

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650230

研究課題名(和文)高出力フェムト秒レーザーによる哺乳類胚の単一細胞の遺伝子改変技術の確立

研究課題名(英文)Single cell photoporation in mammalian embryos induced by a femtosecond laser

研究代表者

田中 幹子(Tanaka, Mikiko)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：40376950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウス胚の胚体内の単一細胞を遺伝子改変する技術を確立することを目的として行われた。この目的で、我々は、全胚培養したマウス胚にフェムト秒レーザーを用いて、バイオナノ粒子の導入を試みた。まず、E9.0期のマウス胚において、卵黄嚢の表面の血管を避けて、小さな穴を開けた上で、ガラスキャピラリーを通して、バイオナノ粒子を神経管に導入した後に、卵黄嚢の穴を塞ぎ、その上で、フェムト秒レーザーを400 nJの強度で照射させた。その結果、マウス胚の単一神経細胞に10,000 Da以下のバイオナノ粒子を物理的に導入できることが確認された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we demonstrate that the effective introduction of biomolecules into targeted single cells in mammalian embryos by photoporation using a femtosecond laser amplifier with a high pulse energy and a low repetition rate. Briefly, E9.0 mouse embryos with closed yolk sacs were cultured, and then injected ~10,000 Da biomolecules into the neural tube. Subsequently, laser pulses of 400 nJ were focused on the surface of the neural tube through a small slit made in the yolk sac. At 24 hours post-injection, biomolecules were successfully delivered to single neurons of mouse embryos. These results suggest that our single cell photoporation technique could be applied to a mammalian embryos.

研究分野：発生生物学

キーワード：レーザー 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

従来の哺乳類胚の領域特異的な遺伝子改変技術は、領域特異的なプロモーター配列を利用し、時間と手間のかかるトランスジェニックを作製することで行われている。現在では、経時的にも遺伝子発現操作を行うために、トランスジェニック動物に遺伝子発現誘発剤を用いた方法などが確立されているが、単一細胞レベルでの遺伝子操作方法の確立までには至っていない。また、疾患モデル動物胚を用いた実験系においても、細胞レベルのドラッグデリバリーの技術が必要とされる局面が多いが、現状では不特定多数の細胞群への導入法しか確立されていない。また、近年の iPS 研究の障害になっていることからわかるように、細胞の遺伝子改変をウイルスベクターやケミカルを利用せずに行う技術の確立が課題とあっている。このような背景から、我々はフェムト秒レーザーを用いて、動物胚の単一細胞に遺伝子やナノ粒子を物理的に導入する方法の確立を試みてきた。これまでにゼブラフィッシュ胚やニワトリ胚では単一細胞にモルフォリノオリゴやプラスミドの導入に成功しており、ゼブラフィッシュ胚では単一細胞に RNA を導入することで、細胞の運命変更も可能であることを確認している。また、直径数 nm の半導体粒子をゼブラフィッシュ胚の細胞に物理的に導入することにも成功しており、タンパクや薬剤を胚体の単細胞に導入する技術へとする足がかりを得ている。

2. 研究の目的

本研究では、高出力フェムト秒レーザーを用いて、哺乳類胚体の単一細胞レベルへのバイオナノ分子の導入を行う技術の確立することを目標とした。哺乳類胚は幅広い分野で広く用いられているモデル動物であるが、特定の発生段階に、単一細胞レベルでバイオナノ粒子を導入する技術は確立されていない。本手法では、我々が確立したフェムト秒レーザーによる単一細胞へのバイオナノ粒子導入法を元に、卵黄嚢に包まれたマウス胚の特定の単一細胞に遺伝子操作を目的とした DNA, RNA, モルフォリのオリゴなどのバイオナノ分子を物理的に効率的に導入する技術できる技術の基盤の確立を試みる。さらに、胚体の特定の細胞へのドラッグデリバリー技術の確立を視野に入れ、ここでは、サイズの比較的大きい分子 (10,000 Da のデキストラン) を導入する条件を明らかにすることとした。本手法により、従来の時間と手間のかかるトランスジェニック動物を作製することなく、胚体の特定の細胞だけを遺伝子改変する新しい技術の一つとして発展させ、実験動物の研究分野に大きく貢献させたい。

3. 研究の方法

高出力フェムト秒レーザー装置

高出力フェムト秒チタンサファイアレーザーを倒立顕微鏡に導き、10 倍の対物レンズ (開口数 0.25) を用いて、顕微鏡の結像面に集光し、1 kHz の周期でパルスを照射した (図 1)。

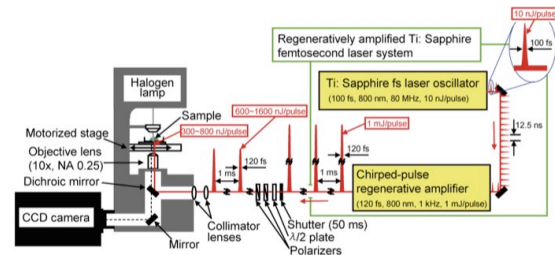


図1 マウス胚の単一細胞へのバイオナノ分子のフォトリポレーションに用いた高出力フェムト秒レーザーのセットアップ (Hosokawa et al., 2009, *Appl Sur Sci* より転載)

マウス胚の単一細胞へのフォトリポレーション

ステージ E9.0 のマウス胚はレーザー照射の前に 37°C に温めたラット血清 (Charles River Japan) 中で、37°C で 2 時間回転培養した。次に、胚をタイロッド液 (Sigma) に移し、ライヘルト膜を除去し、卵黄膜に小さな穴を開け、ガラスキャピラリーを用いて、5 % 蛍光デキストラン (tetramethylrhodamine and biotin, 10,000 MW, lysine fixable, Invitrogen) を神経管に導入した。フェムト秒レーザー照射時は、胚はタイロッド液の入ったシャーレにおいて、レーザーは卵黄膜に開けた小さな穴を通過させ、神経管の表面に焦点を絞った (図 2)。レーザー照射後すぐに、マウス胚をそれぞれ 37°C に温めた 1 ml のラット血清中で培養した。マウス胚を培養するラット血清を入れたチューブは、20 % O₂/5% CO₂/75 % N₂ を充填し、37 °C の回転培養器にセットした。マウス胚は、培養 24 時間後に 4 % パラホルムアルデヒド/PBS で固定し、蛍光実体顕微鏡 (Leica) で観察した。

4. 研究成果

まず、マウス胚の単一細胞にフェムト秒レーザーを用いてバイオナノ分子を導入させるための培養系の確立を試みた。E9.0 のマウス胚をレーザー照射前に 37°C で 2 時間ラット血清中で回転培養し、さらに、ライヘルト膜を取り除き、卵黄膜の表面の血管を避けて、小さな穴を開けた。フェムト秒レーザーを、卵黄膜に開けた小さな穴を通過させて、胚表面のターゲット細胞に焦点を充てた後、穴を塞ぎ、すぐにラット血清中で 37 °C で回転培養すれば、24 時間まで正常に発生できることを確認した。

次に、マウス胚の単一細胞にレーザーパル

スを用いて、バイオナノ分子を導入するためのレーザーの条件の検討を行った。これまでに、高繰り返し (>50 MHz) の低パルスエネルギー (<1 nJ) のレーザーパルスを用いて、培養細胞に対して高効率にバイオナノ分子を導入する手法は複数報告されている (図 2B)。培養細胞へのレーザーでの遺伝子導入については、多光子吸収によるレーザーアブレーションにより細胞膜の微小破壊と膜流動が誘導されることで、バイオナノ分子が細胞膜内に取り込まれるという説明がなされている。しかしながら、培養細胞と比べると透明度が低く、厚みのあるマウス胚では、多光子吸収に起因するレーザーアブレーションを引き起こすことは容易ではない。しかしながら、本研究では、低繰り返し (1 kHz) の高エネルギー (>10 nJ) のレーザーパルスを用いることで、マウス胚の単一細胞の細胞膜にアブレーションに起因する微小破壊を誘導できることを確認した (図 1、図 2A)。

そこで、で培養したマウス胚の単一細胞に、低繰り返しで高エネルギーのレーザーパル

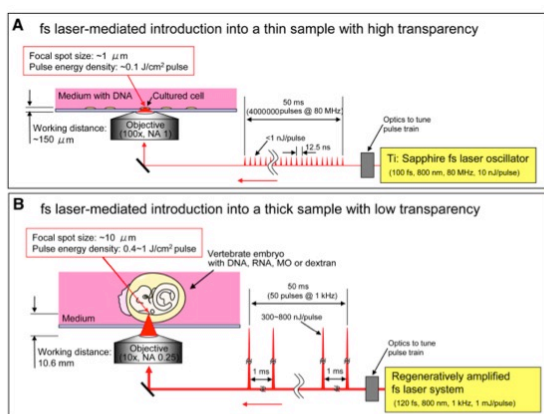


図2 (A) 培養細胞には高繰り返し、低パルスエネルギーでバイオナノ分子の導入が報告されてきた。(B) マウス胚には低繰り返し、高パルスエネルギーでバイオナノ分子が導入可能であった (Hosokawa et al., 2011 より転載)。

スでバイオナノ分子の導入を試みた。その結果、卵黄膜の表面に開けた小さな穴から、ガラスキャピラリーを用いて、10,000 Da の蛍光デキストランを神経管に注入した後、その小さな穴を通過させ、単一神経細胞に焦点をあわせて 400 nJ のレーザーパルスを照射させた。その後、卵黄膜の穴を塞ぎ、ラット血清中で 37°C で回転培養させると、24 時間後に単一神経細胞で、デキストランの蛍光が確認された (図 3)。

これらのことから、高出力フェムト秒レーザーを用いたフォトポレーション技術によ

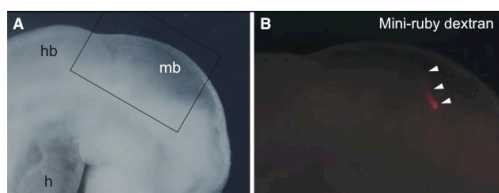


図3 (A) E9.0 のマウス胚の頭部。h, heart; hb, hindbrain; mb, midbrain. (B) (A) で示した領域の蛍光画像。単一神経細胞 (矢尻) に蛍光デキストランが導入されている (Hosokawa et al., 2011 より転載)。

り、マウス胚の単一細胞に 10,000 Da までの分子量の分子を物理的に導入可能であることが示された。

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 2 件)

- ① 田中幹子 (2013). レーザー技術を応用した発生学研究の新展開. Proceedings of the 79th Laser Materials Processing Conference, 79, 31-35. (ISBN: 978-4-947684-80-6) 査読有
- ② 細川陽一郎 (2012). バイオ分野に注目されるフェムト秒レーザー細胞プロセス. 応用物理, 82, 63-67. (<http://www.jsap.or.jp/ap/2013/01/ob820063.xml>, ISBN: 0369-8009) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 田中幹子, フェムト秒レーザーによる高等脊椎動物胚の単一細胞への遺伝子導入, 超短パルスレーザー細胞プロセス研究会 (招待講演), 2014 年 4 月 13 日、奈良先端大、奈良県生駒市
- ② 田中幹子, レーザー技術を応用した発生学研究の新展開, 第 79 回レーザー加工学講演会 (招待講演), 2013 年 5 月 7-8 日、関西大学、大阪府吹田市
- ③ 細川陽一郎, 超短パルスレーザーによる高等動物胚への DDS, 第 51 回日本生体医工学大会 (招待講演), 2012 年 5 月 10-12 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

[その他]

ホームページ等

東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生体システム専攻 細胞・発生生物学講座 発生生物学分野 田中幹子研究室ホームページ
http://mswebs.naist.jp/LABs/env_photo_greenbio/Index/index.html

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 レーザーナノ操作科学研究室 (細川陽一郎研究室) ホームページ
http://mswebs.naist.jp/LABs/env_photo_greenbio/Index/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 幹子 (TANAKA MIKIKO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授
研究者番号: 40376950

(2)研究分担者

細川 陽一郎 (HOSOKAWA YOHICHIRO)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：20448088