

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) 実績報告書

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. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた 額	利息等収入 額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	132,000,000	132,000,000	0	132,000,000	131,958,395	41,605	0
間接経費	39,600,000	39,600,000	0	39,600,000	39,600,000	0	0
合計	171,600,000	171,600,000	0	171,600,000	171,558,395	41,605	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	1,494,423	33,370,224	15,021,391	16,419,199	66,305,237
旅費	30,400	948,547	1,992,961	1,274,001	4,245,909
謝金・人件費等	0	12,976,027	22,210,368	14,255,177	49,441,572
その他	33,000	4,465,158	1,239,778	6,227,741	11,965,677
直接経費計	1,557,823	51,759,956	40,464,498	38,176,118	131,958,395
間接経費計	467,346	17,576,454	10,564,200	10,992,000	39,600,000
合計	2,025,169	69,336,410	51,028,698	49,168,118	171,558,395

4. 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
集束イオンビーム加工装置	SMI500V2	1	14,910,000	14,910,000	2011/10/28	東京農工大学
反射微分干渉顕微鏡システム	オリンパス製	1	5,376,000	5,376,000	2011/12/22	東京農工大学(産業技術総合 研究所で持ち出し許可済(設置 場所変更))
自動接触角計	協和界面科学 製	1	1,584,450	1,584,450	2011/12/21	東京農工大学
ナノニードルアレイ簡易動作装置	オリンパス製	1	1,260,000	1,260,000	2012/1/13	東京農工大学
共焦点顕微鏡用ソフトウェア	U11158-02DC	1	864,675	864,675	2012/6/12	東京農工大学(設置場所変更)
φ8"シリコンウェーハ	導電型:P型(ボ ロン)、結晶方 位:<100>、直 径:200± 0.5mm、厚み:	1	945,000	945,000	2013/2/12	産業技術総合研究所
ディッシュヒーター	JPK製	1	1,047,375	1,047,375	2013/5/29	東京農工大学
アレイ自動撮影システム	オリンパス製	1	1,193,535	1,193,535	2013/9/6	東京農工大学

5. 研究成果の概要

本研究では、iPS細胞の実用化を目指し、新規細胞分離技術の開発を行った。細胞の分離のため、直径200 nm長さ20 μmのナノニードルが、5 mm角のシリコンウェーハ上に30 μm間隔で、100本×100本、合計1万本配置されたナノニードルアレイを作製した。これに対して充填率90%以上でナノニードル直下に細胞を配列させた細胞アレイを作製した。ナノニードルアレイと細胞アレイの精密位置合わせ技術を開発し、抗体を修飾したナノニードルアレイを用いて細胞の釣り上げ分離を試験した。その結果、標的である中間径フィラメント、ネスチンを発現しているP19細胞を回収率24%で分離することに成功し、標的細胞の特異的分離が可能であることを実証した。

課題番号	LR038
------	-------

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) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	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
	Development of a novel cell sorting technology using nanoneedle array
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	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
	Group Leader, Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
氏名 (下段英語表記)	中村 史
	Chikashi Nakamura

研究成果の概要

(和文):本研究では、従来標的に出来なかった細胞内のマーカータンパク質を標的とした新しい細胞分離技術の開発を目的とした。5 mm 角のシリコンウエハ上に、直径 200 nm、長さ 20 μ m のナノニードルが、100 \times 100 本、計1万本規則正しく配列したナノニードルアレイを作製した。このナノニードルアレイを、標的タンパク質を結合する抗体で修飾し、基板の上に配列した1万個の細胞に同時に挿入する。細胞内部の標的タンパク質を抗体で結合しナノニードルアレイを引き上げることにより、標的細胞のみを機械的に釣り上げ、分離することを原理とする。標的である中間径フィラメント、ネスチンを発現している細胞を回収することに成功し、細胞の特異的分離が可能であることを実証した。本技術により、iPS 細胞から分化誘導された細胞群から、目的の細胞のみを正確に分離することが可能になると期待できる。

(英文): In this study, we aimed to develop a new cell separation technology targeting intracellular marker proteins which cannot be targets in conventional cell sorting technologies, e.g. FACS. We have established a fabrication method of a nanoneedle array to separate single cells by inserting nanoneedles of 200 nm in diameter. The nanoneedle array having 10,000 needles on 5 mm square of silicon wafer was modified with antibodies, was approached to 10,000 cell array and was inserted simultaneously to the cells. During the insertion, target cytoskeletal proteins were

bound with the antibodies immobilized on the nanoneedles, subsequently in the retraction of the nanoneedle array, cells containing target proteins could be lifted up mechanically by the binding forces. Intermediate filament nestin positive cell line, P19, could be separated successfully. This method would be applicable for separation of target cells from differentiated iPS cell population.

1. 執行金額 171,558,395 円
 (うち、直接経費 131,958,395 円、間接経費 39,600,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 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、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ことを目的とした。

細胞分離における従来技術では、fluorescence activated cell sorting (FACS)が最も開発が進んでいるが、細胞の表面抗原のみが標的であり、細胞内部のマーカーを標的として分離を行うことが出来なかった。細胞の全タンパク質の90%は細胞の内部にあり、細胞表層に対しておよそ10倍のバラエティが存在している。特に、ケラチン、ビメンチン、デスミン、ニューロフィラメント、ネスチンなどの中間径フィラメントは、細胞特異性が高く、腫瘍マーカーとして、あるいは分化誘導過程におけるマーカーとして用いられるが、このような細胞内のタンパク質を細胞が生きたまま非破壊的に検出することは不可能であった。これらを標的とすることが出来れば、細胞分離の精度はさらに高まり、分化誘導後の iPS 細胞からの目的細胞の分離など、高い細胞純度が必要な場面で威力を発揮する技術となる。

本研究では、細胞を規則正しく配列した細胞アレイを作製し、これに対して正確に同時挿入するナノニードルアレイとその動作装置を開発した。ナノニードルの表面には標的の中間径フィラメントに対する抗体が修飾されており、挿入によって中間径フィラメントと抗体が結合する。ナノニードルと中間径フィラメントの結合力に比べて、細胞の基板に対する接着力が小さくなるように調整し、ナノニードルを引き上げる際に、標的の中間径フィラメントを発現する細胞のみが釣り上げ分離される(図1)。細胞アレイでは、細胞種によって接着力の異なる細胞群に対して、均一な接着力になるように調整されなければならない。本研究では、ネスチンを標的タンパク質とし、ネスチン陽性であるマウス胚性癌細胞 P19 と、ネスチン陰性であるマ

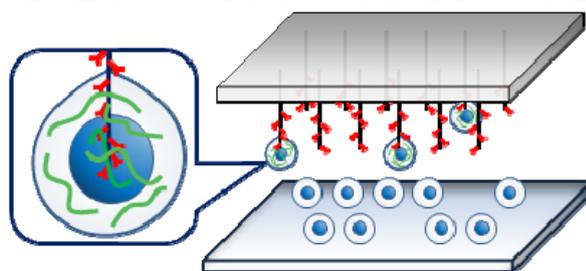


図1 ナノニードルアレイによる機械的細胞分離の概念図

ウス繊維芽細胞 NIH3T3 を用い、機械的に細胞を釣り上げ、強接着基板に接触させ回収する全く新しい細胞分離解析技術を開発することを目的とした。

4. 研究計画・方法

(1) ナノニードルアレイおよび動作装置の作製

ナノニードルアレイは、光リソグラフィと誘導結合プラズマによるドライエッチングにより、マイクロピラーアレイを作製し、湿式熱酸化による酸化と酸化膜除去によって作製した。マスクは、5 mm 角の内側 1 mm を余白として、内側 3 mm 角に 1.8 μm のクロムマスクのドットパターンが 30 μm 間隔で格子状に配列したものを基本設計とした。直径 100 mm、厚さ 400 μm のシリコンウエハに対して、5 mm 角のデバイスを 200 枚程度作製可能である。

シリコンウエハに対して、HMDS、AZ5200 をスピンコートした後に、ポジ型レジスト TSMR-V90 をスピンコートし

た。ステッパー1500MVS (Ultratech)を用いて露光を行った後、NMD-3 を用いて現像を行った。ドライエッチング装置 MUC-21(住友精密工業)を用いて、 SF_6 をエッチングガス、 C_4F_8 を保護ガスとして用いて、ドライエッチングを 200 サイクル行うことにより、マイクロピラーアレイを作製した。プラズマ灰化装置(Samco)を用いて残存レジストの除去を行った後に、全自動式酸化炉を用いておよそ 1100°Cで 10 時間、湿式熱酸化を行った。酸化後、20% BHF による酸化膜除去を行うことで、ナノニードルアレイを得た。ウエハはレーザーステルスダイサーDFL7340 (Disco)を用いて、5 mm 角にダイシングを行った。FE-SEM を用いて観察したナノニードルアレイを図2に示した。マスクは任意のデザインに変更することが可能であり、ナノニードルアレイのデザインも自由に変更することができる。

自作したナノニードルアレイ動作装置を図3に示した。XYZ ステージを、ピエゾモーターによって 0.1~30 $\mu\text{m}/\text{sec}$ で駆動する粗動作を行うことができる。L字型のステーにナノニードルアレイを装着するアームを設置しており、

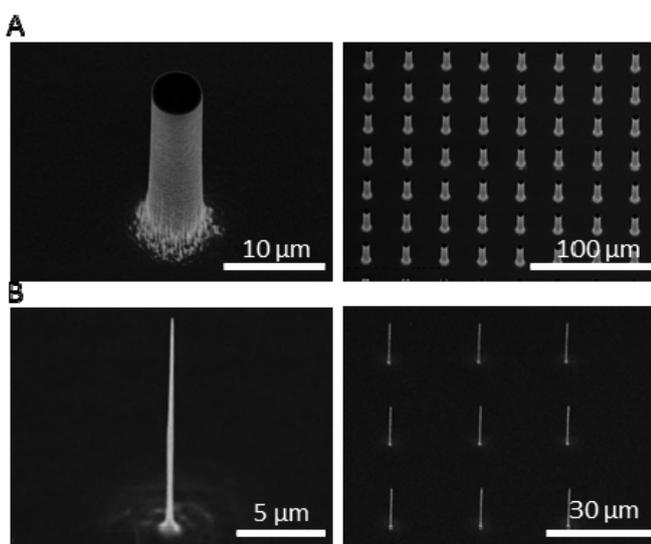


図2 作製されたマイクロピラーアレイ(A)とナノニードルアレイ(B)
(A)直径5 μm 、長さ23 μm (B)直径250 nm、長さ21 μm

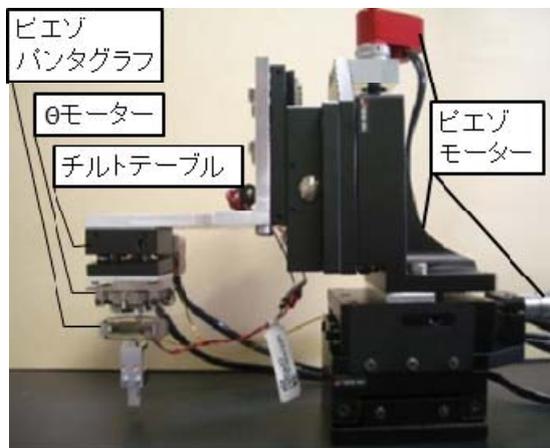


図3 ナノニードルアレイ動作装置

Z ステージの上下によってアームの接近動作を行う。アームとステーの間には、水平調整を行うチルトステージ、 0.005° の精度で回転角を調整する θ モーター、Z 方向の微動作を行うピエゾパンタグラフが設置されており、駆動用電源とファンクションジェネレーターで電位印可を行うことにより、細胞への精密な接近動作が可能である。

(2) ナノニードル上の抗体結合力の増大

抗体結合力は、AFM カンチレバー型ナノニードルを抗ネスチン抗体で修飾し、P19 に挿入抜去する際の結合破断力の最大値から求めた。抗体を固定化する修飾剤として東京大学石原研究室から提供された 10% triethoxysilane、10% NHS を含むランダム共重合 MPC ポリマーと、名古屋大学黒田研究室から提供された proteinA の Fc 結合領域を提示したナノ粒子 ZZ-BNC を用いた。

(3) 接着の平準化された細胞アレイの作製

細胞の基板への接着力は、矢じり型に加工した AFM カンチレバー型ナノニードルを用いた垂直方向への強制剥離により評価した。プラスチックシャーレ上で通常培養した P19、NIH3T3 の基板への接着力は、それぞれ 40 nN、470 nN であり、10 倍以上の差がある。この接着力を細胞種によらず均等に減弱し、細胞を接着する材料として、PEG とオレイル鎖が直鎖上に連結した細胞膜修飾剤 Biocompatible Anchor for Membrane (BAM, SUNBRIGHT OE-020CS, 日油)を用いた。マイクロコンタクトプリント法により、BAM を含むインク液を、マイクロピラーアレイを用いてプラスチックシャーレ上に転写する方法を検討した。

まず 35 mm ϕ のシャーレ上に細胞接着を抑制するウシ血清アルブミン (BSA) の被膜を形成した。BAM をグリセロール、イソプロパノール、DMSO 混合溶液に終濃度 3 mM になるようにインク液を調製し、スピンドーターを用いてスライドガラス上に液膜を形成した。この液膜にマイクロピラーアレイを接触させ、BSA 被膜を形成したシャーレ上に転写し、インキュベーションした。BAM 転写基板に約 100 μ L の細胞懸濁液を滴下し、細胞アレイを形成した。顕微鏡に設置した自動ステージとタイリングソフトウェアにより、1 万個の細胞の明視野像を撮影し、アレイ化した細胞の充填率を評価した。その後、矢じり型ナノニードルを用いて、接着力の評価を行った。

(4) 細胞分離

GFP (緑色)、DsRed2 (赤色)をそれぞれ安定に発現する P19、NIH3T3 を樹立し、同数混合した細胞アレイを作製した。その同一シャーレ内に、BAM を用いて約 100 nN の強接着回収表面を調製した。細胞アレイとナノニードルアレイの同時観察と位置合わせは、反射微分干渉顕微鏡と、自作のずれ角度計算ソフトウェアにより行った。動作装置により、抗体修飾ナノニードルアレイを細胞アレイに対して 8 μ m/sec で 10 回往復させ、挿入動作を行った。その後、強接着表面に接触させ、分離された細胞を回収した。残存した細胞、分離された細胞のタイリング蛍光撮影を行い、細胞種の解析を行った。

5. 研究成果・波及効果

(1) 増大された抗体結合力

従来の化学修飾法による抗体修飾では、数 nN の抗体結合力であった。MPC ポリマーと、

ZZ-BNC を用いた抗体修飾を検討したところ、いずれもネスチン陽性の P19 細胞で 30 nN を超える結合力を達成した(図4)。また 10 nN 以上の結合力を再現性良く得るには、ZZ-BNC の方が優れていることが分った。一方で、ネスチン陰性の NIH3T3 では、平均 2 nN の非特異的相互作用が観察され、細胞アレイでは 2 nN を越える接着力に調製する必要があることが明らかとなった。

(2) 接着力の平準化された細胞アレイ

細胞アレイ調製の各種条件を最適化した結果、ナノニードル直下に1個1個細胞が配列した細胞アレイの作製が可能となり、最大で 95%の細胞充填率を達成した(図5)。また、ナノニードルアレイの直下に細胞は正確に配列していなければならないが、1 mM 以上の BAM インク液を用いることで、中心軸から 5 μm 以上重心がずれた細胞を 5%以下にすることが可能であった。さらなる検討の結果、P19、NIH3T3 ともに約 10 nN に調製することが可能であった。

(3) 細胞分離

P19、NIH3T3 混合細胞アレイと抗体修飾ナノニードルを用い、細胞分離の検証を行った。図6に混合細胞アレイを示した。平均 10 nN の細胞接着力に対して、ZZ-BNC を用いた抗体修飾で期待される抗体結合力は平均 10 nN 程度である。そこで、分離操作では、5 μm 間隔で正三角形に 3 本のナノニードルが配置されたトリプレットナノニードルアレイを用いた。トリプレットナノニードルアレイを用いた細胞分離の結果、24%の P19 の回収に成功した。また、NIH3T3 の誤回収率は 5%に留まった。これらの結果はネスチン陽性の P19 に特異的な細胞分離が可能であることを示している。

本技術は、幹細胞から分化誘導した細胞群の回収する技術に発展するものである。マウス iPS 細胞から神経細胞へ分化誘導し、分化マーカーとなるネスチンを発現した細胞の分離に取り組み、分化誘導したマウス iPS 細胞集団を用いても、充填率 90%以上の細胞アレイを作製出来ることを確認した。継続して神経に分化誘導された細胞の分離を検証している。またさらに、未分化 iPS 細胞についても、マーカーとなりうるビメンチンを標

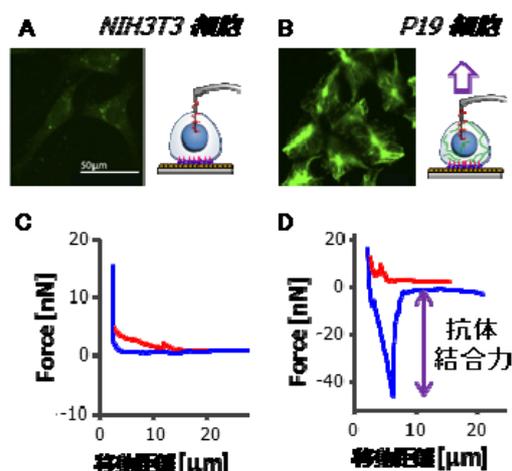


図4 抗体結合力の測定結果
(A, B) ネスチン免疫染色像と(C, D)フォースカーブ

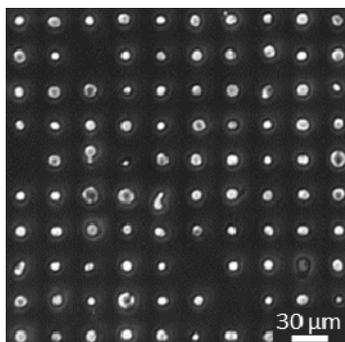


図5 細胞アレイ

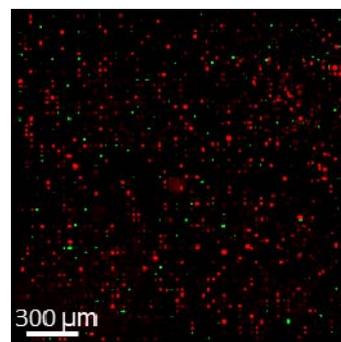


図6 混合した細胞アレイの蛍光像
GFPを発現P19細胞とDsRed2発現NIH3T3細胞

的として、原理的に分離が可能であることを確認している。このように、本技術は iPS 細胞に対して適用可能であり、iPS 細胞の実用化に資する技術に発展することが今後期待される。

(4) まとめ

本研究では、生細胞を抗体修飾ナノニードルで釣り上げて分離可能であることを実証し、多数細胞の同時処理を実現した。他にも、細胞内の浮遊状態のタンパク質を標的として、抽出の後に細胞外で検出し、アレイ上の細胞を特定することも期待でき、生細胞のタンパク質検出技術として汎用性の高い技術に発展すると考えられる。今後、より正確な細胞選別技術に発展させることで安全な再生医療技術への貢献が期待される。また、抗体修飾ナノニードルの飛躍的な性能向上や、平板基板上で着脱可能な単一細胞アレイ調製法の確立など、本研究を通じて開発した要素技術は当初の予想よりも広く応用可能と見られ、今後多様な技術開発の基盤になると考えられる。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計6件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計6件 Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Takanori Kihara, Tomoko Okada, Toshiya Sato, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake and Chikashi Nakamura Mechanical force-based probing of intracellular proteins from living cells using antibody-immobilized nanoneedles Biosensors & Bioelectronics, 31(1), 323-329 (2012) ISSN : 0956 - 5663</p> <p>Yosuke Amemiya, Keiko Kawano, Michiya Matsusaki, Akashi Mistui, Noriyuki Nakamura and Chikashi Nakamura Formation of nanofilms on cell surfaces to improve the insertion efficiency of a nanoneedle into cells Biochemical and Biophysical Research Communications, 420(3), 662-665 (2012) ISSN : 0006-291X</p> <p>Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake and Chikashi Nakamura Evaluation of the actin cytoskeleton state using antibody-functionalized nanoneedle and AFM Biosensors & Bioelectronics, 40(1), 3-9 (2013) ISSN : 0956 - 5663</p> <p>Ryuzo Kawamura, Mari Mishima, Seunghwan Ryu, Yu Arai, Motomu Okose, Yaron R. Silberberg, Sathuluri Ramachandra Rao and Chikashi Nakamura Controlled cell adhesion using a biocompatible anchor for membrane-conjugated bovine serum albumin/bovine serum albumin mixed layer Langmuir, 29(21), 6429-6433 (2013) ISSN: 0743-7463</p> <p>Seunghwan Ryu, Ryuzo Kawamura, Ryohei Naka, Yaron R. Silberberg, Noriyuki Nakamura and Chikashi Nakamura Nanoneedle insertion into the cell nucleus does not induce double-strand breaks in chromosomal DNA Journal of Bioscience and Bioengineering, 116(3), 391-396 (2013) ISSN: 1389-1723</p> <p>Yaron R. Silberberg, Ryuzo Kawamura, Seunghwan Ryu, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara and Chikashi Nakamura Detection of microtubules in vivo using antibody-immobilized nanoneedles Journal of Bioscience and Bioengineering, 117(1), 107-112 (2014) ISSN: 1389-1723</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件 (未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計62件</p>	<p>専門家向け 計57件 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 The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis、東京大学、平成23年3月3日~4日</p>

<p>シングルサーベイヤ研究会</p> <p>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 日本化学会第 91 春季年会(2011)、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>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 2011 年電気化学会第 78 回大会、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>中村 史 抗体修飾ナノニードルを用いた生細胞内タンパク質検出技術 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場、平成 23 年 9 月 12 日～9 月 14 日 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>下奥万梨恵、雨宮陽介、宇田みき、Sathuluri Ramachandra Rao、石原一彦、深沢今日子、中村 史 ナノニードルアレイへの抗体修飾方法の検討 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場、平成 23 年 9 月 12 日～9 月 14 日 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>大小瀬求、雨宮陽介、三枝真吾、Sathuluri Ramachandra Rao、中村 史 細胞分離技術の開発を目的とした細胞接着力の解析と調整 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場、平成 23 年 9 月 12 日～9 月 14 日 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>Sathuluri Ramachandra Rao、雨宮陽介、小林 健、中村 史 単一細胞操作のための高密度シリコンナノニードルアレイの作製 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場、平成 23 年 9 月 12 日～9 月 14 日 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>雨宮陽介、岡田知子、石原一彦、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検出 第 63 回日本生物工学会大会、東京農工大学、平成 23 年 9 月 26 日～9 月 28 日 日本生物工学会</p> <p>雨宮陽介、三枝真吾、北川太郎、金城百合恵、石原一彦、木原隆典、三宅 淳、中村 史 AFM を用いた細胞骨格タンパク質の力学検出による細胞識別 生命科学における走査プローブ法と光ピンセット ワークショップ、駒場コンベンションホー</p>

<p>ル、平成 23 年 9 月 28 日 JPK インストルメンツ</p> <p>中村 史 セルサージェリー技術を用いたバイオセンシング センサ・アクチュエータ・マイクロナノ／ウィーク 2011 次世代センサ総合シンポジウム、東京ビッグサイト、平成 23 年 10 月 12 日～14 日 次世代センサ協議会</p> <p>中村 史 ナノニードルアレイを用いた新規細胞分離技術の開発 第 11 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、産総研つくばセンター共用講堂、平成 24 年 1 月 31 日～2 月 1 日 (独)産業技術総合研究所、産技連ライフサイエンス部会バイオテクノロジー分科会</p> <p>大小瀬求、雨宮陽介、Sathuluri Ramachandra Rao、Silberberg Rafael Yaron、中村 史 細胞分離を目的とした細胞接着力調整方法の検討 日本化学会第 92 春季年会、慶應義塾大学、平成 24 年 3 月 25 日～28 日 日本化学会</p> <p>下奥万梨恵、雨宮陽介、Sathuluri Ramachandra Rao、石原一彦、深沢今日子、中村 史 細胞操作に向けたナノニードルアレイのタンパク質修飾方法の検討 日本化学会第 92 春季年会、慶應義塾大学、平成 24 年 3 月 25 日～28 日 日本化学会</p> <p>Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake, Chikashi Nakamura Evaluation of cytoskeleton state in live cells using an antibody-immobilized nanoneedle Biosensors 2012, Cancun, Mexico, May 15-18, 2012 Elsevier</p> <p>Ramachandra Rao Sathuluri, Yosuke Amemiya, Takeshi Kobayashi, Marie Shimooku, Chikashi Nakamura Development of a silicon nanoneedle array with high-aspect-ratios for analyzing single-cell response Biosensors 2012, Cancun, Mexico, May 15-18, 2012 Elsevier</p> <p>Motomu Okose, Yosuke Amemiya, Yu Arai, Chikashi Nakamura Measurement and control of cell adhesion force to substrate Biosensors 2012, Cancun, Mexico, May 15-18, 2012 Elsevier</p> <p>中村 史 ナノニードルアレイを用いた新しい細胞分離技術の開発 平成 24 年度産官学フォーラム講演会、名古屋大学ES総合館ESホール、平成 24 年 7 月 14 日 電気化学会</p> <p>川村隆三、シルベルベルグヤロン、柳 昇桓、深沢今日子、石原一彦、中村 史 抗体修飾ナノニードルを用いた細胞分離の力学解析 生体機能関連化学部会第 27 回若手フォーラム、北海道大学、平成 24 年 9 月 5 日 日本化学会、生体機能関連化学部会、若手の会</p>

<p>川村隆三、シルベルベルグヤロン、柳 昇桓、深沢今日子、石原一彦、中村 史 抗体修飾ナノニードルを用いた細胞分離におけるフォースカーブ解析 第6回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学高等教育推進機構、平成24年9月6日～8日 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会</p> <p>Chikashi Nakamura Live cell analysis using a nanoneedle functionalized with molecular probes The 6th KIFEE Symposium, Trondheim, Norway, September 10–12, 2012 NTNU</p> <p>Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake, Chikashi Nakamura Evaluation of cytoskeleton state in live cells using an antibody-immobilized nanoneedle IBS2012, Daegu, Korea, September 16–21, 2012 The International Union of Pure and Applied Chemistry, IBS</p> <p>Seung-Hwan Ryu, Taro Kitagawa, Ryuzo Kawamura, Chikashi Nakamura, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake Evaluating the insertion efficiencies of tapered silicon nanoneedles into living single cells PRIME 2012, Honolulu, Hawaii, October 7–12, 2012 The Electrochemical Society</p> <p>Marie Shimooku, Sathuluri Ramachandra Rao, Ryuzo Kawamura, Kazuhiko Ishihara, Kyoko Fukazawa, Chikashi Nakamura Development of a method to modify nanoneedle arrays with molecular probes for the analysis of living cells PRIME 2012, Honolulu, Hawaii, October 7–12, 2012 The Electrochemical Society</p> <p>Chikashi Nakamura, Yaron R. Silberberg, Ryuzo Kawamura, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Takanori Kihara, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake Mechanical force-based probing of cytoskeletal proteins in living cells using antibody-immobilized PRIME 2012, Honolulu, Hawaii, October 7–12, 2012 The Electrochemical Society</p> <p>柳 昇桓、Yaron Silberberg、川村隆三、中村 史 ナノニードルの細胞挿入における加振の効果 第64回日本生物工学会大会、神戸国際会議場、平成24年10月23日～26日 日本生物工学会</p> <p>下奥万梨恵、川村隆三、石原一彦、深沢今日子、中村 史 ナノニードルアレイの抗体修飾方法の検討 第64回日本生物工学会大会、神戸国際会議場、平成24年10月23日～26日 日本生物工学会</p> <p>中村 史 バイオセンサ開発に向けたナノニードルを用いた生細胞解析技術 医療用バイオセンサの製品化を成功させるための最新研究開発と薬事対応、市場開拓、東京 大井町 きゅりあん、平成24年10月30日 株式会社技術情報協会</p>

<p>Yaron Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Chikashi Nakamura A force-based approach for probing the intracellular cytoskeleton 3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop, KKR Hotel Kanazawa, November 5-8, 2012 Kanazawa University</p> <p>Yaron Rafael Silberberg, Ryuzo Kawamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Chikashi Nakamura Mechanical force-based probing of cytoskeletal proteins in single living cells using antibody-immobilized nanoneedle International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, Kyoto Research Park, Kyoto, November 27-28, 2012 The Society for Single-Cell Surveyor</p> <p>Yaron R. Silberberg、三枝真吾、雨宮陽介、深沢今日子、石原一彦、中村 史 A novel method for the label-free detection of cytoskeletal components in live cells using antibody-immobilized nanoneedles 第12回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、産総研つくばセンター共用講堂、平成25年2月5日～6日 (独)産業技術総合研究所、産技連ライフサイエンス部会、バイオテクノロジー分科会</p> <p>川村隆三、Yaron R. Silberberg、柳 昇桓、深沢今日子、石原一彦、中村 史 細胞分離に向けた抗体修飾ナノニードルによる接着細胞の力学的解析 第12回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、産総研つくばセンター共用講堂、平成25年2月5日～6日 (独)産業技術総合研究所、産技連ライフサイエンス部会、バイオテクノロジー分科会</p> <p>Sathuluri Ramachandra Rao、小林 健、下奥万梨恵、川村隆三、中村 史 High aspect ratio silicon nanoneedle array fabrication for single cell manipulations 第12回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、産総研つくばセンター共用講堂、平成25年2月5日～6日 (独)産業技術総合研究所、産技連ライフサイエンス部会、バイオテクノロジー分科会</p> <p>Ramachandra Rao Sathuluri, Takeshi Kobayashi, Marie Shimooku, Ryuzo Kawamura, Chikashi Nakamura Development of High-aspect-ratio Silicon Nanoneedle Array for Single-cell Manipulations INDO-US International Workshop on Nanosensor Science & Technology, Berhampur, Odisha, India, February 27-March 1, 2013 National Institute of Science & Technology</p> <p>川村隆三、三島麻里、シルベルベルグヤロン、深沢今日子、石原一彦、中村 史 細胞分離に向けた細胞接着制御とその力学的解析 日本化学会第93春季年会(2013)、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成25年3月22日～25日 日本化学会</p> <p>中 涼平、柳 昇桓、川村隆三、中村 史 γ-H2AX 発現解析によるナノニードル核挿入のリスク評価 日本化学会第93春季年会(2013)、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成25年3月22日～25日 日本化学会</p> <p>宮崎みなみ、川村 隆三、サトウルリラマチャンドラオ、小林 健、石原一彦、深沢今日子、岩田</p>

<p>太、中村 史 マイクロピラーを用いたコンタクトプリント法による単一細胞アレイの作製 日本化学会第 93 春季年会(2013)、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成 25 年 3 月 22 日～25 日 日本化学会</p> <p>下奥万梨恵、宮崎みなみ、川村隆三、サトウルリラマチャンドラオ、小林 健、辻村範行、中村徳幸、岩田 太、中村 史 ナノニードルアレイを用いた細胞への遺伝子導入法の開発 電気化学会第 80 回大会、東北大学川内キャンパス、平成 25 年 3 月 29 日～31 日 電気化学会</p> <p>柳 昇桓、川村隆三、上野隆史、中村 史 高効率な細胞へのナノニードル挿入方法の開発 電気化学会第 80 回大会、東北大学川内キャンパス、平成 25 年 3 月 29 日～31 日 電気化学会</p> <p>Ryuzo Kawamura, Yaron R. Silberberg, Seung-Hwan Ryu, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Chikashi Nakamura Analysis of forces required for cell detachment by using antibody-immobilized nanoneedle 日本組織培養学会第 86 回大会、産総研つくばセンター共用講堂、平成 25 年 5 月 30 日～31 日 日本組織培養学会</p> <p>中村 史 ナノニードルによる力学的細胞計測 フリーラジカルサマースクール in 館山 2013、筑波大学館山研修所、平成 25 年 8 月 7 日～9 日 フリーラジカルスクール実行委員会</p> <p>三島麻里、川村隆三、大小瀬求、中村 史 BAM-BSA/BSA 混合被膜による細胞弱接着基板の作製 第 65 回日本生物工学会大会(2013)、広島国際会議場、平成 25 年 9 月 18 日～20 日 日本生物工学会</p> <p>宮崎みなみ、清水桂太、川村隆三、Sathuluri Ramachandra Rao、小林 健、飯嶋益巳、黒田俊一、深沢今日子、岩田 太、中村 史 抗体修飾ナノニードルを用いた細胞の機械的分離 第 65 回日本生物工学会大会(2013)、広島国際会議場、平成 25 年 9 月 18 日～20 日 日本生物工学会</p> <p>松本大亮、加藤義雄、寺本健太郎、吉田 亘、阿部公一、池袋一典、中村 史 Zinc-finger nuclease を細胞内で特異的に放出する表面修飾法の検討 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学東山キャンパス、平成 25 年 9 月 27 日～29 日 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>宮崎みなみ、川村隆三、サトウルリラマチャンドラオ、小林 健、飯嶋益巳、黒田俊一、深沢今日子、石原一彦、岩田 太、中村 史 抗体修飾ナノニードルアレイによる細胞の釣り上げ分離 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学東山キャンパス、平成 25 年 9 月 27 日～29 日 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p>
--

<p>柳 昇桓、川村隆三、松本崇裕、上野隆史、中村 史 ナノニードルの部分修飾による多機能化 第7回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学東山キャンパス、平成25年9月27日～29日 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>川村隆三、宮崎みなみ、サトウルリラマチャンドラオ、小林 健、飯嶋益巳、黒田俊一、深沢今日子、石原一彦、岩田 太、中村 史 細胞の機械的分離に向けたナノニードルの抗体修飾と細胞培養基板の接着制御 第7回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学東山キャンパス、平成25年9月27日～29日 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>Mari Mishima, Ryuzo Kawamura, Tomoko Okada, Chikashi Nakamura AFMを用いた強制剥離による細胞接着力の評価/Evaluation of cell adhesion force by mechanical detachment using AFM 第51回日本生物物理学会年会、国立京都国際会館、平成25年10月28日～30日 日本生物物理学会</p> <p>Minami Miyazaki, Ramachandra Rao Sathuluri, Marie Shimooku, Ryuzo Kawamura, Takeshi Kobayashi, Futoshi Iwata, Chikashi Nakamura Development of high-aspect-ratio silicon nanoneedle array for living cell manipulations 2013 MRS Fall Meeting & Exhibit, Boston, Massachusetts, USA, December 1-6, 2013 Materials Research Society</p> <p>Ryuzo Kawamura, Mari Mishima, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Chikashi Nakamura Cell-fishing with antibody-functionalized nanoneedles for specific cell separation 3rd NANO TODAY CONFERENCE, Biopolis, Singapore, December 8-11, 2013 Institute of Bioengineering and Nanotechnology and Nano Today</p> <p>Ramachandra Rao Sathuluri, Marie Shimooku, Minami Miyazaki, Ryuzo Kawamura, Takeshi Kobayashi, Futoshi Iwata, Chikashi Nakamura Development of high-aspect-ratio silicon nanoneedle array for high-throughput single-cell manipulations 3rd NANO TODAY CONFERENCE, Biopolis, Singapore, December 8-11, 2013 Institute of Bioengineering and Nanotechnology and Nano Today</p> <p>中村 史 ナノニードルアレイを用いた細胞分離技術/Cell sorting technology using nanoneedle array 第13回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、産総研つくばセンター共用講堂、平成26年2月18日～19日 (独)産業技術総合研究所 産業技術連携推進会議、ライフサイエンス部会、バイオテクノロジー分科会</p> <p>中村 史 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 最先端研究開発支援プログラム FIRST シンポジウム「科学技術が拓2030年」へのシナリオ、ベルサール新宿グランド、平成26年2月28日 株式会社早稲田総研イニシアティブ</p> <p>橋爪祐衣、三島麻里、川村隆三、田村麿聖、松井裕史、中村 史 AFMを用いた細胞接着力測定における交互積層ナノ薄膜の効果</p>
--

<p>日本化学会第 94 春季年会(2014)、名古屋大学 東山キャンパス、平成 26 年 3 月 27 日～30 日 日本化学会</p> <p>宮崎みなみ、川村隆三、Sathuluri Ramachandra Rao、小林 健、飯嶋益巳、黒田俊一、岩田 太、中村 史 ナノニードルアレイを用いた細胞分離における細胞アレイの接着力制御 日本化学会第 94 春季年会(2014)、名古屋大学 東山キャンパス、平成 26 年 3 月 27 日～30 日 日本化学会</p> <p>三島麻里、橋爪祐衣、川村隆三、岡田知子、中村 史 AFM を用いた垂直剥離による細胞接着力測定法の開発 電気化学会第 81 回大会、関西大学千里山キャンパス、平成 26 年 3 月 29 日～31 日 電気化学会</p> <p>下奥万梨恵、川村隆三、サトウルリラマチャンドラオ、小林 健、岩田 太、中村 史 ナノニードルアレイを用いた細胞への遺伝子導入における取り込み機構の解析 電気化学会第 81 回大会、関西大学千里山キャンパス、平成 26 年 3 月 29 日～31 日 電気化学会</p> <p>松本大亮、加藤義雄、吉田亘、阿部公一、深澤今日子、石原一彦、池袋一典、中村 史 人工ヌクレアーゼの細胞への直接導入によるゲノム編集の検討 電気化学会第 81 回大会、関西大学千里山キャンパス、平成 26 年 3 月 29 日～31 日 電気化学会</p> <p>一般向け 計 5 件 中村 史 ナノニードルアレイセルソーター バイオジャパン 2011、パシフィコ横浜、平成 23 年 10 月 5 日～7 日 BioJapan 組織委員会</p> <p>中村 史 生きている細胞を小さな針で選り分ける 産総研一般公開、産総研つくばセンター、平成 24 年 7 月 21 日 (独)産業技術総合研究所</p> <p>中村 史 ナノニードルアレイセルソーター バイオジャパン 2012、パシフィコ横浜展示ホール、平成 24 年 10 月 10 日～12 日 BioJapan 組織委員会、株式会社 ICS コンベンションデザイン</p> <p>中村 史 生きている細胞をナノニードルで選り分ける 産総研一般公開、産総研つくばセンター、平成 25 年 7 月 20 日 (独)産業技術総合研究所</p> <p>中村 史 ナノニードルアレイを用いた細胞分離技術 産総研 新技術説明会、JST 東京別館ホール、平成 26 年 2 月 21 日 (独)産業技術総合研究所、科学技術振興機構</p>
--

様式21

<p>図書 計3件</p>	<p>木原隆典、中村 史、三宅 淳 「ナノニードルによる細胞内分子評価と生体適合性高分子の利用」 月刊ファインケミカル 2011年10月号、pp33-40、シーエムシー出版、2011年、総88頁 ISBN:0913-6150</p> <p>中村 史 「抗体修飾ナノニードルを用いた生細胞内タンパク質検出技術」 バイオイメージング、20(3)、pp1-7、日本バイオイメージング学会、2012年、総20頁</p> <p>中村 史 「ナノニードル技術:AFMを用いた細胞計測」 スマート・ヒューマンセンシング ~健康ビッグデータ時代のためのセンサ・情報・エネルギー技術~、 シーエムシー出版、pp256-264、2014年、総265頁 ISBN: 978-4-7813-0934-7、バイオテクノロジーシリーズ</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計4件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計4件</p> <p>特許(外国) 中村 史 「細胞の分離法および分離装置」 独立行政法人産業技術総合研究所 13/583746 (US) 平成23年3月9日 US-2013-0005038-A1 平成25年1月3日</p> <p>特許(外国) 中村 史 「細胞の分離法および分離装置」 独立行政法人産業技術総合研究所 11753398.4 (EP) 平成23年3月9日 2546328 (EP) 平成25年1月16日</p> <p>特許(国内) 中村 史 「細胞分離用接着基板」 独立行政法人産業技術総合研究所 特願2012-040201 平成24年2月27日 特開2013-172690 平成25年9月5日</p> <p>特許(国内) 小林 健、中村 史、Sathuluri Ramachandra Rao 「ナノニードルアレイ」 独立行政法人産業技術総合研究所 特願2012-052506 平成24年3月9日 特開2013-183706 平成25年9月19日</p>

様式21

<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://unit.aist.go.jp/biomed-ri/biomed-cme/ センサーゼリー技術の開発 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>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>「ナノニードルアレイセルソーター」 バイोजパン 2011、パシフィコ横浜、平成 23 年 10 月 5 日～7 日、対象者：一般および業界関係者、参加者数：11,940 人 内容：細胞内のマーカータンパク質を標的とした新しい細胞分離技術について、ポスター形式により発表を行った。</p> <p>産総研一般公開「生きている細胞を小さな針で選り分ける」、平成 24 年 7 月 21 日、産総研つくばセンター 対象者：一般および業界関係者、参加者数：5,659 名 内容：見学ツアーにおいて、ナノニードルを用いて細胞を選別する方法を、子供達にも分かり易いようデモンストレーションした。</p> <p>バイोजパン 2012「ナノニードルアレイセルソーター」、平成 24 年 10 月 10 日～12 日、パシフィコ横浜展示ホール 対象者：一般および業界関係者、参加者数：12,369 名 内容：ナノニードルアレイを多数の細胞に対して同時挿入し、目的細胞を機械的に分離する装置の開発についてポスター形式で発表を行った。</p> <p>産総研一般公開「生きている細胞をナノニードルで選り分ける」、平成 25 年 7 月 20 日、産総研つくばセンター 対象者：一般および業界関係者、参加者数：5,909 名 内容：見学ツアーにおいて、ナノニードルを用いて細胞を選別する方法を子供達にも分かり易いよう模型などを用いてデモンストレーションした。</p> <p>中村 史 産総研 新技術説明会「ナノニードルアレイを用いた細胞分離技術」、平成 26 年 2 月 21 日 JST 東京別館ホール 対象者：一般および業界関係者、参加者数：65 名 内容：実用化に向けての可能性について企業に対して説明を行い、企業からの問い合わせを受けた。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載計 1 件</p>	<p>日経産業新聞平成 23 年 5 月 17 日 10 面 「ナノニードルによる細胞内 mRNA の検出」</p>
<p>その他</p>	

7. その他特記事項

22nd Anniversary World Congress on Biosensors において本研究プログラムの成果論文が Best Paper Award 2012, For an outstanding contribution to Biosensors and Bioelectronics を受賞した。受賞論文は

様式21

Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake and Chikashi Nakamura

Evaluation of the actin cytoskeleton state using antibody-functionalized nanoneedle and AFM
Biosensors & Bioelectronics, 40(1), 3-9 (2013)

である。日本のグループからの最高論文賞(1位)の受賞は初めての快挙である。