

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

黒澤 修^{*,1}, オケヨ・ケネディ・オモンディ^{**}, 小穴 英廣^{**},
 沖田 圭介^{***}, 小寺 秀俊^{****}, 鷺津 正夫^{*,**}

(2013年9月10日受付; 2013年11月18日受理)

Development of Direct Gene Delivery System into Adherent Cell Nucleus Using On-Chip Electroporation

Osamu KUROSAWA^{*,1}, Kennedy O. OKEYO^{**}, Hidehiro OANA^{**},
 Keisuke OKITA^{***}, Hidetoshi KOTERA^{****} and Masao WASHIZU^{*,**}

(Received September 10, 2013; Accepted November 18, 2013)

We developed a novel gene delivery system based on on-chip electroporation for introduction of plasmids directly into the nucleus of adherent cell by electrophoresis. The orifice sheet with adherent cells was inserted between AgCl electrodes and a pulse of 4V-200msec was applied in a DMEM medium containing GFP plasmids. Most cells showed GFP expression within 2 hours after pulsation, suggesting that the plasmid was directly introduced into the cell nucleus. Making the orifice pitch nearly equal to nucleus diameter increased the effect of field constriction at a micro orifice, resulting in higher yield of GFP expression. We applied this direct gene delivery system to produce iPS cells. After introduction of Yamanaka factors, cells were cultured on the orifice sheet for three weeks after electroporation, and then reprogramming of nucleus was checked using *Oct4* and *Nanog* antibodies. Cells which had formed colony stained positive for both antibodies of *Oct3/4* and *Nanog*, showing successful reprogramming of cell nucleus.

1. はじめに

近年, iPS 細胞・ES 細胞・抗体産生細胞・骨髄や臍島などの移植用細胞をはじめとする, いわゆる高付加価値の細胞の取得・作製・評価が喫緊のニーズになっている. このためには, 細胞内に複数の外来物質を適当な期間にわたって最適なタイミングと順序で導入する技術

と, 導入後の細胞を 1 個レベルで追跡して, 望みの応答を示す細胞のみを選別するといった, トレーサブルな細胞機能計測法の開発を行う必要がある.

外来物質を種類を問わずに細胞内に導入する方法としては, エレクトロポレーションが挙げられる^{1,2)}. エレクトロポレーションは, 細胞懸濁液にパルス電界を印加して細胞膜に一過的な膜破壊を生じさせ, 細胞内に物質を導入する方法である. 一過的な膜破壊が生じる条件は, 細胞膜に誘起される膜電圧が 1 V 前後の場合と限定されるが, この方法で誘起される膜電圧は, 各々の細胞の細胞径・配向に依存し, 外部からは制御不能であるため, 過大な膜電圧が誘起された細胞は破壊されてしまうなど, 低収率・低再現性・高侵襲であるという問題を抱えている. しかも, バルクでの作業であるため, 目的の物質が導入された細胞を後で選別する必要があり, 物質導入時の刺激応答を観測することは非常に困難である.

これらの問題を解決するため, 筆者らは, マイクロオリフィス上に配置した細胞にパルスを印加する手法(オンチップエレクトロポレーションと命名)の開発を行った(図 1). 本手法を用いれば, 電気力線がオリフィスに集中するので, ほとんどの電位降下がオリフィス近傍で生じ, 電極にかけた電圧のほとんどすべてがオリフィスに張られた細胞膜にかかることになる. その結果, 細

キーワード: オンチップエレクトロポレーション, 電界集中, 遺伝子直接送達, iPS 細胞

* 東京大学バイオエンジニアリング専攻
 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

Dept. Bioengineering, The University of Tokyo, 7-3-1
 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

** 東京大学機械工学専攻

(〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

Dept. Mechanical Engineering, The University of Tokyo,
 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

*** 京都大学 iPS 細胞研究所

(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53)

Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto
 University, 53 Kawahara-cho, Shogoin Yoshida, Sakyo-ku,
 Kyoto 606-8507, Japan

**** 京都大学マイクロエンジニアリング専攻

(〒606-8501 京都府京都市左京区吉田本町)

Dept. Mechanical Engineering, Kyoto University, Yoshida
 Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

¹ okurosawa@washizu.t.u-tokyo.ac.jp

胞膜にかかる電圧は細胞の大きさや形状によらず、極めて低い電圧（1～3 V）で高収率でのエレクトロポレーションが可能となる。また、細胞がオリフィスに固定されているため個々の細胞の経時観察を行うこともできる³⁾。

ところで、一般に、ウィルスベクターよりもプラスミドベクターを用いた方が遺伝子導入の収率が著しく低下するといった特徴がある。これは、細胞内への取り込みの不正確さ、核到達の不正確さ、そして細胞質内の核酸分解酵素や pH の変化によるプラスミドの分解が原因していると考えられる⁴⁾。従って、プラスミドを核内に直接送達することができれば、上記の問題がすべて解決され、高収率な遺伝子発現が期待される。

この点に鑑みて、本研究では、接着細胞をあらかじめオリフィスシート上で培養し、接着・伸展させた細胞の核内にプラスミドを直接送達する手法の開発を行った。また、本手法を用いて、ヒト体細胞（表皮細胞）に山中因子を導入し、細胞の初期化を行うことに成功したのでここに報告する。

2. 細胞核へのプラスミド直接送達

接着細胞をオリフィスシート上で培養すると、細胞はシートに接着し扁平な状態に広がる。そして、細胞核は細胞が扁平になる力に押し潰され、シート表面から近い位置に配置される。このとき、細胞核がオリフィス上にあるものは、細胞膜を挟んで核がオリフィスを塞いでいる状態にあるといえる。

また、エレクトロポレーションで生じた膜穿孔部からのプラスミド移入は、拡散だけではほとんど起こらず、電気泳動を利用するのが効果的である⁵⁾。

従って、図1に示すような配置で、接着・伸展した細胞に対して、オリフィス部以外の膜にも穿孔を起こすのに十分な持続長を有する矩形波パルス印加すると、膜穿孔により細胞内に電流が流れることとなり、プラスミドは電気力線に沿って正極に向かって電気泳動される。さらに、細胞内に導入されたプラスミドはオリフィス部

に向かって泳動されるため、プラスミドは必ず核内に入ることになる。

このように、細胞核直下にオリフィスを配することで、細胞内に取り込まれたプラスミドを電気泳動効果で核に直接送達するオンチップエレクトロポレーション法を遺伝子直接送達法と呼ぶこととする。

3. 実験材料および方法

3.1 細胞および培養

細胞は、ヒト正常二倍体表皮線維芽細胞（TIG-120）を用いた。培養は、10% FBS およびペニシリン・ストレプトマイシンを添加した DMEM 培養液で、37°C・5% CO₂ インキュベータ内で行った。

3.2 プラスミド

細胞内に導入したプラスミドの発現の有無を可視化するため、GFP プラスミド（pmaxGFP）を使用した。iPS 細胞作製用としては、Oct3/4、Sox2、Klf4 および L-Myc（山中因子）に、lin28 と p53shRNA の遺伝子を加えたエピソーマルプラスミド（以降、エピソーマル山中ベクター）を使用した⁶⁾。エレクトロポレーション時の濃度は、各々 50 µg/ml とした。

3.3 オリフィスシート

オリフィス径・ピッチ・シート厚がそれぞれ、約 5 µm・50 µm・25 µm（カプトンシート：オリフィスシート A）、約 3 µm・30 µm・7.5 µm（カプトンシート：オリフィスシート B）、約 2 µm・ランダム（空隙率約 6%）・10 µm（ミリポア・アイソポアポリカーボネートフィルター：オリフィスシート C）、約 2 µm・15 µm・2 µm（SU-8 シート：オリフィスシート D）、以上 4 種類のシートを用いた。

3.4 免疫染色用抗体

細胞の初期化の確認を、免疫染色法を用いて、未分化細胞のマーカータンパク質である、Oct-3/4 と Nanog の発現の有無を調べることで行った。1 次抗体として、Oct3/4 抗体（sc-5279：santa cruz）、Nanog 抗体（ab21624：abcam）、2 次抗体として、Alexa-488 Anti-Mouse IgG（A11001：Invitrogen）、Alexa-546 Anti-Rabbit IgG（A11010：Invitrogen）を用いた。

3.5 細胞播種

細胞を約 300 個/mm² でオリフィスシート上に播種し、CO₂ インキュベータ内で 1 日培養した。

3.6 パルス印加

シリコンゴムシートをスペーサーとし、電極ギャップが 1 mm あるいは 800 µm となるように、銀塩化銀電極でオリフィスシートを挟み、細胞およびプラスミドが存

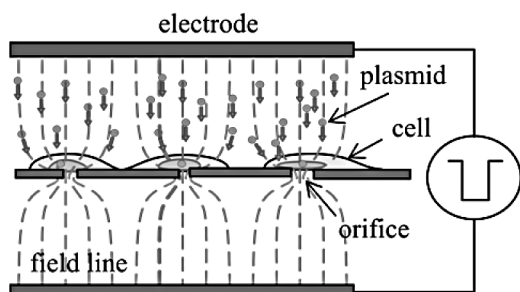


図1 細胞核へのプラスミド直接送達
Fig. 1 Direct introduction of plasmid into cell nucleus

在する側のチャンバーを負極側、オリフィスを介して反対側のチャンバーを正極側とし、矩形波パルス 4V-200msec を 1 回だけ印加した。

3.7 iPS細胞の作製

オリフィスシート D を用いて、エピソーマル山中ベクターと pmaxGFP を導入した後、直ちに、オリフィスシートをシャーレ内の DMEM 培養液に沈め、CO₂ インキュベータ内で培養した。6 日目までには DMEM で、7 日目からは、iPS 細胞の培養に使用される mTeSR-1 (STEMCELL) で培養した。その後約 3 週間にわたり、1 日ごとに細胞の経過を観察し、最後に、免疫染色により核の初期化の有無を調べた。

4. 実験結果

4.1 導入プラスミド発現のタイムラプス

細胞内に導入されたプラスミドが遺伝子を発現するためには、核内に入って遺伝情報を読み出す (転写) 必要がある。しかし、プラスミドは、核膜孔 (開口部直径約 10 nm) を通過できないため、細胞質内のプラスミドが核内に入るためには、核膜が消失する細胞分裂を経験しなければならない。すなわち、通常の方法で GFP プラスミドを導入した場合、すべての導入細胞が GFP を発現するのは、細胞周期分経過した約 24 時間後となる⁷⁾。

一方、本研究で提案する遺伝子直接送達法を用いれば、プラスミドは核内に直接送達されるため、導入から数時間以内に発現が生じるはずである。

エレクトロポレーション後、キーエンスのオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000) を用いて、15 分間隔で蛍光画像を取得し、GFP 発現の時間経過を調べた結果の一部

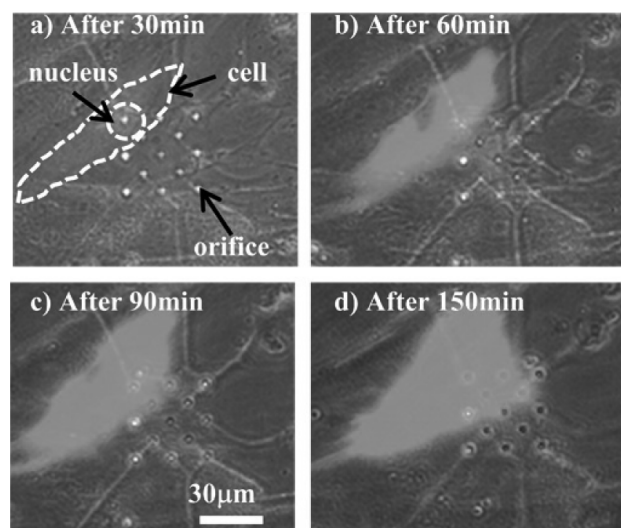


図2 パルス印加による GFP プラスミド導入から GFP 発現の経過観察

Fig. 2 Time-lapse observation of GFP expression after pulsation

を図 2 に示す。図 2-a 中の点線で囲った細長い形状は、オリフィスの直上に細胞核がある細胞の輪郭で、この輪郭内でさらに点線で囲まれた円形部分は細胞核を示している。オリフィスは各図の中央部分に 15 μm ピッチで 13 個配置されている (図-a 中では白い輝点)。図中の点線で囲った細胞は、パルス印加から 30 分後に、わずかなではあるが GFP を発現し、60 分後には緑の蛍光 (図中白色) がはっきりと確認できるまでに発現する様子が確認された。パルス印加から観察開始までにおいて細胞分裂は生じていなかったことより、この結果は、プラスミドが核内に直接送達されたことを反映しているといえる。また、他の細胞の観察結果から、GFP の発現が見られた細胞は、2 時間以内には発現を開始し、5 時間で発現量がほぼ飽和に達する様子が確認された。

4.2 遺伝子直接送達におけるオリフィスパターン依存性

本遺伝子直接送達法は、遺伝子 (プラスミド) が核内を直撃することが本質であることより、オリフィスシート上に播種した細胞へのプラスミドの導入収率は、オリフィスと核の位置関係に大きく依存すると予想される。そこで、オリフィス径とオリフィスピッチの異なるオリフィスシート (オリフィスシート A, B, C) を用いて、プラスミド導入収率のオリフィスパターン依存性を検証した。

本研究で使用した細胞がシート上に接着・伸展した際の細胞と核のおおよその大きさは、細胞が 30 μm × 100 μm、核の径は 15~20 μm 程度である (図 2-a 参照)。従って、細胞が十分な接着状態にある場合、各シートにおける細胞核とオリフィスの配置は以下となる。シート A (図 3a-1) では、細胞の直下にオリフィスはあるが核の直下にオリフィスがあるとは限らない。シート B (図 3b-1) の場合、細胞核の直下にはほぼ 1 個のオリフィスが存在している。シート C (図 3c-1) の場合、核の直下に確実に複数個のオリフィスが存在するが、オリフィス部での電界集中が必ずしも保証されない。

以上より、高収率な遺伝子発現を安定して得られるのは、シート B と予想される。

パルス印加から 5 時間経過した各オリフィスシート上における GFP 発現細胞の結果を図 3a, b, c-2 に示す。予想どおり、シート B を用いた場合に最も多くの GFP 発現細胞が得られた (図 3b-2)。シート C を用いた場合も比較的高収率な GFP 発現細胞を得られているが (図 3c-2)、オリフィスが密集している個所などは電界集中が不十分となり、実際、再現性に問題があった。

以上の結果より、電界集中を保証したうえで、オリフ

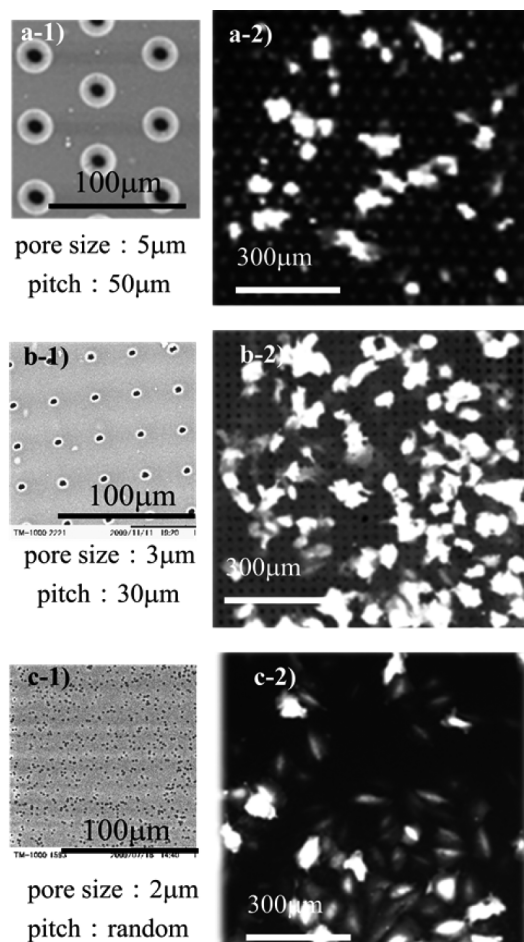


図3 GFP発現収率のオリフィスサイズおよびピッチ依存性
Fig. 3 GFP expression on three types of orifice sheets 5 hours after pulsation

イスピッチを狭めることができれば、発現収率をより高めることができる。筆者らの解析結果によると、電界集中を保証するためには、オリフィス径を a 、ピッチを p 、電極ギャップを L とすると、 aL/p^2 が 10 より十分小さいことが条件となる。

ここで、接着状態での細胞核のサイズが $15\sim 20\ \mu\text{m}$ 程度であることを考慮すると、オリフィスピッチを $15\ \mu\text{m}$ にすれば、核の直下にオリフィス 1 個以上をほぼ確保できる。この条件のもとで、オリフィス径を $2\ \mu\text{m}$ 、電極ギャップを $800\ \mu\text{m}$ 以下とすれば、 aL/p^2 は 7 以下となり、電界集中を保証できる。

以上より、以降の実験においては、オリフィス径 $2\ \mu\text{m}$ 、ピッチ $15\ \mu\text{m}$ のオリフィスシート D を用い、電極ギャップ $800\ \mu\text{m}$ で行うこととした。

4.3 iPS細胞作製への応用

iPS 細胞とは、体細胞に 4 つの遺伝子（山中因子：*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4* および *c-Myc*）を導入することで核を初期化し、分化万能性を再獲得させた細胞のことである⁸⁾。遺伝子を導入する方法としては、当初、レトロウイルスベ

クターが用いられていた。しかし、この方法は、導入した外来遺伝子が iPS 細胞のゲノムの中に組み込まれ、細胞の癌化を引き起こすなど、安全面で問題があった。そこで、遺伝子挿入のない iPS 細胞を作製する方法の一つとして、遺伝子発現が一過的であるプラスミドをエレクトロポレーションで導入する方法が開発された⁹⁾。この方法は、細胞内で自己複製可能なエピソードプラスミドを用い、通常の山中因子に *lin28*、*p53shRNA* を加えることで、初期化効率（iPS 細胞のコロニー数 / 使用した総細胞数）を 0.03% 程度までに改善することに成功している⁶⁾。しかし、この効率は、ウイルスベクターを用いた場合の 10 分の 1 で、さらなる高率化が求められている。

そこで、遺伝子直接送達法を用いて、エピソード山中ベクターを細胞核に直接導入することで、iPS 細胞作製効率を向上できるかを検討した。

エピソード山中ベクターおよび pmaxGFP 導入後オンチップ培養した細胞の経過観察結果を図 4 に示す。図 4a-2 は、パルス印加から 5 時間後の GFP 発現状況で、約 20% 程度の細胞が GFP を発現しており、エレクトロポレーション自体は上手くいっていることが分かる。6 日目の結果（図 4b）から、分裂して増殖した細胞が寄り集まって集合しやすい傾向がみられた。このような細胞の集合は、山中因子を導入していない細胞では見られない現象である。7 日目以降から使用した mTeSR-1 培養液は、ヒト iPS 細胞用に調製されており、体細胞はほとんど増殖できない。図 4c をみると、細胞が全体的に増えており、山中因子が導入された細胞が分裂・増殖しているといえる。図 4d-1 に見られるような細胞のコロニーは、15 日目ぐらいにコロニーの出来始めがみられ、コロニーとしてははっきりと認識できる程度になったのは 18 日目であった。通常、iPS 細胞のコロニー形成においては、山中因子導入後の細胞をフィーダー細胞上に再播種して培養を行うが、その場合、2~3 週間でコロニーができ始めて大きな塊となる⁶⁾。すなわち、オンチップ培養でコロニー形成に要した期間は、フィーダー細胞を用いる従来の方法とほぼ等しいといえる。これはおそらく、山中因子が導入されなかった細胞が、オンチップ上でフィーダー細胞様の働きをしたためと予想される。

図 5 は、20 日経過後の細胞を *Oct3/4* 抗体と *Nanog* 抗体で免疫染色した結果である。図 5a~d は、オンチップ上の細胞の全体像で、図 5a は明視野像、図 5b は細胞の核を染めた DAPI 染色像、図 5c は *Oct3/4* 抗体による免疫染色像、図 5d は *Nanog* 抗体による免疫染色像である。また、各図内で示した四角点線で囲った領域の拡大図を、図 5-e（領域 A）、図 5-f（領域 B）に示す。四角点線内

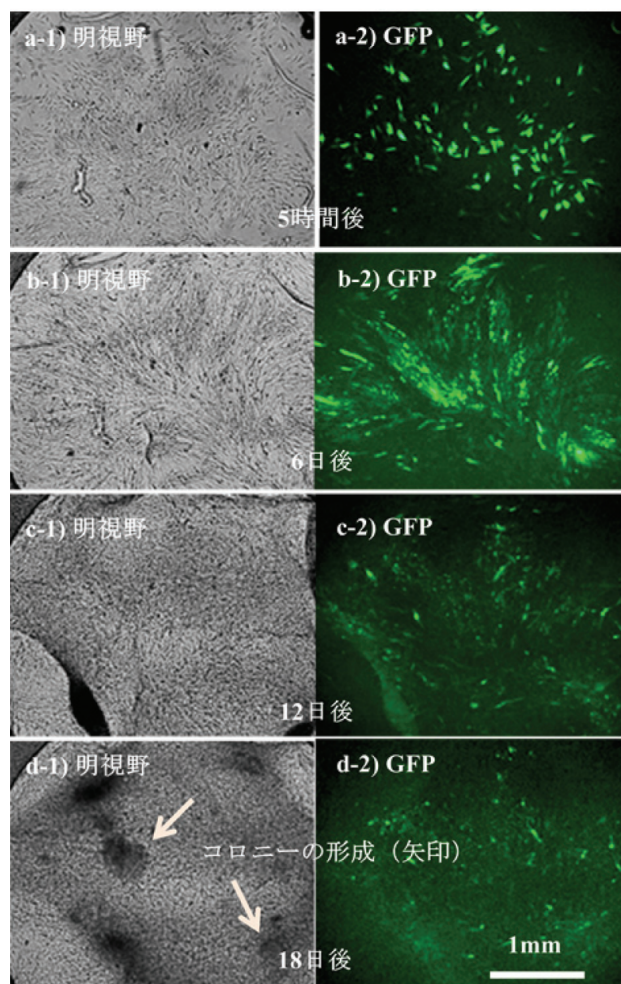


図4 山中因子導入からコロニー形成の過程

Fig. 4 Time course of colony formation from the introduction of Yamanaka factors.

のコロニー状の細胞の核が *Oct3/4* と *Nanog* 抗体で染色されていることより, *Oct3/4* と *Nanog* を発現しているのわかる。

Oct3/4 は, 山中因子にも含まれるが, エピソーマルプラスミドを用いた場合でも, 3週間後の残存率は5%程度であることより⁶⁾, 図5e-2に見られるようにコロニー内の全細胞に発現している *Oct3/4* は, 染色体由来のものといえる。

以上の結果より, 形成されたコロニーは初期化された細胞の集合体であるといえる。

さて, iPS細胞の効率, 播種した細胞数(本実験では約4000個)当たり形成したコロニー数で表わされる。図5の領域AおよびBには, 大小いくつかのコロニー(α , β , γ , δ , ϵ)が存在しているが, 図中 α , β , γ , δ , ϵ で示したコロニーをすべて独立したコロニーとみなすと, 効率は0.125%で, 従来法での0.03%に比べ効率が改善されたといえる。しかし, 通常, コロニーのカウントは, 30日間培養した後に行われる。図5は20日間培養後の

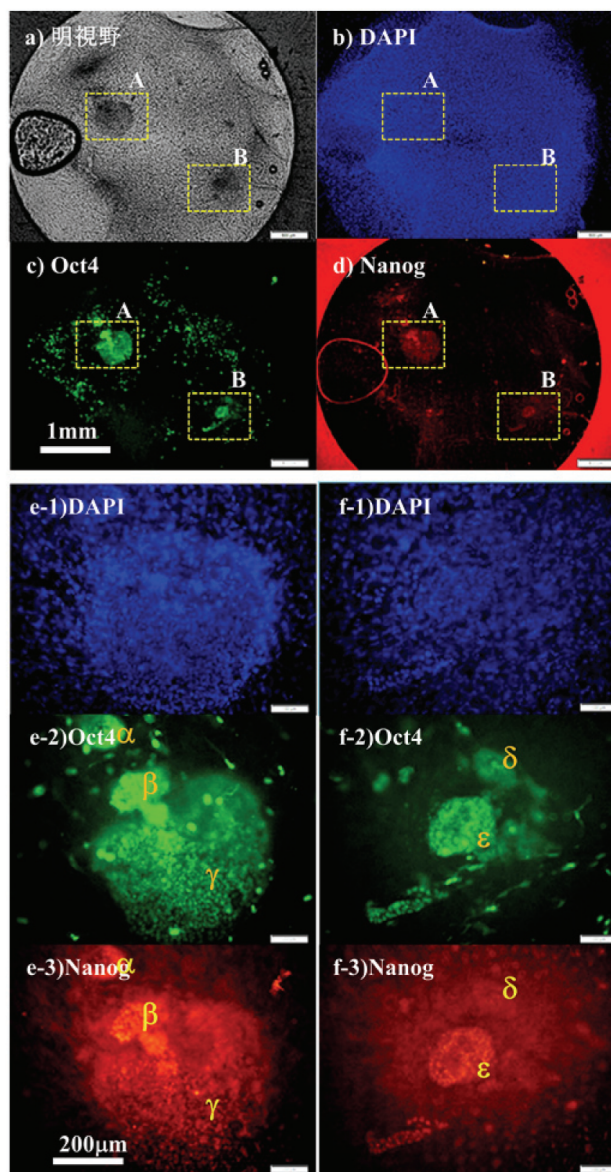


図5 免疫染色による初期化細胞の確認

Fig. 5 Micrographs are the results of immunostain for *Oct3/4* and *Nanog*.

コロニーであり, これを30日間培養したとすると, 領域A内と領域B内の各コロニーはひとかたまりとなることが予想され, その場合の効率は0.05%で, 従来法とほぼ同程度ということになる。従って, 今回の方法では, 効率を大きく改善できたとは言い難い。その原因の一つとして, 従来法と同じく, エピソーマル山中ベクターを1回のみしか導入しなかったことが挙げられる。効率改善のためには, 細胞内で生じる初期化のプロセスをコントロールすることが重要であるので, 本手法を用いて, 初期化に関わる因子を, 各因子の導入量および導入タイミングを制御して細胞内導入すれば, 効果的であると期待される。

以上, 本手法を用いれば, フィーダーフリーでiPS細胞

胞を作製できることが判明した。iPS 細胞を再生医療に応用するためには、異種成分を含まない培養系の確立が求められることより、自己細胞をフィーダー様細胞としている本手法は、有効な方法になりうると期待される。

5. 結論

オンチップ上で培養した細胞の核にプラスミドを直接導入する遺伝子直接送達法を開発し、以下の結果を得た。

1. パルス印加から数時間以内には十分量の遺伝子発現が生じることが実験的に示された。この結果は、細胞周期に依存することなしに遺伝子発現のタイミングを制御できることを示している。
2. 山中因子導入から初期化細胞コロニー形成までをオンチップ上で行うことができた。フィーダー細胞上への再播種等の作業が省略され、自己細胞をフィーダー様細胞とする安全で簡便な iPS 細胞作製法といえる。
3. 遺伝子直接送達法を用いて iPS 細胞を作製できることを実証した。作製効率は、従来法の同等以上ではあるが、大幅な改善には至らなかった。

本手法の利用は、iPS 細胞の作製のみならず、細胞分裂を行わない神経細胞やプライマリー細胞へのプラスミド導入と遺伝子発現等に応用が期待される。

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（課題番号：23241041, 23246045）および(株)アークレイの助成を受けて行われたものです。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) C. Chen, A S.W. Smye, A M.P. Robinson, J.A. Evans : Membrane electroporation theories: a review. *Med Biol Eng Comput*, **44** (2006) 5-14
- 2) J. Gehl : *Electroporation*: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica*, **177**, Issue 4 (2003) 438-443
- 3) O. Kurosawa, H. oana, S. matsuoka, A. Noma, H. Kotera and M. Washizu : Electroporation through a micro-fabricated orifice and its application to the measurement of cell response to external stimuli. *Meas. Sci. Technol.*, **17** (2006) 3127-3133
- 4) D. Luo & W. M. Saltzman : Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnology*, **18** (2000) 33 - 37
- 5) S. I. Sukharev, V. A. Klenchin, S. M. Serov, L. V. Chernomordik, and Yu. A. Chizmadzhev, : Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys. J.*, **63** (1992) 1320-1327
- 6) K. Okita, Y. Matsumura, Y. Sato, A. Okada, A. Morizane, S. Okamoto, H. Hong, M. Nakagawa, K. Tanabe, K. Tezuka, T. Shibata, T. Kunisada, M. Takahashi, J. Takahashi, H. Saji, and S. Yamanaka, "A more efficient method to generate integration-free human iPS cells", *Nature methods*, online 3 april (2011)
- 7) K. Hakamada, S. Fujita, and J. Miyake : Onset timing of transient gene expression depends on cell division. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **109**, Issue 1 (2010) 62-66
- 8) K. Takahashi, S. Yamanaka : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, Issue 4 (2006) 663-676
- 9) K. Okita, M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka, S. Yamanaka : Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells without Viral Vectors. *SCIENCE*, **322** (2008) 949-953