

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32678

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12620

研究課題名（和文）幹細胞評価に向けた多孔質無機ナノシートバイオ電極

研究課題名（英文）Porous inorganic nanosheet bioelectrodes for stem cell evaluation

研究代表者

秀島 翔（Hideshima, Sho）

東京都市大学・理工学部・准教授

研究者番号：10580433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、無機ナノシートが持つ高い比表面積を効果的に利用できる垂直配向ナノシート電極の作製、iPS細胞の分化状態に関するバイオマーカーであるポドカリキシンを検出できる受容体固定化技術の探索、および同電極を用いたターゲット検出能の評価を効果的に進めた。その結果、多孔質の垂直配向ナノシート電極がiPS細胞の臨床応用の際の安全性を高める評価ツールとなる可能性を示した。また、小型集積化に有利である半導体バイオセンサを用いることで、iPS細胞から培養液中に分泌されたポドカリキシンを直接検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

垂直配向ナノシート電極は高い電極表面積とレドックス活性を有していることが確認されたことは、ナノ材料を用いた電気化学バイオセンサの発展に寄与する。本研究課題で開発したバイオセンサはiPS細胞由来の移植用細胞の安全性評価に利用することができ、iPS細胞を用いた再生医療の促進に貢献できると期待される。また、iPS細胞評価に限定されるものではなく、様々な健康医療分野での測定に展開可能であり、多方面への波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This project focused on three topics; development of vertically aligned nanosheet electrodes that can effectively utilize the high specific surface area of inorganic nanosheets, development of immobilization technology of receptors for biomarker related to the differentiation state of iPS cells, evaluation of target detection ability using the developed electrodes. As a result, porous vertically aligned nanosheet electrodes can be used as an evaluation tool to enhance the safety of iPS cells in clinical applications. In addition, by using a semiconductor-based biosensor, we successfully detected podocalyxin secreted from iPS cells into the culture medium.

研究分野：電気化学

キーワード：電気化学バイオセンサ 垂直配向膜 無機ナノシート 多孔質電極 幹細胞 分子認識界面

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) や ES 細胞に代表される多能性幹細胞は失われた組織や器官を復元する能力を有していることから、それらを応用した再生医療の実現により患者や障害者の生活の質を飛躍的に向上させることができる。また、幹細胞から形成した各種組織は病態の解明や新たな薬剤の副作用評価に活用でき、その活用法は多岐に渡る。しかしながら、幹細胞を所望の細胞に分化誘導する際に、未分化細胞が残存すると腫瘍化するため、未分化細胞数を定量的に検出し、統計的に腫瘍化しない基準値まで同細胞数を減らすことが必要となる。従来のフローサイトメトリー法や qRT-PCR 法等の測定技術では、作製した移植用細胞の一部を破壊して検査に使用しなければならない。このような問題点を解決するために、細胞自体を用いずに、移植用細胞にわずかに混入するヒト iPS/ES 細胞を簡便に検出する新たな技術の開発が重要である。近年、iPS 細胞の表面においては、O 型糖鎖を多く有する糖タンパク質である rBC2LCN 陽性ポドカリキシン (以降ポドカリキシン) が存在し、培養中に培養液へ分泌されることから、分化細胞中に残存する未分化細胞を検出するバイオマーカーとなることが報告された (H. Tateno et al., *Sci. Rep.*, 2014, 4, 4069)。すなわち、採取した幹細胞培養液からポドカリキシンを定量的に検出できれば、移植用細胞中の未分化細胞の混入率を明らかにすることができると期待される。

電気化学バイオセンサは、電極界面における酸化還元反応の際に流れる電流や電位変化を測定することにより、溶液中のターゲット物質を定量・定性分析する手法である。すなわち、電極界面に抗体等の受容体を固定化し、ターゲット (抗原等) が特異的吸着をした際に界面での酸化還元効率が増加するため、その電流値を測定することで定量が可能となる。電気化学的手法による対象物質の高感度検出を考えた場合、電極界面の導電性を向上すること、酸化還元反応が起こる電極表面積を最大化すること、また対象分子を効率的に捕捉する受容体固定化界面構造を構築することが望まれる。層状結晶の剥離によって得られる無機ナノシートは 1 nm の厚さを持った異方的な形状のナノ材料であり、高比表面積、高い結晶性を有する。しかしながら、ナノシートを用いた薄膜電極はナノシートの二次元異方性による影響から、ナノシートが電極表面に対し水平に配向するため、電気化学的活性表面積が小さく、電解質の拡散性が乏しい。ナノシートを用いた電極を用いたターゲット検出の高感度化に向けて、ターゲット吸着量およびそれに伴う電極反応を最大化するためには、ナノシートの持つ高い比表面積を有効活用できる多孔質の三次元構造の作製が重要となる。

2. 研究の目的

本研究では、多孔質の三次元構造を有する垂直配向ナノシート電極を作製し、腫瘍化の可能性のある未分化細胞から分泌されるポドカリキシンを電気化学的に検出できることを示し、培養過程で移植用細胞に残存する未分化細胞数を把握できる可能性を示すことを目的とした。また、前述の電流の変化を検出する電気化学バイオセンサを用いた検出法に加え、電位検出型センサである半導体バイオセンサを用いた検出法を検討した。開発するセンサは、ヒト iPS/ES 細胞の分化誘導追跡のための簡易ツールとして役立つ、同細胞の臨床応用の際の安全性が高められることができると期待される。

3. 研究の方法

無機ナノシートである MXene 等を電気泳動堆積法により金表面に堆積、その後凍結乾燥をすることで、ナノシートの垂直配向膜を作製した。続いて、作製した垂直配向膜をカーボンペーストを用いてグラッシーカーボン電極に転写することで、垂直配向ナノシート電極を作製した。ナノシートへの受容体の固定化は、ナノシート表面にアミノ系シランカップリング剤を反応することでアミノ基を導入し、その後カルボジイミド架橋剤を介して受容体を反応することで行った。作製した受容体固定化ナノシート電極のバイオセンサ性能は、ヘキサアンミンルテニウムを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中でのサイクリックボルタンメトリーで評価した。

4. 研究成果

(1) 垂直配向ナノシート電極の作製と評価

合成した MXene の結晶構造及び表面形態を、X 線回折装置 (XRD) と原子間力顕微鏡 (AFM) を用いてそれぞれ分析した。得られた XRD パターンから、全てのピークが (002) 面の高次反射に起因し、層間距離は 1.248 nm であった。AFM 像より、約 1.5 nm の厚さと 450 nm の横方向サイズを有するフレークが確認された。これらの結果から、MXene が正常に合成されたと判断した。

続いて、合成した MXene を用いて垂直配向膜と水平配向膜を作製し、SEM により形態観察を行った。垂直配向膜は厚さ約 300 μm 、平均細孔径約 20 μm であり (図 1a, b)、水平配向膜は厚さ 3 μm であり、細孔は確認されなかった。その後、垂直配向電極と水平配向電極の電気化学特性をレドックスプローブにヘキサアンミンルテニウムを使用して、サイクリックボルタンメトリー

にて評価した (図 1c)。垂直配向電極と水平配向電極は、共にレドックスプローブに起因する酸化還元電位 = -0.15 および -0.20 V vs. Ag/AgCl にピークを示した。垂直配向電極と水平配向電極を比較すると、垂直配向膜は電流密度が高く、酸化還元電位の差 ΔE が小さくなった。これらの結果から、垂直配向膜を用いることで、電解質中のレドックスプローブの拡散性が向上したことが示唆された。

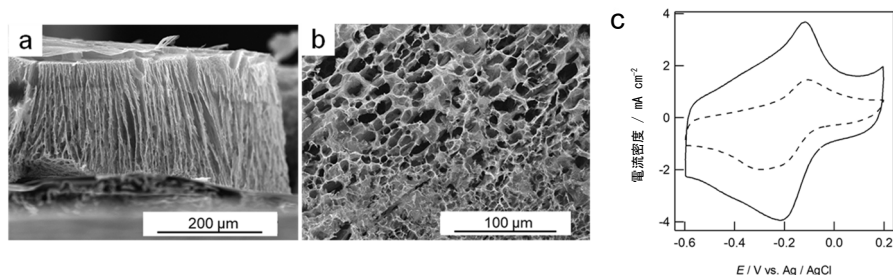


図 1 垂直配向ナノシート膜の走査型電子顕微鏡像。断面図 (a) および上面図 (b)。作製したナノシート電極のサイクリックボルタモグラム (c)。垂直配向ナノシート電極 (実線) および水平配向ナノシート電極 (破線)。

(2) 垂直配向ナノシート電極のバイオマーカー検出能の評価

まず作製した垂直配向ナノシート電極を用いたバイオマーカー検出を、抗原抗体反応に基づくモデルタンパク質の特異的吸着を用いて検討した。抗体を固定化した水平配向ナノシート電極または垂直配向ナノシート電極に対してモデルタンパク質添加後の電流値の変化率を測定することで、配向性の違いによる検出性能の違いを評価した。水平配向ナノシート電極と垂直配向ナノシート電極はともに、抗体修飾後、およびモデルタンパク質と反応後にそれぞれ酸化還元電流が減少した。これは、抗体固定化およびモデルタンパク質の特異的吸着により、酸化還元反応が可能である反応場が減少したことに関与すると考えた。特に、垂直配向ナノシート電極を用いた場合は、水平配向ナノシート電極に比べてモデルタンパク質の反応時の電流減少量は大きかった (図 2)。さらに、両電極に対して無関係タンパク質 (ヒト血清アルブミン (HSA)) を添加した場合、酸化還元電流の減少は小さいことが確認された。これらの結果から、水平配向ナノシート電極および垂直配向ナノシート電極は、モデルタンパク質を特異的に検出可能であることが示された。続いて、垂直配向ナノシート電極および水平配向ナノシート電極に対して、 10^{-11} g/mL から 10^{-6} g/mL まで濃度を変化させたモデルタンパク質を反応させることで濃度依存性を評価した。その結果、垂直配向電極は水平配向電極と比較し、濃度上昇に伴う減少率の変化が大きいことが確認された。

また、ポドカリキシンの特異的検出にむけて、ナノシート表面にレクチンを固定化した電極を作製した。ポドカリキシンおよび無関係タンパク質 (HSA) の添加前後での電流応答を確認したところ、ポドカリキシン添加時には酸化還元電流が減少したこと、HSA 添加時には変化がほとんど見られないことが確認された。このことより、レクチンを固定化したナノシート電極を用いることでポドカリキシンを特異的に検出できることが示唆された。

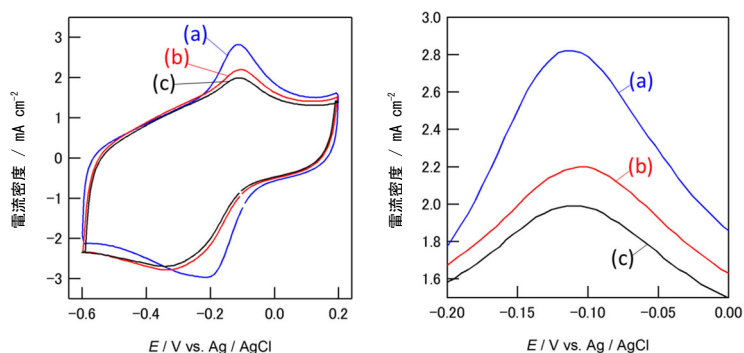


図 2 垂直配向ナノシート電極のサイクリックボルタモグラム。アミノ単分子膜修飾時 (a)、抗体固定化時 (b)、およびモデルタンパク質反応時 (c)。電解液: ヘキサアンミンルテニウムを含む PBS (pH=7.4, 25°C)。走査速度: 50 mV s^{-1} 。

(3) 半導体バイオセンサのバイオマーカー検出能の評価

垂直配向ナノシート電極の作製に並行して、電位検出型センサである半導体バイオセンサも検討した。半導体バイオセンサは、ゲートと呼ばれる検出表面に対象物質が付着することで生じる電気的な変化を検出する素子である。半導体技術を利用して作製されるため、小型集積化に有

利であり、大量生産時にはセンサの低コスト化が可能となる。レクチンを固定化した半導体バイオセンサを用いて、iPS細胞から細胞培養上清に分泌されたポドカリキシンの検出を試みた。

初めに、レクチン固定化半導体バイオセンサの特異検出性を評価するために、ポドカリキシンもしくは iPS 細胞の培養液である mTeSR1 を添加した際のセンサ応答を測定した。その結果、50 $\mu\text{g/mL}$ のポドカリキシン添加時に +50 mV の正方向へのシフトが観測された (図 3a) 一方、ヒト血清アルブミンやトランスフェリン等のタンパク質を含む mTeSR1 添加時はほとんど応答を示さなかった。半導体特性の正方向へのシフトは、ポドカリキシンの吸着に伴う半導体バイオセンサの電荷検出可能範囲であるデバイ長内の電荷密度変化したことに起因する。一方、mTeSR1 添加に伴うセンサ応答から、レクチン固定化表面には無関係タンパク質の非特異吸着が起こりにくいことが示唆された。続いて、半導体バイオセンサのポドカリキシンの定量検出の可能性を検証するために、異なる濃度のポドカリキシン (0.5~50 $\mu\text{g/mL}$) 添加に伴うセンサ応答を評価した。その結果、ポドカリキシン濃度の増加につれてセンサ応答が増加した (図 3b)。以上より、レクチン固定化半導体バイオセンサを用いることで、ポドカリキシンを特異的かつ定量的に検出できることが示唆された。

続いて、レクチン固定化半導体バイオセンサによる分化細胞中に残存した未分化細胞の識別可能性を検証した。iPS 細胞から神経細胞への分化誘導過程における培養液を採取し、各々の培養液をセンサに添加した時の応答を評価したところ、分化処理後の経過日数に伴いセンサ応答が減少した。これは分化処理により iPS 細胞数が減少して神経細胞数が増加したため、培養液中のポドカリキシンが減少したためと考えられ、フローサイトメトリー測定による iPS 細胞数の変化と一致した。したがって、レクチン固定化半導体バイオセンサは、iPS 細胞の分化状態を非侵襲的に把握するデバイスとして有用であることが示された。

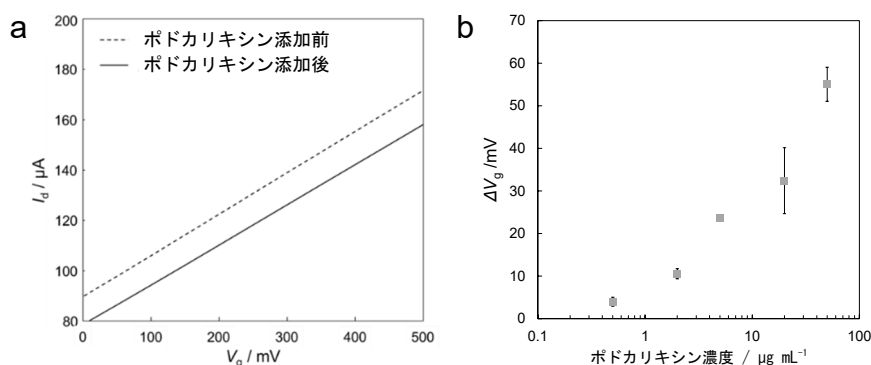


図 3 ポドカリキシン添加前後におけるレクチン固定化半導体バイオセンサの半導体特性の変化 (a)。異なる濃度のポドカリキシン添加に対するレクチン固定化半導体バイオセンサの応答 (b)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hideshima Sho, Hayashi Hiroki, Saito Sayoko, Tateno Hiroaki, Momma Toshiyuki, Osaka Tetsuya	4. 巻 3
2. 論文標題 A Non Destructive Electrical Assay of Stem Cell Differentiation Based on Semiconductor Biosensing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analysis & Sensing	6. 最初と最後の頁 e202200046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anse.202200046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾形雄太、杉本渉、秀島翔
2. 発表標題 多孔質ナノシート電極における配向性が食物アレルギー検出性能に及ぼす影響
3. 学会等名 電気化学会第89回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Ogata, Daisuke Takimoto, Sho Hideshima, Wataru Sugimoto
2. 発表標題 Electrochemical Biosensing of Food Allergens Using Vertically-Aligned Antibody Functionalized MXene
3. 学会等名 Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science 2020 (PRiME 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾形雄太、滝本大裕、秀島翔、杉本渉
2. 発表標題 垂直配向ナノシート電極を用いた食物アレルギーの電気化学的検出
3. 学会等名 電気化学会第88回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------