C701

超音波遺伝子導入の蛍光顕微鏡による可視化

橘 理恵^{*}(東大), 岡本 旭生, 葭仲 潔, 高木 周, 松本 洋一郎

Visualization of Sonoporation with a fluorescence microscope

Rie TACHIBANA (Univ. Tokyo), Akio OKAMOTO, Kiyoshi YOSHINAKA,
Shu TAKAGI, Yoichiro MATSUMOTO

ABSTRACT

Recently, the development of an ultrasound gene transfer system, called Sonoporation has been investigated. It is known that micro-bubble can enhance gene transfection. Using this method, we are able to reduce cell damage, and induce genes into only target cells. However, the mechanism and optimal induction condition have not been clarified in detail. In vitro, we induced GFP-plasmid into fibroblast cell (NIH3T3) by using ultrasound contrast agent (micro-bubble) and piezoelectric transducer. We examined what factors affect gene induction rate. Average induction rate in whole a cell culture plate was measured with flow cytometer. Though, because of heterolytic sound pressure in a cell culture plate, measurement of partial gene induction rate is needed in order to examine the effect of sound pressure on induction rate more accurately. We stained cell nucleus and tried to measure the partial induction rate from fluorescence observation.

Keywords: Micro-bubble, Sonoporation, Fluorescence observation

1. 序論

近年、遺伝子治療にむけ、低侵襲で目的の部位のみの細胞に遺伝子を導入することができる超音波を用いた手法が期待されている。この手法において、超音波造影剤として臨床的に用いられているマイクロバブルを併用することで導入効率を飛躍的に改善できるという知見が得られている。

このマイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入のメカニズムとしては、超音波照射によりマイクロバブルが崩壊し、崩壊に伴って発生する局所的な高圧力により、細胞表面に小さな穴が空き、この小孔を通して物質輸送が行われると言われている¹⁾。また、超音波の圧力振動やマイクロバブルの振動により細胞膜の物質透過率が上昇することで遺伝子や粒子などが細胞内に導入される²⁾とも言われているが、詳細な導入メカニズムは明らかにされていない。

本研究では、超音波とマイクロバブルによる細胞への遺伝子導入メカニズムを解明するために、超音波照射条件を変えて遺伝子導入を行うことで、いかなる因子が導入効率を高めるのかを調べることを目的とする。

2. 実験および実験装置

2.1 細胞

本研究では、遺伝子の導入細胞として線維芽細胞 (NIH3T3) を用いた。線維芽細胞は多機能な未分化細胞で、軟骨への分化誘導遺伝子を細胞外から導入することで軟骨組織の再生治療へ応用が期待されている。

2.2 遺伝子

導入遺伝子は、クラゲの発光タンパク発現に関わる遺伝子から抽出され円環上の遺伝子に作りかえられた GFP プラスミドを用いた。GFP プラスミドは、細胞内に導入されると発光タンパクを発現し緑色に蛍光する。

2.3 マイクロバブル

マイクロバブルとして超音波造影剤である Sonazoid[®]を用いた。内部気体が C₄F₁₀ で、シェルの成分が脂質の気泡である。気泡径は 2.3 ~ 2.9 μm である。

2.4 実験装置

Fig.1 に実験装置の概略図を示す。細胞は 24well プレート内で培養した。ファンクションジェネレータ(NF 社製 WF1944A)からのバースト波をアンプ(E&I 社製 2100L)により、出力を増幅させて、トランスデューサから平面波として、超音波を発生させた。周波数は 2.00 MHz とし、Duty Cycle 10%(40/360)のバースト波として照射した。マイクロバブルと GFP プラスミド(15 μg/mL)を混合した培

養溶液にトランスデューサを浸し、上から超音波を照射した。

Fig.1 Experimental apparatus

3. 結果

3.1 フローサイトメトリによる導入率測定

超音波強度による導入率変化をフローサイトメータ (BD 社製 LSR II) により測定した。結果を Fig.2 に示す。音圧測定により求めた培養容器全体の平均の超音波強度とファンクションジェネレータの出力との対応関係を Fig.3 に示す。これから超音波強度を大きくなるほど導入率が増加するということが分かる。しかしながら、超音波照射時に死亡してしまった細胞は培養容器の底からはがれてしまい、測定時に回収されないため、ここでの導入率はあくまで生き残った細胞のうちの遺伝子導入率である。

Fig.2 The effect of US intensity on induction rate
(US exposure time 60 [s], CA density 10[%])

FG output [mV _{pk-pk}]	0	50	70	100	150	200
US average intensity [W/cm ²]	0.00	0.44	0.86	1.76	3.97	7.06

Fig.3 US average intensity

3.2 蛍光観察による導入率測定

音圧測定により細胞容器内では圧力分布が様々であることが分かっている。しかしながら、フローサイトメ

トリによる導入率測定では容器内全体での平均導入率を測定しているため、導入率と超音波による音圧との正確な対応付けがなされていない。遺伝子導入された細胞数は GFP によりカウントできる (Fig.4(a)) ので、容器内での部分的導入率測定のため、核染色 (Hoechst33342) により細胞数をカウントし (Fig.4(b))、導入率測定可能にした。

蛍光観察により遺伝子導入された細胞が局所的に固まって導入されていることが多く、部分的には平均導入率の 10 倍以上の導入がなされていることが分かった。これは GFP プラスミドが培養液に均一に混ざっていないため、可能性もある。今後、well 全体を蛍光画像にて撮影し、音圧分布と導入率の相関を調べることで、GFP プラスミド濃度の導入率に対する影響を調べることを課題とする。

Fig.4 Fluorescent observation

(FG output 100 [mV_{pk-pk}], US exposure time 60 [s],
CA density 10 [%])

4. 結言

超音波強度が大きいほど、超音波照射下において生き残った細胞中への導入率が大きくなることが示された。また、蛍光観察により、well 全体では 0.1 ~ 0.3 % の導入率であっても、局所的には数 % 以上の導入率を示す可能性があることが分かった。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省「ナノバイオインテグレーション (CNBI)」, ならびに科学研究費補助基盤研究 (A)1820620 による支援を受けました。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) Taniyama et. al, "Local Delivery of Plasmid DNA Into Rat Carotid Artery Using Ultrasound", Circulation. 2002, pp.1233-1239.
- 2) 田淵圭章, "超音波誘導遺伝子治療", 超音波テクノ, pp.203-208