

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：57102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K04458

研究課題名（和文）ナノ秒パルスを用いたマルチパルスエレクトロポレーターの開発

研究課題名（英文）Development of multi-pulse electroporator using the nanosecond pulse

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：高電圧ナノ秒パルスに低電圧ミリ秒パルスを組み合わせたマルチパルスエレクトロポレーター（ナノ秒マルチパルスEP）を試作し、数種類の細胞種（浮遊細胞，接着細胞）に対するGFP導入実験を行い導入効率について調査した。シンプルなパルス条件で実験を実施し、その後の細胞状態をもとに簡単なプロットを描くことで、細胞種毎に導入の可否や導入効率が高いパルス条件を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子などの物質を受精卵や細胞に導入する技術には物理的方法、化学的方法、生物学的方法があるが、導入率・生存率・実験効率（時間効率）・費用・実験者に求められる熟練度などに関して各方法には一長一短がある。これら短所を改善し、技術の向上を目指して研究開発したナノ秒マルチパルスEP装置は、簡単な操作で、さまざまな細胞種に対し効率良い条件設定を容易に見出すことができ、さらに低侵襲な物質導入ができる可能性を持つことが分かった。このような特徴をもつ本装置は、生物学・医学・薬学などの研究に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A multi-pulse electroporator that combined a commonly used low-voltage millisecond pulses with a high-voltage nanosecond pulse was made as a prototype, and transfection efficiencies of GFP (Green Fluorescent Protein) for both type of cells, adherent cells and floating cells, were investigated.

Experiments were performed under relatively simple pulse conditions and plots based on the cell states were drawn. These plots showed possibilities of transfection for each cell and the pulse conditions resulting in better transfection efficiency.

研究分野：パルスパワー工学

キーワード：エレクトロポレーション ナノ秒高電圧パルス HL-60 CHO RAW264.7 THP-1 GFP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子などの物質を受精卵や細胞に導入する技術には物理的方法、化学的方法、生物学的の方法があるが、導入率・生存率・実験効率(時間効率)・費用・実験者に求められる熟練度などに関して各方法には一長一短がある。これら短所を改善し、技術向上することは、遺伝子導入の研究や胚細胞に対する導入物質の影響調査をおこなう上で大変有用なことである。

電気パルスを用いて遺伝子を導入する方法としてエレクトロポレーション法(Electroporation Method、EP法)がある。EP法は電気パルスを溶液中の細胞に印加し細胞膜に一時的な孔を発生させ、そこから遺伝子等を導入する技術である(図1)。従来のEP法ではマイクロ秒からミリ秒オーダーの比較的長い継続時間の矩形波パルスや減衰波パルスを1回~数回印加することが一般的であった。EP法は操作が簡便であるが、低い導入効率が弱点であり、導入効率の向上が求められてきた。

近年、複数の異なる電気パルスを組み合わせたエレクトロポレーター(マルチパルスEP装置)が数社のメーカーから販売された。これは細胞膜に孔を形成する電気パルス(ポアリングパルス、P.P.)を最初に印加し、引き続き物質の移動・導入を促す電気パルス(トランスファーパルス、T.P.)を印加するというものである(図2)。

市販されているマルチパルスEP装置の出力波形で一般に公開されているものをみると、数発(1~4発)の数百ボルト・数ミリ秒オーダーのP.P.、数発(1~5発)の数十ボルト・数十ミリ秒オーダーの正負パルスのT.P.、各パルス間隔は数十ミリ秒である(図3)。この波形を用いたマルチパルスEP装置を用いることで、導入効率が従来のEP装置によるものよりも大きく向上したという報告が多数ある[1]。しかし、細胞の種類によっては未だ遺伝子導入が困難なものが依然としてあること、さらにDNA導入後の状態が好ましくない(数日経過すると細胞が死亡するなど低侵襲とは言えない)細胞があることなど、さらなる向上が求められているのが現状である。

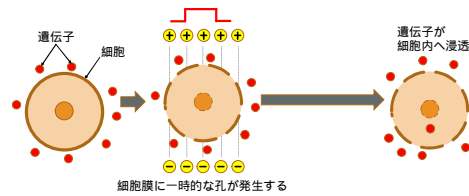


図1 EP法(従来)

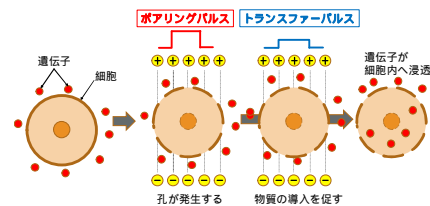


図2 マルチパルスEP

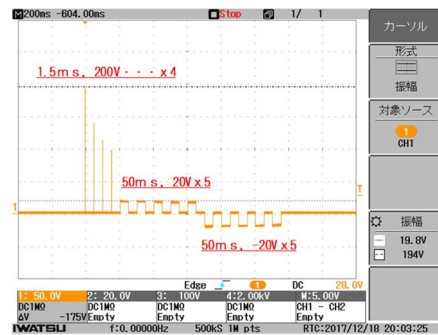


図3 市販マルチパルスEPの波形例

(2) 本研究室では、これまでのマルチパルスEP装置では使用されていないナノ秒高電圧極短パルスをP.P.として採用し、これにT.P.として従来のEPエレクトロポレーションでも使用される低電圧長パルスを組み合わせたナノ秒マルチパルスEPを提案し実験を行ってきた。これを用いたメダカ受精卵への化学物質導入実験では、受精卵卵膜に一時的な孔を形成し、化学物質を導入できることを確認した[2]。次に対象をHL-60細胞(ヒト白血病細胞株、浮遊細胞)、とし、GFP発現プラスミド導入実験を行った。その結果、ナノ秒高電圧極短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、低電圧長パルスを組み合わせることで導入効率が高くなる条件を見出す簡便な手法を提案することができた[3]。

参考:

- [1] スーパーエレクトロポレーター NEPA21 Type , ネッパジーン株式会社ホームページ, (2024年4月1日, <https://nepagene.jp/products/electroporation/nepa21>)
- [2] N. Tominaga, et al., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74 (6), 2010, pp. 1279-1282
- [3] Susumu Kono, Nobuaki Tominaga, Proc. of IEEE Pulsed Power and Plasma Sci., (2019)

2. 研究の目的

(1) 本研究は、さまざまな細胞種に対し導入効率の向上が見込めるマルチパルスEPをナノ秒高電圧極短パルスと低電圧長パルスの組み合わせであるナノ秒マルチパルスEPで実現することを目的とする。

(2) ナノ秒マルチパルスEPにより、現在のマルチパルスEPでは導入が困難な細胞への物質導入や低侵襲な物質導入が行えるパルス条件が判明できれば、生物学・医学・薬学などの研究に大きく貢献できると考える。

3. 研究の方法

(1) ナノ秒高電圧極短パルスは出力パルス幅 (50, 100, 200, 250 ns) に対応したパルス発生装置 (ブルームライン線路型) を製作し, 適宜取り換えた。低電圧長パルスは任意のパルス幅 ($\mu\text{s} \sim \text{ms}$) を半導体素子のスイッチング動作で出力できるような RC 放電回路を製作した。これらを組み合わせてナノ秒マルチ EP 装置とした (図 4)。使用する組み合わせパルスはシンプルにナノ秒パルス (負極性), ミリ秒パルス (正極性または負極性) とともに 1 発の組み合わせとした。(図 5)。ただし, この組み合わせでは導入困難と判明した細胞に対してはミリ秒をさらに複数に分けるバーストパルスでも実験を行った。パルス印可は細胞種ごとの細胞懸濁液 (細胞濃度約 10^7 個/ml) をキュベット (ギャップ長-容量: 2 mm-100 μl , 4 mm-, 200 μl) に入れて行い, その後の様子を蛍光顕微鏡で観察した。導入物質は, 導入状況を調べるために GFP ベクター (pEGFP-N3vector) と蛍光標識デキストラン, 細胞状態を調べるために PI (Propidium Iodide) と Hoechst33342 を用いた。一部細胞は参考[1]にあげた市販 EP 装置を用いて結果を比較した。

(2) 本研究室で培養を行い実験対象とした細胞は, HL-60 (ヒト白血病細胞株, 浮遊細胞), RAW264.7 (マウス単球性白血病由来細胞株, 付着細胞), CHO (チャイニーズハムスター卵巣細胞, 付着細胞), THP-1 (ヒト由来急性単球性白血病細胞, 浮遊細胞) である。なお, THP-1 については外部の研究機関でも実験を実施した。

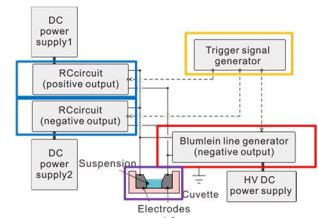


図 4 ナノ秒マルチ EP

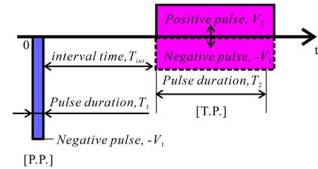


図 5 パルス波形

4. 研究成果

(1) R2 年度は主に HL-60 を使った実験を行った。パルス極性の実験結果より, 仕様上, 負極性パルスが出力されるナノ秒高電圧 (P. P.) に対して, ミリ秒低電圧パルス (T. P.) は“負極性”のほうが“正極性”に比べ, GFP 発現個数が明らかに多くなることが分かった。次に P.P. から T.P. を印加するまでのインターバル時間を変化した実験結果より, インターバル時間は 100 マイクロ秒 ~ 10 ミリ秒のほうが, 100 ミリ以上に比べ, GFP 発現個数が多くなることが分かった。

(2) R3 年度は主に RAW264.7 を使った実験を行った。P.P. のパルス幅と電圧を 50 ns, 2.1 ~ 3.5 kV / 100 ns, 1.5 ~ 2.5 kV / 250 ns, 0.9 ~ 1.6 kV / 3 us, 274 ~ 456 V と変化した GFP 導入実験では, いずれもパルス幅でも多少の差はあるもののポアリングパルスとしての役割を果たしていることが判明した。T.P. の極性は, HL-60 と同様に“負極性”のほうが良好と判明した。P.P. を 100 ns, 2.0 kV と固定し, T.P. のパルス幅と電圧を大きく変化させて実験を行った。観察結果から, 横軸を T.P. エネルギー, 縦軸を T.P. の電界 (= 電圧/キュベットのギャップ長) としたときの細胞の状況-影響なし, 良好な導入, ダメージ大 (図 6) を散布図としてプロットした (図 7)。これより良好な導入ができる組み合わせパルスの最適条件の範囲が判明した。PI と Hoechst33342 による死細胞と生細胞の確認を行い, 組み合わせパルスによって低侵襲で GFP 導入ができていることが分かった (図 8)。

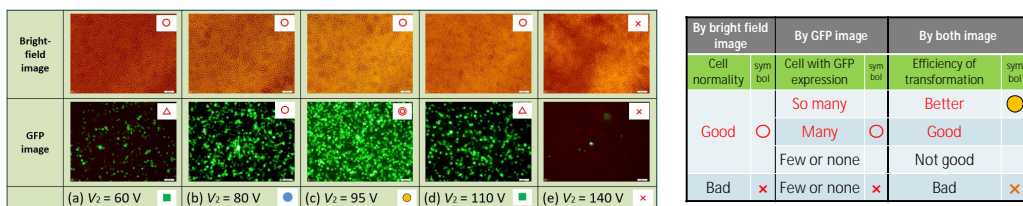


図 6 導入実験 (RAW264.7, GFP)

パルス条件: $T_1 = 100 \text{ ns}$, $V_1 = -2.0 \text{ kV}$, $T_{int} = 1 \text{ ms}$, $T_2 = 50 \text{ ms}$, $V_2 = 60 \sim 140 \text{ V}$

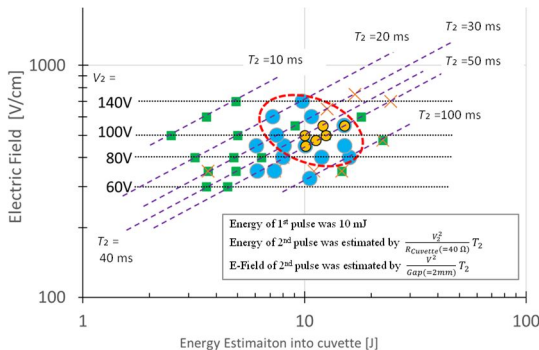


図 7 パルス条件と導入状況 (RAW264.7) (赤破線の領域で良好な導入結果が得られる)

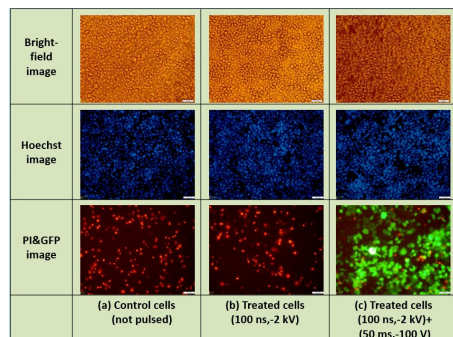


図 8 死細胞と生細胞の様子 (青:生細胞, 赤:細胞, 緑:GFP)

(3) R4 年度は主に CHO を対象に実験を行った。P.P.のみ, T.P.のみ, P.P.+T.P.の組み合わせパルスを用いた実験で, P.P.のみでは導入はできないこと(画像無し), T.P.のみでパルス幅や電圧が長く高くなると GFP 導入ができること, T.P.+P.P.を組み合わせると, T.P.のみに比べ GFP の導入個数が格段に増加することが分かった(図 9)。作成した導入状況の散布図(図 10)から良好な導入条件が判明し, CHO の最適条件は RAW264.7 とほぼ同等であることが分かった。

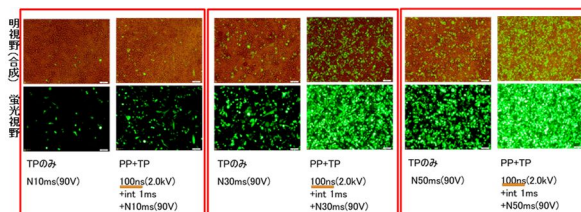


図 9 T.P., P.P.+T.P.による導入状況(CHO)
(P.P.を加えることで導入が大幅に増加する)

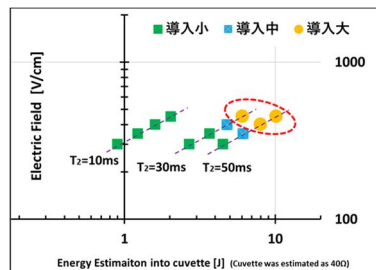


図 10 パルス条件と導入状況(CHO)
(赤破線で良好な導入が得られる)

(4) R5 年度は THP-1 を対象とした。蛍光標識デキストラン(コスモ・バイオ, 非帯電, 分子量 2000 kDa)を濃度 10mg/ml に調整し, PP を 100 ns, 1.0 kV, インターバル 1 ms, T.P.のパルス幅 20, 40, 60 ms, 電圧 40~90 V と変化した時のデキストランの導入の可否を確認した(図 11)。観察結果をもとにパルス幅毎に生存率と導入率をグラフ化した(図 12, 60ms)。図より 2000 kDa のデキストラン導入状況が変化するしきい値が TP 電圧にはパルス幅毎にあること, 電圧がある値を超えるとダメージとして現れることが分かった。

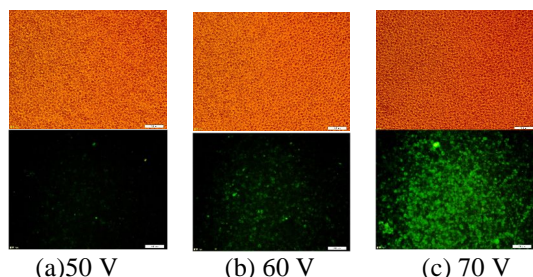


図 11 蛍光標識デキストラン導入実験

明視野(上)・蛍光視野(下)

T.P.: パルス幅 60 ms,
電圧(a)50 V, (b) 60 V, (c) 70 V

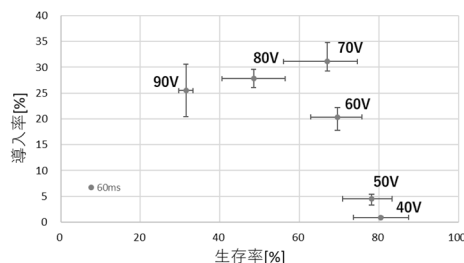


図 12 導入率-生存率グラフ(60 ms)
50V~60V に導入状況が変わる閾値がある。
70V~80V の生存率が低下する閾値がある。

パルス条件と導入状況の散布図を描くための実験を行ったところ, これまでの細胞で使用した P.P.電圧(2.0 kV)ではダメージが大きいこと, これまでの細胞で確認ができた良好な導入が得られる領域が狭く, 導入細胞数も非常に少ないことが分かった。そこで P.P.電圧 1.0 kV, 通常 T.P.と T.P.を複数に分割したバーストパルス(B.P.)を用いて実験を行った。同時に市販 EP 装置を用いて実験を行い, 結果を比較した。1 日後の GFP 導入率は TP42%, BP49%, 市販 EP49% とほぼ同等であった。1 日後から 4 日後の生存率の変化は, TP8% 15%, BP13% 47%, 市販 EP10% 6% であった。1 日後の導入率は同程度であったが, 数日後の生存率に差が現れた。

他研究機関で, ナノ秒マルチパルス EP(T.P.は B.P.とした)と市販 EP による GFP 導入実験を行った。フローサイトメトリー(FACS)で, 24 時間後と 96 時間後の GFP 陽性率と生存率を解析してもらった(図 13)。結果より, 24 時間後の GFP 陽性率(BP18%:市販 EP20%)は同程度, 24 時間後から 96 時間後の生存率の変化(BP67% 21%, 市販 EP58% 4%)をみると, B.P.は市販 EP よりも減少の度合いが小さく, 細胞に対して低侵襲である可能性が示唆された。

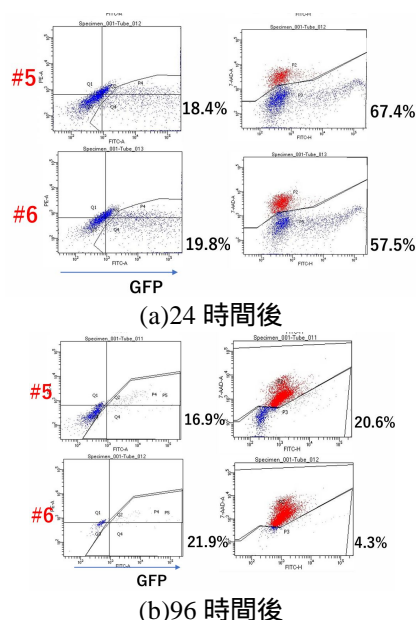


図 13 FACS による解析結果
#5: BP, #6: 市販 EP
左: GFP 陽性率, 右: 生存率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 -
2. 論文標題 GFP Introduction for RAW264.7 Cells by Combining Nanosecond High Voltage Pulse and Millisecond pulse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 2021 IEEE Pulsed Power Conference (PPC)	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/PPC40517.2021.9733150	査読の有無 無
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4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, 松本 光二郎, 渥美 優介, 明日山 康生, 富永 伸明
2. 発表標題 ナノ秒高電圧パルスを用いたマルチパルスエレクトロポレーション技術によるCHO細胞へのGFPベクター導入実験
3. 学会等名 2022年度(第75回) 電気・情報関係学会九州支部連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生山 也真登, 富永 伸明, 河野 晋
2. 発表標題 THP-1細胞を対象としたマルチパルスEP法による遺伝子導入実験
3. 学会等名 2023年度(第76回) 電気・情報関係学会九州支部連合大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三井 愛斗, 徳永 篤朗, 富永 伸明, 河野 晋
2. 発表標題 マルチパルスEP法による細胞膜に形成される孔の大きさの推定
3. 学会等名 2023年度(第76回) 電気・情報関係学会九州支部連合大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三井 愛斗, 生山 也真登, 富永 伸明, 河野 晋
2. 発表標題 マルチバルスEP法によるTHP-1細胞に対するデキストラン導入実験
3. 学会等名 令和5年度 電気学会九州支部沖縄支所講演会
4. 発表年 2023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
研究分担者	富永 伸明 (Tominaga Nobuaki) (30227631)	有明工業高等専門学校・創造工学科・教授 (57102)	

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