

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20398

研究課題名（和文）超並列デジタル電気穿孔による遺伝子導入の網羅的現象解明とiPS細胞の生産性向上

研究課題名（英文）Comprehensive Elucidation of Gene Transfer Phenomena and Improvement of iPS Cell Productivity by Super-Parallel Digital Electroporation System

研究代表者

岡本 俊哉（Okamoto, Shunya）

豊橋技術科学大学・工学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：00909294

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、iPS細胞の生産性向上を目的に、電圧印加による細胞への遺伝子導入をマイクロ流体チップ上で簡便に、かつ、多量で実行可能なマイクロ流体システムの開発を行った。その結果、1つのチップ内で、細胞が入った微細な液滴を作り、そこへ電圧を印加し細胞へ刺激を与えられることができ、また、細胞の培養や、細胞の染色による、行った処理の評価ができるシステムを構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究、マイクロ流体チップにおける流体制御技術の研究を基盤に、マイクロ流体チップ内での細胞への遺伝子導入技術や細胞培養技術の研究を行った。細胞を取り扱う研究では、いかに同じ条件で多数の操作を行うか（再現性や統一性の担保）が重要となる中で、簡便に多量の細胞封入液滴を作製可能な流体制御技術を確立し、また、不必要な外的要因を排除するため、処理後の細胞培養をチップ内で行うための条件を確立した。本システムでは、液滴への細胞封入から、細胞への電気刺激印加、その後の状態観察（細胞培養）までの一連の操作を、1チップで多数を並列に実行できることから、細胞の更なる現象理解への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a super-parallel digital electroporation system with a microfluidic device for comprehensive elucidation of gene transfer phenomena and improvement of iPS cells' productivity. As a result, it was confirmed that the developed system can easily execute to create micro-droplet including cells and to apply stress to the cell by electrical Voltage application. Moreover, the device was demonstrated to be able to carry out cell culture and an evaluation by cell staining.

研究分野：マイクロ流体工学

キーワード：マイクロ流体チップ 電気穿孔法 エレクトロポレーション 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

細胞への遺伝子導入技術は、高度先進医療技術などの基盤技術として重要な役割を担っている。特に人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を活用した再生医療は、臨床応用を指向した研究が活発になされている。しかし iPS 細胞の作製効率が高くないことから圧倒的な供給不足となっている。本研究ではこの現状を打破すべく、複数の微小反応器が配列されたマイクロ流体デバイスを作製し、次世代の iPS 細胞作製技術として注目されるマイクロ液滴電気穿孔法をオンチップで実行する。そして iPS 細胞作製効率の向上に貢献するものである。従来のマイクロ液滴電気穿孔法は、流体の流れの中で連続的に各操作を実行する一方で、本提案研究では各反応器において静止状態で実行する。これにより現象の理解をさらに深めることができる。

2. 研究の目的

本研究では、iPS 細胞を用いた再生医療の普及を指向し、細胞への電気穿孔メカニズムの解明を目的とし、微小領域で単一細胞の単離、細胞への遺伝子導入、細胞培養および評価までの一連の操作をオンチップで行うデジタル電気穿孔システムの開発を行った。本システムの特長は、同一の微小領域で細胞への遺伝子導入および細胞培養を行うことで、細胞に作用する外的要因の影響を低減し、かつ個々の領域ごとに電圧印加条件を変更することで網羅的な影響因子の探索が可能となり、また、これらを比較的簡便な操作で実行可能な点にある。また、より効率的な電気穿孔や分析のため、単一細胞を微小領域へ自律的に封入するためのマイクロウェル構造、決定論的横置換法（DLD 法）を利用した細胞懸濁液内の細胞塊と単一細胞の自律的な分離手法や、オンチップで細胞培養を行うための手法について検討を行った。

3. 研究の方法

図 1 に作製したマイクロ流体デバイスの一例を示す。デバイスは、電極をパターニングしたガラス基板に、流路をパターニングした PDMS（Polydimethylsiloxane）を接合することで作製した。デバイスへは、シリンジポンプを用いて細胞懸濁液を導入した。細胞は、ヒト胎児腎細胞（HEK293）を使用した。流路は、前半に DLD を利用した単一細胞収集部があり、細胞塊を排除した上で、後半のマイクロウェルで細胞を単離する構造となっている。そしてこのマイクロウェルには、それぞれに電極がパターニングしてあり、本研究では 4 つの電圧印加条件を同時に試行することができる仕様となっている。

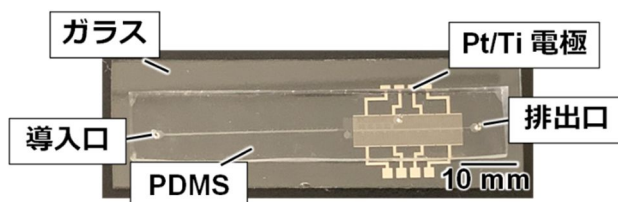


図 1 デジタルマイクロ液滴電気穿孔システムの概要図

4. 研究成果

本研究の特徴の 1 つに簡便な操作でのマイクロ液滴生成がある。各マイクロウェルには 3 対の受動バルブが組み込まれており、これらの開閉の閾値の圧力を調整することで、細胞懸濁液と分離相（オイルや空気）を順に送液するだけで、単離された細胞封入液滴を形成可能である（図 2）。

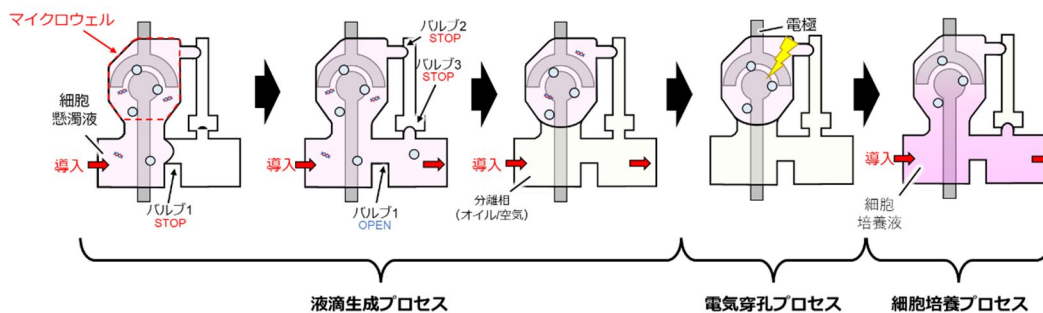


図 2 マイクロウェルで実行されるプロセス

図 3 に液滴生成プロセスの実験の様子を示す。まず、細胞懸濁液を導入すると、まずバルブ 1 で懸濁液が堰き止められ、マイクロウェルへと進路を変える。マイクロウェルを満たすとバルブ 2 によって堰き止められる。バルブ 1 のほうが決壊しやすく設計してあるため、懸濁液は次のマ

マイクロウェル方向へと流れる。マイクロウェルのベント流路はメインの流路につながっているが、バルブ3により、ベント流路への流入が防がれている。また、バルブ2とバルブ3に封入された空気は、バルブ2の決壊に必要な圧力をあげる方向に働き、マイクロウェルから細胞が流出するのを防ぐことができる。この動きが連続して実行され、作製した100個のウェルすべてを懸濁液で満たすことができることを確認した。続いて、マイクロウェルに入った懸濁液を単離するため、分離相を送液した。分離相はオイルおよび空気の2種類を試したが、いずれも懸濁液を単離可能であることを実証し、本流体制御技術の汎用性の高さを確認した。

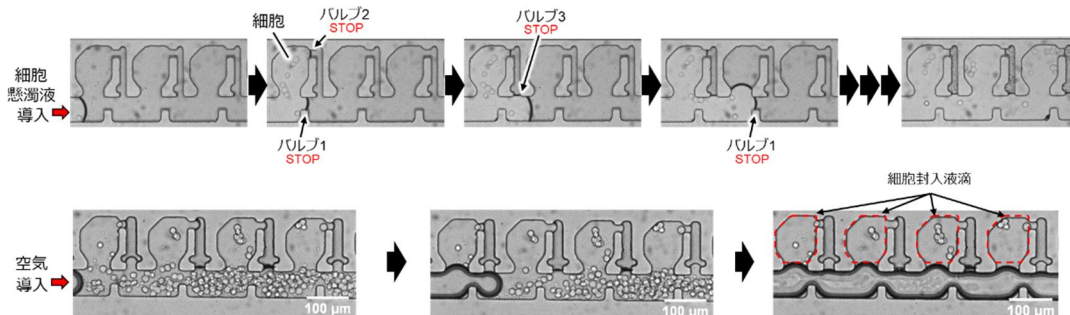


図3 細胞懸濁液導入の様子(上段)と空気による細胞封入液滴単離の様子(下段)

次に、本システムで、細胞へ電気刺激を印加可能であることを確認するため、Fluo 3-AM をオフチップで予め細胞に導入し、電気刺激による応答を調査する実験を行った。細胞は外部から刺激を受けると内部のカルシウムイオン濃度が変化することが知られており、Fluo 3-AMはこのカルシウムイオンの蛍光指示薬である。

図4に実験結果を示す。本研究では、双極性パルス電圧を印加した。図4(c)は測定された電圧の一例(±4V印加時)である。±4V以上の電圧印加時に蛍光輝度が変化することが確認され、本システムで封入された細胞へ電気刺激を印加可能であることが実証された。一方で、この細胞では、±8V印加時に途中で蛍光輝度の増加がなくなる現象が観察され、また、±10V印加時には蛍光輝度増加しなかったことから、±8V以上の電圧を印加すると、細胞死が発生することが示唆される結果を得た。

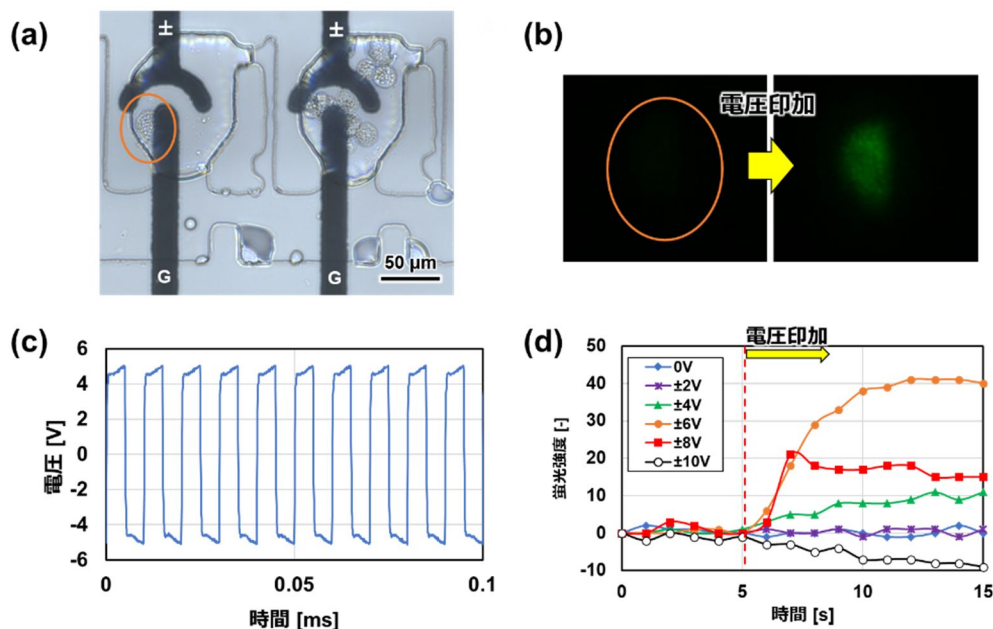


図4 電気刺激印加検証実験の結果

- (a) 明視野画像 (b) 蛍光観察画像。(a)の で示した細胞を観察している。
(c) 電圧印加時に計測された電圧波形 (d) 印加電圧ごとの蛍光輝度の変化量

続いて、マイクロウェル内での細胞培養方法について検討を行った。電気穿孔で細胞へ物質を導入したあとは、例えば、iPS細胞作製時には発現まで培養するが必要であったり、導入物質の確認のためのインキュベートの必要があったりするためである。

まず、マイクロウェル内に液滴を形成したあと、その液体を置換可能であるかを検討した。

図5はその結果である。無着色のバッファを導入し、一旦空気で単離して液滴を形成したあと、蛍光試薬を溶かした水を導入し、流路内の蛍光輝度の変化を観察したものである。まず、蛍光試薬導入時においても、バルブ2は決壊することなく機能したため、マイクロウェル内の液体を流出させることなく、流路内に蛍光試薬を導入することができた。図(d)は、各点における蛍光輝度の経時変化量を示している。蛍光試薬導入からおよそ2分で、マイクロウェル内の蛍光輝度が導入蛍光試薬の約6割に達することを確認し、マイクロウェル内の液体を入れ替え可能であること示唆する結果が得られた。

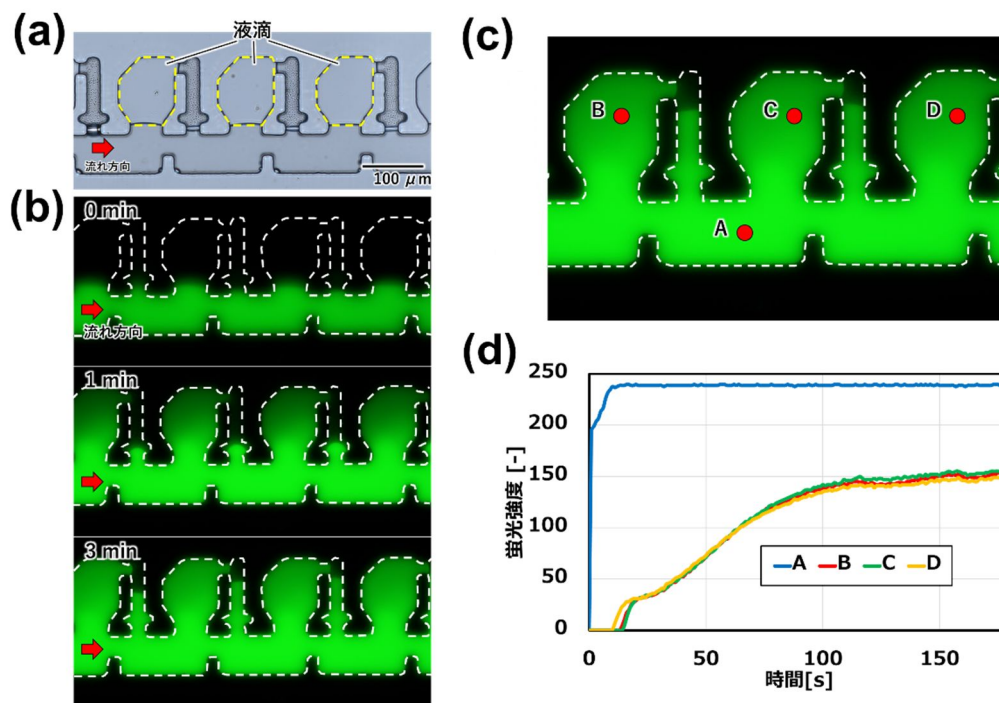


図5 マイクロウェル内の液体の置換検証の結果

(a) 明視野画像 (b) 蛍光観察画像 (c) 蛍光輝度を計測した箇所 (d) 各点の蛍光輝度の変化量

次にマイクロウェル内で細胞を培養し、その後細胞の生死判別を行う実験をした。細胞の生死判別には、生細胞染色液 Carcein-AM (PromoKine) と死細胞染色液 EthD- (PromoKine) を用いた。まず、チップ内で細胞封入液滴を作製後、チップ内の液体を培養液に置換しただけの状態では、3日間培養した場合には、細胞の増殖が確認できなかった。ディッシュを用いた通常の培養では、播種から1週間程度は培養液の交換なく培養できることから、チップ内では、培養液の供給が少なかったことが、要因として考えられる。そこで、図6に示すように、培養液を入れたピペットチップをチップの導入口に挿入し、重力により培養液を送液しながら培養する方法を試みた。その方法で3日間培養を行った結果と、その時の細胞染色(生死判別)を行った結果を図7に示す。

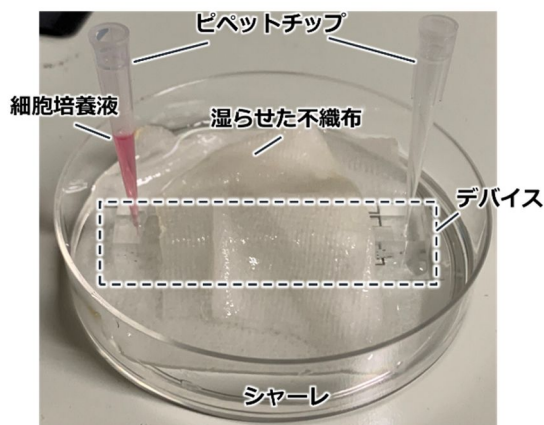


図6 細胞培養の様子

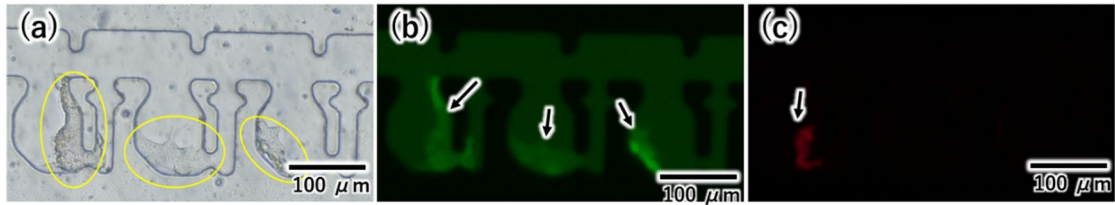


図7 培養3日目の観察結果

- (a) 明視野観察画像 (b) 蛍光観察画像 (生細胞 | 蛍光フィルター : FITC)
(c) 蛍光観察画像 (死細胞 | 蛍光フィルター : mCherry)

まず、明視野観察から、細胞の仮足が形成されていることが観察できる。また、蛍光観察から、黄緑色に染色されている細胞と赤色に染色されている細胞が観察できる。黄緑色は生細胞であることを示しており、赤色は死細胞であることを示している。つまり、本デバイスを用いて、細胞の生死判別が可能であることと、細胞培養が可能であることを実証できたといえる。

以上より、本提案システムにより、1つのチップ内で、細胞封入液滴の形成、電気刺激印加、細胞培養、細胞染色による評価が実行可能であることが実証されたといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田健生, タミン オスウェル, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行
2. 発表標題 ゲノム情報制御のためのデジタル液滴電気穿孔システムの開発 – マイクロウェルアレイを用いた微小液滴形成法の基礎的検討 –
3. 学会等名 2021年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田健生, タミン オスウェル, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行
2. 発表標題 ゲノム情報制御のためのデジタル液滴電気穿孔システムの開発 – 細胞のストレス応答を指標とした電気穿孔条件の検討 –
3. 学会等名 2022年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田陸, 柴田健生, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行
2. 発表標題 ゲノム情報制御のためのデジタル液滴電気穿孔システムの開発 (第3報) - オンチップ細胞生死判定機能の評価 -
3. 学会等名 2023年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田健生, 本田陸, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行
2. 発表標題 細胞培養機能を統合したデジタル電気穿孔デバイスの開発
3. 学会等名 第32回 ライフサポート学会 フロンティア講演会
4. 発表年 2023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
---------	---------