

細胞にやさしい液滴電気穿孔法の再生医療への応用

豊橋技術科学大学 次世代半導体・センサ科学研究所 教授

沼野 利佳

1. はじめに

高齢化社会を迎えた日本にとって、2012年にノーベル医学生理学賞を受賞された山中伸弥先生が見出したiPS細胞を用いた再生医療の推進は、最重要課題の1つである。将来、移植に使用可能な安全なiPS細胞の効率的な樹立できる方法は電気穿孔法である。また、末梢血由来の血球細胞は、サンプリングしやすくドナーに優しい方法であるが、培養が比較的困難で、弱い細胞であるため、細胞毒性が低く、複数の山中因子を1細胞に導入できる電気穿孔法装置が希求されている。

本ラボ独自で開発した液滴電気穿孔法とは、細胞と遺伝子を含む液滴に、放電によるナノ秒パルス電界を印加して細胞膜に穴をあけ、細胞に遺伝子を導入する新しい方法である¹⁾。数マイクロリットルの液滴内で、細胞1000個という小スケールで、遺伝子導入を可能である。

独自で開発したこの液滴電気穿孔法を社会実装するため、現状の市販の電気穿孔装置との差別化をはかり、移植にたえうるiPS細胞をはじめとする有用細胞の大量作製を目的にする、広くユーザーに提供できるような方法、機器に、さらに発展させることをめざす。

2. 産業機械の高機能化と課題

液滴電気穿孔法の利点として、少量の細胞に対し、少量の外来性物質で導入が可能、細胞毒性が低い、多種類の外来性物質が同一細胞に導入可能、感染性や毒性の可能性が非常に低い、高価なパルスジェネレーターが不必要で安価であるなどがある。この利点をいかし、iPS細胞作製に展開し、高効率で安全なiPS細胞作製を安定的に実現する装置を作製する。

3. 研究の方法及び内容

3-1

まず、開発した液滴電気穿孔法の改善、試作機改良を実施する。具体的には、本法の遺伝子導入効率の向上、細胞毒性の低下、実験の汎用性・再現性・簡便性をより高める改善を施す。液滴電気穿孔法において、放電管の種類、印加条件の検討はもちろん、機器の液滴保持部の形状や放電管装着部の改善、電荷パルスの安定化などのアップデートも実施する。

液滴電気穿孔装置の試作機について、特に、印加される電荷パルスの強さを決める電圧と、パルス頻度を決めるコンデンサーの容量がつまみを調節することで、また、内部のコンデンサーやコイルを付け替えることで、様々なサンプルに対する遺伝子導入効率が最適な印加条件を検討した。(図1)。

また、HEK293細胞に、蛍光GFPコードプラスミドDNA導入したあと、2週間ほど培養した結果、蛍光を示す細胞が多数観察された(遺伝子導入効率25%)ため、この機器を用いて、外来性の遺伝子を細胞ゲノムに導入できる安定的遺伝子導入細胞株も作成できることがわかった。HEK293細胞株により、調整コン

デンサ-1000pF, コイル 55mH の条件で、現在、遺伝子導入後 8 日後に GFP の DNA 導入効率は 39%まで向上した。また、細胞の死亡率は、1.82%と、印加していないもの 2.94%とほぼ変わらず低かった。



図 1. 放電タイプ液滴電気穿孔法の試作機

電気素子であるコンデンサとコイルの組み合わせをモジュール化したものを作成し、取り外しを容易にした。130 μ H のインダクタのコイルは、低い 30 μ H インダクタのコイルを複数本、直列接続し、発熱を防ぎ、耐空性、安全性を向上した。

また、以下のコイルとコンデンサをそれぞれ組み換え式のものから、一体化したモジュールを作成し、リンパ芽球細胞株 LCL 細胞細胞にて、蛍光発現 GFP plasmid DNA の導入効率を測定した(図 2)。

モジュール M1 : コイル 130 μ H、コンデンサ 1000 pF

モジュール M2 : コイル 130 μ H、コンデンサ 125 pF

モジュール M3 : コイル 210 μ H、コンデンサ 125 pF

モジュール M4 : コイル 55 μ H、コンデンサ 125 pF

モジュール M5 : コイル 5 μ H、コンデンサ 100 pF

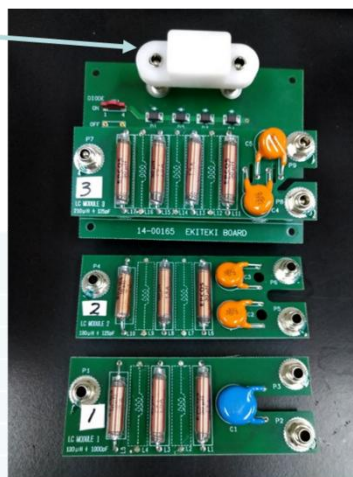
モジュール M6 : コイル 5 μ H、コンデンサ 470 pF

放電型の液滴電気穿孔装置試作機の印加条件として、遺伝子導入と細胞生存率にクリティカルに影響する 2つの要素としてコンデンサーとコイルの値がある。そこで、細胞種によりこれまで検討した最適条件について、いくつかの組み合わせコンデンサとコイルを搭載したモジュール電極を 6 種類作成し、HEK293 細胞を用いて遺伝子導入の性能チェックを行った。取り替えが簡単のように脱着式にした。その結果、6 種類すべてにおいて、約 20-40%の遺伝子導入効率を、細胞生存率は、7-10%であった。(図 28, 29)

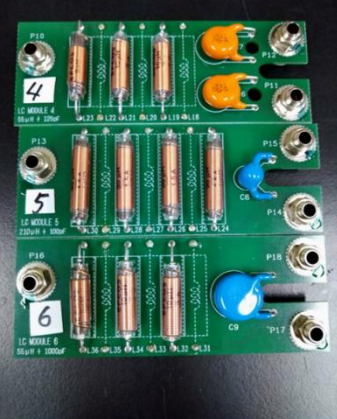
取り外し可能な液滴保持部



モジュール	コイル (μH)	コンデンサ (pF)	対象sample
1	130	1000	LCL細胞
2	130	125	LCL細胞
3	210	125	LCL細胞
4	55	125	HL60細胞
5	210	100	HEK細胞
6	55	1000	HEK細胞

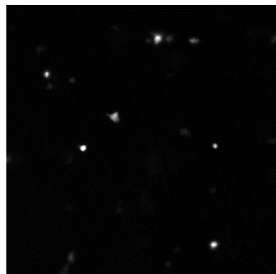


6種類のモジュール

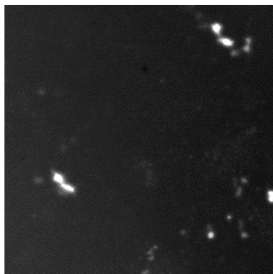


モジュール 番号	機器コン デンサ pF	遺伝子 導入効 率 (%)
1	500	30
1	2000	25
2	500	40
2	2000	25
3	500	39
3	2000	32
4	500	37
4	2000	39
5	500	21
5	2000	41
6	500	19
6	2000	23

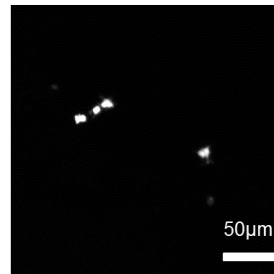
モジュール1



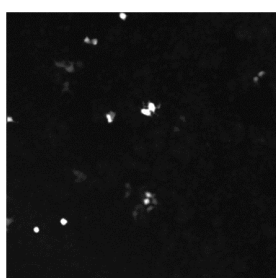
モジュール2



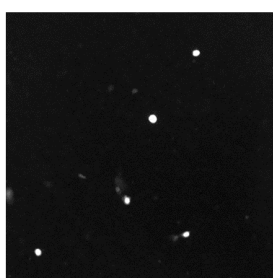
モジュール3



モジュール4



モジュール5



モジュール6

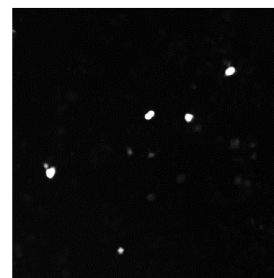


図2 各放電型液滴電気穿孔法印加モジュールの遺伝子導入率

3-2

さらに、改善した液滴電気穿孔法の装置を使用し、複数の人の末梢血由来の細胞から、安全な iPS 細胞の効率的な樹立を実施し、実用にたえるかを検討する。

iPS 細胞作製効率は、現在、センダイウイルスを用いての遺伝子導入にて、0.1%ほどであるが、再生医療に使用するため移植まで考慮すると、ウイルス感染にて作製した iPS 細胞は適さない。物理的に、遺伝子を導入する電気穿孔法にて作製した iPS 細胞は、癌化の懸念が少なく移植にも適すると考えられる。しかし、市販の電気穿孔装置での iPS 細胞作製効率は、0.002%~0.0015%ほどと低く、再生医療における

ボトルネックであった。そこで、少量の細胞に、細胞毒性が低く、効率よく、複数の遺伝子導入が可能な本液滴電気穿孔法を用いて、少ない細胞数からの iPS 細胞の作製効率をあげることを実施する。

新たな発見として、放電部を安定化するために放電管を接続する仕様としたが、ガスアレスタ放電管の同じ最大電圧のものでも、様々な会社のものを試し、販売会社により放電管の放電が異なるため、最適なものを選ぶ必要があることがわかった。現在、クリップで回路に組み込む形式にしているが、固定化しないと条件が振れる可能性があることがわかった。基礎実験をとおして、販売機器として、結果の再現性、性能の安定性がキーであることがわかった。

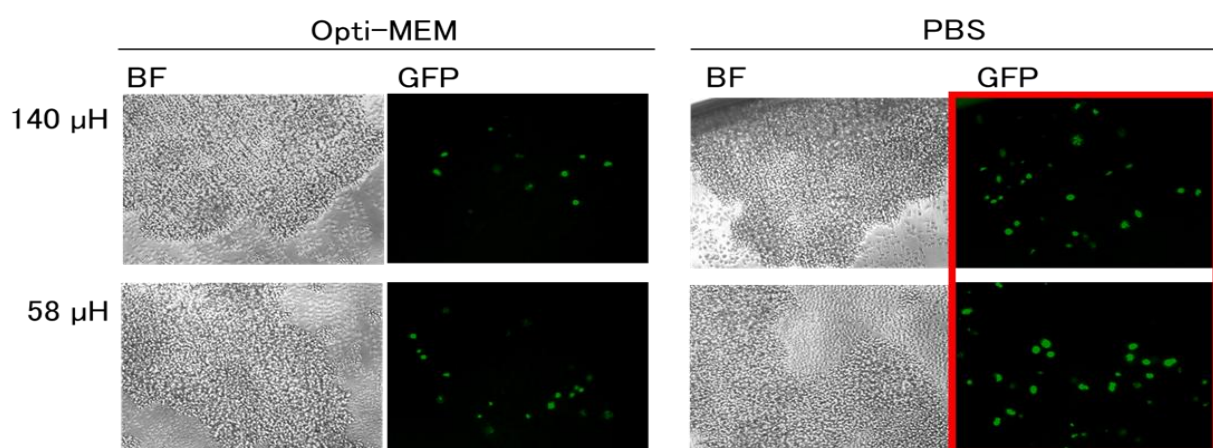
3-4

浮遊細胞である血液由来の T 細胞は HEK293 細胞株と比べて、本液滴電気穿孔法による遺伝子導入効率は、サンプルの個体差はあるものの一概に低下するので、多くのサンプルについて導入実験を実施しなければならない。そこで、血液中の血球細胞を用いて iPS 細胞を作成することにした。健康人由来の血球 B 細胞に、EB virus (ヒトヘルペスウイルス 4 型 (Human herpesvirus 4HHV-4)) を感染させて不死化した B 細胞株 (LCL) を細胞バンクより入手し、それらを用いて、リプログラミング化して iPS 細胞を作成することにした。LCL から iPS 細胞を作成方法が報告されている²⁾。

LCL 細胞株 (Lymphoblastoid cell line; LCL) を用いて、iPS 細胞を樹立しているが、本細胞における電気の印加条件等の検討を緑蛍光タンパク質遺伝子 (pCXLE-EGFP) にて実施した。今回は、液滴培地に OptiMEM と PBSBuffer を用いた場合に遺伝子導入効率に変化するかどうかを比較した。その結果、導入効率が比較的高いコイルの 2 条件 140 μ H と 58 μ H の両方の印加条件で、OptiMEM よりも PBS を液滴培地に用いたものが、蛍光表示細胞が多く、遺伝子導入効率が高かった (図 3)。

z

図 3. LCL 細胞の遺伝子導入効率の検討



独自の電気穿孔法である放電型液滴電気穿孔法は、少量の細胞に、高効率で、複数の外来遺伝子の導入が、可能な本法の特色をいかし、4 種類の山中因子遺伝子を、人血球 B 細胞由来 LCL 細胞株に導入したところ、遺伝子導入から 16 日後、平均で、0.16 %の確率で、iPS 細胞コロニーが観察された (図 24a)。

50 歳男性の健康人由来の不死リンパ球 (MY-EBV-LCL) にリプログラミング化遺伝子 (山中因子) を放電型タイプの液滴電気穿孔法にて遺伝子導入し、約 3 週間後に iPS 細胞コロニーが形成されたことから、他の不死化リンパ球に対しても iPS 細胞が作製できるかを検討した。その結果、9 歳男性の健康人由来の不死リンパ球 (TW-EBV-LCL)、53 歳女性の健康人由来の不死リンパ球 (HEV0019)、39 歳女性の健康人由来の不死リンパ球 (HEV0024) を用いても同様に iPS 細胞が作製できることが示された (図 4)。

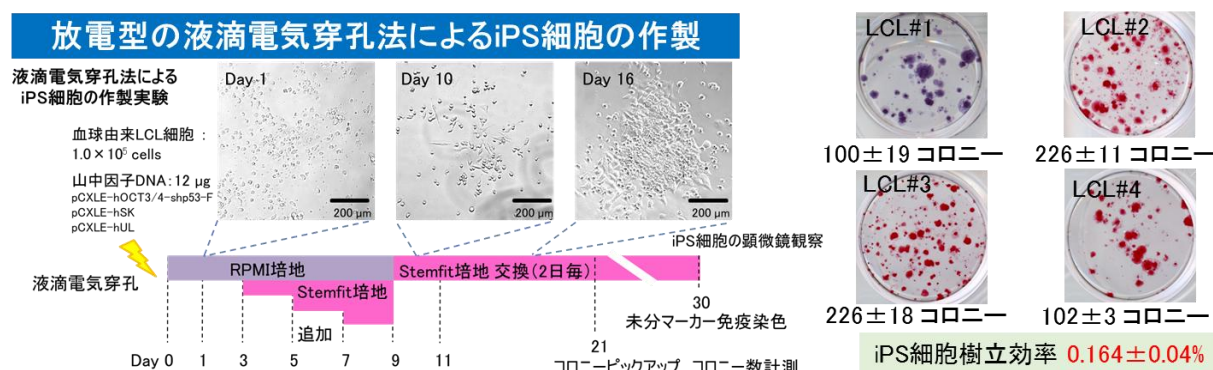


図 4. 血球由来 LCL 細胞に液滴電気穿孔法にて山中因子を導入し iPS 細胞樹立

3-3

また、本機器にて作成した iPS 細胞が、再生医療への貢献のために分化能があるかを神経前駆体細胞に分化できるかも確認する。

本年度は豊橋技術科学大学でも液滴電気穿孔装置を用いて不死化リンパ芽球株から iPS 細胞を安定的に樹立することに成功したため、樹立した細胞を凍結し順天堂に移送し、従来の iPS 細胞と同等の神経分化能を有しているか検討した。

iPS 細胞を下図の様にニューロスフェアと呼ばれる細胞塊を経由して中脳ドパミン神経細胞へ分化させた (図 5)。

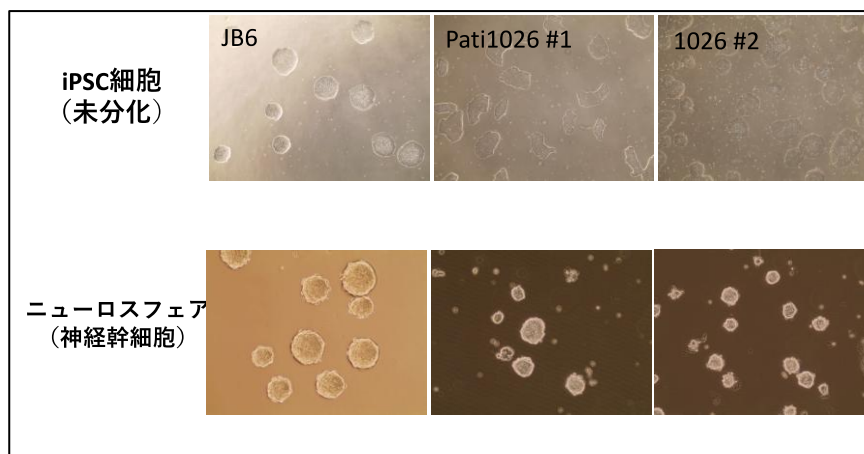


図 5. 電気穿孔装置を用いて樹立された iPS 細胞の神経分化

3-4

さらに、液滴電気穿孔法が、複数種の外来物質を導入が高い利点を生かし、iPS 細胞作製などの際に、ゲノム編集技術により遺伝子治療応用もめざす。そのため、本法によるゲノム編集についても、さまざまなサンプルで、効率を確認する。

5. 研究成果の波及効果

今後、需要が増大すると予想される iPS 細胞製作への展開を想定している。京都大学の iPS 研究所や、順天堂大学など iPS 細胞の量産やストックを実施したり、パーキンソン病の神経疾患の患者さんからの血液より iPS 細胞をへて神経細胞を作成し、薬剤スクリーニングを実施している組織に、製品化した液滴電気穿孔装置を販売し、再生医療の発展に尽力する。特に、本法では、細胞 1000 個単位の少量のサンプルより、効率よく iPS 細胞を樹立することができるため、採取サンプルとしては、血液一滴からでも iPS 細胞樹立が可能であるため、多量のサンプルからの iPS 細胞量産に役立つと考えられる。

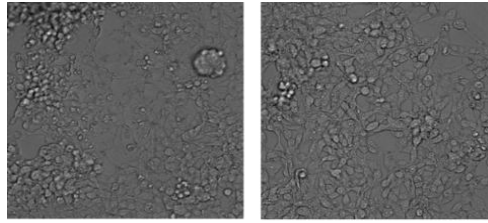
また、高齢化社会では神経疾患による治療薬が長期にわたり服用が続くため、社会保障費に大きな負担となっており、この費用を軽減できることは、日本社会にとっても重要なことである。液滴電気穿孔法の波及効果として、再生医療や、がん免疫療法 CAR-T 関連細胞・遺伝子治療など高額医療への応用が寄与できる。つまり、液滴電気穿孔法が、複数種の外来物質を導入が高い利点を生かし、量産する iPS 細胞作製などの際に、ゲノム編集技術により遺伝子治療応用もめざす。

放電型の液滴電気穿孔装置の試作機を設計・作成し、様々なサンプルについてデモ実験を実施し、性能の向上や使いやすさを追求している。本プロジェクトでは、社会実装にむけ、明らかになった問題点の解決や、さらなる汎用性や安全性の向上などの装置改良を実施する。

往復運動型液滴電気穿孔法により、円弧型電極にてゲノム編集のマーカである伊川先生提供のベクターとともに、哺乳類細胞株 HEK293 細胞株に導入し、その際にターゲットの遺伝子に対する gRNA を導入した。伊川のベクター由来の GFP シグナルより、ゲノム編集を確認。また、シーケンスにより 1 塩基付加によるフレームシフト変異を確認した(図 21 上)。標的遺伝子の特異的に切断する gRNA と Cas9 酵素の発現により、ゲノム編集がおき、GFP 遺伝子の中にあつた標的遺伝子は切り出されて、GFP 遺伝子は発現し蛍光シグナルが発現するようになる。本ゲノム編集の効率をみるマーカー DNA を伊川研よりリソースセンターを通して入手した。

HEK293 細胞株において、本液滴電気穿孔によるゲノム編集が起きることを確認した。具体的には、ゲノム編集が起きることで蛍光マーカー遺伝子 GFP が発現し、細胞が緑蛍光を帯びるプラスミド DNA の遺伝子配列を改変し、GFP シグナルをより強くし、この DNA を本液滴電気穿孔で、HEK293 細胞に遺伝子導入し、GFP シグナルを確認したことでゲノム編集に成功した(図 6)。

明視野



GFP

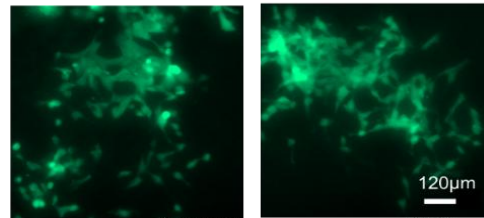


図6 改変ゲノム編集マーカーDNA の液滴電気穿孔による導入

4. まとめ

新たに開発した液滴電気穿孔法の性能、安定性を向上させ、装置化し、社会実装をめざす。本液滴電気穿孔法の持つ特異性を再生医療分野にて活かし、広く一般に流布し、再生医療自体の再生の起爆剤としたいと考えている。

謝辞

本研究は、同じ電気穿孔装置のトップメーカーであるネッパジーン社から多大なご支援を頂き、松本光二郎には、様々なご提案をありがとうございました。また、本学の篠崎 竜登氏、仁木 剛史先生、栗田弘史先生、柴田 隆行先生には、大切な Discussion をありがとうございました。松尾 美奈子様、木村尚文様、実験のお手伝いをありがとうございました。ここに深く謝意を示します。

参考文献

- 1) Numano R, “幹細胞研究の最前線～基礎から臨床まで～ 液滴電気穿孔装置の開発と幹細胞研究への応用,” 3) Cytometry Research, vol. 27, 5月号, 2018.
- 2) Kurita H, Nihonyanagi H, Watanabe Y, Sugano K, Shinozaki R, Kishikawa K, and Numano R, “Advanced motion control for next-generation industrial applications,” PLoS One., vol. 15, no. 12, e0243361, 2020.
- 3) Watanabe Y, Nihonyanagi H, Numano R, Shibata T, Takashima K, and Kurita H, “Influence of Electroporation Medium on Delivery of Cell-Impermeable Small Molecules by Electrical Short-Circuiting via an Aqueous Droplet in Dielectric Oil: A Comparison of Different Fluorescent Tracers,” The 45th Annual Conference of IEEE Industrial Electronics Society, IECON2019-LISBON, Lisbon, Portugal, , vol. 22, no. 7, pp. 2494–2507, 2022.
- 4) Tsurusaki Y, Watanabe Y, Numano R, Shibata T, and Kurita H, “Influence of DNA characteristics on cell membrane damage stimulated by electrical short-circuiting via a low-conductive aqueous droplet in dielectric oil.” PloS one, vol. 18, no. 5, e0285444 2023.
- 5) Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, Tada H, Matsumoto T, Isoda M, Hashimoto R, Hattori N,

Takahashi T, Morishita S, Tsuji S, Akamatsu W, and Okano H, “Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines,” *Mol Brain*, vol.9, pp. 88–102, 2016.