科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 26 年 6月 26日現在

機関番号: 33302
研究種目: 挑戦的萌芽研究
研究期間: 2011~2013
課題番号: 2 3 6 5 6 2 7 5
研究課題名(和文)レーザ誘起創発的インパルス応力波による遺伝子導入法の開発と細胞影響の遺伝学的解析
研究課題名(英文)Development of gene transfection and genetic analysis by Laser induced Emergent Stre ss Wave
研究代表者
小木 美惠子(Kogi,Mieko)
金沢工業大学・バイオ・化学部・教授
研究者番号:5 0 4 1 0 2 8 8
交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000 円 、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文):ヒト由来の細胞に外来遺伝子を導入する技術は、遺伝子治療や再生医療の基本的技術である。本研究は、あらゆる細胞に適用可能で、かつ高い導入効率を示す遺伝子導入を目指して、レーザ誘起創発的応力波(LIESW)を用いた遺伝子導入システムの開発を行った。レーザはQスイッチNd:YAGレーザを用い、応力波発生素子としてエチレンプロピレンゴムとポリエチレンテレフタレートからなる固体素子を用いた。外来物質の導入にはピーク圧力値は10MPa以上必要であり、細胞の接着面に対して反対側からレーザを照射することで100%近い導入効率を示した区画を得ることができた。

研究成果の概要(英文): The technology which introduces foreign genes into the human cell is the fundament al technology or gene therapy or regeneration medicine. In this study, we developed the gene introduction system using the Laser induced Emerged Stress Wave for any kind of the cell and high gene introduction eff iciency. Q-switch Nd:YAG laser was used and, a solid element consisting of EPDM and polyethylene terephtha lates were used as a stress wave outbreak element. The peak pressure level was necessary for the introduct ion of the foreign material more than 10MPa. We were able to obtain the division that showed a little less than 100% of introduction efficiency by irradiating a laser from the other side for an adhesion side of t he cell.

研究分野:工学

科研費の分科・細目: 電気電子工学・制御工学

キーワード:応力波 Nd:YAGレーザ 遺伝子導入

1.研究開始当初の背景

先端生物医学研究として遺伝子導入には, これまでウイルスベクター法やリポソーム 法などが開発されてきたが、臨床応用には、 その安全性や細胞種の特異性が問題視され ている.一方,物理的刺激を利用した遺伝 子導入法としてエレクトロポレーションや ソノポレーション法があるが,これらはキ ャビテーションの発生による細胞膜の破壊 が起こる可能性が示唆されており、細胞の 生存率が低くなるという問題が指摘されて いる.それらの問題を解決するために, 我々は新規遺伝子導入法として,Nd:YAGレ ーザの第二次高調波 532nm を固体素子に 照射することにより,レーザと固体素子と の相互作用から発生するレーザ誘起創発的 応力波(Laser induced Emerged stress wave: LIESW) による新規遺伝子導入法の 開発を行ってきた. LIESW は標的組織(例 として癌細胞・癌組織)に作用し,かつナ ノ秒単位で細胞膜穿孔体を形成するため, 細胞への傷害性が極めて少ない空間制御性 に優れた手法であると考えている.さらに LIESW は導入細胞の種類に依存せず, あら ゆる細胞に応用が可能であると考えられる. しかし, LIESW の研究はまだ開発初期段階 であり, LIESW が細胞膜にどのような影響 を与えるか等の物理的知見が蓄積されてい ない.

2.研究の目的

新規遺伝子導入法として,レーザ誘起創 発的応力波 (Laser induced Emerged stress wave : LIESW)を用いる遺伝子導入 法を開発する.具体的には LIESWが細胞に 及ぼす影響を物理学的に検証し,細胞ごと の最適条件を決定する.さらに細胞が受け る物理的損傷を細胞の生存率および染色体 レベル,遺伝子レベルで検証し,LIESWに よる遺伝子導入の安全性の評価を行う.

3.研究の方法 実験システム

光源には、QスイッチNd:YAGパルスレーザ (Spectra Pysics 社,LAB-130)の第二次高 調波の532nm,最大ピーク出力は 200mJ/pulse,繰り返し周波数は10Hzを用 いた.Nd:YAGパルスレーザ光をNDフィルタ ーに通し、レンズで所定の大きさのビーム 径にした後、反射ミラーで上向きに反射さ せ、ターゲットに照射した.図1に実験シ ステムの概略図を示す.



ターゲット素子の選定

ターゲット素子はレーザ光を表面吸収で きるターゲット材料(吸熱性表面吸収材 料:黒色ゴム(NR),エチレンプロピレン ゴム(EPDM))と,アブレーションとプラ ズマの閉じ込め用透明高分子材料としてポ リエチレンテレフタレート(PET)を高分子 接着剤(エポキシ樹脂)で接着させたもの を用いた.黒色ゴムはそれぞれ0.5mm, 1.0mm,3.0mmの厚さのものを,EPDMは 0.07mmの厚さのものを使用した. LIESWの測定には,ハイドロフォンセンサ ーを用いて培養容器中の純水に入射した時 の圧力を,培養容器底面の圧力はプレスケ ール(中圧用,測定範囲10MPa~50MPa)を用 いてLIESWの評価を行った.

(2) 細胞および導入 DNA ,外来物質 遺伝子導入細胞

細胞種の違いによる LIESW の影響を調べ るため,接着細胞としてHeLa(JCRB9004), Vero(JCRB0111),浮遊細胞として Ramos(JCRB9119),HL60を用い,細胞培養 容器(ガラスベースディッシュ IWAKI, 3961-035)に播種し,HeLaは E-MEM 培地 (FBS 10%), Veroは D-MEM 培地(FBS 10%), HL60と Ramos は RPMI1640(FBS 10%)で24時 間培養した.その後,LIESW 処理直前に血 清低減培地(Opti-MEM 培地)に交換し LIESW 処理を行った.

導入遺伝子 , 外来物質

導入遺伝子として Enhanced green fluorescent protein(オワンクラゲ由来の 緑色蛍光タンパク質の改変体)と CMV(cytomegaro virus)プロモーターがコ ートされたプラスミド: pEGFP-C1(Clontech)を,導入物質として FITC-dextran(Sigma-Aldrich)4kDa を用い た(図2).



図 2 pEGFP の制限酵素地図とFITCデキスト ランの構造

陽性細胞の観察は,LIESW 処理後に pEGFP は24時間培養後に,FITC-dextranは 3時間培養後に行った. 観察には蛍光顕微鏡(Nikon,ECLIPSE 80i), フィルターは Green Excite (494/20), Emitter(527/20)を用いた.

4.研究成果

黒色ゴム(NR)の厚さ0.5mm, 1.0mm, 3.0mmの応力波発生素子を用いてLIESW処 理し,24時間培養後のHeLa細胞の生細胞率 を図3に示す.



図3 HeLa細胞の生細胞率

LIESW 打ち込み24時間後の生細胞率は,NR の厚さに関係なく,約80%~90%と一定で あった.



[物質導入の検討]

黒色ゴム(NR)の厚さ,0.5mm と3.0mm の素子を用いてLIESW 処理をして,3時間 培養後のFITCデキストランの取り込み率を 調べた.その結果を図4に示す.NR 0.5mmの素子を用いた場合の取り込みが著 しく高く,約40%であった.

一方,NR 3.0mmでは約5%の取り込み率で LIESW なしのnegative controlとほぼ同じ 値を示し,FITCデキストランが取りこまれ ていないことが分かった.

[LIESWOD acoustic signature]



図5 と図6 は図4の実験時のLIESWの波形を示している. どちらもレーザフルエンス1.7J/cm²で照射したが,NRの厚さの違いにより,LIESW のacoustic signatureのプロファイルは大きく異なっている.NR

0.5mm では, レーザ照射後わずか 0.5 µ s でプラズマの膨張によるアブレーションが 見られ,そのピーク電圧は20V以上であっ た. 一方, NR3.0mm では立ち上がり時間が 約1.8 µ s と大幅に遅れ, そのピーク電圧 は約10Vであった.ゴム厚が増加すると acoustic signatureの先頭に現れる鋭いピ ークは消失し,台形上の波形のみが残るこ とを見出した.さらにこのピークはレーザ 照射時に発生した衝撃波に由来し、また、 波形が立ち上がる時間は,ゴム厚に比例し て増加し, LIESW の伝搬速度は音速を超え ていた.このacoustic signatureの先頭に 現れる鋭いピークは細胞を剥がす役割をし ていると同時に,FITCデキストランの取り 込みに深く関与していることも示唆してい る.

また,LIESW のacoustic signatureを離散 フーリエ変換したところ,NRが厚いほど, 1MHz以上の高周波成分が大きく減衰してい た.HeLa細胞は培養ディッシュ上で細胞基 質接着と呼ばれる細胞 マトリックス接着 をしており,細胞の下部には接着斑という 構造が存在する.その典型的な接着分子は カドヘリンやインテグリンである.接着し ている細胞が剥がれるということは,この 細胞 マトリックス接着よりも,強い力が 細胞の下部に加わり,接着斑の構造が破壊 されたことを意味している(図7).



LIESW 前 LIESW 後 (青:核,赤:コラーゲンタイプIV) 図7 免疫染色(コラーゲンタイプIV)

また,4KDa,2.8nmのFITCデキストランが 取り込まれたことは,脂質二重層からなる 細胞膜に少なくとも数nmの隙間が開いたこ とを示唆している.

[細胞種による導入効率]

接着細胞としてHeLa細胞とVero細胞を, 浮遊細胞としてHL60細胞とEB細胞を用いた. 導入時のピーク圧力値は 10MPa ~ 30MPaで, 導入物質として FITC-デキストランと pEGFP プラスミド DNA を用いた. HeLa 細 胞, Vero細胞ともに FITC-デキストランの 物質導入は,シャーレの中心部ほど物質の 取り込み率が高く,シャーレの周辺部で取 り込み率が低くなり,シャーレ全体の物質 取り込み率は約 25% であった.HL60細胞へ の FITC-デキストランの物質導入では約3%



pGFPの導入率はHeLa細胞,Vero細胞の順に 高く,HL60細胞では大きく減少していた (図9).



また,細胞外マトリックスの主成分である,

インテグリンやコラーゲンタイプIVはシャ ーレ中心部で最も剥がれていた.

[本研究の完成系]

以上,これらのデータをもとに以下の条 件を本研究の完成系とした. レーザ:QスイッチNd:YAGレーザ 応力波発生素子:エチレンプロピレンゴム (EPDM)



図 10 FITC 蛍光画像

LIESW が細胞膜に向かって発生するように 打ち込んだ実験系では,FITC-dextranの取 り込み率が,場所によっては約100%まで向 上した.

[今後の課題]

本システムによる遺伝子導入は,接着細胞に対して有効であるが,浮遊細胞に対してはまだ,改善の余地があることが判明した.浮遊細胞に対しては,LIESW処理時に細胞を物理的に固定するか,化学的に補足する等の工夫が必要であると思われた.ま

た,本研究では主にHeLa細胞を用いたため, LIESWによる細胞の細胞遺伝学的安全性評 価ができなかった.今後,正常な核型の線 維芽細胞を用いることにより,LIESWによ る細胞の安全性評価を行うことが課題とし て残った.

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15件) 2013年<査読有>(計1件)

Motoaki Nishiwaki , <u>Mieko Kogi</u> and <u>Yoshiaki Tokunaga</u>, "Accoustic signature of stress waves emerged by target with direct or confined geometry in Q-switched nanosecond pulse laser irradiation "Accoust. Sci & Tech. 34, 3 (2013) pp. 206-208

2013年 < 查読無 > (計3件) 小木美恵子,杉山尚玖,柳澤隆康,西村

駿,<u>會澤康冶,得永嘉昭</u>,"浮遊細胞にお けるレーザ誘起創発的応力波による遺伝子 導入の実験的検討"信学技報Vol.2013, No.55,2013-11,pp.11-14

<u>得永嘉昭</u>,折坂駿介,<u>會澤康冶</u>,<u>小木美</u> <u>恵子</u>,"レーザ誘起創発的応力波による遺 伝子導入の問題点とその検討"信学技報 Vol.US2013, No.56,2013-11,pp.15-19

<u>會澤康冶</u>,富永淳司,折坂駿介,<u>小木美</u> <u>恵子</u>,<u>得永嘉昭</u>, "レーザ誘起創発的応力 波の伝搬に関する実験的検討とヒト培養細 胞に与える影響"信学技報 Vol.2013-54, 2013-11, pp.5-10

```
2012年 < 査読有 > (計1件)
```

<u>Yoshiaki Tokunaga</u>, Motoaki Nishiwaki and <u>Mieko Kogi</u>, "Accoustic signature of stress waves in endothermic surface absorbing targets by Q-switched Nd:YaG pulse laser irradiation" Accoust. Sci & Tech. 33, 2 (2012) pp. 121-122

2012年 < 査読無 > (計6件) 竹内光恵,<u>小木美恵子</u>,<u>會澤康治</u>,西村 駿,木村政尊,西脇基晃,<u>得永嘉昭</u>,レー ザ誘起応力波による細胞への外来物質の取 り込み,IEICE Technical Reprt US2012-64, 2012-10, pp5-8

西脇基晃,<u>小木美恵子</u>,<u>會澤康治,得永 嘉昭</u>,"ナノ病高強度パルスレーザ光を使 う創発的応力波の研究I, IEICE Technical Reprt US2012-6, 2012-04, pp29-32 <u>Koji Aizawa</u> and <u>Yoshiaki Tokunaga</u>, "Dynamics of Second Harmonic in Nonlinear Surface Acoustic Waves and A Proposal of Its Device Application", AIP Conf. Proc. 1474, pp.398-401 (2012) (D01:10.1063/1.4749378)

<u>會澤康治</u>,中 善弘,冨永惇司,<u>得永嘉</u> 昭,"レーザと複合構造基板との相互作用 によるパルス応力波の創発 薄膜黒色ター ゲットを用いた閉じ込め構造の検討",信 学技報,US2012-67,2012, pp.17-22

<u>會澤康治</u>,吉田翔一,牧野友哉,<u>得永嘉</u> 昭,"ナノ秒高強度パルスレーザ光を使う 創発的応力波の研究 "信学技報, US2012-15,2012,pp.11-16

<u>得永嘉昭</u>,西脇基晃,<u>會澤康治</u>, "レー ザと複合構造基板との相互作用による正方 向性応力波の創発モデルの検討"信学技報, US2012-68,2012, pp.23-28

2011年 < 査読無 > (計4件) <u>M.Kogi</u>, H. Ishimaru, M. Nishiwaki, H. Miyawaki, <u>E. Uchida</u> and <u>Y. Tokunaga</u>, "Experimental discisions on emergent impulse stress wave for gene transfection into cells" IEICE Technical Report, 2010-97, (2011-1)pp31-34, [in Japanese].

<u>M.Kogi</u>, M.Nishiwaki, T.Sakurai, <u>E.Uchida</u>, <u>K. Aizawa</u> and <u>Y. Tokunaga</u>, "Development of a new method for gene transfer by laser induced stress wave" IEICE Technical Report, 2011-26, (2011-7)pp21-25, [in Japanese].

<u>得永嘉昭</u>,吉村政俊,西脇基晃,<u>會澤康</u> <u>治</u>,<u>小木美恵子</u>,"Nd:YAGレーザ誘起イン パルス応力波の創発に関する論理的検討" 電気情報通信学会信学技報,Vol.2010, No.96,2011-01,pp.25-30

<u>得永嘉昭</u>,西脇基晃,石丸幸大,<u>小木美</u> <u>恵子</u>,"レーザと表面熱吸収ターゲットの 相互作用によるインパルス応力波の創発" 電子情報通信学会,Vol.2011,No.26, 2011-07, pp.27-32

〔学会発表〕(計6件) <u>小木美恵子</u>,柳澤隆康,西村駿,杉山尚 玖,杉本貴弘,<u>會澤康治</u>,<u>得永嘉昭</u>, "細 胞種に問わないLIESW(レーザ誘起創発的 応力波)による遺伝子導入の開発"第13回 再生医療学会,2014年3月4~6日,(京 都)国立京都国際会館 柳澤隆康,<u>小木美恵子</u>,西村駿,<u>會澤康</u> <u>治</u>,<u>得永嘉昭</u>,"Characterization of gene transfection by LIESW"第36回日本 分子生物学会,2013年12月3~6日,(神 戸)神戸国際会議場

<u>小木美恵子</u>,竹内光恵,<u>會澤康治</u>,<u>得永</u> <u>嘉昭</u>,"レーザ誘起応力波を用いた遺伝子 導入および DDS への開発"第12回再生医療 学会,2013年3月21~23日,(横浜)パシ フィコ横浜

折坂駿介,<u>會澤康治</u>,竹内光恵,<u>小木美</u> <u>恵子</u>,<u>得永嘉昭</u>,"レーザ誘起創発的応力 波の効率的形成に関する基礎研究"日本音 響学会2013年春季研究発表会,2013年3月 13日,(東京八王子)東京工科大学

竹内光恵,<u>小木美恵子</u>,<u>會澤康治</u>,西村 駿,<u>内田恵理子</u>,<u>得永嘉昭</u>, "Nd; YAG レ ーザによる応力波を用いた遺伝子導入"第 35回日本分子生物学会,2012年12月11~14 日,(福岡)福岡国際会議場

<u>得永嘉昭</u>,西脇基晃,<u>小木美恵子</u>,<u>會澤</u> <u>康治</u>,"遺伝子導入用インパルス応力波の 創発に関する基礎研究"日本音響学会 2012春季研究発表会,2012年3月13日, (横浜)神奈川大学

〔その他〕 ホームページ等

6.研究組織

(1)研究代表者
小木 美恵子(KOGI, Mieko)
金沢工業大学・バイオ・化学部・教授
研究者番号:50410288

(2)研究分担者
得永 嘉昭(TOKUNAGA, Yoshiaki)
金沢工業大学・工学部・教授
研究者番号:00072174

内田 恵理子(UCHIDA, Eriko) 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医 薬部・第1室 室長 研究者番号:80176685

會澤 康治(AIZAWA, Koji) 金沢工業大学・工学部・教授 研究者番号:40222450