

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 22 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ナノニードルアレイを用いた革新的細胞分離解析技術の開発
研究機関・ 部局・職名	独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長
氏名	中村 史

1. 当該年度の研究目的

本研究では、挿入しても細胞にダメージを与えないナノスケールの針材料「ナノニードルアレイ」を用いることで、細胞の生体機能を損なうことなく、多数の細胞を同時に機械的に分離し、解析する全く新しい基盤技術を開発する。

本研究で用いるマウス胚性癌細胞 P19 とマウス繊維芽細胞 NIH3T3 は通常培養時の接着力がそれぞれ 25 nN、60 nN と大きく異なるため、接着力の平準化のための試験細胞として適している。平成 22 年度の研究では、P19 と NIH3T3 をトリプシン処理し、細胞表層タンパク質を処理する条件の検討を行う。BAM などの細胞付着材料による表面修飾を検討し、P19 と NIH3T3 の接着力を等しく 2 nN 程度に平準化することを目的とする。また、本手法で達成できる Adhesion force の最大値を求めることを目的として、抗体固定化方法を検討する。

2. 研究の実施状況

培養皿に対する細胞の接着力を 2 nN(ナニュートン)程度に平準化することを目的とし、細胞をトリプシン処理によって剥離回収し、細胞膜修飾剤 BAM を固定化した基板に再接着させ、接着力を調整する方法を検討した。牛血清アルブミン(BSA)で被覆された表面には細胞は全く接着しない。この BSA に BAM を結合させた複合体を作製し、細胞接着材料として用いた。BAM-BSA 複合体と BSA を様々な比で混合し、ガラス基板に吸着させ、BAM-BSA 固定化基板を作製した。回収した細胞を、BAM-BSA 固定化基板に播種し、AFM 探針で強制剥離させることによって、細胞接着力の測定を行った。P19 と NIH3T3 で検討を行った結果、BAM-BSA 複合体と BSA の混合比を 1:10 にした場合には 5.6 nN 程度、1:100 の場合は 1.3 nN 程度に、接着力の調整が可能であり、P19、NIH3T3 とともに同程度に調整することが可能であることが明らかとなった。

さらに、ナノニードルへの抗体固定化量を増大し、細胞を釣り上げ分離するための結合力 Fishing force を最大化することを試みた。ナノニードルへの抗体の固定化には、東京大学石原研究室の調製する MPC ポリマーを利用している。MPC ポリマーの修飾条件を検討し、抗体固定化量の増大を試みた。調製された抗ネスチン抗体固定化ナノニードルを P19 に挿入し、抜去する際の Fishing force の測定することでその評価を行った。その結果、P19 細胞に挿入した針を引き上げる際に、最大で 5 nN の Fishing force が検出さ

様式19 別紙1

れ、細胞の釣り上げ分離には十分な結合力が達成できることが明らかとなった。また、ネスチン発現を抑制した P19 や、抗体をブロッキングしたナノニードルでは、Fishing force が NIH3T3 と同程度であることを確認した。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 0 件	(掲載済み一査読有り) 計 0 件 (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件
会議発表 計 3 件	<p>専門家向け 計 3 件</p> <p>The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis 三枝真吾、雨宮陽介、木原隆典、岡田知子、石原一彦、中村徳幸、三宅 淳、中村 史 SINGLE CELL DISCRIMINATION BY DETECTING INTERMEDIATE FILAMENTS USING ANTIBODY-IMMOBILIZED NANONEEDLE AND AFM、東京大学、平成 23 年 3 月 3 日～4 日、シングルサーベイヤ研究会</p> <p>日本化学会第 91 春季年会(2011) 河野景子、雨宮陽介、松崎典弥、明石 満、木原隆典、三宅 淳、中村徳幸、中村 史 細胞表面に形成したナノ薄膜の針材料挿入に対する効果 神奈川大学(震災のため大会開催は中止、要旨発表のみ)、平成 23 年 3 月 26 日～29 日、日本化学会</p> <p>2011 年電気化学会第 78 回大会 三枝真吾、雨宮陽介、木原隆典、中村徳幸、三宅 淳、中村 史 抗体修飾ナノニードルを用いた細胞内繊維状タンパク質の力学検出による細胞解析法の開発 横浜国立大学(震災のため大会開催は中止、要旨発表のみ)、平成 23 年 3 月 29 日～31 日、電気化学会</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
図書 計 0 件	
産業財産権 出願・取得状況 計 0 件	(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 0 件
Webページ (URL)	<p>http://unit.aist.go.jp/biomed-ri/biomed-cme/</p> <p>セルサージェリー技術の開発</p> <p>産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門セルメカニクス研究グループ</p>

様式19 別紙1

国民との科学・技術対話の実施状況	平成22年度は未実施であった。
新聞・一般雑誌等掲載計0件	
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成22年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額
直接経費	132,000,000	0	60,146,000	71,854,000
間接経費	39,600,000	0	18,043,800	21,556,200
合計	171,600,000	0	78,189,800	93,410,200

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度 執行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額
直接経費	0	60,146,000	0	60,146,000	1,557,823	58,588,177
間接経費	0	18,043,800	0	18,043,800	467,346	17,576,454
合計	0	78,189,800	0	78,189,800	2,025,169	76,164,631

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	1,494,423	ライフサイエンスステージ、実験試薬等
旅費	30,400	研究打ち合わせ旅費(東京農工大学)
謝金・人件費等	0	
その他	33,000	学会参加費
直接経費計	1,557,823	
間接経費計	467,346	
合計	2,025,169	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
ライフサイエンス ステージ	S-OX-00-L Olympus	1	1,087,275	1,087,275	2011/3/17	東京農工大学
				0		
				0		