

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02045

研究課題名（和文）マイクロ液滴電気穿孔法によるオンチップ遺伝子情報改変システムの開発

研究課題名（英文）Development of Microdroplet-based Electroporation System for Genome Editing

研究代表者

柴田 隆行（Shibata, Takayuki）

豊橋技術科学大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：10235575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイクロ流体チップテクノロジーを応用し、微小空間内での高効率な遺伝子導入を行うための電気穿孔技術を開発した。本提案技術を用いて、不死化リンパ芽球様細胞株（LCL細胞）からのヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）の樹立に成功した。将来的には、安全・高効率な遺伝子導入システムとしての装置化を図り、革新的なiPS細胞量産プラットフォームを提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞への遺伝子導入技術は、高度先進医療技術および革新的医薬品開発における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）を利用した再生医療・創薬に大きな期待が寄せられている。本提案技術は、安全かつ高効率なiPS細胞の自動化量産技術としての応用展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：With the aim of realizing gene transfer into human cells with high throughput and high efficiency, we developed an electroporation technique in micro-reaction fields by the employing microfluidic chip technology. By using this technique, we successfully demonstrated the derivation of human induced pluripotent stem cells (iPS cells) reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines (LCL cells). In the future, we will develop an innovative mass-production platform for generating iPS cells with higher level of safety and reprogramming efficiency.

研究分野：MEMS，マイクロ・ナノ加工

キーワード：遺伝子導入技術 電気穿孔法 iPS細胞 ゲノム編集 マイクロ流体デバイス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

「健康・安心な理想社会」の実現には、生命科学の新たな知を創出し、医療・医薬分野のイノベーションへと進化・発展させることが極めて重要な課題である。中でも、世界に先駆けて体細胞からあらゆる組織や臓器に分化する人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の研究でノーベル生理学・医学賞 (2012 年) を受賞した山中伸弥教授の功績を機に、再生医療分野の進展には目覚ましいものがある。例えば、2014 年 9 月には理研のグループが、加齢黄斑変性の患者の iPS 細胞から作製した網膜色素上皮細胞を移植する世界初の手術 (臨床応用) を行ったことが報じられた。その後は、iPS 細胞を利用した重症虚血性心筋症治療 (2018 年 5 月, 大阪大), パーキンソン病治療 (2018 年 11 月, 京大), 脊髄損傷治療 (2019 年 2 月, 慶応大) などの臨床応用が開始されている。このように、ヒト iPS 細胞を活用した最先端の再生医療や難病の仕組みの解明, 創薬スクリーニングなどの実践的な応用展開に大きな期待が寄せられている。しかし、現状では iPS 細胞の作製効率 (0.1%程度) が低く、手技が煩雑で高度な熟練を要し、かつ癌化などの安全性にも問題が残り、iPS 細胞は世界的に圧倒的な供給不足となっている。このため、臨床応用を加速するためには、安全かつ高効率な iPS 細胞の自動化量産技術の開発が喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

細胞への遺伝子導入技術は、高度先進医療技術および革新的医薬品開発における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) を利用した再生医療・創薬に大きな期待が寄せられている。しかし、ウイルスベクターを用いた従来の遺伝子導入法では、作製した iPS 細胞を目的とする細胞へ分化する段階で癌化の懸念があり、再生医療への適用が困難であるという本質的な問題点がある。本研究では、マイクロ液滴内 (極微小反応場) に単一細胞と初期化遺伝子を封入し、同一のマイクロ流路内で連続的に電気穿孔を行う安全かつ高効率な遺伝子導入技術 (オンチップ遺伝子情報改変システム) の確立を目的として実施した。さらに、本提案技術を iPS 細胞の作製技術として適用し、自動化量産技術としての可能性を検討した。

3. 研究の方法

図 1 に提案する遺伝子改変チップ (流路幅 50 μ m, 高さ 30 μ m) の概要を示す。遺伝子導入手順は大別して 3 つの工程からなる。まず、第 1 工程 (細胞整列) において、単一細胞のみを液滴内に封入するために、液滴形成部 (十字型流路) に細胞を等間隔に整列させて供給する。次に、第 2 工程 (液滴形成) では、十字流路部分でメイン流路を流れる分散相 (水相: 細胞と初期化遺伝子を含む懸濁液) に対して、直交するサブ流路から連続相 (油相: シリコンオイル) を適切な流量比で導入することでマイクロ液滴 (長さ \sim 100 μ m) を連続的に形成し、同時に細胞と遺伝子を封入する。最後に、第 3 工程 (液滴電気穿孔) の電気穿孔プロセスによって、細胞膜表面に一過性の微小孔を形成し、目的とする遺伝子を導入する。この工程では、流路の底面部に形成した電極対に液滴が接触した時点で電圧が印加され、細胞膜に高電圧パルス電界 (1kV/cm 以上) が作用して電気穿孔が実現される (マイクロ液滴電気穿孔技術)。この際、電極の幅や電極間距離などを適切に設計することで、細胞への電圧の印加時間を任意に制御することが可能となる。また、本提案システムの電圧印加方式では、市販の電気穿孔装置で使用される高価なパルスジェネレータ (電圧 \sim 2kV, パルス幅 \sim 10ms) は不要となり、安価な直流電源 (\sim 10V) が利用でき、将来の製品化における装置コストの低廉化が図れるという優位性もある。

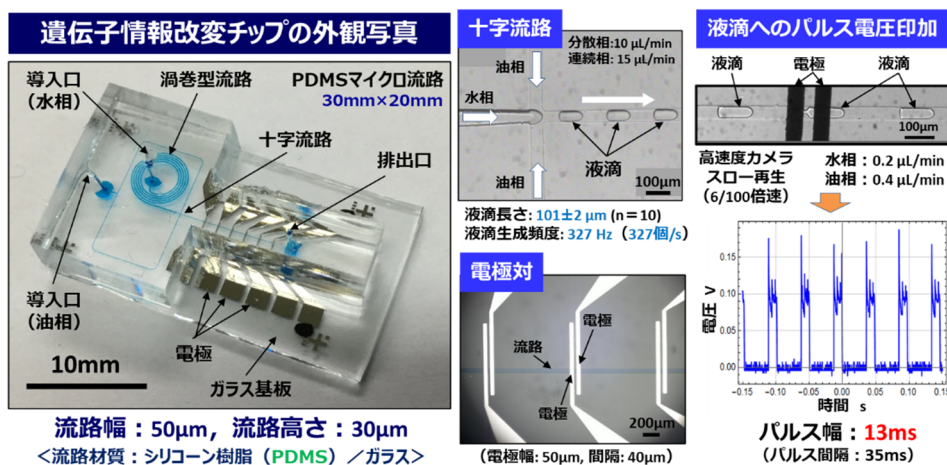


図 1 遺伝子改変チップの作製例とマイクロ液滴へのパルス電圧の印加実験

4. 研究成果

(1) 双極性パルス電圧印加による電気穿孔プロセスの安定化

図2に示すように、マイクロ流路（遺伝子改変チップ）を用いた電気穿孔プロセス（直流電圧印加条件）において、電極表面に付着物が堆積する問題があり、長時間安定した処理が行えなかった。付着物を同定した結果、主に液滴内に封入した遺伝子（DNA）であり、一部、細胞膜（死細胞の残骸）も堆積していることが判明した。経験上、意図的に電極の極性を入れ替えることで付着物が除去できることがわかっていたことから、双極性パルス電圧の印加効果を検証した。その結果、パルス周波数 10kHz の条件下では、長時間（～1h 程度）の実験においても付着物が堆積せずに安定した電気穿孔プロセスが行えるようになった。さらに、電極の溶出（液滴内に気泡が発生する際に顕著に現れる現象）が起こる電圧の上限値を DC 電圧 2V から双極性パルス電圧 ±6.5V（10kHz）まで大幅に増加できるようになり、高効率での遺伝子導入が可能となった。

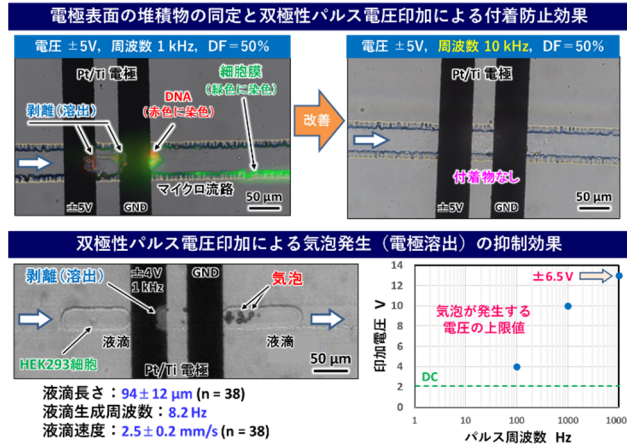


図2 電気穿孔プロセスにおける双極性パルス電圧印加効果

(2) ヒト胎児腎細胞株（HEK293 細胞）への緑色蛍光タンパク質（GFP）の導入実験

遺伝子改変チップを用いた電気穿孔プロセスにおいて、双極性パルス電圧印加条件を検討した（図3）。ヒト胎児腎細胞株（HEK293 細胞）への緑色蛍光タンパク質（GFP）コードプラスミド pCMV-EGFP の遺伝子導入実験を行い、電圧振幅（周波数 10kHz）とオフセット電圧の影響を調査した（電圧印加条件は表を参照）。細胞濃度 1.0×10^7 cells/mL、プラスミド濃度 500 ng/μL となるように細胞懸濁液を調整してマイクロ流路デバイスに導入した。図中の蛍光顕微鏡像（印加電圧 ±30V、オフセット電圧 DC+0.4V）に示すように、GFP 遺伝子が発現して緑色に蛍光する細胞が観察された。また、図中のグラフは、電気穿孔実験からの経過日数に対する GFP 発現細胞数の推移を示している。図から、オフセット電圧の有無によらず、電圧振幅の増加にとともに、遺伝子発現確率（培養 1 日目）が大きくなることがわかる。また、印加電圧 ±15V の条件では、オフセット電圧の有無によらず、電気穿孔直後（1 日目）と比較して、培養 3 日目に遺伝子発現細胞数が増加する傾向が認められた。一方、印加電圧 ±30V の条件では、1 日目には 21% の細胞で GFP 遺伝子の発現が認められたが、培養日数が経過すると、蛍光細胞数が減少していることがわかる。高電圧下での電気穿孔による細胞へのダメージによって死滅した可能性がある。

電気穿孔実験の電圧印加条件

条件番号	設定振幅	実測振幅	設定オフセット	実測オフセット	周波数	Duty比
1	15V	6.73V	0V	0.18V	10kHz	50%
2	15V	7.53V	0.4V	0.52V	10kHz	50%
3	20V	9.93V	0V	0.19V	10kHz	50%
4	20V	9.96V	0.4V	0.60V	10kHz	50%
5	30V	未計測	0.4V	未計測	10kHz	50%

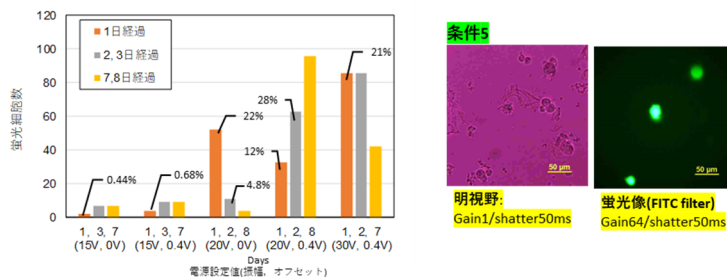


図3 双極性パルス電圧印加条件（電圧振幅とオフセット電圧）と GFP 遺伝子発現確率の関係

(4) 単相流電気穿孔プロセスの提案

油中液滴からの細胞回収率の改善および作業効率の向上を図るために、液滴を用いない「単相流」(細胞懸濁液のみをマイクロ流路内に導入)を用いた電気穿孔プロセス法を検討した(図4)。本手法においても双極性電圧を印加することで、電極表面での気泡の発生や付着物の堆積が起こらずに、長時間安定して処理が可能であることがわかった。結果として、液滴とオイルとの分離工程が不要となったことで、細胞回収数は処理時間当たり 700 個/min となり、液滴を形成するプロセス (60 個/min) に対して 10 倍以上の細胞数を次工程の培養に供することが可能となった。これによって、作業工程が簡略化でき、かつオイルフリーとなることで細胞毒性に及ぼす影響が低減でき、安全性・信頼性の向上が図れた。図4に、単相流を用いた電気穿孔法によって、HEK293 細胞株への GFP コードプラスミド (pCMV-EGFP) の遺伝子導入実験を行った結果を示す。マイクロ流路に細胞懸濁液 (細胞濃度 1.0×10^7 cells/mL, プラスミド濃度 500 ng/ μ L) を導入し、双極性三角波電圧 (周波数 10kHz、電圧 ± 10 V) を印加した。回収した細胞を 3 日間培養した結果、高い細胞生存率 (99.7%) を維持した状態で、最大で 49% の GFP 遺伝子発現確率が得られることが実証できた。

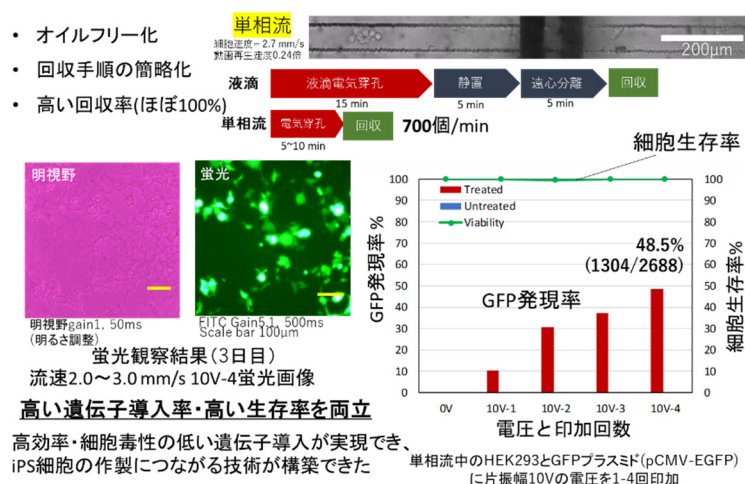
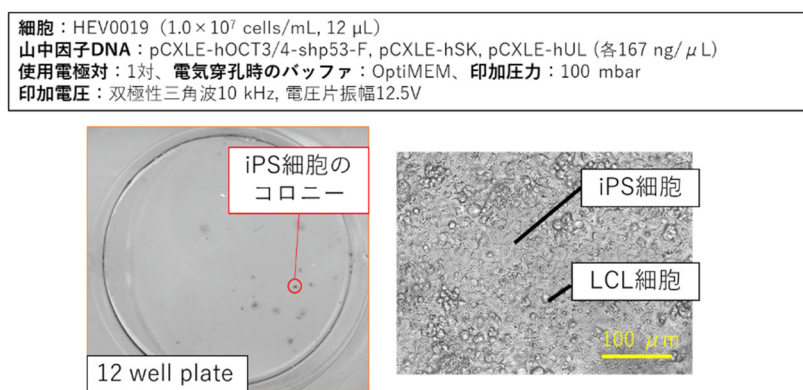


図4 単相流・双極性電圧による電気穿孔プロセスの性能評価 (GFP 遺伝子発現確率)

(5) iPS 細胞の作製実験

本技術を適用し、末梢血中の B 細胞を EB ウイルス (Epstein-Barr Virus) で不死化したリンパ芽球様細胞株 (Lymphoblastoid cell line, LCL 細胞) に山中因子を導入した。21 日間培養後にアルカリホスファターゼ染色を行った結果、樹立効率 0.048% で iPS 細胞の作製に成功した (図5)。



$$(iPS樹立効率) = (\text{コロニー数平均}57\text{個}) / (\text{処理細胞数} 1.2 \times 10^5 \text{ Cells}) = 0.048\% (n=3)$$

図5 遺伝子改変チップを用いた iPS 細胞の作製 (樹立効率 0.048% 達成)

(6) まとめと今後の展望

本研究では、マイクロ流体チップテクノロジーを応用し、微小空間内での高効率な電気穿孔技術を開発した。ヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) への緑色蛍光タンパク質 (GFP) プラスミド DNA の導入実験では、高い細胞生存率 (99.7%) と遺伝子導入確率 (47%) が得られることを実証した。さらに、LCL 細胞への初期化遺伝子 (山中因子) の導入実験を行い、iPS 細胞の樹立 (0.048%) に成功した。将来的には、安全・高効率な遺伝子導入システムとしての装置化を図り、革新的な iPS 細胞量産プラットフォームを提供する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9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, 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

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

1. 発表者名 手島（石井）美帆, 服部光治, 栗田弘史, 沼野利佳, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行
2. 発表標題 細胞機能デザインのためのオンチップ微小液滴電気穿孔システムの開発（第8報） 細胞膜穿孔および遺伝子導入に及ぼす双極性電圧印加条件の影響
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 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（第2報） 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 柴田隆行, 服部光治, 手島(石井)美帆, 岡本俊哉, 永井萌土, 初澤 毅
2. 発表標題 オンチップ細胞機能制御プラットフォーム
3. 学会等名 令和3年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田隆行, 手島(石井)美帆, 栗田弘史, 沼野利佳, 岡本俊哉, 永井萌土
2. 発表標題 iPS細胞の量産化を実現するためのオンチップ微小液滴電気穿孔デバイスの開発
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
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 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 服部光治, 柴田健生, 日比野直也, 手島(石井)美帆, 栗田弘史, 沼野利佳, 永井萌土, 柴田隆行
2. 発表標題 胞機能デザインのためのオンチップ微小液滴電気穿孔システムの開発(第7報) - 電気穿孔プロセスに及ぼすパルス電圧印加条件の影響 -
3. 学会等名 2021年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日比野直也, 柴田健生, 服部光治, 手島(石井)美帆, 永井萌土, 柴田隆行, 初澤 毅
2. 発表標題 オンチップ細胞機能制御プラットフォーム
3. 学会等名 令和2年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>豊橋技術科学大学 機械工学系 マイクロ・ナノ機械システム研究室ホームページ https://mems.me.tut.ac.jp/ 豊橋技術科学大学 教員紹介ホームページ https://www.tut.ac.jp/university/faculty/me/64.html</p>

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	沼野 利佳 (Numano Rika) (30462716)	豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・教授 (13904)	

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
---------	---------