



小特集 プラズマが誘導する生体応答とそのバイオ・医療応用

7. プラズマによる遺伝子導入

7. Gene Transfection by Discharge Plasma

神野 雅文¹⁾, 佐藤 晋^{1,2)}

JINNO Masafumi¹⁾ and SATOH Susumu^{1,2)}

¹⁾愛媛大学大学院理工学研究科, ²⁾株式会社ワイズ

(原稿受付: 2015年7月31日)

2002年に筆者らにより発見されたプラズマ遺伝子導入法は、遺伝子導入効率と細胞生存率の両立が難しくまた不安定で再現性が低かったが、その後の改良でプラズマを極小化し空間的および時間的な揺動の影響を限定することで大きく性能が改善された。本章ではまず、従来の遺伝子導入法とそれに対するプラズマ法の長所と短所、プラズマ法の課題を紹介し、続いて、各々の研究者のデータを比較する際には導入効率の単純比較をしてはならず、導入物質の分子量と構造を考慮しなければならないことを実験データを基に説明する。次いで標的細胞と導入プラスミドを揃え導入効率と細胞生存率を生成法の異なるプラズマ間で比較した結果、およびプラズマの極小化により性能改善ができた理由を説明した後、プラズマ遺伝子導入法の機序について現在までに判明していることを説明する。

Keywords:

plasma, gene transfection, cell membrane, DNA transfection

7.1 はじめに～遺伝子導入とは

遺伝子工学の歴史は、1953年に J.D. Watson と F.H.C. Crick によりデオキシリボ核酸 (DNA:Deoxyribo-nucleic Acid) の二重らせんモデルが発表されたことに始まる [1]。その後の技術進歩はめざましく、分子レベルでの生命現象の理解が飛躍的に進んだ。この DNA 二重らせんモデルに端を発した分子生物学上の重要な技術の一つに遺伝子導入がある。遺伝子導入とは、細胞内に任意の遺伝子を人為的に導入して新しい遺伝形質をもつ細胞や、それらの細胞由来の個体を作製する技術をいう。農業では、遺伝子組み換え作物の開発、育種などに利用されており、医療分野では iPS 細胞の樹立や、ES 細胞の分化、これらを用いた再生医療、遺伝子医療、創薬などへの利用が期待されている。現在、さまざまな種類の遺伝子導入法が実用化されており、それらはウイルスベクター法、物理的手法及び化学的手法に大別される。以下、遺伝子導入法の歴史を簡単に説明する。

最初に実用化された遺伝子導入は化学的手法である。1965年の Vaheri と Pagano による DEAE デキストラン法 [2]、1973年の Graham によるリン酸カルシウム法 [3, 4] を経て、1987年に Felgner らによりリポフェクション法が開発された [5]。リポフェクション法は陽性荷電脂質などからなるリポソーム (脂質二重膜小胞) と陰性荷電の DNA を結合させてエンドサイトーシス (細胞内とり込み) により細胞内に取り込ませる方法である。この方法は特別な装置・設備が不要で遺伝子導入効率が高いという利点があ

る。他方、試薬が高価であること、細胞毒性があること、細胞によって検討すべきパラメータが多いことなどの欠点がある。

物理的手法としては1982年、Neumann が高電圧パルスにより細胞に小さな孔を開け DNA を取り込ませるエレクトロポレーション法 (電気穿孔法) を開発している [6]。この手法は処理時間が短く、浮遊細胞等多種の細胞に対応しているという長所がある。他方、遺伝子導入効率を高くするために電流を増やすなどすると細胞へのダメージが増えて死滅率が高くなってしまったり、装置、特に消耗品のキューベットが高価なこと、また、接着系の細胞は細胞懸濁液にする必要があることなどが短所としてあげられる。

ウイルスベクター法は細胞に感染し入り込む時に自身の遺伝子を持ち込むという、ウイルスに自然に備わった能力を利用するものであり、1980年代後半から現在までに、遺伝子導入のためのベクター (DNA キャリアーのこと) がアデノウイルスやレトロウイルスをはじめとした種々のウイルスで開発されている [7-12]。この方法の利点は、条件さえ整えばほぼ100%、細胞への感染および遺伝子発現が可能であり、しかも長期的発現が可能なベクターもある。さらに、化学的手法や物理的手法と違い *in vitro* だけでなく *in vivo* での使用も可能である。他方、ウイルス自体が抗原となり不必要な免疫を誘導してしまう短所や、標的組織以外に感染して死亡事故や白血病の発生につながる可能性などの安全性の問題を完全にはクリアできていない。

これらが現在用いられている代表的な遺伝子導入法の手

法であるが、それぞれ説明したように固有のリスクがある。研究用であればこれらのリスクは大きな問題にはならないが実際の医療用の手法として用いることは難しく、従来手法の抱える問題を解決した安全で高効率な新しい遺伝子導入法の登場が切望されている。

7.2 プラズマによる遺伝子導入

プラズマ照射により細胞に遺伝子が導入できることは本稿著者の一人である佐藤らのグループによって2002年に知財化された後[13], Ogawa らにより論文として報告された[14, 15]. ちょうどこの頃、プラズマ分野では大気中／大気圧のプラズマジェットなどの大気中／大気圧非平衡プラズマの研究が盛んに行われており、この報告以降、世界でいくつかのグループにより大気中非平衡プラズマを用いた遺伝子・分子導入実験の結果が報告されている。

Leduc らは、大気圧グロー放電トーチプラズマにより大きさの異なるデキストラン分子を標的細胞に導入し、導入できる高分子の最大半径を評価した結果、導入できる最大半径は 6.5 nm 未満であることを明らかにした[16]. 彼らはさらに、平行電極誘電体バリア放電 (DBD) と大気圧グロー放電トーチを使用して直接および間接的なプラズマ処理が標的細胞と DNA へ与えるダメージを評価し、プラズマと直接接触した標的細胞は酸化ストレス応答を示すが、脂質過酸化反応は起きていないことや、リン酸緩衝生理食塩水中のプラスミド DNA は、DNA の二本鎖切断が引き起こされていることを明らかにしている[17]. Connolly らは、マウスの皮膚にプラズマを照射し、プラスミドが経皮吸収されることを報告している[18]. Nakajima らは DBD プラズマジェットによる遺伝子導入が可能であることを報告している[19]. Sasaki らは DBD 放電のプラズマジェット照射により、標的細胞に蛍光色素 YOYO-1 が導入されること、またその細胞への導入率とプラズマ照射距離依存性からプラズマの作用要因に電気的なものと化学的なものがあることが示唆されたと報告している[20, 21].

一方、筆者らは2002年のプラズマの遺伝子・分子導入作用を発見して以降、フレア型アーク放電プラズマ、プラズマジェット、誘電体バリア放電、マイクロキャピラリー電極による微小プラズマ、と生成法の異なるプラズマで遺伝子導入を試みプラズマの最適化を進めてきた[22, 23]. また、導入機序の解明のために、有効と考えられる複数の機序作用要因の作用タイミングが異なることを利用して、プラスミドや活性種を洗い流す Wash-Out 法を考案し、これにより機序要因の重み付けを行うことに成功している[24].

7.3 プラズマ遺伝子導入の課題

プラズマ遺伝子導入法は現在、研究開発中の技術であり学際的な領域であるために研究を進める上で解決すべき問題や実用化までに解決すべき学術的な課題がある。

実験条件の標準化：後述のように導入効率は導入分子の分子量と構造および用いる細胞の種類と無関係ではなく、異なる系で導入効率を単純に比較することは適切でない。そ

のため、標的細胞や導入分子などの実験条件が研究者間で共通化されていないことが研究成果の評価を難しくしている。この問題に対応するため、文部科学省新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」では、標的細胞と導入分子を共通化し、研究グループ毎の結果を共通のプラットフォームで容易に比較できるようにすることで、プラズマによる遺伝子導入機序の早期解明を目指す体制が整い始めている。

バイオ・医療の実験に関する知識・経験の不足：プラズマ遺伝子導入の研究はプラズマとバイオ・医療の両分野の知識が必要な学際的な研究であるため、バイオ・医療分野に関する実験方法や実験結果の解釈に無理が生じている場合がある。このような問題が生じないようにするためには、両分野の研究者でチームを構成し研究を進め双方の分野で受け入れられる内容としてまとめる必要がある。

遺伝子導入効率と細胞生存率の相反性：各研究機関で遺伝子導入効率および細胞生存率を同時に高めるための検討を進めているが、導入の機序が明らかにされていないため、プラズマ照射時間や、印加電圧・電流などの電気的條件を変化させることで最適化研究が実施されており、如何に高導入効率と高生存率を確立できるかが重要な課題になっている。

導入機序の解明：プラズマによる遺伝子の導入機序が解明されていないため、研究用の手段としては利用できても、医療用装置としての利用は難しい。学術的な課題にとどまらず、安全性や信頼性を高めてより高精度の医療用機器とするために機序の解明は解決すべき最重要課題と言える。プラズマにより生じる要素は測定可能であり、それらの各要素および要素の組み合わせが生体膜あるいは生体機構とどのような相互作用を起こして目的の分子が細胞や組織内に導入されるかを分子生物学的に解明する必要がある。

7.4 導入分子・遺伝子の大きさ・構造の問題

本節では、表 1 に示した分子を用いて、導入する分子の分子量や構造が分子の導入効率にどのように影響するかを明らかにする実験を行った。その結果、導入効率は導入分子の分子量や構造と無関係ではなく、導入分子が何であるかを考慮せず導入効率だけを追求することは本質的ではないという結論に至ったのでこれを説明する。

分子としては分子量が1000～15000程度の蛍光分子 (YOYO-1) および5'末端が蛍光分子 FAM で標識された一本鎖オリゴヌクレオチド (20塩基および45塩基) などの比較的分子量の小さな分子、また二本鎖 DNA として5'末端が FAM 標識されたオリゴヌクレオチド (45塩基) および EGFP を発現する遺伝子がコードされた DNA 断片 (3 Kbp, および 5.5 Kbp) およびスーパーコイル pCX-EGFP プラスミドを用いた。尚、3 Kbp, および 5.5 Kbp の直鎖 DNA は pCX-EGFP を制限酵素処理により EGFP 遺伝子を含む直鎖 DNA を精製・回収し用いた。それぞれの分子の溶液は細胞 (COS7) とともに 96 well プレート中で印加電圧 15 kV, 照射時間 5 msec, ギャップ長 1 mm の条件でプラズマが照射された。処理後培地を加え CO₂ インキュベーター中にて細胞を培養し、48時間後に蛍光顕微鏡にてプ

レート上の導入細胞を観察し、その後 Cytell (GE ヘルスケアバイオサイエンス) にて導入細胞数を測定した。

L-929 細胞へのそれぞれの分子の導入効率の結果を表 1 に、またその時の細胞の状態を図 1 に示す。YOYO-1 はウェル中の 65% の細胞で導入が観察された。一方、20塩基、45塩基の一本鎖 DNA。オリゴ20およびオリゴ45はそれぞれ 20.5%, 14.1% の導入効率であり、YOYO-1 を含め導入効率は分子量の大きさに依存して低下した。一方、二本鎖 DNA のオリゴ 45 bp は 26.8% の導入率であり分子量は一本鎖 DNA のオリゴ 45 の約 2 倍であるにも関わらず導入効率は高かった。同様に、pCX-EGFP 断片の導入効率はそれぞれ

表 1 プラズマ照射による分子導入効率に及ぼす分子量・遺伝子鎖長の影響。

導入分子	YOYO-1	オリゴ20	オリゴ45
分子量 (kDa)	1.270	6.765	14.560
導入効率 (%)	65.0	20.5	14.1
SD	—	6.3	3.5

導入分子	オリゴ45bp	pCX-EGFP Hind-Sal	pCX-EGFP hindIII	pCX-EGFP
塩基対数 (bp)	45	3000	5500	5500
分子量 (kDa)	29.7	1980	3630	3630
導入効率 (%)	26.8	3.5	2.9	16.0
SD	5.3	0.8	0.9	5.7

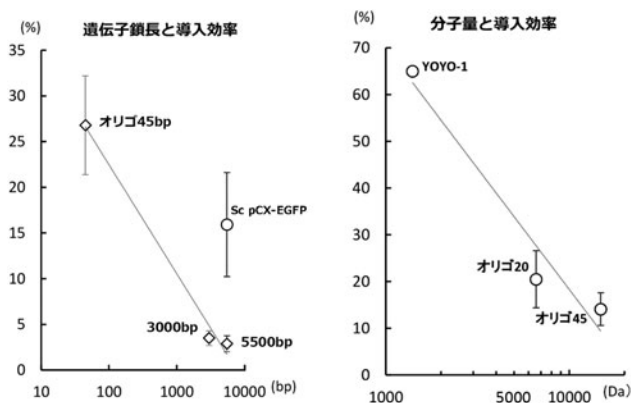


図 1 導入率の分子量・遺伝子鎖長依存性(左)導入効率の遺伝子鎖長、(右)導入効率の分子量依存性。

れ 5.5 Kbp が 3.5%, 3.0 Kbp が 2.9% の導入効率でありこちらも分子量が増加することで導入効率は低下し、コントロールとなるスーパーコイル DNA の pCX-EGFP プラスミド (導入効率 16%) と比較し導入効率は大幅に低下した。

結果として、プラズマ照射による細胞への分子導入に対し、分子量が 1000 Da 以上の分子については分子量の大きさに依存して細胞への導入効率が低下した。また一本鎖の核酸と二本鎖の核酸について、鎖長が同じ 45塩基の核酸では、分子量がほぼ倍にもかかわらず二本鎖の核酸の方が導入されやすく、スーパーコイルプラスミド DNA は同等分子量の直鎖プラスミド DNA に比較して高い効率で導入がなされた。本結果からプラズマによる分子の導入は導入される分子の分子量と立体構造に依存することが示唆された。

7.5 プラズマ生成方式の比較

プラズマの生成には種々の手法があり、その特性もさまざまであるため、遺伝子導入の効果も異なることが推測される。我々は、導入効率と生存率の相反性解決へのアプローチとして、同一の標的細胞 (COS-7) と導入プラスミド (pCX-EGFP 5.5 kbp) の組み合わせに対して生成方法の異なる大気中プラズマの照射について検討をおこなったので、以下にそれらの結果を紹介する。図 2 に示すように、4 種類のプラズマ (フレア状アークプラズマ、大気圧プラズマジェット、誘電体バリア放電、マイクロキャピラリープラズマ) において、細胞生存率と遺伝子導入率を比較した。なお、照射条件はそれぞれのプラズマにおいて遺伝子導入効率が最高となる条件である。その結果を図 3 に示す。フレア状アークプラズマはフレアが空間的・時間的に安定しないために再現性が悪く、また、導入効率も 10% 程度であった、これに対して、大気中プラズマジェットでは若干安定化が見られたものの、ジェットが直接照射された細胞は死滅してしまうことが多く、生存率が悪化してしまった。生存率を改善するために、水平方向にバリア放電を発生させ、放電領域の上部から希ガスジェットを吹き付けてプラズマを細胞近傍に輸送する誘電体バリア放電方式では、生存率は改善されたものの導入が殆どなされないという結果であった。上述の 3 種のプラズマによる実験から

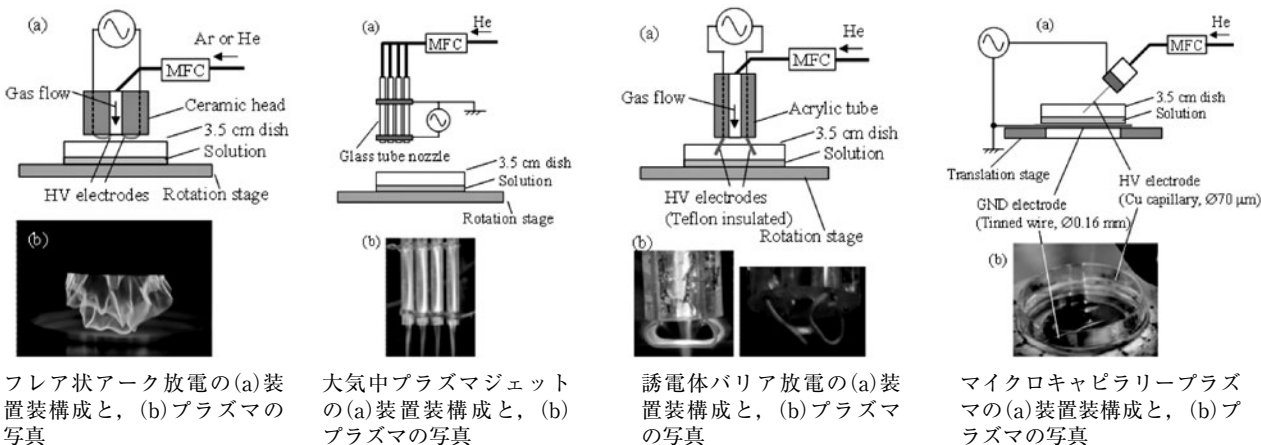


図 2 生成法の異なるプラズマとその装置構成。

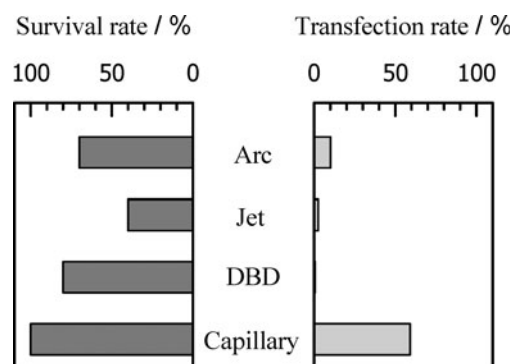


図3 プラズマの生成法による細胞生存率と遺伝子導入効率の違い。

プラズマが直接細胞に触れると細胞が死滅しやすいことが判明したため、高電圧側の電極を外径70 μm まで細くし、シャーレやウェルの底に銅板の対向電極を配置して、プラズマを時間的空間的に制限して直接触れる細胞を限定することで、生存率ともに導入効率も同時に改善することが可能になった。

7.6 プラズマ遺伝子導入の機序検討[24, 25]

図4に、プラズマにより遺伝子・分子導入が細胞に導入される際の機序作用と作用要因の関係を模式的に示す。プラズマには電荷や電流、電界といった電気的要因、ラジカルなどの化学的要因があり、それぞれが、物理的作用、化学的作用、生化学的作用を惹起していると考えられる。図5にマイクロキャピラリープラズマにより pCX-EGFP プラスミドが導入された細胞が緑色蛍光発している写真を示す[24]。写真の中央部はプラズマが直接触れたため細胞が死滅して発光が観察されないが、その外側に同心円状に一樣な蛍光が観察できる。これは、プラズマが直接触れていない細胞にプラスミドが導入されていることを示している。他方、大気圧プラズマジェットを用いた Kaneko らの実験ではプラズマが直接触れた細胞にのみプラスミドが導

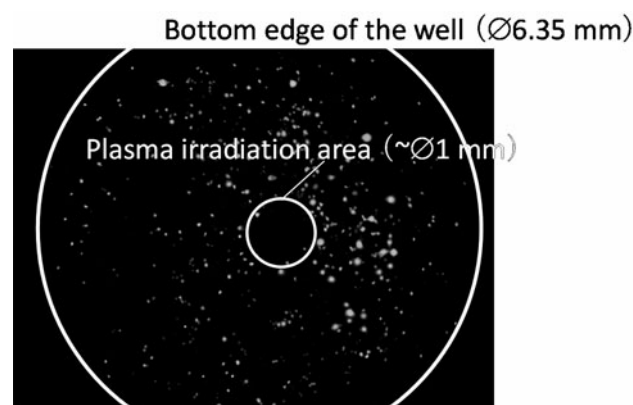


図5 96ウェルにおけるマイクロキャピラリープラズマによりプラスミドが導入された細胞の蛍光写真。

入されており[21]、我々とは逆の結果になっている。これらのことから、プラズマ生成方式により導入の機序ないしは作用要因のバランスが異なっている可能性があると考えられる。

前述のようにマイクロキャピラリープラズマを用いた場合、プラズマ照射範囲の外側で一樣に遺伝子導入が生じているので、プラズマにより生成されたラジカルが拡散により輸送され細胞に作用していると推測できる。そこで、図6に示すように、細胞(COS-7)の入ったウェルプレートの直上でレーザーを気中集光してプラズマを生成し、細胞に pCX-EGFP プラスミドが導入されるか試みたところ、図7中(c)に示すように、プラスミドの導入は観察されなかった。レーザー生成プラズマの場合、電気的要因は殆ど作用しておらずラジカルのみが作用していると考えて良いので、ラジカルのみでは遺伝子は導入されないと推測される。他方、図7中の(a)(b)に示すように、Wash-out 法によりプラズマ照射後のウェルをリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate Buffered Saline:PBS)で洗浄した結果、遺伝子導入率が1/10に低下した。これはプラズマ照射後の活性種

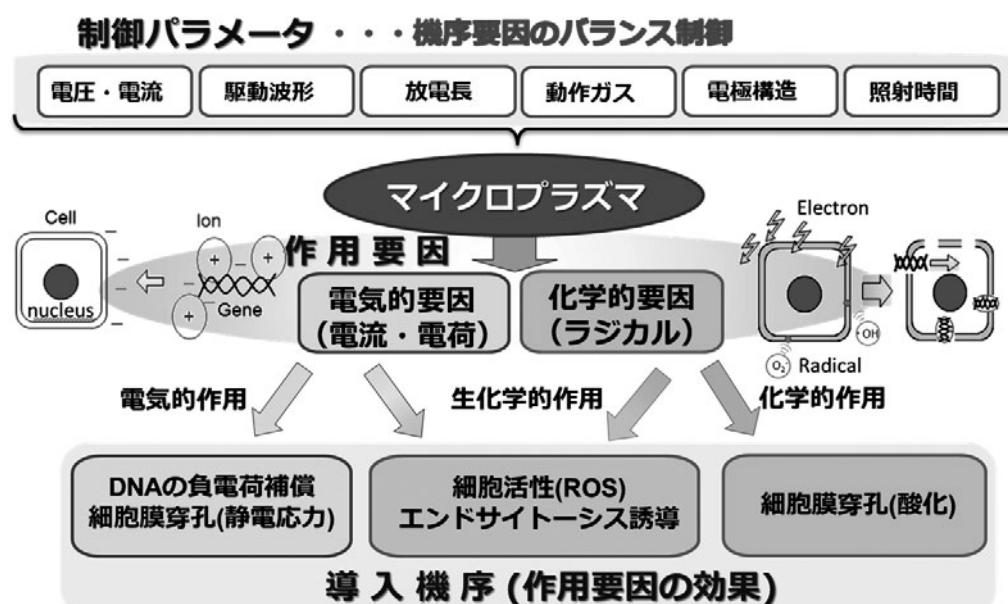


図4 プラズマ遺伝子導入の機序作用と作用要因。

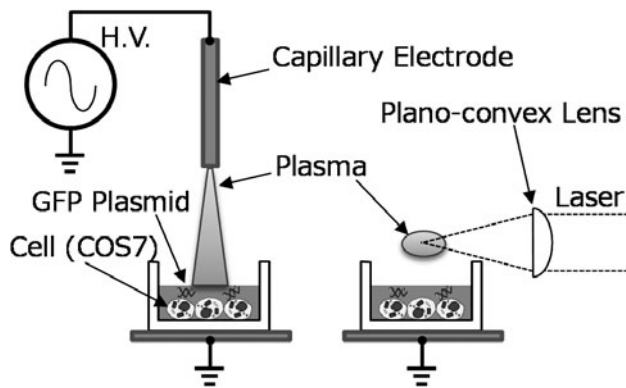


図6 マイクロキャピラリーとレーザー生成プラズマによる遺伝子導入試験の模式図。

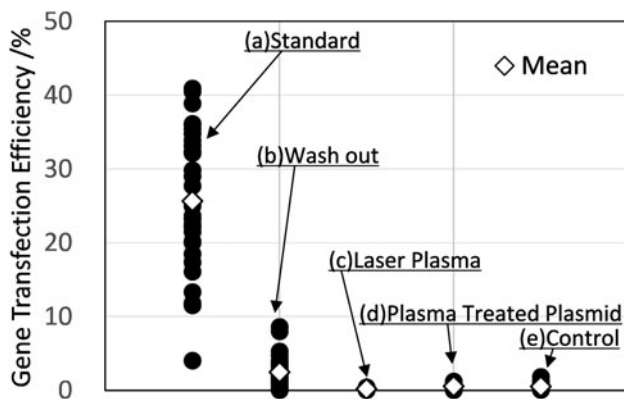


図7 Wash-Out とレーザー生成プラズマの各プロトコルにおける遺伝子導入率。

の効果（化学的，生化学的要因）が大きいことを示している。一方，プラスミド溶液にのみプラズマを照射し，標的細胞に滴下した場合は同図(d)に示すように遺伝子は導入されなかった[24]。また，溶液中の人工細胞にプラズマ照射すると，人工細胞が正に帯電することがわかっている[25]。これらの結果からプラズマ照射中の直接的効果（電気的要因）による標的細胞の帯電が遺伝子導入に影響していると考えられる。

プラズマによる遺伝子導入のほとんどは，プラズマ処理によって生成された活性種の作用を必要とするが，それだけでは不十分で細胞とプラスミドに対してプラズマ照射という電気的作用も必要であることから，これらの相乗効果により遺伝子が効率よく導入がなされることが示唆された。

7.7 おわりに～プラズマ遺伝子導入の未来

当初は再現性も低く，また遺伝子導入率と細胞生存率の

両立も困難だったプラズマ遺伝子導入法も発見から10年以上が経過して，安定して高い生存率と高い導入効率を両立できるようになってきた。また導入機序の解明も進んでおり，将来の医療用途や創薬，育種など多方面への展開が期待できる。

謝 辞

紹介した著者らの研究の一部は，科学研究費補助金 新学術領域研究 (25108509, 15H00896) の助成により行われ，DNA 試料は本学学術支援センター (ADRES) より提供を受けた。

参考文献

- [1] J.D. Watson *et al.*, Nature **171**, 737 (1953).
- [2] A. Vaheri *et al.*, **27**, 434 (1965).
- [3] F.L. Graham *et al.*, Virology, **52**, 456 (1973).
- [4] F.L. Graham *et al.*, J Gen Virol, **36**, 59 (1977).
- [5] P.L. Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, **84**, 7413, USA (1987).
- [6] E. Neumann *et al.*, The EMBO J., (7) 841 (1982).
- [7] K. Lundstrom, Curr. Opin. Biotechnol. **8**, 578 (1997).
- [8] I. Kovacs *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. **8**, 583 (1977).
- [9] J.E. Rabinowitz *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. **9**, 470 (1998).
- [10] H.E. Gruber *et al.*, Science **230**, 1057 (1985).
- [11] M.L. Drumm *et al.*, Cell **62**, 1227 (1990).
- [12] M.W. Carroll *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. **8**, 573 (1997).
- [13] 特許 3585124 : Patent WO/2002/064767 (2002).
- [14] Y. Ogawa *et al.*, Biotechnol. Bioeng. **92**, 865 (2005).
- [15] Yasunari Sakai *et al.*, J. Biotechnology, **121**, 299 (2006).
- [16] M Leduc *et al.*, New Journal of Physics **11**, 115021 (2009).
- [17] Mathieu Leduc *et al.*, Plasma Proc. and Polym. **7**, 899 (2010).
- [18] R. J. Connolly *et al.*, Bioelectrochemistry, **103**, 15 (2015).
- [19] T. Nakajima *et al.*, International Journal of Plasma Environmental Science & Technol. **5**, 42 (2011).
- [20] S. Sasaki *et al.*, Appl. Phys. Express **7**, 026202. doi:10.7567/APEX.7.026202 (2014).
- [21] T. Kaneko *et al.*, Biointerphases. **10**(2):029521. doi: 10.1116/1.4921278 (2015).
- [22] T. Okihiro *et al.*, Proc. 4th Intl. Conf. Plasma Medicine, P11, p.75, Orleans (2012).
- [23] 神野雅文他：第73回応用物理学会学術講演会，12P-E1-10 (2012).
- [24] M. Jinno *et al.*, J. Photopolym. Sci. Tech. **27**, 399 (2014).
- [25] 相原大二郎他：第62回応用物理学会春季学術講演会，13a-A28-8 (2014).