

(様式第9 別紙2：公開版)

## 養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名：宮本 裕一

2. 養成カリキュラム名：パルス波レーザー光誘起応力波を用いた遺伝子導入技術の開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

申請カリキュラムの目的として以下の三点を掲げた。レーザー光誘起応力波を物理的外力とする遺伝子導入機構を実験的に検討，本手法あるいは本手法の併用によって非ウイルス性ベクターの導入効率が高まることを実証，得られた知見を整理し，新規の遺伝子導入法もしくは導入補助手法としての提案およびその実用化の検討。

について：本カリキュラムではレーザー光誘起応力波として(1)レーザーアブレーションの利用，(2)マイクロビーズの利用，(3)光増感剤の利用を実験検討した。後者二点については機構の検証にまでは至らなかったが，前者については応力波の定量化のためのモデルの構築，導入可能な圧力の検証まで行うことが出来た。

について：カリキュラムにあるようにプラスミド DNA を対象としたものだけでなくデキストラン分子の取り込みについても評価を行った。リポソームとの併用を行ったものは有意に取り込み量が増加する結果が得られた。

について：国内学会での発表と原著論文三報にまとめることができた。

4. 成果

養成カリキュラム期間内においては主として以下の三つの研究を行い成果を得た。

(1) レーザーアブレーション誘起応力波による抗癌剤の細胞内導入

レーザー光誘起応力波の照射システムを構築し，実際に複数の抗癌剤の細胞内導入を行い，細胞傷害効果の増強がはかれるかどうかを検討した (Fig.1)。

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を 24-well の培養プレート (3820-024, IWAKI, Tokyo, Japan) に  $2 \times 10^5$  cells/well の密度で播種し，10% FBS を含む F-10 培地にて 12 時間培養の後，Fig.1 に示す応力波照射システムによってピーク圧約 3 MPa 応力波 (SW) を照射した。細胞膜の透過性の評価は細胞外液に拡散した乳酸 dehydrogenase (LDH, MW=140 kDa) の活性を経時的に測定することで行った。抗癌剤には cis-Diammine-dichloroplatinum (II) (CDDP) (Wako Pure Chemical) および Bleomycin A2, hydrochloride (BLM) (Calbiochem) を用い，終濃度はいずれも 10 ng/ml 100  $\mu$ g/ml の範囲で行った。応力波の照射から 24 時間経過した試料は MTT viability assay により生存力を評価した。

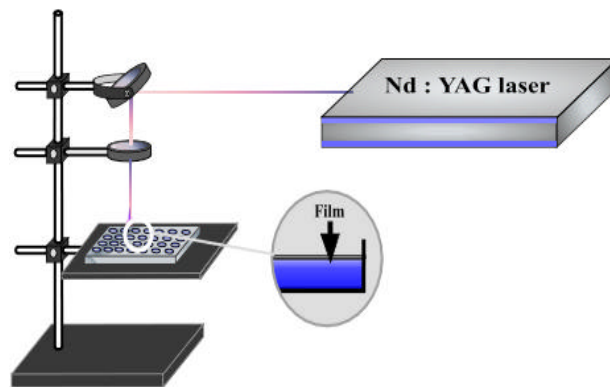


Fig. 1 応力波照射システム

応力波照射後の LDH の細胞外への拡散は照射直後から始まり，約 10 分間にわたって，その活性値は上昇する傾向を示したが，細胞の viability は 90%以上あり，一時的な膜透過性亢進状態にあることが示された． CDDP および BLM とともに応力波照射群の viability は接触のみの群のそれより，有意に低下した ( $p < 0.001$ )．特に BLM を接触させた実験では最大で 35% 以上の差が生じた．

BLM は本来非常に強い細胞傷害性を持つ薬剤であるが，細胞膜を透過しにくい．培養系にて BLM を接触させた場合，実際に細胞内に拡散し得る量は，接触量の 0.1% という報告もあり，何らかの手法により細胞膜の透過性を亢進させない限り，細胞傷害作用は見込めない．ここで適用した応力波は Electrochemotherapy と同様，細胞膜の過渡的な Permeabilization を実現し，抗癌剤の導入が可能な手法であると考えられる．

## (2) パルス波レーザーとマイクロスフィアを用いた細胞内への巨大分子導入

レーザー光誘起ストレスの効果を細胞膜上の特定部位に局限させることで，細胞膜透過性を上昇させるモデルを考案した．Fig.2 は着色微小球(直径  $1 \mu\text{m}$ , 青色)をマウス繊維芽肉腫細胞(Meth-A)の細胞膜表面に付着させたものである．照射されたレーザー光は，吸収効率の高い微小球に支配的に吸収され，応力波を含むストレス誘起する．すなわちストレスの発生源は微小球に限定される．

Meth-A 細胞と微小球の混合液を 96-well のプレートに添加し，プレートの下方からレーザー光を照射した．レーザーは Nd:YAG レーザー (Spectra Physics GCR-150, パルス半値全幅 7-9 ns, 繰り返し周波数 10Hz) の第二高調波 532 nm を用いた．照射後の細胞を Propidium Iodide (PI) および Fluorescein diacetate (FDA) によって染色し，Flow cytometer (Coleter, Epics Elite) を用いて生細胞，死細胞および膜透過性を示す細胞を検出した．レーザー光照射直後において，膜透過性を示す細胞の割合は照射パワー密度，照射時間および微小球添加量に依存して変化した．膜透過性はレーザー光照射後，50 分間持続した．61% の細胞が膜透過性を示したとき，死細胞は 13% であった．細胞表面または近傍の微小球から発生する応力波を含む何らかのストレスが細胞膜の透過性を高め

ていると考えられる。また本手法は細胞膜における局所的なストレスの暴露を実現するものであり、これは細胞のダメージの軽減につながるものである。膜透過性の上昇メカニズムは現在も検討中であるが、応力波による膜穿孔以外に、熱によるリン脂質の相転移もあるのではないかと考えている。



Fig.2 マイクロスフィアを付着させたマウス線維芽肉腫細胞

(3) 光増感剤とパルス波レーザー光を用いた細胞膜孔形成とプラスミド DNA の導入  
本遺伝子導入法は光増感剤の使用により細胞膜上にて発生する応力波の振幅を増大させる効果、および細胞膜の微小酸化効果が期待できる。

・ Photosensitized HeLa 細胞の膜孔形成 -電子顕微鏡的検索-

35 mm dish に  $5 \times 10^5$  cells/well の播種密度で HeLa 細胞を播種し 12 時間培養後、試料として供した。Hematoporphyrin derivative (HpD) の濃度は MTT viability assay の結果に基づき、5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  を採用した (100mW/cm<sup>2</sup> のパワー密度で 5 J (50 s) の照射を行った場合、24 時間後の viability はそれぞれ、100%, 90%, 85%であった)。照射後の試料は速やかに 1%グルタルアルデヒドによって固定され、脱脂・脱水後、走査型電子顕微鏡により細胞形態の観察および膜上の孔の検索を行った。

細胞膜上に複数の孔が見られたことから、接着性細胞においても poration は可能であると考えられる。孔の径は 200-1000nm の範囲であり、相当大きな分子の導入が可能と思われる。今後、孔形成部位と酸化部位との関係を明らかにできれば、本手法による poration メカニズムを提起できるものと考えられる。

・ Photosensitized HeLa 細胞の膜孔形成と p-EGFP 遺伝子の導入 - reporter gene assay による評価 -

35 mm dish に  $2 \times 10^6$  cells/well の播種密度で HeLa 細胞を播種し 18 時間培養後、試料として供した。HpD の濃度は 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  を採用した。レーザー光の照射はパワー密度 60 mW/cm<sup>2</sup>, 照射量 3 J/cm<sup>2</sup> とし、照射後の試料はリンス後、p-EGFP プラスミド DNA を 5  $\mu\text{g/ml}$  in PBS(-)の濃度で 30 分接触した。その後、通常培地に置換し、24 時間インキュベートした。24 時間経過後の資料は、1%グルタルアルデヒドによって固定され、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。

3000 pixel あたりの平均強度は、Control で  $50.72 \pm 4.25$ , DNA のみで  $49.28 \pm 3.02$  であつたのに対し、DNA+HpD (10  $\mu\text{g}$ )では  $71.17 \pm 28.61$ , DNA+HpD (20  $\mu\text{g}$ )で  $88.43 \pm 35.74$  であり、PDT 群は Control あるいは接触のみの群よりも 1.5-1.7 倍蛍光強度が高いことが示された。PDT 群で標準偏差が大きいのはコントラストの差が大きいことを意味し、細胞一個あたりの蛍光強度は PDT 群は、これよりもさらに高いものと考えられる。PDT 群の蛍光強度は細胞の存在部位によって異なり、Control と同程度の蛍光強度しか示さない部位やネクローシスにまで至っている部位が、それぞれ同一照射部位で見られる。今後はパワー密度の一様性の確保も課題になると考えられる。

・ Photosensitized HeLa 細胞の膜孔形成と *LacZ* 遺伝子の導入 - reporter gene assay による評価 -

24-well plate に  $2 \times 10^6$  cells/well の播種密度で HeLa 細胞を播種し 18 時間培養後、試料として供した。HpD の濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  を採用した。レーザー光の照射はパワー密度 50  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , 照射量 3  $\text{J}/\text{cm}^2$  とし、照射後の試料はリンス後、プラスミド DNA を 0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Optimem™ の濃度で 4 時間接触した。その後、通常培地に置換し、24 時間インキュベートした。24 時間経過後の試料は、2%ホルムアルデヒド/0.2%グルタルアルデヒドによって 10 分間固定、X-gal 染色液で発色させた。

DNA alone 群では発色が確認できず、本遺伝子と標的細胞の組み合わせでは、プラスミド DNA の接触のみではプラスミドは細胞内へ移行できないものと考えられる。それに対して、DNA+PDT の群はいくつかの陽性細胞を観察することができた。このことは本 PDT 処置がプラスミドを細胞内へ移行させ得ることを意味し、本手法が遺伝子導入技術として有効であることを示す。また liposome 併用群では、発色強度が高い細胞がいくつか見られ、PDT とリポソームの併用は発現量の高い遺伝子導入処置であるものと考えられた。

## 5 . 成果の対外的発表等

( 1 ) 論文発表 ( 論文掲載済、または査読済を対象。)

[1] Y. Miyamoto, Y. Umebayashi, M. Koyano, M. Wakita, T. Nishisaka, Enhancement of cytotoxic effect of bleomycin with transient multiple stress waves in vitro, Cancer Lett. 199 (2003), 45-51.

[2] Y. Umebayashi, Y. Miyamoto, M. Wakita, A. Kobayashi, T. Nishisaka, Elevation of plasma membrane permeability on laser irradiation of extracellular latex particles, J. Biochem. 134 (2003), 219-224

[3] Y. Miyamoto, Y. Suzuki, T. Meguro, M. Iwaki, Cytoplasmic Molecular Delivery by hematoporphyrin derivative-based photodynamic treatment using high-intensity pulsed laser irradiation, Chem. Lett. 33 (2004), 240-241

( 2 ) 口頭発表 ( 発表済を対象。)

[1] 宮本裕一, 上田晋太郎, 梅林志浩, 脇田政嘉, 西坂剛 ALA-based photodynamic therapy における Zn-PpIX の細胞内合成 - 応力波の照射による Zn<sup>2+</sup>の細胞内導入 -, 第 41 回日本 ME 学会大会

[2] 宮本裕一, 梅林志浩, 上田晋太郎, 脇田政嘉, 西坂剛, レーザー光誘起応力波を用いた癌化学療法の増強効果, 日本 ME 学会甲信越・北陸合同支部大会

[3] 宮本裕一, 梅林志浩, 上田晋太郎, 脇田政嘉, 西坂剛, パルス波レーザー光誘起応力波による癌化学療法の増強効果, 第一回 21 世紀連合シンポジウム -科学技術と人間-

[4] 宮本裕一, 梅林志浩, 脇田政嘉, 西坂剛, ナノ秒パルス波レーザー光誘起 Photodynamic treatment による細胞内物質導入, 第 13 回日本光線力学学会

( 3 ) 特許等 ( 出願番号を記載 )

なし