

2021 年 9 月 10 日

早稲田大学

科学技術振興機構(JST)

理化学研究所

細胞用電動ナノ注射器「電気浸透流ナノポンプ」を開発

- 細胞治療に向けた新たな細胞内物質導入機器 -

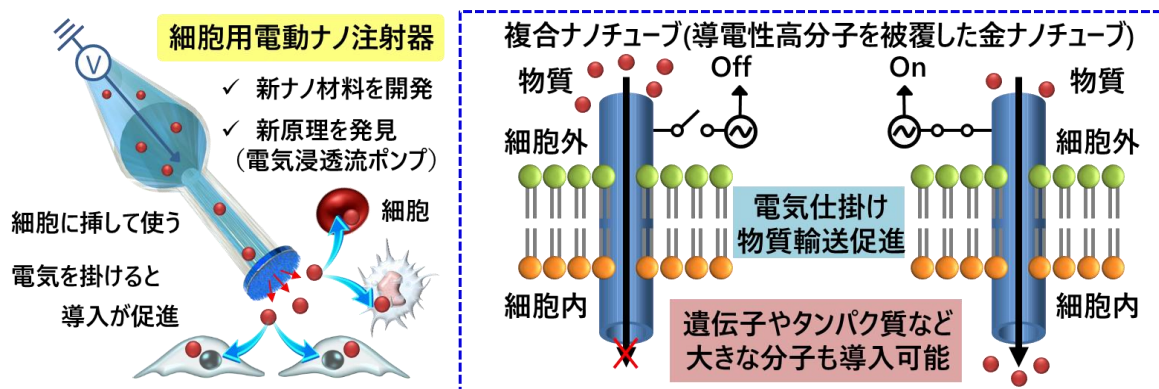
発表のポイント

- 導電性高分子と金属から成る複合ナノチューブシートを開発
- このシートに電気を掛けると物質輸送が 3 倍以上促進する電気浸透流ポンプ現象を発見
- タンパク質（GFP）を導入効率 84%、細胞生存率 98.5%で細胞内に導入可能となり、再生医療や細胞治療に役立つ医療機器としての活用が期待できる

早稲田大学大学院情報生産システム研究科の三宅 丈雄（みやけ たけお）教授らの研究グループと、理化学研究所生命機能科学研究センターの木川 隆則（きがわ たかのり）チームリーダーおよび美川 務（みかわ つとむ）専任研究員らの研究グループは、導電性高分子で被覆された金属製ナノチューブシートを開発し、電気を掛けることで電気浸透流^{※1}が発生し、細胞膜を通過する物質の輸送速度を促進させることを発見しました。さらにこの電気浸透流現象を利用することで、安全かつ効率良く細胞内に物質を導入できることを確認しました。本導入技術は、物理的にナノチューブを細胞に挿して利用するため、導入する物質の大きさ・形状・電荷を選ぶ必要がありません。そのため、さまざまな機能性物質を細胞内に導入することで新たな細胞の種を作り、再生医療や細胞治療に応用することが期待されます。

この研究は、科学研究費補助金、科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業さきがけ「電子・イオン制御型バイオイオントロニクス」（JPMJPR20B8）および研究成果展開事業 SCORE 大学推進型「高効率な細胞内物質導入スタンプおよび顕微鏡搭載システムの事業化検証」（JPMJST2053）による成果であり、2021 年 9 月 9 日（中央ヨーロッパ時間）に科学誌「Small Science」にオンライン版で公開されます。

論文名：High-Efficient and Dosage-Controllable Intracellular Cargo Delivery through Electrochemical Metal-Organic Hybrid Nanogates



細胞用電動ナノ注射器「複合ナノチューブ電気浸透流ポンプ」

（１）これまでの研究で分かっていたこと（科学的・歴史的な背景など）

細胞治療は、細胞を体外で加工・培養・評価した後に、ヒトなどに機能性細胞を移植することで疾病を治療する新しい医療です。その市場は、年々大きく拡大しており、それに伴いさまざまな新産業が創出されています。一般的な再生・細胞治療の工程として、自身の細胞を採取・搬送する工程①、届けられた細胞を加工・設計する工程②、設計された細胞を培養・増殖させる工程③、最後に、安全性や機能を評価する工程④に分けられます（図１）。現在、この各工程において、新しい要素技術や新製品の開発が進んでいます。

再生・細胞治療における市場と関連産業

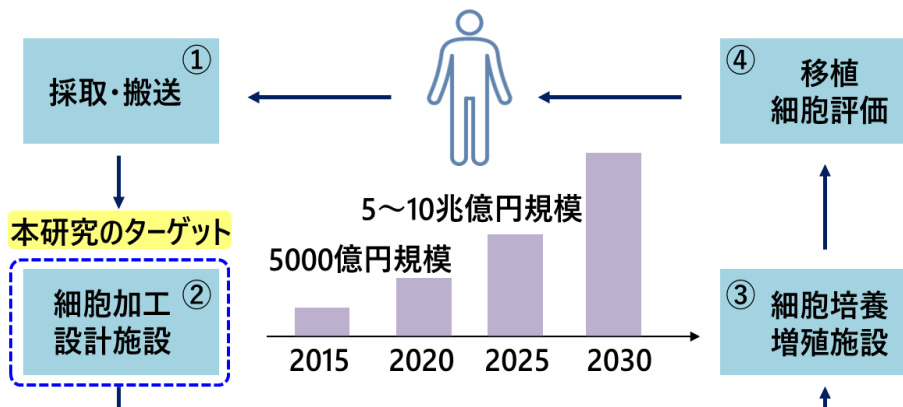


図１．細胞治療における市場と関連産業

このような背景の中、我々の研究グループは、工程②における細胞加工・設計に関する技術開発を中心に取り組んでいます。工程②では細胞内に外来性物質を導入し、細胞内機能（プログラミング）を改変することで機能性細胞を設計することが主な目的です。しかし、細胞膜はそもそも物質の出入りを選択するため、細胞内に物質を届けることが困難です。これまでの手法としては、化学/生物的手法（ウィルスベクター法）と物理的手法（エレクトロポレーション法）が利用されていました。遺伝物質を、ウィルスを用いて細胞に送るウィルスベクター法に関しては、ベクターの調整などに時間と手間が生じ、また、細胞膜への取り込みが、細胞が外界から物質を取り込む作用であるエンドサイトーシス^{※2}経路となるため時間がかかり、かつ、導入できる物質や導入効率などに課題が残ります。一方の物理的手法では、電気を掛けることで細胞に短期的な穴を開け、その生じた微小孔を介して細胞内に物質を届けるエレクトロポレーション法がよく利用されます。比較的大きな分子サイズや異なる電荷を有する物質を細胞内に導入できる点で優れていますが、印加する電圧が数ボルト以上必要であるため、死細胞の数が多く、また、意図しない電気シグナルが細胞に伝わるという課題を抱えていました。こうした課題を解決するため、中空管のマイクロ/ナノニードルを細胞に挿入することで、目的の物質を細胞内に導入するナノ注射器に関する取り組みが盛んですが、開発が進むナノ注射器は単針であり、かつ、マイクロサイズの細胞に単針を挿入するマニピレータが必要であるため、主に1細胞毎に導入する必要がありました。

そこで、我々の研究グループは、ナノチューブを配列した薄膜（シート）を開発し、本ナノチューブを細胞に挿入することで短時間かつ高効率に物質を細胞に届けるナノ注射器を開発してきました（図２）。これまでに、低分子から高分子までを細胞内に導入することに成功してきましたが、今回、新たな素材（導電性高分子）を金属製ナノチューブに被覆することで、細胞生存率が飛躍的に改善されること、さらに膜電位以下の微小電圧で物質を効率良く細胞内に届ける新原理（電気浸透流ポンプ）を発見しましたので、その詳細を（２）以降で説明します。特に、これまで細胞内に届けることが困難であったタンパク質や抗体などの高分子を効率良く届ける技術として期待できます（表１）。

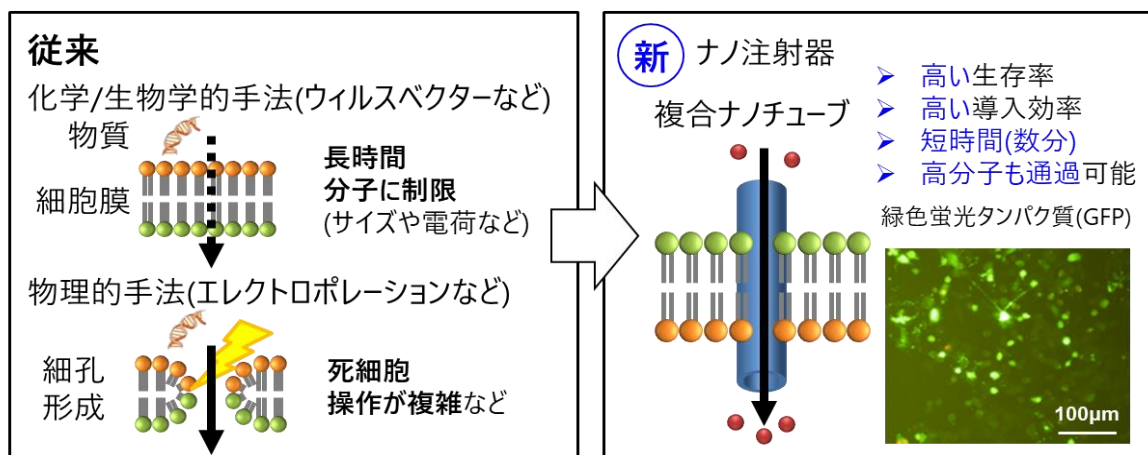


図2. 従来法の課題と新提案技術の概要とその特徴

長所		化学/生物学的	物理的	本技術
細胞内導入	時間	長時間	短時間	短時間
	物質種類	制限	任意	任意
	操作	簡便	複雑	簡便
	生死細胞	生細胞 多数	死細胞 多数	生細胞 多数
	電圧	主になし	高電圧	なし or 低電圧

表1. 既存の物質導入技術と本手法の特徴

(2) 今回の研究で新たに実現しようとしたこと、明らかになったこと

三宅研究グループでは、これまで金属製のナノチューブを開発し、細胞内に物質を導入する技術を開発してきましたが、今回、金属製ナノチューブに導電性高分子を被覆することでイオンの流れを電気で制御することに成功しました。これまでの金属製ナノチューブでは、正負の電圧を膜に印加すると、プラスとマイナスのイオン電流を計測することができました。これは、イオンが双方向にナノチューブ膜を通過できることを意味します。一方、複合ナノチューブでは、正の電圧を印加した時のみイオンが流れる整流特性（イオニックダイオード）が確認できました。このダイオード特性は、印加電圧がわずか $\pm 100\text{mV}$ の範囲で生じます（図3）。これは、複合ナノチューブの出入口（上面と下面）が非対称なナノ構造体でできていること、かつ、その表面が帯電しているからだということが分かりました。

さらに、複合ナノチューブを細胞に挿入するために、図4に示すようなスタンプシステムを構築し、HeLa細胞^{※3}を用いて生存率を確認しました。従来の金属製ナノチューブを細胞に挿入すると、5分で約93%の生存率まで減少し、30分後にはわずか1%となります。一方、今回開発した複合ナノチューブを用いた場合、30分間挿入し続けても、生存率は約95%という高い値を維持しました。これは、細胞からナノチューブに流れ込む物質の拡散を抑制できたことが主な要因と考えています。

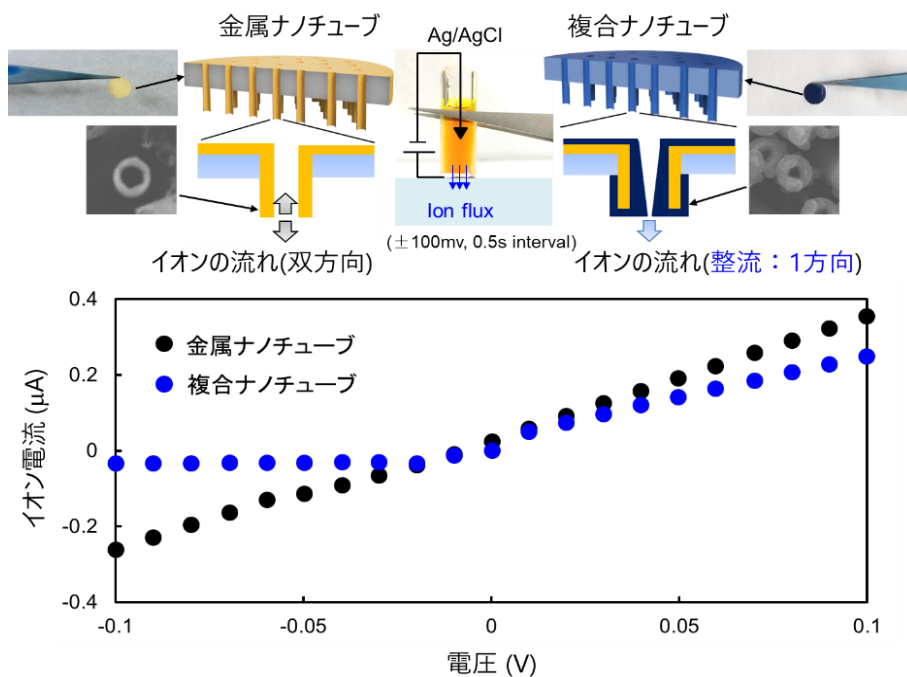


図3. 複合ナノチューブにおけるイオン電流（整流特性）

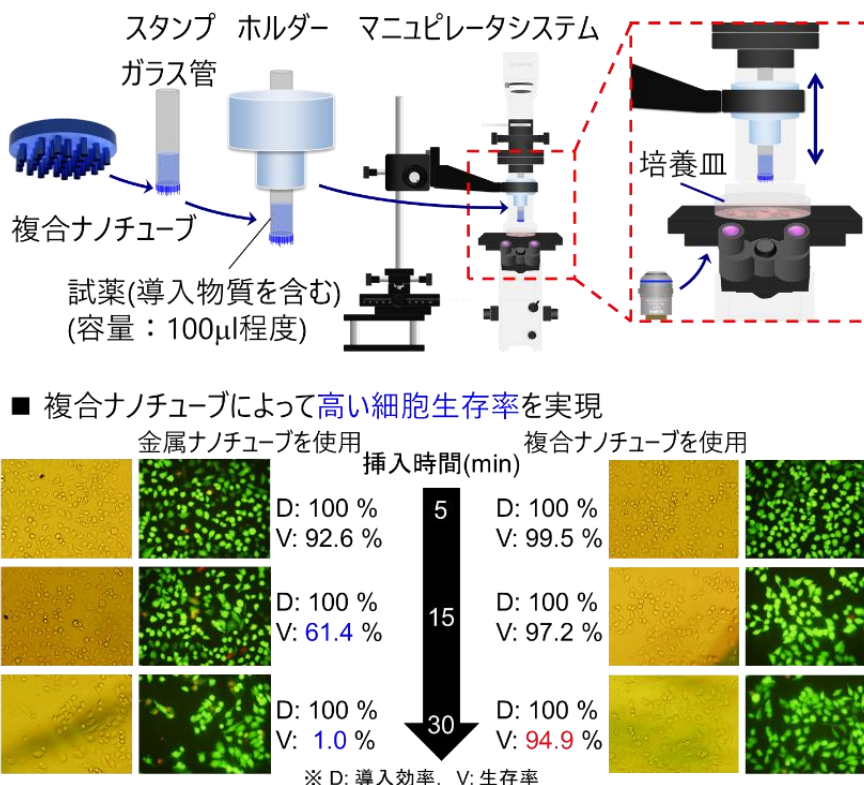


図4. ナノチューブの細胞内挿入と生存率

最後に、開発した複合ナノチューブを用いて、カルセイン低分子と GFP タンパク質を HeLa 細胞に、DNA プラスミドを NIH3T3 細胞^{※4} に導入した結果を示します（図5）。いずれの結果も±50mV の電気を印加すると、物質の導入効率が促進することが確認できました。カルセイン低分子においては、導入効率 99%、細胞生存率 96.8%を実現し、GFP タンパク質においては、導入効率 84%、細胞生存率 98.5%を実現しました。DNA プラスミドに関しては、約 10%のトランスフェクション率^{※5}を実現しました。

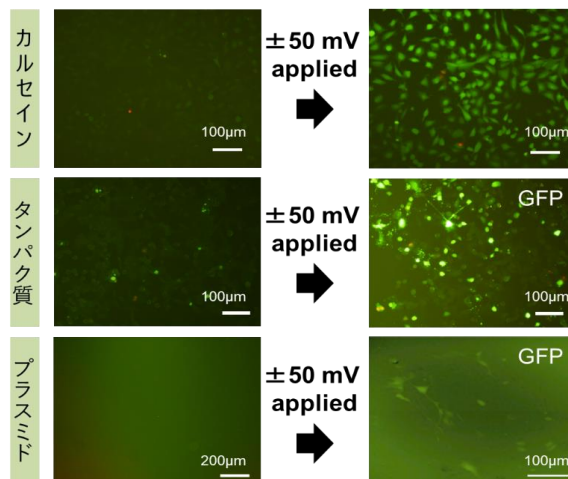
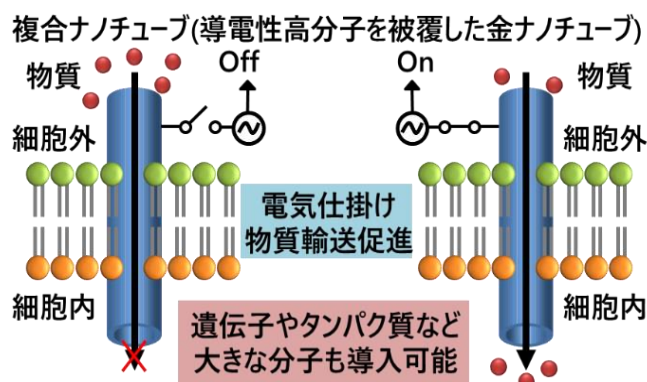


図5. 高分子などの細胞内導入

(3) 研究の波及効果や社会的影響

今回、我々の研究グループは、細胞との適合性が高い新ナノ材料（複合ナノチューブ）を開発し、このナノチューブを通して物質を細胞に届ける物質導入法を実現しました。これは、従来技術では導入が困難、あるいは、不可能とされた物質（正電荷、高分子、微粒子、小器官など）を細胞に届けることが可能となり、ひいては、細胞治療に必要な細胞種を任意に加工・設計可能なツールを提供できると考えています。

(4) 今後の展開

再生医療や細胞治療の現場で利用いただけるよう、本技術を改良していきたいと考えています。特に、医療現場で利用されている細胞に対して、新規物質を導入し、新しい製薬（細胞注入液）を開発することが期待できます。

(5) 研究者のコメント

今後は、さまざまな機能性高分子を細胞内に導入し、細胞の機能制御や新しい細胞種の開発に取り組みたいと考えています。また、接着性細胞のみならず、浮遊性細胞にも物質を導入する技術開発にも興味があるため、本プロジェクトにご興味のある企業や研究機関からの問い合わせをお待ちしています。

(6) 用語解説

- ※1 電気浸透流：電圧を印加することで液体の流れを誘発する現象。液体と固体が接している界面で起きる現象であり、特にナノスケールの微小な構造体で生じやすい。
- ※2 エンドサイトーシス：細胞内へ物質を取り込む現象。物質と細胞膜が相互作用を引き起こし、膜の形態変化によって取り込まれる。
- ※3 HeLa 細胞：ヒト由来のがん細胞。一般的な培養細胞として、基礎研究で広く利用されている。
- ※4 NIH3T3 細胞：マウス胎児由来の皮膚細胞。一般的な培養細胞として、基礎研究で広く利用されている。
- ※5 トランスフェクション率：核酸を細胞内へ導入し、目的の物質を発現させた割合。



(7) 研究助成

科学研究費補助金基盤研究 B

科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 さきがけ「電子・イオン制御型バイオイオントロンクス」(JPMJPR20B8)

科学技術振興機構 (JST) 研究成果展開事業 SCORE 大学推進型「高効率な細胞内物質導入スタンプおよび顕微鏡搭載システムの事業化検証」(JPMJST2053)

(8) 論文情報

雑誌名 : Small Science

論文名 : High-Efficient and Dosage-Controllable Intracellular Cargo Delivery through Electrochemical Metal-Organic Hybrid Nanogates

執筆者名 (所属機関名) : Bowen Zhang(1) [#], Dinuo Zheng(1), Shi Yiming(1), Kazuhiro Oyama(1), Masahiro Ito(2), Masaomi Ikari(2), Takanori Kigawa(2), Tsutomu Mikawa(2), Takeo Miyake(1,3) *

所属機関名 :

1 : 早稲田大学 理工学術院

2 : 理化学研究所

3 : JST さきがけ

[#] 筆頭著者、*責任著者

掲載日 (中央ヨーロッパ時間) : 2021 年 9 月 9 日 (木)

DOI : 10.1002/smssc.202100069

【研究内容に関するお問い合わせ先】

早稲田大学 理工学術院 大学院情報生産システム研究科 教授 三宅 丈雄

Tel: 093-692-5158 E-mail: miyake[at]waseda.jp

理化学研究所 生命機能科学研究センター 細胞構造生物学研究チーム 専任研究員 美川 務

E-mail: mikawa[at]riken.jp

【発信元】

早稲田大学広報室広報課

Tel: 03-3202-5454 E-mail: koho[at]list.waseda.jp

科学技術振興機構広報課

Tel: 03-5214-8404 E-mail: jstkoho[at]jst.go.jp

理化学研究所広報室 報道担当

E-mail: ex-press[at]riken.jp

【JST 事業に関すること】

科学技術振興機構戦略研究推進部グリーンイノベーショングループ 嶋林ゆう子

Tel: 03-3512-3526

E-mail: presto[at]jst.go.jp