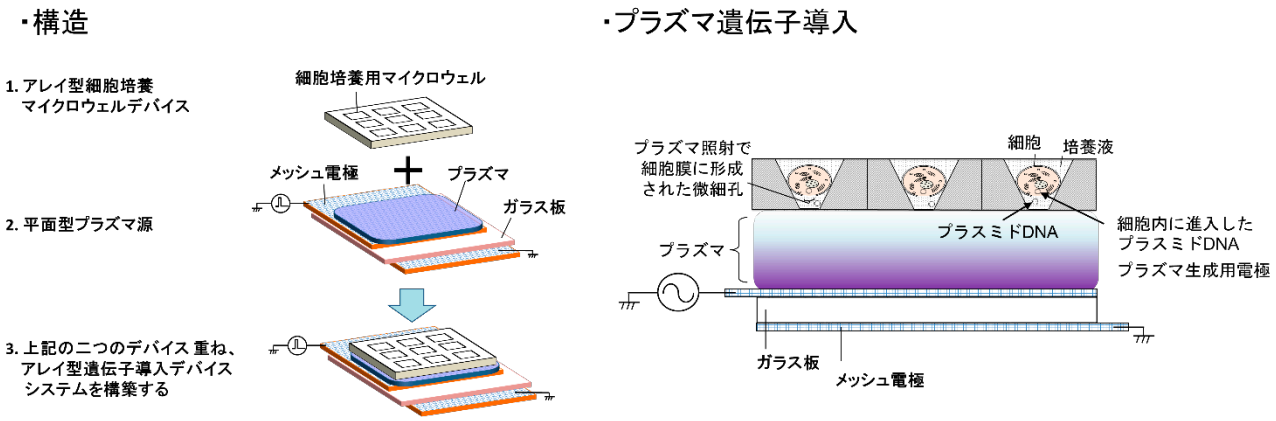
81　大気圧プラズマを用いた革新的遺伝子導入法の開発	熊谷　慎也

【目的】遺伝子導入により細胞機能をコントロールすることは医療において強力な手法となりつつあり、世界各国で導入方法の開発が進められている。例えば、患者の細胞を元に、山中 4 因子を導入して iPS 細胞を樹立し再生医療に用いるには、複数の細胞株の中から質の良い細胞株を選択することが必須である。これは砂場の中から金の粒を探す作業に等しく、時間的・経費的に非効率である。導入された 4 因子の量に依存して iPS 細胞の質が影響を受ける為、高効率で定量的な遺伝子導入が実現できれば、最初から高効率で質の良いクローンを作り出せる可能性が高く、クローン化さえ必要なくなることも考えられる。しかし、この要求を満たす遺伝子導入方法はいまだに確立されていない。近年工学研究者により、新たな遺伝子導入手法として、物質の第 4 状態であるプラズマを用いることが提案された。プラズマとは電離気体のことであり、荷電粒子・ラジカル・フォトンといった活性種を含んでいる。これらの活性種に起因するプラズマの効果によって、細胞内部への物質導入が促進されると考えられている。この手法の可能性を切り拓くため、本研究では、マイクロ電気機械システム技術（Micro ElectroMechanical Systems、MEMS）技術を用いてプラズマ照射型遺伝子導入システムを作製し、高効率に遺伝子導入する手法の開発を行った。

【方法】複数の細胞への遺伝子導入を行うため、アレイ型プラズマ照射遺伝子導入マイクロシステムを開発した。本システムを、細胞を培養するマイクロウェルデバイスと、遺伝子導入促進のための平面型プラズマ源とを組み合わせて構成した。マイクロウェルデバイスでは、プラズマ照射部に細胞が誘導されるように、ウェルの側壁部分に勾配を持たせた。大気圧プラズマ照射による細胞内への物質導入過程の解析を迅速に行うため、マウス線維芽細胞 L929 に対してプラズマを照射し、蛍光色素 DiYO-1 を導入して、その蛍光強度から導入効率を評価することとした。

【結果】マイクロウェルに細胞を播種して培養し、プラズマ照射を行って、蛍光色素の導入を行った。位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、プラズマ照射によって細胞内への物質導入が促進された。この蛍光色素導入は、デバイスチップの中に含まれるアレイに並べられた各マイクロウェルで同時に実現できた。今後、共同研究者と協力し、本研究で開発したマイクロデバイスを用いて、ヒト人工多能性幹細胞（hiPSC）への応用など、関連分野を大きく発展させることを考えている。

プラズマ照射型マイクロ遺伝子導入システム



81. 大気圧プラズマを用いた革新的遺伝子導入法の開発

熊谷　慎也

名城大学 理工学部 電気電子工学科 電子生命情報研究室

Key words：遺伝子導入，大気圧プラズマ，細胞，マイクロデバイス

緒　言

遺伝子導入により細胞機能をコントロールすることは医療において強力な手法となりつつあり、世界各国で導入方法の開発が進められている。特に、1. 簡便な方法で、2. 多量の、3. 多種多様な細胞に、4. 高い導入効率を保ちつつ、5. 遺伝子導入量を厳密にコントロールすることは、遺伝子治療や再生医療において極めて重要である。例えば、患者の細胞を元に、山中 4 因子を導入して iPS 細胞を樹立し再生医療に用いるには、複数の細胞株の中から質の良い細胞株を選択することが必須である。これは砂場の中から金の粒を探す作業に等しく、時間的・経費的に非効率である。導入された 4 因子の量に依存して iPS 細胞の質が影響を受ける為、高効率で定量的な遺伝子導入が実現できれば、最初から高効率で質の良いクローンを作り出せる可能性が高く、クローン化さえ必要なくなることも考えられる。しかし、上述した 5 つの条件すべてを満たす遺伝子導入方法はいまだに確立されていない。

近年工学研究者により、新たな遺伝子導入手法として、物質の第 4 状態であるプラズマを用いることが提案されている［1］。プラズマとは電離気体のことであり、荷電粒子・ラジカル・フォトンといった活性種を含んでいる。これらの活性種に起因するプラズマの効果によって、細胞内部への物質導入が促進されると考えられている。既に細胞や植物に対して、常温の大気圧プラズマを用いた遺伝子・たんぱく質導入が報告されはじめているものの［1，2］、医学・生物学分野で一般に認知されているとは言い難い。

プラズマと細胞との間の相互作用の解明に向けて、一つの細胞に対して直接プラズマを照射し、その後の細胞を解析するマイクロデバイスシステムが開発された［3〜5］。このマイクロデバイスシステムによって、マイクロスケールで顕在化する液体の表面張力を活用することで、培養液中の細胞に対して、ガス状のプラズマを直接照射することが可能になった。

本研究では、プラズマを用いた遺伝子導入手法の可能性を切り拓くため、マイクロ電子機械システム技術（Micro ElectroMechanical Systems：MEMS）技術を用いてプラズマ照射型遺伝子導入システムを作製し、高効率に遺伝子導入する手法の開発を行った。MEMS 技術を駆使して、一細胞に確実に遺伝子を導入するマイクロデバイスをアレイ状に作製し、複数細胞への同時遺伝子導入を行うマイクロデバイスを試作した。培養細胞のレベルで、簡便で効率良く狙った細胞に決められた量の遺伝子を導入するマイクロデバイスを目指した。

方　法

1. アレイ型プラズマ照射遺伝子導入マイクロシステムの開発

複数の細胞への遺伝子導入を行うため、アレイ型のプラズマ照射遺伝子導入マイクロシステムを考案した。本システムを、図 1a に示すように、細胞を培養するマイクロウェルデバイスと、平面型プラズマ源とを組み合わせて構成した。各部の詳細を以下に述べる。

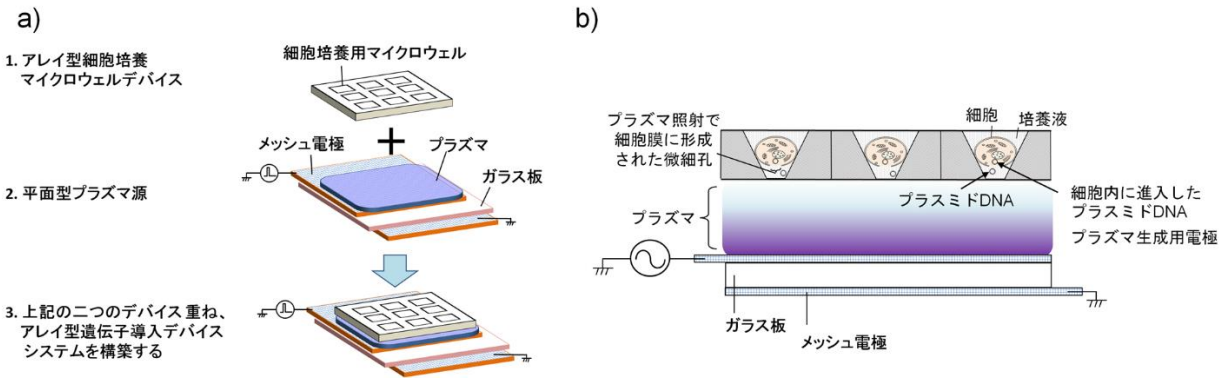


図 1. プラズマ照射型マイクロ遺伝子導入システムの概要

a）プラズマ照射型マイクロ遺伝子導入システムの構成。

b）プラズマ照射を利用した遺伝子導入時の断面図。

細胞を培養するマイクロウェルデバイスでは、プラズマ照射部に細胞が導かれるようにするため、図 1b の断面図で示されるように、細胞を培養するマイクロウェルの側壁部分に勾配を持たせることとした。作製プロセスの流れを図 2 に示す。熱酸化膜（厚さ：3 μm）を持つシリコンウェハ（厚さ：200 μm）を 22 mm 角に切り出して、微細加工プロセスを進めた。基板を洗浄し、基板の裏面を保護するためのフォトレジストを塗布した後、フォトリソグラフィーでマイクロウェルのパターンを形成した。その後、バッファフッ酸を用いて、露出している熱酸化膜部をエッチングした。その後、深堀エッチング技術により、基板の厚さの半分の深さ 100 μm まで深掘りエッチング（Deep-RIE）を行った。基板についているフォトレジストを除去した後、結晶異方性エッチングを行い、勾配を持つ側壁構造を作製した。このシリコン基板を超音波洗浄機に入れ、底面の熱酸化膜部を超音波によって破砕した。こうして、マイクロウェル底部の中心に向かって細胞を誘導する構造が得られた。本作製プロセスでは、マイクロウェルをつくる際に Deep-RIE と結晶異方性エッチングを行っており、結晶異方性エッチングだけで細胞誘導用のテーパー構造をつくるのに比べて、ひとつの基板上におけるマイクロウェルの集積度を向上した点に特色がある。

平面型プラズマ源には誘電体バリア放電方式を適用した。誘電体バリア放電では、放電によって生成した電荷が誘電体上に蓄積することによって放電が間欠的に起こるため、プラズマ中のガス温度の上昇を抑えることができる。本システムでは、ガラス板を 2 枚の金属メッシュで挟み込み、その金属メッシュ間に 9 kV（12.5 kHz）の高電圧を印加し、プラズマ発生させた。

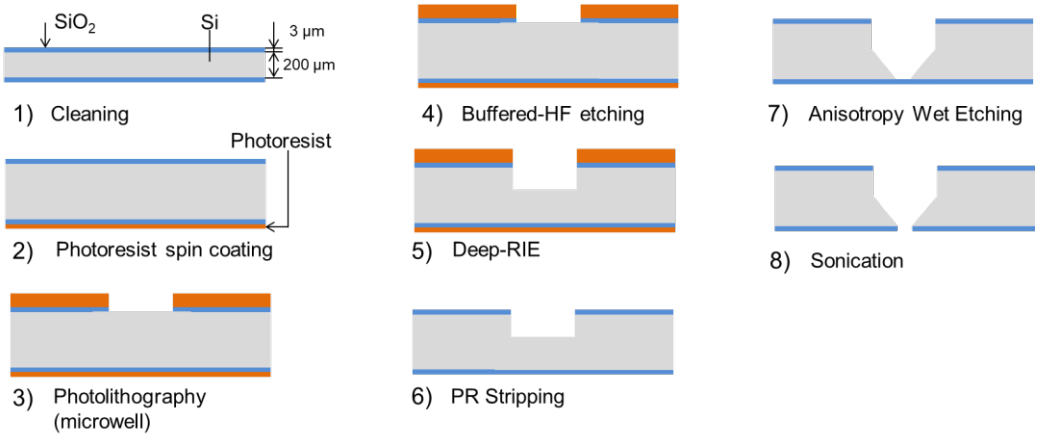


図 2. プラズマ照射型マイクロ遺伝子導入システム作製のフローチャート

2. 複数細胞への遺伝子導入

試作したマイクロデバイス上で細胞を培養するにあたり、マイクロデバイスの材料であるシリコン基板と細胞との間の親和性を向上させるため、基板表面の表面修飾処理を行った。3-aminopropyltriethoxysilane（APTES）を用いて基板表面にアミノ基を提示させ、マイクロデバイス上での細胞付着率を向上させた。表面修飾処理を行ったマイクロデバイスを、図 3a に示すようにテフロン治具にテープで貼り付け、細胞を播種した。その後、CO_2インキュベータ内に静置し、細胞をマイクロデバイス表面上に付着させた。

大気圧プラズマ照射による細胞内への物質導入過程の評価を促進するため、プラズマを照射した細胞に対し、蛍光色素 DiYO-1 を導入し、その蛍光強度から導入効率を評価することとした。図 3b に示すように、物質導入実験の直前に培養液を、蛍光試薬 DiYO-1 を含むものと交換した。マイクロデバイスを張り付けたテフロン治具を、スペーサーを介して平面型プラズマ源の上に設置した。その後、プラズマを発生させ、細胞の中への物質導入を行った。

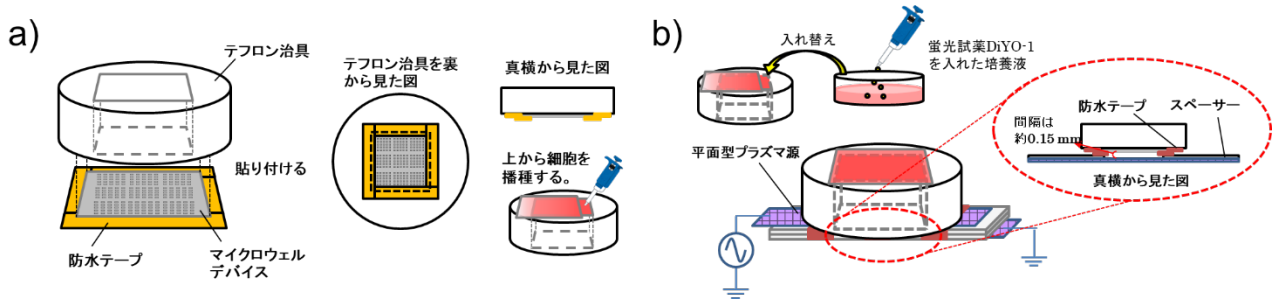


図 3. プラズマ照射型マイクロ遺伝子導入システムのセットアップ

a）テフロン治具へのマイクロウェルデバイスの貼り付け。

b）プラズマ照射による物質素導入。

結果および考察

1. マイクロ細胞培養デバイスと平面型プラズマ源

試作したデバイスでは、図 4a に示すように、マイクロウェルを 5×5 のアレイ状に並べ、このアレイを 22 mm 角の基板上に 9 か所配置させた。図中、赤線で囲んだマイクロウェルを拡大しているが、底面の中心に向かう逆ピラミッド形状ができていることが分かる。底面部における開口の大きさは、最小で 10 μm×10 μm のものが得られた。

平面型プラズマ源を作製し、高電圧（9 kV、12.5 kHz）を印加し、プラズマを発生させた。図 4b に示すように、40 mm×20 mm の領域にわたって均一にプラズマを発生させることができた。このプラズマを純水に対して 40 秒間照射し、培養細胞の活動に影響を与える活性種の濃度計測を行った。活性酸素種として H_2O_2 が 0.12 mg/mL、活性窒素種として NO_3^-、NO_2^-がそれぞれ 82 mg/mL、6.4 mg/mL の濃度になっていることが分かった。

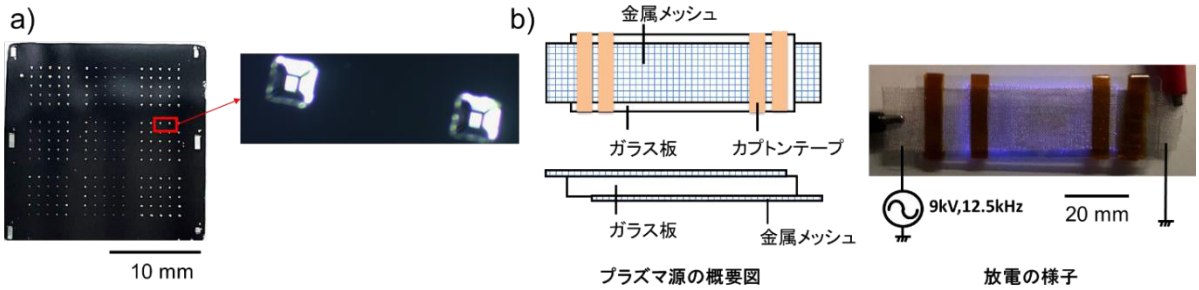


図 4. プラズマ照射型マイクロ遺伝子導入システムにおける構成部品

a）マイクロシャーレデバイス。

b）平面型プラズマ源。

2. アレイ型プラズマ照射遺伝子導入マイクロシステムを用いた複数細胞への物質導入

遺伝子導入マイクロシステムの中で培養される細胞に対して、プラズマを利用して、細胞の内部への物質導入を試みた。20 秒のプラズマ照射を 10 秒のインターバルをおいて 2 回行い（合計照射時間：40 秒）、物質導入を行った。まず、一つのマイクロウェルに着目し、位相差顕微鏡と蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。図 5a に示すように、マイクロウェル内に存在する細胞の中に蛍光色素が導入されていることを確認した。続いて、22 mm 角の基板の中に分布する各マイクロウェルの中で培養される他の細胞についても評価を行った。図 5b に観察したマイクロウェルでの結果を示す。細胞の中に蛍光色素が導入されたことによる緑色の発光を確認した。以上の結果より、マイクロウェルで培養される複数の細胞に対して、同時に物質導入を行う基盤を確立したといえる。

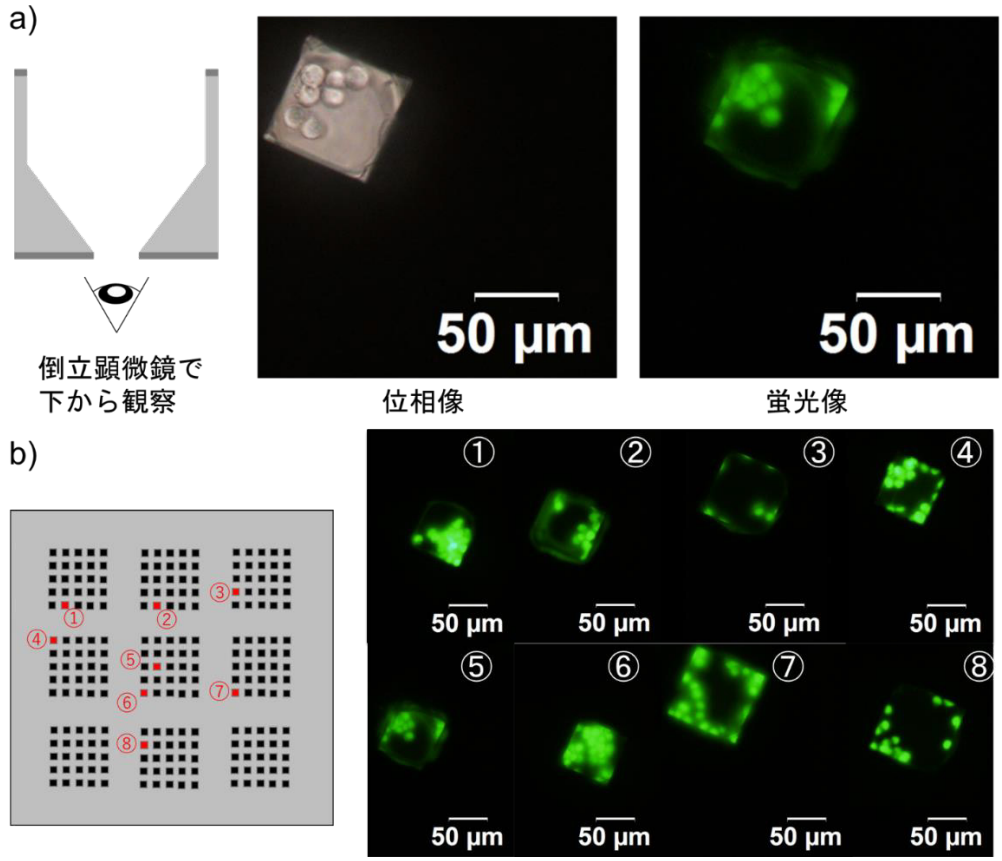


図 5. マイクロウェル内で培養する細胞への蛍光色素導入

a) プラズマを利用して蛍光色素を導入した細胞の位相差顕微鏡及び蛍光顕微鏡による観察像。

b) 複数のマイクロウェルに対する同時蛍光色素導入。マイクロウェルデバイスチップにおける代表的な点での観察を行ったところ、各マイクロウェルで、導入された蛍光色素に起因する緑色蛍光が確認された。

本研究では、大気圧プラズマを利用した細胞への遺伝子導入マイクロシステムを開発した。複数細胞への同時物質導入を行う基盤技術を構築した。この他にも、共同研究者の協力を得て、ヒト人工多能性幹細胞（hiPSC）へのプラズマ照射にも着手し、遺伝子発現のプラズマ照射による変化の解析を行っている［6, 7］。本研究で開発したマイクロデバイスの実験手法を hiPSC の研究に応用し、関連する分野を大きく発展させることを考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪医科薬科大学薬理学教室助教の小林未明博士、Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, Research Investigator の Kiichiro Tomoda 博士、産業技術総合研究所電子光基礎技術研究部門主任研究員、連携大学院千葉大学大学院医学研究院医療機器国際基準認証学講座教授の清水鉄司博士である。

文　献

1) Jinno M, Ikeda Y, Motomura H, Kido Y, Satoh S. Investigation of plasma induced electrical and chemical factors and their contribution processes to plasma gene transfection. Arch Biochem Biophys. 2016 Sep 1;605:59-66. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27136710 DOI: 10.1016/j.abb.2016.04.013.

2) Yanagawa Y, Kawano H, Kobayashi T, Miyahara H, Okino A, Mitsuhara I. Direct protein introduction into plant cells using a multi-gas plasma jet. PLoS One. 2017 Feb 9;12(2):e0171942. Epub 2017 Jan 27. PMID: 28182666 DOI: 10.1371/journal.pone.0171942.

3) Kumagai S, Chang CY, Jeong JH, Kobayashi M, Shimizu T, Sasaki S. Development of plasma-on-chip: Plasma treatment for individual cells cultured in media. Japanese Journal of Applied Physics. 2016 Jan; 55(1S):01AF01. Epub 2015 Oct 29. DOI: 10.7567/JJAP.55.01AF01

4) Okada T, Chang CY, Kobayashi M, Shimizu T, Sasaki M, Kumagai S. Plasma-on-chip device for stable irradiation of cells cultured in media with a low-temperature atmospheric pressure plasma. Arch Biochem Biophys. 2016 Sep 1;605:11-8. Epub 2016 Apr 5. PMID: 27059851 DOI: 10.1016/j.abb.2016.04.001.

5) 熊谷慎也，小林未明，友田紀一郎，清水鉄司，佐々木実．プラズマオンチップ．2021 年第 68 回応用物理学会春季学術講演会，19p-Z17-1，2021 年 3 月 19 日．

6) Kobayashi M, Tomoda K, Asahi M, Kumagai S. Low temperature plasma for controlling iPS cell differentiation. 72nd Annual Gaseous Electronics Conference (the GEC19 Meeting of The American Physical Society, 2019), MW1.00067 2019 Oct 30.

7) 小林未明，友田紀一郎，清水鉄司，朝日通雄，熊谷慎也．大気圧プラズマが iPS 細胞分化に与える影響の解析．2021 年第 68 回応用物理学会春季学術講演会，19p-Z17-2，2021 年 3 月 19 日．