

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24681025

研究課題名(和文) 複層シェル構造金属ナノカップの生命科学分野への実用化応用研究

研究課題名(英文) Practical application of multi-layered metal nano-cups for studies in life sciences

研究代表者

金 賢徹 (Kim, Hyonchol)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・オンチップ・セロミクスプロジェクト・研究員

研究者番号：70514107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、目的細胞をサイズ選択的に分画回収する技術開発を目指し、(1)超常磁性を有する細胞回収金属カップの作製と最適化、(2)細胞を選択的に回収するためのカップ内部への分子固定化技術の確立、(3)カップ口径に依存したサイズ選択的な細胞の捕捉と磁場による回収の、3つの研究テーマを推進した。その結果、お椀形状をした磁性粒子「magcup」を新規開発することに成功し、magcup内部に細胞をサイズ選択的に捕獲して回収可能であることを実証した。これにより、磁性粒子回収技術と粒径依存フィルタ分画技術の特長を組み合わせ、目的細胞を迅速・簡便に選択回収可能な細胞回収技術の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：A method of size-selective cell separation using hemispherical superparamagnetic particles, "magcups", was developed. Polystyrene spheres were used for templates of the fabrication, magnetic elements were deposited on the spheres by thermal evaporation, the spheres were removed by burning and the hemispherical superparamagnetic metal shells, magcups, were obtained. Target cells were mixed with a set of different sizes of magcups, then, target cells were only captured in magcups having larger diameters than the cells. The collected cells were grown in culture medium without any damage. These results indicate that the developed method can achieve quick, simple and non-invasive target cell separations depending on their sizes.

研究分野：1細胞計測技術

キーワード：ナノ機能材料 磁性構造体 細胞回収技術

## 1. 研究開始当初の背景

特定の細胞を分画回収する要望は、近年の再生医療技術やがん治療創薬開発の発展と共に急速に高まっている。例えば幹細胞から分化させた細胞を基板上にパターンニング配置して臓器モデルとし、献体が不要で安全な薬効評価を行う研究が推進されているが、そのためには細胞集団から分化した細胞のみを選択回収する技術が必須となる。またがん診断では、血中を循環する悪性転移がん細胞の存在とその種類を特定する、血液検査のみで患者負担の少ないがん診断技術開発が行われているが、この場合も血液中からがん細胞のみを分画回収することが必須である。

細胞分画技術の代表例のひとつとしてはフィルタ法があり、基板上に特定直径以下の細胞のみ通過可能なホールアレイを設置して大きな細胞を濾し取る技術であるが、実際には微小な細胞凝集体などによるフィルタの目詰まりや細胞を通過させるための加圧によるダメージなどの問題点があり、大量のサンプルに対して細胞ダメージ無く安定に分画処理を行うことが可能な改良が望まれていた。また別の方法としては磁気微粒子回収法があり、磁気微粒子表面に抗体などの分子を固定化して目的細胞と結合させ、磁場により選択回収する技術がある。細胞液に磁気微粒子を懸濁して反応を行い磁石で回収するため、大量サンプルの処理に向いており方法も簡便である。一方、サイズによる分画は本技術では難しい。以上のように、両技術それぞれ一長一短があり、決定的な技術とはなり得ていないという状況であった。

一方で、本研究代表者は研究提案段階までに、ポリスチレン球を鋳型としてその表面に金属を真空蒸着することにより、様々な粒径・元素の金属ナノ粒子を作製する技術開発を行ってきた。さらにその発展として、有機物分解処理を行いポリスチレン球鋳型を除去することにより、任意の元素で構成されたシェル構造金属ナノカップを作製することに成功した。30nm-100 $\mu$ m径のカップをCV値5%以下で作製でき、異なる元素の複層シェル構造も容易に作製可能である長所を有しているため、特徴的な形状を生命科学分野、特に細胞分画技術へ応用・実用化したいと考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

新規開発した複層シェル構造金属微粒子を実用化利用するための橋渡し原理検討を行った。特に目的細胞を分画回収する実用化利用に焦点を絞り、以下の技術開発を推進した。

研究項目① 超常磁性を有するカップ状細胞回収金属微粒子の作製と最適化

研究項目② 細胞を選択的に回収するためのカップ内部への分子固定化技術の確立

研究項目③ カップ口径に依存したサイズ選択的な細胞の捕捉と磁場による回収

これにより、磁性粒子回収技術と粒径依存フィルタ分画技術の特長を組み合わせ、目的細胞を迅速・簡便に選択回収可能な細胞回収技術の開発と実用化を目指した。

## 3. 研究の方法

研究項目①では、磁場を利用して回収可能であり、かつ凝集せず再分散可能な、様々なサイズの超常磁性体粒子作製技術の構築を目指した。磁性体の材質は主にNiを利用し、基板上に配置したポリスチレン球にNiを真空蒸着した上でポリスチレン球を取り除くことで、球殻状の粒子を作製するための条件検討を行った。また、超常磁性が表れることがカップ状粒子構造強度が保持されることが両立するよう、適切なNiの膜厚および構造保持材としてNiと共に使用するに適切な材料の選択について検討を行った。以上のアプローチを利用した上で、細胞回収を想定して様々な粒径のカップ状磁性体粒子を作製する技術開発を推進した。

研究項目②では、磁性体粒子に分子を安定固定化する技術を完成させることを目指した。マーカー分子を標的とした細胞の選択的回収を行うことを想定し、抗体やDNAを安定に固定化する条件検討を行った。特に球殻状構造の微粒子内面のみを選択的に分子を固定化するための技術開発および固定化条件、固定化密度の粒径依存性について重点的な評価を推進した。

研究項目③では、作製した磁性体微粒子を用いて、サイズ選択的な細胞回収が可能であるかに対する評価を行った。手始めに粒径が揃ったポリスチレン球をモデルとし、作製した磁性体微粒子がサイズフィルタとして機能することを確認した上で、生きたままの細胞を選択的に回収可能であるかに関する評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) 超常磁性を有するカップ状細胞回収金属微粒子の作製と最適化

直径7-80 $\mu$ mのポリスチレン球上にNi薄膜とSiO<sub>2</sub>薄膜を、Niが1層あたり3nm以下、SiO<sub>2</sub>が1層あたり15nm以下となるよう、かつNi層数が3以上となるよう交互に積層させた後、高温焼成を行いポリスチレン球を取り除く方法で、超常磁性を保持しつつネオジウム磁石による磁場印加で簡便に回収可能であり、かつ溶液中で単分散状態を保持可能な、超常磁性体カップ、「magcup」の作製に成功した(図1、発表論文2,3)。作製したmagcupは、一般的な細胞培養液のような高塩濃度溶媒中でも溶解等することなく安定で、かつ超常磁性を保持したまま利用可能であることを

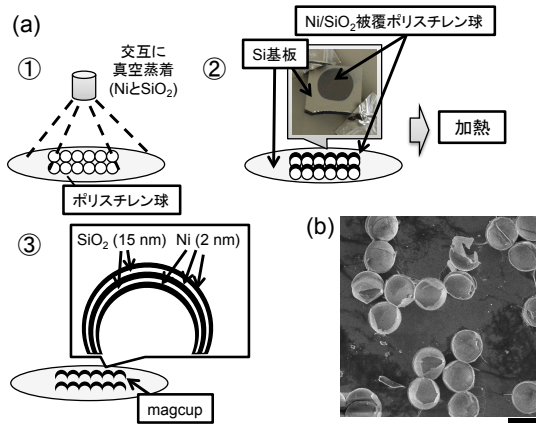


図 1 magcup の作製方法 (a) と作製した magcup の走査型電子顕微鏡像 (b)。Bar, 10 $\mu$ m。  
(発表論文 2、3 より改編)

明らかにした。

(2) 細胞を選択的に回収するためのカップ内部への分子固定化技術の確立

magcup を作製する工程において、最内層に 5nm 膜厚の Au 層をさらに追加する (すなわち、鋳型ポリスチレン球に対して最初に Au を蒸着した後、その上から Ni や SiO<sub>2</sub> を蒸着して magcup を作製する) ことで、末端に SH 基を持つプローブ DNA を magcup 内面のみ、面選択的に固定化することに成功した。さらに、magcup 内部にプローブ DNA を固定化した後、プローブ DNA と相補的なターゲット DNA を固定化した金ナノ粒子をカップ内部でハイブリダイゼーションさせ、結合した金ナノ粒子数密度を計数することでカップ内面へ固定化されたプローブ DNA 数を推定する実験を推進した。magcup 粒径依存性を明らかにする目的で、140nm から 800nm までの小さな magcup を作製して本実験を推進した結果、固定化されるプローブ DNA 密度はカップ内部凹面曲率に依存し、1 カップ内面全体あたりのプローブ DNA 固定化密度は小さなカップほど高くなる傾向にあること、それはカップ側面部分へのプローブ DNA 固定化密度の差が寄与しているらしいことを明らかにした (図 2、発表論文 4)。

(3) カップ口径に依存したサイズ選択的な細胞の捕捉と磁場による回収

直径 7-80 $\mu$ m の magcup を作製した上で、直径 10 $\mu$ m のビーズと直径 12 $\mu$ m の細胞を回収標的として実験を行った結果、回収標的直径以下の magcup ではビーズおよび細胞が全く回収されないことから、magcup 内部空間が厳密なサイズフィルタとして機能することを確認した (図 3、発表論文 2)。さらに、回収細胞が magcup に捕獲された状態のまま培養液中で培養すると、回収細胞が自発的に magcup

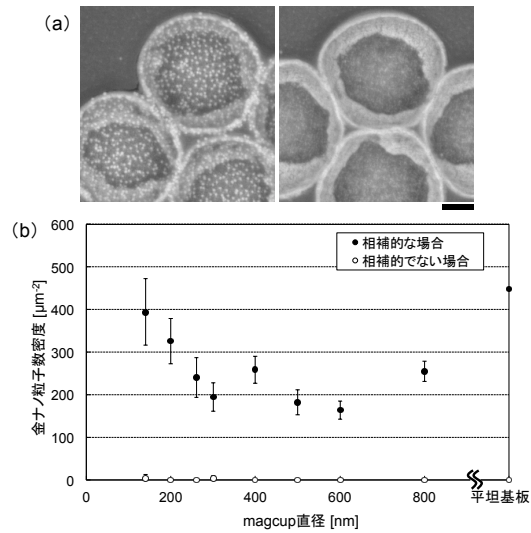


図 2 magcup 内部への分子固定化評価。(a) magcup 内部に固定化したプローブ DNA に対し、ターゲット DNA を固定化した金ナノ粒子を作用させた後に得た走査型走査型電子顕微鏡写真の例。左は magcup 内に固定化した DNA に対して相補的な DNA を金ナノ粒子に固定化して反応を行った場合、右は相補的でない DNA を用いた場合。ハイブリダイゼーション反応により結合した金ナノ粒子は、白い輝点として観察されている。magcup 直径 800nm、Bar, 200nm。(b) 観察された金ナノ粒子密度と magcup 直径の関係。(発表論文 4 より改編)

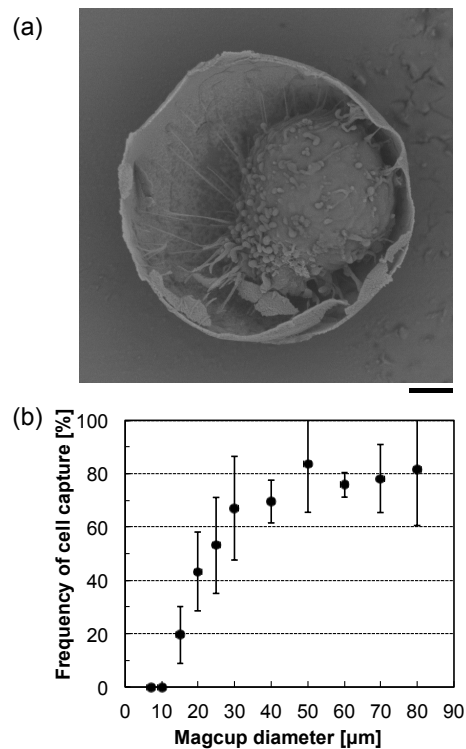


図 3 magcup による細胞のサイズ選択的回収結果。(a) 直径 15 $\mu$ m の magcup を用いて細胞を回収した後に撮影した走査型電子顕微鏡像。Bar, 2 $\mu$ m。(b) 直径 7 $\mu$ m から 80 $\mu$ m の magcup を用いて細胞を回収した場合の回収率。(発表論文 2 より改編)

から抜けだし、一定時間後に分裂する様子が確認された(図4)。このことは、magcupによる細胞回収法が回収対象の細胞に対して非侵襲的であり、回収を望む細胞をmagcupで回収した後に再培養することで増殖させ、後段の分析研究へ利用できることを示している。一方、magcupへ細胞が捕獲される物理的機構を調べた結果、magcupと細胞の結合では体積排除効果によるエントロピー由来の駆動力が寄与していることが示唆された(発表論文1)。このことは、magcupに最も高頻度に捕獲される細胞は直径がmagcup径に最も近いものであることを示唆しており、実用化利用を想定した場合に標的回収効率を向上させるための、大きな知見を得ることができた。

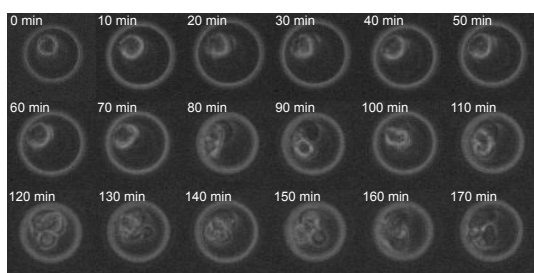


図4 magcupを用いて回収した細胞の再培養結果。30 $\mu$ m径の培養チャンバ(白い円形の外枠)内にmagcupと細胞の複合体を閉じ込めた上で、10分毎に画像を取得しつつ培養を行った結果。Bar, 20 $\mu$ m。(発表論文2より改編)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1. Kim, H., Terazono, H., Takei, H. and Yasuda, K., "Depletion effect on concave microstructure upon size-specific target particle collection", *Japanese Journal of Applied Physics*, 54 (6S1), 06FL02, 1-5 (2015), 10.7567/JJAP.54.06FL02, 査読有
2. Kim, H., Terazono, H., Takei, H. and Yasuda, K., "Cup-Shaped Superparamagnetic Hemispheres for Size-Selective Cell Filtration", *Scientific Reports*, 4:6362, 1-6 (2014), 10.1038/srep06362, 査読有
3. Kim, H., Terazono, H., Takei, H. and Yasuda, K., "Fabrication of Multilayered Superparamagnetic Particles Based on Sequential Thermal Deposition Method", *Japanese Journal of Applied Physics*, 53 (6S), 06JJ01, 1-6 (2014), 10.7567/JJAP.53.06JJ01, 査読有
4. Kim, H., Terazono, H., Takei, H. and Yasuda, K., "DNA Hybridization Efficiency on Concave Surface Nano-Structure in Hemispherical Janus Nano-cups", *Langmuir*, 30 (5), 1272-1280 (2014), 10.1021/la403557g, 査読有

[学会発表] (計15件)

1. 金賢徹、寺菌英之、竹井弘之、安田賢二、Contribution of Depletion Effect for Size-Selective Target Cell Acquisition in Cup-Shaped Microstructures, 60th American Biophysical Society Annual Meeting, 2016.2.28, Los Angeles (アメリカ)
2. 金賢徹、寺菌英之、竹井弘之、安田賢二、Size-Specific Target Cell Purification Exploiting Depletion Effect on Cup-Shaped Superparamagnetic Hemispheres, 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2014), 2014.11.7, ヒルトン福岡市一ホーク(福岡)
3. 金賢徹、寺菌英之、竹井弘之、安田賢二、超常磁性カップの作製とサイズ選択的細胞回収、第75回応用物理学学会学術講演会、2014.9.19、北海道大学(北海道)
4. 金賢徹、寺菌英之、竹井弘之、安田賢二、Nano-Cups: Fabrication and Application of Cup-Shaped Functional Nano-Particles for Cell Biology, 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications (招待講演), 2014.1.20, Costa da Caparica (ポルトガル)
5. 金賢徹、寺菌英之、竹井弘之、安田賢二、Fabrication of Superparamagnetic Janus Particles Having Various Sizes and Its Application for Non-Destructive Cell Sorting, 第50回日本生物物理学会年会、2012.9.24、名古屋大学(愛知)

他、国内開催会議7件、国外開催会議3件

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 微小体の配列方法  
 発明者: 安田賢二、金賢徹、寺菌英之、服部明弘  
 権利者: 公益財団法人神奈川科学技術アカデミー、株式会社オンチップ・セラミクス・コンソーシアム、東京医科歯科大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願2012-272009  
 出願年月日: 2012.12.13  
 国内外の別: 国内

名称: 磁気ナノ粒子  
 発明者: 安田賢二、金賢徹、寺菌英之、服部明弘  
 権利者: 公益財団法人神奈川科学技術アカデミー、株式会社オンチップ・セラミクス・コンソーシアム、東京医科歯科大学  
 種類: 特許  
 番号: PCT/JP2012/078993

出願年月日：2012. 11. 8  
国内外の別：国外（PCT 出願）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

金 賢徹 (KIM, Hyoncho1)  
公益財団法人神奈川科学技術アカデミ  
ー・オンチップ・セラミクスプロジェク  
ト・研究員  
研究者番号：70514107

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし