

〈一般研究課題〉 細胞への遺伝子導入技術の革新に向けた  
作用機序解明に関する研究  
助成研究者 名城大学 熊谷 慎也



## 細胞への遺伝子導入技術の革新に向けた 作用機序解明に関する研究

熊谷 慎也  
(名城大学)

### Study of substance delivery into cells using non-thermal atmospheric pressure plasma for effective gene transfer

Shinya Kumagai  
(Meijo University)

#### Abstract :

Non-thermal atmospheric pressure plasma (NTAPP) has been used in biomedical researches. One of its attractive applications is gene transfer for controlling cell fate. To achieve high-efficiency gene transfer into cells, we have to elucidate what happens at the cells during the gene transfer. In this study, surface morphologies of cells upon plasma exposure were observed by scanning electron microscopy (SEM). On the cell membrane, nanopores were found. Next, for the cells exposed to plasma, substance delivery experiments were conducted using fluorescent reagent. Fluorescence microscopy revealed that the cells having nanopores on the cell membrane emitted fluorescence. It is considered that nanopores formed by plasma exposure are necessary for substance delivery into cells and play important roles in gene transfer.

#### 1. はじめに

遺伝子導入により細胞機能を制御することは生物学・医学分野において強力な手法である。これまでにウィルスベクターを用いる生物学的手法、脂質分子を用いる化学的手法、電圧パルスを印加して細胞膜に孔を開け遺伝子を導入する電気穿孔法など、数々の手法が開発されてきた。しかしながら、初代細胞など遺伝子導入が困難な細胞があることも事実であり、それを克服する手法が待たれている。そして、一つの細胞に導入できれば良いという訳ではない。例えば、再生医療では、多

量の細胞に対して均一に一定量の遺伝子を導入し、超高品質な人工多能性幹細胞(iPS細胞)をつくり、応用していくことが求められている。例えば、心筋細胞移植を例に挙げれば、 $10^8 \sim 10^9$ 個の均質な細胞を創りだすことが求められている[1]。

細胞への高効率な遺伝子導入の実現に向けて、近年、物質の第4の状態であるプラズマ(電離気体)を用いる『プラズマ遺伝子導入法』が報告された[2,3]。プラズマの中には、荷電粒子・化学活性種・光といった細胞に作用する活性種が含まれている。これらのプラズマ活性種を細胞に作用させることで、細胞膜における物質透過性を向上させ、内部への遺伝子導入を促進できるとされている(図1)。その促進メカニズムについては諸説あり、プラズマを照射することで細胞膜表面における物質取り込み現象であるエンドサイトーシスが活発化されるとの報告もあるが[3]、メカニズム解明に向けての議論は続いている。

プラズマ遺伝子導入のメカニズムを明らかにするのであれば、プラズマが照射された細胞表面で何が起きているのかを直接観察し、プラズマ照射強度と細胞表面で誘起される現象との相関を明らかにする必要がある。

本研究では、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて、プラズマによって細胞表面に誘起される特徴的な構造を観察し、実際の物質導入との相関を解明することを試みた。

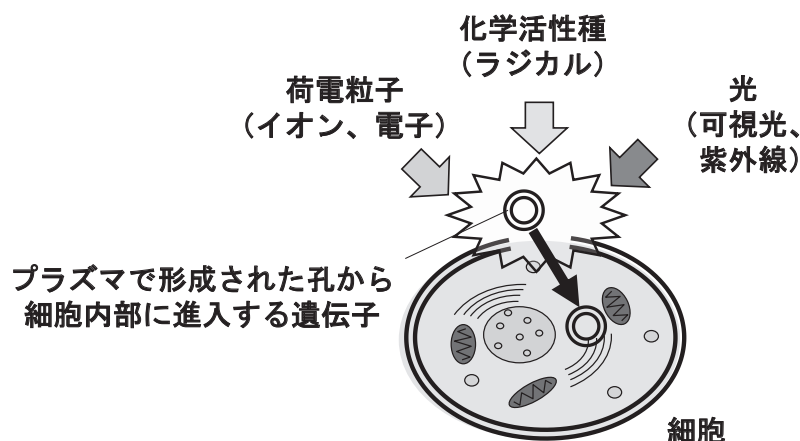


図1: プラズマ活性種の作用で、細胞への遺伝子導入を促進する。

## 2. 試料および実験方法

細胞にプラズマを照射する装置としては、プラズマジェット型装置と平面型プラズマ生成装置の二つを用いた。プラズマジェット型装置は、図2(a)に示すようにガラス管(直径3mm, 内径2mm)に、二つの銅電極が取り付けられている。このガラス管の内部にプラズマ生成用のヘリウムガスを供給し、電極間に高電圧(10kVpp, 9kHzの正弦波)を印加すると、ガラス管内部のヘリウムガスがプラズマ化し、ヘリウムガスの流れによって、プラズマのジェットがガラス管端部より出射する。細胞へのプラズマ照射実験の際には、プラズマが出射するガラス管端面と、細胞を培養するシャーレ底面との距離を10 mmに設定し、照射時間を変えてプラズマの照射強度を変えた。一方の平面型プラズマ生成装置は、図2(b)に示すように誘電体(ガラス板)をメッシュ電極で挟んだ構造になっている。このメッシュ電極に高電圧(9kV, 20kHz)を印加すると、誘電体(ガラス板)とメッシュ電極の間にプラズマが生成する。細胞への照射を行う際は、細胞培養シャーレの上にこの平面型プラズマ生成装

置を置いて実験を行った。プラズマの照射強度は、ジェット型装置と同様に、照射時間を変えて調整する。

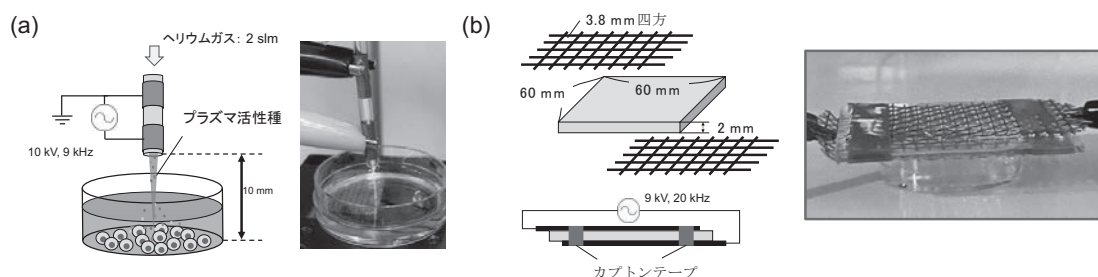


図2: 実験に用いたプラズマ生成装置。(a) プラズマジェット型装置。(b) 平面型プラズマ生成装置。

細胞試料としては、マウス線維芽細胞L929を用いて実験を行った。L929細胞はMEM培地(10%のFBS,1%の抗生物質を含む)を用いて培養した。

プラズマを照射した際に細胞で起こる反応を明らかにするため、プラズマ照射によって起きる細胞表面の変化をSEMで観察した。プラズマ照射後の細胞の表面形状を固定するため、グルタルアルデヒドを滴下し、CO<sub>2</sub>インキュベータ内で24時間保持した。SEM観察時には細胞を真空チャンバ内に導入することになるため、細胞試料内に含まれる水分を除去しなければならない。そこで凍結乾燥を行った。細胞が培養されているMEM培地をtブチルアルコールと置換し、温度5℃で30分保持し、tブチルアルコールを固化する。その後、細胞試料を真空容器に設置して真空引きを行うと、固化したtブチルアルコールが昇華し、細胞を乾燥させることができる。この細胞試料をSEMの低加速電圧条件で、観察した。

プラズマを照射した細胞への物質導入性を評価するため、蛍光色素(DiYO-1;分子量 1270)の導入実験を行った。蛍光色素は細胞内に導入されれば、蛍光顕微鏡で容易に観察できる点がメリットであり、物質導入に適したプラズマ条件の検討を速やかに行うことができる。本実験では、高感度モノクロカメラを取り付けた倒立型顕微鏡を用い、位相差顕微鏡観察と蛍光顕微鏡観察を行った。

### 3. 実験結果

#### 3.1 プラズマジェット照射後の細胞表面の形状

まず、プラズマジェット型装置を用い、プラズマ照射強度に対する細胞表面の変化をSEM観察で捉えることを試みた。プラズマ照射前の細胞表面には、シワ状の構造が見られるものの、その表面を拡大すると、滑らかであることが分かる(図3(a,d))。プラズマ照射時間を徐々に長くしていくと、はじめ滑らかであった細胞の表面に、照射時間10秒になると、突起状の構造が形成され始めることが分かった(図3(b,e))。更に、照射時間を長くしていくと、くぼみのような構造が見られるようになり、孔状の構造が形成されることが分かった(図3(c,f))。

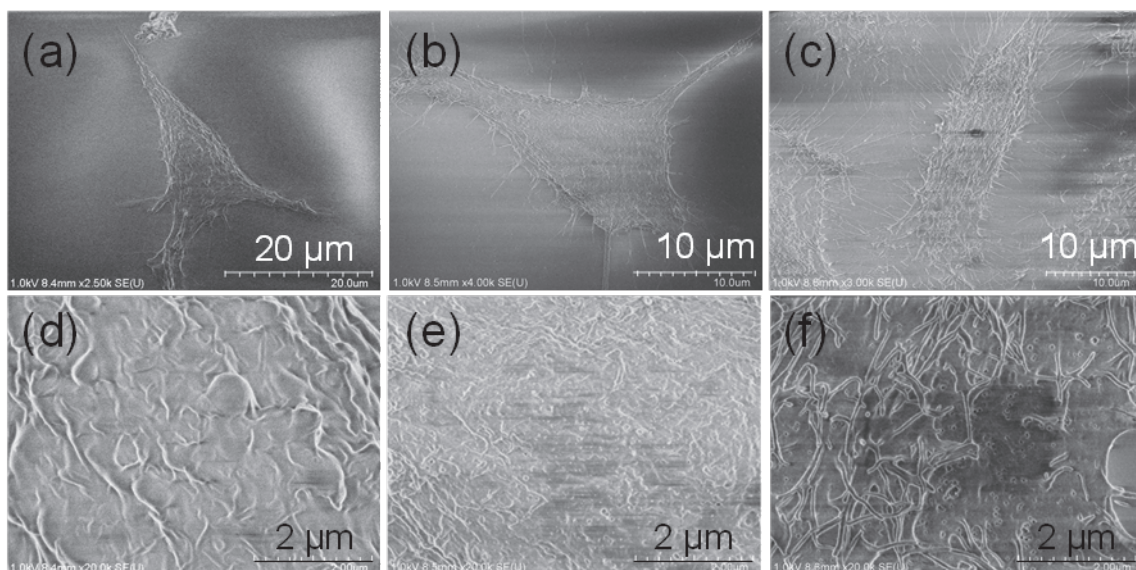


図3: プラズマを照射した細胞のSEM写真。全体像 (a,b,c) と拡大像 (d,e,f)。プラズマ照射時間は、それぞれ、0秒(a,d)、10秒(b,d)、13秒(c,f)である。

続いて、プラズマジェット型装置で照射処理を行ったL929細胞に対して、蛍光試薬DiYO-1の導入実験を行った。顕微鏡観察結果を図4に示す。図中の白線で囲まれた円形領域はプラズマが照射された領域を表している。図4(a,c)は位相差顕微鏡による観察像であるが、プラズマ照射なし/ありで明確な違いは見られない。続いて、蛍光顕微鏡で、プラズマ照射なし/ありの細胞試料を観察すると(図4(b,d))、プラズマが照射された細胞試料で緑色蛍光が観察された。前述のSEM観察の結果とあわせると、細胞膜に形成された微細孔状の構造が細胞内部への蛍光試薬導入と関連しているといえる。

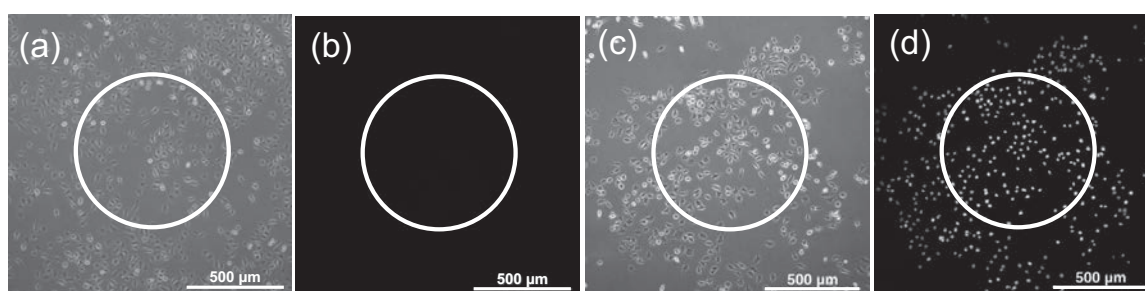


図4: 蛍光試薬DiYO-1導入処理後の位相差顕微鏡像(a,c)と蛍光顕微鏡像(b,d)。蛍光顕微鏡像では、蛍光を発する細胞が示されている。(a,b) プラズマ照射なしと(c,d)プラズマ照射ありの観察結果を比べると、位相差顕微鏡観察(a,c)では、プラズマ照射なし/ありで細胞の形状に大きな違いは見られないが、蛍光顕微鏡観察では、プラズマ照射を行った細胞試料で蛍光が検出された(b,d)。

さらに蛍光顕微鏡像を詳細にみると(図4(d))、白線の円形領域から離れるにつれて、蛍光強度が低下していること、細胞の内部に蛍光試薬が導入されていないことが分かる。つまり、プラズマジェットによる細胞内への蛍光試薬導入効果は、領域限定的であるといえる。従って、培養シャーレの中にある細胞全体に蛍光試薬導入処理を行うには、プラズマ照射の均一性に優れた手法とする必要がある。

また、プラズマジェット型装置を用いて13秒プラズマを照射した細胞に形成される微細孔状の構造は、細胞を3日間インキュベートすると微細孔状の構造が消失し、細胞の活性も元に戻り、細胞の増殖率は、プラズマを照射していない細胞と同様の増殖率に達することを観測した。

### 3.2 多量の細胞への同時遺伝子導入に向けた平面型プラズマ発生装置の検討

シャーレの中で培養される細胞全体に対して均一なプラズマ照射を実現するため、図2(b)に示す、平面型プラズマ生成装置を用いて実験を行った。平面型プラズマ生成装置は、ガスの流れで活性種を供給するプラズマジェット装置と比べると、シャーレの底面で培養される細胞に、プラズマ活性種を供給する力が弱い。そこで、プラズマ照射前に培地を取り除いてからプラズマ照射を行い、その後で、蛍光試薬を含む培地を注入することとした。実験では、プラズマ照射時間30秒までは、蛍光試薬の導入が確認されなかった(図5(a,b))。照射時間が40秒になると細胞内に蛍光色素が導入され始め(図5(c,d))、照射時間50,60秒では、顕微鏡の観察視野に含まれる、ほぼすべての細胞に蛍光試薬が導入された(図5(e-h))。

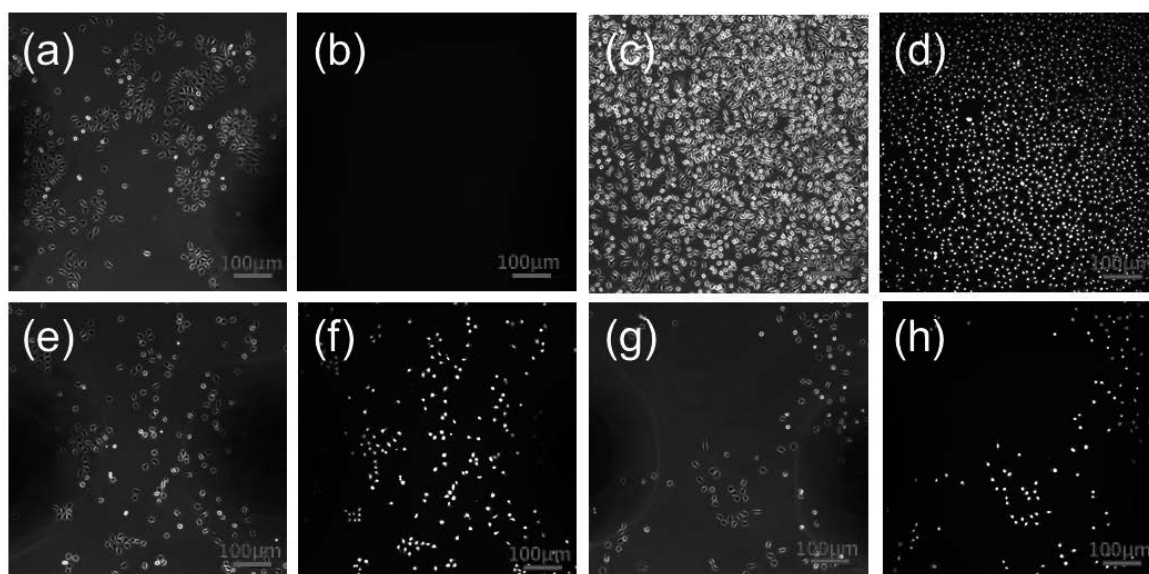


図5: 平面型プラズマ源を用いた蛍光試薬DiYO-1導入後の位相差顕微鏡像(a,c,e,g)と蛍光顕微鏡像(b,d,f,h)。両顕微鏡像ともにグレースケールで表している。プラズマ照射時間は、(a,b) 30秒、(c,d) 40秒、(e,f) 50秒、(g,h) 60秒である。照射時間30秒では導入されないが、照射時間40秒以降で蛍光試薬が導入された。

続いて、平面型プラズマ生成装置で照射した後の細胞表面をSEMで観察した(図6)。照射時間30秒においても微細孔形状は観察されたが(図6(a))、図5(a,b)で示されたように蛍光色素は導入されなかった。このことから、蛍光色素が導入される微細孔の大きさに閾値があることが考えられる。照射時間を40秒よりも長くしていくと、微細孔構造の大きさとその数は増加した(図6(b,c,d))。

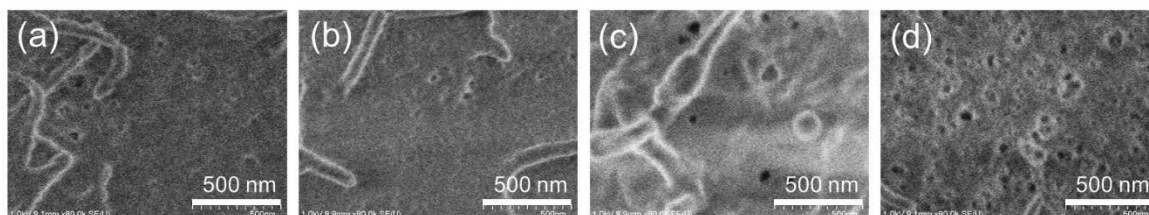


図6: 平面型プラズマ源を用いて照射した細胞のSEM像。照射時間は、(a) 30秒、(b) 40秒、(c) 50秒、(d) 60秒である。

照射時間60秒で蛍光試薬がほぼ100%導入される結果を得たが、細胞膜に微細孔状の構造が多数できていては細胞へのダメージも大きく、細胞活性に大きな影響があることが考えられる。そこで、平面型プラズマ生成装置で照射した後の細胞を24時間インキュベートし、細胞増殖の割合を評価した(図7)。その結果、照射時間60秒では細胞が増殖しない細胞試料も多く観察された。プラズマの照射強度が強くと、細胞に大きなダメージを与えたと考えられる。蛍光試薬の導入と細胞活性の維持の両方を実現し得る条件として、今回の研究で検討した範囲では、平面型プラズマ源の照射時間としては40秒が適していると判断される。

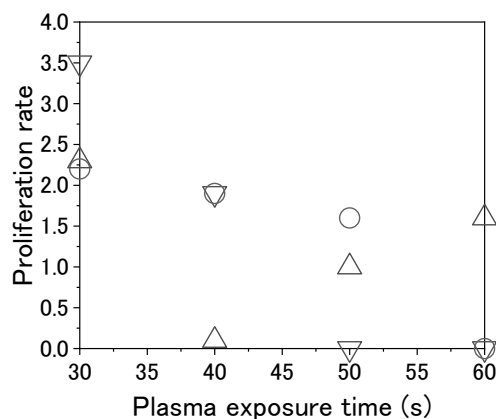


図7: 平面型プラズマ源を用いて照射した細胞の24時間後の細胞増殖率。

#### 4. まとめ

本研究では、プラズマを用いた遺伝子導入法の更なる高効率化に向けて、プラズマを照射した細胞の表面に何が起きているのかを明らかにするため、SEM観察を実施した。その結果、プラズマによって細胞の表面に微細孔状の構造ができていることが明らかとなった。続いて、蛍光試薬の導入実験を行い、プラズマによって形成される微細孔の大きさ、および、その数と、蛍光試薬導入量との相関を明らかにした。数多くの細胞への均質な遺伝子導入に向け、多数の細胞への一括プラズマ照射に適した平面型プラズマ生成装置を用い、遺伝子導入に適した条件を見出した。今後は、これらの条件をもとに導入条件を調整し、高効率な実遺伝子の導入条件を検討していく。現在、GFPをコードしたプラスミドDNAの導入の実験検討を進めており、プラズマを照射した細胞において、GFPに由来する緑色蛍光の観測にも成功している。プラスミドは蛍光試薬分子よりも、分子量が大きいことから、細胞内へのプラスミド導入に適した大きさの微細孔状構造を適切に形成するための条件を詳細に検討していく必要がある。将来的には、物質導入の作用機序に基づく最適条件を実現する遺伝子導入システムを、助成研究者のマイクロデバイス技術[7-9]と融合して構築し、従来の手法を超える『革新的遺伝子導入技術』の実現を目指す。今後の研究の進展にご期待いただきたい。

#### 参考文献

- [1] Tohyama et al., Stem Cell Rep. **9**, pp.1406-1414, (2017).
- [2] Ogawa et al., Biotechnol. Bioeng. **92**, pp. 865-870, (2005).
- [3] M. Ludec et al., New J. Phys. **11**, 115021, (2009).
- [4] Jinno et al., Jpn. J. Appl. Phys. **60**, 030502, (2021).

- [5] R Tero et al., *Appl. Phys. Express* **7**, 077001, (2014).
- [6] R. Tero et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **605**, pp. 26-33, (2016).
- [7] S. Kumagai et al., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **55**, 01AF01, (2016) (OPEN ACCESS);  
<https://doi.org/10.7567/JJAP.55.01AF01>
- [8] S. Kumagai et al., *JSAP Rev.* 2022, 220416 (2022).
- [9] H. Okino et al., *Jpn. J. Appl. Phys.* **62**, SG1043 (2023).