

遺伝子混合を伴わない体細胞初期化技術の開発

Novel Method of the Reprogramming of Somatic Cells without Gene Mixing

鈴木祥平 指導教員 鷲津正夫教授

Shohei SUZUKI (Professor Masao WASHIZU)

Keywords: cell fusion, cell cultivation, cell reprogramming, micro-orifice, micro-Total Analysis Systems

1. 研究背景

発生初期の胚細胞は、様々な種類の細胞になりうる潜在的な能力を持っている(未分化)。しかし、ほとんどの細胞が、発生の進行に伴い、特定の機能を持つ細胞に分化する。分化した細胞は特定の機能を果たすため不必要な遺伝子の発現を抑制している。近年、この抑制を解除し全ての遺伝子発現が可能な状態に戻す方法(初期化)が開発されている。

その一つに、ES(Embryonic Stem)細胞と体細胞の融合技術がある[1]。ES細胞の細胞質内の初期化因子によって体細胞の初期化がおこるため、本来なら、2つの細胞の核(遺伝子)を混合させずに、初期化因子を含む細胞質のみ混合できればよい。しかし、現在は、核同士が混在してしまう融合方法しか開発されていない。そのため、遺伝子混合を伴わない細胞融合方法の開発が必要である。

そこで、微細オリフィスを挟んで細胞融合を行うことを考える。オリフィス径を細胞核より小さく設けることで、細胞核は物理的に接触できないが、初期化因子は混合することができる(Fig.1)。そのため、遺伝子混合を伴わない体細胞の初期化が可能であると考えられる。

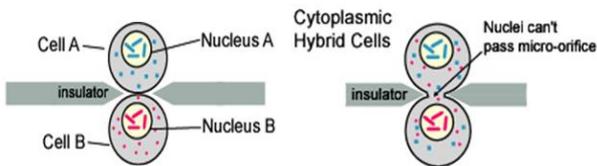


Fig. 1 : Cell fusion with micro orifice

2. 微細オリフィスを持つ融合チップの作製

2.1 本研究の実験系

本実験系では、細胞核(>5 μm)よりも十分に小さい微細オリフィスを持ち、融合する2細胞を融合から培養までの間、経時的に観察できるチップが必要である。そこで、2本の流路を平行に並べ、流路を仕切る壁に数ヶ所数 μm オーダーの微細オリフィスが空いたPDMS流路とアルミ蒸着で作製した電極を貼り合せてチップを作製することを考える。チップの外観及び流路内とオリフィスのSEM像をFig. 2Aに載せる。Fig. 2Aのように径1.5 μmのオリフィスが、PDMS面に偏った位置(Fig. 2A下側)にあいている。このチップを、電極側からPDMS流路方向に向かって観察することで、2細胞を同時に観察することができる。

2.2 オリフィス部での細胞融合原理

オリフィスを挟むように電極を設定する。高周波電圧を印加し、誘電泳動によりオリフィスの両端に細胞を誘導する。電気パルス印加しオリフィス部に膜破壊を起こし細胞を融合する(Fig. 2B)。

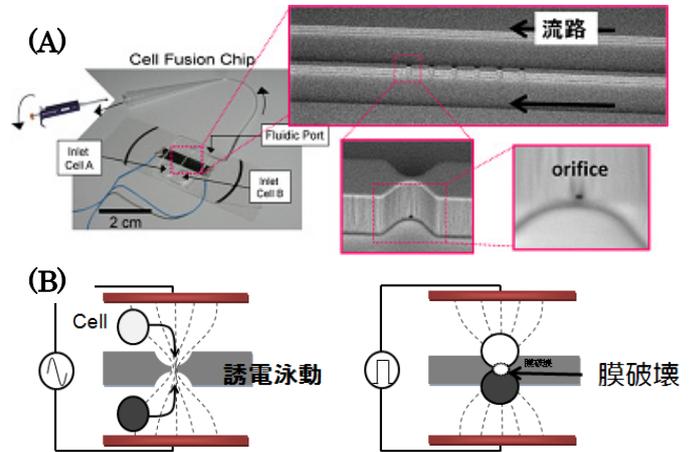


Fig. 2 : Cell fusion chip with micro orifice
(A) SEM view of channel and micro orifice
(B) Principle of cell fusion

3. 融合細胞のチップ上での培養

3.1 使用する細胞

本研究には、ES細胞(HM1 DsRed/neo)とMEF(Mouse Embryonic Fibroblast)を使用する。使用するMEFは、Oct4-GFPをレポーターに持つ。そのため、両細胞を融合し、MEFが初期化を起こすと、未分化時のみに発現するタンパク質Oct4に緑色蛍光タンパク質GFPが結合したものを発現し、B励起で光るようになる。

3.2 実験方法

ES細胞とMEFをオリフィス径1.5 μmのチップ内で融合させた。その後、PDMS流路を電極から剥がし、培養液を滴下し培養した(Fig.3)。その様子を3分おきに明視野観察した。また、24時間後にOct4-GFPの発現を観察し初期化の判定を行った。

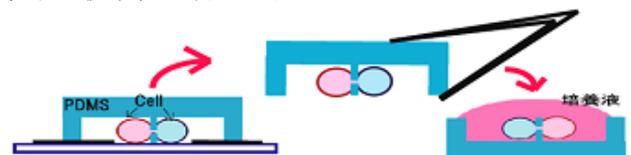


Fig.3 : Incubation method

3.3 実験結果と考察

上流路にMEF下流路にES細胞を導入し融合した(Fig.4左)。融合細胞は、培養1~2時間後にES細胞がオリフィスを通過しMEF側へ通り抜けてしまった(Fig.4中右)。Fig.5Aに培養中の融合細胞の様子の模式図を示す。2.1よりPDMS流路のオリフィスは培養中床面に偏っている。従って、融合細胞は床面を足場に進展できるため、一方の細胞に引きずられる形で、融合細胞がオリフィスを抜け出してしまうと考えられる。

そこで、PDMS 流路を電極から剥がさずに培養する方法を考える。融合細胞は重力や接着するための力により下向きに力を受ける。そのため、核は流路上部のオリフィスに近付けなくなると考えられる(Fig.5B)。

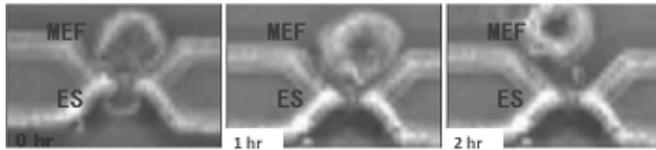


Fig.4 : Result cultures of fused cell

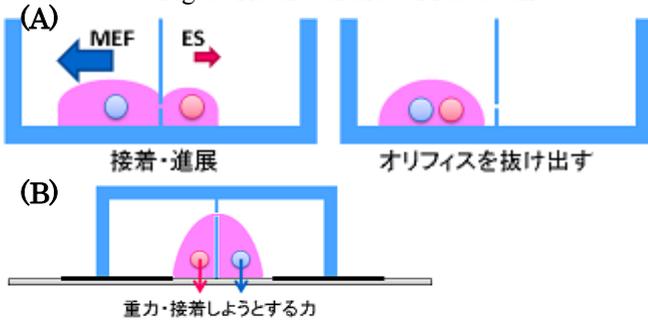


Fig.5 : Schematic illustration of cells on (A)PDMS, (B) electrode

4. 融合細胞のシャーレ電極上での培養

4.1 MPC

MPC(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)ポリマーは、タンパク質との相互作用が極めて弱く、たとえタンパク質と接触していても、タンパク質の構造変化を引き起こさないことが知られている。

4.2 実験方法

シャーレ上にアルミ蒸着で電極を作製した。PDMS 流路を貼り合わせて、流路内で ES 細胞と MEF を融合させた。その後、流路内に培養液を導入し、1 日経時観察した。シャーレは、MPC をコートしたものとしていないものの 2 種類を用いた。

4.3 実験結果と考察

MPC コートしていないシャーレ上での培養結果の代表例を Fig.6A に、コートしたシャーレ上での結果の代表例を B に載せる。MPC コートなしでは、ES 細胞と MEF が再分離した(7 例中 5 例)。しかし、GFP の発現は見られなかった。MPC コートありの場合は、オリフィスに融合細胞がとどまったままの状態 で GFP の発現を観察した(18 例中 8 例)。

MPC をコートしない場合、融合細胞は接着しようとする力で、下方向に力を受ける。そのため、融合細胞の連結部分(オリフィス部分)では、高い抵抗力がかかり、融合細胞が切断しやすくなったと考えられる(Fig.7 左上)。また、連結部分が細くなるため、初期化因子のやり取りが上手くいかず初期化が起こらなかったと考えられる(Fig.7 右上)。

MPC をコートすると、融合細胞が接着しにくくなり、浮いたままの培養が可能になる(Fig.7 左下)。そのため、コートしない場合よりは融合細胞は切断されにくくなり、また、連結部分が太くなり、初期化因子のやり取りが行われやすくなるために、初期化する細胞が増えたと考えられる(Fig.7 右下)。

5. 結論

本研究から得られた結論は以下のとおりである。

(1)細胞融合チップ上で融合細胞を培養すると、融合細胞はオリフィスから抜け出してしまふ。(2)シャーレ電極上で融合細胞を培養すると、融合細胞が途中で再分離を起こす、また、初期化には至らない。(3)MPC コートしたシャーレ電極上で融合細胞を観察すると、約 40%の融合細胞で、遺伝子情報の混在がない体細胞の初期化が可能である。

本研究の技術を用いることで、より効率的・実用的な体細胞初期化技術の開発が可能になると考える。

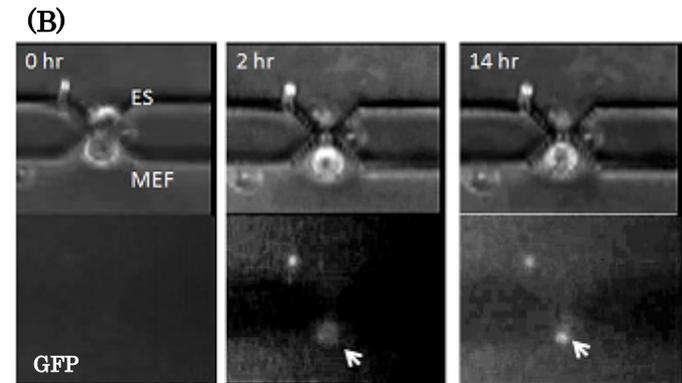
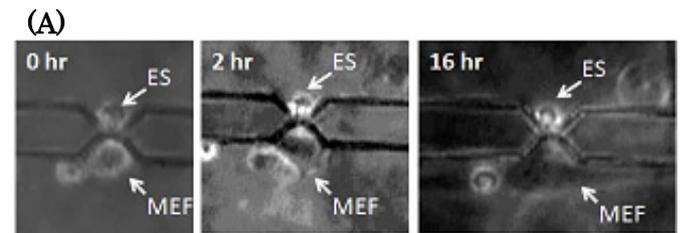


Fig.6 : Time lapse image

(A) fused cell on the dish, (B) fused cell on the MPC

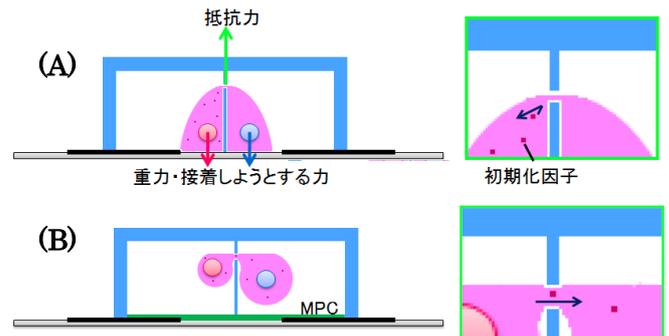


Fig.7 : Schematic illustration of cells on (A) electrode, (B)MPC

6. 参考文献

[1] Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T, "Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells." *Curr Biol.* 11(19), 1553-1558 (2 October 2001)
 [2] Murat Gel et al: "Fabrication of three-dimensional structure by self-forming meniscus and its application to on-chip cell fusion." *μTAS* 2008, 1968-1970