

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：33302
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K04271
研究課題名(和文) 圧電装荷デバイスによるナノ秒衝撃波・パルス電界ハイブリッドトランスフェクション
研究課題名(英文) Hybrid transfection using a combination of nanosecond shock wave and pulse electric field with piezoelectric loading device
研究代表者
會澤 康治 (Aizawa, Koji)
金沢工業大学・工学部・教授
研究者番号：40222450
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナノ秒衝撃波やナノ秒パルス電界照射によるヒト細胞への外来物質導入と圧電体を挿入した市販のエレクトロポレーション用キュベットを使い、衝撃波発生とパルス電界印加の併用が可能なハイブリッド・トランスフェクションシステムを開発した。また本システムを酵母(*S. cerevisiae*)にも適用して、その効果を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行ったヒト細胞へのナノ秒衝撃波照射実験およびパルス電界印加実験の成果は外来物質導入に関する新たな知見をいくつか与えている。また圧電体導入による印加電界の増強効果は従来法にはない現象で導入効率向上につながる可能性がある。本研究で構築したシステムは、市販の細胞培養容器を使っているため汎用性があり、酵母に対する効果を実験的に確かめるなど、ヒト細胞以外にも応用できることを示した点で意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a general-purpose system for introducing foreign substances into human cells. A developed system (hybrid transfection system) is composed of a combination of shock wave and pulsed electric field using a commercially available electroporation cuvette introducing a piezoelectric material. We also applied this system to yeast (*S. cerevisiae*) and experimentally investigated its effect.

研究分野：電気電子工学

キーワード：パルス電界 衝撃波 外来物質導入 圧電体 パルスレーザ

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療への期待の高さから、ヒト正常細胞に対して臨床応用上有効な導入効率と導入細胞の安全性を両立する遺伝子導入法の確立が望まれている。細胞種に依存しない安全かつ高効率な遺伝子導入法を考えたとき、超音波穿孔法(ソノポレーション)や電気穿孔法(エレクトロポレーション)などで代表される物理的手法は細胞や組織に加えるストレスや刺激を人為的に制御できる点で優れる。特にソノポレーションは音波の性質を利用しており空間制御性にも優れる。しかしながら通常のソノポレーションは、連続超音波あるいはバースト超音波によるキャビテーションを利用するため細胞への物理的ダメージが安全性の点で無視できないと考えられる。急峻な正の圧力変化と衝撃インパルスの効果により細胞膜の一時的な物質透過性変化を誘起することで細胞質への遺伝子導入を可能にする「衝撃波法」は、従来のソノポレーションよりも低ダメージの導入法として期待されているが、十分な導入効果を得るためには技術的なブレイクスルーが求められている。

2. 研究の目的

遺伝子導入では、外来遺伝子が核内に導入される必要があるが、これを衝撃波の力学的作用だけで実現するのは現時点で難しく、細胞分裂しない細胞へは適用できない。そこで本研究では、物理的作用のみで細胞分裂をしない細胞も含めたあらゆる細胞種に対して適用可能な遺伝子導入技術において、単一ナノ秒衝撃波によって細胞質に導入した外来遺伝子をナノ秒パルス高電界を用いた核膜に対するエレクトロポレーションで核内に導入する「ハイブリッド・トランスフェクション」で実現する(図1)。なおこれまでに、このような視点でこれらを併用する試みは我々が調べた限りない。

実用的な物理的遺伝子導入法には、最小限のストレス・刺激印加(安全性)と最大限の効果(導入効率)が求められる。我々はこれを、1J以下の微小エネルギーで発生させたソノポレーションよりも短時間かつ高強度の音圧を持つ単一のナノ秒衝撃波と、エレクトロポレーションよりも短時間・高強度のナノ秒パルス高電界の併用によって、ヒト正常細胞への遺伝子導入を実験的に確かめ、安全で高効率な遺伝子導入技術を提供したいと考えている。なお我々の実験結果から、ナノ秒衝撃波の単一照射による染色体変異はなく、遺伝的に安全であることが分かっている。

これまでに我々は、レーザー誘起衝撃波法と細胞膜への電界ストレスにより高い導入効率が期待できるエレクトロポレーション効果も加えた電気・機械的相互作用による遺伝子導入法や「光吸収層を持つ圧電体を装荷したマイクロ流路素子」により、導入細胞の動きを空間的に制限した状態で衝撃波・パルス電界を同時印加する方法を検討してきた。本研究ではこれらを発展させ、圧電膜で標的細胞をサンドイッチした圧電装荷デバイスを用いて圧電効果によってエレクトロポレーションを増強し、かつナノ秒衝撃波照射後のナノ秒パルス高電界の印加タイミングを制御するシステムを構築する。またこれを用いて細胞等に対する効果を調べる。

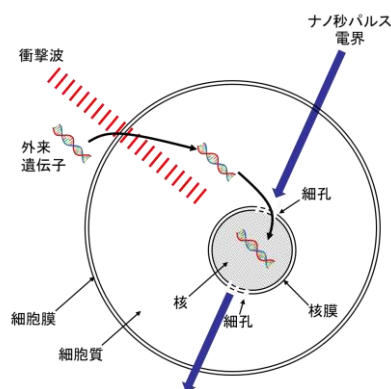


図1 ハイブリッド・トランスフェクションの概念

3. 研究の方法

本研究では、ナノ秒衝撃波やナノ秒パルス電界照射の効果を調べる。なおナノ秒衝撃波発生には既設のパルスレーザー装置を使用する。一方、ナノ秒パルス高電界印加には、出力電圧15kV、パルス幅<50ns、パルスエネルギー<1J/pulse程度の高安定電源を新たに購入して実験を実施する。その後、圧電装荷デバイスおよび衝撃波発生装置とパルス電界印加装置を用いたハイブリッド・トランスフェクションシステムを構築し、細胞等への外来物質導入実験を試みる(図2)。今回構築するシステムでは、パルス発生器を新たに購入し、パルス発生器から発出したトリガ信号により衝撃波発生とナノ秒パルス印加のタイミング制御を行う。

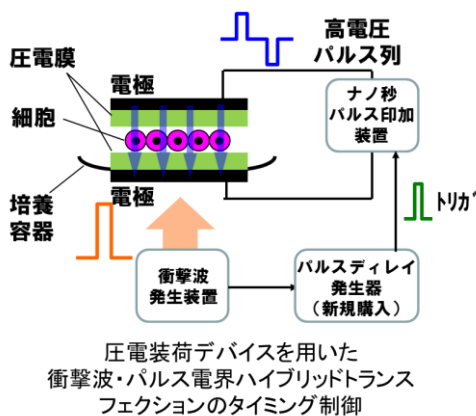


図2 ハイブリッドトランスフェクションシステムの構成

衝撃波や電界効果の影響や安全性評価は、主にトリパンプルー色素排除法による細胞生存率の

評価で行う。また蛍光顕微鏡観察などにより印加条件と導入効果を調べる

4. 研究成果

(1) ナノ秒衝撃波照射実験

本実験では、LD 励起 Q スイッチレーザ (Quantum Light Instruments, QUANTAS Q1C) の第 2 次高調波 (波長 527 nm, ビーム径 2.3 mm) をレーザターゲット (ポリエチレンテレフタレート・エポキシ系接着剤・黒色ゴムの 3 層構造) に照射し発生させたナノ秒衝撃波 (レーザエネルギー 9.93mJ において最大圧力 27.9 ± 1.1 MPa) をガラスベースディッシュ (IWAKI, 底面 $\phi 12$ mm) に 1×10^4 cells 播種したヒト子宮頸がん由来の HeLa (JCRB9004) とヒト胎児脳由来の Fibroblast (JCRB0068) に 1 回照射した。導入物質には FITC-dextran (4kDa, 終濃度 100 μ M), 培地には Opti-MEM を用いた。

ナノ秒衝撃波照射後の細胞接着率は、HeLa の場合が 81.4 ± 2.48 %, Fibroblast の場合が 78.5 ± 4.18 % であり、接着率に大きな違いは見られなかった。FITC-dextran の導入率に関しては、HeLa の場合が 1.93 ± 0.427 %, Fibroblast の場合が 12.3 ± 1.00 % であり、導入率に関しては Fibroblast の方が有意に増加した (図 3)。以上の結果から、10mJ 程度の低エネルギーレーザを用いて発生させたナノ秒衝撃波でも外来物質を導入できることを実験的に示した。この結果は細胞種の違いが導入に関係していることを示唆している。

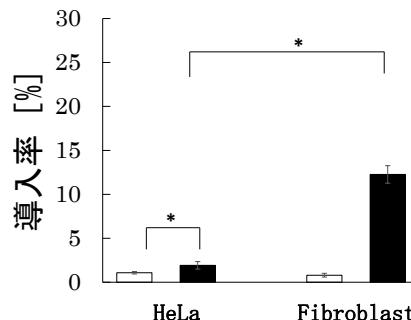


図 3 ナノ秒衝撃波照射による HeLa 細胞への FITC-dextran 導入結果

(2) パルス電界印加実験

本実験では、HL60 (急性前骨髄性白血病細胞株) を用いてナノ秒パルス電界列印加単独、ミリ秒パルス電界印加単独、およびこれらの併用による FITC-dextran および GFP をコードしたプラスミド DNA の導入実験を行い、外来物質導入におけるナノ秒パルス電界列印加の効果とミリ秒パルス電界との併用による効果を検討した。

パルス電界印加による dextran 導入実験では、終濃度 100 μ M の FITC-dextran (4 kDa) に Opti-MEM で HL60 を 5×10^5 cells/70 μ L に調製した細胞懸濁液を 70 μ L 入れた電極間隔 1 mm のキュベット (NepaGene, EC001) にナノ秒パルス電源装置 (Suematsu, nsBioPEFs) からキュベットにナノ秒パルス電界列 (31.2kV/cm, 半値幅 180 ns) を繰り返し周波数 1 Hz で 5, 10, 20 回印加した。またミリ秒パルス電界印加では、240V まで出力可能な直流安定化電源 (Kikusui, PWR401MH) と nMOSFET (Toshiba, 2SK2382) で構成したパルス回路を外部パルス発生器 (Quantum Composers, 9212) で制御するミリ秒パルス電源を自作し、細胞懸濁液を入れたキュベットにミリ秒パルス電界 (最大印加電圧 100, 150, 200 V) をパルス幅が 1, 2, 5 ms で 1 回印加した。実験結果から、ナノ秒パルス電界列印加単独ではパルス印加回数に依存して細胞生存率が低下した (20 回印加で約 43% まで低下) が、dextran 導入率はパルス電界印加なしの結果 (0.5%) 以下であった。またミリ秒パルス電界印加単独における細胞生存率は、ナノ秒パルス印加列印加と同様、印加電圧に依存して低下した (印加電圧 200 V において約 73%) が、dextran 導入率は印加電圧によって結果は異なった。ナノ秒パルス電界列印加とミリ秒パルス電界印加の併用は、印加順序に関わらず、ナノ秒パルス電界列の印加回数が 10 回において細胞生存率は約 63%, dextran 導入率は約 2% であった。

次にパルス電界印加による HL60 への GFP をコードしたプラスミド DNA の導入実験を行った。Opti-MEM を用いて終濃度が 0.1 μ g/ μ L の GFP をコードしたプラスミド DNA の溶液に HL60 が 1×10^7 cells/1 mL になるよう調整した細胞懸濁液を 70 μ L 入れた電極間隔 1 mm のキュベット (NepaGene, EC001) にナノ秒パルス電界列とミリ秒パルス電界を併用印加した。ナノ秒パルス電界列印加は印加電界 31.2kV/cm, 半値幅 180 ns, 繰り返し周波数 1 Hz, パルス印加回数 10 回に固定し、ミリ秒パルス電界印加は、最大印加電圧 100 V (印加電界 1 kV/cm), パルス幅 5 ms, 印加回数 1 回に固定して行った。実験結果から、ナノ秒パルス電界列印加とミリ秒パルス電界との併用による細胞生存率は、パルス電界印加なし (95.4%) やナノ秒パルス電界列印加単独 (79%) およびミリ秒パルス電界印加単独 (88.7%) と比べて低かった (約 70%)。プラスミド DNA の導入率は、ナノ秒パルス電界列とミリ秒パルス電界を併用することで、ナノ秒パルス電界列単独 (0.7~1.0%) あるいはミリ秒パルス電界単独 (1.0~1.3%) に比べて高かった (1.7~2.8%)。またナノ秒パルス電界列とミリ秒パルス電界の印加順序によるプラスミド DNA 導入率は培養時間で異なる傾向を示した。以上の結果は、HL60 において、ナノ秒パルス電界列 (印加電界 31.2kV/cm, 半値幅 180 ns, 繰り返し周波数 1 Hz, パルス印加回数 10 回) とミリ秒パルス電界印加 (印加電界 1 kV/cm, パルス幅 5 ms, 印加回数 1 回) それぞれ単独による暴露より、ナノ秒パルス電界列およびミリ秒パルス電界印加複合型暴露、あるいはその逆でミリ秒パルス電界印加およびナノ秒パルス電界列複合型暴露が外来物質導入に有効であることを示唆している。

(3) ハイブリッド・トランスフェクションシステム構築

これまでの研究成果を踏まえ、市販のエレクトロポレーション用キュベットにナノ秒パルス電界列およびミリ秒パルス電界の複合印加とパルスレーザで誘起したナノ秒衝撃波導入が可能なシステムを構築した。なお本システムでは、キュベット底面に接着したレーザターゲットにパルスレーザ光を照射して、発生させた衝撃波をキュベット内の培地に導入する。そのためキュベットにパルスレーザ導入を可能にするキュベットホルダを特注で製作した(図4)。7.3 mJのパルスレーザをキュベット底面に貼り付けた黒色ゴムシート(EPDM, 厚さ0.07mm)に照射してキュベット内に注入した純水中に生じた衝撃波をハイドロフォンセンサ(Muller-platte-guage)で観測した結果、パルス幅が230 ns、ピーク音圧が約0.9 MPaの衝撃波がキュベット内に導入できることを確認した(図4)。またピーク音圧の増強は閉じ込め構造レーザターゲットを使うことで可能である。キュベット内の衝撃波伝搬については、時間領域差分法による波動伝搬シミュレーションを用いて、キュベット内部(媒質:水)の音圧分布を解析した。解析空間の分割数は500(差分量25 μm)とし、厚さ1 mmのキュベット底面(ポリカーボネート)に印加応力を点で与えた。結果として、電極間隔2mmのキュベット内部の音圧は、中心軸上において底面からおよそ1 mmの距離で飽和することが分かった。

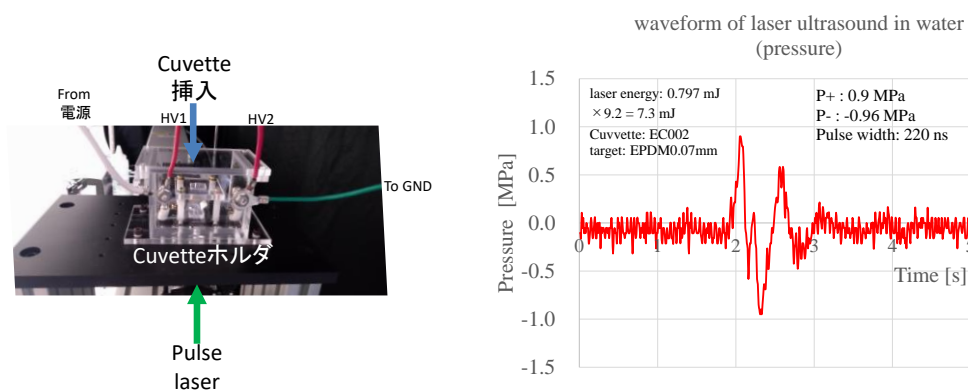


図4 ナノ秒衝撃波導入用の特注キュベット(左)と観測した衝撃波形(右)

本研究で構築したハイブリッド・トランスフェクションシステムは、キャパシタ充電器(Suematsu, CUS501W-850V-250-P)とパルスパワー電源(Suematsu, CUS3010S-25LP, 30 kV at 500 Ω, 0.8 J/p)からなるナノ秒パルス印加経路と直流安定化電源(Kikusui, PWR401MH)とnMOSFET(Toshiba, 2SK2382)で構成したパルス回路を外部パルス発生器(Qunatum Composers, 9212)で制御するミリ秒パルス印加経路をスイッチで切り替える(図5)。実験では、Opti-MEM® I(1X)(Gibco, cat.no. 31985-062)培地を入れたキュベット(NepaGene)にmsEPあるいはnsEPを印加した時の電流-電圧特性を培地量ごとに調べた。これまでの成果から、nsEPでは32 kV/cm(印加電圧6.4 kV)、かつmsEPでは1 kV/cm(印加電圧200 V)をパルス幅1 msで印加パルス数5回以上を満足する必要がある。構築したシステムは、電極ギャップ2 mmのキュベット(NepaGene, EC002)を使う場合、培地量200 μLにおいて、導入実験が要求する条件を満足することを確認した(図6)。また圧電膜(Kureha, KF piezo film, 80 μm)を挿入したキュベットを用いることで、未挿入の場合と比較して電界強度は1.3倍から1.5倍に増加することも確認した。

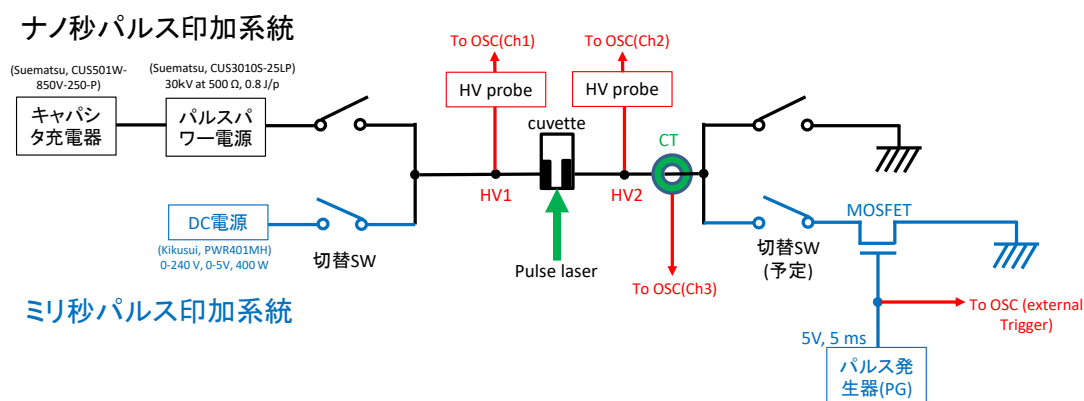


図5 ハイブリッド・トランスフェクションシステムの電気系統図

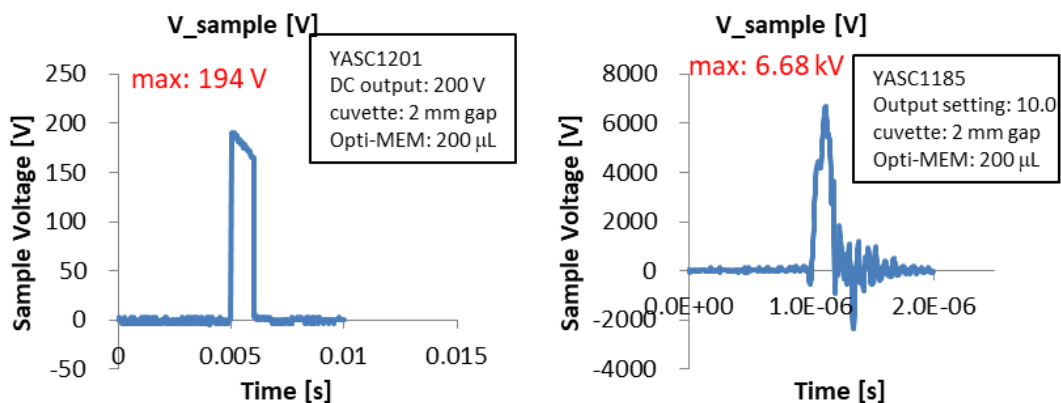


図 6 電極ギャップ 2 mm のキュベット(NepaGene, EC002, 培地量 200 μ L)における、ミリ秒パルス電圧 (左) およびナノ秒パルス電圧 (右) の印加波形

(4) ハイブリッド・トランスフェクションシステムによる酵母へのパルス電界印加実験

従来方法と比較するために、本システムを酵母 (*S. cerevisiae*) にも適用して、その効果を調べた。実験に使用する *S. cerevisiae* は、市販乾燥酵母を YPD 液体培地中で 34 $^{\circ}$ C、24 時間培養後に遠心して回収し、氷冷したリン酸緩衝食塩水で懸濁して実験に使用した (培養後の菌体濃度は 5×10^7 cells/mL 程度)。蛍光標識 (FITC dextran) を加えた終濃度 0.1 mM の懸濁液 (1 mL) からエレクトロポレーション用キュベットに 0.2 mL 分注してパルス電界を印加した。実験では、単発ミリ秒パルス印加、10 発ナノ秒パルス印加、およびこれらの組み合わせ (印加の順番が異なる 2 通りの組み合わせ) を試した。蛍光顕微鏡観察の結果から、蛍光強度の増加がみられた。また、ナノ秒パルス電界印加 (24 kV/cm, 250 ns, 10 pulses, 最大電流 300 A, 0.22 J/p) とミリ秒パルス電界印加 (0.81 kV/cm, 3.0 ms, 1 pulse, 最大電流 12 A, 3.9 J/p) の併用において、多くの菌体で自家蛍光の増強が見られた (図 7)。トリパンブルーを用いた生死評価では、パルス電界印加の有無にかかわらず生菌数の割合は 90% 前後であった。この結果は、本システムの酵母への適用可能性を示唆している。

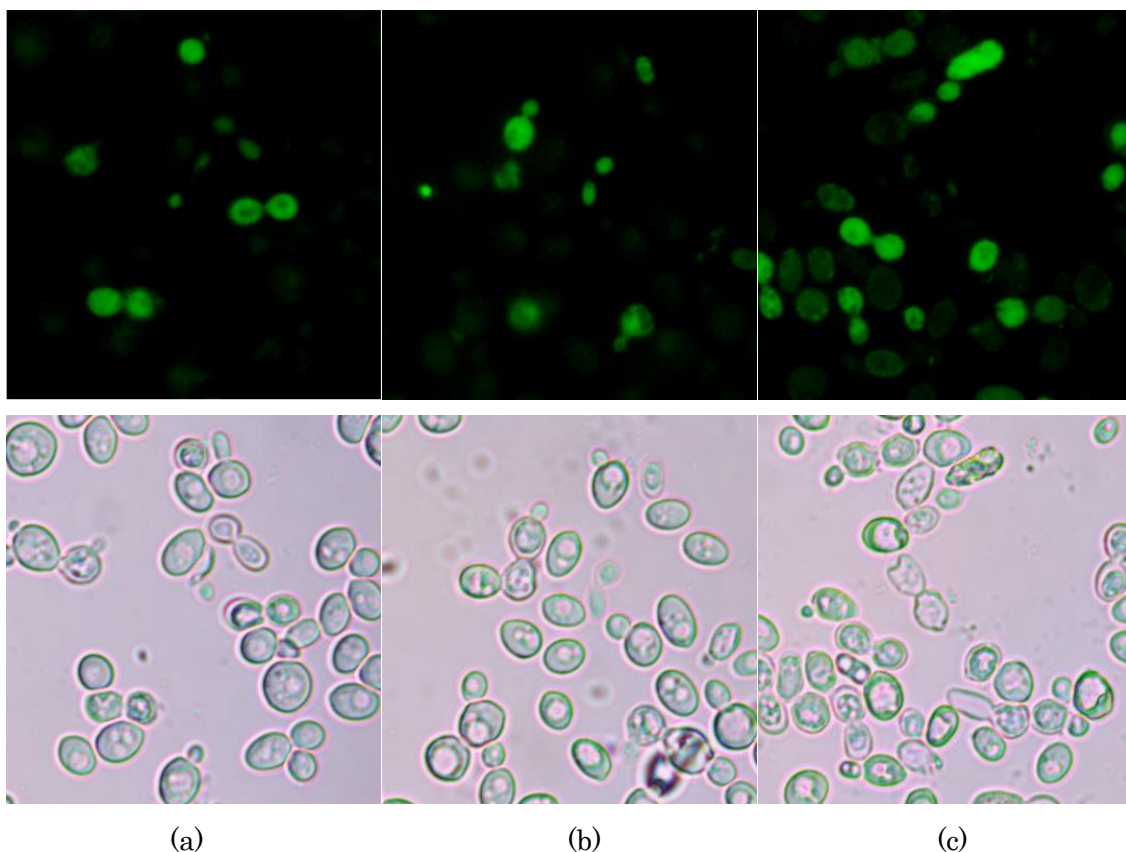


図 7 酵母の蛍光画像 (上) と明視野像 (下) の観察結果. (a) コントロール, (b) ナノ秒パルス電界印加のみ, (c) ナノ秒パルス電界印加とミリ秒パルス電界印加の併用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aizawa Koji, Kobayashi Takumi	4. 巻 59
2. 論文標題 Effect of a cylindrical waveguide on extracting a high-intensity pressure pulse and on irradiating it to adherent cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 067002 ~ 067002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ab9162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa Koji, Kobayashi Takumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Characterization of intense pressure pulse through cylindrical hole	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acoustical Science and Technology	6. 最初と最後の頁 776 ~ 779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1250/ast.41.776	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa Koji	4. 巻 41
2. 論文標題 Intense aerial ultrasound generated by shock vibration with confined laser ablation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acoustical Science and Technology	6. 最初と最後の頁 921 ~ 924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1250/ast.41.921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 會澤康治、小林卓実
2. 発表標題 液体媒質を満たした導波管内を伝搬する高強度パルス超音波のFDTD解析
3. 学会等名 日本音響学会2019年秋季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Aizawa and Takumi Kobayashi
2. 発表標題 A cylindrical waveguide with different diameters for extracting high-intensity pressure pulse of underwater spark-induced shock wave and for suppressing the impact of cavitation
3. 学会等名 The 40th Symposium on UltraSonic Electronics (USE2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 會澤康治、山越健雄、織田貴明
2. 発表標題 高強度パルスレーザを用いた空中超音波源の開発
3. 学会等名 信学技報
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林卓実, 會澤康治
2. 発表標題 平行平板で挟まれた液体媒質中の高強度パルス状圧力波伝搬過程
3. 学会等名 日本音響学会2018年秋季研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Kobayashi and Koji Aizawa
2. 発表標題 Single underwater spark discharge induced shock wave propagated within the waveguide
3. 学会等名 The 39th Symposium on Ultrasonic Electronics (USE2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木俊介, 小木美恵子, 小林卓実, 會澤康治, 山口照英
2. 発表標題 衝撃波照射による細胞内への巨大分子の送達
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤貴行, 鈴木俊介, 會澤康治, 小木美恵子
2. 発表標題 低エネルギーレーザーで誘起された応力波によるヒト細胞への外来物質導入
3. 学会等名 平成30年度日本生体医工学会北陸支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Aizawa
2. 発表標題 Continuous generation of intense aerial ultrasound induced by pulsed laser
3. 学会等名 The 41st Symposium on UltraSonic Electronics (USE2020)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ガイド (會澤康治 研究室) https://kitnet.jp/laboratories/lab0059/index.html?_ga=2.264834189.380944239.1620016284-1088458537.1602043752
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小木 美恵子 (Kogi Mieko) (50410288)	金沢工業大学・基礎教育部・教授 (33302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関