

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：57102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06332

研究課題名(和文) 組み合わせ電気パルスによる遺伝子導入実験-電気パルス形状による生体膜透過性制御-

研究課題名(英文) Gene transfer experiments by using a combination of electric pulses

研究代表者

河野 晋 (Kono, Susumu)

有明工業高等専門学校・創造工学科・教授

研究者番号：30270375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：広範囲にわたる矩形波のパルス電圧を用いたときの生体膜透過性について調査を行った。その結果、これまでにエレクトロポレーション法で使用されることのなかった高電圧ナノ秒パルスは、従来の電気パルスよりも低エネルギーでも細胞膜の透過性を上げることができると分かった。200ナノ秒のパルス高電圧に低電圧長パルスを組み合わせることで、効率良く遺伝子導入が可能であることを確認した。この実験結果をもとに、シンプルな2つのパルス電圧を用いて遺伝子導入が可能となる実験条件の調査が容易にできる手法を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のエレクトロポレーション法による遺伝子導入では導入が困難である細胞が依然として存在しており、その導入効率の向上が望まれている。今回の研究結果から、ナノ秒高電圧パルスに低電圧長パルスを組み合わせることで、導入困難と考えられている数種類の細胞への遺伝子導入が可能であることが分かった。これらのパルスを組み合わせた遺伝子導入実験により、効率の良い遺伝子導入が達成できるパルス条件を簡便に見出すことができる手法を提案した。本手法を適用することで、現在遺伝子導入が困難とされる細胞に対する導入効率が向上すれば、医学、薬学、生物学などの幅広い分野に貢献できる技術になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In electroporation, voltage pulses are used to create pores on cell membrane, and then genes are expected to be introduced into cells through the pores. A condition of voltage pulse is very important factor to achieve high efficiency of introduction. In this study, rectangular voltage pulses with wide range from nano-second to a second were applied to cells for increasing the membrane permeability. Two hundred nanosecond pulse seldom used in ordinary electroporators was found to increase the membrane permeability with lower energy input than ordinary voltage pulses. Combination of the 200 ns pulse as 1st pulse and the low voltage pulse (4 V - 400 V and 10 microsecond - 1 second) as 2nd pulse were tested. The outcomes of transformation efficiencies were posted in a graph with an electric field on the perpendicular axis and an input energy on the horizontal axis. The pulse parameters to achieve high efficiency of introduction were easily found by using this graph.

研究分野：パルスパワー

キーワード：パルスパワー ナノ秒 遺伝子導入 GFP HL60

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで電磁波、低周波～高周波の電界・磁界などを生体や細胞に印加し、それらの影響を調査する研究が各国の研究機関で行われてきた。バイオエレクトリクス(Bioelectrics)ではナノ秒オーダーの高電圧パルスを使用するが、生体や細胞の周囲溶液の熱上昇を抑えつつ、電界の影響を生体や細胞に直接与えることができ、さらには電気的影響を与える生体や細胞の部位をパルス幅(周波数)でコントロールできる可能性があると考えられている⁽¹⁾。

周囲溶液中に設置されている一般的な動物細胞にマイクロ秒以上のパルス電圧を印加するとコンデンサとして考えられる細胞膜が電圧印加の間充電される。このとき、充電電圧がある閾値を超えると細胞膜に電気的な孔(Electro-poration)が形成されると考えられている。印加電界が低いと電気的な孔は形成されず、印加電界が高すぎると細胞に対して自然治癒が不可能なダメージを与えることになる。これは従来のエレクトロポレーション法の説明となる。

パルス幅を数百ナノ秒から数ナノ秒オーダーまで短縮すると、電界影響の範囲が次第に細胞膜から細胞内部へと移行する。電界を 100 kV/cm 程度まで上昇すると核膜に対する電気刺激とができることが予想されており、これはバイオエレクトリクスの範疇による生体膜制御である。

従来のエレクトロポレーション法では前述したとおりマイクロ秒以上の矩形波や減衰波を溶液内の細胞に印加することで人工的な孔を細胞膜に一時的に形成し、そこから遺伝子等を導入する。最適とされる実験条件(パルス波形、周囲溶液、電極間隔など)は生物毎で異なるが、これは生体毎に電気的特徴に差があることに起因するものである。従来のエレクトロポレーション法による遺伝子導入では、全体の 5 割程度が生存し、その中の 5 割程度に遺伝子導入できる実験条件であることが多い。多数の試験体を準備することができない場合などでは低い導入効率が問題でエレクトロポレーションの導入効率の向上が望まれている。

(2) 本研究室では、従来のエレクトロポレーション法では使用されなかったナノ秒の高電圧極短パルスを採用し、これに従来のエレクトロポレーションで使用される低電圧長パルスを組み合わせることで化学物質をメダカ受精卵に導入する技術を開発した⁽²⁾。その技術を用いて、ラット受精卵細胞に対し RNA 導入の予備実験を行い、あるパルス条件でサンプルの 33%に変異の確認ができた。ヒト白血病細胞株(HL-60)への GFP 発現プラスミド導入の予備実験では、高電圧極短パルスと低電圧長パルスの印加順を調整することで GFP 発現した HL-60 細胞の存在が確認できた。これらの結果より、ナノ秒高電圧極短パルスも遺伝子導入技術に適用可能であること、異なる形状のパルスの組み合わせは GFP 発現プラスミドや RNA の導入に有効であること、対象細胞毎・導入物質毎で有効なパルス条件が異なることなどが分かってきた。

参考文献

- (1) K. H. Schoenbach, et al., IEEE Trans. Plasma Sci., vol. 30, no. 1, pp. 293-300, Feb. 2002.
- (2) N. Tominaga, et al., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74 (6), 2010, pp. 1279-1282

2. 研究の目的

(1) 異なる細胞を対象として、印加パルス形状による生体膜透過性の変化を幅広く調査し、得られた結果をもとに、さまざまな細胞種に対する遺伝子導入効率の向上が期待される効果的なパルス印加方法を確立することを目的とする。

(2) 本調査によりさまざまな生物の生体膜透過性操作に最適な電気パルスの情報や、高効率な遺伝子導入パルス形状の情報が発信できれば、医学、薬学、農学、生物学など幅広い分野における利用価値は高く、その貢献度は極めて大きいと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 広範囲（電圧，幅）のパルスを印加するため表 1 に示すパルス電源を使用した。各パルス電源の出力波形例を示す。これらパルスを組み合わせたパルスシステムの概要を図 2 に示す。各パルスの出力（印加順，パルス間隔，パルス幅など）はトリガシグナルジェネレータをプログラムすることで制御した。図 3 キュベットの外観を示す。キュベットは電極間へのアクセスが容易，かつ，高電圧印加時に気中放電が発生しにくい構造とした。

No.	パルス幅	電圧	出力極性	インピーダンス	備考	
1	ナノ秒パルス	5 ns	10~25kV	負極性	10Ω	パルス成形線路型，ガス圧調整による自爆型トリガ
2	ナノ秒パルス	50ns	800V-6kV	負極性	20Ω	パルス成形線路型，トリガトロン型ギャップスイッチによる外部トリガ
3	ナノ秒パルス	100ns	800V-6kV	負極性	20Ω	パルス成形線路型，トリガトロン型ギャップスイッチによる外部トリガ
4	ナノ秒パルス	200ns	800V-6kV	負極性	20Ω	パルス成形線路型，トリガトロン型ギャップスイッチによる外部トリガ
5	マイクロ秒以上	10 μ s-1s	5V-1200V	正極性，負極性	接続負荷	RC放電型，コンデンサバンク，MOSFET,IGBTによるスイッチング

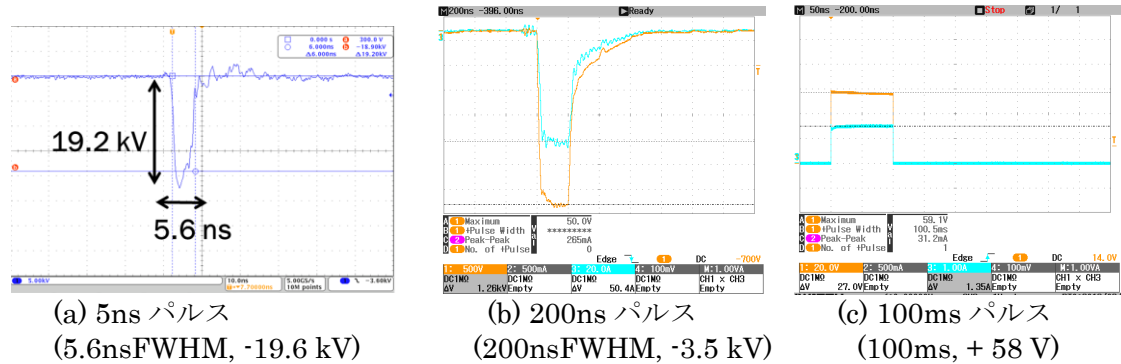


図 1：パルス波形（単発）

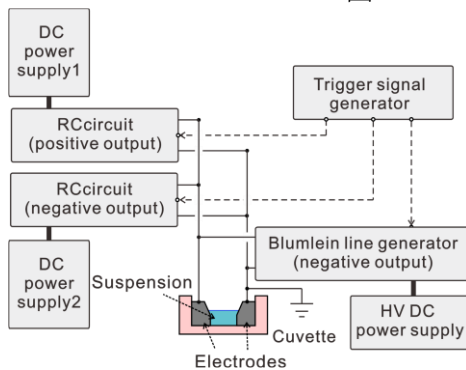


図 2：新パルスシステムの概要

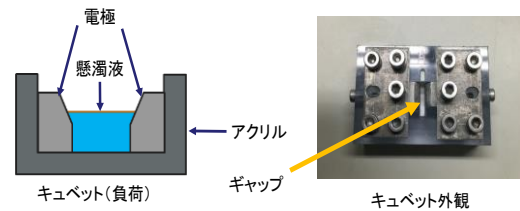


図 3：専用キュベット

(2) 本校で培養が可能な細胞（ヒト白血病細胞株（HL-60））を主な実験対象とした（図 4）。本校で飼育可能なメダカ受精卵も使用して組み合わせパルスの確認実験を行った。細胞培養の関係で他の研究機関にご協力をいただき，数種類の導入が難しい細胞に対する予備導入実験を行った。

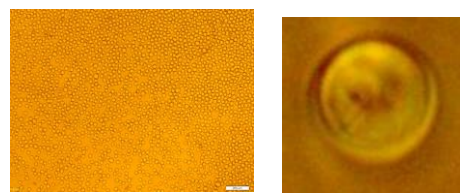


図 4 HL-60 細胞

左：広範囲での画像，右：1 個の拡大画像

(3) 準備した細胞懸濁液をマイクロピペットでキュベットに入れ，(1) のパルスシステムで電圧を印加した。パルス処理後の懸濁液をマイクロピペットで必要量だけ採取し，観察用プレートに入れ，インキュベータで保管し，実験後の観察を行った。

4. 研究成果

(1) ナノ秒パルスが細胞膜透過性に影響を持つかを調べる実験を行った。培地（RPMI1640）に HL-60 細胞(5×10^6 /ml)と GFP ベクター(pEGFP-N3vector, 70 μ g/ml) を混合したものを細胞懸濁液とした。懸濁液 100 μ l をキュベットに入れ，図 5 に示す 2 連続パルスを印加した。これらのパルスは単体の印加では，死亡する細胞はほとんど無いが GFP ベクターの発現もないこ

とは確認済みである。表 2 にパルス条件を示す。P.P.としてマイクロ秒とナノ秒の 2 種類を用意し、組み合わせる T.P.は同一波形 ($T_2=50$ ms, $V_2=90$ V, 10.1 J) とした。エネルギーは印加電圧、パルス幅、キュベットの抵抗値 ($40\ \Omega$) から求めた概算値である。P.P.から 100 ms 後に T.P.を印加した。パルス印加後、キュベット中で 15 秒間静置後、 $30\ \mu\text{L}$ を FBS を 10% 混合した培地 $500\ \mu\text{L}$ で満たされた 24 穴プレートに移した。実験終了後プレートをインキュベータ (37°C , CO_2 5%) で保存し、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, IX70) で 1 日後の細胞の状態を観察した。

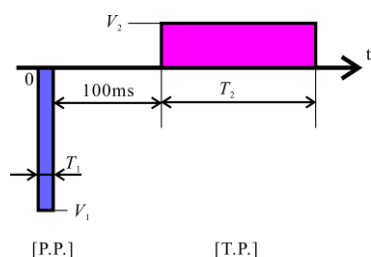


図 5 組み合わせパルス (T.P.固定)

表 2 パルス条件 (P.P.)

条件	T_1 , V_1	エネルギー
a	100 μs , -100 V	25 mJ
b	100 μs , -140 V	49 mJ
c	200 ns, -2 kV	20 mJ

図 6 に各条件における蛍光と明視野の画像を示す。明視野画像よりいずれの条件も細胞に対するダメージは小さいと考えられる。条件 a, b では、電圧の増加による GFP の発現個体数の増加が確認できる。条件 c は、条件 b の半分以下の投入エネルギーであるが、GFP 発現個体数は明らかに多いことが確認できた。この結果からナノ秒パルスは低い投入エネルギーでも細胞膜の透過性を大きく変化させることが分かった。

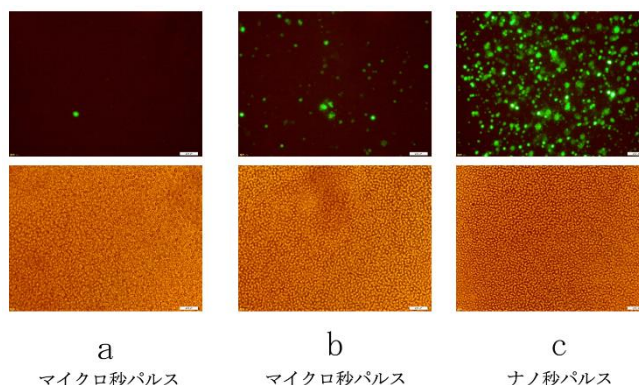


図 6 蛍光画像(上), 明視野画像(下)

(2) 次にナノ秒パルスの P.P.に、広い範囲のパルス幅と電圧をもつ T.P.を組み合わせたパルスによる導入実験を行った。P.P.は同一波形 ($T_1=200$ ns, $V_1=-2$ kV, 20 mJ), T.P.はパルス幅 $10\ \mu\text{s}\sim 1$ s, 電圧 4 V \sim 400 V の 図 7 組み合わせパルス (P.P.固定) 範囲とした (図 7)。細胞懸濁液等の条件は (1) のときと同じである。

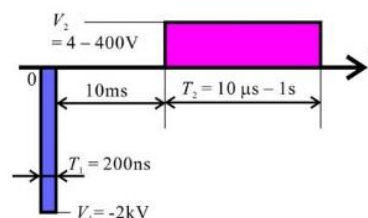


図 7 組み合わせパルス (P.P.固定)

観察結果の一例を図 8 に示す。図は T_2 が 10ms, 30ms, 100ms のとき、電圧 V_2 を変化したときの細胞の様子である。例えば、左の列は、 T_2 が 10ms で、上から V_2 が 70 V, 108 V, 116 V となっており、それぞれ上が明視野、下が蛍光視野である。また、右にあるシンボル (○, △ など) は表 3 に示すように、細胞の生死を“○×”, GFP 発現状況を“◎○△×”で評価し、それらをもとに導入の総合評価を“●●■×”で示したものである。

図 8 をみると、各 T.P.において電圧が低いと細胞状態は良いが導入は少ないが、電圧が上昇するに従い導入がみられるようになるが、電圧が高くなると死細胞が増え導入も少なくなることが分かった。図 9 は、横軸を TP のエネルギー、縦軸を TP の印加電界 (=電圧/ギャップ長) とし、導入評価をプロットした導入状況分布図である。図より導入評価の高いエリアは赤破線で囲われることが分かった。また、TP として短いパルス (300 μs 以下) や長いパルス (300ms 以上) を組み合わせた場合、■から●を経ずに×となっており良好な導入を得られる可能性が低いことが分かった。

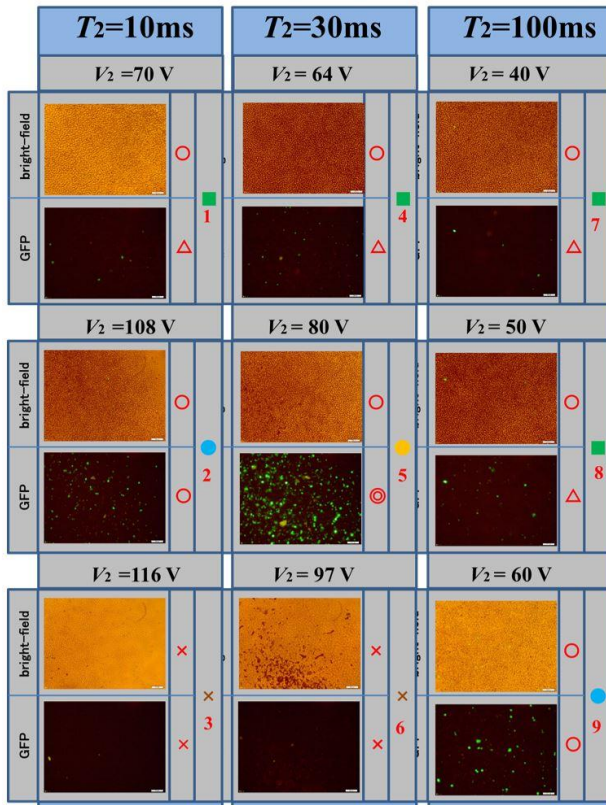


表 3 導入評価

By bright field image		By GFP image		By both image	
Cell normality	sym bol	Cell with GFP expression	sym bol	Efficiency of transformation	sym bol
Good	\circ	So many	\odot	Better	\bullet
		Many	\circ	Good	\bullet
		Few or none	\triangle	No effect	\square
Bad	\times	Few or none	\times	Too much damage	\times

図 8 細胞状況 (T.P.による)

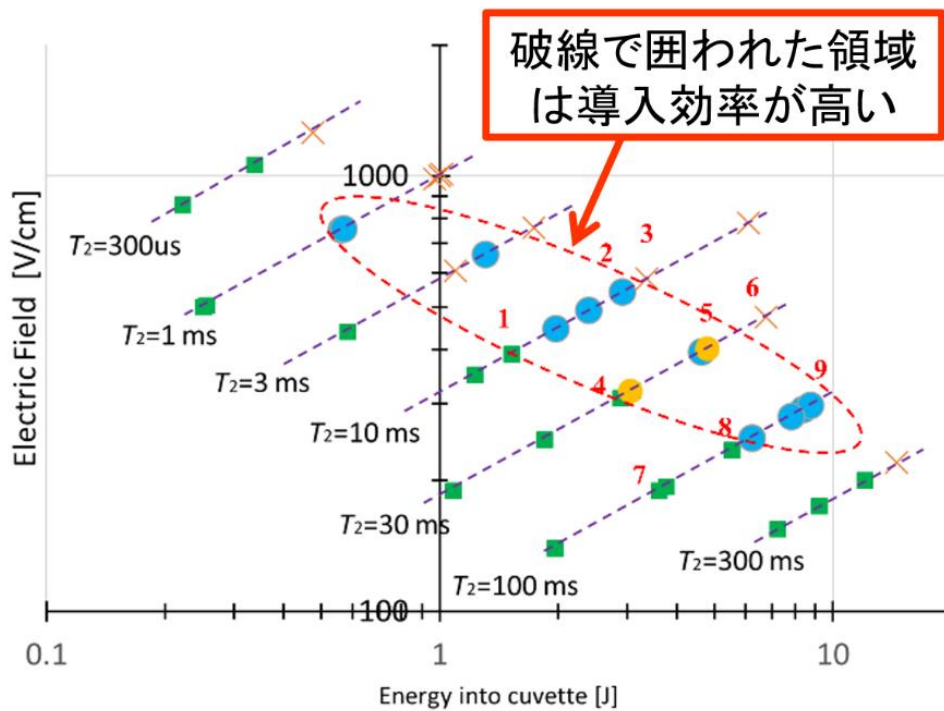


図 9 導入状況分布図 (数字 1~9 は, 図 8 中の右の数字と一致する)

HL-60 に対して高電圧ナノ秒パルスと低電圧長パルスというシンプルな 2 連続パルスによる GFP ベクター導入実験により, 高電圧ナノ秒パルスは低エネルギーでも細胞膜透過性を変化させること, ナノ秒パルスと従来のパルスを組み合わせて導入効率が高くなる条件を検索する簡便な手法を提案することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Susumu Kono, Nobuaki Tominaga	4. 巻 1
2. 論文標題 Optimization of GFP introduction into HL-60 cells with a combination of two different rectangular pulses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of 2019 IEEE Pulsed Power & Plasma Science	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野 晋
2. 発表標題 高電圧極短パルスと低電圧長パルスの組み合わせによる遺伝子導入
3. 学会等名 高専 新技術説明会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 晋, 富永 伸明
2. 発表標題 ナノ秒高電圧パルスと低電圧長パルスの組み合わせによるHL-60細胞へのGFPベクター導入実験
3. 学会等名 2019年度 電気・情報関係学会九州支部連合大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井匠, 池松裕人, 山口明美, 富永伸明, 河野晋
2. 発表標題 メダカ受精卵に対する組み合わせ矩形波電気パルスを用いた物質導入
3. 学会等名 平成31年電気学会全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井 匠, 池松 裕人, 富永 伸明, 河野 晋
2. 発表標題 メダカ受精卵に対する物質導入のための矩形波電気パルスの影響調査
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部第71回連合大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牛島和樹, 河野 晋, 山口明美, 富永伸明
2. 発表標題 電気パルスを用いたGFP導入高効率化に関する基礎研究
3. 学会等名 平成29年度 電気・情報関係学会 九州支部連合大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 牛島和樹, 富永伸明, 河野 晋
2. 発表標題 電気パルスを用いたHL-60細胞へのGFP高効率化に関する基礎研究
3. 学会等名 平成29年度 電気学会九州支部高専研究講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞への物質導入装置, および細胞への物質導入方法	発明者 河野晋, 富永伸明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-14689	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

