

利用課題番号 : F-13-KT-0068  
利用形態 : 技術補助  
利用課題名 (日本語) : 細胞内物質導入の基礎研究  
Program Title (English) : Fundamental Research of Mass Transfer in Cells  
利用者名 (日本語) : 梶本 剛生, 岡 洗佑  
Username (English) : Takao Kajimoto, Kosuke Oka  
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 (English) : Department of Micro Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

## 1. 概要 (Summary) :

細胞の形質変化の手段として電気穿孔法を用いた細胞への外来性遺伝子の導入が広く行われている。一般的なバルク電気穿孔法では、数 mm の距離を離れた平行電極を有するキュベット内に細胞懸濁液を入れ、電極間にパルス状の電圧を印可することで、細胞内へ遺伝子を導入する。従来法は操作が簡便である一方で、数百 V 程度の高電圧を必要とする点や遺伝子発現の効率が比較的低いことが課題であった。そのため近年、微小オリフィスによる集中電場を利用した電気穿孔法が提案されている<sup>(1, 2)</sup>。この手法は絶縁材料中のオリフィスにより電場を集中させることで低い電圧での膜穿孔が可能であると共に、電場の影響を細胞膜の一部に局限できるため細胞への損傷を低減できる。しかし、本手法における遺伝子導入過程は不明な点が多く、先行研究<sup>(1)</sup>で報告されている様な遺伝子発現における効率向上の詳細メカニズムは明らかになっていない。バルク電気穿孔法ではプラスミド等比較的大きな分子は細胞内部へ直接導入されるのではなく、電場が分子と細胞膜の相互作用を惹起し、その後のエンドサイトーシスにより分子が導入されると考えられている<sup>(3)</sup>。一方で、Boukany ら<sup>(4)</sup>は、集中電場により生じる電気泳動が物質輸送を促進していると主張している。さらに、Kurosawa ら<sup>(5)</sup>は、電気泳動により核内へ分子が直接導入されている可能性を示しており、これが発現効率向上のメカニズムの一つとして考えられる。電気穿孔時に核内へ分子が直接輸送されるためには、分子は細胞膜に加えて核膜を透過する必要がある。核膜は大きさ 2 nm~10 nm 程度の核膜孔と呼ばれる穴状構造を有しているが<sup>(6)</sup>、一般にプラスミド等の分子は平衡状態で 100 nm 以上の大きさを有しており、拡散により核膜孔を透過することは困難である。そのことから、電気泳動により核膜孔を通過する際には分子が大きく変形していると考えられる。また、集中電場が核膜の膜電位を上昇させ、その分子透過性を上昇させる可能性も考えられ、前報<sup>(7)</sup>ではその影響について数値解析により検討した。本研究では、ここで用いた細胞の

核膜孔(直径約 4 nm)よりも大きな量子ドット(直径約 13 nm)を用いて電気穿孔を行い、電気穿孔後における量子ドットの細胞内分布を詳細に調べることで集中電場による核膜の分子透過性上昇の可能性について検討した。

## 2. 実験 (Experimental) :

デバイスは 8 本の深さ 50  $\mu\text{m}$  および幅 2.5 mm の流路と中央の直径 8.0 mm 細胞培養用ウェルで構成されており、流路中には大きさ数  $\mu\text{m}$  のオリフィスが設置されている。中央のウェルに細胞懸濁液を導入し外側の流路出口との間に水頭差を与えることで各オリフィスに細胞を固定できる。電気穿孔を行うための電極は Ag/AgCl 製であり、一方の電極は中央のウェルに、もう一方は流路出口に挿入した。本デバイスは絶縁性材料である PDMS (polydimethylsiloxane) およびガラス基板から成り、電圧印加により生じるイオン電流は全てオリフィスを通過する。これにより、電位差を与えた流路のオリフィスに固定された細胞のみを電気穿孔できる。また、電気穿孔時に測定した電流値からオリフィスにおける電場強度を推定できる<sup>(8)</sup>。本デバイスはネガ型レジストである SU-8(Microchem)で製作した鋳型を PDMS へ転写することで製作した。また、オリフィスは近接した鋳型構造の間に形成される離型剤のブリッジ構造を利用して製作した<sup>(9)</sup>。ただし、ここではその鋳型構造の間隔を 4  $\mu\text{m}$  とした。作製した PDMS 流路は大気プラズマ処理によりガラス基板と接着した。

## 3. 結果と考察 (Results and Discussion) :

3 V の電圧印加後において撮影した細胞の共焦点蛍光像より電圧印加後において量子ドットが細胞内及び細胞核内に分布していることが確認できた。量子ドットが核内部へも導入されていることから、本結果は集中電場が核膜の分子透過性を上昇させる可能性を示している。同様の実験を様々な印加電圧の条件で実施し、印加電圧と核内部へ導入された量子ドットの割合の関係について整理した。ここで核内部へ導入された割合は量子ドットに対応する共焦点蛍光像を用いて (細胞核内部の蛍光値の和)

I (細胞全体の蛍光値の和) から算出した。印加電圧および導入割合の相関係数  $r$  は-0.40 と得られるが、有意水準  $p = 0.1$  ( $n=17$ )とした時、 $|r| < r_{0.1} = 0.41$  より帰無仮説を棄却できない。一方で、核膜とオリフィスまでの距離と核内部へ導入された量子ドットの割合における関係を調べたところ、距離と導入割合の相関係数  $r$  は-0.79 であり、有意水準  $p = 0.01$  としても帰無仮説は棄却され ( $|r| > r_{0.01} = 0.61$ )、両者に強い負の相関があることが分かった。すなわちオリフィスと細胞核までの距離が減少するにつれて細胞核内部へ導入される量子ドットの割合が増加することを意味している。Laplace 方程式に基づく数値解析<sup>9)</sup>より、オリフィスと核膜間の距離がその膜電位上昇において重要なパラメータであり、これが減少すると核膜の一部がオリフィス近傍における電場の高い領域に近づき、その膜電位が上昇するという結果が得られている。さらに、ここで得られた実験結果より、その膜電位の上昇が分子透過性の向上につながることを示唆された。以上から、特に核膜孔よりも大きな分子において電気穿孔による核内部への直接導入には、核をオリフィス近傍に配置することが重要であると考えられる。

#### 4. 参考文献：

1. Valero, a *et al.* Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device. *Lab on a chip* 8, 62–7 (2008).
2. Hakamada, K. *et al.* Development of a microfabricated device for low-voltage electroporation of adherent cells. *Journal of bioscience and bioengineering* 115, 314–9 (2013).
3. Golzio, M., Teissie, J. & Rols, M.-P. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1292–7 (2002).
4. Boukany, P. E. *et al.* Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cells. *Nature nanotechnology* 6, 747–54 (2011).
5. Kurosawa, O. *et al.* DIRECT INTRODUCTION OF PLASMID INTO NUCLEUS USING ON-CHIP ELECTROPORATION. *14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2010)* 217–219 (2010).

6. Mazzanti, M., Bustamante, J. O. & Oberleithner, H. Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiological reviews* 81, 1–19 (2001).
7. 新宅博文, 梶本剛生, TECHAUMNAT Boonchai, 鷲津正夫, 小寺秀俊 電場集中を用いた電気穿孔法が細胞内小器官に及ぼす影響. 日本機械学会流体工学部門講演会講演論文集 90, 289–290 (2012).
8. Shintaku, H. *et al.* Measurement of local electric field in microdevices for low-voltage electroporation of adherent cells. *Microsystem Technologies* (2013).doi:10.1007/s00542-013-1797-9
9. Gel, M. *et al.* Dielectrophoretic cell trapping and parallel one-to-one fusion based on field constriction created by a micro-orifice array. *Biomicrofluidics* 4, 022808–022808–8 (2010).

#### 5. 論文・学会発表 (Publication/Presentation)：

- (1) 重里優子, 横川隆司, 小寺秀俊, 新宅博文, 分子濃縮によるオンチップ電気穿孔法の効率化, 日本機械学会第5回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, pp. 127-128, 仙台, 2013年11月6日.
- (2) 梶本 剛生, 岡 洗佑, 新宅 博文, 横川 隆司, 小寺 秀俊, 電場集中を用いた電気穿孔法における 細胞内小器官への分子輸送の可視化計測, 日本機械学会 2013 年度年次大会, J026022, 岡山, 2013年9月9日.

#### 6. 関連特許 (Patent)：

なし。