

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18590312

研究課題名（和文） 気体プラズマを用いた新たな遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new gene therapy using gas plasma

研究代表者

馬場 晴久（BABA HARUHISA）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30419577

研究成果の概要：我々はプラズマによる遺伝子導入法を開発した。これを用いて、癌細胞などの種々の cell line 及び CD34 陽性細胞への至的遺伝子導入法を検討した。遺伝子導入時に使用する培養液として、リン酸バッファー、MEM、RPMI、無血清培養液を比較検討した結果、リン酸バッファーと無血清培養液とが遺伝子導入効率が最も高いことが判明した。しかしリン酸バッファーを用いた場合、死細胞の割合が高かった。CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率は、プラズマ発生条件や細胞培養液条件を変えても、接着性細胞と比較して、著しく低かった。今後は CD34 陽性細胞などの浮遊細胞での遺伝子導入効率を上げることが課題である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	690,000	4,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：遺伝子導入、CD34 陽性細胞、プラズマ法

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療研究における課題は、(1) 高い遺伝子導入効率を確保すること、(2) 遺伝子導入された細胞が導入された遺伝子を長期間維持すること、(3) 導入された遺伝子が適切に発現されること、(4) 発癌性を含めた安全性が確保されること、の 4 点である。組み換えウイルスを用いた遺伝子治療法は、治療後短期間では良好な臨床成績が得られているものの、ウイルスベクター固有の発癌を伴うことがあり、安全性の高いベクターや遺伝

子導入法の開発が待たれている。他方エレクトロポレーションやリボソーム法など非ウイルスベクターによる遺伝子導入法は、一般に DNA 導入効率がウイルスベクターと比較して低く、遺伝子治療技術としての実用化は遅れている。このように、現在、これらの問題が解決された遺伝子導入法は開発されていない。

プラズマはその固有の物理化学特性に基づき、様々な工業用途に利用されてきた。医療面では、医用素材の表面加工や微生物の殺

菌等に利用され、遺伝子治療には利用されなかったことのない工業技術である。近年、イオン性ガスである気体プラズマが細胞の物質透過性を高めることが明らかとなり、我々は、九州大学・片山佳樹教授およびアステラス製薬（株）との共同研究で、遺伝子導入を目的としたプラズマ発生装置（FP-100U）を開発した。本装置での遺伝子導入は、従来のエレクトロポレーションやリポソーム法に比べて操作がきわめて簡便であり、特殊な試薬を必要としない。

2. 研究の目的

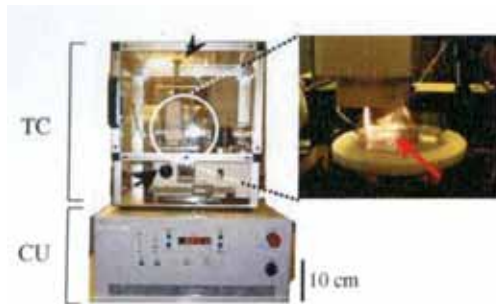
今回の研究の目的は、このプラズマ発生装置を用いて、種々の細胞で遺伝子導入を行い、その効果を検討することである。

3. 研究の方法

(1). プラズマ発生装置

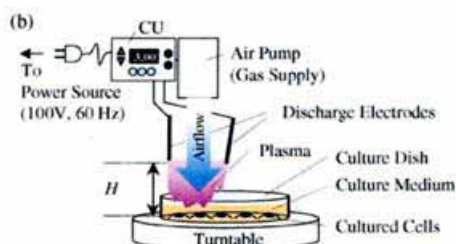
今回使用したプラズマは、atmospheric pressure discharge plasma であり、その発生装置（FP-1000U）を図1に示す。

図1 プラズマ発生装置



具体的な atmospheric discharge plasma generator の概要を図2に示す。

図2 Plasma generator の概要



Plasma discharge の pulse frequency は 30 から 60 Hz の範囲で設定可能であるが、pulse frequency の設定値では、遺伝子導入効率が変わらないため、今回 40 Hz に設定した。同様に、Output amplitude は 30kV に設定した。

(2) 細胞の培養と遺伝子導入

Cell line は、HeLa-S3、HT-1080、MCF-7、Jurkat、SH-SY5Y 細胞を使用した。CD34 陽性細胞は、臍帯血単核球から Microbeads を用いて CD34 陽性細胞を純化して用いた。HeLa-S3、HT-1080、MCF-7 細胞は 10% FCS 入り Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: Invitrogen Japan K.K., Tokyo) を用いて培養した。SH-SY5Y 細胞は、10% FCS 入り 45% DMEM、45% Ham's F12 Medium (Invitrogen Japan K.K.)を用いて培養した。Jurkat 細胞は 10%FCS 入り RPMI で培養した。対数的増殖時の細胞 5×10^5 を 6mm dish に一日培養した後、遺伝子導入した。遺伝子導入時は種々の transfection medium 200 μ l に細胞を suspend をした。Transfection 終了後は、各培養用 medium にもどした。遺伝子導入は G418 遺伝子を有する pEGFP プラスミドを用いた。遺伝子導入 24 時間後、PI 染色を行い、EGFP の蛍光とを蛍光顕微鏡及びフローサイトメーター（EPICS XL: Beckman-Coulter, Hialeah, FL, USA）で検出することにより、遺伝子導入効率および死細胞の割合を計算した。

4. 研究成果

このプラズマ発生装置システムを用いた遺伝子導入法によって、EGFP をコードした plasmid を、HeLa-S3 細胞、HT-1080 細胞、MCF-7 細胞、SH-SY5Y 細胞に効率的に遺伝子導入することができた（図3、4）。

図3 プラズマ発生装置を用いた遺伝子導入（蛍光顕微鏡）

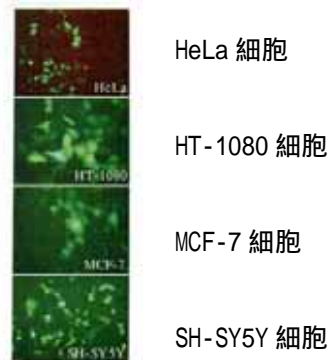
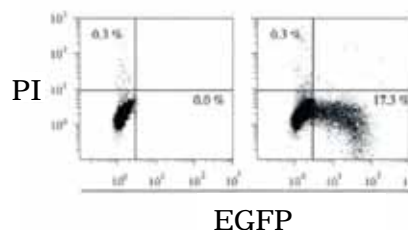
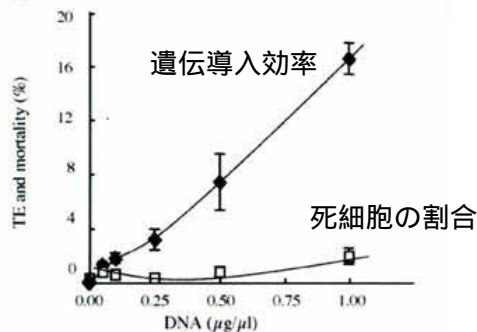


図4 プラズマ発生装置を用いた遺伝子導入（HeLa-S3 細胞、フローサイトメーター）



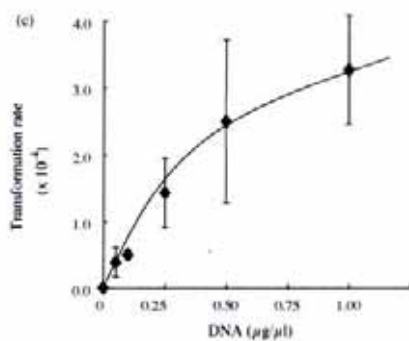
遺伝子導入効率を調べると、DNA 濃度と相関関係が見られたが、死細胞の割合は DNA 濃度を上げてても上昇しなかった (図 5)。

図 5 DNA 濃度と遺伝子導入効率 / 死細胞の割合との関係 (HeLa-S3 細胞)



同様に G418 を用いて selection を行い、transformation rate を算出すると、DNA 濃度に応じて transformation rate も上昇した (図 6)。

図 6 DNA 濃度と transformation rate との関係 (HeLa-S3 細胞)



プラズマ発生装置の種々の条件における、各種細胞の遺伝子導入効率を表 1 に示す。

表 1 各種細胞での遺伝子導入効率

Table 1
The transformation efficiency using gas plasmas

Cell	Output (wV)	Frequency (Hz)	Distance (mm)	Time (s)	DNA (µg/µl)	TE* (%)	Mortality* (%)
HeLa-S3	30	40	22	1	0.5	8.8 ± 0.89	2.19 ± 0.75
	30	40	22	2	0.5	17.8 ± 4.65	2.56 ± 0.56
	30	40	22	3	0.5	18.5 ± 3.40	2.65 ± 0.54
HT-1080	30	40	22	1	0.5	16.7 ± 3.67	0.84 ± 0.21
	30	40	22	2	0.5	23.4 ± 5.51	1.98 ± 0.12
	30	40	22	3	0.5	19.2 ± 1.07	2.81 ± 0.28
MCF-7	30	40	22	1	0.5	17.8 ± 3.05	0.67 ± 0.19
SH-SY5Y	30	40	22	1	0.5	3.74 ± 0.49	1.16 ± 0.44
Jukat	25	40	22	2	0.5	2.91 ± 1.46	1.87 ± 0.58

TE, transformation efficiency.
* TE and mortality represent the fractions (%) of the EGFP⁺ and PI⁺ cells of total cell counts, respectively. Data are shown as mean ± S.D. values obtained from three independent transfections.

これらの結果をふまえて、さらに遺伝子導入効率を上げるべく、遺伝子導入時に細胞を suspend する培養液を検討した結果、リン酸バッファーを用いた場合、遺伝子導入効率は若干の上昇を認められたが、死細胞の増加を認められた。また、リン酸バッファーに FCS を添加し

たものでは、死細胞の割合を若干低下させることができたが、遺伝子導入効率は低下した。さらに、種々の無血清培地等を使用したが、最終的には、有意な差は認められなかった。CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率は、数パーセント以下であり、さらなる条件設定を要するものと考えられた。

このように、遺伝子導入法の一つとして、プラズマ法は有望と考えられるが、さらなる遺伝子導入効率の上昇、死細胞の軽減などのための改良が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 25 件)

1. Ni R, Ihara K, Miyako K, Takemoto M, Ishimura M, Kohno H, Matsuura N, Yoshimura A, Hara T: Association study of polymorphisms in SOCS family genes with type 1 diabetes mellitus. *Int J Immunogenet.* 33(1):7-10, 2006
2. Tsutsumi Y, Jie X, Ihara K, Nomura A, Kanemitsu S, Takada H, Hara T: Phenotypic and genetic analyses of T-cell-mediated immunoregulation in patients with Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 23(10):1145-50, 2006
3. Ni R, Ihara K, Miyako K, Kuromaru R, Inuo M, Kohno H, Hara T: PD-1 gene haplotype is associated with the development of type 1 diabetes mellitus in Japanese children. *Hum Genet.* 121(2):223-32, 2007
4. Ihara K, Inuo M, Kuromaru R, Miyako K, Kohno H, Kinukawa N, Hara T: The Leu544Ile Polymorphism of the growth hormone receptor gene affects the serum cholesterol levels during GH treatment in children with GH deficiency. *Clin Endocrinol.* 67:212-217, 2007
5. Uematsu M, Sakamoto O, Sugawara N, Kumagai N, Morimoto T, Yamaguchi S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Ihara K, Yoshino M, Watanabe Y, Inokuchi T, Yokoyama T, Kiwaki K, Nakamura K, Endo F, Tsuchiya S, Ohura T: Novel mutations in five Japanese patients with 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Hum Genet.* 52(12):1040-3, 2007

6. Furuno K, Takada H, Yamamoto K, Ikeda K, Ohno T, Khajoo V, Mizuno Y, Hara T. Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and coronary artery lesions in Kawasaki disease. *J Pediatr.* 151: 155-60, 2007
7. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature.* 448: 1058-62, 2007
8. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghonaium A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Maródi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med.* 204: 2407-22, 2007
9. 吉川秀人、北村太郎、渡辺周永、虻川大樹、稲垣徹史、武山淳二、今泉益栄、高田英俊、原寿郎。本邦初の Interleukin-1 receptor associated kinase 4 欠損症兄弟例の臨床的特徴 *日本小児科学会雑誌* 111: 750-4, 2007
10. Ohga S, Nomura A, Takada H, Suga N, Hara T. Successful self-infusion of activated prothrombin complex concentrate for prophylaxis in a child with a factor VIII inhibitor. *Am J Hematol.* 82: 145-9, 2007
11. Ohga S, Ichino K, Urabe K, Ishimura M, Takada H, Nishikomori R, Furue M, Hara T. Early-onset sarcoidosis mimicking refractory cutaneous histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 50: 723-6, 2007
12. Ishimura M, Ohga S, Nagatoshi Y, Okamura J, Tajiri T, Kohashi K, Oda Y, Takada H, Hara T. Malignant hepatic tumor occurring 10 yrs after a histocompatible sibling donor bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant.* 11: 945-9, 2007
13. 楠原浩一、高田英俊、原寿郎 結核菌 / 非定型抗酸菌に対する易感染性と IL-12/IFN- γ 経路 *日本サルコイドーシス / 肉芽腫性疾患学会雑誌* 27: 9-19, 2007
14. 大賀正一、野村明彦、高田英俊、原寿郎 血球貪食症候群 *小児内科* 39: 2078-81, 2007
15. 大賀正一、石村匡崇、野村明彦、高田英俊、原寿郎 慢性活動性 EB ウイルス感染症 病態と治療 *日本小児皮膚科学会雑誌* 26: 69-73, 2007
16. 原寿郎、高田英俊、楠原浩一 自己炎症性症候群 *小児科臨床* 60: 1505-16, 2007
17. Takada H, Ishimura M, Inada H, Ohga S, Kusahara K, Moroi Y, Furue M, Hara T. Lipopolysaccharide-induced monocytic cell death for the diagnosis of mild neonatal-onset multisystem inflammatory disease. *J Pediatr.* 152: 885-7, 2008
18. Ohga S, Sanefuji M, Ishimura M, Nomura A, Torisu H, Kira R, Takada H, Mizuno Y, Kazuyama Y, Hara T. Epstein-Barr virus load in cerebrospinal fluid of patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 27: 1027-30, 2008
19. Hoshina T, Yamaguchi Y, Ohga S, Kira R, Ishimura M, Takada H, Tanaka T, Hara T. Sjogren's syndrome-associated meningoencephalomyelitis: cerebrospinal fluid cytokine levels and therapeutic utility of tacrolimus. *J Neurol Sci.* 267: 182-6, 2008
20. Ohga S, Ideguchi H, Kato J, Ishimura M, Takada H, Harada N, Kawanaka H, Hattori Y, Kang D, Hamasaki N, Hara T. Thromboembolic complications in splenectomized patients with dominantly inherited beta-thalassemia. *Acta Haematol.* 120: 31-5, 2008
21. Sanefuji M, Ohga S, Kira R, Nomura A, Torisu H, Takada H, Kusahara K, Hara T. Epstein-Barr virus-associated meningoencephalomyelitis: intrathecal reactivation of the virus in an immunocompetent child. *J Child Neurol.* 23: 1072-7, 2008
22. 高田英俊、大賀正一、原寿郎 血球貪食症候群の発症機序 サイトカイン血

- 液・腫瘍科 57 [suppl.6]: 40-5, 2008
23. 大賀正一、石村匡崇、菅尚浩、野村明彦、高田英俊、原寿郎 EB ウイルスに伴う血球貪食症候群 発症機序 血液・腫瘍科 57 [Suppl. 6]: 116-21, 2008
 24. 高田英俊、原 寿郎 自然免疫による免疫不全症 小児科臨床 61: 1783-9, 2008
 25. 高田英俊、原 寿郎 インターフェロンガンマ受容体異常症と類似疾患 小児内科 40 増刊号 小児疾患診療のための病態生理 1 : 1356-9, 2008
 26. Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD. FBP17 Mediates a Common Molecular Step in the Formation of Podosomes and Phagocytic Cups in Macrophages. *J Biol Chem.* 284: 8548-56, 2009
 27. Kusuhara K, Ohga S, Hoshina T, Saito M, Sasaki Y, Ishimura M, Takada H, Fujita M, Hara T. Disseminated Bacillus Calmette-Guérin lymphadenitis in a patient with gp91phox (-) chronic granulomatous disease 25 years after vaccination. *Eur J Pediatr.* 2008 Sep 2 [Epub ahead of print]
 28. Ishimura M, Saito M, Ohga S, Hoshina T, Baba H, Urata M, Kira R, Takada H, Kusuhara K, Kang D, Hara T. Fulminant sepsis/meningitis due to Haemophilus influenzae in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy. *Eur J Pediatr.* 2008 Aug 27 [Epub ahead of print]
 29. Yamaguchi K, Ikeda K, Ihara K, Takada H, Kusuhara K, Hara T. Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease. *Hum Immunol.* Nov 19. 2008 [Epub ahead of print]
 30. Muneuchi J, Ohga S, Ishimura M, Ikeda K, Yamaguchi K, Nomura A, Takada H, Abe Y, Hara T. Cardiovascular Complications Associated with Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *Pediatr Cardiol.* Jan 30. 2009 [Epub ahead of print]
 31. Kuroki-Nagamatsu R, Koga Y, Suminoe A, Matsuzaki A, Ihara K, Oki E, Kakeji Y, Maehara Y, Hara T: Complement component 9 deficiency is not associated with the development of gastric carcinoma and leukaemia. *Molecular Immunology* 45:4176, 2008
 32. Inuo M, Ihara K, Matsuo T, Kohno H, Hara T: Association study between B- and T-lymphocyte attenuator gene and type 1 diabetes mellitus or systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Int J Immunogenet.* (in press) 2008
 33. Ikeda K, Ihara K, Yamaguchi K, Muneuchi J, Ohno T, Mizuno Y, Hara T: Genetic analysis of MMP gene polymorphisms in patients with Kawasaki disease. *Pediatr Res.* 63(2):182-5, 2008
- [学会発表](計 55 件)
1. Hara T, Takada H, Hoshina T, Sasaki Y, Saito M, Nomura A, Kusuhara K, Kobayashi M, Miyawaki T: Genetic backgrounds of patients with susceptibility to mycobacterial infections in Japan 25th International Congress of Pediatrics 25-30 August, Athens, Greece 2007
 2. Ishimura M, Ohga S, Nagatoshi Y, Okamura J, Oda Y, Takada H, Hara T: Malignant hepatic tumor occurring 10 years after a histocompatible sibling donor bone marrow transplantation for severe aplastic anemia 14th Annual Meeting of the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group, 2007 June 2-3, Nagoya, Japan
 3. Ohga S, Koga Y, Ishimura M, Nomura A, Takada H, Hara T: Congenital pure red cell aplasia as a human ribosomopathy SESSION I. Prenatal and Pediatric Research for Future Development of Cure, Care and Prevention of Congenital Disease The 18th Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-Child Health Research September 1st, 2007 Fukuoka, Japan
 4. Ohga S, Sanefuji M, Ishimura M, Nomura A, Torisu H, Kira R, Takada H, Mizuno Y, Kazuyama Y, Hara T: Central nervous system reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in chronic active EBV infection and EBV-associated encephalitis The 3rd Congress of Asian Society for Pediatric Research, October 7-8, 2007, Tokyo, Japan
 5. Muneuchi J, Ohga S, Ishimura M, Yamawaki K, Kanaya Y, Takada H, Hara T:

- Clinical outcomes of cardiac complications associated with chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV). The 3rd Congress of Asian Society for Pediatric Research (Oral), October 7~8, 2007, Tokyo, Japan
6. Ishimura M, Ohga S, Nagatoshi Y, Okamura J, Tajiri T, Kohashi K, Oda Y, Takada H, Hara T: Malignant hepatic tumor occurring 10 years after a histocompatible sibling donor bone marrow transplantation for severe aplastic anemia The 3rd Congress of Asian Society for Pediatric Research, October 7~8, 2007, Tokyo, Japan
 7. Hara T, Takada H: NEMO mutation as a cause of familial occurrence of female Behcet s disease patisnts. XX International Congress of Genetics, 2008.7.16-17 Berlin, Germany
 8. Ohga S, Koga Y, Ishimura M, Takada H, Hara T: Pathophysiology and treatment of Diamond-Blackfan anemia SYMPOSIUM 4 Hematological disorders in mature and premature infants by JSPS-NRCT program and the 18th Annual Meeting of the Japan Society of Obstetrical, Gynecological and Neonatal Hematology June 27-28, 2008 Fukuoka
 9. Takada H: IRAK4 deficiency in Japan Symposium for PID in ASIA Dec 11-12, Yokohama
 10. Hidetoshi Takada, Yojiro Arinobu, Masataka Ishimura, Koichi Akashi, Toshiro Hara : Novel primary immunodeficiency syndrome with a developmental defect of pro-B cells, NK cells and plasmacytoid dendritic cells 第 38 回日本免疫学会 2008 年 12 月 1~3 日 京都
 11. Takehiko Doi, TAKADA Hidetoshi, KANEGANE Hirokazu, TOMIZAWA Mariko, NAKAYAMA Toshinori, OHARA Osamu, MIYAWAKI Toshio, HARA Toshiro, ISHIKAWA Fumihiko : Development of functional human B cells in NOD/SCID/IL2r · KO mice and the application of the xenotransplant model in studying human immunodeficiency 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008.12.1-3 京都

6 . 研究組織

(1)研究代表者

馬場 晴久 (BABA HARUHISA)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 30419577

(2)研究分担者

高田 英俊 (TAKADA HIDETOSHI)
九州大学・大学病院・特任准教授
研究者番号 : 70294931

片山 佳樹 (KATAYAMA YOSHIKI)
九州大学・工学研究院・教授
研究者番号 : 70284528

井原 健二 (IHARA KENJI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号 : 80294932

(3)連携研究者

なし