

博士学位論文要約（令和4年3月）

液中プラズマを活用した高品質遺伝子導入法の開発

本田 竜介

指導教員：金子 俊郎， 研究指導教員：佐々木 渉太

Development of High-Quality Transfection Method
Using Discharge in Liquid

Ryosuke HONDA

Supervisor: Toshiro KANEKO, Research Advisor: Shota SASAKI

In this study, experiments on the development of new methods for gene/drug transfer into living cells using discharge in liquid (plasma in liquid) have been conducted. Some types of treatment methods were developed and used. In case of drug-simulated molecule transfection, highly efficiency molecule transfection in local area was demonstrated by direct plasma treatment. As the candidates for transfection factor, mechanical stimuli (shockwave or flow in solution) in direct plasma treatment and reactive oxygen species (OH radical or O_2^- radical) in indirect treatment were likely to be key factors, and transfection could be caused by the cell response mediated by channels on cell membrane. In case of gene transfection, the treatment that combined plasma and pulsed electric field was used. By the treatment, we achieved plasmid DNA transfection efficiency of 70% over on adherent cell line (MCF-7 cells) or 20% over on floating cell line (Jurkat cells and HEV cells), and cell viability had remained above 50%, respectively.

1. 序論

生細胞内に薬剤分子や遺伝子といった細胞外分子を導入する分子導入技術は、がん治療や遺伝子治療、iPS細胞作製に必須の技術であり、近年重要性を増してきている。これまでに様々な従来法が開発・実用化されてきたが、どの手法も克服の難しい課題を抱えている現状がある。ウイルスの細胞内へ侵入する特性(ウイルス感染)を活用したウイルスベクター法は、高い導入効率を有する一方で、ウイルス侵入による細胞のがん化といった危険性を有している。リポフェクション試薬の添加により遺伝子とのカチオン性リポソームを形成させて、細胞内への取り込みを誘起するリポフェクション法は、対象細胞種によっては高効率導入を達成できるが、浮遊細胞系への導入が困難であるという適用細胞種の制限や試薬が高価であるという点に課題を持っている。また現在広く使用されている手法としてエレクトロポレーション法(EP法)があげられ、この手法では溶液中の細胞に対して電気パルスを加えることで細胞膜に一時的に小孔を形成し、細胞外分子を流入させる方法として知られている。適用細胞種を問わず、高い導入効率を有しているが、細胞生存率が50%程度以下まで低下するといった細胞への深刻なダメージが欠点としてあげられる。

このような状況に対して、近年プラズマを活用した分子導入手法が盛んに研究され注目を集めてきて

いる。当研究グループの先行研究ではヘリウムガス流を利用した気相プラズマを生成し、これを培養細胞に照射することで局所領域中の細胞への高効率・高細胞生存率を両立した薬剤模擬分子の導入を実証している(気相プラズマ法)[1,2]。一方で気相プラズマ法では液深くに存在する細胞に対する導入効果が小さく、また遺伝子導入は困難であるという課題があった。そこで本研究では液中プラズマの活用を着想した。液中プラズマはガス流などを用いることなく液相中のいたるところで生成可能であり、プラズマ生成由来の刺激を液相中の細胞に供給することで分子導入を誘起することが期待できる。当グループの先行研究では、生理食塩水といった高導電性溶液中で微小なプラズマ放電(液中プラズマ)を生成し、培養細胞へ照射することで、細胞内薬剤模擬分子導入が誘起されることを報告している。一方で、薬剤分子の局所導入実証や導入メカニズムの解明には至っていない。また、液中プラズマによる遺伝子の導入については実証されておらず、液中プラズマによる分子導入法の実用化に向けては、これらが課題として存在する。

本研究では、この液中プラズマを活用することにより、幅広い細胞種に対して高い生存率を保ったまま高効率で薬剤分子・遺伝子を導入する(高品質導入)新規手法の開発・実用化を最終目標とした、薬剤模

擬分子・遺伝子高効率導入条件探索と、分子導入作用機序探索に関する研究を行った。

2. 実験装置・導入物質・対象細胞

本研究での実験装置、導入物質、対象細胞について説明する。生理食塩水や細胞培養液といった高導電性(〜13 mS/cm)の溶液中に配置された針型タンゲステン電極に対して、自作パルス電源を用いて高電圧パルス(充電電圧:1.0〜1.5 kV, パルス幅:100 μ s, 印加周波数:1 Hz)を印加し、液中プラズマを生成した。化学エッチングにより針型電極の先端曲率半径を 200 μ m 程度に制御することで液中プラズマの安定生成を可能にした[3]。薬剤分子導入条件探索では薬剤模擬蛍光物質 YOYO-1 を、遺伝子導入条件探索では緑色蛍光たんぱく質(GFP)を発現するようにコードされたプラスミド遺伝子 pAc-GFP1c1 をそれぞれ導入物質として用いて実験を行った。導入対象の細胞として、YOYO-1 導入実験ではマウス繊維芽細胞(3T3-L1)を、プラスミド遺伝子導入実験ではヒト乳がん細胞(MCF-7)、ヒト急性 T 細胞性白血病細胞由来細胞(Jurkat)および日本人由来不死化 B 細胞(HEV0036)を使用した。

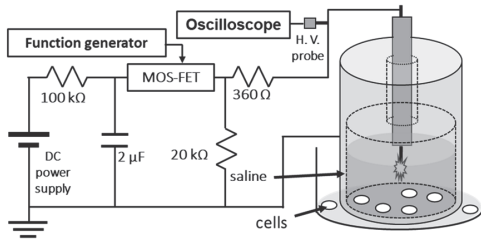


図1. 本研究で使用する液中プラズマ生成装置概略図。

3. 実験方法・原理

YOYO-1 導入実験では液中プラズマ直接照射法(DPI)と間接照射法(IPI)の 2 種類の照射法を用いて実験を進めた。DPI では培養細胞の周りを YOYO-1/生理食塩水混合溶液で満たし、その中で生成した液中プラズマを直接的に細胞に照射した。対して IPI では、プラズマ照射 YOYO-1/生理食塩水混合溶液を一定の時間保持した後に細胞に滴下した。DPI, IPI いずれにおいても処理した細胞を 30 分間培養後、蛍光顕微鏡を用いて細胞内 YOYO-1 蛍光を観察・撮影し、蛍光面積を導入量として解析・評価した。

プラスミド遺伝子導入では液中プラズマ照射処理に加えて、短パルス電場(パルス幅:< 10 μ s, 印加周波数:1 kHz, 両極性)を印加する短パルス電場処理、さらに液中プラズマと短パルス電場を重畳して印加処理する複合処理を行った。いずれの処理でも処理後 24–48 時間細胞を培養し、培養後の細胞内 GFP 蛍光を、蛍光顕微鏡を用いた観察、またはフローサイトメトリーを用いた測定・解析によって、プラスミド遺

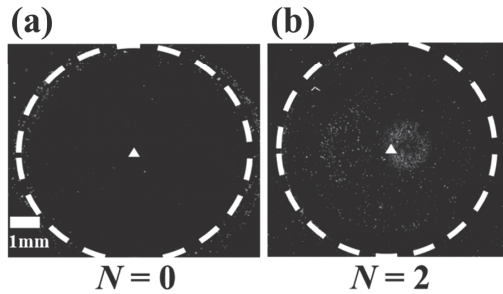


図2. 液中プラズマ DPI 処理後の細胞蛍光図。(a)未処理、(b)放電回数2回。白色細胞: YOYO-1 導入細胞。図中 Δ : 高電圧電極直下位置。

伝子導入を評価した。

4. 液中プラズマ照射による薬剤模擬分子導入

液中プラズマ照射による、培養細胞内への薬剤模擬分子(YOYO-1)導入の高効率導入条件探索、および導入機序解明に関する実験結果について記述する。はじめに照射条件探索によって DPI, IPI の両処理方法ごとの YOYO-1 高効率導入条件を発見した。DPI では放電回数を 2 回に設定した条件下で、液中プラズマ照射部直下領域で直径 1.5 mm 程度の高効率 YOYO-1 導入が観察された(図2)[4]。一方、IPI では放電回数 100 回程度に高効率導入の最適値を発見し、DPI と IPI では高効率 YOYO-1 導入を誘起する最適照射回数が大きく異なることを明らかにした。

次に IPI での YOYO-1 導入因子探索を目的に、照射溶液に活性種阻害剤や細胞活動阻害剤を添加する実験を行ったところ、短寿命活性種阻害剤(D-mannitol, superoxide dismutase ; SOD)の添加で YOYO-1 導入が大きく抑制されたため、OH ラジカルや O₂ ラジカルといった液中プラズマ照射由来短寿命活性種が主要な導入因子である可能性を明らかにした。また細胞膜上ルテニウムレッド(RR)感受チャネル阻害剤である RR の添加でも導入が抑制され

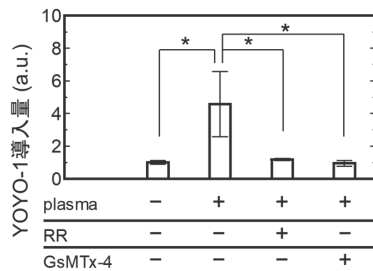


図3. 液中プラズマ DPI 処理による YOYO-1 導入に対する各種細胞活動阻害剤添加の効果。RR : Ca²⁺チャネル阻害剤, GsMTx-4 : PIEZO1 チャネル阻害剤。

たことから、細胞膜上 RR 感受チャネルが導入に関与する可能性が高いことが明らかとなった。

同様に DPI での導入因子探索を行ったところ、活性種阻害剤添加による導入抑制効果は見られなかった一方で、RR 添加では YOYO-1 導入抑制が生じるという結果が得られた。DPI では活性種以外の刺激が主要導入因子の可能性が高く、また DPI においても YOYO-1 導入には RR 感受チャネルが関与している可能性が示唆された。そこで RR 感受チャネルの中でも機械刺激感受チャネルとして知られる PIEZO1 チャネルを特異的に阻害する阻害剤 GsMTx-4 を添加した実験を行ったところ、GsMTx-4 の添加で YOYO-1 導入が大きく抑制されるという結果が得られ(図 3)、衝撃波や液流といった液中プラズマ照射由来機械刺激が DPI での主要導入因子である可能性が高いことが明らかとなった。

5. 液中プラズマを活用したプラスミド遺伝子導入

液中プラズマを活用した培養細胞内遺伝子導入の新規導入手法開発に関する研究結果について述べる。

YOYO-1 導入実験において高効率導入を誘起した直接照射条件を用いてプラスミド遺伝子導入を試みたが、プラスミド遺伝子導入は生じなかった。そこで、始めに液中プラズマ処理条件の改善を行った。接着状態の MCF-7 細胞に対する DPI ではプラスミド遺伝子導入が生じなかったことから、細胞を酵素処理により溶液中に剥離・懸濁させ、さらに細胞/プラスミド濃度を高めた濃縮状態の懸濁液へ液中プラズマを照射するという処理条件の改良を行った。この改良の結果、液中プラズマ照射によるプラスミド遺伝子導入の実証に成功したが、導入効率 (η) は 10%以下の低い値であることが分かった。次に細胞/プラスミド濃縮液に対して液中プラズマとは独立に短パルス電場印加処理を行い、短パルス電場印加処理単体でのプラスミド遺伝子導入実証と処理時間の最適化(最適処理時間 ~10 秒)に成功した。一方で短パルス電場印加処理単体での高効率導入も困難であることが新たに明らかとなったため、液中プラズマ照射と短パルス電場印加を複合させて処理を行う複合処理を新たに着想した。それぞれの単体処理の最適導入条件を組み合わせた複合処理を実行したところ、単体での導入効率を上回るプラスミド遺伝子の高効率導入(導入効率 70%以上)の実現に成功した。さらに細胞代謝能測定から細胞生存率を算出し、高導入効率を達成した複合処理条件においても細胞生存率が 60%をこえることを明らかにした。これらの結果から、高導入効率と高細胞生存率を両立

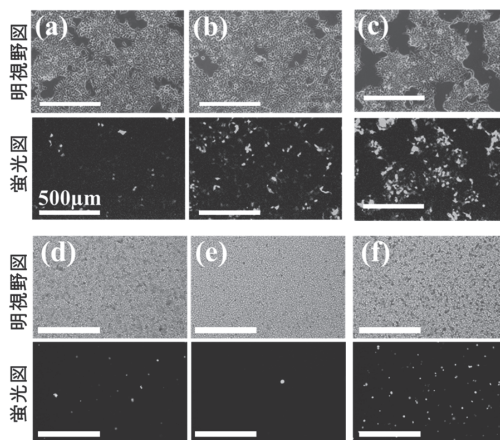


図 4. (a,b,c)MCF-7 細胞, (d,e,f)Jurkat 細胞における, (a,d)液中プラズマ照射処理, (b,e)短パルス電場印加処理, (c,f)複合処理後 24 時間後の細胞明視野図と蛍光図。

した高品質導入が複合処理により達成できる可能性が示された。

接着細胞である MCF-7 細胞で高品質導入の可能性が示されたため、次に従来法では遺伝子導入が困難とされてきた浮遊細胞 (Jurkat 細胞, HEV 細胞) に対して、開発した複合処理でのプラスミド遺伝子高効率導入を試みた。プラスミド遺伝子濃度, 短パルス電場印加条件を浮遊細胞系に対して最適化した複合処理を行ったところ, Jurkat 細胞で導入効率 20% (図 4(d,e,f)), HEV 細胞で導入効率 30%程度の高い導入効率を達成し, 開発した複合処理の幅広い細胞種(接着細胞, 浮遊細胞)への適用可能性を示すことに成功した。さらに Jurkat 細胞での細胞代謝能測定結果から, 細胞生存率が 60%程度を維持していることが明らかとなったため, 浮遊細胞系においても高品質導入が達成しうる可能性を示した。

開発した複合処理による細胞内プラスミド遺伝子導入の作用機序探索を MCF-7 細胞について行った。はじめに細胞膜上に形成された小孔からの導入の検証を目的として, プラスミド遺伝子の代わりに導入物質に YOYO-1 分子を用いて単体処理および複合処理を行い, 導入の傾向を観察した。実験時には液温を 4℃に固定し, エンドサイトーシスといった細胞の能動輸送経路を抑制した条件で実験を進めた。液中プラズマ単体, 短パルス電場印加単体, 複合処理では未処理と比較して YOYO-1 導入の増加を確認したが, どの処理の導入量とも同程度であり, プラスミド遺伝子導入時の導入効率の傾向(液中プラズマ単体 < 短パ

ルス電場印加単体 < 複合処理) が観測できなかった。この結果から細胞膜上に形成された小孔由来のプラスミド遺伝子導入が主要導入経路の可能性は低いと考察した。そこで次に複合処理による細胞膜またはプラスミド遺伝子の帯電による細胞膜/プラスミド遺伝子の電気的接着とその後の取り込み応答促進による導入の可能性を検証するために、複合処理後の細胞にプラスミド遺伝子を添加する実験および、複合処理を行ったプラスミド遺伝子を細胞に対して滴下する実験を行った。処理後の細胞へのプラスミド遺伝子添加や処理後プラスミド遺伝子の細胞への滴下では導入が生じなかったため細胞膜/プラスミド遺伝子の帯電と接着が導入機序である可能性が低いことが明らかとなった。

そこで新たな導入作用機序として、複合処理によって細胞膜とプラスミド遺伝子の複合体が形成され、これが導入に寄与している可能性[5]を考察した。また複合体形成については、以下の4つの状態を取っている可能性があると考えた。①細胞膜外ミセル状複合体、②細胞膜外複合体、③細胞膜内複合体、④細胞膜内ミセル状複合体。そこで考察した4つの複合体に対して、どの状態が導入に関与するのか検証実験を行った。複合処理を行った細胞/プラスミド遺伝子懸濁液を遠心分離し「①細胞膜外ミセル状複合体」が除去される条件で細胞を処理した場合でも、遠心分離の有無によるプラスミド遺伝子導入効率に変化が見られなかった結果から、①の複合体が導入に関与している可能性が低いことが明らかとなった。さらに、細胞/プラスミド遺伝子懸濁液に対して複合処理後5秒以内にDNA分解酵素(DNase)を添加し②細胞膜外複合体を分解・除去する実験を行ったが、DNase添加の有無で導入効率に変化が見られなかった結果が得られた。複合処理前にDNaseを添加した場合導入効率が1%程度まで低下することは既に確認しているため、この結果から②の複合体が導入に関与する可能性が低いことを明らかとした(図5)。またこの実験から、処理中または処理後数秒以内にDNaseが作用できない形の複合体が速やかに形成されている可能性が高いことが示唆された。上記の結果・考察から、③細胞膜内複合体及び④細胞膜内ミセル状複合体が導入に寄与している可能性を考察している。

結論

液中プラズマを活用した、薬剤分子・遺伝子高品質導入の新規手法開発を目的に研究を行った。

薬剤分子導入に向けた実験では、液中プラズマ直接照射と間接照射での最適導入条件を発見し

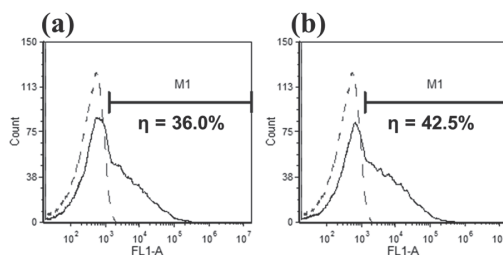


図5. 複合処理24時間後のフローサイトメトリ解析図。(a) 複合処理、(b) 複合処理後DNase添加。点線：未処理、実線：複合処理サンプル。

た。特に直接照射では照射条件の最適化によって、局所領域高効率導入の実証に成功した。また薬剤模擬分子の導入作用機序として、直接照射では衝撃波や液流といった機械刺激が、間接照射では短寿命活性種が主要導入因子であり、これら刺激が細胞に作用したことによる細胞応答によって、分子取り込み応答が誘起され薬剤模擬分子が導入されている可能性が高いことを明らかにした。

遺伝子導入に向けた実験では、液中プラズマ照射条件の検討・改善を行うことで、プラズマ照射処理単体でのプラスミド遺伝子導入の実証に成功した。さらに液中プラズマ照射に加えて短パルス電場印加を重畳するという複合処理を新たに着想し、実行したところ、接着細胞、浮遊細胞の両方においてプラスミド遺伝子高品質導入が達成できうる可能性を示した。特に接着細胞系に対する複合処理によって、プラスミド遺伝子導入効率70%以上という高い導入効率を達成した。また導入機序として、複合処理によって形成された細胞膜とプラスミド遺伝子の複合体が導入に関与している可能性を示すに至った。

参考文献

- 1) S. Sasaki, M. Kanzaki, and T. Kaneko, Appl. Phys. Express 7, 26202 (2014).
- 2) S. Sasaki, R. Honda, Y. Hokari, K. Takashima, M. Kanzaki, and T. Kaneko, J. Phys. D: Appl. Phys. 49, 334002 (2016).
- 3) R. Honda, S. Sasaki, K. Takashima, T. Sato, and T. Kaneko, Jpn. J. Appl. Phys. 58, 106002 (2019).
- 4) R. Honda, S. Sasaki, K. Takashima, M. Kanzaki, T. Sato, and T. Kaneko, Jpn. J. Appl. Phys. 59, 040904 (2020).
- 5) M. Golzio, J. Teissie, and M.-P. Rols, Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 1292 (2002).