



Mechanoporation of living cells for delivery of macromolecules using nanoneedle array

ナノニードルアレイを用いたメカノポレーションによる生細胞への分子導入

(JBB, Vol. 122, No. 6, 748–752, 2016)

松本 大亮¹・山岸 彩奈²・齋藤 恵¹・Ramachandra Rao Sathuluri²
Yaron R. Silberberg²・岩田 太³・小林 健⁴・中村 史^{1,2*}

CRISPR/Casなどの人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集技術は近年目覚ましい発展を遂げてきているが、ゲノム上の目的外の遺伝子を切断するオフターゲット効果が依然として問題となっている。プラスミドDNAなどによって人工ヌクレアーゼを発現させる場合には発現の量と時間を制御できないことがオフターゲット効果の原因であると考えられており、その解決法として人工ヌクレアーゼを直接導入する手法が試みられている。リポフェクションなどのエンドサイトーシスを経由する手法ではエンドソームからの脱出効率が問題となり、エレクトロポレーションなどの細胞膜を穿孔する手法はそのダメージが問題となる。本研究では、独自に開発したナノニードルアレイを用いて細胞膜の機械的穿孔を行い、物質を導入する手法を開発した。

筆者らは直径200 nmにAFM探針を加工したナノニードルを用いた細胞操作技術を開発してきたが、ナノニードルを挿入した孔から細胞外の物質はまったく侵入しないことが分かっているので、物質導入には特別な穿孔操作が必要である。単一のナノニードルでは多数の細胞を取り扱えないため、ナノニードルアレイを利用した、4インチウエハを原材料とし、ICPドライエッチングにより数十ミクロンの深掘りを行い、直径2 μm程度のマイクロピラーアレイを作製する。これに対して10時間程度の湿式熱酸化によりSiO₂層を形成させ、最後にフッ酸によりSiO₂層を除去することによってナノニードルアレイを得る。ナノニードルアレイの作製に着手した当初は、根本が細くなり野球のバットのような形状のものばかりができた。およそ1年をかけ細かな条件を整えることによって、直径200 nm、長さ40 μmを超える高アスペクト比で美しいナノニードルアレイを作製できるよ

うになった¹⁾。最後にナノニードルアレイはレーザーステルスダイサーにより5 mm角に裁断して使用する。

アレイはフォトマスクのデザインによって任意の位置に配置できる。本研究では3 mm角内に格子状に30 μm間隔でナノニードルが約1万本配列したものを使用した。通常の顕微鏡レンズで観察すると、ナノニードルの根本付近のテーパー状の構造が直径15 μmの影として観察され、ニードルは見えない。培養ディッシュに対して、ナノニードルアレイを接触するまで接近させ、さらに押し込むとナノニードルは座屈し、前述の円形の影からニードルの先端が一斉に顔を出す。筆者らはニードルの中心から先端までの長さを座屈半径と定義し、押し込み深さの指標としている。大きく押し込まない限りナノニードルが折れることはなく繰り返し操作することができる。筆者らはナノニードルが座屈するとともに横方向にスライドする現象を利用し、細胞膜を穿孔することを着想した。ナノニードルアレイを動作する装置は自作であり、およそ5 kHzの高周波上下振動が可能である。種々の条件を検討した結果、マウス繊維芽細胞NIH3T3に対して、ナノニードルを座屈半径7 μmで押し付けた状態で、0.25 μmの振幅で60 s加振した時にもっともFITCデキストラン(70 kDa)の導入効率がよく(45%)、死細胞も少ないことが明らかとなった。本論文以降の研究により、ジンクフィンガーヌクレアーゼを直接導入し、従来法よりも高いゲノム編集を得ることに成功しており、高効率で安全なゲノム編集技術に応用できると期待している。

1) Matsumoto, D. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 15325 (2016).

* 著者紹介 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門(研究グループ長) E-mail: chikashi-nakamura@aist.go.jp

¹東京農工大学大学院工学府, ²産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門,

³静岡大学大学院総合科学技術研究科, ⁴産業技術総合研究所集積マイクロシステム研究センター