

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：34412

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22654070

研究課題名（和文）集積型マイクロプラズマを用いた高性能遺伝子導入法の開発

研究課題名（英文）Development of High Performance Gene Transfection Methods Using Microplasma Integrated Devices

研究代表者

橘 邦英（TACHIBANA KUNIHIDE）

大阪電気通信大学・工学部・教授

研究者番号：40027925

研究成果の概要（和文）：

集積型マイクロプラズマジェットを用いて、標準的な細胞に緑色蛍光タンパク遺伝子を導入する実験を試み、照射後一日間培養した細胞内に遺伝子が導入されていることを確認した。その機構を解明するために、何種類かのプラズマ源を用いて実験を行った。その結果、遺伝子導入には電界のみではなく、プラズマで生成された荷電粒子の効果が大きいことが推定された。この知見に基づいて、電荷を効率的に供給できるエレクトロスプレー法を開発し、細胞の死滅率を抑制しながら比較的高い導入効率が得られる条件を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We have tried gene transfection experiments using an integrated device composed of microplasma jets. After the irradiation of plasma jet onto COS cells mixed with GFP genes and cultivation of those cells for 24 hours, the GFP genes have been successfully transfected into a certain amount of cells. Through a series of experiments with several kinds of plasma sources, it is concluded that the effects of transported electric charges from plasma produced particles play a key role in the transfection mechanisms. Upon this understanding, we have developed a new electro-spray method in which a higher efficiency of transfection is achieved with suppressing the damages on living cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	0	2,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	150,000	2,950,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：プラズマ科学

キーワード：反応性プラズマ、マイクロプラズマ、プラズマメディシン、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

細胞への遺伝子導入技術は、万能細胞の生成などを始めとして、各種の医療応用において基盤的な技術になってきている。従来用いられている分子・遺伝子導入技術としては、

マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、トランスフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロ気泡超音波法などがある。その中で、エレクトロポレーション法は高電圧（電界）

パルスを加えることにより、細胞膜構造を一時的に不安定化して DNA などを取り込ませるといふ、電気的な刺激を利用した方法である。最近になって、気体放電プラズマを培養細胞に照射する遺伝子導入の方法が提案され、実用化に向けた研究がベンチャー企業等で進められてきている。しかし、そのプラズマ源として用いられているものは既存の放電装置であり、細胞の大きさや特性に対して最適化されたものでないため、従来法に比べて高効率導入の可能性が示されているものの、導入確率や細胞の生存率に対する再現性や信頼性に乏しく、基本的な原理に基づく改良が求められている。

2. 研究の目的

遺伝子などの巨大分子を高効率にかつ再現性よく目的の細胞へ導入する技術として、本研究では 2 次元集積構造のプラズマ源によって気液界面で生成された放電プラズマを利用する「高性能プラズマトランスジェニックス技術」を開発する。また、その技術を実際に標準的な培養皮膚細胞への遺伝子導入に適用し、プラズマ診断と細胞の動態観察の両面から性能を検証しながら、更に高性能化をはかるための技術改良を進め、実用的なプラズマ応用装置としての設計原理や使用条件の最適化における指針を確立する。

3. 研究の方法

まず、マイクロプラズマ源を用いた遺伝子導入の実験装置を構築し、その基本的機能を検証するために、マーカーとなる GFP (緑色蛍光蛋白) 遺伝子を標準的な細胞へ導入する研究を進めていく。

図 1 にはその装置の外観を示す。図中には 4 本のプラズマジェットを束ねたプラズマ源が示されている。そのプラズマ源の直下にサンプルの COS 細胞 (アフリカ緑ザル由来の細胞) pCX-EGFP という蛍光発現遺伝子を入れたシャーレを配置し、一定速度で回転させながらプラズマを照射する。位置 (距離) や時間を変化させながらプラズマを照射したサンプルを一定時間 (通常 1 日) 培養した後、顕微鏡と CCD カメラによる観測によっ

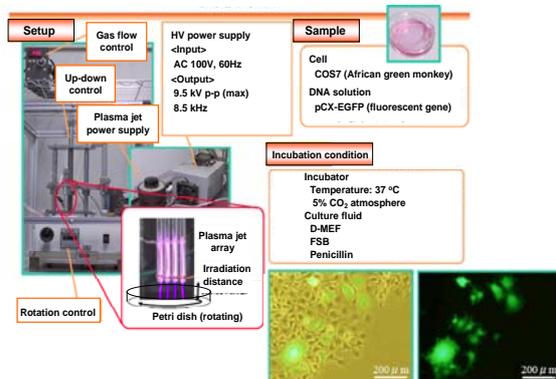


図 1 遺伝子導入装置の構成と実験条件

て、遺伝子導入率や細胞生存率などを評価する。得られた結果を系統的に分析することによって、プラズマ源の構造の改良や実験条件の最適化を行う。そこでは、各動作条件の下で、プラズマから細胞への電界、荷電粒子、ラジカル種による刺激と遺伝子導入確率、細胞死滅確率などの結果を関係づけて、プラズマ照射の効果に定量的な考察を加える。

4. 研究成果

(1) マイクロプラズマジェットの配列を用いた実験

① 実験の概要

図 1 に示したような (1x4) 本の配列および (3x3) 本の配列のプラズマ源も用いて遺伝子導入の実験を進めた。各ジェットから噴出するジェットが適当な長さをもつために、1 本あたり 1 L/mni 程度のガス流量が必要であった。しかし、そのガス流に直に曝される場所では、細胞が吹き飛ばされたり乾燥してしまったりするため、ジェットが通る軌跡から少し離れた同心円状の領域で比較的高い確率で遺伝子が導入されていた。

② 遺伝子導入の評価

顕微鏡の視野をマッピングしながら、シャーレ内の全領域にわたって蛍光遺伝子が導入された細胞の数 n をカウントした。プラズマ生成に投入した電力 E とガス流量 F を可変の動作条件として、結果をプロットした例を図 2 に示す。この例は、プラズマ源として

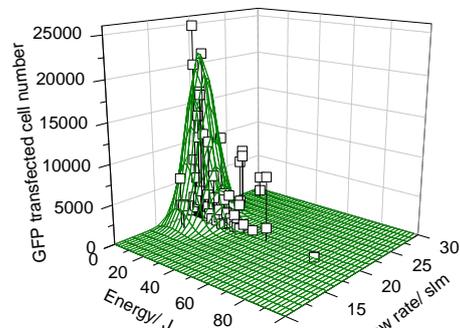


図 2 遺伝子導入数の動作条件依存性

アーク放電型のものを用いたものであるが、マイクロプラズマジェットの配列を用いた場合でも同様であった。 n は次式で示されるように、 E と F に対して、次式で与えられるように、其々、 w_E と w_F の半値幅の範囲で最適な条件が存在することがわかる。

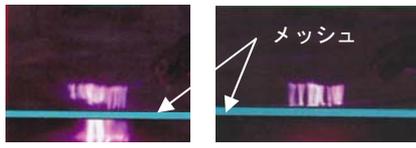
$$n = n_0 \exp \left[-\frac{(E - E_0)^2}{2w_E^2} - \frac{(F - F_0)^2}{2w_F^2} \right]$$

係数 n_0 は最大値であり、アーク型での 2×10^4 に対してジェット型では何れも 1×10^3 程度であった。一方、細胞生存率 η は E と F の両者に対して単調に減少する傾向を示した。

③ メカニズムに関する解析

上記のプラズマ源以外にも、直接プラズマがサンプルに触れないように、絶縁体被覆導線間の誘電体バリア放電を利用するタイプも試みた。それらの結果を総合して、遺伝子導入には、印加電圧による電界の効果やプラズマで生成された反応活性な中性粒子の効果以上に、サンプル表面に輸送される荷電粒子が直接的に影響を及ぼしていることが推察された。そこで、プラズマから輸送される荷電粒子を途中で取り除いて、その差異を見るために以下の実験を行った。

図3は集積型マイクロプラズマジェットのプラズマ源の下流に其々(a)誘電体メッシュと(b)金属メッシュを配置したときのジェットの様子を示したものである。前者の場合には、ジェットが貫通してサンプルまで直接到達しているが、後者の場合には導体のメッシュのところまでプラズマが遮断されている。その場合でも、電荷を持たない中性粒子や紫外線などは到達していると考えられる。遺伝



(a) 誘電体 (b) 金属
図3 メッシュの種類によるプラズマジェットの進展の違い

子導入率は、(a)の場合にはメッシュの開口率に対応する程度の減少はしたが、(b)の場合のように激減はしなかった。この結果からも、サンプルに輸送されるプラズマ生成種の中では、中性ラジカルより荷電粒子の方が遺伝子導入への効果が大きいことが示された。

(2) 極細管ノズルを用いた実験

更に、電界の効果と荷電粒子の効果を識別するために、プラズマジェットのガラス管の代わりに金属製の外径70 μm のキャピラリー（極細管）を電極として、サンプルの近傍で微細な放電プラズマを生成する実験を試みた。図4にその実験配置の概観を示す。

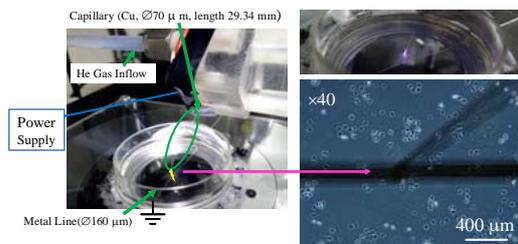


図4 キャピラリーノズルからのマイクロプラズマジェットを用いた遺伝子導入の配置

交流印加電圧の周波数は20kHzであるが、25kHzでデューティ比1%のパルス変調をかけている。このときの印加電圧に対して測定された遺伝子導入率（左縦軸）と細胞生存率（右縦軸）の変化を図5に示す。

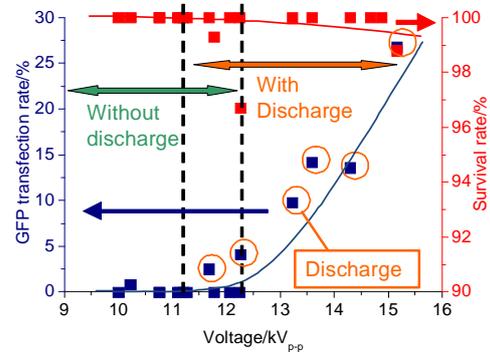


図5 キャピラリージェットを用いた場合の遺伝子導入率と細胞生存率の印加電圧依存

印加電圧が12 kV以下では放電が起こっておらず、遺伝子も導入されていないが、それ以上の印加電圧では放電が生成し、その強さと共に導入効率が増加している。細胞生存率は放電開始と共に少し下がっていく傾向を示している。このことから、印加電圧で誘起される電界だけでは遺伝子導入が起こらないことが示された。

(3) エレクトロスプレーを用いた実験

以上の結果を受けて、遺伝子導入には標的細胞あるいは導入する遺伝子（タンパク分子）へ電荷を有効に帯電させる方法を開発することが、導入効率を上げることにつながるとの推論を立てた。

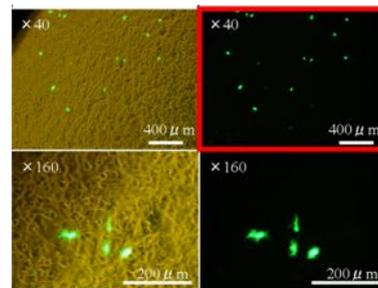
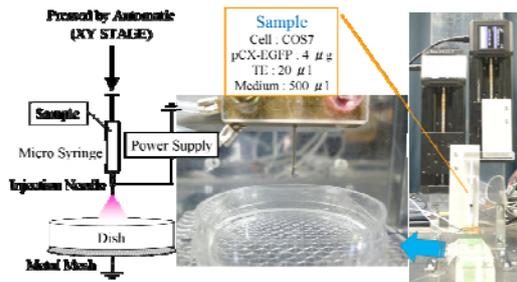


図6 (a) エレクトロスプレー法の概観と (b) 処理後1日培養した細胞の蛍光観察

そこで、**図 6 (a)** に示すようなエレクトロスプレー法を構築して実験を進めた。本方法では、注射器のシリンジに溜めた溶液を金属細管の針先から抽出するときに、針先と対向電極（サンプルを入れたシャーレの下部に設置）に電圧を印加すると、液滴が帯電して霧状に噴霧される原理を利用する。溶液の内容物として、i) 培養液、ii) 培養液+遺伝子分子、iii) 培養液+遺伝子分子+標的細胞の3通りの組み合わせがある。ある一定条件で遺伝子導入を試みたサンプルについての蛍光観測例も同図**(b)** に示している。

現在、これらの組み合わせの選択に動作条件の最適化を合わせて、死滅率を抑制しながら、より高効率の遺伝子導入が実現できる方法を開発中である。

(4) 考察と展望

本研究では、プラズマを用いた高性能の遺伝子導入法の開発を進め、集積型マイクロプラズマジェットやキャピラリーノズルプラズマジェットなど種々のプラズマ源を試行した。得られた結果を総合的に解析することから、プラズマから試料に輸送される荷電粒子が遺伝子導入に大きな役割を担っていることを突き止めた。その考察に基づいて、より効果的に荷電粒子を輸送し、試料の標的細胞あるいは導入タンパク分子の表面に帯電させることができるかを検討し、エレクトロスプレー法を活用した新しい遺伝子導入法を提案した。今後は、その最適化をはかりながら、実用的な遺伝子導入法へと完成させていきたい。本研究で得られた主な成果は、学会発表と知財申請の形で公表してきたが、さらに学術的な内容を高めて、論文として公表していくことを考えている。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

- ① H. Motomura, J. Matsuda, K. Ikeda, T. Okihiro, M. Jinno, K. Tachibana, S. Satoh, N. Saeki, 4th International Conference on Plasma Medicine (Orleans, France, June 18, 2012).
- ② T. Okihiro, J. Matsuda, K. Ikeda, H. Motomura, M. Jinno, K. Tachibana, S. Satoh, N. Saeki, Validation of Plasma Irradiation Effect on Gene Transfection by Using Microplasma Jet from Capillary Nozzle, 4th International Conference on Plasma Medicine (Orleans, France, June 18, 2012).
- ③ H. Motomura, J. Matsuda, K. Ikeda, T. Okihiro, M. Jinno, K. Tachibana, S. Satoh, N. Saeki, Gene Transfection by

Electric Charge Injection Using Electrospray Technique, 4th International Conference on Plasma Medicine (Orleans, France, June 18, 2012).

- ④ 沖廣 仁、池田健太郎、松田 淳、本村英樹、神野雅文、橘 邦英、佐藤 晋、佐伯登、プラズマ遺伝子導入法における電荷の効果の検証、応用物理学会(東京、2012年3月16日)
- ⑤ 沖廣 仁、池田健太郎、松田 淳、本村英樹、神野雅文、橘 邦英、佐藤 晋、佐伯 登、遺伝子導入のためのマイクロプラズマジェットの最適化、応用物理学会(山形、2011年8月31日)。

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

名称: 標的細胞への選定分子の導入法およびそれに用いる選定分子導入装置(エレクトロスプレー法)

発明者: 神野雅文、本村英樹、橘 邦英、
沖廣 仁、佐藤 晋、佐伯 登

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-134989

出願年月日: 平成 24 年 6 月 14 日

国内外の別: 国内

名称: 標的細胞への選定分子の導入法およびそれに用いる選定分子導入装置(マイクロキャピラリープラズマ法)

発明者: 神野雅文、本村英樹、橘 邦英、
沖廣 仁、佐藤 晋、佐伯 登

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-134990

出願年月日: 平成 24 年 6 月 14 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橘 邦英 (TACHIBANA KUNIHIDE)

大阪電気通信大学・工学部・教授

研究者番号: 40027925

(2) 研究分担者

神野 雅文 (JINNO MASAFUMI)

愛媛大学・理工学研究科・教授

研究者番号: 30274335

(平成 22 年度)

(2) 研究分担者

本村 英樹 (MOTOMURA HIDEKI)

愛媛大学・理工学研究科・助教
研究者番号：80332831
(平成 22 年度)

(3) 連携研究者

橋本 公二 (HASHIMOTO KOJI)
愛媛大学・医学研究科・教授
研究者番号：00110784
(平成 22 年度)

(2) 研究連携者

白方 裕司 (SHIRAKATA YUJI)
愛媛大学・医学研究科・講師
研究者番号：50226320
(平成 22 年度)

(2) 研究連携者

神野 雅文 (JINNO MASAFUMI)
愛媛大学・理工学研究科・教授
研究者番号：30274335
(平成 23 年度)

(2) 研究連携者

本村 英樹 (MOTOMURA HIDEKI)
愛媛大学・理工学研究科・助教
研究者番号：80332831
(平成 23 年度)