

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25600056

研究課題名(和文) マイクロチップ上での遺伝子導入と1細胞追跡を用いた細胞初期化・分化の研究

研究課題名(英文) A study on the on-chip transfection and time-lapse observation of initialization and differentiation

研究代表者

鷲津 正夫 (WASHIZU, Masao)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10201162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロチップ上での遺伝子導入技術を確立した。この技術の、精密なタイミングで細胞に遺伝子を導入するという特長を生かし、体細胞のiPS化と細胞周期の関係につき研究を行った。G1期には赤、S期-G2期-M期には緑に発光するFucciを導入したHela細胞を用いて、山中因子を導入したところ、S期～M期で周期を停止する細胞が、山中因子を含まない場合に比べて有意に多く観察された。また、Oct3/4の抗体染色を行ったところ、約70%の細胞でGFPとOct3/4発現が一致しているという結果が得られた。これらの実験結果より、S期～M期での細胞周期停止は山中因子の導入・発現により誘発されたものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Gene transfection method on a microfabricated chip is established. The feature of the device, being able to precisely control the timing of transfection, is made use of to investigate the relation between cell cycle and initialization by Yamanaka factors. When the factors are fed to Hela cells recombined with Fucci factor (green fluorescence during G1 period, and red fluorescence through S-G2-M period), it was found that significantly large number of cells stopped at S-M period compared with that where no Yamanaka factors were fed. Staining with anti-Oct3/4 antibody, 70% of the cells show simultaneous expression of GFP and Oct3/4. These observation suggest that the cell period stopping is induced by the feeding of, or the expression of Yamanaka Factors.

研究分野：バイオナノテクノロジー

キーワード：マイクロ・ナノテクノロジー エレクトロポレーション マイクロチップ 再生医療 静電気 遺伝子導入 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞は、体細胞に数種類の遺伝子(いわゆる山中ファクター)を導入することにより作製される、多分化能を持つ細胞のことである。シャーレ上の細胞にこれらの遺伝子を導入して2週間ほど培養すると、一部の細胞が移動・集合を始めることにより、もとの細胞1万個から1つ程度の確率で細胞塊(コロニー)が発生し、そのコロニーを再播種・継代することにより、iPS 細胞が得られる。この作製法の必然として、1つのコロニーの中のすべての細胞がもともと1つの細胞から分裂してできたものであるという保証は無く、むしろ、遺伝子の入り方の異なる多数の細胞を源とするヘテロな集団がコロニーを形成していると考えらるべきである。この、均一性・同一性を保証できないということは、臨床応用においては安全性の問題を、薬剤スクリーニング応用などでは信頼性の問題を引き起こす。このような場合には、コロニーを分解して細胞を取り出し、その子孫を増殖・採取する、いわゆるクローニングが一般に行われるが、これは一般に数ヶ月を要する煩雑なプロセスであり、かつ、本当に細胞の純度が保証されるとは限らない。また、iPS の形成過程自体が解明されていないという問題もある。体細胞のiPS 化および分化誘導は遺伝子のエピジェネティックな修飾にかかわる事柄であるので、遺伝子導入等の操作を行うタイミング、特に細胞周期との関連が予測されるが、従来の導入法では、遺伝子や因子導入のタイミングを分秒のオーダーで制御することは困難であり、様々な因子を任意のタイミングで供給できる手法の開発が待たれている。さらに、エピジェネティックな変化は、コロニー形成以前にも生じている可能性もあるが、現在の集団的に細胞を扱う方法では、これらを見逃しているかもしれない。

## 2. 研究の目的

今回の申請では、顕微鏡下で長期培養可能なマイクロ細胞培養チャンパー内にオリフィスシートを設置し、細胞周期を蛍光により可視化した細胞をそのシート上に播種培養し、エレクトロポレーションにより遺伝子等の物質を導入し、その後の細胞の周期・形態等の変化を各々の細胞について経時的に追跡することにより、体細胞のiPS 化・iPS 細胞の分化を、特に細胞周期に着目して可視化解析し、初期化・分化の過程の解明をするための手法を開発することを目的とする。さらに、この手法は、各々の細胞の履歴が追えるため、由来の明らかな初期化/分化細胞クローンを得ることができ、移植医療用細胞製剤として、あるいは創薬のスタンダードとしてのiPS 細胞の応用展開を加速することが期待される。

## 3. 研究の方法

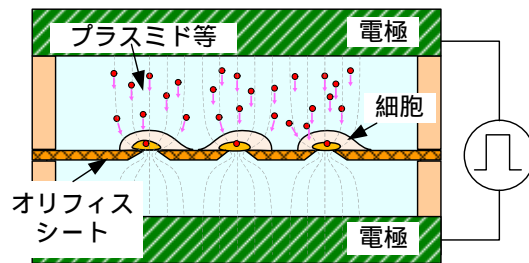


図1 オンチップエレクトロポレーション

本研究は、申請者らの独自技術であるオンチップエレクトロポレーションを用いて、細胞のエピジェネティックな性質の操作および計測を行うものである。チップ上でのエレクトロポレーション自体は MIT や UC Berkeley で例があるが、DNA のトランスフェクションが安定的に行なえるのは、申請者らがほぼ唯一の例である。すなわち、申請者らは、図1に示すように、細胞を付着培養した時に細胞核の下に少なくとも1つのオリフィスが来るような密度(たとえば10 $\mu$ m ピッチ)でオリフィスを配置し、かつハイドロゲルで裏打ちしたシートを用いる方法を開発した。このシート上で適切な電気条件でエレクトロポレーションを行うと、プラスミド DNA は電気泳動効果により電気力線に沿って泳動し、細胞核に到達する。一般の遺伝子導入法では、DNA が核に移送されるまでに多段の細胞内プロセスを経なければならぬため、遺伝子発現まで細胞周期程度(半日~1日)かかるのに対し、本法は電気泳動で核に直接入るため、パルス印加後2時間程度以内に遺伝子発現が生じる。さらに、オリフィス上に核がある場合には、必ず DNA が到達することが期待されるので、高収率(数十%)な遺伝子導入が可能になる。また、導入に必要な電圧はたかだか1-2V であるので、非侵襲も期待できる。

一方、細胞周期は、理研の宮脇らによる Fucci 遺伝子により、蛍光顕微鏡下で可視化することができる。この技術と、申請者らの遺伝子導入の即時性・高収率性を組み合わせることにより、タイミングを制御した遺伝子あるいは他の因子の細胞への導入と、その後の1細胞レベルでの追跡が可能になる。

このような1細胞レベルでの物質導入・細胞応答の経時変化計測は、現状のシャーレ上での生物学的手法では実現不能であり、iPS 等エピジェネティックな操作および計測に大きな進歩をもたらすものと期待される。

## 4. 研究成果

(1) 山中因子導入と細胞周期の停止の発見：  
iPS 細胞とは、山中因子と呼ばれる4つの遺伝子を導入することで体細胞を初期化し

て得られる，分化万能性を再獲得した細胞のことである。iPS 細胞の作製方法の最も簡便な方法の一つが，自己複製と遺伝子発現の両方ができるエピソーマルプラスミドをエレクトロポレーション(電気穿孔法)で細胞内導入する手法である。iPS 細胞はその作製効率の低さが実用化への妨げの一つとなっているが，この効率の低さの原因として細胞ごとの遺伝子発現や細胞周期に依存する細胞内部状態のばらつきが指摘されている。特に細胞周期のS期のDNAは他の細胞周期とは異なり，凝縮が解かれた状態にあるため，山中因子による初期化との深い関連が示唆される。

したがって本研究では，山中因子が細胞周期にどんな影響を与えるのかを明らかにするため，遺伝子導入後の細胞周期の挙動についてタイムラプス観察した。

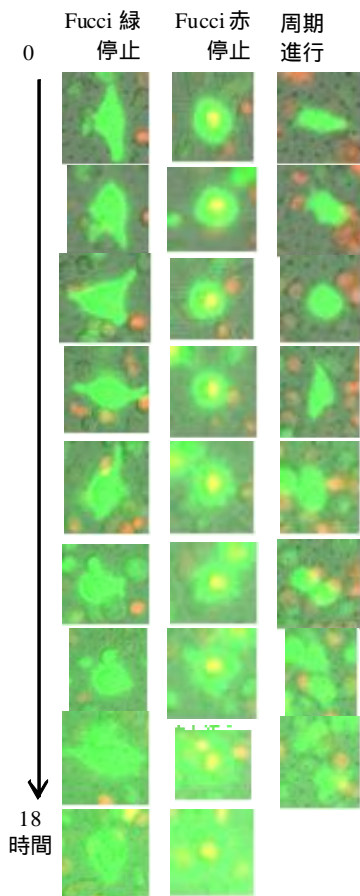


図2 山中+GFP プラスミド導入細胞の細胞周期観察結果

山中因子の導入実験においては，山中因子の導入成否の確認をとるために山中因子とGFP プラスミドを混合し，HeLa/Fucci 細胞に導入した，こうして得られた GFP 蛍光発現細胞をタイムラプス観察した結果(図2)，周期が停止している細胞が，山中因子を導入していない細胞に比べて有意に多く見られた(図3)。この周期停止細胞の周期内訳を調べたところ，S期-G2期-M期が多かった(図4)。

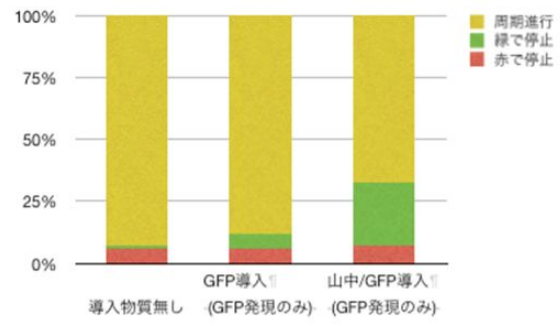


図3 周期停止細胞の占める割合

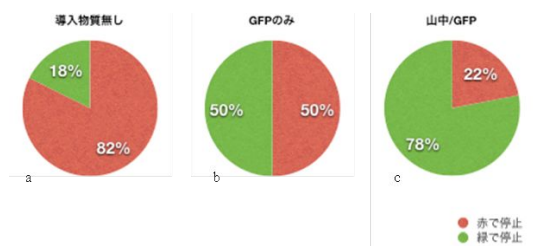


図4 周期停止細胞周期内訳

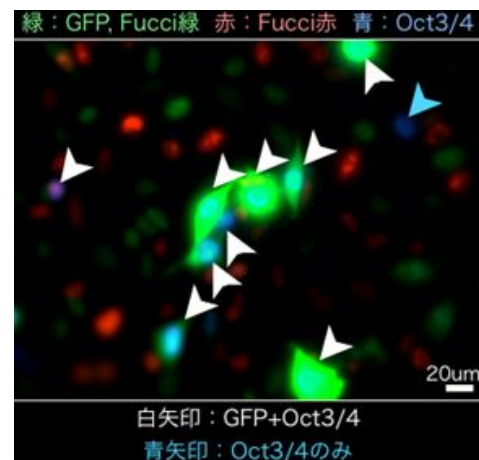


図5 細胞染色時の Fucci・GFP・Oct3/4 の発現状態：HeLa/Fucci 細胞に山中/GFP プラスミドを導入後 Oct3/4 を染色した結果

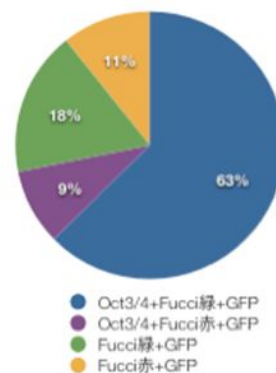


図6 細胞染色時の Fucci・GFP・Oct3/4 の発現状態：GFP 発現細胞の染色時の Fucci 蛍光と Oct3/4 の有無

次に、山中因子の導入成否状況の確認をとるため、山中/GFP プラスミド導入細胞に対して Oct3/4 の抗体染色を行った。約 70% の細胞で GFP 発現と Oct3/4 発現が一致しているという結果が得られた(図 5, 6)。

これらの実験結果より、S-G2-M 期での細胞周期停止は山中因子の導入・発現により誘発されたものである可能性が示唆された。

(2)細胞周期による遺伝子発現量の差異の計測：

Fucci を有する HeLa 細胞に、オンチップエレクトロポレーションにより GFP プラスミドを導入し、GFP の発現と細胞周期の関係を調べた。その結果が図 7 である。

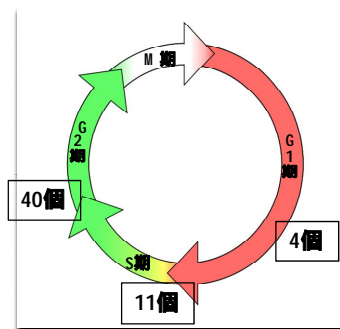


図 7 各細胞周期における GFP の発現個数

発現は、G1 期では発現は少なく、S 期-G2 期-M 期において多いという傾向が観察され、特に G1 期から S 期に入った直後に急激に数が増えるという結果であった。この原因としては、G1 期では細胞自身のタンパク質合成が優先に行われるため、GFP の発現は少ないのに対し、G1 期直後では細胞自身のタンパク質合成を終えており、比較的フリーなタンパク質合成系が多くなるので、GFP 発現が活発に起きたと言えるかもしれない。(1)において、外来因子の導入により細胞周期が停止したように見えたのは、タンパク質合成系がフリーになるのを待つため、必ずしも初期化因子の働きとばかりは言えないのかもしれない。

いずれにせよ、本研究を通じて、ある特定の細胞周期をねらって数秒の時間分解能で遺伝子を導入する手法が開発されるとともに、その細胞のエピジェネティクス研究への応用の道が開けたと評価される。

##### 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 3 件)

- [1] 黒澤修・オケヨ ケネディ オモンディ・小穴英廣・沖田圭介・小寺秀俊・鷲津正夫：「オンチップエレクトロポレーションを用いた接着細胞核への遺伝子直接送達法の開発」静電気学会誌, Vol.38, No.1, p.28-33 (2014)

- [2] オケヨ ケネディ・西垣内康宏・近藤武宏・黒澤修・小穴英廣・小寺秀俊・鷲津正夫：「電界集中型細胞融合法による抗体産生細胞の高収率取得」静電気学会誌, Vol.38, No.1, p.40-45 (2014)

- [3] Masao Washizu, Boonchai Techaumnat: "Analysis of general multipolar images on dielectric layers for the calculation of DEP force", Journal of Electrostatics 71, 854-861 (2013)

〔学会発表〕(計 4 件)

- [1] K.O. Okeyo, R. Yanaru, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu: "Generation of epithelial cell sheets with defined cell orientation using microstructured mesh sheets as a substrate for cell culture", μTAS2014, October 26-30, 2014, San Antonio, Texas, p. 1128-1130 (2014)

- [2] K.O. Okeyo, T. Isozaki, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu: "Stable and long term culture of stem cells under shear flow on a microstructured mesh sheet embedded in a fluidic chamber", μTAS2014, October 26-30, 2014, San Antonio, Texas, p. 907-909 (2014)

- [3] K. O. Okeyo, Y. Hayashi, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu: "On-chip electroporation device for direct introduction of plasmids into cell nucleus and observation of cell reprogramming process", μ-TAS 2013, Oct. 27-31 Freiburg, Germany p.113-115 (2013)

- [4] K. O. Okeyo, N. Omasa, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu: "Cell adhesion control initiate cell sheet formation in a medium suspension", μ-TAS 2013, Oct. 27-31 Freiburg, Germany p.1057-1059 (2013)

〔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〕

<http://www.washizu.t.u-tokyo.ac.jp/>

##### 6. 研究組織

(1)研究代表者

鷲津正夫(東京大学大学院工学系研究科  
バイオエンジニアリング専攻教授)  
研究者番号：10201162

(2)研究分担者 (なし)

(3)連携研究者 (なし)