

2022年9月13日

報道関係者各位

慶應義塾大学

実験時のプラスチック廃棄物を削減する持続可能な技術

—超音波で空中に浮かせた液滴内で効果的に細胞への遺伝子導入が可能に—

容器を使わずに化学および生物学実験を可能にする浮揚法は将来、革新的な実験手法となるだけでなく、研究現場におけるプラスチック廃棄物を大幅に削減する可能性があります。慶應義塾大学大学院理工学研究科の新井公大（博士課程3年）、同大学理工学部生命情報学科 佐藤智典教授、松原輝彦准教授の研究グループは、空气中に浮揚させた培養液中で、動物細胞への効果的な遺伝子導入が可能であることを示しました。細胞の懸濁液を超音波の定在波を使用して浮揚させたところ、プラスミドDNA（pDNA）の細胞への取り込みおよび導入遺伝子の発現効率が、試験管内で操作した場合よりも大幅に高いことを明らかにしました。遺伝子導入技術は、細胞工学において基幹となる技術の1つです。この技術は研究室のプラスチック廃棄物を削減するだけでなく、細胞工学分野における新たな実験手順を提供することが期待されます。

本研究成果は、2022年8月26日（GMT/グリニッジ標準時）にドイツの科学雑誌「*Advanced Science*」のオンライン版に掲載されました。

1. 本研究のポイント

- ・化学および生物系研究室におけるプラスチック廃棄物を削減する取り組みは進んでいない。
- ・音響浮揚現象（※1）を利用した本技術は、容器を使わずに空中で実験が可能である。
- ・培地を浮揚させ、pDNAを効果的に動物細胞に遺伝子導入（トランスフェクション）できる。
- ・今回のトランスフェクション条件は、pDNAや細胞に損傷がほとんどない。
- ・導入した遺伝子の細胞取り込みや発現効率は、試験管内よりも大幅に高い。
- ・エンドサイトーシス（※2）取り込み経路の統合が起こり、発現効率が向上した可能性がある。
- ・音響浮揚により細胞特性の変化を誘発することが明らかになり、細胞工学分野における革新的な実験条件となる可能性がある。

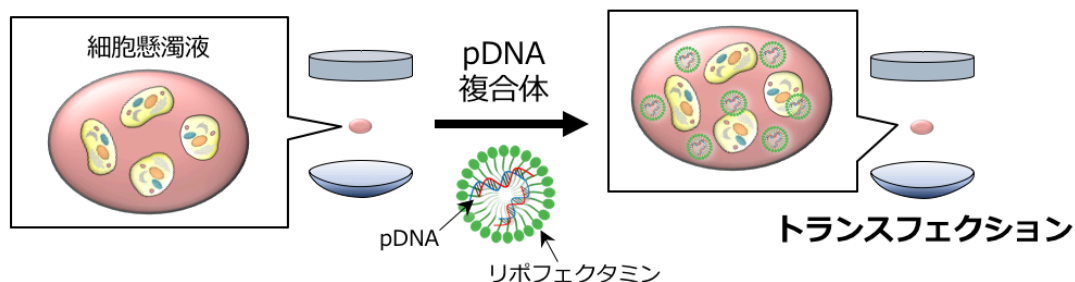


図1 超音波浮揚させた培地での細胞トランスフェクション。

2. 研究背景

ポリスチレンやポリプロピレンなどの高分子材料は反応容器などとして、化学および生物学研究で頻用されています。ピペットやチップ、チューブ、培養皿などは使い捨てであり、研究者1人あたりのプラスチック廃棄物は年間約数十 kg と推定されています。しかしこれら使い捨てプラスチックの廃棄物を削減する取り組みはほとんど進んでいません。

一方、音響浮揚は、気相と液相の両方で数ミリメートルサイズの物体を非接触で操作することが可能な技術です。物体を非接触で扱うことで、デリケートな化合物や生体サンプル、さらに微生物などを処理するのに有用です。この技術を用いれば容器を用いずに実験操作ができることから、研究室でのプラスチック廃棄物の削減に役立つと期待できます。

3. 研究内容・成果

動物細胞の取り扱いを空气中（気相）で行う研究はいくつかの例がありましたが、液滴の移動や細胞応答を検出するのみであり、10分以上浮かせた例はありませんでした。本研究では、超音波で浮揚させた液滴内に細胞を懸濁させ、長時間（4時間）浮揚させてトランスフェクションを行い、その遺伝子導入効果を調査しました（図1）。

しかしながら空气中で30分以上、細胞を含む培地を浮かせると水分が蒸発していきます。そこで浮揚させている液滴を Complementary Metal Oxide Semiconductor (CMOS) イメージセンサを備えた高速度カメラで撮影し、その体積をリアルタイムで監視しました。時間の経過によって減少した水分量を継続的に追加し、浮揚状態を維持させました。浮揚させた培地中のヒト肝細胞 Huh-7 の生存率は、静置した試験管を用いた場合と比較して80%を超えており、さらに細胞増殖に関しても浮揚の有無で有意差は認められませんでした。

pDNA とトランスフェクション試薬（リポフェクタミン）の複合体を作製し、浮揚させた Huh-7 細胞（ 8×10^4 個）と混合してトランスフェクションを4時間行いました。導入遺伝子の発現は、細胞を培養プレートに播種し、 37°C 、5% CO_2 下で約1日培養した後、ルシフェラーゼもしくは緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子の発現によって評価しました。

ルシフェラーゼ活性はトランスフェクション時間の延長とともに増加し、一般的なトランスフェクション時間（4時間）では、静置した細胞と比較して3倍以上の増加を示しました。pDNA の取り込み量をリアルタイム PCR を使用して同定したところ、試験管内で静置した細胞よりも3倍高く、導入効率の向上が発現活性に寄与していることが示されました。

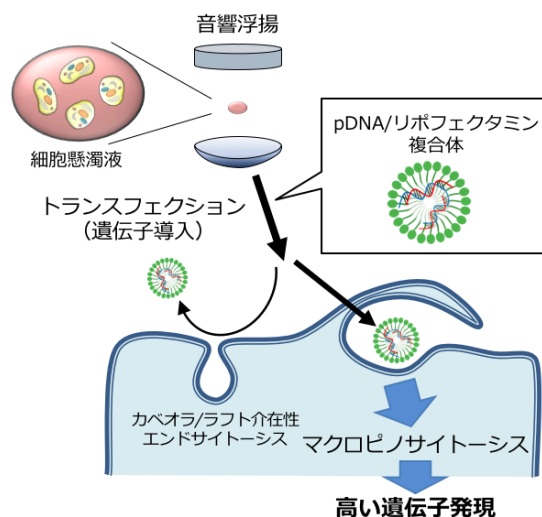


図2 浮揚液滴での効率的なトランスフェクションが可能であり、遺伝子導入効率の向上はエンドサイトーシス取り込み経路の統合によることが示唆された。

浮揚液滴内における導入遺伝子発現レベルは、低温（7℃）で大幅に減少したことから、トランスフェクション効率がエンドサイトーシスに依存することが示されました。エンドサイトーシス阻害剤で処理した結果より、浮揚によって細胞に取り込まれる pDNA がマクロピノサイトーシスに統合されることが示唆されました（図 2）。つまり、浮揚によってエンドサイトーシス経路が変更されることを意味しています。これらの結果は、超音波浮揚が効果的な遺伝子導入条件として利用可能であることを示しています。

4. 今後の展開

本研究では、超音波を用いた浮揚液滴での細胞トランスフェクション法を行いました。導入遺伝子の発現効率と細胞取り込みは、静置した試験管と比較して有意に高いことが示されました。予想外なことに超音波浮揚が細胞特性を変化させ、エンドサイトーシスの取り込み経路が統合されたことを示唆しました。

この研究は、浮揚させた培地での細胞への遺伝子導入が可能であり、標的とする細胞内で外来のタンパク質を発現できることを示唆しています。非接触で遺伝子導入を可能にする本手法は、細胞工学の分野で広く適用でき、プラスチックを使用しない細胞培養法や遺伝子発現システムを構築する際に有用な技術となることが期待できます。

※本研究は、科研費・挑戦的研究（萌芽）、（公財）村田学術振興財団、（公財）木原記念横浜生命科学振興財団 LIP、横浜トライアル助成金、（公財）立石科学技術振興財団、福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金などの助成や支援を受けて行われました。

<原論文情報>

タイトル（和訳）：Effective cell transfection in an ultrasonically levitated droplet for sustainable technology（持続可能な技術としての超音波浮揚させた液滴内での効果的な細胞トランスフェクション）

著者名：新井 公大、佐藤 智典、松原 輝彦

掲載誌：*Advanced Science* (DOI: 10.1002/advs.202203576)

<用語説明>

※1 超音波による音響浮揚

音響波（超音波もしくは音波）振動子を重力方向に沿って発生させ、振動子と反射板の間の距離を調整することで定在波を生成させる装置を用いる。定在波の複数の節に 10 μ L 程度の液滴を捕捉させることが可能。

※2 エンドサイトーシス

細胞外の物質を細胞が取り込む機構のことであり、マクロピノサイトーシス、クラスリンやカベオラ/ラフトが介在するエンドサイトーシスなどがある。取り込む物質の大きさや形状、受容体の有無などで、どの経路が使われるか異なる。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

・研究内容についてのお問い合わせ先

慶應義塾大学理工学部生命情報学科 准教授 松原 輝彦（まつばら てるひこ）

TEL : 045-566-1795 E-mail : matsubara@bio.keio.ac.jp

・本リリースの配信元

慶應義塾広報室（望月）

TEL：03-5427-1541 FAX：03-5441-7640

E-mail：m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>