

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

— 腫瘍や臓器・組織の治療研究への貢献に期待 —

平成 30 年 10 月 11 日

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

国立研究開発法人 国立国際医療研究センター

国立大学法人 北海道大学

■ ポイント ■

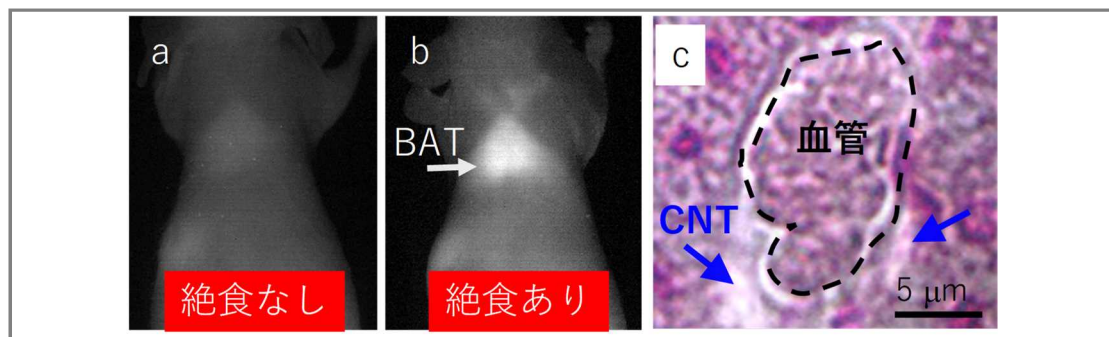
- ・ プローブとして用いたカーボンナノチューブの組織内での分布を細胞レベルで観察
- ・ 絶食マウスでは、褐色脂肪組織内の血管壁透過性が異常に亢進することを発見
- ・ 腫瘍や臓器・組織の異常発見とその機序解明をサポートする技術として治療法開発への貢献に期待

■ 概要 ■

国立研究開発法人 産業技術総合研究所【理事長 中鉢 良治】(以下「産総研」という)ナノ材料研究部門【研究部門長 佐々木 毅】湯田坂 雅子 招聘研究員と片浦 弘道 首席研究員は、国立研究開発法人 国立国際医療研究センター【理事長 國土 典宏】研究所 疾患制御研究部 幹細胞治療開発研究室 佐伯 久美子 室長、国立大学法人 北海道大学【総長 名和 豊春】大学院獣医学研究院 基礎獣医科学分野 岡松 優子 講師 らと共同で、リン脂質ポリエチレングリコール (PLPEG) で表面を被覆した単層カーボンナノチューブ (SWCNT) を近赤外蛍光 (NIRF) プローブとして用いて、マウス全身の NIRF 造影と今回開発した NIRF 顕微鏡による組織観察を行った。その結果、絶食させたマウスでは SWCNT が褐色脂肪組織 (BAT) に集積する現象を発見した。また、それが、BAT の血管壁透過性が亢進して SWCNT が血管外に漏出するためということを見出した。

SWCNT の NIRF を利用したマウス全身造影と NIRF 顕微鏡による細胞レベルでの組織観察は、臓器・組織の異常発見とその機序解明に役立ち、薬剤や治療法の開発への貢献が期待される。なお、この技術の詳細は、2018 年 9 月 27 日に *Scientific Reports* にオンライン掲載された。

_____ は【用語の説明】参照



PLPEG で被覆した SWCNT を尾静脈に投与したマウスの

(a, b)BAT 部分の NIRF 造影像と(c)絶食マウスの BAT の NIRF 顕微鏡像

絶食マウスでは BAT に SWCNT が集積して明るく造影され(b)、SWCNT は BAT の血管外に漏出している(c)。正常マウス(絶食なし)では、BAT に SWCNT は集積せず、明るく造影されない(a)。

■ 開発の社会的背景 ■

生体組織の細胞レベルでの異常(細胞死、がん細胞浸潤など)の把握は、疾病治療法の研究開発にとって重要であるが、従来の造影剤では分子サイズが小さいため、組織にとどまる時間が短く、解剖して得た組織から異常を読み取ることが困難である。また、その場で観察できる手法が探索されているが、生きた動物から微視的な情報を得ることも、動物が呼吸などにより動くため難しい。

このような中、近赤外光の生体透過性の高さを生かし、近赤外蛍光ナノ物質を用いた生体内造影研究が近年注目を集めている。中でも SWCNT は他の近赤外蛍光ナノ物質と異なり、退色しにくく、毒性も低いため、動物実験を用いた医療関連研究への貢献が期待されている。また、SWCNT は直径約 1 nm、長さ約数十 nm～数 μm と大きいため、組織内にとどまる時間が長く、解剖後の組織観察により異常を発見しやすいと考えられている。さらに、SWCNT の蛍光は、組織の自家発光と波長が異なるため、鮮明な NIRF 像が得られる。

■ 研究の経緯 ■

産総研は、SWCNT のバイオ分野での実用化を目指して研究開発に取り組んでいる。特に、SWCNT を使った動物実験用の近赤外蛍光プローブや生体応用に適した SWCNT の分散手法、酸化により SWCNT の蛍光強度を増大させる技術などを開発してきた(2018 年 4 月 19 日 産総研プレス発表)。また、MPC ポリマーの一種である PMB で表面を被覆した SWCNT を用いるとマウス BAT を選択的に造影でき、他の褐色脂肪組織造影剤より鮮明で正確な画像が得られることを明らかにした(2017 年 3 月 17 日 産総研プレス発表)。

これまで、血管や臓器など大きな部位を造影するための近赤外蛍光プローブとしての SWCNT の研究開発を行ってきたが、今回、SWCNT を近赤外蛍光プローブとして用いて、細胞レベルでの微視的な情報を得る技術の開発に取り組んだ。

なお、今回の研究開発は、独立行政法人 日本学術振興会の科学研究費助成事業 基盤研究(A)「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(平成 28～30 年度)」、基盤研究(S)「完全制御カーボンナノチューブの物性と応用(平成 25～29 年度)」による支援を受けた。

■ 研究の内容 ■

これまで SWCNT を用いたマウス体内の NIRF 造影では、血管や臓器など比較的大きく肉眼でも見分けられる部位を非侵襲的に造影してきた。しかし、組織内の微視的な異常の情報は得られず医療研究への適用には限界があった。組織内の SWCNT の微視的な分布を細胞レベルで観測するには、近赤外光に対応した光学素子を用いた NIRF 顕微鏡が必要である。近年、近赤外光の有用性が知られるにつれ、近赤外光対応の光学素子の開発が進んできたため、今回、近赤外対応物レンズと CNT 励起・観察用ダイクロイックミラー、そして高感度 2 次元 NIR 検出器を組み合わせ、空間解像度を数 μm 程度にあげた NIRF 顕微鏡を開発した(図 1a)。また、疎水性の SWCNT に親水性を持たせることで、マクロファージに捕獲されないように PLPEG で表面を被覆した SWCNT(PLPEG-SWCNT)を近赤外蛍光プローブに用いた(図 1b)。この PLPEG-SWCNT は水溶液中でほぼ孤立分散する。

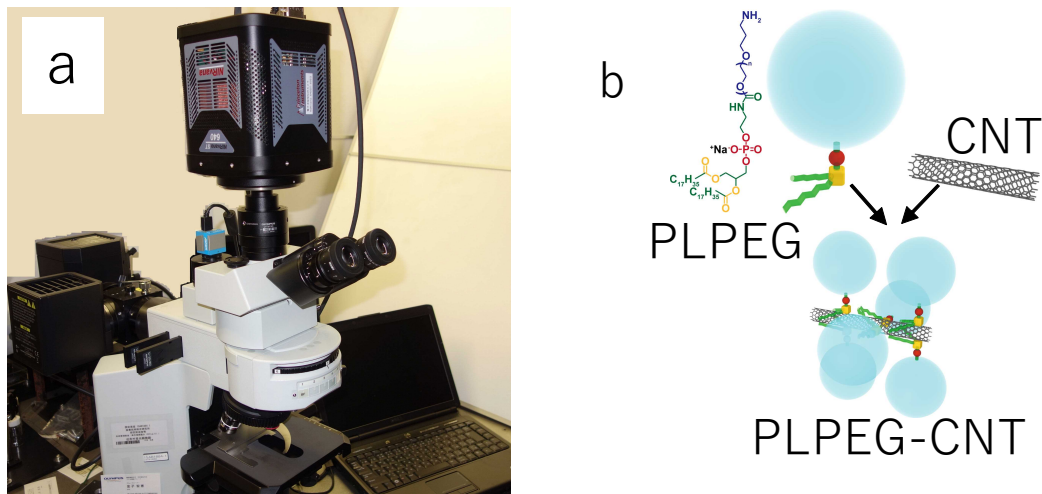


図 1 今回開発した(a)NIRF 顕微鏡と、(b)プローブに用いた PLPEG-SWCNT

PLPEG-SWCNT をマウスに尾静脈投与し、マウスの全身、特に BAT(図 2a)を 2016 年に産総研が開発した NIRF 造影装置(図 2b)を用いて全身撮影した。この撮影では波長 1000 nm 以上の蛍光を検出した。正常マウスでは、PLPEG-SWCNT は BAT に蓄積せず、NIRF 撮影では明るく造影されなかったが(図 2c)、マウスを絶食(20 時間)させると、何らかの理由で PLPEG-SWCNT が BAT に蓄積され、明るく造影された(図 2d)。

CNT が BAT に蓄積される機序を明らかにするため、PLPEG-SWCNT が蓄積した絶食マウスの BAT の組織を今回開発した NIRF 顕微鏡(図 1a)で波長 1100 nm 以上の蛍光を観察すると、BAT の血管から PLPEG-SWCNT が漏れ出て、組織内に拡散していた。絶食により BAT の血管壁透過性が亢進するこの現象は PLPEG-SWCNT によって初めて捉えられた現象である(図 2e)。他に、同様の機能を持つプローブは見当たらず、PLPEG-SWCNT は細胞レベルでの異常を検知するのに優れたプローブであるといえる。さらに詳細に調べるため、BAT を鍍銀染色し通常の光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察したところ、BAT で細胞や血管を支えて組織を形作っている結合組織であるコラーゲン線維が脆弱化していることがわかった。絶食マウスの BAT では、コラーゲン分解酵素の 1 つである MMP3 の発現が亢進していたことから、絶食による BAT の血管壁透過性亢進は、血管を裏打ちしているコラーゲン線維の脆弱化に起因すると推察される。

今回、PLPEG を被覆剤として用いたが、PLPEG に含まれるポリエチレングリコールは生体親和性がよいため PLPEG-SWCNT の免疫系細胞による捕獲を阻止できる。また、タンパク質などの非特異的吸着も避けられるためプローブのサイズが大きくなることもなく、体中の毛細血管にくまなく到達する。そのため、血管異常を伴う異常であれば、どこで起こっても PLPEG-SWCNT を使って場所を特定でき、さらに異常原因を明らかにして適切な治療を施せる可能性がある。また、組織内の細胞レベルでの微細な構造変化が検知できるため、PLPEG-SWCNT を用いた体内の NIRF 造影と組織の NIRF 顕微鏡観察が、未知の生体組織の微細な構造変化の発見や、その生理的意義の解明に貢献できる可能性がある。

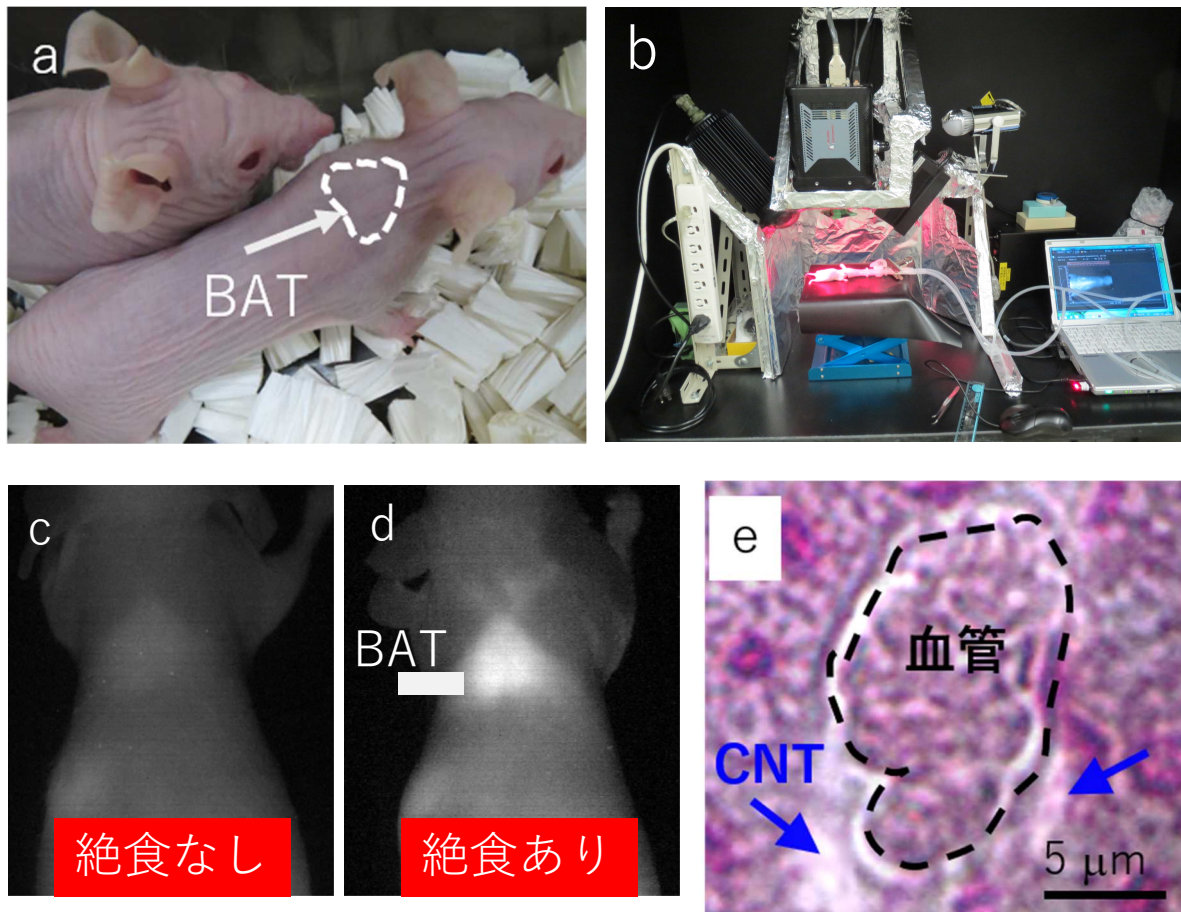


図 2 (a)マウスの BAT 部分、(b)NIRF 造影装置、(c、d)撮影した NIRF 像、(e)撮影した NIRF 顕微鏡像

■ 今後の予定 ■

今後は NIRF 顕微鏡を改良し、PLPEG-SWCNT の細胞レベルでの微細分布解明の精度を高める。また、がん治療研究に役立つことを目指して、腫瘍構造の細胞レベルでの解明に今回開発した技術を適用していく。

■ 本件問い合わせ先 ■

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

招聘研究員 湯田坂 雅子

〒305-8565 茨城県つくば市 東 1-1-1 中央第 5

TEL:029-861-4818 FAX:029-861-6236

E-mail:m-yudasaka@aist.go.jp

ナノ材料研究部門

首席研究員 片浦 弘道

〒305-8565 茨城県つくば市 東 1-1-1 中央第 5

TEL:029-861-2551 FAX:029-861-6236

E-mail:h-kataura@aist.go.jp

【取材に関する窓口】

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 企画本部 報道室

〒305-8560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第1

つくば本部・情報技術共同研究棟 8F

TEL:029-862-6216 FAX:029-862-6212 E-mail:press-ml@aist.go.jp

国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 広報企画室(広報係長:三山 剛史)

〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1

TEL:03-5273-5258 FAX:03-3207-1038 E-mail:tmiyama@hosp.ncgm.go.jp

国立大学法人 北海道大学 総務企画部 広報課

〒060-0808 北海道札幌市北区北8条西5丁目

TEL:011-706-2610 FAX:011-706-2092 E-mail:kouhou@jimuhokudai.ac.jp

【用語の説明】

◆ リン脂質ポリエチレングリコール(PLPEG)

リン脂質ポリエチレングリコール(PLPEG)は水溶性ポリマーの一種であり、今回用いた PLPEG は炭素数 17 のアルキル鎖 2 本と分子量約 5000 のポリエチレングリコールがリン酸基を介して結合している。PLPEG はドラッグデリバリーシステム用リポソームミセルの構成成分として使用されている。PLPEG は、疎水性のアルキル鎖が SWCNT に吸着し、ポリエチレングリコール部分が最表面に出て、PLPEG-SWCNT に親水性をもたらすと考えられる。

◆ 単層カーボンナノチューブ(SWCNT)

単層カーボンナノチューブ(SWCNT)は炭素原子からなる、直径約 1 nm(1 ナノメートル:10 億分の 1 メートル)程度の円筒状物質で、黒鉛と同じく 6 角形のネットワークによってできている。6 角形の並び方の違いで、半導体的性質を示したり、金属的性質を示したりする。金属型と半導体型は、直径がほぼ同じであっても、全く異なった光吸収スペクトルを示す。1 nm 程度の直径の半導体型 SWCNT は、生体透過性の高い近赤外光の蛍光を発する希な素材であり、小動物の血管造影などに利用されている。

◆ 近赤外蛍光造影(NIRF 造影)

700~1600 nm の波長の光は近赤外光と呼ばれていて、赤外光と可視光の間の波長領域となっている。この波長領域の光は生体透過性が高く、検査などに役立つと考えられているが、この波長領域で発光する物質がほとんどなかったため、発光による体内造影技術が発展してこなかった。最近ではナノ粒子開発が進み、近赤外領域に発光を持つ物質も知られるようになったが、カドミウムなど有害物質を使う点が問題となっている。SWCNT は、数少ない近赤外蛍光を発する物質の一つであり、また、炭素だけからなるため、有害重金属を用いたものに比べて毒性が低く、近赤外蛍光による動物体内造影に適している。

◆ 褐色脂肪組織(BAT)

褐色脂肪組織(Brown Adipose Tissue: BAT)は、哺乳類で見られる脂肪組織の一つ。脂肪を燃焼させて熱を産生する機能を持つため、肥満やそれに関連する病の発症を予防・治療するためのターゲットとして期待され、近年盛んに研究されている。げっ歯類では肩甲骨間部などに、ヒトでは頸部・腋窩・傍椎体部など、体内の特定の部位に局在する。マウスではコンピューター断層撮影法(CT)を用いた方法が、ヒトでは陽電子放射断層撮影(PET)と CT を組み合わせた方法(PET-CT)により、BAT 造影が行われているが、いずれも選択性や感度の点で課題が残されている。また高額な機器を使用するための経済的問題、検査対象への放射線被爆の問題などの課題がある。一方、光学的技法による簡易な BAT 検出法も提案されている。

産総研、国立国際医療研究センター、北海道大学、東京大学の研究グループは 2017 年に、SWCNT をリン脂質ポリマー(<http://www.mpc.t.u-tokyo.ac.jp/s-innova/technologies.html>)で被覆すると BAT の毛細血管内皮細胞に集積し、BAT が鮮明に造影されることを明らかにした。