

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07147

研究課題名(和文) 磁場を利用した選択的遺伝子導入系、および遺伝子発現操作系の開発

研究課題名(英文) A novel strategy of selective gene delivery by using a uniform magnetic field

研究代表者

伊達木 穰 (Dateki, Minori)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生化学・助教)

研究者番号：00415879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は磁場を利用し局所的な遺伝子導入効率の制御を行う手法を確立することを目的として実施した。検証の結果、1.5 mTの一樣磁界が培養細胞内の活性酸素レベルを一過性に低下させることを見出した。また、活性酸素により機能が抑制される遺伝子導入担体を用いた遺伝子導入実験に際し1.5 mTの一樣磁界を作用させたところ遺伝子の導入効率が増強されることを見出した。培養容器内で局所的に磁界を強めることで培養細胞への遺伝子導入効率を局所的に増強させることにも成功している。動物体内での遺伝子導入効率の増強についても検証を行い、磁界の作用により遺伝子導入効率が増強されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物体内への遺伝子の導入手法にはウイルスベクターや非ウイルス性のカチオン性高分子等が広く利用されており臓器によっては高効率での導入が可能である。非ウイルス性のカチオン性高分子等による遺伝子導入に関しては、その効率を光により制御し任意の部位への遺伝子導入効率の増強、抑制が可能なケースも報告されている。これら光による遺伝子導入効率の制御に関しては有用性が認められるものの、生体組織深部への光の作用は限定的であり依然として技術的な困難を伴う。本研究は生体深部に対しても比較的容易に作用する磁場を利用し局所的な遺伝子導入効率の制御を行う手法を確立する目的で実施した。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish a novel procedure for uniform magnetic field-dependent enhancement of transfection efficiency. We examined effect of a 1.5 mT uniform magnetic field on cellular reactive oxygen species (ROS) level and transfection efficiency mediated by a ROS-sensitive transfection carrier. Our experimental results revealed that a 1.5 mT uniform magnetic field transiently decreased cellular ROS level and strongly enhanced transfection efficiency mediated by polyethylenimine (PEI). The uniform magnetic field-dependent enhancement of PEI-mediated in vivo transfection was confirmed in the livers of mice. Local intensification of a uniform magnetic field in a culture dish resulted in selective gene delivery into cells on the target area. Although further examination and improvement are necessary for this procedure, our findings provide a novel option for spatial control of gene delivery.

研究分野：遺伝子操作

キーワード：遺伝子導入手法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

実験動物体内への遺伝子の導入手法にはウイルスベクターや非ウイルス性のカチオン性高分子等が広く利用されており臓器によっては高効率での導入が可能である。非ウイルス性の遺伝子導入試薬に関しては近年、高効率化、低毒性化が顕著であり、取り扱いも比較的容易であることから広く基礎研究に用いられている。また、非ウイルス性のカチオン性高分子による遺伝子導入に関しては、その効率を光により制御し任意の部位への遺伝子導入効率の増強、抑制が可能ケースも報告されている。これら光による遺伝子導入効率の制御に関しては高い有用性が認められるものの、生体組織深部への光の作用は限定的であり依然として技術的な困難を伴う。これに対して磁界は比較的容易に生体組織深部に対し作用することができる事から種々の誘導実験への応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究は磁界を利用した遺伝子導入効率の制御手法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

遺伝子導入試薬として利用されているカチオン性高分子の中には細胞内の活性酸素レベルによって遺伝子導入効率が著しく変化するものがある。また、一様磁界が細胞内の活性酸素レベルを変化させるとの報告が多数なされていたことから、これらの現象を利用した遺伝子導入効率の制御手法の開発に取り組んだ。

4. 研究成果

一様磁界による細胞内活性酸素レベルへの影響は条件により増強、抑制いずれも報告されている事から、使用を想定する強度の一様磁界が培養細胞内の活性酸素レベルにどのように影響するか検証した。その結果、1.5 mTの一様磁界により細胞内の活性酸素レベルが一過性に低下することが見いだされた(コントロール群に比較して25%ほど減少)。この一過性の活性酸素レベルの変化を利用して活性酸素により作用が抑えられる遺伝子導入試薬 Polyethylenimine (カチオン性高分子)の働きを制御する事を試みた。polyethylenimine を用いた培養細胞への遺伝子導入実験に際し1.5 mTの一様磁界を作用させたところ、遺伝子の導入効率が顕著に増強されることが示された(図1)。この一様磁界による増強効果は複数の細胞腫で確認され、その増強効率には細胞腫間で差異がある事も明らかになった。また、この一様磁界による増強効果は polyethylenimine-DNA 複合体の細胞あたりの dose が低いほど顕著である事も見いだされた。これらの新たな知見に基づき、磁界を用いた局所的遺伝子導入手法の確立に取り組んだ。その基礎としてヘルムホルツコイルおよび二本の鉄柱を利用し、培養容器内において局所的に磁界の強度を高める系を確立した(図2)。これにより10cm径の培養シャーレ内で局所的に polyethylenimine による遺伝子導入の効率を増強させることに成功した。動物体内での遺伝子導入効率の増強についてもマウスを用いて検証を行った。培養細胞系に比較して効果は低いものの一様磁界を作用させることで polyethylenimine による肝臓への遺伝子導入の効率が増強されることを示した。

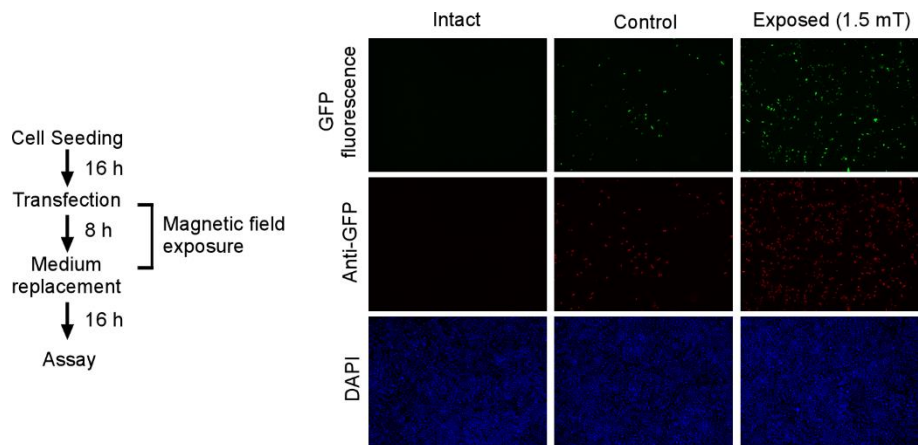


図1 1.5 mTの一様磁界による遺伝子導入効率の増強
左：実験手順、右：蛍光像。HEK293A細胞を使用。

これまでに実用されている磁界を使った遺伝子導入効率の増強手法は、DNA を吸着させた磁気ビーズを勾配磁界の磁気力で引きつけることで効率を高めるものであり、生体組織深部を対象とした遺伝子導入には適用が難しい。今後の改善の余地はあるものの本研究の成果として得られた新たな操作技術は将来的にそのような目的への応用が見込まれる。

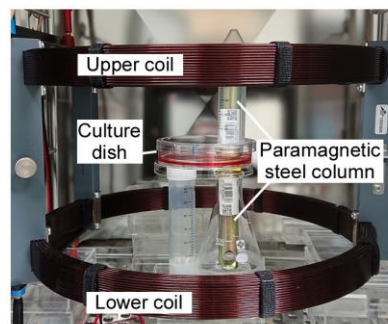
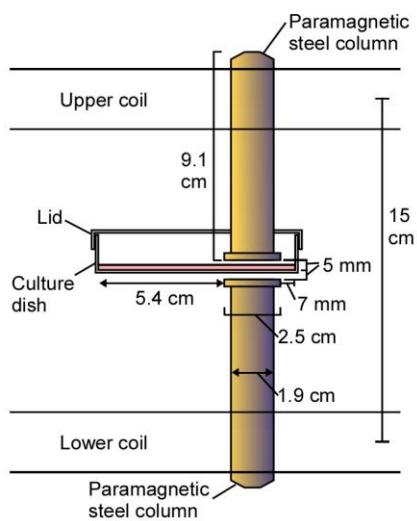


図2 局所的に磁界を増強する系の概要. ヘルムホルツコイルで作られた弱い一様磁界の中で2本の鉄柱が磁化され、鉄柱に挟まれた狭い空間に周辺より強い磁界が形成される. 左: コイル、鉄柱、培養容器の位置関係. 右: 実際の写真. これらの装置をCO₂ インキュベーター内に設置して実験を実施した.

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 Minori Dateki, Osamu Imamura, Masaaki Arai, Hidehisa Shimizu, Kunio Takishima	4. 巻 16(4)
2. 論文標題 A novel strategy of selective gene delivery by using a uniform magnetic field	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology journal	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.202000233	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊達木 穰
2. 発表標題 遺伝子導入効率制御手法の検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊達木 穰
2. 発表標題 遺伝子導入効率制御手法の検討
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------