

氏 名（本籍）	白 幡 康 弘
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 7 7 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 26 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （博士課程）外科学系専攻
学 位 論 文 題 目	New Technique for Gene Transfection Using Laser Irradiation （レーザーによる遺伝子導入法の確立）

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教 授 里 見 進 教 授 工 藤 俊 雄
	教 授 高 井 俊 行

# 論文内容要旨

## 研究目的

現在の遺伝子導入法は、ウィルスベクターを用いた方法とカチオニックリポソーム、エレクトロポレーション法など非ウィルスベクター法に大別され、その特徴に応じた応用がすすめられている。しかし、ウィルスベクターについてはウィルス自体の感染による細胞障害やワイルドタイプの発生の危険性などの問題が危惧されている。レーザーによる細胞膜穿孔法では対照となる細胞を顕微鏡下にて、術者自らその目的とする形質に応じて選ぶという選択性を有し、ウィルスやリポソームなど特殊なベクターを用いずに遺伝子導入が可能である。更に手技が容易で出力のコントロールによって細胞障害を少なくする事が可能であり、エレクトロポレーション法やダイレクトインジェクション法にはない特性をもっている。今回我々は2種類のレーザー照射装置を用いて遺伝子導入装置の作成ならびに方法の確立をめざし適正な照射、さらに付着および浮遊細胞に対して遺伝子導入を行い、その発現効率について検討した。

## 研究方法

パルスレーザー (Nd : YAG Laser, 波長 355nm), トラッピングレーザー (Nd : YAG Laser, 波長 1015nm, 持続照射), 倒立顕微鏡ならびにパルスジェネレーターを用いて, レーザーによる細胞膜穿孔と細胞捕捉が可能な遺伝子導入装置を作成し, 実際のパルスレーザーによる細胞膜の変化を観察し, 適切なレーザー出力について検討した。付着細胞である HuH-7, NIH/3T3 をガラスボトムディッシュに付着させ, Enhanced Green Fluorescent protein 発現遺伝子を含むメEDIUMを注入した。この状態で個々の細胞に対してパルスレーザーを照射し細胞膜を穿孔させ遺伝子導入を行い, 24 時間以降の EGFP 発現を検討した。また, 遺伝子濃度を 0.0 から 40.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  まで変化させ遺伝子発現頻度との関係について検討した。浮遊細胞の SP2 はネオマイシン耐性遺伝子を含むメEDIUMに浮遊させた状態でガラスボトムディッシュに注入し, トラッピングレーザーで捕捉, 固定した状態にてパルスレーザーを照射し細胞膜穿孔による遺伝子導入をはかった。この後ネオマイシン 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  でセレクションを行い, 導入 2 週間後の耐性細胞の増殖について検討した。

## 研究結果

パルスレーザー, トラッピングレーザーを組み合わせ遺伝子導入装置を作成した。この装置によって付着, 浮遊細胞に関わらず, 細胞障害を生じさせることなく細胞膜穿孔が可能となった。

細胞膜穿孔は約 $2\mu\text{m}$ の暗点として観察され、瞬間的に消失した。パルスレーザーの適正出力は $0.91$ から $1.10\mu\text{J}/\text{shot}$ であった。浮遊細胞はトラッピングレーザーの固定がない場合は適切なパルスレーザー照射が困難であった。付着細胞のHuH-7, NIH/3T3に対してパルスレーザーによる遺伝子導入後(EGFP発現遺伝子濃度 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ )EGFPの発現が観察され、24時間後の遺伝子発現率は約10%であった。遺伝子は含むがパルスレーザーを照射しない群では遺伝子発現は観察されなかった。発現した細胞の培養を2ヶ月以上継続することによりEGFP発現HuH-7細胞株がえられた。遺伝子濃度では $10.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上にて約10%の遺伝子発現率が得られたが $20.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では発現率は上昇しなかった。浮遊細胞のSP2についてはメEDIUMにネオマイシン耐性遺伝子を含みパルスレーザーを照射したグループのみセレクションメEDIUMの中で細胞増殖が認められた。

## 結 論

トラッピングレーザーを併用した顕微鏡下パルスレーザー照射システムを作成し、選択的遺伝子導入法を確立した。適切な出力を検討し、細胞障害を生じさせることなく細胞膜穿孔を可能とした。EGFP発現遺伝子を用いた発現効率は約10%でEGFP発現HuH-7細胞株が得られた。浮遊細胞に対してもトラッピングレーザーによる細胞固定を併用することによって遺伝子導入が可能であった。

## 研究の意義・独創的な点

当方法は対象細胞の選択性を有し、ウィルスなどの特殊なベクターを必要としない新しい遺伝子導入法である。EGFP発現遺伝子を用いて一過性発現および細胞株化を検討した点はレーザーを用いた遺伝子導入法としてこれまで他に報告をみない。またパルスレーザーとトラッピングレーザーを組み合わせる付着細胞のみならず、浮遊細胞をも対象としたのは今回の報告がはじめてであり、これからの臨床応用(ガン細胞に対する遺伝子治療や骨髄細胞へのex vivoでの薬剤耐性遺伝子導入などの遺伝子操作)や基礎医学における応用(ES細胞などの分化による形態が変化する細胞に対する選択的遺伝子導入)が期待される。

## 審査結果の要旨

現在、分子生物学、特に遺伝子工学の分野の発展は急速にて遺伝子診断や遺伝子治療など臨床医学においても応用され、これからも期待される分野である。遺伝子導入法としては様々な方法が開発され、それぞれの特徴に応じて用いられている。現在のところ選択的遺伝子導入法としてはダイレクトインジェクション法があるが付着細胞のみを対象としており対象細胞が限定されてしまう。本論文はレーザーを用いて付着・浮遊など細胞の形態に関わりなく選択的な細胞膜穿孔法による遺伝子導入法の開発を目指したものである。レーザーを用いるという独自の発想から遺伝子導入装置を開発し、その細胞に与える影響や至適条件を検討し、さらに実際に付着・浮遊両細胞に対して遺伝子導入をはかり、その導入を検証し、遺伝子導入法としての実用性を明らかにした。これは高く評価されることである。

本論文ではレーザーの特性を考慮しパルスレーザー、トラッピングレーザー、倒立顕微鏡ならびにパルスジェネレーターを用いて、レーザーによる細胞膜穿孔と細胞捕捉が可能な遺伝子導入装置を作成し、細胞障害を生じさせることない細胞膜穿孔を可能とした。さらに細胞膜穿孔と細胞変化を観察し、適切なレーザーの出力が約  $1.0 \mu\text{J}/\text{shot}$  であることを明らかにした。また、この装置をもとに Enhanced Green Fluorescent protein 発現遺伝子を付着細胞に導入し、その遺伝子発現を証明し、至適遺伝子濃度と遺伝子導入率を明らかにした。2種類のレーザーの併用によって浮遊細胞に対してもネオマイシン耐性遺伝子の導入を行い、その発現を検証し、遺伝子導入が可能であることを証明した。以上のことから非常に独創的なレーザーを用いた遺伝子導入法を開発し、その特性や遺伝子導入法としての有効性について検証しており研究として意義深い。

この方法は対象細胞の選択性を有し、ウイルスなどの特殊なベクターを必要としない新しい遺伝子導入法である。EGFP 発現遺伝子を用いて一過性発現および細胞株化を検討した点はレーザーを用いた遺伝子導入法としてこれまで他に報告をみない。またパルスレーザーとトラッピングレーザーを組み合わせて付着細胞のみならず、浮遊細胞をも対象としたのは今回の報告がはじめてであり、ガン細胞に対する遺伝子治療などこれからの臨床応用や、ES 細胞などの分化度のちがいによる選択的遺伝子導入など基礎医学における応用が期待される。以上を鑑み、本論文は独創性を持ち、さらに臨床医学、基礎医学へ期待が大きいと考えられ、学位授与に値するものである。