

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：82627

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12530

研究課題名(和文)超音波照射による胎児期遺伝子導入メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of gene transfer by sonoporation for fetus

研究代表者

佐藤 智夫 (SATO, Tomoo)

国立研究開発法人海上・港湾・航空技術研究所・港湾空港技術研究所・専任研究員

研究者番号：10242918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子に異常を持つ胎児が誕生直後に死亡することは少なくはなく、胎児期に正常な遺伝子を目標の臓器(細胞)に導入し治療する方法が検討されている。遺伝子を目標細胞に導入する手法のひとつに、細胞の近傍で微小気泡を超音波により破裂させ、細胞膜に一時的な孔を開けるソノポレーションがある。本研究では、より高効率で安全なソノポレーションの実現のために、超音波照射条件の検討、及び超高分解能高速高感度共焦点顕微鏡を用いたソノポレーション中の細胞膜の動態観察を試みた。

研究成果の概要(英文)：There is a great concern about the gene therapy to fetuses. We pay attention to sonoporation which is method using ultrasound and micro-bubbles to transfer the gene into target organ (cell) selectively. The purpose of our study is to build the method of gene-transfer that is more efficiently and more safety, by studying the dynamics of the cell membrane during sonoporation. We tried development of the technique to observe the dynamics of the cell membrane using super high spatio-temporal resolution confocal microscope with high sensitivity.

研究分野：超音波工学

キーワード：ソノポレーション 胎児治療 遺伝子導入 超音波 マイクロバブル 実験計画法 緑色蛍光タンパク質 蛍光画像

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎児期の遺伝子治療

先天性代謝異常は遺伝子の異常により引き起こされる。治療法として移植治療、及び遺伝子治療が挙げられる。移植治療は、慢性的なドナー不足、免疫抑制剤の副作用、新生児の外科処置には困難が伴うなどの課題がある。

一方、遺伝子治療は臨床研究において死亡例がみられ、安全性が懸念されていた。死亡の原因として、遺伝子導入効率を高めるために用いたウイルスベクターが指摘されていた。このため非ウイルス性ベクターを用いて導入効率を向上させることに期待が寄せられていた。

(2) ソノポレーションのメカニズム

ソノポレーションは、薬剤や遺伝子を選択的に細胞内に取り込ませる技術である。そのメカニズムは、現在でも一般に以下のように説明されている。

細胞内に取り込ませたい物質と微小気泡が、細胞の周囲に存在する条件下で超音波を照射すると、微小気泡が崩壊する。その際にキャビテーションが発生し、細胞膜に小孔が開く。通常では細胞内に透過出来ない大きさの物質が、その小孔より細胞内に透過する。細胞膜に生じた小孔は、一時的なものでありやがて閉じる。

このメカニズムは、超音波照射後に細胞を固定し、電子顕微鏡あるいは蛍光染色を行い観察されたものであり、生きた細胞で起きている現象をリアルタイムに観察した例は、我々が調べた限り見付からなかった。

(3) 培養細胞に対するソノポレーション

細胞培養用プレートを超音波照射容器として用いると、超音波照射後も引き続き培養を継続することが出来るが、以下の現象により超音波照射強度を管理することが困難であり、再現性は低下する。

不均一な音場分布

近距離音場、平面振動子の音圧分布により生じる音圧分布。

定在波の発生

プレート底面、培養液面の反射により発生する定在波。

一般的に再現性を優先し、培養プレートの底面側から定在波や不均一音場を避ける工夫を行い超音波照射される。

しかし、本研究においては光学顕微鏡の観察用光路を優先し、培養プレート上方からの超音波照射となる。このため照射条件の検討が必要である。

2. 研究の目的

(1) 超音波照射条件の検討。

培養プレート底面の細胞に対して、プレート上方より超音波照射を行った場合に、遺伝子導入結果に影響を与える要因を把握する。

(2) 遺伝子導入細胞のリアルタイム観察法の

確立。

適切な蛍光ラベルの選択

超高分解能高速高感度共焦点顕微鏡を用いて、蛍光観察を行うために、目的に合わせて適切蛍光ラベルを選択する。

時間スケールの検討

時間分解が十分か、及びソノポレーションによる透過性上昇の持続時間スケールを検討する。後者は以下を意味する。膜透過性の上昇が超音波照射後も十分長く持続するのであれば、適切な条件で超音波照射を行った後に、細胞膜の動態観察を行うことが可能であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞及び超音波照射

細胞として、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞 (American Type Culture Collection) を使用した。細胞培養液は、ダルベッコ改変イーグル培養液 (DMEM) に 10% FBS, 100 U/ml ペニシリン, 100 U/ml ストレプトマイシンを添加して調製した。

0day 細胞の播種及び培養

懸濁した細胞 (2×10^3 細胞/1mL) を、96 穴培養プレート (Nunc) 上に、100 μ L 播種し、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ インキュベータ内で培養を行った。

2day ソノポレーション

培養プレートの各ウェルにプラスミド DNA (pEGFP-N3, Clontech) あるいは Propidium Iodide (PI), 及び微小気泡 (Sonazoid[®], GE Healthcare) を加えて、超音波照射装置 (SONTORON 2000V, NEPAGENE) の直径 6mm の超音波トランスジューサを用いて、培養プレート上方より超音波照射した。ソノポレーション後、プラスミド DNA あるいは PI が細胞内に取り込まれた。

超音波照射前後より、遺伝子導入細胞のリアルタイム観察を超高分解能高速高感度共焦点顕微鏡により行った。遺伝子発現の確認は、ソノポレーション 2 日後長時間露光型の蛍光顕微鏡を用いた。

4day 遺伝子発現の確認

緑色蛍光タンパク質 (GFP: Green Fluorescent Protein, Ex: 484nm ; Em 510nm) の発現により、生きた細胞で蛍光観察することができ遺伝子発現確認の指標とした。

(2) 超音波照射条件の検討

以下の 4 つの要因より、遺伝子導入に影響を与える項目を検討した。

照射距離, 照射強度, 照射時間, デューティ比. ~ の初期値は先行研究で用いられた値とした。照射距離は、超音波トランスジューサと培養プレート底面の距離として、ラックピニオンギヤによる粗動とマイクロメータによる微動が可能な位置合わせ治具を用いた。照射距離の設定は、トランスジューサの近距離音場限界 $N=6$ mm と培養プレートのウェルの深さを考慮し、 $L=3, 5, 7$ mm とした。

表1 L9 直交表 (試行の割り付けと実験結果)

Factor	L9 Orthogonal table				Condition of the experiment				Result
	a	b	c	d	Distance	Intensity	Period	Duty	Number of the emission of light point
	1	2	3	4	1	2	3	4	
1	1	1	1	1	5 mm	1 W/cm ²	30 s	1:1 (50%)	71
2	1	2	2	2	5 mm	0.1 W/cm ²	3 s	1:9 (10%)	52
3	1	3	3	3	5 mm	5 W/cm ²	150 s	1:0 (100%)	206
4	2	1	2	3	7 mm	1 W/cm ²	3 s	1:0 (100%)	80
5	2	2	3	1	7 mm	0.1 W/cm ²	150 s	1:1 (50%)	14
6	2	3	1	2	7 mm	5 W/cm ²	30 s	1:9 (10%)	152
7	3	1	3	2	3 mm	1 W/cm ²	150 s	1:9 (10%)	10
8	3	2	1	3	3 mm	0.1 W/cm ²	30 s	1:0 (100%)	9
9	3	3	2	1	3 mm	5 W/cm ²	3 s	1:1 (50%)	83

それぞれの要因に 3 水準の値を与え、各試行で 1 つの要因の水準のみを変更すると、 $3^4=81$ 通りの試行となる。この繰り返しを少なくするために実験計画法(タグチメソッド)を用いた L9 直交表に表 1 のように 9 つの試行を割り付けた。

4. 研究成果

(1) 超音波照射条件の検討

計測結果の一例を表 1, 図 1 に示す。また分散分析結果を表 2 に示す。分散分析は R 言語を用いて行った。変動の小さい照射時間を誤差として寄せ集めると、照射距離と照射強度は 1% で有意となり、照射距離、照射強度の管理が重要であることが示された。

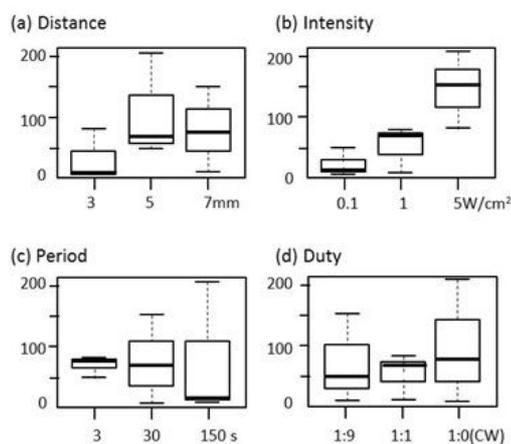


図 1 超音波照射条件検討結果 (箱ひげ図)

表2 分散分析

	DF	Sum Sq.	MeanSq.	F value	Pr(>F)	DF: 自由度,
Distance	2	8795	4397	152.81	0.00650**	Sum Sq.: 平方和 (変動),
Intensity	2	24417	12208	424.23	0.00235**	Mean Sq.: 不偏分散
Duty	2	2756	1378	47.89	0.02045*	F value: F 値,
Residuals	2	58	29			Pr: P 値

Signif. codes: ** : P<0.01, * : P<0.5

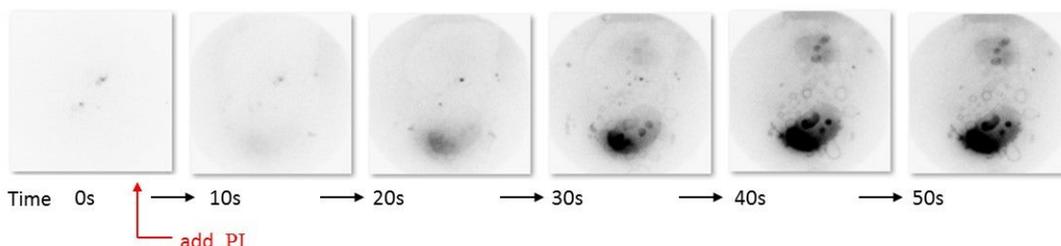


図 2 低分子量物質のソノレーションによる取り込み

(2) ソノポレーション細胞の観察

細胞と微小気泡のみ状態で超音波照射を行い、その後、分子量の異なる2つの物質を培養液に添加し、その取り込みを観察した。

低分子の取り込み

Propidium Iodide (分子量 668.39) は、死細胞を染色するために用いられ、生きた細胞の細胞膜は透過しない。

図2は、微小気泡存在下で超音波照射を行い、超高分解能高速高感度共焦点顕微鏡にて観察を始めてから、培養液にPIを添加した場合の観察結果である。PIの蛍光画像(Ex: 530nm ; Em 620nm)である。PI添加後、細胞膜をPIが透過し核酸が染色(画像では黒く表示)される様子が示されている。画像間の時間間隔は10秒である。

高分子の取り込み

プラスミドDNA(分子量 2921226.04)に対して、PI同様の操作を行い、24時間後にGFP発現を蛍光観察した。図3(a)に結果を示す。微小気泡に加えプラスミドDNAが存在する状態で超音波照射した場合である図3(b)に比べると、ほとんどGFPの発現が見られない。

以上、よりソノポレーションによる細胞膜の透過性の変化は、分子の大きさにより異なることが示された。

現在、超音波照射中のプラスミドDNAの動態の観察、解析を行っている。

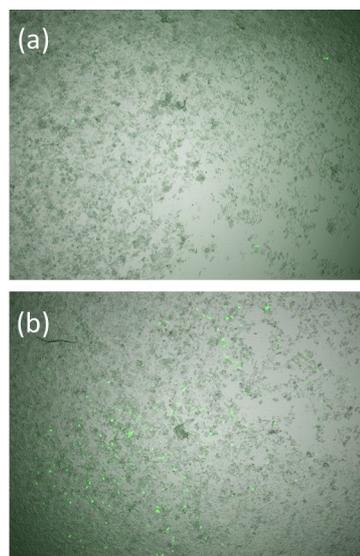


図3 プラスミドDNA(高分子)のソノポレーションによる取り込み

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- (1) Y. Oishi, T. Kakimoto, W. Yuan, S. Kuno, H. Yamashita, T. Chiba, "Fetal gene therapy for ornithine transcarbamylase deficiency by intrahepatic plasmid DNA- microbubble injection combined with hepatic ultrasound insonation", *Ultrasound Med Biol.*, Vol.42, No.6, pp. 1357-61, Jun. 2016. 査読有.
- (2) K. Kurokawa, Y. Suda, and A. Nakano, "Sar1 localizes at the rims of COPII-coated membranes in vivo", *J Cell Sci.*, Vol. 129, pp. 3231-3237, 2016. DOI: 10.1242/jcs.189423. (Selected IN THIS ISSUE, *J Cell Sci* 2016 129: e1701), 査読有.
- (3) M. Ishii, Y. Suda, K. Kurokawa, and A. Nakano A, "COPI is essential for Golgi cisternal maturation and dynamics", *J Cell Sci.*, Vol. 129, pp. 3251-3261, 2016. DOI: 10.1242/jcs.193367. (Selected IN THIS ISSUE, *J Cell Sci* 2016 129: e1702), 査読有.
- (4) 黒川量雄, 中野明彦, "ゴルジ体によるタンパク質輸送機構", *生物物理* Vol. 56, No. 4, pp.201-206, 2016. 査読有.
- (5) M. Iwai, M Yokono, K. Kurokawa, A Ichikawa, and A. Nakano, "Live-cell visualization of excitation energy

dynamics in chloroplast thylakoid structures", *Sci Rep.*, Vol. 6, pp. 29940, 2016. DOI: 10.1038/srep29940. 査読有.

[学会発表](計13件)

- (1) 宮本義孝, 池内真志, 野口洋文, 鈴木聡, 八木透, 生田幸士, 林衆治, "培養デバイス TASCL による初代肝細胞スフェロイド培養、および均一・大量生産系の確立", 第54回日本生体医工学会大会, 2015年5月7-9日, 名古屋.
- (2) 宮本義孝, 池内真志, 野口洋文, 鈴木聡, 八木透, 生田幸士, 林衆治, "培養デバイス TASCL を用いた肝細胞組織体の創製", 第22回HAB研究機構学術年会, 2015年6月26-27日, 東京.
- (3) 黒川量雄 (招待講演), 中野明彦, "細胞内膜交通の高速高感度高解像イメージング", 第67回日本細胞生物学会大会, 2015年7月2日, 東京.
- (4) 黒川量雄, 中野明彦, "Sar1 concentrates on the neck region of COPII-coated vesicle at the endoplasmic reticulum exit sites in vivo", *Cell biology of yeasts*, 2015年11月4日, Cold spring Harbor laboratory (New York) USA.
- (5) 石井みどり, 黒川量雄, 須田恭之, 中野明彦, "Studies on the molecular mechanism of cisternal maturation in budding yeast *Sacharomyces*

- cerevisiae”, Cell biology of yeasts, 2015 年 11 月 4 日, Cold spring Harbor laboratory (New York) USA.
- (6) 黒川量雄, 須田恭之, 中野明彦, ”Sar1 concentrates at the neck of COPII-coated vesicle in vivo”, 第 38 回日本分子生物学会年会 / 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸ポートピアアイランド 兵庫.
- (7) 黒川量雄 (selected speaker), 石井みどり, 中野明彦, “積荷タンパク質のゴルジ体槽間輸送機構”, 第 68 回日本細胞生物学会大会, 2016 年 6 月 16 日, 京都.
- (8) 黒川量雄 (invited speaker), “小胞体ゴルジ体間、ゴルジ体槽間のタンパク質輸送のイメージング”, 日本遺伝学会第 88 回大会, 2016 年 9 月 7 日, 静岡.
- (9) Kazuo Kurokawa (session organizer), “4D imaging of membrane trafficking in living *Saccharomyces cerevisiae*”, Imaging technology, 14th International Congress on Yeasts, Awagi Yumebutai, 2016 年 9 月 14 日, (Hyogo) Japan.
- (10) 宮本義孝, 池内真志, 野口洋文, 八木透, 生田幸士, 林衆治, “3 次元培養によるヒト脂肪由来幹細胞の脂肪への分化とマイクロテッシュの作製”, 第 68 回日本生物工学会大会 2016 年 9 月 28-30 日, 富山.
- (11) 宮本義孝, 池内真志, 野口洋文, 八木透, 生田幸士, 林衆治, “ヒト脂肪由来幹細胞からマイクロテッシュの大量作製”, 第 52 回日本移植学会総会, 2016 年 10 月 1 日, 東京.
- (12) 宮本義孝, 池内真志, 野口洋文, 鈴木聡, 八木透, 生田幸士, 林衆治, “培養デバイス TASCL を用いたヒト脂肪様細胞組織体の創製”, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 2017 年 1 月 31 日, 東京.
- (13) 佐藤智夫, 山下紘正, 宮本義孝, 黒川量雄, 千葉敏雄, “超音波遺伝子導入の光学的実時間観察のための超音波照射条件の実験計画法を用いた検討”, 電子情報通信学会超音波研究会, 2017 年 6 月 27 日, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 智夫 (SATO TOMOO)
 港湾空港技術研究所・専任研究員
 研究者番号: 10242918

(2) 研究分担者

千葉 敏雄 (CHIBA TOSHIO)
 日本大学・総合科学研究所・教授
 研究者番号: 20171944
 宮本 義孝 (MIYAMOTO YOSHITAKA)
 国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・共同研究員
 研究者番号: 20425705
 黒川 量雄 (KUROKAWA KAZUO)
 理化学研究所・光量子工学研究領域・専任研究員
 研究者番号: 40333504