

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560263

研究課題名(和文) ミー散乱増強光の時空間制御による核内分子デリバリー

研究課題名(英文) Direct molecular delivery into nucleus by spatiotemporally controlled enhanced Mie scattering light

研究代表者

寺川 光洋 (Terakawa, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：60580090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：超高速ミー散乱増強光を用いて、細胞全体の機能を損なわない高スループット・細胞核プロセッシング技術を創出することを目的とした。そして、細胞膜と核膜の一括アブレーションによる核内へのダイレクト分子デリバリーを試みた。実験研究により、蛍光標識したプラスミドDNA/リボソーム複合体を細胞に導入すると、レーザー照射直後に複合体が細胞質だけでなく細胞核内においても観察され、また、導入したプラスミドDNAの発現によるGFP由来の蛍光が得られた。以上より、細胞膜と核膜の一括アブレーションにより、細胞膜だけでなく核膜の透過性も亢進した核内への分子デリバリーが示唆された。

研究成果の概要(英文)：High-throughput processing of cell nuclear membrane was investigated by using ultrafast enhanced Mie scattering light. Simultaneous laser ablation of cell membrane and nuclear membrane was also studied for achieving direct molecular delivery into nucleus. The fluorescence of the plasmid DNA/liposome complexes was detected in the nucleus as well as cytoplasm after laser illumination for microspheres. The direct delivery of complexes into the nucleus is probably attributed to the enhancement of the nuclear membrane permeability by the enhanced optical field obtained close to the nucleus.

研究分野：レーザープロセッシング

キーワード：フェムト秒レーザー ドラッグデリバリー レーザー医療

1. 研究開始当初の背景

細胞膜および核膜の透過性亢進による分子デリバリーは、遺伝子治療や再生医療といった次世代医療および生命科学における細胞機能解明と制御において必要不可欠である。近赤外の集光フェムト秒レーザーによる細胞プロセッシング(非熱的ナノサージェリー)は細胞膜への小孔形成や細胞小器官破壊による細胞機能制御を可能とするが、伝搬光による多光子プロセッシングでは単一の集光焦点における処理となり、多数の細胞の一括処理は難しい。回折限界を大幅に下回るナノスケールの細胞のプロセッシングを高スループットで実現できれば、ナノサージェリーの特長を活用した分子デリバリーに有用である。研究代表者らは、本研究開始時までの研究において、誘電体粒子に近赤外波長の非集光フェムト秒レーザーを照射すると、超高速ミー散乱増強光がナノスケールで局在することに着目し、同増強光を細胞膜のプロセッシングに利用することで細胞膜透過性の亢進が可能であることを実験実証した。誘電体粒子(生分解性高分子)がナノレンズとして働くことで、粒子近傍に存在する細胞膜に微小孔を形成できる。同技術を細胞膜のみならず核膜のプロセッシングに活用するためには、任意の増強光強度分布を得て、光と核膜を相互作用させることが課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、超高速ミー散乱増強光を用いて、細胞全体の機能を損なわない高スループット・細胞核プロセッシング技術を創出することを目的とした。そして、細胞膜と核膜の一括アブレーションによる核内へのダイレクト分子デリバリーを試みた。

3. 研究の方法

(1) 誘電体へのフェムト秒レーザー照射により発生する増強光につき、レーザーパラメータおよび誘電体粒子の大きさと屈折率に対する特性を調べた。Finite-Difference Time Domain (FDTD) 法により、ポリ乳酸 (Polylactic Acid, PLA) 粒子、乳酸・グリコール酸共重合体 (Poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA) 粒子、ポリスチレン粒子へのレーザー照射により得られる集光場の光強度分布を計算した。この計算は以下に述べる実験研究と並行して進め、計算結果と実験結果を比較して考察を行った。

(2) 細胞膜上に多数の PLA 粒子もしくは PLGA 粒子を結合し、フェムト秒レーザーを照射して集光増強光を発生させて細胞のプロセッシングを行った。光源にはフェムト秒 Ti:Sapphire レーザーの基本波(中心波長 800 nm、パルス幅 80 fs)を用いた。粒子と細胞の相対位置により増強光による核膜穿孔の確率が変化すると予想から、接着状態の細胞と浮遊状態の細胞を対象とした実験研究を行い、その結果を比較した。

(3) 細胞核内への分子デリバリーを目的とし、緑色蛍光タンパク (GFP) をコードしたプラスミド DNA を用いた実験研究を行った。まず、プラスミド DNA の細胞内導入において第一の障壁となる細胞膜とプラスミド DNA の間に生じる静電反発力を軽減するため、カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体を作製し、レーザー法との併用効果を調べた。次に、第二の障壁である核膜の透過を目的とし、集光増強光の強度分布に着目して細胞膜と核膜の一括アブレーションを試みた。直径の異なる粒子を用いることで核膜プロセッシングに必要な光強度分布を検討し、核内への導入効率を調べた。

4. 研究成果

(1) 図 1 に、FDTD 法により求めた直径 2 μm の PLA 粒子および PLGA 粒子によって得られる光増強強度分布を示す。入射光は波長 800 nm の直線偏光とした。PLA と PLGA の屈折率はそれぞれ 1.45 と 1.60 とし、水中(屈折率 1.33)に配置した系の計算を行った。光強度の最大値はいずれも粒子より少し離れた位置に得られ、近接場光より実効焦点距離が長い伝搬光が主体の光増強場であることがわかった。

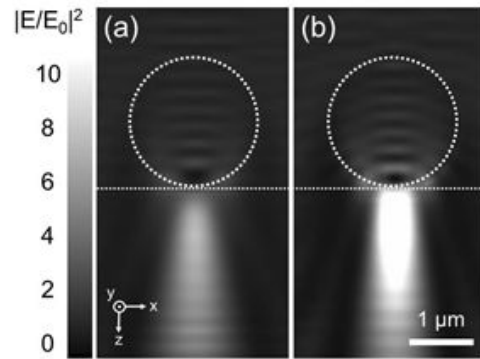


図 1 FDTD 法により計算した PLA 粒子 (a) および PLGA 粒子 (b) 周囲の光強度分布

また、直径 0.75 μm と 3.0 μm のポリスチレン粒子周囲の光強度分布を求めた。粒子に入射するレーザーパルスのフルエンスを直径 0.75 μm の粒子では 0.7 J/cm²、直径 3.0 μm の粒子では 0.081 J/cm² とすると、粒子下において得られるピーク強度が同程度となることがわかった。

(2) 細胞膜上に結合した多数の PLA 粒子もしくは PLGA 粒子にフェムト秒レーザーを照射し、細胞膜への小孔形成を試みた。接着状態の細胞への分子デリバリー実験では、マイクロ流路を用いた。PLGA 粒子を用いた方が PLA 粒子よりも低いレーザー強度により細胞内への蛍光分子の導入が可能であった。この結果は、PLGA 粒子の高い増強度により入射レーザー強度を低くできることを示唆している。さらに、接着状態の細胞と浮遊状態の細胞に同手法を試み比較したところ、細胞核内への分子導入効率は浮遊状態の細胞の場合の方

が高いことが示された。接着状態の細胞は培養ディッシュ底面に接着した細胞であり、細胞上面に粒子が位置するものの、細胞の形状により粒子は裾野部分に多く留まり、細胞核の上方に位置する粒子は少ない。浮遊状態の細胞では粒子分布の偏りは小さく、接着細胞に比べて細胞核の上方に粒子が存在する確率が高い。以上の相対位置が原因となり、核内への導入効率に違いが生じたと考察された。

(3) プラスミド DNA とカチオン性リポソームの複合体を用いた実験では、PLGA 粒子を細胞膜に結合した後にレーザーを照射した条件においてのみ GFP 発現を示す蛍光が観察された。また、リポソーム濃度を変化させ、複合体のゼータ電位を測定した。リポソーム濃度の増大に伴い GFP 発現細胞の割合をもとに定義した導入効率が上昇し、特に複合体のゼータ電位が負から正へと変化する際に、導入効率の統計的有意差が得られた (図 2)。また、蛍光標識したプラスミド DNA を細胞内に導入し観察したところ、リポソーム濃度の上昇に伴い、レーザー照射直後に細胞内に存在するプラスミド DNA の個数が増加することがわかった。ただし、導入されたプラスミド DNA の大部分は核内ではなく細胞質において観察された (図 3)。導入された複合体の数は時間の経過に伴い減少し、この原因はライソソームによる消化であると考えられる。

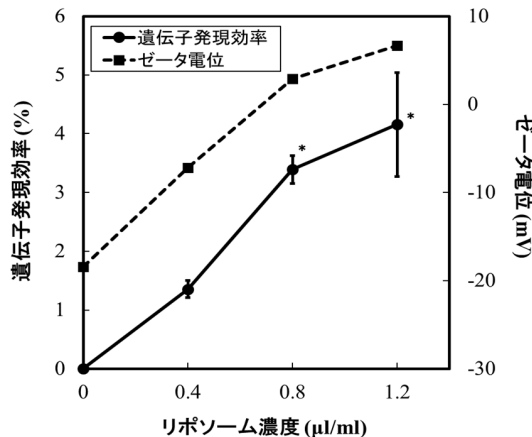


図 2 粒子とレーザーを用いてプラスミド DNA / リポソーム複合体を細胞内に導入したときのリポソーム濃度、遺伝子発現効率、複合体のゼータ電位。

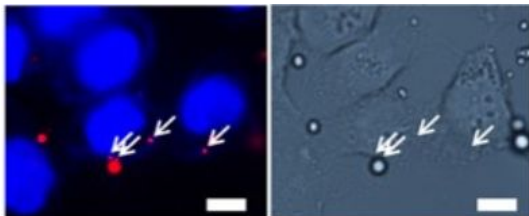


図 3 粒子とレーザーを用いて導入したプラスミド DNA / リポソーム複合体と細胞の相対位置。青色および赤色の蛍光は、それぞれ細胞核と複合体を表す。スケールバーは 10 μm。

第二の障壁である核膜につき、粒子寸法のばらつきが小さいポリスチレン粒子を用いて、細胞膜と核膜の一括アブレーションを試みた。直径 3.0 μm と 0.75 μm のポリスチレン粒子を用いて、両粒子下のピーク強度が同程度となるようにレーザー照射条件を選定した。直径 3.0 μm のポリスチレン粒子を用いてレーザー照射により蛍光標識した複合体を導入した細胞では、レーザー照射直後に複合体が細胞質だけでなく細胞核内においても観察され、また、導入したプラスミド DNA の発現による GFP の蛍光も観察された (図 4)。一方、直径 0.75 μm のポリスチレン粒子では、核内において複合体は観察されなかった。これは、直径 3.0 μm の粒子周囲に生じる増強光のピークは細胞核に近い位置で得られること、増強光のレイリー長が長いことに起因していると考えられる。以上より、細胞膜と核膜の一括アブレーションによる、細胞膜だけでなく核膜の透過性亢進による核内への分子デリバリーが示唆された。将来展望として、本研究成果をもとに粒子とフェムト秒レーザーによる細胞小器官の刺激・操作が期待できる。

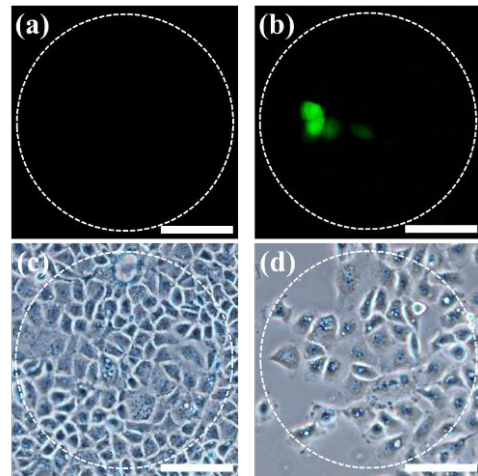


図 4 レーザー照射から 48 時間経過後の細胞の蛍光 (a, b) および位相差画像 (c, d)。ポリスチレン粒子の直径は 0.75 μm (a, c) および 3.0 μm (b, d)。蛍光画像内の緑色蛍光は発現した GFP を表す。直径 3.0 μm の粒子を用いた細胞のみ、GFP の蛍光が観察された。スケールバーは 100 μm。

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 3 件)

Atsuhiko Ishii, Yuki Hiruta, Dag Heinemann, Alexander Heisterkamp, Hideko Kanazawa, Mitsuhiro Terakawa, Intracellular localization and delivery of plasmid DNA by biodegradable microsphere-mediated femtosecond laser optoporation,

Journal of Biophotonics, 査読有, 2017,
(掲載決定)

寺川光洋、石井敦浩、フェムト秒レーザーによる微粒子を用いた極微細加工と生体応用、レーザー研究、査読有、44号、2016、pp. 809-813

Atsuhiko Ishii, Kazumasa Ariyasu, Tatsuki Mitsuhashi, Dag Heinemann, Alexander Heisterkamp, Mitsuhiro Terakawa, Biodegradable microsphere-mediated cell perforation in microfluidic channel using femtosecond laser, Journal of Biomedical Optics, 査読有, Vol. 21, 2016, pp. 055001/1-6,
DOI: 10.1117/1.JBO.21.5.055001

[学会発表](計 11件)

Atsuhiko Ishii, Yuki Hiruta, Dag Heinemann, Alexander Heisterkamp, Hideko Kanazawa, Mitsuhiro Terakawa, Intracellular localization of plasmid-DNA on dielectric microsphere-mediated gene transfection using femtosecond laser, SPIE Photonics West 2017, 2017年1月28日~2017年2月2日, San Francisco (USA)

寺川光洋、超短パルスレーザーと生分解性ポリマーの相互作用およびドラッグデリバリーへの応用、第86回レーザー加工学会講演会、2016年12月12日~2016年12月13日、岡山大学(岡山県・岡山市)

Atsuhiko Ishii, Yuki Hiruta, Yusuke Akutsu, Kazumasa Ariyasu, Shunichi Sato, Hiroko Kanazawa, Mitsuhiro Terakawa, Gene transfection using femtosecond laser-excited focused optical field with cationic liposome, European Materials Research Society (E-MRS) Spring Meeting 2016, 2016年5月2日~2016年5月6日, Lille (France)

石井敦浩、有安和優、三橋龍樹、Dag Heinemann, Alexander Heisterkamp、寺川光洋、マイクロ流路内における生分解性粒子支援フェムト秒レーザー外来分子導入、第63回応用物理学会春季学術講演会、2016年3月19日~3月22日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都・目黒区)

鈴木皓大、阿久津佑介、矢田周平、小田貴大、安藤景太、寺川光洋、生分解性粒子へのナノ秒パルスレーザー照射により発生する衝撃波の圧力算出、第16回レーザー学会東京支部研究会、2016年3月5日、東海大学高輪キャンパス(東京都・港区)

石井敦浩、蛭田勇樹、阿久津佑介、金沢秀子、寺川光洋、フェムト秒レーザー励起集光場によるプラスミドDNAの細胞内

導入、レーザー学会学術講演会第36回年次大会、2016年1月9日~2016年1月11日、名城大学天白キャンパス(愛知県・名古屋市)

Mitsuhiro Terakawa, Atsuhiko Ishii, Tatsuki Mitsuhashi, Polymer microsphere-mediated cell membrane perforation using microfluidic channel, The 7th International Congress on Laser Advanced Materials Processing (LAMP 2015), 2015年5月26日~2015年5月29日、北九州国際会議場(福岡県・北九州市)

[招待講演] Mitsuhiro Terakawa, Kazumasa Ariyasu, Atsuhiko Ishii, Enhanced-ultrafast optical field for biomedical applications, European Materials Research Society (E-MRS) Spring Meeting 2015, 2015年5月11日~2015年5月15日, Lille (France)

鈴木皓大、阿久津佑介、島田卓一郎、矢田周平、有安和優、寺川光洋、生分解性粒子へのナノ秒パルスレーザー照射により発生する衝撃波の観察、第15回レーザー学会東京支部研究会、2015年3月5日、東海大学高輪キャンパス(東京都・港区)

石井敦浩、有安和優、寺川光洋、PLGA粒子を用いたフェムト秒レーザー励起集光場による外来分子導入、第15回レーザー学会東京支部研究会、2015年3月5日、東海大学高輪キャンパス(東京都・港区)

Mitsuhiro Terakawa, Shuhei Yada, Kazumasa Ariyasu, Akimichi Shibata, Femtosecond laser nanoprocessing toward drug delivery and tissue engineering, European Materials Research Society (E-MRS) Fall Meeting 2014, 2014年9月15日~2014年9月18日, Warsaw (Poland)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺川 光洋 (TERAKAWA, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号: 60580090