

光酸化細胞膜穿孔体に関する基礎的研究

細胞膜穿孔体の安定作成・運用に向けて

齋藤敬¹, 猪股慧²¹ 秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科² 秋田県立大学システム科学技術研究科機械知能システム学専攻

光化学反応を利用した局所的な細胞膜酸化による細胞膜穿孔法は我々の独自技術であり、様々な研究開発を行ってきた。今回、技術の実用化に向け、その中核となるナノブラシ状の細胞膜穿孔体について、安定した作成法や運用方法を調査した。その結果、一種のシリコンゴムで構成される穿孔体を転写して作成するため鋳型について、転写に伴う鋳型の目詰まりと転写後の形状を観察、実用上支障が無いことを確認した。また細胞膜穿孔体の穿孔能力について、能力を保ちつつ酸化反応を突起部に限定する製法に成功、加えて穿孔体表面の汚れに伴う穿孔性能の低下はタンパク質・脂質分解酵素液と超音波洗浄の併用により回復可能である旨を確認した。一方、穿孔体に薬品を含有させるための多孔質化を試みたが、多孔質化には成功したものの、このような穿孔体は処理中に細胞を穿孔体表面に吸着し、細胞培養容器から剥離させる結果となった。最終的に光照射部の制御による穿孔パターンニング技術に関する基本的なデータを得ることができた。以上の成果によって、様々な研究者との協業に向けての基盤が大きく強化された。

キーワード：細胞，膜，酸化，光増感剤，ロボット

近年、細胞の機能改変技術は注目を集めている。この技術の発展は、例えばどんな細胞・器官・臓器へも姿を変える可能性のある、iPS 細胞を利用した医療分野などに貢献すると考えられ、山中と中村（2007）が総説を報告している。これに対し Saito, Suekane, Akagi, Taguchi, Ichiki（2009）は光化学酸化反応を細胞膜穿孔法に応用し、新たな細胞改変技術として近年注目を集めている。この穿孔法の大きな特徴は、細胞群への穿孔を行えるため効率が良い、細胞自身が修復できる程度の酸化処理によって、穿孔を行うため細胞生存率が高いといったことが挙げられる。しかし、発展途上の技術であるため、実用化するためのデータが不足していた。

これまでの研究では、光化学細胞膜穿孔法の基本的な技術基盤を固めることを目的として、細胞膜穿孔体や装置周辺の改良・開発および物質導入実験を行ってきた。その結果、光化学細胞膜穿孔法の実用性や信頼性を向上することができ、この技術の一連

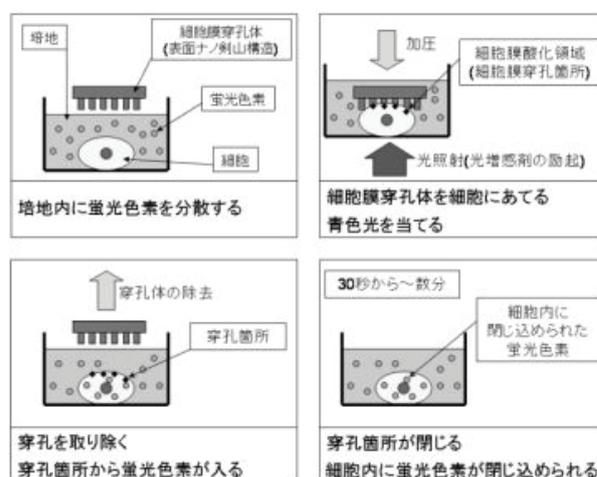


図1 光化学細胞膜穿孔法の概略図

の動作を行うためのロボット装置も開発、共同研究を行っている関連企業よりセルスタンパーCP-01 という製品名で試験販売にまで至った。

そこで本研究では、コストを抑えつつも、従来以上に様々な範囲で光化学細胞膜穿孔法の利用を可能

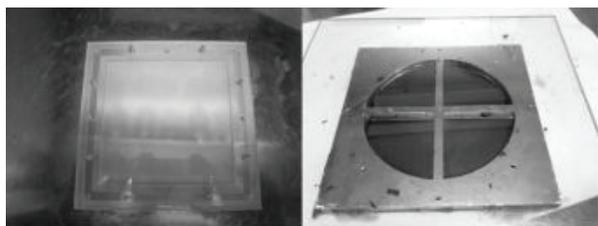


図2 新型穿孔体鋳型

にすることを目的に装置の改良および実験を行う。具体的には穿孔体の生産効率向上および機能拡張に加え、光化学細胞膜穿孔法を用いたパターンニング法の模索を行う。これらを実現することで、より広い分野で光化学細胞膜穿孔法の活躍が可能と考える。

細胞膜穿孔体鋳型

穿孔体は一種のシリコーンゴム (polydimethyl siloxane, PDMS) を主材料に、光増感剤 Hematoporphyrin を分散、ナノブラシ状の表面となるよう、微細な穴を有する鋳型を転写して作成している。従来、作製には一辺 17mm 角の多孔質シリコンを内蔵した鋳型を使用しており、一度の作製で 10 個の穿孔体しか作ることができなかった。また穿孔体は直径 12mm、厚さ 3mm と小さいために鋳型からの取り外しが容易ではなく、作業中に穿孔体のブラシ構造や本体そのものを破壊してしまう危険性もあった。そこで穿孔体の作製方法を見直し、新たな穿孔体鋳型の設計・開発を行った。

図2の左は樹脂フィルムによって転写を行うフィルムモールドタイプの鋳型であり、右は従来の多孔質シリコンのサイズを大きくした大型多孔質シリコン基板タイプの鋳型である。フィルムモールド鋳型では一度の工程で 36 個、大型多孔質シリコン基板鋳型では 27 個の穿孔体を作製することができる。また材料を大きめに固化させた後に、穿孔体の寸法にくり抜くという手順に変更したことで、材料の取り外しを容易にし、穿孔体の品質の低下を抑えることができた。さらにフィルムモールドとシリコン基板で微小な孔の形状が異なるものを使用している。これによってブラシ構造が異なる穿孔体を用意することができ、細胞の種類によって穿孔体の種類も変更することが可能となった。以上より、穿孔体の生産効率

を向上し、また細胞内物質導入の使用範囲を広げることが可能となった。

細胞膜穿孔体

酸化力局在化穿孔体

従来の穿孔体では、細胞に触れる表面全体に光増感剤が含まれているため、細胞群を必要以上に酸化し、細胞の生存率や物質導入率を低下させてしまっていることが懸念されていた。そこで、穿孔体のナノブラシ構造のみに光増感剤を含ませた酸化力局在化穿孔体を作製した。

最新の導入法の詳細や導入条件は Tachibana ら (2015) の文献に述べられており、今回もその条件を踏襲する。物質導入対象とした細胞は Greene と Tischler (1976) によって樹立された株化細胞ラット PC12 であり、Φ35mm ディッシュ (collagen type I coat dish, ATG) 上で培養、ディッシュ表面を中央より 90 度ずつ 4 分割し、各象限毎に様々な条件を変えて遺伝子発現効率を評価した。

酸化力局在化穿孔体を用いて、従来と同じ条件で、Shimomura, Johnson と Saiga (1962) により発見された青色励起光下で緑色蛍光を示すタンパク質 GFP、その遺伝子を含むプラスミドベクターを膜穿孔により導入した (pFP-C1 ベクター, pmaxGFP キット, Lonza: 調整・濃度は同社キットの説明に準ずる)。細胞内に導入された GFP プラスミドは CMV プロモーターによって GFP 遺伝子が導入細胞の遺伝子に転写され、導入から約 1 日で GFP が細胞内に発現する。このベクターを PC12 細胞に対して導入したところ、問題なく細胞への遺伝子導入と発現を行うことができた。また、従来の穿孔体と比較して、作製に使用する光増感剤の量は半分以下であり、また PDMS の重合固化時に必要なオートクレーブの回数も従来の 2 回 (増感剤含有層 1mm 厚 1 回、磁力固定用鉄粒子含有層 2mm 厚を追加し再度 1 回加熱) から 1 回 (増感剤含有層がブラシ部のみと微量であり、鉄粒子含有層と一括で固化可能) で済むことから、より生産効率がよくコストを抑えた穿孔体を作製することができた。今後は酸化力局在化穿孔体を使用し、より高い物質導入効率の条件を探る必要が

ある。

薬品含有型穿孔体

通常の細胞内物質導入では、細胞が定着しているディッシュ内を導入物で満たし、加圧および励起光照射によって穿孔を行う。しかし、この方法では必要以上に薬品や物質を使用してしまうため、コストが大きくなってしまふ。そこで図3のように細胞への導入物を含むことができる多孔質層を穿孔体に持たせることで、薬品の消費を最小限に抑えるというものを考案した。この方法で物質導入を行うことで、ディッシュ内の培地を導入物と入れ替える作業を省くことができるため、細胞が雑菌等に汚染される可能性も減らすことができる。ここでは薬品含有型穿孔体の作製方法と、この穿孔体の実用性についての研究を行う。薬品含有層の形成には、穿孔体材料のPDMSに水を混入し氷点下で重合固化することで、空隙を持たせる方法を採用し、薬品含有型穿孔体を作製した。作製した薬品含有型穿孔体を用いて、GFP遺伝子導入実験をPC12細胞に対して行った。その結果、一部の細胞でGFP遺伝子の発現が見られたが、多くの細胞はディッシュから剥離してしまった。これは、穿孔体表面に空隙を持たせたことで、細胞が張り付きやすくなってしまったためであると考えられる。また、GFP遺伝子の蛍光を示す細胞が少なかった原因として、薬品含有型穿孔体の疎水性が想定していた以上に高く、GFP遺伝子を微量しか含有できなかったことが挙げられる。以上の結果から、今後は細胞の剥離を抑える方法の探求、また薬品含有量を増加させるための措置として、穿孔体の親水性を持たせる処理の検討などが必要である。

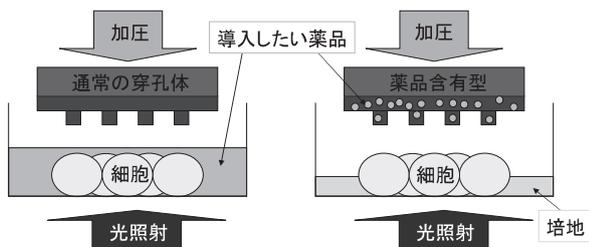


図3 薬品含有型穿孔体の概要

穿孔体の洗浄

前述の Tachibana ら (2015) の実験を通じ、穿孔体使用2回目以降の細胞膜穿孔効率の低下が明らかになったため、穿孔体の洗浄方法の確立に向けた研究に着手した。将来的な技術利用者による入手性を念頭に、市販の脂質・タンパク質分解酵素を含んだコンタクトレンズ洗浄剤より2種を選定(洗浄剤1: Activa Tablet, オフテクス, 洗浄剤2: Cキューブ オーツーワン, ロート製薬)と超音波洗浄機(1510, Bransonic)を併用して使用後の穿孔体を洗浄し、洗浄後の穿孔体を使用したPC12細胞へのGFP遺伝子導入実験を行った(表1)。洗浄条件、手順は以下の通りである:

- 条件1: 洗浄剤1+超音波洗浄+すすぎ洗い
- 条件2: 洗浄剤2+超音波洗浄+すすぎ洗い
- 条件3: 超純水+超音波洗浄+すすぎ洗い
- 条件4: 超純水+すすぎ洗い

手順: ①使用後の穿孔体を15ml遠沈管に入れたものを4つ用意→②遠沈管ごとに条件の液体をそれぞれ入れ、30分超音波洗浄→③洗浄剤の効果を検証するため、24時間放置→④遠沈管内の液体を全て取り除き、超純水で3回すすぎ洗い

その結果、GFP遺伝子が発現していた細胞数は未

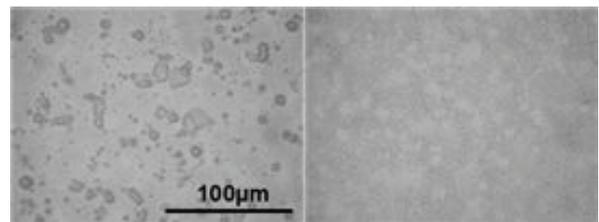


図4 洗浄前後の穿孔体表面(左: 洗浄前, 右: 洗浄後)

表1 洗浄後、処理回数による遺伝子導入細胞数の推移

	1回目	2回目	3回目	4回目
条件1(洗浄剤有)	54	17	8	8
条件2(洗浄剤有)	27	0	10	9
条件3(洗浄剤無)	4	0	4	4
条件4(洗浄剤無)	6	5	6	6

※未使用の穿孔体によるGFP導入実験

→各象限あたり平均70個の細胞から蛍光を確認

使用の穿孔体を用いた実験と同程度であったため、穿孔体の洗浄に成功したと考える。今後、より効果の高い洗浄剤の選定、洗浄手順の最適化、洗浄を行った穿孔体の汚れを検出するための試薬の検討により、より良い穿孔体洗浄方法を探求する必要がある。

パターンニング用基礎研究

光化学細胞膜穿孔法の運用範囲拡大のために、臓器再生を見据えた細胞膜穿孔技術によるパターンニングの基礎を構築する事を目的として、Tas と Werserneng (1981) が報告した死細胞の細胞膜を透過して核を染色するヨウ化プロピジウムの導入実験を PC12 細胞に対して行った。ここではパターンニングの効果を検証するために、セルスタンパーCP-01の光照射ユニットの半分を覆い隠し、励起光照射エリアと励起光遮断エリアに分けて実験を行った(図5)。その結果、光照射エリアでは細胞の剥離が少なく、遮光エリアでは細胞の剥離が多かった。これは、光照射エリアでは光化学反応によって細胞表面が酸化されて固くなったことで穿孔体に張り付きにくくなり、遮光エリアでは粘着性のある細胞が穿孔体に多く張り付いてしまったと考える。

また、光照射エリアでは生細胞と思われるものも

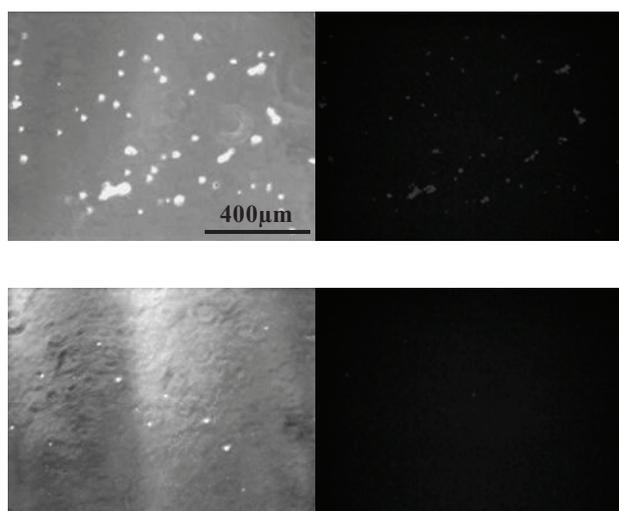


図5 パターンニング試験

(上段: 励起光照射エリア, 下段: 励起光遮断エリア)

(左: 透過像, 右: 蛍光像)

※コントラスト調整実施

多く染色されているのに対して、遮光エリアでは染色されている生細胞はほとんど確認できなかった。以上のような、励起光の有無による穿孔効果の差が確認されたことで、光化学細胞膜穿孔法を用いたパターンニング技術に関する基本的なデータを得ることができた。

結論

新たな細胞改変技術として注目されつつある、光化学細胞膜穿孔法を基本的な部分から振り返り、その中核部品である細胞膜穿孔体の性能向上を目指した諸研究を行った。その結果、細胞膜穿孔体の最適な作製方法や洗浄方法の確立に有用なデータや、穿孔体の機能拡張や光化学細胞膜穿孔法によるパターンニング技術に関する基本的なデータを得ることができた。これらによって、様々な研究者との協業に向け、光化学細胞膜穿孔法の機能および運用範囲の拡張に向けての技術基盤が大きく強化されたといえる。

文献

- 山中伸弥・中内啓光 (2008). 『再生医療へ進む最先端の幹細胞研究』実験医学増刊 26 (5), 羊土社
- Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976), "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 73(7), 2424-2428.
- Saito, T.K. Suekane, O. Akagi, T. Taguchi, A and Ichiki, T. (2009). "Large-Scale High-Performance Cell Membrane Perforation, with Nanoimprinted Mass Producing Perforator" 2009 IEEE/NIH Life Science Systems and Applications Workshop LiSSA, 5-8.
- Shimomura, O. Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962). "Extraction, purification and properties of equorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*". *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 223-239.
- Tachibana, T. Suzuki, Y. Fujioka, K. Ikeda, K. Inoue, Y.

Tada, Y. Saito, T.K. and Manome, Y. (2015). “Cell Membrane Perforation with Photosensitizer and a Brush-shaped Soft-polymer Sheet Using a Malignant Glioma Cell Line”, *Anticancer Research*, 35, 6069-6074.

Tas, J. & Werserneng, G. (1981). “Fundamental Aspects of the Interaction of Propidium Diiodide with Nucleic Acids Studied in a Model System of Polyacrylamide Films”, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29(8), 929-936.

〔 平成 28 年 7 月 20 日 受付
平成 28 年 7 月 31 日 受理 〕

Fundamental Research on a Photooxidative Cell Membrane Perforator

For stable fabrication and operation of the cell membrane perforator

Takashi K. Saito¹, Kei Inomata²

¹ *Department of Machine Intelligence and Systems Engineering, Faculty of Systems Science and Technology,
Akita Prefectural University*

² *Graduate School of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University*

Our photooxidative cell membrane perforation method is a unique physicochemical transgenic process for cell engineering. A robotic transgenic process based on this method is now available; therefore, in this research, we focused on a nanobrush-shaped cell membrane perforator and evaluated the fabrication and operation methods. The results are summarized as follows: (1) the mold can repeatedly imprint the brush-like surface. (2) To reduce the risk of oxidation during the process, the oxidative reagent is concentrated in the brush part; this approach is effective. (3) Cleansing of the perforator surface after the process with sonication and protease can recover the perforation performance. (4) A porous perforator can absorb materials and cells and can detach the cells from the culture dish. (5) The perforated area can be controlled through manipulation of the light irradiation area, and this concept can be extended to two-dimensional patterning modification processes of the cells. With these efforts, we can collaborate with various researchers.

Keywords: cell, membrane, oxidation, photosensitizer, robot