

第26回青葉工学研究奨励賞



高品質プラズマ遺伝子導入の実現に向けた細胞のプラズマ感知機構解明

東北大学大学院
工学研究科 電子工学専攻
助教 佐々木 渉 太

近年、細胞外の薬剤や遺伝子を細胞内に導入する技術の重要性が増してきている。特に、遺伝子導入は、iPS細胞作製にも必要不可欠であるように、あらゆる医学・生物学研究に欠かせない根幹技術となっている。これまで多くの方法が提案されてきたが、安全でかつ高い効率と高い細胞生存率を両立する手法は未だ確立されていない(表1)。

表1 従来の薬剤・遺伝子導入法

方法	効率	生存率	安全性
エレクトロポレーション	◎	×	○
リポフェクション	○	○	△
ウイルス法	◎	○	×

これに対して、新しい高効率な遺伝子導入法として大気圧プラズマ法が提案されたが[1]、熱化したプラズマに由来する細胞損傷が大きく、細胞生存率の改善が課題であった。私はこの問題を解決するために、近年開発された、手で触れるほど低温な大気圧低温プラズマ技術を採用することで、高効率・高生存率な薬剤・遺伝子導入法を開発した。また、その安全性を担保するために、その導入機構を詳細に解析し、その一端を明らかにしてきた。

今回開発した低温プラズマ法では、わずか1秒の照射で高い導入効率と高い生存率を両立するとともに、局所的な導入も可能であった[図1(a)]。また、導入機構解明(プラズマの作用因子解明と細胞の感知・動態解明)を両面から進めた。その結果、プラズマが空気中の酸素・窒素や水を分解して生成する短寿命活性種($\cdot\text{OH}$ ・ $\text{O}_2^{\cdot-}$ ・ ONOO^-)が重要な作用因子であることが明らかとなった[2-6]。特に、プラズマを直接照射している間は $\cdot\text{OH}$ を多量に供給しており、照射後には、 $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{ONOO}^-$ が徐々に放出される系が作られていた[図1(b)]。この $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{ONOO}^-$ は、通常1秒に満たない半減期で失活していくが、プラズマ照射によって液中に生成される多種多様な活性種が互いに連鎖反応を起こすことで、数分にわたって濃度が維持される特殊な環境が作り出されていた。

次に、これら短寿命活性種が細胞に供給された後、どのような細胞応答が惹起されるかについて、細胞を生きたまま可視化するライブイメージング技術によって詳細に解析した[7,8]。その結果、活性種供給から1分以内に、まず細胞外の Ca^{2+} が細胞内に流入し、細胞内 Ca^{2+} 応答が活性化

していることが明らかとなった。さらに、そのプラズマ惹起性 Ca^{2+} 応答には、細胞膜上にある一過性膜受容器(TRP)チャンネルが必要であることを見出した。TRPチャンネルは、細胞外の様々な刺激(機械刺激・温度刺激・化学的刺激)を受容するセンサーの役割を担っていることが良く知られており、今回の場合、活性種を感知するセンサーとして機能したと考えられる。そのプラズマ惹起性 Ca^{2+} 応答の後、数十分にわたって細胞外物質(薬剤・遺伝子等)を摂取する飲食作用が活性化されていた。このように、細胞が元来有する仕組みを上手に活用することが、高効率・高生存率を実現するための鍵であることが分かってきた。今後は、詳細な機構解明の知見を基に、更なるプラズマ源の高性能化、多種多様な細胞株・組織への応用を進めていきたい。

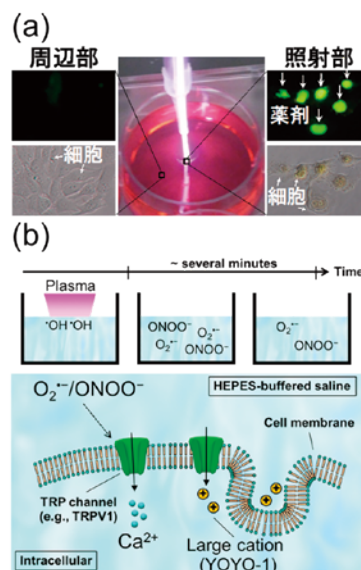


図1 低温プラズマ法の(a)導入例, (b)導入機構。

- [1] Y. Ogawa et al.: Biotechnol. Bioeng. 92 (2005) 865.
- [2] S. Sasaki et al.: Appl. Phys. Express 7 (2014) 026202.
- [3] S. Sasaki et al.: J. Phys. D: Appl. Phys. 49 (2016) 334002.
- [4] S. Sasaki et al.: Jpn. J. Appl. Phys. 55 (2016) 07LG04.
- [5] S. Sasaki et al.: Plasma Process. Polym. 15 (2018) e1700077.
- [6] S. Sasaki et al.: Plasma Process. Polym. 17 (2020) e1900257.
- [7] S. Sasaki et al.: Sci. Rep. 6 (2016) 25728.
- [8] M. Kawase et al.: Sci. Rep. 10 (2020) 9687