

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：33919

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19942

研究課題名（和文）シングルセル遺伝子導入デバイス

研究課題名（英文）A gene delivery microdevice for single cells

研究代表者

熊谷 慎也（Kumagai, Shinya）

名城大学・理工学部・教授

研究者番号：70333888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,100,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の形質を積極的に制御するために遺伝子導入が行われる中、物質の第4の状態であるプラズマを用いる遺伝子導入が注目を集めている。いずれの遺伝子導入手法によっても、遺伝子導入の現場では、個々の細胞における遺伝子の発現がバラつくことが問題となっている。そこで、本研究では、マイクロ電気機械システム技術とプラズマ技術を駆使し、一細胞レベルで均一に遺伝子を導入するマイクロシステムの開発を行なった。マイクロデバイスに作り込まれたシャーレ構造の中で細胞を培養し、プラズマを利用した細胞内への物質導入を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、プラズマ照射型シングルセル遺伝子導入デバイスの開発である。一細胞に対して確実に遺伝子導入を行って、その細胞をマイクロウェル構造の中で増殖させることで、同じ遺伝情報を持つ細胞群（クローン）を高い効率で作り出す。将来性の一つとして、iPS細胞の樹立には山中4因子を導入する必要があり、樹立確立は1%程度と低い。本手法で各因子を細胞内に確実に導入し、高効率に初期化できる可能性がある。本研究は、医工学関連分野でのイノベーションを起こす第一歩となる意義を持っている。

研究成果の概要（英文）：Transfection is the process of inserting genetic material, such as DNA into cells. The method is a powerful tool to control cell trait. However, it has been difficult to induce gene expression equally in all cells treated. In this study, we used a plasma, which is the fourth state of matter, for effective transfection. Utilizing micro electromechanical systems (MEMS), a microwell array device was fabricated that enables plasma treatment on single cells cultured in each microwell. Introduction of DNA and chemical substances into cells were achieved by plasma treatment. The microsystem is an important first step towards controllable transfection that has a potential to revolutionize protocol for establishing iPS cells.

研究分野：ナノバイオテクノロジー、マイクロ電気機械システム、プラズマ科学

キーワード：プラズマオンチップ マイクロデバイス 細胞 遺伝子導入 大気圧プラズマ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の形質を積極的に制御するために、遺伝子導入が行われている。その応用の一つに遺伝子治療があり、これまで難病とされていた病気の治療が行われている。細胞に遺伝子を送り込むために、ウイルスベクターを使用できるが、ウイルスがゲノムに組み込まれる際、正常な遺伝子を破壊してしまう危険性があり、運べる遺伝子の大きさにも限りがある。

その欠点を補う手法として、現在、エンドサイトーシスを利用したりポフェクションや、高電圧パルスをかけて細胞膜に孔を形成する電気穿孔法(エレクトロポレーション)が行われている。ただこれらの手法は、ウイルスベクターを用いる手法に比べて、遺伝子導入効率の低いことが問題となっている。近年、工学研究者らによって、物質の第4の状態であるプラズマを利用する、プラズマ遺伝子導入法が開発された。このプラズマ遺伝子導入法は、細胞に対して常温常圧のプラズマを照射し、細胞膜に微細孔を開けて細胞の内部に遺伝子を導入するものであり、高効率な遺伝子導入に関する報告がされている。

上述のように様々な遺伝子導入法があるものの、いずれの遺伝子導入においても、個々の細胞内での発現にバラつきが生じることが課題となっている。最先端医療で注目を集める iPS 細胞を一例としてあげてみたい。患者の細胞を元に、山中4因子を導入して iPS 細胞を樹立する際にも、細胞集団の中から質の良いクローンを選び出して、その後の解析が行われている。これは砂場の中から金の粒を探す作業に等しく、時間的・経費的に非効率である。それゆえに、この状況を打開する遺伝子導入法が期待されている。

### 2. 研究の目的

前述の背景より、多数の細胞の集団に対して遺伝子導入が行われて、遺伝子の発現にバラつきが発生するのであれば、個々の細胞に対して、確実に遺伝子導入できる手法を開発すればよいと考えられる。本研究では、はじめから一細胞を狙って遺伝子を導入し、細胞を改変することを目的としている。望み通りの改変ができれば、そのままシングルセルクローンとして使えるはずである。

### 3. 研究の方法

一細胞レベルで遺伝子導入を行っていく上でのカギは、一つの細胞に対して、一定量の遺伝子を供給すること、供給された遺伝子を確実に細胞の内部に導入すること、にあると考えられる。そこで本研究では、マイクロ電気機械システム(Micro Electro Mechanical Systems, MEMS)技術とプラズマ技術を駆使した遺伝子導入法を開発する。

一細胞を培養する、マイクロシャーレを作る[図1(a)]。このマイクロシャーレの底面部には微細孔を設けておき、後のプラズマ遺伝子導入で使用する。続いて、マイクロシャーレ内で培養される細胞に対して、マイクロシャーレの背面から常温常圧のプラズマ(電離気体)を照射する。プラズマの中で生成された活性種は、マイクロシャーレの底面に設けられた微細孔からマイクロシャーレ内に拡散し、細胞膜に到達して、細胞膜に孔を形成する[図1(b)]。培養液中に供給された遺伝子は、この孔を介して、細胞の中に入るとする[図1(c)]。ウェルの中で細胞を増殖させれば、同じ遺伝子情報を持つ細胞群が得られる。

本手法の要点を説明するために、図1では一つのマイクロシャーレ構造のみを描いているが、MEMS技術でマイクロシャーレをアレイ状に作製することは容易である。アレイ型のマイクロデバイスを作製することで、多数の細胞に対して同時に遺伝子導入することも可能になる。

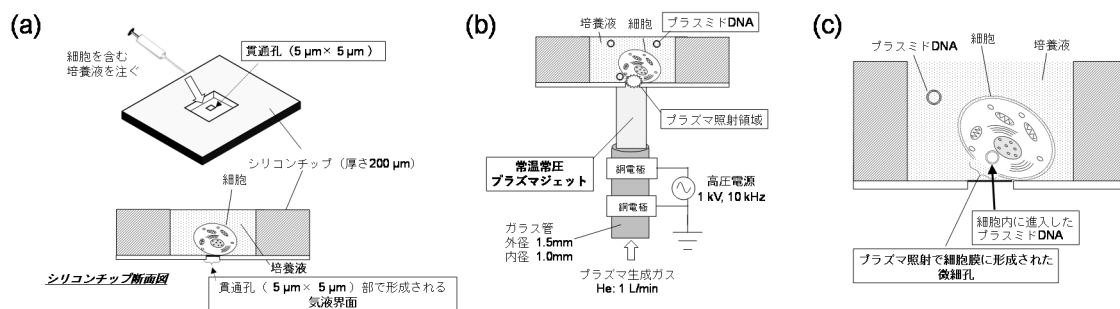


図1 マイクロデバイスを用いた細胞へのプラズマ遺伝子導入の概略。(a) デバイスのマイクロウェル部に細胞を含む培養液を注ぐ。貫通孔部(5 $\mu$ m角)では、液体の表面張力で気液界面ができ、液体は漏れない。(b) 実験の断面図。貫通孔部を下側からプラズマジェットで照射する。(c) プラズマ照射を受けた細胞の断面図。プラズマ照射で細胞膜に孔ができ、プラスミドDNAが内部に拡散する。

#### 4. 研究成果

研究期間の1年目(2018年度)では、まず、一細胞に対してプラズマを照射するためのマイクロデバイスの試作を行った。文科省ナノテクプラットフォーム事業を活用し、近隣大学の微細加工設備を利用してマイクロデバイスを作製した(図2)。22mm角のSiウェハの中に細胞を培養するマイクロシャレのアレイ構造が4パターン分作製されており、使用する際に1/4の大きさにカットする。マイクロデバイスのハンドリングを容易にするため、カットしたデバイスを、図3に示すように、テフロン製の治具に固定した。その後、マウス線維芽細胞 L929 を含む培養液を注ぎ、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養を行なった。

マイクロデバイスを作製する一方で、細胞に対してプラズマを照射するための実験システムを構築した(図4)。細胞に遺伝子導入を行うために、マイクロデバイスの背面から、ジェット状のプラズマを照射することが可能になった。

研究開発期間の2年目(2019年度)では、マイクロデバイス上でマウス線維芽細胞を培養し、まず、蛍光プローブを用いて細胞へのプラズマ照射刺激の影響を評価した。マイクロデバイスのプラズマ照射部直近に位置する細胞に変化を与えられることを確認した。続いて、蛍光試薬を用いてプラズマ照射による物質導入の過程を評価した。プラズマ照射によって細胞膜に形成される微細孔の大きさおよびその形成時間に関する知見を得た。一方で、シャレ上で培養したマウス線維芽細胞に対してプラズマを照射し、緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)の導入に成功した。

この GFP の導入成果とマイクロデバイスとを併せることで、個々の培養細胞に対する効果的な遺伝子導入を実現できると考えられる。一細胞に対して確実に遺伝子導入を行い、その細胞をマイクロシャレの中で増殖させることで、同じ遺伝情報を持つ細胞群(クローン)を高効率で作出できる可能性がある。

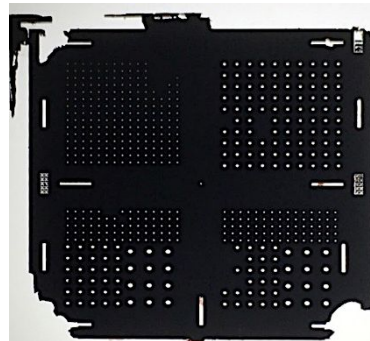


図2 試作したマイクロデバイス。大きさは22 mm × 22 mm。本マイクロデバイスを4つにカットし、テフロン製の治具にテープで固定して、実験を行う。

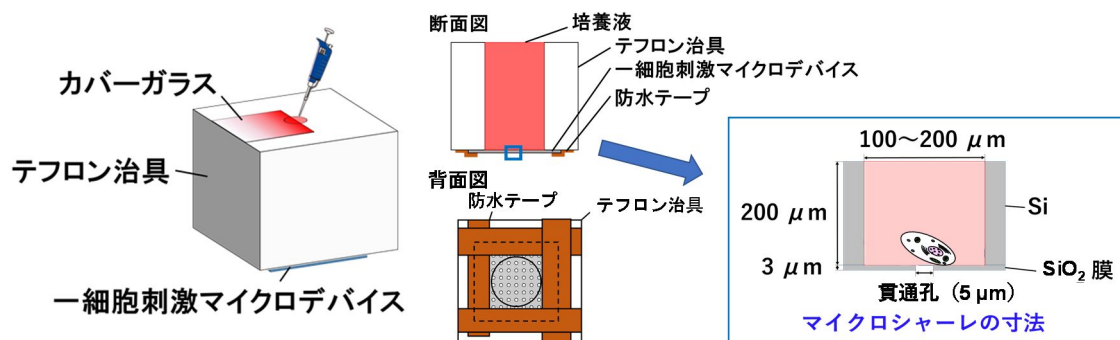


図3 細胞培養のためのテフロン治具へのマイクロデバイス固定。孔のあいたテフロン治具に対して、テープでマイクロデバイスを固定する。その後、細胞を含む培養液を孔部に導入する。細胞はマイクロデバイスのシャレ部に到達し、そこで培養される。

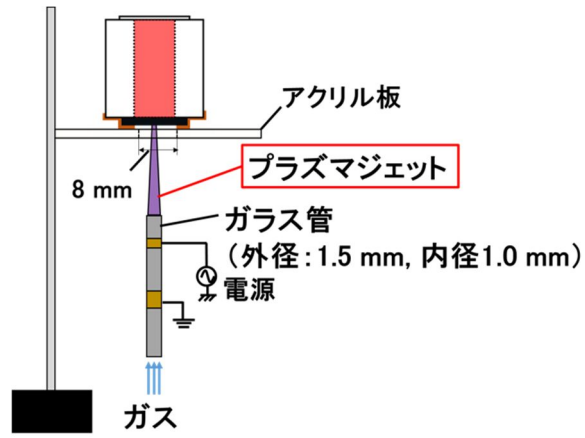


図4 マイクロデバイス内で培養される細胞に対するプラズマ照射装置。細胞を培養するマイクロシャーレ部に対し、背面側からプラズマを照射する。プラズマ中の活性種は、マイクロシャーレの底面に設けられた微細孔より、マイクロシャーレ内へ進入して細胞に到達する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koichi Ishikawa, Minoru Sasaki, Shinya Kumagai	4. 巻 59
2. 論文標題 Measurement of hydroxyl radicals delivered into liquid through a micro gas-liquid interface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SAAC11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.7567/1347-4065/ab5171">https://doi.org/10.7567/1347-4065/ab5171</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kumagai Shinya, Kobayashi Mime, Shimizu Tetsuji, Sasaki Minoru	4. 巻 140
2. 論文標題 Plasma-on-Chip: Device for Non-thermal Atmospheric Pressure Plasma Irradiation to Single Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems	6. 最初と最後の頁 452 ~ 456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1541/ieejeiss.140.452	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10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Shinya Kumagai, Chun-Yao Chang, Jonghyeon Jeong, Mime Kobayashi, Tetsuji Shimizu, Minoru Sasaki
2. 発表標題 【2018年度応用物理学会優秀論文賞受賞記念講演】 Development of plasma-on-chip: Plasma treatment for individual cells cultured in media
3. 学会等名 2018年 第79回 応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinya Kumagai
2. 発表標題 Plasma-on-Chip for Biological Application: A Microdevice for Stimulating Single Cell with Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma
3. 学会等名 2019 International Conference on Solid State Devices and Materials, Satellite Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Kumagai, Mime Kobayashi, Tetsuji Shimizu, Minoru Sasaki
2. 発表標題 Irradiating single cells with cold atmospheric pressure plasma using a microdevice
3. 学会等名 Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Kumagai, Mime Kobayashi, Jun-Seok Oh, Tetsuji Shimizu, Minoru Sasak
2. 発表標題 Plasma-on-Chip: A micro device for irradiating single cells with non-thermal atmospheric pressure plasma
3. 学会等名 3rd Asia-Pacific Conference on Plasma Physics (AAPPS-DPP 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuki Hobo, Mime Kobayashi, Shinya Kumagai
2. 発表標題 Improving substance intake efficiency using non-thermal atmospheric pressure plasma towards single cell gene transfection
3. 学会等名 The 80 th JSAP Autumn Meeting 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mime Kobayashi, Kiichiro Tomoda, Michio Asahi, Shinya Kumagai
2. 発表標題 Low temperature plasma for controlling iPS cell differentiation
3. 学会等名 The 72nd Annual Gaseous Electronics Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Kumagai, Mime Kobayashi, Tetsuji Shimizu, Minoru Sasaki
2. 発表標題 Plasma-on-Chip: An innovative microdevice targeting for cell fate control using non-thermal atmospheric pressure plasma
3. 学会等名 CiRA 2019 International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mime Kobayashi, Kiichiro Tomoda, Michio Asahi, Shinya Kumagai
2. 発表標題 Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma on iPS cell differentiation
3. 学会等名 CiRA 2019 International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuya Kitazaki, Shinya Kumagai
2. 発表標題 Measurement of time evolution of fluorescent reagent introduction rate into cells towards efficient plasma gen transfection
3. 学会等名 ISPlasma2020/IC-PLANTS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mime Kobayashi, Kiichiro Tomoda, Michio Asahi, Shinya Kumagai
2. 発表標題 Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma on iPS cell differentiation
3. 学会等名 The 67th JSAP Spring Meeting 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名城大学 理工学部 電気電子工学科 熊谷研究室  
[http://www1.meijo-u.ac.jp/~skumagai/cms\\_new/researchmap](http://www1.meijo-u.ac.jp/~skumagai/cms_new/researchmap)における研究代表者の情報  
<https://researchmap.jp/sk1/researchmap>における研究分担者の情報  
<https://researchmap.jp/Las-e/?lang=japanese>

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
研究 分 担 者	小林 未明  (Kobayashi Mime)  (60393807)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・博士研究員    (14603)	