

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02032

研究課題名(和文)カーボンナノウォールシートエッジエレクトロニクス創成と単一細胞の分化誘導制御

研究課題名(英文)Construction of carbon nanowall sheet edge electronics and differentiation induction control of single cell

研究代表者

堀 勝 (Hori, Masaru)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：80242824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,500,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノウォール(CNW)のシートナノエッジから発現する電子物性と細胞との相互作用の体系化な解明による、細胞の接着、形態と分化誘導制御が可能なバイオデバイスとプラズマバイオエレクトロニクスの開拓を目的に、CNW足場上での電気刺激重畳が骨芽細胞の増殖・分化(骨化)に及ぼす効果を解明した。周波数10 Hzの電気刺激を重畳した場合においてのみ、特異的に増殖促進と骨化の抑制が確認された。更に壁密度に対する依存性や、骨化を伴わない細胞塊の形成も見出された。これらはCNW表面のシートエッジと電気刺激とのシナジーによる細胞増殖と分化の変化を示唆し、多様な再生医療での新しい細胞制御技術の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to cultivate biotechnology devices and plasma bioelectronics that can control adhesion, morphology and differentiation induction of cells by systematic elucidation interaction between electronic properties developed from nanosheet-edges in carbon nanowall (CNW) and cells, the effects of superimposed electrical stimulation on the CNW scaffold on the proliferation / differentiation (ossification) of osteoblasts were elucidated. Proliferation promotion and suppression of ossification were specifically confirmed only when the electrical stimulation at the frequency of 10 Hz was superimposed. Furthermore, the dependence on wall density and the formation of cell clumps without ossification were also found. These suggest changes in cell proliferation and differentiation due to the synergy between the sheet edge on the CNW surface and electrical stimulation, and establishment of new cell control technology in various regenerative medicine is expected.

研究分野：プラズマ科学

キーワード：プラズマ カーボンナノウォール グラフェンエッジ 分化誘導 骨芽細胞 細胞外カルシウム 細胞内カルシウム

### 1. 研究開始当初の背景

2004年に平面型(2次元グラフェンシート)のグラフェンシートの電子デバイス応用への論文が発表されて以来、この8年に亘って爆発的に平面型グラフェンの研究が発展し、その成果はノーベル賞に至った。一方、時期を全く同じにして、我々はプラズマプロセスの高度化により、カーボンナノウォール(3次元グラフェンシート): CNWを触媒なしで、形態の精密制御ができる新しい合成法を世界で初めて開発し[1]、そのオリジナリティと成果を論文と特許(特許第3962420号、他22件)、著書[2]で集積してきた。平面型グラフェンシートは、sp<sup>2</sup>軌道を有した積層グラフェンシートに由来した新しい物性が次々に見出されたが、CNWは、図1に示すように、グラフェンシートが垂直に並んだ3次元ナノ構造を有しており、ナノチューブには無い、シート状のエッジを利用した新しいグラフェン機能を発現できる。我々は、基盤研

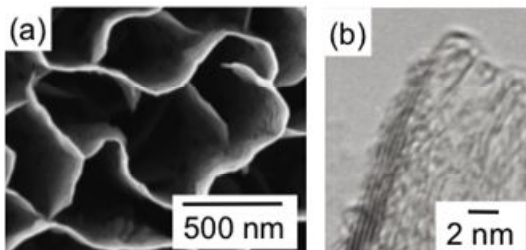


図1 カーボンナノウォールの  
(a)平面 SEM 像および(b)TEM 像

究(A)(H17~19)「CNWを基盤とする次世代高性能ディスプレイの開発」において、先端エッジの化学修飾で、低電界しきい値(1.5 V/cm)の電子放出デバイスの創製に成功している。特定領域「シリコンナノエレクトロニクスの新展開(H18~21:低次元カーボン系チャネルエンジニアリング)において、世界で初めて半導体的特性を有したCNWの合成と物性制御によるバンドギャップ(100 meV)の発現を見出した。基盤研究(A)(H20~22)「CNWの超高速・超精密形成と次世代燃料電池デバイスへの応用」においては、超高密度白金ナノ粒子担持CNW(2nm径の微粒子Ptを $10^{13} \text{ cm}^{-3}$ の密度で担持)を合成し、燃料電池への応用に成功した。最近、我々はCNWの特異な形態やその1~5 nmサイズのエッジ効果を利用することで、今まで観測できなかった生体高分子を高精度で分析できることや、再生医療に必要な不可欠な立体細胞を合成できることを発見した。これらの現象は、平面型グラフェンシートでは発現できない画期的な成果であり、最近では、世界中でナノグラフェンのエッジに注目が集まるに至っている。さらに、我々はラジカル処理によって制御したCNWの表面化学状態が、細胞の接着やその成長に大きな影響を与えることは見出したが、再生医療の展開に必要な、細胞接着と成長、形態と分化誘導を決定づけている要因の特定とその制御方法のための

基礎科学の確立には至っていない。

これらの基盤研究を基に、CNWの幅や形状とその化学構造を制御したシートナノエッジから発現する電子物性を体系的に解明するとともに、その特異な電子化学状態と細胞との相互作用を体系化することで、単一細胞の接着、形態と分化誘導制御が実現できる新バイオデバイスの創製と新たなプラズマバイオエレクトロニクス分野の開拓が可能であるとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

グラフェンシートが垂直に並んだ3次元ナノ構造(カーボンナノウォール: CNW)は、ナノシートのエッジから発現する機能より、平面型グラフェンシートにはない未踏の物性や応用が期待できる。我々は、半導体特性を示すCNWの合成やn型CNWによる電子エミッタ特性を世界で初めて発見するとともに、CNWのエッジから発現する新現象として、ソフトレーザー脱離法を用いて今まで観測できなかった高分子の超高精度計測、再生医療に必要な不可欠な立体細胞の合成にも成功した。本研究の目的は、1)直線、曲線、リング状ナノワイヤーなどシートエッジ形状をデザインしたCNWマトリクスアレイの創成、2)CNWのエッジから発現する新物性、3)エッジと単一細胞との相互作用を学術的に体系化し、新しいバイオエレクトロニクスを創成することである。

### 3. 研究の方法

金属基板上にCNW足場を形成し、ラジカル(酸化、水素化、窒化、塩素化、フッ素化)により化学終端されたシートナノエッジから発現する機能(疎水・撥水、二次電子、プラズモン、磁性)を計測し、その機構を解明する。次に、CNW足場上の細胞に対する、エッジからの電気刺激や光電子および磁界によって、細胞内の特定の部位を刺激する。細胞内の特定部位の刺激から誘発されるシグナルトランスファーを解明し、生体シグナルを制御することで、単一細胞の接合や分化誘導を決定する因子を解明する。CNWのエッジから誘発される物性を体系化し、エッジエレクトロニクスを創成するとともに、単一立体細胞の感受性と応答を制御するシグナルパスを制御することで、再生医療で強く望まれている立体細胞の分化誘導制御を実現するバイオエレクトロニクスを開拓する。

### 4. 研究成果

本研究では、グラフェンシートが垂直に並んだ3次元ナノ構造を有するカーボンナノウォール(CNW)上において細胞分化誘導の誘起とその制御を行うデバイスの作成を行った。本デバイスはシートエッジが酸素、窒素、フッ素、水素により終端されたCNWを使用することでシートエッジの化学終端による細胞培養への影響を系統的に評価するこ

とができるとともに、培養細胞に対して微小な電気刺激を与えることができる機能を有しており、電気刺激による細胞の培養および分化誘導への影響を調査することが可能である(図2)。まず構築したデバイス进行评估す

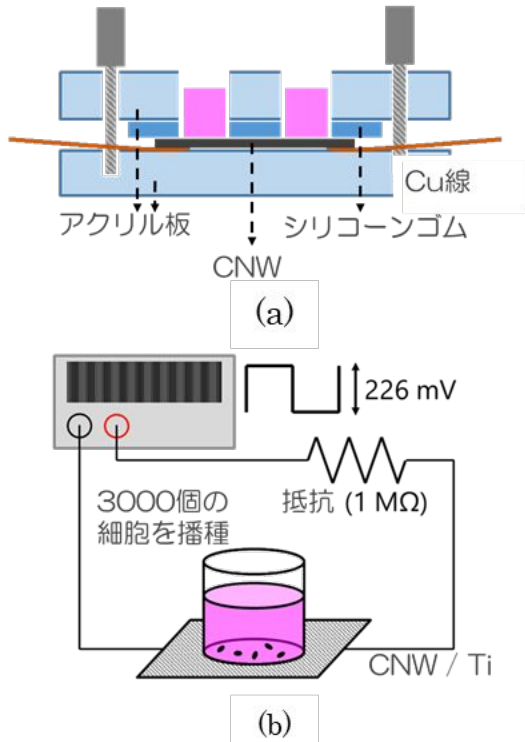


図2 (a)カーボンナノウォール足場を用いた細胞培養デバイスと(b)電気刺激印加回路の模式図

ることを目的に、シートエッジが水素原子により終端されたCNWを用いたデバイスにおいてヒト由来骨芽細胞様細胞 (Saos-2) を培養した。本実験ではラジカル注入型プラズマ励起化学気相堆積 (RI-PECVD) 装置を用いてTi基板上にCNWを成長し、同基板上でSaos-2を37°C、CO<sub>2</sub>が5%の環境で培養した。電気刺激は振幅226 nAの方形波をTi基板に印可した。図3は、10日間培養後における骨芽細胞における細胞外カルシウム量(左縦軸)と、100時間培養後における同細胞の細胞数(右縦軸)に対する電気刺激の周波数依存性である。

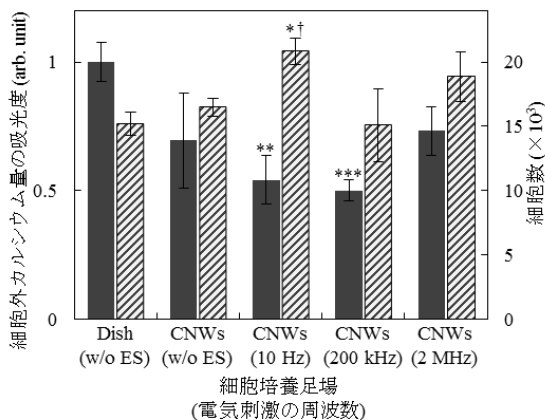
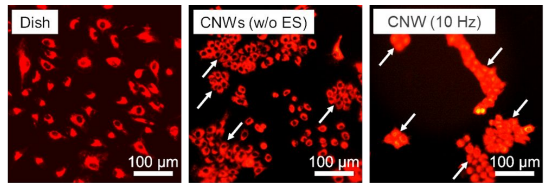


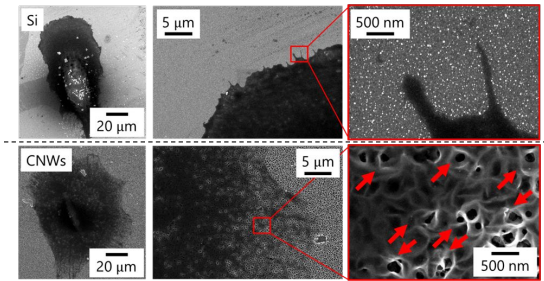
図3 培養後の細胞外カルシウムと細胞数

[\*: p<0.05 vs. Dish, \*\*: p<0.01 vs. Dish, \*\*\*: p<0.005 vs. Dish, †: p<0.05 vs. CNWs (w/o ES)]

前者は、骨細胞への分化の程度を評価する指標として広く用いられている。CNW上で10 Hzの電気刺激を加えた場合において、商用ディッシュと比較して27%の細胞数の増加と56%の分化抑制が確認された。一方、蛍光顕微鏡観察や走査型電子顕微鏡観察においては、細胞の集合体であるnoduleや、CNWの形状を反映した細胞先端の形状などが観察された。これらの結果は、CNWと電気刺激の組み合わせの細胞制御手法としての有用性を示唆するものと考えられる。特に、分化を抑制しつつ増殖速度を上昇させることは、骨粗鬆症の再生医療技術を用いた治療の実現に資するものと期待される。



(a) 蛍光顕微鏡像



(b) Si基板(平滑表面)上とCNW足場上の細胞のSEM像

図4 市販の細胞培養ディッシュ、Si基板およびCNW上で培養したSaos-2の(a)蛍光顕微鏡写真と(b)SEM像

次にCNW特有のどのような物性・ナノ構造が、電気刺激との相乗作用を誘起しているかを明らかとするために、CNWの密度に対する細胞増殖速度と骨化度に依存性について調べた。具体的には、隣接する壁間隔が208 nm(高密度)と341 nm(低密度)の2種類のCNWを、ラジカル注入型プラズマ励起化学気相堆積装置を用いてTi基板上に成長し、同基板上でSaos-2を培養した。電気刺激は方形波をTi基板に印可した。電気刺激の電流振幅を113から371 nAまで変化して96時間培養後における細胞数を調べた結果、いずれにおいても低密度(壁間隔341 nm)なCNWの

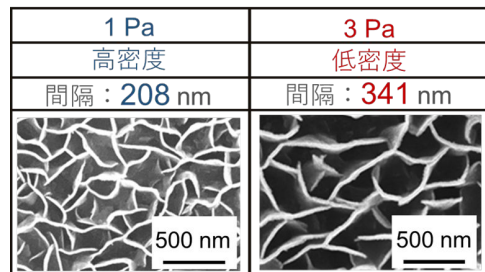


図5 隣接する壁間隔が208 nm(高密度)と341 nm(低密度)のCNWのSEM像

場合にのみ、優位な細胞数の増加が見られた (226 nA の場合において 58%増加)。また蛍光試薬 (Fluo-4AM) を用いて細胞内カルシウム量のイメージングを行ったところ、低密度な CNW の場合にのみ、電気刺激印可後に細胞内から  $\text{Ca}^{2+}$  の増加を示す蛍光シグナルの増大が観測された(図 6)。すなわち、CNW 表面の

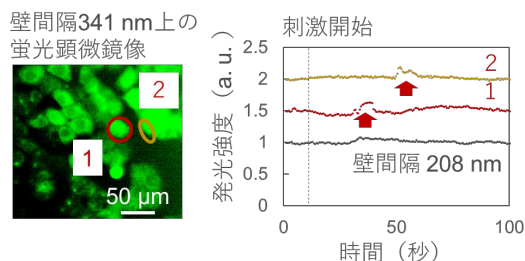


図 6 壁間隔が 341 nm (低密度) の CNW 上で培養した Saos-2 における細胞内カルシウムの蛍光顕微鏡像と蛍光強度.

シートエッジと電気刺激とのシナジーによる細胞増殖と分化の変化が示唆され、多様な再生医療における新しい細胞制御技術の確立が期待される。

#### 参考文献

- [1] Applied Physics Letters, Vol.84, No.23, pp.4708-4710 (2004)  
 [2] Mineo Hiramatsu and Masaru Hori 著 : Carbon Nanowalls: Springer 2010 (国際学会), 2017.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

- Masakazu Tomatsu, Mineo Hiramatsu, John S. Foord, Hiroki Kondo, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine, Keigo Takeda and Masaru Hori, Hydrogen peroxide sensor based on carbon nanowalls grown by plasma-enhanced chemical vapor deposition, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, Vol. 56, 2017, 06HF03-1-6, DOI: 10.7567/JJAP.56.06HF03  
 Manish Kumar, Jin Xiang Piao, Su B. Jin, Jung Heon Lee, Satomi Tajima, Masaru Hori, Jeon Geon Han, Low temperature plasma processing for cell growth inspired carbon thin films fabrication, Arch. Biochem. Biophys., 査読有, Vol. 605, 2016, 41-48, DOI: 10.1016/j.abb.2016.03.026  
 Amjed Javid, Manish Kumar, Seokyoung Yoon, Jung Heon Lee, Satomi Tajima, Masaru Hori and Jeon Geon Han, Role of surface-electrical properties on the cell-viability of carbon thin films

grown in nanodomain morphology, J. Phys. D: Appl. Phys., 査読有, Vol. 49, 2016, 264001:1-7, DOI: 10.1088/0022-3727/49/26/264001

Lingyun Jia, Hirotsugu Sugiura, Hiroki Kondo, Keigo Takeda, Kenji Ishikawa, Osamu Oda, Makoto Sekine, Mineo Hiramatsu, Masaru Hori, Effect of gas residence time on near-edge X-ray absorption fine structures of hydrogenated amorphous carbon films grown by plasma-enhanced chemical vapor deposition, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, Vol. 55, 2016, 040305-1-4, DOI: 10.7567/JJAP.55.040305

Takayoshi Tsutsumi, Takayuki Ohta, Keigo Takeda, Masafumi Ito, Masaru Hori, Wavelength dependence for silicon-wafer temperature measurement by autocorrelation type frequency-domain low-coherence interferometry, Applied Optics, 査読有, Vol. 54, 2015, 7088~7093, DOI: 10.1364/AO.54.007088  
 Takayoshi Tsutsumi, Kenji Ishikawa, Keigo Takeda, Hiroki Kondo, Takayuki Ohta, Masafumi Ito, Makoto Sekine, Masaru Hori, Real-time temperature-monitoring of Si substrate during plasma processing and its heat-flux analysis, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, Vol. 54, 2015, 01AB04-1-4, DOI: 10.7567/JJAP.55.01

AB04

[学会発表](計 29 件)

- Masaru Hori, A Challenge for Future Carbon Devices by Advanced Plasma Nano-Processes, The 15th International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017) (基調講演) (国際学会), 2017.  
 Tomonori Ichikawa, Suiki Tanaka, Hiroki Kondo, Kenji Ishikawa, Hiroshi Hasizume, Hiromasa Tanaka and Masaru Hori, A Novel Controlling Method of differentiation of Cultured Cells on Carbon Nanowalls Scaffold with an Electric Stimulation, Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE 2017)  
 Masakazu Tomatsu, Mineo Hiramatsu, Kenji Ishikawa, Hiroki Kondo, Masaru Hori, Carbon nanowall (CNW) electrochemical  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensor, The 39th International Symposium on Dry Process (DPS2017) (国際学会), 2017.  
Hiroki Kondo, Masaru Hori, and Mineo Hiramatsu, Advanced Plasma Syntheses of Carbon Nanomaterials And Nanocomposites for Nano-Bio

Applications, 4th International Symposium on Hybrid Materials and Processings (HyMaP 2017) (招待講演) (国際学会), 2017.

Tomonori Ichikawa, Suiki Tanaka, Hiroki Kondo, Hiroshi Hashizume, Hiromasa Tanaka, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine, Masaru Hori, Effect of shape and conductivity of carbon nanowalls scaffold on cell morphology and proliferation, Workshop on advanced plasma applications on bio and nanomaterials (国際学会), 2017.  
Masaru Hori, Carrying Knowledge into a New Vision of Plasma Science, The 1st Innovative Global GRDC Workshop (基調講演) (国際会議) 2016.  
Masaru Hori, Hiroki Kondo, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine, Mineo Hiramatsu, Carbon nanowalls for sustainable future, 20th International Vacuum congress (IVC-20) (招待講演) (国際会議), 2016.  
Hiroki Kondo, Masaru Hori, Mineo Hiramatsu, Plasma Synthesis and Structural Control for carbon Nanowalls for Novel Nano-Bio Devices, 229th Electrochemical Society Meeting (招待講演) (国際学会), 2016.

Masakazu Tomatsu, Mineo Hiramatsu, Hiroki Kondo, and Masaru Hori, Hydrogen peroxide sensor based on carbon nanowalls grown by plasma enhanced emical vapor deposition, 2016 Internatioinal Symposium on Dry Process (国際学会), 2016.

Shun Imai, Hiroki Kondo, Hyung Joon Cho, Hiroyuki Kano, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine, Mineo Hiramatsu, Masaru Hori, Electrochemical Durability of Pt-Supported Carbon Nanowalls Synthesized Using C2F6/H2 Mixture Plasma, 2016 Materials Research Society Fall Meeting & Exhibit (国際学会), 2016.

Hirotsugu Sugiura, Lingyun Jia, Shunichi Sato, Hiroki Kondo, Keigo Takeda, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine and Masaru Hori, Effects of Residence Time on Growth Characteristics and Properties of Amorphous Carbon Films Grown by Radical-Injection Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition, 2016 Materials Research Society Fall Meeting & Exhibit (国際学会), 2016.

Suiki Tanaka, Tomonori Ichikawa, Hiroki Kondo, Kenji Ishikawa, Hiroshi Hashizume, Hiromasa Tanaka, Makoto Sekine, Masaru Hori, A Novel

Controlling Method of Proliferation of Cultured Cells on Carbon Nanowalls Scaffold with an Electric Stimulation, The 26th annual meeting of Materials Research Society Japan (国際学会), 2016.

Mineo Hiramatsu, Hiroki Kondo, Masaru Hori, Structure Control of Vertical Nanographene toward Electrochemical and Bio Applications, 69th Annual Gaseous Electronics Conference (国際学会), 2016.

Uros Cvelbar, Petr Slobodian, Hiroki Kondo, Makoto Sekine, Masaru Hori, Plasma-Assisted Deposition of Carbon Nanowalls for Detection of Organic, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science 2016 (PRiME 2016) (国際学会), 2016.

Mineo Hiramatsu, Hiroki Kondo, Masaru Hori, Synthesis of nanostructured platform based on 3-dimensional graphene network for biosensing and energy applications, 20th International Vacuum congress (IVC-20) (国際学会), 2016.

Masaru Hori, Mineo Hiramatsu, Chamically Sruface-modified Carbonnanowalls for nano-bio Applications, Energy Materials and Nanotechnology (EMN) Meeting on Biomaterials (招待講演) (国際学会), 2016.

Hyung Joon Cho, Satomi Tajima, Keigo Takeda, Hiroki Kondo, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine, Mineo Hiramatsu, Masaru Hori, Effects of fluorine termination on nanostructures and electrical proeprties of carbon nanowalls, 8th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials / 9th International Conference on Plasma-Nano Technology & Science (国際学会), 2016.

Masaru Hori, The Fourth Industry and Life Revolutions Employing Plasma Science and Technologies, The 21st Korea-Japan Workshop on Advanced Plasma Processes and Diagnostics & The Workshop for NU-SKKU joint Instultute for Plasma-Nano Materials (基調講演) (国際会議) 2015.

Masaru Hori, Plasma Medical Science Innovation, International Workshop for Bio & Medical Applications of Plasma Science (招待講演) (国際会議) 2015.

Hyung Joon Cho, Satomi Tajima, Keigo Takeda, Hiroki Kondo, Kenji Ishikawa,

- Makoto Sekine, Mineo Hiramatsu, Masaru Hori, Modification of chemical bonding structures and electrical properties of carbon nanowalls by Ar/F<sub>2</sub> post-treatments, The 10th Asian-European International Conference On Plasma Surface Engineering (国際学会), 2015.
- 21 Mineo Hiramatsu, Hiroki Kondo, Masaru Hori, Nanoplatfrom Based on Vertical Nanographene, The 10th Asian-European International Conference On Plasma Surface Engineering(国際学会), 2015.
- 22 Hiroki Kondo, Hironao Shimoeda, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine, Masaru Hori and, Mineo Hiramatsu, Surface Reactions Of Oxygen Species On Carbon Nanowalls, The 10th Asian-European International Conference On Plasma Surface Engineering(国際学会), 2015.
- 23 Hyung Joon Cho, Satomi Tajima, Keigo Takeda, Hiroki Kondo, Kenji Ishikawa, Makoto Sekine, Mineo Hiramatsu, Masaru Hori, Effects of Fluorine Termination of Carbon Nanowall Edges on Their Electrical Properties by Ar/NO/F Mixture Gas Treatments, 68th Annual Gaseous Electronics Conference/9th International Conference on Reactive Plasmas/33rd Symposium on Plasma Processing (国際学会), 2015.
- 24 Mineo Hiramatsu, Masakazu Tomatsu, Hiroki Kondo, Masaru Hori, Fabrication of Nanoplatfrom Based on Vertical Nanographene, 68th Annual Gaseous Electronics Conference/9th International Conference on Reactive Plasmas/33rd Symposium on Plasma Processing (国際学会), 2015.
- 25 近藤博基, 平松美根男, 堀勝, プラズマプロセスによるカーボンナノウォールの制御合成とナノバイオ応用, 第 65 回応用物理学会春季学術講演会(招待講演), 2018.
- 26 市川知範, 近藤博基, 橋爪博司, 田中宏昌, 堤隆義, 石川健治, 堀勝, カーボンナノウォール足場上の細胞増殖に及ぼす電気刺激効果, 第 65 回応用物理学会春季学術講演会, 2018.
- 27 近藤博基, 堀勝, 平松美根男, 先進プラズマ技術によるカーボンナノウォールの制御合成とナノバイオ応用, 第 66 回 CVD 研究会(招待講演), 2017.
- 28 市川知範, 田中替貴, 近藤博基, 橋爪博司, 田中宏昌, 竹田圭吾, 石川健治, 関根誠, 堀勝, カーボンナノウォール足場上での電気刺激が細胞増殖と接着形態に及ぼす効果, 第 64 回応用物理学春季学術講演会, 2017.
- 29 趙亨峻, 田嶋聡美, 竹田圭吾, 近藤博基,

石川健治, 関根誠, 平松美根男, 堀勝, Ar/NO/F<sub>2</sub> ガスを用いたカーボンナノウォールの化学終端処理が表面微細構造および電気的特性に及ぼす効果, 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学プラズマ医療科学国際イノベーションセンター

<http://plasmamed.nagoya-u.ac.jp/center/>

名古屋大学工学研究科電子情報システム専攻集積プロセス講座 ナノプロセスグループ

<http://horilab.nuee.nagoya-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀勝 (HORI, Masaru)

名古屋大学・未来社会創造機構・教授

研究者番号: 80242824

### (2) 研究分担者

近藤博基 (KONDO, Hiroki)

名古屋大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 50345930

### (3) 連携研究者

石川健治 (ISHIKAWA, Kenji)

名古屋大学・大学院工学研究科・特任教授

研究者番号: 60417384

竹田圭吾 (TAKEDA, Keigo)

名城大学・理工学部・准教授

研究者番号: 00377863

田中宏昌 (TANAKA, Hiromasa)

名古屋大学・大学院工学研究科・特任准教授

研究者番号: 00508129