

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710116
 研究課題名 (和文) ナノ・ニードル基板による高効率な遺伝子導入デバイス開発
 研究課題名 (英文) APPRICATION OF MICRON-SPIKED ELECTRODES PRODUCED
 BY THE PHASE TRANSFORMATION PHENOMENON OF STAINLESS STEEL
 FOR GENE TRANSFER DEVICE
 研究代表者 宮野公樹 (MIYANO NAOKI)
 京都大学・工学研究科・講師
 研究者番号：40363353

研究成果の概要：

二相ステンレス鋼を用いた精密熱処理とエッチング技術によるニードル形状の製作、および、そのニードル形状上での細胞培養に成功した。これらを踏まえ、より高効率な遺伝子導入を目指すナノ・ニードル基板エレクトロポレーションの開発を推し進め、その結果を論文投稿するまでに至った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：複合新領域
 科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学, マイクロ・ナノデバイス
 キーワード：マイクロ化学システム, 遺伝子導入デバイス

1. 研究開始当初の背景

申請者が大学4年生のときに、金属表面をエッチングすると内部に形成されていたマイクロオーダーの析出物が表面に残存し突出することを発見した。その析出物は非常にアスペクト比の高い形状であり、トップダウン的な微細加工では製作不可能であった。その後この技術の応用先を追求しつづけ、最終的に「バイオ分野における遺伝子導入技術」という最適なプラットフォームに帰着した。具体的には、2005年から析出物の形態制御等の基礎的な実験を開始し、最近、本技術を活

用した電気刺激遺伝子導入（以下、エレクトロポレーション）デバイスを試験的に試作し実験を行ったところ、遺伝子の導入効率およびその発現効率が向上する傾向にあることが確認された。

2. 研究の目的

高効率な遺伝子導入を目指す「ナノ・ニードル基板エレクトロポレーションデバイス」を開発する。遺伝子導入効率の向上を評価軸に、電場、温度応答性、細胞適応性など様々な要素の基礎的な実験および解析を行う。

3. 研究の方法

研究方法は三段階に分けられる。①二相ステンレス鋼を用いて精密熱処理と選択的エッチング技術により表面にナノ・ニードル形状を製作する。②そのメタル基板にCrとAu蒸着してアルカンチオール自己組織化単分子(SAM)膜を形成させ細胞導入物質となるプラスミドDNAを担持し細胞を培養。③細胞培養した基板をエレクトロポレーションの電極として使用し、電気刺激により細胞膜に一時的に細孔を形成させると同時にプラスミドDNAを電気泳動で細胞内に導入する。

4. 研究成果

(1)遺伝子導入に適したニードル形状の制御
ニードルは、一方向と3方向の2種類が製作可能である。これらニードル形状を変数として細胞培養に適した形状を検討した結果、ニードルが3方向のときに遺伝子導入効率がよいことがわかった。

また、ソフトリソグラフィ技術を応用してNiのパターニングを行い、ステンレス鋼表面にNiの拡散を制御することで局所的に原子濃度分布を制御した。その後、マルチ熱処理を行うことで数十ミクロンオーダーでの析出相生成場所制御に成功した。具体的には、幅100ミクロンのライン&スペース形状、及び、直径100ミクロンのドット形状にパターンニングすることができた。図1を参照。

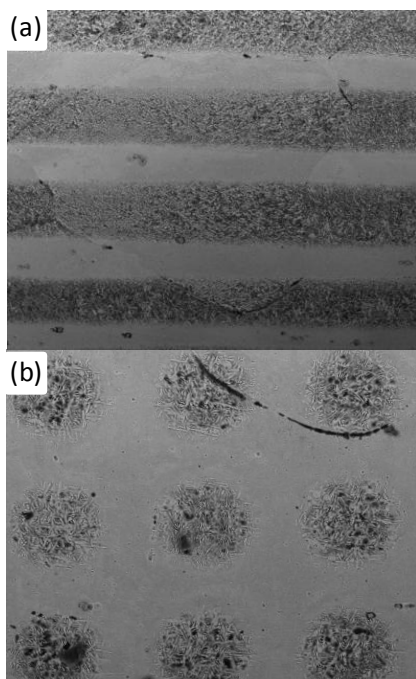


図1 析出相のパターニング結果

(2)局所加熱が細胞に及ぼす影響と遺伝子導入率の変化

一般的な金属膜電極と比較して、ニードル形状基板は遺伝子導入のためのパルス電圧印可量を大幅に減らすことができた。また種々の検討の結果、局所加熱は細胞に対して有益な影響を与えないことがわかった。

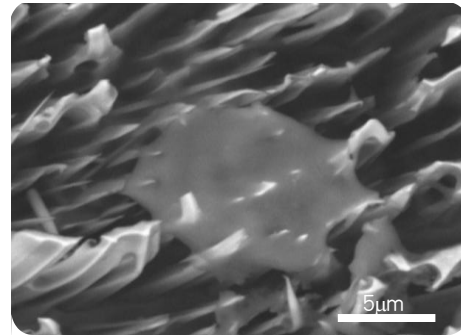


図2 ステンレスニードル上に存在するHEK細胞のSEM写真

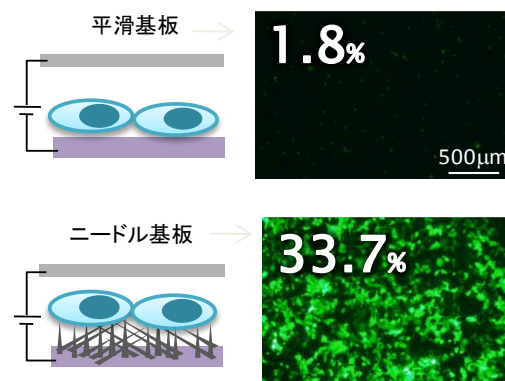


図3 ステンレスナノニードル基板と通常の平滑基板との遺伝子導入効率の比較。緑色の蛍光像(GFP像)は細胞に遺伝子が導入されたことを示している。これらを比較した結果、平滑基板の約30倍の導入効率を示した。

(3)電場を使わない新たな遺伝子導入方法の提案

ニードル基板を流路平面に用い、細胞と物質の混濁液を流路にながすだけで細胞に物質導入されるデバイスを試作した。ニードル形状は先端数ナノ、直径約10ミクロン、長さ約200ミクロンのものを使用した。PDMSを母体として流路を形成し、ステンレスニードルと組み合わせることでデバイスを作成した。その結果、ニードル形状に依存したタンパク質の細胞導入効率結果を得、新しいデバイスの可能性を示すことに成功した。

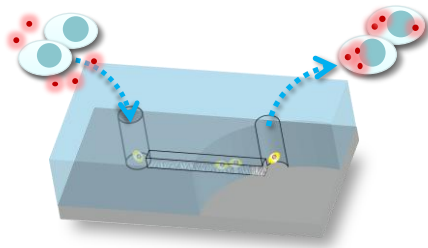


図4 ステンレスナノニードル基板を使った細胞メス流路デバイスの図。細胞と蛍光タンパクの懸濁液を流路に通過させる。

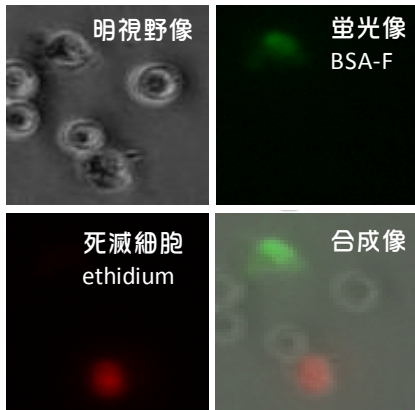


図5 流路を通過させた後の細胞観察結果。蛍光タンパクが導入された細胞は緑、死滅した細胞は赤。細胞：MEL，導入物質：BSA-Fluorescent(65000 Mw) 100mg/ml

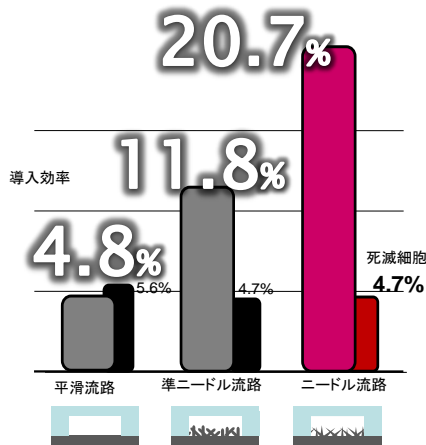


図6 細胞への蛍光タンパク導入効率の比較結果。平滑流路通過時の5倍の導入効率を示した。この結果は他の物質導入方法に匹敵する。

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4件)

① Naoki Miyano, Keisuke Fujii, Yuuki Inoue, Yuji Teramura, Hiroo Iwata and Hidetoshi Kotera, "Gene transfer device utilizing micron-spiked electrodes produced by the self-organization phenomenon of Fe-alloy", Lab. Chip., , 8, 1104 – 1109, (2008) 査読有

② N. Miyano, A.Takahashi, J. Miyazaki and K. Ameyama, Prediction of Precipitate Morphology by Atomic Matching Model and FEM analysis with Consideration of Anisotropy Elastic Strain in a BCC/HCP system, Material Transactions, 19 pp. 471-478, (2008) 査読有

③ N. Miyano, K. Ameyama, N. Hirano, Y. Takao, FEM analysis based on the 3D-NCS model for precipitate morphology in the BCC/HCP system, Materials Science and Engineering A 480, 464-471(2008) 査読有

④ 宮野公樹, 則村貴洋, 稲葉輝彦, 飴山 恵 Ti-15V-3Cr-3Sn-3Al 合金における三角錐形状 α 析出相の結晶学的考察日本金属学会誌, 71(2007) J. Japan Inst. Metals, Vol. 71, No. 5, pp. 469-475, (2007) 査読有

〔学会発表〕(計9件)

① N. Miyano, Y. Inoue, Y. Teramura, N. Nishiguchi, H. Iwata and H. Kotera, AN APPLICATION OF A STAINLESS SUBMICRON NEEDLE FOR THE GENE TRANSFER DEVICE, Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro-Nano Technology, 22-25 June 2008, Taiwan

② N. Miyano, M. Morieda, Y. Inoue, Y. Teramura, F. Tsumori, H. Iwata and H. Kotera, APPLICATION OF MICRON-SPIKED ELECTRODES PRODUCED BY THE PHASE TRANSFORMATION PHENOMENON OF STAINLESS STEEL FOR GENE TRANSFER DEVICE, micro-TAS, 13-16 Oct 2008, San Diego

③ N. Miyano, Akihiro Takahashi and Kei Ameyama, Shape-Dependent Strain of Precipitate Morphology Investigated by FEM Analysis in a BCC/HCP system, ISPMA 2008, 24-27 Aug 2008, Prague

④ Akihiro Takahashi, N. Miyano and Kei Ameyama, Prediction of Precipitate Morphology by Atomic Matching Model and FEM Analysis with Consideration of Anisotropy Elastic Strain in a BCC/HCP system, 17th International Federation for Heat Treatment and Surface Engineering, 27-30 Oct, 2008, 神戸

⑤ Naoki Miyano, Keisuke Fujii, Yuuki Inoue, Yuji Teramura, Hiroo Iwata and Hidetoshi Kotera, Development of Gene Transfer

Device with a Submicron-Needle Produced by a Self-Organization Phenomenon in an Fe-alloy, The 6th International Conference on Intelligent Processing and Manufacturing of Materials, 2007/6/27, イタリア

⑥Fuji Tsumori, Naoki Miyano, Akio Fukui, Koji Sagawa, Hidetoshi Kotera, Deformable Micro Pillar Array with Magnetic Particles and Elastic Material, Int. Conf. Computational Plasticity, 2007/9/6, バルセロナ

⑦Fuji Tsumori, Naoki Miyano, Akio Fukui, Koji Sagawa, Hidetoshi Kotera, Development of Deformable Micropillar Array using Magnetic Particles and Elastic Material, The 6th International Conference on Intelligent Processing and Manufacturing of Materials, 2007/6/27, イタリア

⑧宮野公樹, 藤井恵介, 津守不二夫, 小寺秀俊, 二相ステンレス鋼における析出相を活用したナノ・ニードル基板とその応用, 07年秋期金属学会講演大会, 2007/9/19, 岐阜大学

⑨宮野公樹, 藤井恵介, 井上祐貴, 寺村裕治, 津守不二夫, 岩田博夫, 小寺秀俊, 自己組織化による”ステンレス製”ナノ・ニードル構造体を用いた遺伝子導入デバイスの開発, 第24回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2007/10/16, 船橋

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 二相ステンレス鋼部材とその製造方法およびその表面処理方法, 固体高分子型燃料電池とそのセパレータ、導通部材並びにバイオデバイス

発明者: 川浦宏之、鈴木憲一、宮野公樹、射場英紀、高尾尚史

権利者: 京都大学、豊田中央研究所、トヨタ自動車

種類: 特許、特願

番号: 2008-037407

出願年月日: 08年2月6日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮野公樹 (MIYANO NAOKI)

京都大学工学研究科・講師

研究者番号 40363353