

ナローイングスリットを用いた 遺伝子非混合型細胞質融合法の開発

37-116823 阪本 祥太
指導教員 鷲津 正夫 教授

概要：遺伝子非混合型細胞質融合を行うため、ナローイングスリットを用いて電界集中型細胞融合と融合細胞の培養を行った。ナローイングスリットは幅の広い天井部で融合を行い、融合した細胞を幅の低い底部に落とし底面で接着培養することで、細胞核内の遺伝情報を混ぜずに融合細胞の培養が行える。実験の結果、底部の幅が $1\mu\text{m}$ のスリットを用いた際に、細胞質融合した細胞を数時間後にスリット部で分離し永久的に切り離すことに成功した。

1. はじめに

再生医療の目標の 1 つにテーラーメイド医療がある。これは、患者の皮膚などから採取した細胞を一度分化する前の状態に初期化し、目的の細胞に再び分化させ欠損した組織の修復を目指すものである。これにより、拒絶反応の少ない組織移植・臓器移植が可能になる。

体細胞初期化の方法は大きく分けて 3 つある。体細胞の核を未受精卵にインジェクションし、発生したクローンから ES 細胞を取り出す技術（体細胞核移植法）や遺伝子を体細胞に導入し初期化を行う iPS 細胞技術、ES 細胞などの未分化な細胞と体細胞を融合し ES 細胞の因子によって体細胞を初期化する技術（細胞融合法）がある [1]。

体細胞核移植ではクローン胚を壊してしまうため倫理的問題な問題があり、iPS 細胞技術では効率が低いことやガン化するリスクなどの問題が未だに残る。本研究では、初期化誘導の効率が高いとされる細胞融合法に着目した。

2. 電界集中型細胞融合法

当研究室では、細胞を 1 対 1 で効率よく電気融合する電界集中型細胞融合法を開発している [2]。これは、絶縁体に細胞核の直径よりも小さいマイクロオリフィスを設け、これを電極で挟んだ時に発生する電界集中を用いて、誘電泳動による

細胞のアラインメントとオリフィス部での細胞膜可逆的破壊を行う電気融合法である。

絶縁物質である PDMS で作製した平行な 2 本の流路を仕切る壁に、直径 $2\sim 3\mu\text{m}$ のマイクロオリフィスを設け、これをアルミ蒸着で作製した平行電極で挟む(図 1)。融合したい 2 種類の細胞をそれぞれ流路に流す。

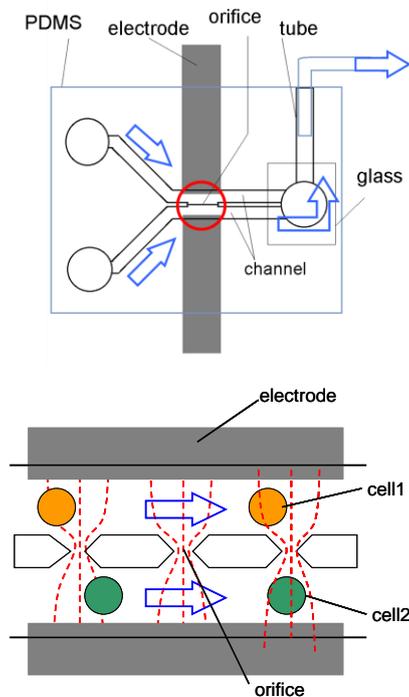


図 1 デバイス全体概略図

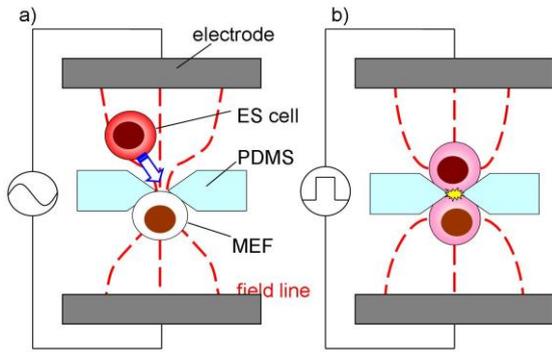


図2 電界集中を用いた細胞質融合法

(a)誘電泳動による細胞のマニピュレーション. (b)オリフィス部での高効率な細胞融合

電極間に 1.0MHz, 10V の交流電圧をかけると、オリフィスに向かって電界が集中する。細胞は、導電率の低い溶液中では正の誘電泳動によって電界の強い方へ引き寄せられる性質があるため、細胞は電界の強いオリフィスに引き寄せられ細胞ペアを形成する(図 2a)。

次に、膜が接した状態で電極間に 100 μ s 程度のパルス電圧をかけると膜に破壊が起き、接触していた細胞膜同士がトポロジカルに繋がり細胞融合が起こる (図 2b)。オリフィス部の電界集中により、電圧降下がオリフィス部集中するため、電極間に加えた電圧にほぼ等しい電圧がオリフィス部の細胞膜にかかり、オリフィスでペアを形成した 2 種類の細胞を 1 対 1 で効率よく融合することができる (図 3)。

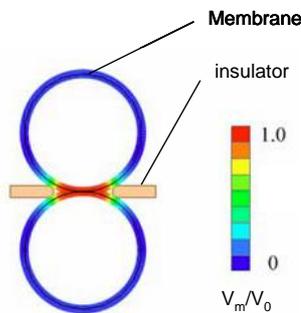


図3 膜印加電圧のシミュレーション結果[3]

(V_m : 膜電圧, V_0 : 電極間印加電圧)

先行研究では、細胞核の直径よりも小さいマイクロオリフィスを用いて、遺伝子の混合なく細胞質のみを融合することを試みた。しかし、遺伝子の混合を防ぐためにオリフィス径を小さくすると膜同士が接触しにくくなるという二律背反があった。

本研究では、この問題を解消すべくナローイングスリットを考案し、実験を行った。

3. ナローイングスリットによる遺伝子非混合型細胞質融合の原理

マイクロオリフィスを、天井部が広く底部に向けて幅が狭くなるナローイングスリットに置き換えた。

幅の広いスリット天井部で電界集中型融合を行う (図 4a)。融合後に幅の狭いスリット底部に細胞を落とし込み、ここで培養することで、細胞核が独立の状態でも細胞質が融合したまま培養が行える(図 4b)。電気融合と培養の 2 つのおプロセスを別のスリット構造で行うことで二律背反を解消した。

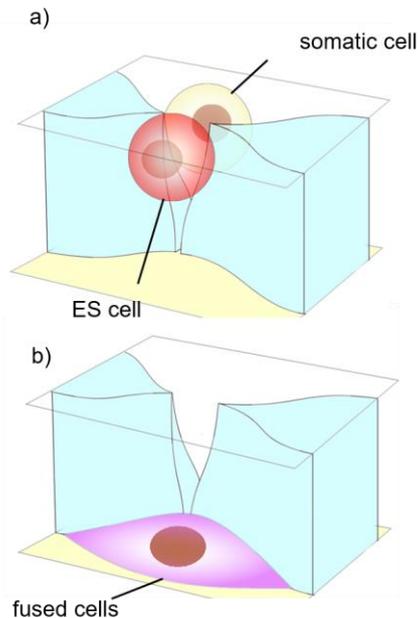


図4 ナローイングスリットの原理

(a)幅の広い天井部での融合, (b)幅の狭い底部での培養

4. ナローイングスリットの作製

ナローイングスリットは、フォトリソグラフィーでモールドを成型し、PDMS に型取りして作製した。モールドの元となるフォトマスクでは、スリットになる部分が幅 $1\mu\text{m}$ と非常に狭くなっている。これを用いて、フォトリソグラフィーによるモールドの成形を行うと、フォトマスク近傍で回折光によって光硬化性樹脂(SU-8)の硬化範囲が広がる (図 5b)。モールドを PDMS に転写すると、露光が広がったマスクに近い側が PDMS 流路の天井部になり、ナローイングスリットとなる (図 6)。

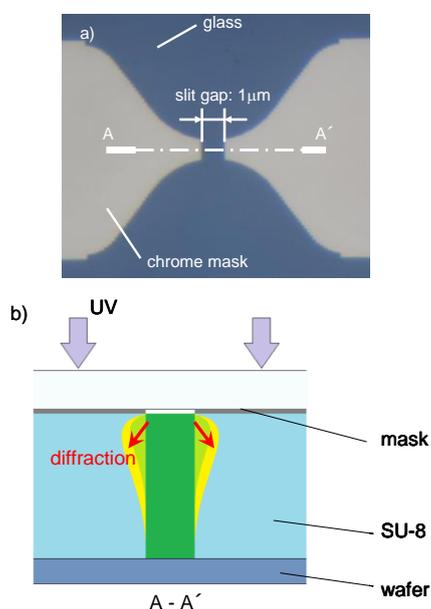


図 5 (a)SU-8 モールドの成型に用いた実際のフォトマスク, (b)SU-8 露光時の硬化範囲の拡大

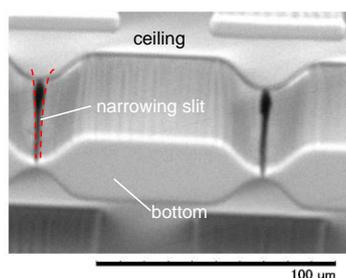


図 6 PDMS で作製したナローイングスリット (SEM 画像)

5. 細胞の準備と実験方法

電気融合の可視化のために、ES 細胞の細胞質を蛍光色素(Calcein Red-orange)で染色した。その後、電気融合のために導電率の低い融合用バッファに溶液を置換した。

高周波の交流電圧(1.0 MHz, 10 V)を印加しながら細胞を流路内に流すと、誘電泳動で引き寄せられた細胞がスリットで細胞ペアを作る。

次にパルス電圧(100 μs , 10V)を印加し、スリットに配列した細胞を 1 対 1 で電気融合した。融合に成功すると ES 細胞の細胞質にある蛍光物質が体細胞側へ流れこむ。

融合後は、デバイスをタイムラプス顕微鏡に移し、融合細胞を追跡観察する。

6. 実験結果と考察

細胞質融合実験の結果、約 8 割の確率で融合が行えた (図 7)。マイクロオリフィスによる融合では、小さなゴミでオリフィス塞がってしまうと融合が行えず効率が下がってしまうことがあるが、ナローイングスリットでは、幅の広い天井部を用いて融合を行うため、穴が塞がることなく容易に高収率な融合が行えた。

幅の広いナローイングスリット天井部で融合した後は、PDMS デバイスごと遠心機にかけ融合した細胞を幅の狭い底部まで落とした。培養を開始すると、底部に落ちた細胞は速やかに流路底面に接着した。底面に接着してすぐはスリットの両側で同程度の面積で接着するが、時間が経つと

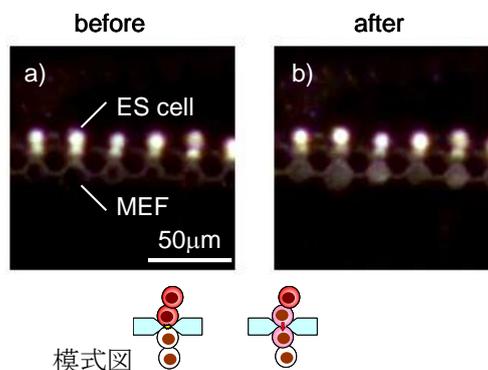


図 7 細胞融合の様子 (明視野+蛍光)

1 方向に伸展を始めた。スリット底部の幅が 2~3 μm のスリットを用いた実験では、スリットから細胞が外れてしまった (図 8b,c)。この時、細胞がスリットをすり抜ける直前まで、細胞核がスリットに引っかかり留まっていたことが分かった。細胞核はスリット底部の幅が 1 μm の時は、片方の細胞核がスリットをすり抜けることなく留まり、細胞膜がスリット部で切れて永久的に分離した (図 8d,e)。

これらの結果から、底部の幅が 1 μm よりも狭いナローイングスリットを用いて培養を行うと、細胞核がスリットの間を移動せず、遺伝子の混合なく培養が行えると分かった。また、培養を続けると核がスリットに留まったまま伸展を続け、スリット部で核を残したまま細胞膜が切れ、永久的に分離することにも成功した。

しかし、融合による体細胞初期化には 48 時間程度必要であるとされるため、融合から数時間で分離してしまうと目的は達成できない。今後は、体細胞が初期化されるまでスリット部で細胞が切れることなく培養を続けるために、細胞の伸展する力を弱めるなどの工夫が必要である。

7. まとめ

遺伝子非混合型細胞質融合を目指し、マイクロ流体デバイス上にナローイングスリットを作製し融合を行った。このスリットでは、幅の広い天井部で融合を行い、幅の狭い底部に融合した細胞を落とすことによって遺伝子混合のない培養を目指す。実験の結果、融合細胞を、細胞核が独立した状態でスリットに留め約 24 時間培養が行えた。先行研究によると細胞融合による体細胞初期化には 48 時間程度必要とされるため、スリットに留める時間を更に伸ばす工夫が必要である。

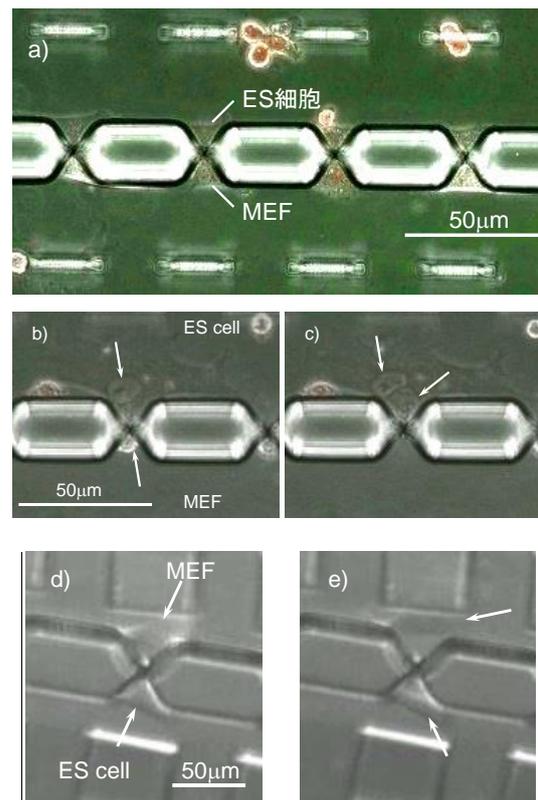


図 8 培養中の細胞 a)底面に接着開始した細胞, b-c)細胞核がスリットすり抜ける (矢印:細胞核), d-e)融合後に融合細胞がスリット部で切れる様子(d,前, e, 後)

参考文献

- [1] Tada M, Tada T: "Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells." *Curr. Biol.* 11(19), 1553-1558 (2001)
- [2] Murat Gel et al: "Fabrication of three-dimensional structure by self-forming meniscus and its application to on-chip cell fusion." μTAS San Diego USA 2008, 1968-1970 (2008)
- [3] Techaumnat B, Wasizu M: "Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells" *J. Phys. D:Appl. Phys.* 40, 1831-1837 (2007)