

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）  
 研究期間： 2008～ 2009  
 課題番号： 20860031  
 研究課題名（和文） 細胞の移動能力を用いた微細構造の自己組織化と細胞内ナノインターフェースへの応用  
 研究課題名（英文） Cell migration driven self-assembly of microstructure and its application for intracellular nano interface

研究代表者  
 星野 隆行 (HOSHINO TAKAYUKI)  
 東京農工大学・大学院工学府・特任助教  
 研究者番号： 00516049

## 研究成果の概要（和文）：

生体の機能を工学的なシステムと融合させる試みでは、細胞膜電位を数日から数年といった長期間、細胞膜や細胞内の機能計測を維持し続けること必要である。本研究では、長期間細胞内に機能計測が可能なプローブを多数同時に導入することを目的とし、細胞の運動性を利用してナノピラーを細胞内へ自己刺入させるナノ構造を提案してきた。マイクロウェル内に細胞を誘導、接着させ、細胞自らの力で細胞内にナノプローブを導入させる構造を作製した。マウス筋芽細胞株 C2C12 がナノピラーを細胞内に刺入させ、これが生存していることを確認した。

## 研究成果の概要（英文）：

We demonstrated the insertion of an intracellular nanoneedle into a single living cell which was caused by a cell-driven force. The cell-driven assembly of bio-hybrid micro and nanocomponents offers a potential route in nano-bioengineering research on new fabrication tools of bio-micro electro-mechanical systems (bio-MEMS) without direct mechanical manipulation. We describe the cell-driven self-insertion of a single conductive tungsten nanoneedle of 190 nm diameter. A single nanoneedle was fabricated on the bottom of each 15 μm wide glass microwell. A myoblast C2C12 cell migrated into a microwell; within 3 hours, the insertion of a nanoneedle into the cell was observed using a three-dimensional laser scanning confocal microscope. Observation of fluorescence labeled viable cells indicated that no dead cells were present in the microwells during the nanoneedle insertion process. The intracellular nanoneedles were broken after a maximum of 2 days.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,330,000	399,000	1,729,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,530,000	759,000	3,289,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：知能機械学・機械システム

キーワード：細胞内電極，自己組織化，細胞運動，ナノ電極，ナノニードル，集束イオンビーム

### 1. 研究開始当初の背景

生体から直接情報を取得することにより非言語的なコミュニケーションを行う生体との直接的インターフェースの開発において，生体の情報伝達を計測し，評価する技術が開発されてきた．真の生体情報を獲得するためには細胞の活動を *in vivo* と同様な環境に近づけて計測することが望ましいので侵襲性が低く，継続的な計測方法が必要である．このような要求に対して神経活動計測ではこれまでパッチクランプ法や微小電極法が用いられている．また，持続的かつ超大規模な計測を行うために MEMS 電極や蛍光色素が開発されてきた．細胞内での活動を計測するこれらのプローブを細胞内に導入する方法としては，主に微小位置を制御可能なマニピュレータが用いられる．近年の研究では，*in vitro* の細胞内計測においては，AFM の探針先端を集束イオンビームのエッチングによって先鋭化させたプローブ[1]や，カーボンナノチューブを取り付けたプローブ[2]で細胞内に遺伝子や量子ドットを導入させ尚且つ生きさせることに成功している．一方で *in vivo* の細胞外計測では，細胞の活動計測を維持するためにマイクロマニピュレータによりプローブ位置の調整を継続的に行うシステムが用いられてきた[3]．

マニピュレータを用いて位置調整を行う方法は簡易であるために初期の実験には適しているものの，神経細胞ネットワークの解析には入出力関係が  $10^3$  チャンネル以上必要になるに至り[4]，実装技術，セットアップの時間が現実的な範囲を超えるようになった．アクチュエータを個々のマニピュレータに取り付け，自動調整を試みる研究もあるが，細胞のサイズが  $10^{-5}$  [m]であるのに対して，マニピュレータが  $10^{-2}$  [m]と寸法効率がよくない．

### 参考文献

- [1] I. Obataya, et al., *Biosensors and Bioelectronics.*, 2, 20(8), pp.1652-1655, 2005.
- [2] Xing Chen, et al., *Proc Natl Acad Sci*, 104(20), pp.8218-22, 2007.
- [3] JG. Cham, et al., *J Neurophysiol.*, 93(1), pp.:570-579, 2005.
- [4] MA. Nicolelis. "Methods for Neural Ensemble Recordings". 1<sup>st</sup> ed. CRC;

1998.

### 2. 研究の目的

細胞の移動運動と細胞接着を利用して細胞内にナノデバイスを取り込ませ，情報インターフェースを自己組織的に構築することを目的とし，本報では，集束イオンビームで作製した導電性ナノピラーを細胞に取り込ませるデバイスを作製し，本研究で提案している細胞の移動運動によって構築するナノデバイスの原理検証を行った．

### 3. 研究の方法

細胞の移動運動に関して *in vitro* において単一細胞での接着力や移動力が調査されており， $3 \times 10^{-7}$  [N] であり[5]，一方で細胞膜を貫通するのに必要な力は  $0.6-1.9 \times 10^{-9}$  [N] であり[1]，細胞膜を貫通してナノデバイスを導入するために必要な原動力として細胞の移動運動力は十分大きい．

この細胞の移動運動に伴う力を有効利用するために，細胞を誘導しナノピラーを細胞内

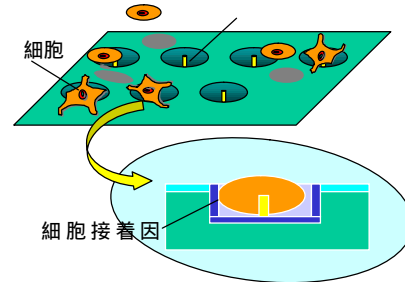


図1 ナノ電極の刺入

井戸状の細胞誘導部に高アスペクト比で直径 100nm のナノ電極を配置．井戸の内外に細胞接着因子，接着阻害因子をパターンニング．井戸内に細胞を接着・誘導してナノ電極を自己組織的に刺入する

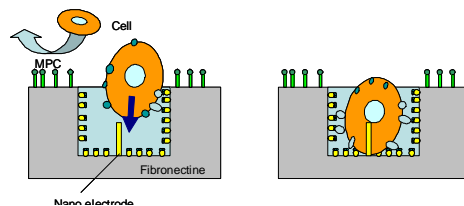


図2 細胞移動によるナノニードルの自己刺入．マイクロウェル内に接着した細胞は自身の接着力でナノニードルを細胞内に刺入する．

に取り込ませる誘導構造を用いる。マイクロウェル内に細胞接着物質であるフィブロネクチンを接着させ、ウェル外には非特異的な細胞接着を抑制できる 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマー[6]を修飾した。これによって、マイクロウェル内に細胞を誘導、接着させる構造とした。マイクロウェルの形状は、細胞の大きさから一辺が 15 [μm]で、深さ 10 [μm]の垂直なウェルとした。

細胞内に取り込ませる電極構造は、これまでの先行研究[1, 2]によって報告されている刺入された細胞の生存性、および本研究で採用した加工法の加工限界から、直径 80-100 [nm]とし、上記マイクロウェルの底部に垂直に設置させることとした。垂直なマイクロウェルを用いて細胞内にナノピラー電極を導入する場合、細胞接着力が細胞刺入力として最も効果的なのは細胞の進展方向と針の刺入方向が平行である場合であると考えた。

#### 参考文献

- [5] Z. Yang, et al., *J. Theor. Biol.* 242, pp.607-616, 2006.  
 [6] Y. Xu, et al., *Lab Chip.* 7, pp. 199, 2007.

#### (1) 細胞運動によるマイクロ組立

本報告では細胞の2次元運動から3次元運動を生成することを試みた。細胞の運動は接着タンパク質のマイクロパターンや、マイクロチャネル、基板の機械的物性などを入力として制御されてきた。これらの従来研究では誘導される運動は基板上的2次元に限定されていた。生物の立体的な構造構築を鑑みると細胞に3次元的な力の発生は可能ならずであり、単純な刺激から3次元的な運動を生成できないか検証した。

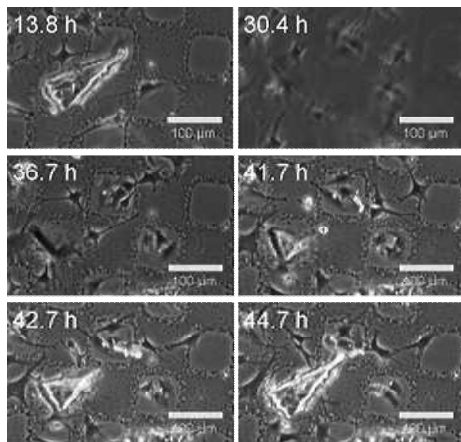


図3 細胞運動によるマイクロパーツの3次元移動

3次元的な回転運動は偶力を発生させることで生じる。したがって、平面基板上を移動する遊走細胞に意図的な非対称の運動形態を生成させることで回転運動を実現できた。具体的にはマイクロパーツを駆動している細胞の運動量および接着力に偏りが生じるよう離散的な親水化パターンを用意し、近隣の細胞間あるいは同一細胞内の接着部位間に時間的、空間的に異なった不連続な環境を提供した。細胞の移動運動によりマイクロパーツの3次元的な縦回転が生成されたことを確認した。細胞運動の偏りが3次元的な運動を誘起できたといえる。(図3)

#### (2) 細胞内ナノデバイスの作製

細胞内ナノデバイスを作製する工程では、生体適合性およびMPCやフィブロネクチンなどの表面修飾物質の活性を維持するためにウェット工程を含む従来のマイクロマシニングを用いない。本報では特に細胞内デバイスの可能性を検証するのが目的であるので、プロトタイプを作製することを目的とし、直描技術の一つである集束イオンビーム(FIB)加工を用いることとした。

マイクロウェルの加工、ナノピラーの作製はFIB(SMI9800, SII NT)を用いて行った。0.17 [mm]厚さのガラス基板(Matsunami)にMPCポリマーのシランカップリング処理を施した。ナノ加工中のイオンビーム照射によるMPCの損傷を回避するために、導電性保護フィルム(厚さ約10 [μm])を添付した。マイクロウェルを作製するために、保護フィルムごとFIB照射によりエッチングを40 [min/well] おこない一辺15 [μm]、深さ10 [μm]のウェル形状を作製した。次にタングステンヘキサカルボニルのデポジションガスを導入し、集束イオンビーム気相化学成長(FIB-CVD)を用いてタングステンのナノピラー(直径80-100 [nm]、高さ3-7 [μm])を作製した(図4)。最後に保護フィルムを剥がし、100 [μg/mL]フィブロネクチン溶液(300-13401, Ito life science)に浸漬し、37にて1時間静置して、フィブロネクチンをウェル内に吸着させた。ウェル外の面にはタンパク質の吸着性が極めて低いMPCポリマーによって細胞非接着領域としたことでウェル内だけの選択的吸着を誘起することが

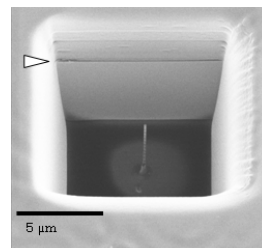


図4 マイクロウェルとナノニードル

できる。

### (3) マイクロウェルアレイ上で培養実験

作製した細胞内ナノデバイスがあるガラス基板は、底面をくりぬいた 60 [mm] 培養皿 (IWAKI) に貼り付けガラスボトム培養皿を作成し、この培養皿内で細胞の培養を行い観察した。

培養細胞はマウス筋芽細胞株 C2C12 (RCB 0987, Riken Cell Bank) を用いた。60 [mm] 培養皿でコンフルエントになるまで増殖した C2C12 を TrypLE Express (GIBCO) で解離させ、2 [mL] の培地 (DMEM, 10% FBS, penicillin/streptomycin (GIBCO, 14250-122)) に懸濁させた。この細胞懸濁液を先のガラスボトム培養皿に播種し 37 [°C], 5% CO<sub>2</sub>, 飽和水蒸気雰囲気中の培養装置内で培養した。

### (4) 細胞内ナノデバイスの観察

マイクロウェルに入った細胞の内部を観察する必要があるため、レーザー共焦点顕微鏡 (TE2000E; Nikon, CSU-X1; Yokogawa) を用いて 488 [nm] の波長において蛍光観察した。

ナノピラーを自らの細胞内に刺した細胞が生存していることを確認するために、蛍光試薬は生細胞を染色する CMFDA (C7025, molecular Probes) を用いた。明視野で観察して、細胞がマイクロウェル内に侵入したのを確認してから CMFDA による生細胞の染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡を用いて Z 軸での連続断面を観察した。

CMFDA は蛍光観察により退色するため長時間の観察が困難であるため、より精緻な観察のために、CMFDA に加えてより退色に強い Alexa Fluor 488 ファロイジン (AF488-P) (A-12379, Molecular probes) によって細胞骨格を染色した。AF488-P の染色に当たって細胞を 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し、細胞の状態を保存して精細な断面画像を取得した。

CMFDA, あるいは CMFDA と AF488-P との蛍光試薬で染色された細胞は、レーザー共焦点顕微鏡で Z 軸にそって 0.1 [μm] ごとにスライス画像を撮影し、3 次元データを取得した。

### (5) 細胞内ナノデバイスの寿命

ナノピラーが細胞運動や原形質流動によって応力を受けているため、マイクロウェル内に存在できている時間を計測した。ナノピラーは、周囲が蛍光発色していると、影として共焦点顕微鏡画像として捉えられるため、観察する対象である C2C12 細胞をあらかじめ CMFDA で蛍光染色し観察した。細胞懸濁液を作製する前に CMFDA により細胞体を染色し、マイクロウェルアレイの上に播種して 1-3 日毎にレーザー共焦点顕微鏡で観察した。



図 5 細胞に刺入されたナノニードル。共焦点顕微鏡による断面。

アレイにおいて、播種後 1 日、2 日、5 日でマイクロウェルアレイ内のナノピラーの存在を観察した。1 日後にはナノピラーが確認できたが、2 日後には半数、5 日後にはすべてなくなっていた。

### (6) 細胞内への刺入

播種から 4 時間後のレーザー共焦点顕微鏡画像を図 5 に示す。播種から 3 時間後に CMFDA にて蛍光染色を行ったので、ウェル内に進入した細胞が生細胞であることが確認できた。取得した 3 次元データからマイクロウェルの中央部の X-Z 断面を再構成したデータであるが、蛍光発色している細胞に照らされる形で、ウェルの中央に影としてナノピラーの存在が確認できる。

### (7) 自己刺入構造とナノ電極の作製

細胞の移動および接着力によるナノ電極の自己刺入構造は、細胞の発生する力を効率的に利用するためマイクロウェル形状の内にナノ電極を配置した構造とした。マイクロウェルの形状は一辺 20 [μm]、深さ 15 [μm] のウェル形状とし、底面には裏面からの観察が可能となるように ITO 薄膜 (厚さ 200 [nm]) の透明導電層上に直径 110 [nm]、高さ 8 [μm] のタングステン電極を配置した。マイクロウェルは ITO 薄膜 (200 [nm]、フォトリソレーション) をスパッタ蒸着したガラス基板上にフォトリソ SU-8 (SU-8 XP Film, 化薬マイクロケム) を UV 露光にて作製し、細胞接着性を制御するために非特異的に細胞接着を抑制できる 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマー [7] をディップコートにて試料表面を修飾した。

ナノ電極は W(CO)<sub>6</sub> を  $1 \times 10^{-3}$  [Pa] の前駆ガスとして用い FIB-CVD (SMI9800, SII NT) の Ga イオンビーム (ビーム径 12 [nm]、ビーム電流 1 [pA]、電流密度 8.8 [nA/μm<sup>2</sup>]) をスポット照射させて垂直に堆積させた。細胞接着性をウェル内に確保するためにマイクロウェル内の MPC ポリマーを除去することと、ウェル底部の ITO 導電層を絶縁するために、 $1-2 \times 10^{-3}$  [Pa] の Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub> (TEOS) ガスを前駆ガスとしてマイクロウェル内全体に堆積させた。ナノ電極の先端は FIB にてエッチングして露出させている。

ITO による配線、絶縁処理、溶液をいれる

チャンパーの取り付けを行い、電極としての評価を行った。DPBS(-) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco) をチャンパーにいれ、対極をタングステン線(0.1mm, ニラコ)としてナノ電極のインピーダンスを電気化学計測装置(1280Z, Solartron Analytical)を用いて、計測周波数は0.1-20k [Hz]の範囲を走査し、振幅 10 [mV]の条件で計測した。

本デバイスが対象としている静止膜電位から活動電位までの周波数帯域(0-10k [Hz])では、ナノ電極のインピーダンス  $|Z|$  は  $10^6$ - $10^9$  [ ]であった。これは一般的な膜電位計測アンプで測定可能な領域にあり、細胞機能計測に使用できる電極であると考えられる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞運動によるマイクロ組立

本報告では細胞の2次元運動から3次元運動を生成することを試みた。剛体の3次元的回転運動は偶力を発生させることで生じる。したがって、平面基板上を移動する遊走細胞に意図的な非対称の運動形態を生成させることで回転運動を実現できた。

##### (2) 細胞によるナノ構造の自己刺入とナノ電極

本報告では、マニピュレータなどの巨大な装置を使わずに構成できる細胞内情報インターフェースを提案し、構成する原動力として細胞自身の細胞運動を用いることを提案した。細胞運動を微小な領域で利用する原動力として活用することを試み、マイクロ組立を行った。

自らの細胞移動によって生きたままの細胞内にナノピラーを刺入したことが確認されたのは世界で初めてである。作製したナノピラーはタングステンでできており、導電性を持っているのでITOなどの配線構造上に本報で報告した細胞誘導構造とナノピラーを構成すれば、自律的に構成される自己組織的細胞内インターフェースが構築できる。用いる力は細胞自身の細胞移動力だけであるので、従来のマニピュレータによるマイクロ操作が必要なくなり、労働集約的にしか構成できなかった細胞内の情報インターフェースが容易に短時間のうちに構成できる可能性を示している。これにより、超大規模の細胞内インターフェースの構築が可能になるのではないかと考えている。

今後、細胞へのダメージとナノピラーの残存性の向上を調査し、本報告で作製したナノピラーが膜電位、チャンネルや細胞内小器官の活動を計測することができる機能性を有していることを示す必要がある。

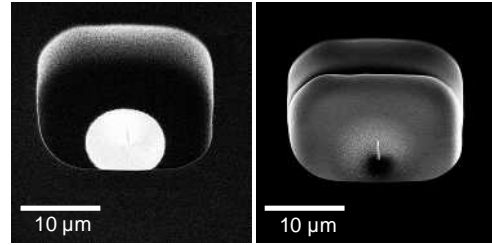


図6 ITO電極上に作製したナノ電極とマイクロウェル

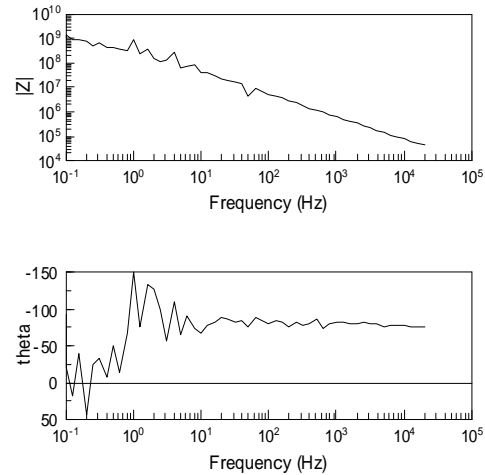


図7 ナノ電極の周波数特性。

#### 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2件)

Takayuki Hoshino, Ayako Higashi, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, Keisuke Morishima, "Cell-driven Three-dimensional Manipulation of Micro-parts for a Micro-assembly", *Japanese Journal of Applied Physics*, In Press, (2010).

Takayuki Hoshino, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, Keisuke Morishima, "Live-Cell-driven Insertion of a Nanoneedle", *Japanese Journal of Applied Physics*, 48, pp.107002, (2009).

[学会発表](計9件)

Takayuki Hoshino, and Keisuke Morishima, "Cell-driven Micro locomotion of Micro-parts for Micro assembly", 22nd International Microprocesses and

Nanotechnology Conference (MNC 2009), Sapporo (Japan), 18D-7-124, pp. 400-401, (November 16-19, 2009) (Poster, 査読あり).

Takayuki Hoshino, and Keisuke Morishima: “Nano-assembly based on cell migration”, KTH, Stockholm (Sweden), (June 5 2009), (Poster, 査読なし)

星野隆行, 金野智浩, 石原一彦, 森島圭祐, “細胞ナノシステムによるバイオハイブリッドナノマシン構築 ナノマシンの自己組織的組み立てに向けた細胞移動の制御”, 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会 2009, 2A1-J05, 福岡, 5月25-26日(2009.05.26)(査読無し)

星野隆行, 金野智浩, 石原一彦, 森島圭祐, “細胞を駆動力としたバイオハイブリッド素子の自己組織的構築”, 第4回 LSW 研究会シンポジウム, P08, 北海道大, 札幌, 1月9日(2009)(査読無し)

Takayuki Hoshino, Tomohiro Konno, Kazuhiro Ishihara, and Keisuke Morishima: “A Nano-Needle Interface Self-Assembled by Using Cell Migration for Recording Intracellular Activity: Nano-Needle Durability.”, The second IEEE RAS/EMBS International Conference on Biomedical Robotics and Biomechatronics (BioRob 2008), Scottsdale, Arizona (USA), TuBT1.4, pp. 506-510, (October 19-22 2008)(Oral, 査読あり)

Takayuki Hoshino, Yuichi Hori, Tomohiro Konno, Kazuhiro Ishihara, and Keisuke Morishima: “Cell Driven Nano Locomotion.”, The 12<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Science (micro TAS 2008), San Diego (USA), M12B (poster), pp.230-232, (October 13 2008)(Poster, 査読あり)

星野隆行, 金野智浩, 石原一彦, 森島圭祐: “移動運動により細胞内に導入されるナノインターフェース”, 第26回日本ロボット学会学術講演会, 1G2-04, 神戸大学, 神戸, 9月9-11日(09.09.2008)(査読なし)

星野隆行, 金野智浩, 石原一彦, 森島圭祐, “細胞の移動運動によって構築するナノデバイス”, 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会 2008, 2P2-J19, ビッグハット, 長野, 6月5-7日(2008)(査読無し)

星野隆行, 金野智浩, 石原一彦, 森島圭祐, “集束イオンビームにより作製したナノピラーの細胞自己刺入と細胞内活動計測デバ

イスへの応用”, 化学とマイクロ・ナノシステム研究会講演会, FP30, 九州大学, 福岡, 5月20-21日(2008), pp. 34(査読無し)

〔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  
[http://space.geocities.jp/takahoshino/CV\\_j.htm](http://space.geocities.jp/takahoshino/CV_j.htm)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

星野 隆行 (HOSHINO TAKAYUKI)  
国立大学法人東京農工大学・大学院工学府・  
特任助教  
研究者番号: 00516049

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし