

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)
実施状況報告書(平成25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

平成 25 年度研究では、ナノニードルアレイを用いた細胞分離の検証を目的とした。平成 24 年度までに開発したナノニードルアレイは、5 mm 角のシリコンウエハに 30 μm 間隔で縦横 100 本ずつ、合計1万本のナノニードルを配置したものである。マイクロピラーアレイを用いたコンタクトプリント法により、ナノニードル直下に細胞を配列させた細胞アレイの作製が可能となっているが、その充填率 80%以上を達成することを目標とした。さらに、ナノニードルアレイと細胞アレイの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による細胞の釣り上げ分離を実証することを目指した。釣り上げた細胞は、高接着基板にて回収し、回収された細胞、細胞アレイ上に残存した細胞をそれぞれ解析し、細胞分離効率を検証した。

2. 研究の実施状況

共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて、細胞アレイに対するナノニードルアレイの挿入を観察した結果、1箇所に1本の通常のナノニードルはもとより、1箇所に3本のナノニードルを配置した triplet ナノニードルでも1個の細胞に同時挿入可能であることが明らかとなった。効率的な細胞分離を実現する為に、細胞アレイの細胞充填率の向上を試みた。マイクロピラーアレイを用いたマイクロコンタクトプリントにより細胞の接着スポットを作製する工程において、温度、湿度を精密に制御することで、接着力を 10 nN 程度に維持しつつ、目標の充填率 90%を達成することが可能であった。また、1 万個の多数細胞の同時処理を迅速に行うために、細胞アレイとナノニードルアレイの画像から相対的な回転角度ズレを算出するソフトウェアを開発し、ピエゾ回転モーターで補正することで、位置合わせを3分以内に完了できるようになった。

抗体結合力を増大し、細胞の釣り上げ分離を達成するために、ナノニードル表面に抗体を修飾する方法として、抗体を結合する Zドメインを多数配置したナノ粒子 ZZ-BNC を利用することにより、配向が制御された修飾を検討した結果、従来法と比較し、抗原検出の S/N 比が大幅に向上した。

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 細胞と、ネスチン陰性の NIH3T3 細胞について、それぞれ蛍光タンパク質安定発現株を樹立し、イメージングサイトメトリーによる分離効率評価を行った。抗体修飾ナノニードルアレイを用いて、混合細胞アレイから細胞分離を行い、強接着基板に細胞を回収した結果、P19 の回収率 24%、NIH3T3 の誤回収率は 5%であったことから、ネスチン陽性細胞の特異的分離が可能であることが実証された。マウス iPS 細胞から神経へと分化誘導した細胞群を用いて、充填率 90%以上の細胞アレイの作製に成功しており、本技術が iPS 細胞へ応用可能であることを示した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 3 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件 Ryuzo Kawamura, Mari Mishima, Seunghwan Ryu, Yu Arai, Motomu Okose, Yaron R. Silberberg, Sathuluri Ramachandra Rao, 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, 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, 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</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 21 件</p>	<p>専門家向け 計 19 件 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、サトゥ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、サトゥルリラマチャンドラ 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 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ウンド、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 磨聖、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>
--	---

様式19 別紙1

	<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、サトゥ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2件 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 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 産業技術総合研究所、科学技術振興機構</p>
<p>図書 計1件</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、pp.256-264、2014年、総ページ数:265 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0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://unit.aist.go.jp/biomed-ri/biomed-cme/ センサージェリー技術の開発 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>

様式19 別紙1

<p>国民との科学・技術対話の実施状況</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 0 件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	132,000,000	95,360,000	36,640,000	0	0
間接経費	39,600,000	28,608,000	10,992,000	0	0
合計	171,600,000	123,968,000	47,632,000	0	0

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	当該年度返還 額
直接経費	1,577,723	36,640,000	0	38,217,723	38,176,118	41,605	0
間接経費	0	10,992,000	0	10,992,000	10,992,000	0	0
合計	1,577,723	47,632,000	0	49,209,723	49,168,118	41,605	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	16,419,199	アレイ自動撮影システム、実験試薬等
旅費	1,274,001	研究成果発表旅費(シンガポール)等
謝金・人件費等	14,255,177	博士研究員人件費、テクニカルスタッフ人件費
その他	6,227,741	学会参加費、修理等
直接経費計	38,176,118	
間接経費計	10,992,000	
合計	49,168,118	

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
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
				0		