

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：33302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656275

研究課題名(和文) レーザ誘起創発的インパルス応力波による遺伝子導入法の開発と細胞影響の遺伝学的解析

研究課題名(英文) Development of gene transfection and genetic analysis by Laser induced Emergent Stress Wave

研究代表者

小木 美恵子 (Kogi, Mieko)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：50410288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト由来の細胞に外来遺伝子を導入する技術は、遺伝子治療や再生医療の基本的技術である。本研究は、あらゆる細胞に適用可能で、かつ高い導入効率を示す遺伝子導入を目指して、レーザ誘起創発的応力波(LIESW)を用いた遺伝子導入システムの開発を行った。レーザはQスイッチNd:YAGレーザを用い、応力波発生素子としてエチレンプロピレンゴムとポリエチレンテレフタレートからなる固体素子を用いた。外来物質の導入にはピーク圧力値は10MPa以上必要であり、細胞の接着面に対して反対側からレーザを照射することで100%近い導入効率を示した区画を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The technology which introduces foreign genes into the human cell is the fundamental technology of gene therapy or regeneration medicine. In this study, we developed the gene introduction system using the Laser induced Emergent Stress Wave for any kind of the cell and high gene introduction efficiency. Q-switch Nd:YAG laser was used and, a solid element consisting of EPDM and polyethylene terephthalates were used as a stress wave outbreak element. The peak pressure level was necessary for the introduction of the foreign material more than 10MPa. We were able to obtain the division that showed a little less than 100% of introduction efficiency by irradiating a laser from the other side for an adhesion side of the cell.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・制御工学

キーワード：応力波 Nd:YAGレーザ 遺伝子導入

4. 研究成果

黒色ゴム (NR) の厚さ 0.5mm, 1.0mm, 3.0mm の応力波発生素子を用いて LIESW 処理し, 24時間培養後のHeLa細胞の生細胞率を図3に示す.

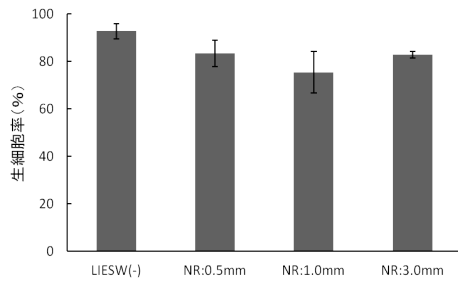


図3 HeLa細胞の生細胞率

LIESW 打ち込み24時間後の生細胞率は, NRの厚さに関係なく, 約80% ~ 90%と一定であった.

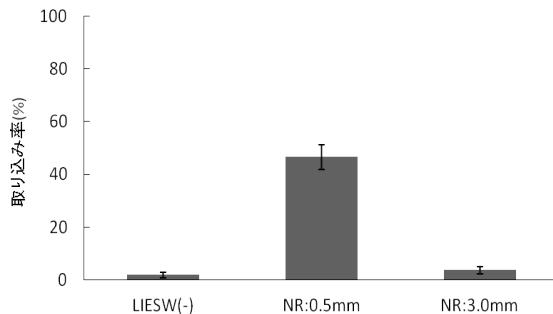


図4 FITCデキストランの取り込み率

[物質導入の検討]

黒色ゴム (NR) の厚さ, 0.5mm と 3.0mm の素子を用いて LIESW 処理をして, 3時間培養後のFITCデキストランの取り込み率を調べた. その結果を図4に示す. NR 0.5mmの素子を用いた場合の取り込みが著しく高く, 約40%であった.

一方, NR 3.0mmでは約5%の取り込み率で LIESW なしのnegative controlとほぼ同じ値を示し, FITCデキストランが取りこまれていないことが分かった.

[LIESWの acoustic signature]

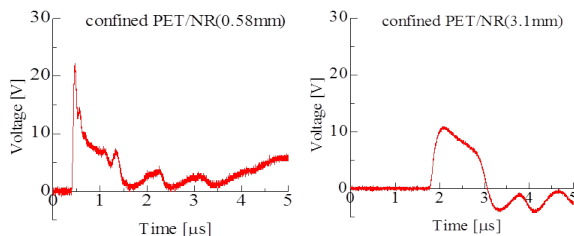


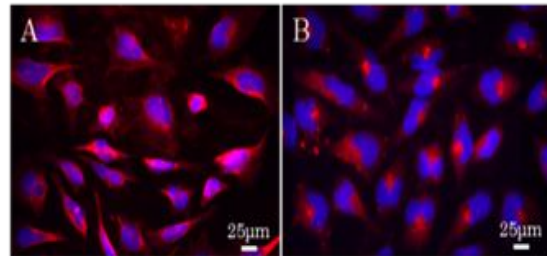
図5 NR 0.5mm

図6 NR 3.0mm

図5と図6は図4の実験時のLIESWの波形を示している. どちらもレーザーフルエンス $1.7\text{J}/\text{cm}^2$ で照射したが, NRの厚さの違いにより, LIESWのacoustic signatureのプロファイルは大きく異なっている. NR

0.5mmでは, レーザ照射後わずか $0.5\ \mu\text{s}$ でプラズマの膨張によるアブレーションが見られ, そのピーク電圧は20V以上であった. 一方, NR3.0mmでは立ち上がり時間が約 $1.8\ \mu\text{s}$ と大幅に遅れ, そのピーク電圧は約10Vであった. ゴム厚が増加すると acoustic signatureの先頭に現れる鋭いピークは消失し, 台形上の波形のみが残ることを見出した. さらにこのピークはレーザー照射時に発生した衝撃波に由来し, また, 波形が立ち上がる時間は, ゴム厚に比例して増加し, LIESWの伝搬速度は音速を超えていた. このacoustic signatureの先頭に現れる鋭いピークは細胞を剥がす役割をしていると同時に, FITCデキストランの取り込みに深く関与していることも示唆している.

また, LIESWのacoustic signatureを離散フーリエ変換したところ, NRが厚いほど, 1MHz以上の高周波成分が大きく減衰していた. HeLa細胞は培養ディッシュ上で細胞基質接着と呼ばれる細胞マトリックス接着をしており, 細胞の下部には接着斑という構造が存在する. その典型的な接着分子はカドヘリンやインテグリンである. 接着している細胞が剥がれるということは, この細胞マトリックス接着よりも, 強い力が細胞の下部に加わり, 接着斑の構造が破壊されたことを意味している (図7).



LIESW 前

LIESW 後

(青: 核, 赤: コラーゲンタイプIV)

図7 免疫染色 (コラーゲンタイプIV)

また, 4kDa, 2.8nmのFITCデキストランが取り込まれたことは, 脂質二重層からなる細胞膜に少なくとも数nmの隙間が開いたことを示唆している.

[細胞種による導入効率]

接着細胞としてHeLa細胞とVero細胞を, 浮遊細胞としてHL60細胞とEB細胞を用いた. 導入時のピーク圧力値は10MPa ~ 30MPaで, 導入物質としてFITC-デキストランと pEGFPプラスミドDNAを用いた. HeLa細胞, Vero細胞ともにFITC-デキストランの物質導入は, シャーレの中心部ほど物質の取り込み率が高く, シャーレの周辺部で取り込み率が低くなり, シャーレ全体の物質取り込み率は約25%であった. HL60細胞へのFITC-デキストランの物質導入では約3%

と低く、Ramos 細胞においても約7%と接着細胞と比較すると大きく減少していた(図8)。

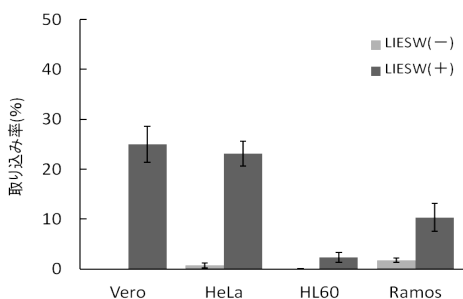


図8 FITC 取り込み率 (シャーレ全体)

pGFPの導入率はHeLa細胞, Vero細胞の順に高く, HL60細胞では大きく減少していた(図9)。

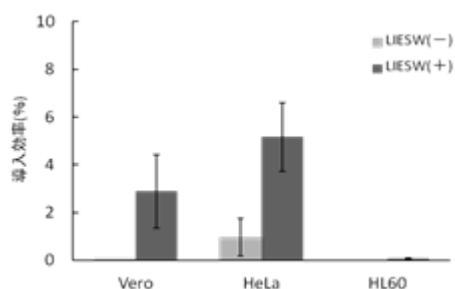


図9 GFP 導入効率 (シャーレ全体)

また, 細胞外マトリックスの主成分である, インテグリンやコラーゲンタイプIVはシャーレ中心部で最も剥がれていた。

[本研究の完成系]

以上, これらのデータをもとに以下の条件を本研究の完成系とした。

レーザー: QスイッチNd:YAGレーザー
 応力波発生素子: エチレンプロピレンゴム (EPDM)

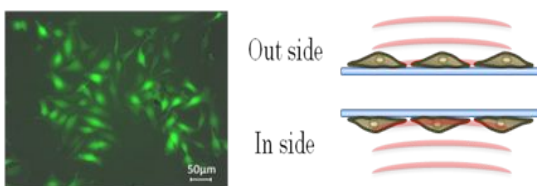


図10 FITC 蛍光画像

LIESW が細胞膜に向かって発生するように打ち込んだ実験系では, FITC-dextranの取り込み率が, 場所によっては約100%まで向上した。

[今後の課題]

本システムによる遺伝子導入は, 接着細胞に対して有効であるが, 浮遊細胞に対してはまだ, 改善の余地があることが判明した。浮遊細胞に対しては, LIESW 処理時に細胞を物理的に固定するか, 化学的に補足する等の工夫が必要であると思われる。ま

た, 本研究では主にHeLa細胞を用いたため, LIESW による細胞の細胞遺伝学的安全性評価ができなかった。今後, 正常な核型の線維芽細胞を用いることにより, LIESW による細胞の安全性評価を行うことが課題として残った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

2013年 < 査読有 > (計1件)

Motoaki Nishiwaki, Mieko Kogi and Yoshiaki Tokunaga, “Accoustic signature of stress waves emerged by target with direct or confined geometry in Q-switched nanosecond pulse laser irradiation” *Accoust. Sci & Tech.* 34, 3 (2013) pp. 206-208

2013年 < 査読無 > (計3件)

小木美恵子, 杉山尚玖, 柳澤隆康, 西村駿, 會澤康治, 得永嘉昭, “浮遊細胞におけるレーザー誘起創発的応力波による遺伝子導入の実験的検討” *信学技報* Vol.2013, No.55, 2013-11, pp.11-14

得永嘉昭, 折坂駿介, 會澤康治, 小木美恵子, “レーザー誘起創発的応力波による遺伝子導入の問題点とその検討” *信学技報* Vol.US2013, No.56, 2013-11, pp.15-19

會澤康治, 富永淳司, 折坂駿介, 小木美恵子, 得永嘉昭, “レーザー誘起創発的応力波の伝搬に関する実験的検討とヒト培養細胞に与える影響” *信学技報* Vol.2013-54, 2013-11, pp.5-10

2012年 < 査読有 > (計1件)

Yoshiaki Tokunaga, Motoaki Nishiwaki and Mieko Kogi, “Accoustic signature of stress waves in endothermic surface absorbing targets by Q-switched Nd:YAG pulse laser irradiation” *Accoust. Sci & Tech.* 33, 2 (2012) pp. 121-122

2012年 < 査読無 > (計6件)

竹内光恵, 小木美恵子, 會澤康治, 西村駿, 木村政尊, 西脇基晃, 得永嘉昭, “レーザー誘起応力波による細胞への外来物質の取り込み, IEICE Technical Reprt US2012-64, 2012-10, pp5-8

西脇基晃, 小木美恵子, 會澤康治, 得永嘉昭, “ナノ病高強度パルスレーザー光を使う創発的応力波の研究 I, IEICE Technical Reprt US2012-6, 2012-04, pp29-32

Koji Aizawa and Yoshiaki Tokunaga,
“Dynamics of Second Harmonic in
Nonlinear Surface Acoustic Waves and
A Proposal of Its Device
Application”, AIP Conf. Proc. 1474,
pp.398-401 (2012)
(DOI:10.1063/1.4749378)

會澤康治, 中 善弘, 富永惇司, 得永嘉昭,
“レーザと複合構造基板との相互作用
によるパルス応力波の創発 薄膜黒色ター
ゲットを用いた閉じ込め構造の検討”, 信
学技報, US2012-67, 2012, pp.17-22

會澤康治, 吉田翔一, 牧野友哉, 得永嘉昭,
“ナノ秒高強度パルスレーザ光を使う
創発的応力波の研究” 信学技報,
US2012-15, 2012, pp.11-16

得永嘉昭, 西脇基晃, 會澤康治, “レー
ザと複合構造基板との相互作用による正方
向性応力波の創発モデルの検討” 信学技報,
US2012-68, 2012, pp.23-28

2011年<査読無>(計4件)

M.Kogi, H. Ishimaru, M. Nishiwaki,
H. Miyawaki, E. Uchida and Y. Tokunaga,
“Experimental discisions on emergent
impulse stress wave for gene
transfection into cells” IEICE
Technical Report, 2010-97,
(2011-1)pp31-34, [in Japanese].

M.Kogi, M.Nishiwaki, T.Sakurai,
E.Uchida, K. Aizawa and Y. Tokunaga,
“Development of a new method for
gene transfer by laser induced stress
wave” IEICE Technical Report,
2011-26, (2011-7)pp21-25, [in
Japanese].

得永嘉昭, 吉村政俊, 西脇基晃, 會澤康治,
小木美恵子, “Nd:YAGレーザ誘起イン
パルス応力波の創発に関する論理的検討”
電気情報通信学会信学技報, Vol.2010,
No.96, 2011-01, pp.25-30

得永嘉昭, 西脇基晃, 石丸幸大, 小木美恵子,
“レーザと表面熱吸収ターゲットの
相互作用によるインパルス応力波の創発”
電子情報通信学会, Vol.2011, No.26,
2011-07, pp.27-32

〔学会発表〕(計6件)

小木美恵子, 柳澤隆康, 西村駿, 杉山尚
玖, 杉本貴弘, 會澤康治, 得永嘉昭, “細
胞種に問わないLIESW(レーザ誘起創発的
応力波)による遺伝子導入の開発” 第13回
再生医療学会, 2014年3月4~6日, (京
都) 国立京都国際会館

柳澤隆康, 小木美恵子, 西村駿, 會澤康治,
得永嘉昭, “Characterization of
gene transfection by LIESW” 第36回日本
分子生物学会, 2013年12月3~6日, (神
戸) 神戸国際会議場

小木美恵子, 竹内光恵, 會澤康治, 得永嘉昭,
“レーザ誘起応力波を用いた遺伝子
導入およびDDSへの開発” 第12回再生医療
学会, 2013年3月21~23日, (横浜) パシ
フィコ横浜

折坂駿介, 會澤康治, 竹内光恵, 小木美恵子,
得永嘉昭, “レーザ誘起創発的応力
波の効率的形成に関する基礎研究” 日本音
響学会2013年春季研究発表会, 2013年3月
13日, (東京八王子) 東京工科大学

竹内光恵, 小木美恵子, 會澤康治, 西村駿,
内田恵理子, 得永嘉昭, “Nd:YAGレ
ーザによる応力波を用いた遺伝子導入” 第
35回日本分子生物学会, 2012年12月11~14
日, (福岡) 福岡国際会議場

得永嘉昭, 西脇基晃, 小木美恵子, 會澤康治,
“遺伝子導入用インパルス応力波の
創発に関する基礎研究” 日本音響学会
2012年春季研究発表会, 2012年3月13日,
(横浜) 神奈川大学

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小木 美恵子 (KOGI, Mieko)
金沢工業大学・バイオ・化学部・教授
研究者番号: 50410288

(2) 研究分担者

得永 嘉昭 (TOKUNAGA, Yoshiaki)
金沢工業大学・工学部・教授
研究者番号: 00072174

内田 恵理子 (UCHIDA, Eriko)
国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医
薬部・第1室 室長
研究者番号: 80176685

會澤 康治 (AIZAWA, Koji)
金沢工業大学・工学部・教授
研究者番号: 40222450