Systems Characterization	6．最初と最後の頁 1800151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1002/ppsc.201800151	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 Teng-Fei Fan, Michael G. Potroz, Ee-Lin Tan, Jae H. Park, Eijiro Miyako, Nam-Joon Cho	4．巻 9
2．論文標題 Human blood plasma catalyses the degradation of Lycopodium plant sporoderm microcapsules	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 2944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-019-39858-z	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 Hokyun Chin, Jurriaan J. J. Gillissen, Eijiro Miyako, Nam-Joon Cho	4．巻 90
2．論文標題 Microfluidic liquid cell chamber for scanning probe microscopy measurement application	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Review of Scientific Instruments	6．最初と最後の頁 46105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1063/1.5086063	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 Yue Yu, Masahiro Nishikawa, Ming Liu, Takahiro Tei, Sunil C. Kaul, Renu Wadhawa, Minfang Zhang, Junko Takahashi, Eijiro Miyako	4．巻 10
2．論文標題 Self-assembled nanodiamond supraparticles for anticancer chemotherapy	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Nanoscale	6．最初と最後の頁 8969-8978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1039/C8NR00641E	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 Yue Yu, Eijiro Miyako	4．巻 24
2．論文標題 Recent advances in liquid metal manipulation toward soft robotics and biotechnologies	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Chemistry - A European Journal	6．最初と最後の頁 9456-9462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1002/chem.201800605	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 Yue Yu, Eijiro Miyako	4．巻 3
2．論文標題 Alternating-magnetic-field-mediated wireless manipulations of a liquid metal for therapeutic bioengineering	5．発行年 2018年
3．雑誌名 iScience	6．最初と最後の頁 134-148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.04.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計0件

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	田代　歩 (Tashiro Ayumu)	南洋理工大学・School of Biological Sciences・Assistant Professor	
その他の研究協力者	チョ　ナムジョン (Cho Nam-Joon)	南洋理工大学・School of Materials Science & Engineering・Professor	