

※課題番号 : F-12-KT-0068
※支援課題名 (日本語) : 細胞内物質導入の基礎研究
※Program Title (in English) : Fundamental studies on delivery of molecules into living cells
※利用者名 (日本語) : 重里 優子
※Username (in English) : Juri Yuko
※所属名 (日本語) : 京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻
※Affiliation (in English) : Kyoto University, the Department of Micro Engineering

※概要 (Summary) :

細胞に遺伝子導入を行う技術は iPS 細胞や抗ガン治療等に広く用いられている。導入手法として、生物的手法、化学的手法、物理的手法の3つが挙げられるが、生物的手法はウイルスを用い、化学的手法は有害な薬剤を使用するため、安全性に課題がある。そこで本研究では安全性が高い物理的手法の中でも、比較的導入効率が良い電気穿孔法に用いて、より高速かつ高い導入効率を実現する方法の開発を目指した。具体的には、マイクロ流路における遺伝子の濃縮および電場集中を用いた電気穿孔法を考案した。ここでは、その有効性について検討するために行った予備実験の結果を報告する。

※実験 (Experimental) :

利用した主な装置名 : ゼータ電位・粒径測定システム

マイクロ流路において分子濃縮を行うために、本研究では等速電気泳動 (以下、ITP) を用いた。ITP は、電気移動度の高いイオンと低いイオンを用いてその中間の移動度を有する物質を濃縮する技術である。濃縮を行うプラスミド pmax-GFP、並びに HeLa 細胞の電気移動度の測定には、ゼータ電位・粒径測定システム (大塚電子株式会社) を使用した。測定は Phosphate Buffered Saline 溶液で行った。その結果、pmax-GFP と HeLa 細胞がそれぞれ $-25.2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{Vs}$ および $-1.07 \pm 0.04 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{Vs}$ となった。これらが異なる移動度を有している点を利用して、ITPにより濃縮された pmax-GFP 中を HeLa 細胞が通過する際に電気穿孔を行う方法を考案した。ここでは、有効性検討のための予備実験について述べる。まず Tris 50 mM, HCl 25 mM, sucrose 175 mM, PVP 1% w/w および細胞 5.0×10^5 個/ml の溶液を準備した。これを幅 50 μm および深さ 20 μm のガラス製マイクロ流路に満たした。その後、流路の負極側から Tris 50 mM, HEPES 25 mM, sucrose 175 mM, PVP 1% w/w, プラスミド 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶

液を導入し、長さ 72 mm の流路端間に 1.5 μA の一定電流を加え、流路内部の様子を観察した。

※結果と考察 (Results and Discussion) :

電圧印加時に、ITP によってプラスミドが濃縮され、細胞を追い抜く様子を図 1 に示す。プラスミドおよび細胞は正極に向かって図中右方向に流動し、ITP によるプラスミドの濃縮層が電気移動度の小さい細胞を追い抜き、通過する様子を確認できた。

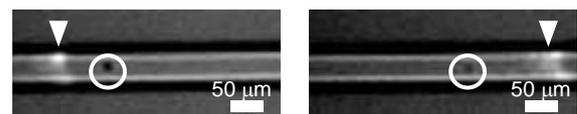


図 1 プラスミド濃縮層が細胞を追い越して移動している様子 (白丸 : 細胞, 白三角 : プラスミド濃縮層)

※その他・特記事項 (Others) :

今後の展望として、圧力駆動流によりプラスミドの濃縮界面を流路内で固定し、連続的かつ長期的に細胞が通過する状態を実現する。更に、濃縮界面周辺で電場を集中させ、細胞の通過と同時に電気穿孔を行うデバイスを作製し、導入効率、生存率等の検討を行う。