

※課題番号 : F-12-KT-0029
 ※支援課題名 (日本語) : エレクトロポレーション技術を用いた細胞内物質導入の研究
 ※Program Title (in English) : Electroporation Technology for Delivery of Materials into Cells
 ※利用者名 (日本語) : オケヨ ケネディ
 ※Username (in English) : Okeyo Kennedy
 ※所属名 (日本語) : 東京大学大学院工学系研究科機械工学専攻
 ※Affiliation (in English) : Department of Mechanical Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo

※概要 (Summary) :

エレクトロポレーション技術を用いた細胞内物質導入の研究を行うために必要なフォトマスクの作製を依頼した。具体的な研究内容は以下に示す。

※実験 (Experimental) :

フォトマスク作製に利用した主な装置は下記。

A3 : レーザー直接描画装置

またフォトマスク作製のプロセス (条件は下記)

1. 露光 : focus 値=0, intens 値=30
2. 現像 : TMAH2.38%, Spray time=60sec
3. Cr Etching : S クリーン S24, time=90sec
4. レジスト剥離 : アセトン 10min
5. ポストクリーン : SPM, 10sec

・具体的な研究内容

作製したフォトマスクを用い、フォトリソグラフィー法により無数の穿孔 (径 2 μ m) を持った、厚さ 2 μ m のオリフィスシートを光硬化性樹脂 (SU-8) より作製した (図1)。

さらに、オリフィスシートをマイクロデバイスの電極間に挟み込み、オンチップエレクトロポレーションデバイスを作製した (図2)。オリフィス近傍で生じる電界集中を利用することにより、低侵襲かつ効率よく細胞内へ物質 (プラスミド等) を導入できることがこのデバイスの大きな特徴である。本実験では、このデバイスを山中因子による体細胞の初期化過程の観察に用いた。

※結果と考察 (Results and Discussion) :

まず、GFP プラスミドの発現を指標に、細胞内物質導入の成否を判断した。パルス印加から1時間後、図3に示すように、Fucciの発現により核が光る HeLa 細胞に加え、細胞質全体の光る細胞も観察された。ま

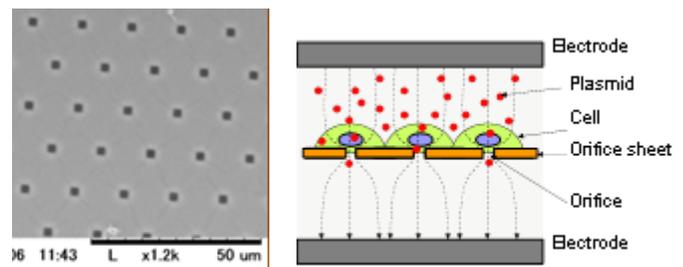


図1 オリフィスシート 図2 電界集中型電気穿孔法

た、細胞周期プローブを発現する HeLa 細胞内に細胞の初期化因子 (山中因子) を導入し周期の変化を経時的に観察した結果、DNA 合成期から細胞分裂の間に細胞周期の回転が止まる現象を観察した。これは、初期化過程における山中因子の影響として考える。

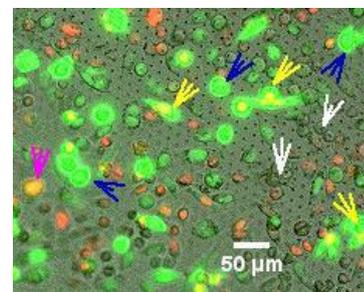


図3. GFP を発現している HeLa 細胞

※その他・特記事項 (Others) :

今後の予定

細胞初期化過程の解明を目的に、今後、物質導入に伴う細胞形質転換や細胞応答のリアルタイム計測を行う予定である。

参考文献

- [1] Chen L.W. et al., CNS Neurol. Disord. Drug Targets. Vol. 10(4):449-58 (2011).
- [2] Kurosawa O. et al., Meas. Sci. Technol. Vol.17:3127-3133 (2006).

用語解説

エレクトロポレーション：電気パルスの印加により、細胞膜に膜穿孔を生じさせ、そこから細胞内に物質導入を導入する方法である。

山中因子：体細胞の初期化を引き起こす因子として、京都大学の山中先生により発見された。

共同研究者等 (Coauthor) :

小寺秀俊、京都大学工学研究科マイクロエンジニアリング専攻教授

論文・学会発表

(Publication/Presentation) :

(1) Kennedy Okeyo, Naoya Omasa, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera and Masao Washizu, "CELL ADHESION CONTROL INITIATE CELL SHEET FORMATION IN A MEDIUM SUSPENSION, MicroTAS2013, 27-31 October 2013, Freiburg, Germany (発表予定)

(2) Kennedy Okeyo, Naoya Omasa, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera and Masao Washizu, "REALTIME OBSERVATION OF CELL REPROGRAMMING PROCESS USING ON-CHIP ELECTROPORATION DEVICE REVEAL CELL CYCLE ARREST, MicroTAS2013, 27-31 October 2013, Freiburg, Germany (発表予定)

関連特許 (Patent) :

細胞培養装置と細胞構造体の製造方法 (執筆中)