

レーザー誘起応力波を用いた遺伝子導入技術の
組織工学応用に関する研究

平成 19 年度

寺川光洋

本論文の構成と内容

1990年の米国における ADA(adenosine deaminase)欠損症を対象としたヒトへの遺伝子治療実施以来、治療対象となる疾患は年々増加し、2007年現在までに1000例を超える臨床試験が承認されている。その対象は、遺伝子に起因する疾患だけでなく、外傷や感染症など多くの難病にもおよぶ。また、先端医療に必要とされる組織工学(tissue engineering)においても遺伝子治療は重要な技術である。例えば移植治療では、特定の遺伝子を導入することにより、血管新生を促進させ、生着を促進させるといった方法が期待されている。しかし、現在まで実施された多くの遺伝子治療は、当初期待されていたほどの成果を上げていない。その最も大きな要因の一つとして、遺伝子治療の根幹技術である遺伝子導入技術が確立していないことがあげられる。

レーザーを用いる遺伝子導入法は空間制御性が高く、光ファイバを利用できるため経内視鏡的・経カテーテル的遺伝子治療へ適用できる特長を持つ。しかし、光の強散乱体である生体組織中ではレーザーの散乱減衰が大きいので、レーザーを組織に直接照射する方法は組織深部への応用には適さない。一方、固体材料へのパルスレーザー光照射によって発生する応力波(Laser-induced stress wave, LISW)を用いた遺伝子導入法は、上記の特長に加え、単位時間当たりに処理できる細胞数が多く、深部適用に優れているなどの利点を備えている。

本研究は、LISWを用いた遺伝子導入技術を組織工学に応用することを目的に行われた。まず LISW の適用によりプラスミド DNA を *in vitro* で培養細胞に導入できることを示し、LISW の特性と遺伝子導入効率の関係を明らかにしている。さらに、各種細胞への遺伝子導入を試み、LISW による遺伝子導入法が、異なる種類の細胞へも応用可能であることを示している。そして以上の成果に基づき、肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクターの導入を実証し、組織工学への応用として高性能移植皮膚の作成を試みている。

本論文は 6 章よりなる。

第 1 章は序論であり、遺伝子導入とその研究動向について解説している。特にレーザーを用いた遺伝子導入技術の歴史的経緯を振り返り、遺伝子導入技術に求められている課題について述べている。さらに、遺伝子導入の応用として期

待される組織工学について概説し、本論文の目的を述べている。

第 2 章では、LISW の発生原理について述べた後、ナノ秒パルスレーザーを用いた LISW の発生とその特性について述べている。レーザー照射条件を変化させたときの LISW のピーク圧力、立ち上がり時間、圧力の時間積分値等の変化を示している。

第 3 章では、LISW を用いた培養細胞への遺伝子導入実験について述べている。レポーター遺伝子を用いた実験により、LISW の特性と遺伝子導入効率の関係を明らかにし、遺伝子導入過程において重要なパラメータについて考察している。また、これらのデータに基づき、*in vitro* における培養細胞への遺伝子導入のメカニズムについて考察している。さらに、各種哺乳類細胞種への遺伝子導入実験の結果から、LISW による遺伝子導入法が、様々な種類の細胞へも応用できることを実証している。

第 4 章では、LISW を用いた遺伝子導入法の組織工学的応用として、移植皮膚の生着促進を目的とした肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクターの導入実験結果について述べている。第一段階として、上記の遺伝子をラット皮膚へ導入し、肝細胞増殖因子の生成の有無およびその濃度を調べた結果を示している。次に、第二段階として、同遺伝子をラット移植皮膚へ導入した。新生血管の生成に関する組織学的分析から生着促進を評価した結果について述べている。遺伝子を導入した皮膚移植片を用いたラット皮膚移植では、血管新生が有意に促進されることを実証している。

第 5 章では、LISW と生体との相互作用について述べている。LISW を適用したラット皮膚を組織学的に観察した結果を評価している。また、この結果を踏まえて、LISW を用いた *in vivo* における遺伝子導入のメカニズムについて検討を行なっている。

第 6 章は本研究の結論であり、本研究により得られた成果を総括するとともに、将来展望を述べている。

目次

	頁
第1章 序論	1
1.1 はじめに	2
1.2 遺伝子治療	2
1.3 ドラッグデリバリーと遺伝子治療	4
1.4 遺伝子導入技術の研究動向	4
1.4.1 化学的方法	5
1.4.2 物理的方法	6
1.4.2.1 エレクトロポレーション法	6
1.4.2.2 超音波法	7
1.4.3 レーザを用いた遺伝子導入技術の研究動向	8
1.4.3.1 レーザの直接照射による方法	9
1.4.3.2 色素や金微粒子等を補助に用いる方法	10
1.4.3.3 レーザ誘起応力波による方法	11
1.5 組織工学	13
1.6 本研究の目的と論文の構成	14
参考文献, 図表	16
第2章 レーザ誘起応力波の物理および特性の計測	44
2.1 はじめに	45
2.2 レーザ誘起応力波の物理	46
2.2.1 レーザ誘起応力波の発生	46
2.2.1.1 熱弾性過程	46
2.2.1.2 飛散物の反力	47
2.2.1.3 プラズマを伴う LISW 発生	48
2.2.2 プラズマ閉じ込めによる応力波の増大	50
2.2.3 プラズマによるレーザーエネルギーの吸収	51
2.3 応力波の計測方法	52
2.4 レーザ誘起応力波発生と絶対値計測	52

2.4.1	実験装置および方法	52
2.4.2	実験結果および考察	53
2.5	終わりに	56
	参考文献, 図表	57
第3章	レーザー誘起応力波による培養細胞への遺伝子導入	76
3.1	はじめに	77
3.2	遺伝子導入の方法論	77
3.2.1	ベクター	77
3.2.2	レポーター遺伝子	78
3.2.3	細胞の構造	78
3.2.3.1	細胞膜の構造と輸送経路	79
3.2.3.2	核膜の構造と輸送経路	80
3.3	LISW が導入遺伝子に与える影響の評価	81
3.3.1	実験方法	82
3.3.2	結果および考察	82
3.4	培養細胞への遺伝子導入実験	83
3.4.1	プラスミド DNA	83
3.4.2	培養細胞	84
3.4.3	レーザー誘起応力波の適用	84
3.4.4	評価方法	85
3.4.5	実験結果	85
3.4.6	考察	87
3.4.6.1	仮説(1) “細胞膜の膜タンパクの変性”の検討	87
3.4.6.2	仮説(2) “キャビテーションによる細胞膜変形ないし変性”の検討	88
3.4.6.3	仮説(3) “外来遺伝子の加速”および 仮説(4) “せん断応力による一時的な膜変形 ないし変性”の検討	89
3.4.6.4	加温効果の検討	93

3.5.5 細胞種依存性の検討	94
3.5 おわりに	94
参考文献, 図表	96
第4章 レーザ誘起応力波を用いた肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクター 導入による移植皮膚内の血管新生促進	124
4.1 はじめに	125
4.2 植皮と遺伝子治療の研究動向	125
4.3 実験方法	126
4.3.1 プラスミド DNA	126
4.3.2 レーザ誘起応力波	127
4.3.3 <i>In vivo</i> におけるラット皮膚への HGF 発現遺伝子ベクター導入	127
4.3.4 HGF 濃度の測定	128
4.3.5 ラット移植皮膚への HGF 発現遺伝子ベクター導入	128
4.3.6 新生血管生成の評価	129
4.3.7 統計解析	129
4.4 実験結果	129
4.4.1 <i>In vivo</i> におけるラット皮膚への HGF 発現遺伝子ベクター導入	129
4.4.2 ラット移植皮膚への HGF 発現遺伝子ベクター導入	130
4.5 考察	131
4.6 おわりに	133
参考文献, 図表	135
第5章 レーザ誘起応力波と生体との相互作用および 遺伝子導入メカニズムの検討	148
5.1 はじめに	149
5.2 LISW が皮膚組織へ与える影響の評価	150

5.2.1	実験方法	150
5.2.2	結果および考察	151
5.3	<i>In vivo</i> における LISW による遺伝子導入のメカニズムの検討	153
5.4.1	実験方法	154
5.4.1.1	表皮細胞選択性の検証	154
5.4.1.2	「外来遺伝子が加速され細胞膜を透過する」仮説の検証	155
5.4.1.3	LISW による細胞膜変形ないし変性の評価	155
5.4.2	結果	155
5.4.2.1	表皮細胞選択性の検証	156
5.4.2.2	外来遺伝子が加速され細胞膜を透過する仮説の検証	156
5.4.2.3	LISW による細胞膜変形ないし変性の評価	156
5.4.3	考察	157
5.4	おわりに	158
	参考文献, 図表	160
第6章	結論	174
6.1	はじめに	175
6.2	レーザー誘起応力波の物理およびその計測 (第2章)	176
6.3	レーザー誘起応力波による培養細胞への遺伝子導入 (第3章)	176
6.4	レーザー誘起応力波を用いた肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクター 導入による移植皮膚内の血管申請促進 (第4章)	177
6.5	レーザー誘起応力波と生体との相互作用 (第5章)	177
6.6	総括	178
6.7	展望	178
	用語説明	180
	謝辞	182
	著者文献目録	184

第 1 章

序論

1.1 はじめに

近年、バイオテクノロジーの進歩により、従来では不可能と考えられていたヒト疾患の治療が可能となりつつある。特に遺伝子に関する研究は急速に進み、診断技術の進歩から遺伝子に起因する疾患の詳細が明らかになってきた。現在までに遺伝子に起因する疾患は 4,000 例以上知られている。

遺伝子治療とは、目的とするタンパク質をコードした外来遺伝子を標的細胞の核内に導入し、発現させることにより治療を行う医療技術である[1-6]。その対象は遺伝子に起因する疾患だけでなく、外傷や感染症など多くの難病にもおよぶ。しかし現在まで実施された多くの遺伝子治療は、当初期待されていたほどの成果を上げていない。その最も大きな要因の一つとして、遺伝子治療の根幹技術である遺伝子導入技術が確立していないことがあげられる。

本章では遺伝子治療について概説した後、遺伝子導入に関する研究動向について解説する。特にレーザーを用いた遺伝子導入技術の歴史的経緯を遡り、遺伝子導入技術に求められている課題を明らかにする。さらに、本論文で取り上げるレーザー誘起応力波を用いた遺伝子導入法の応用分野として期待される組織工学について概説し、遺伝子治療と組織工学の関係について述べる。最後に本論文の目的と意義を示す。

1.2 遺伝子治療

1950 年代初め、DNA(deoxyribonucleic acid, デオキシリボ核酸)の構造が解明されるとともに、細胞の遺伝情報はそのヌクレオチド配列にコードされていることが明らかになった[7]。細胞はこの遺伝情報を基にタンパク質合成を行う。この合成過程はセントラルドグマと呼ばれ、主に転写(transcription)と翻訳(translation)という過程よりなる[8](Fig. 1-1)。まず、細胞の核内において DNA の塩基配列の中の特定領域は RNA(ribonucleic acid, リボ核酸)に写し取られる。この過程を転写という。DNA 分子は多種多様なタンパク質の合成指令を含んでいるが、RNA 分子は DNA の一部分の情報だけを持つ。転写された RNA はメ

ッセンジャーRNA(mRNA)と呼ばれ、転写後、核膜に存在する核膜孔を通り核外に移動する。真核細胞では細胞質に存在するリボソームにおいてこの mRNA が翻訳され、タンパク質合成が行われる。mRNA は複数回翻訳されることが可能であり、最終的にヌクレオチドに分解される。よって mRNA が細胞内に存在できる時間により合成されるタンパク質の総量が変化する。

遺伝子治療の考えは、遺伝子病の存在が知られるようになった 1950 年代から存在したが、近年の組換え遺伝子工学等の発達により徐々に実現可能な治療と考えられるようになった。現在の遺伝子治療は、当初考えられていたゲノムを治療するものは少なく、遺伝子を用いて欠損ないし低下した機能を補う補充療法が大部分を占める。つまり、外部からタンパク質の設計図となる遺伝子を導入することで、新たな機能を付加して治療効果を得る。

ヒトを対象とした初めての遺伝子治療は 1990 年に米国で ADA(Adenosine deaminase)欠損症を対象に行われ、以後、欠損・変異遺伝子そのものだけでなく、免疫強化や異常細胞のアポトーシス誘導、細胞増殖制御などを目的とした研究も進められており、治療対象となる疾患は年々増加している。臨床試験では、がんを対象とした例が最も多く、その他、血管疾患、感染症、創傷など遺伝子治療の対象となる疾患は極めて多岐にわたる[9](Fig. 1-2)。例えば、癌に対する免疫遺伝子治療では、リンパ球や癌細胞に免疫反応を増強させるようなサイトカイン遺伝子を導入することにより癌の治療を試みる報告がされている[10-12]。また、血友病治療のため、血液凝固因子の遺伝子を患者の血管内皮細胞などに導入し、ここで持続的に発現させようとする方法も考えられている[13, 14]。このような方法で使われる遺伝子は、本来は発現していないかあるいは必要とされるレベル以下で発現している。この遺伝子を大量に強制発現させることで治療効果を得ようとするものである。2007 年現在、遺伝子治療は米国を中心に臨床研究が展開しており、1000 例を超える臨床試験が承認されている[9]。しかしその内、治療の毒性および安全性の評価である第 I 相研究が 61.5%を占め、治療効果の評価を含む第 II 相および第 III 相は少ない。その大きな原因のひとつに、代表的な遺伝子導入法であるウイルスベクターに由来する副作用の報告がなされたことがあげられる[15-19]。

1.3 ドラッグデリバリーと遺伝子治療

遺伝子を安全かつ高効率に細胞内に導入する技術は未だ存在しないため、近年、ドラッグデリバリーシステム(Drug delivery system, DDS)技術を利用し、細胞への遺伝子導入効率を高める試みが精力的に進められている。DDSは、望ましい部位へ最適な量の薬剤を輸送することにより治療効果を最大にするための技術であり、その開発は製剤学から始まったが、現在では工学と融合して発展している[20-22]。

経口投与や注射により投与された薬剤は、体内において病変部の細胞に到達することでその効果を発揮する。しかし病変部へ到達する薬剤は投与したうちの一部であり、大部分は分解・排泄される。一方、薬剤は正常な細胞へしばしば副作用をもたらすため、単純に投与量を増加させることはできない。このため薬剤効果を向上し、副作用を軽減させることを目的とし、DDSの開発が精力的に進められている。従来、輸送する薬剤としては化学物質が中心であったが、DNAやRNAを細胞内へ導入する遺伝子治療においてもDDSの確立が切望されている。

遺伝子治療では、導入遺伝子を目的の組織へ効率よく送達するだけでなく、さらに細胞膜を透過させ、核などの目的の細胞小器官へ送達させる必要がある。しかし、導入遺伝子は通常の薬剤(~数kDa)と比較して著しく分子量が大きく、細胞膜を透過させることは容易ではない。例えば、非ウイルスベクター法において用いられるプラスミドベクターの分子量は一般に数MDa(10^6 Da)である。(1 Da = 1.661×10^{-24} g)

1.4 遺伝子導入技術の研究動向

これまで多くの遺伝子導入法が開発、研究されているが、それらはウイルスベクター法、化学的手法、および物理的手法に大別することができる。

レトロウイルスやアデノウイルスのゲノム(染色体あるいは遺伝子の全体)に、

導入しようとする遺伝子を組み込み、ウイルスの感染能力を利用して導入を行うウイルスベクター法[23-27]は、細胞内への導入効率が高い。これは、例えばアデノウイルスベクターでは、細胞膜に存在するレセプターにウイルスが結合し、その後エンドサイトーシス（第3章参照）によって細胞内へ取り込まれるが、ウイルス自体がエンドソームから細胞質へ遊離する能力を有するため、遺伝子がライソソームにより分解されることなく細胞質内へ到達することによる。さらに、ウイルスは核内移行機能も備えているため、遺伝子発現効率も増加する。しかるに、臨床試験においてウイルスベクター法に由来する深刻な副作用が報告されている。1999年、米国ペンシルバニア大学にて行われたアデノウイルスベクターを用いたOTC (Ornithine transcarbamylase) 欠損症に対する臨床研究において、18歳の男性患者が心肺肝不全によりベクター投与4日後に死亡した[15]。またフランスにおいても、2002年に重傷免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency diseases, X-SCID)患者を対象にレトロウイルスを用いた遺伝子導入が行われ、2名の患者に白血病が発症したことが報告されている[17, 18]。これらの原因として、ベクター遺伝子の染色体ゲノム中への挿入によるがん化の可能性が指摘されている[18]。

これらの背景に鑑み、現在ウイルスを用いない遺伝子導入法が注目を集め、化学的手法や物理的手法による遺伝子導入の研究が急速に進められている[28-35]。しかし、標的部位に安全かつ高効率に遺伝子を導入する技術はいまだ確立していない。

1.4.1 化学的方法

化学的遺伝子導入法は担体(キャリア)を用いる方法が多く、リポソームが最も広く用いられている[36-41]。リポソームとはリン脂質などの極性脂質が形成する小胞であり、一層の脂質二分子膜で包まれた単層リポソームと多数の二分子膜が積層した多重層リポソーム (Fig. 1-3) がある。この中に遺伝子を封入し、リポソームと細胞膜間のリン脂質の相互輸送等による膜融合の後、遺伝子はエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれる。しかし初期の中性のリポソームは導入効率や再現性の面で遺伝子治療には適さなかった。DNAと細胞膜が

いずれも負に帯電しているため、導入遺伝子の細胞膜への集積性が低いことがその原因であった。1987年Felgnerは正電荷を持つ合成脂質によるリポソームを作り、さらに電荷によってDNAの周りをこのリポソームで取り囲んだDNAとリポソーム複合体を考案した[42]。この複合体では正電荷のリポソームとDNA複合体が細胞表面に付着し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。これまでにこの考案に基づきLipofectin® (Invitrogen)、リポフェクタミン® (Invitrogen)、トランスフェクタム® (Promega)などが製品化されている。しかし、一般に正電荷のベクターは培養細胞での遺伝子導入には適しているが、組織内においては複数の細胞や細胞間物質により形成される電界が複雑であるため、導入効率が低く実際的ではないとの指摘がある[43]。また化学的手法ではエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるため、導入された遺伝子の多くがリソソームで分解されてしまう。このため、細胞内に導入された遺伝子の核内移行率は 10^{-3} ~ 10^{-4} 程度と低い[44]。また安全性の面では、リポソームの細胞毒性が指摘されている[43]。

1.4.2 物理的方法

近年、安全性の高さや取り扱いの簡便さから担体を用いない Naked DNA の直接導入が注目を集めている。Naked DNA は培養細胞に接触させてもほとんど取り込まれないが、*in vivo*において骨格筋や心筋、皮下、および甲状腺への直接注入によって遺伝子発現が得られる。その導入機構については不明であるが、プラスミド DNA に非特異的なレセプターが骨格筋細胞などに存在し、それに吸着した遺伝子が組織圧によって細胞内に押し込まれると考えられている[1]。しかし、一般に Naked DNA の直接投与では導入効率は低く、物理的エネルギーを併用することで遺伝子導入効率向上および発現を増強する試みが行われている[43, 45, 46]。代表的なものにエレクトロポレーション法[47-62]および超音波遺伝子導入法[63-78]があげられる。

1.4.2.1 エレクトロポレーション法

エレクトロポレーション法(電気穿孔法)とは、細胞に高電圧パルスを印加することで細胞膜を一時的に破壊し、遺伝子を細胞内に導入する方法であり、物理的遺伝子導入法の中では最も広く用いられている[47-62]。1982年に Neumannらにより *in vitro* における初めてのエレクトロポレーションによる遺伝子導入が報告され[51]、1980年代後半には *in vivo* での遺伝子導入が数多く報告されている。

電界が強くなれば電流は細胞膜を貫通して流れる。このときジュール熱により細胞膜が破壊され、小孔が形成される。この小孔を通して、細胞膜表面近傍に存在する遺伝子が細胞内に導入されると考えられているが[52]、小孔形成後の詳細については十分に解明されていない。現在のところ、

- (1) 電圧パルスにより形成される電気泳動力により遺伝子が細胞内へ運ばれる(Fig. 1-4),
- (2) 電圧パルスが脂質二重膜の不安定さを誘起し、エンドサイトーシスが促進されて細胞内に導入される(Fig. 1-5)

といった仮説が提唱されている。

エレクトロポレーションによる遺伝子導入効率には電圧、パルス幅、温度、細胞種、DNA濃度などに依存する。例えば、ラット皮膚への遺伝子導入では、電圧 355 – 1000 V、パルス幅 0.1 – 5.0 ms、電圧パルス数 10 ショットの条件(直流)が用いられている[62]。現在、Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad)、ECM830 (BTX)、PA-4000S PulseAgile® (Cyto Pulse Sciences)、Nucleofector™ (amaxes Biosystems)等のエレクトロポレーション装置が市販されている。エレクトロポレーションの利点として、手技が簡便であること、比較的低コストであることがあげられる。一方で、生体内での電流の空間制御が困難であり、これに伴う熱傷等による組織損傷の可能性といった問題点がある。また *in vivo* では、特定の組織を対象とした場合を除き、体内に直接電極を刺入する必要があり、侵襲的な方法である。また、心臓のように電気を適用する上で注意を要する臓器およびその近傍に適用するのは困難である。

1.4.2.2 超音波法

超音波による遺伝子導入法は、1987年にFechheimerらによって初めて報告された[63]。しかし、その後は1996年にKimらが生存細胞の数%の導入効率を達成するまでほとんど注目されていなかった[64]。従って、エレクトロポレーション法と比較して歴史は浅いが、低侵襲性および手技の簡便性から注目されている[65-78]。この遺伝子導入メカニズムには超音波により発生する気泡(直径1~100 μm)が関与している。液体中に縦波を伝搬させると、波の進行方向に周期的な密度勾配が生じ、Fig. 1-6に示すような高圧域と低圧域が発生する[79]。気泡は負の圧力域で発生し、圧力の変動に伴い成長し、その後崩壊する。超音波による遺伝子導入法では、気泡が崩壊するときに細胞膜に小孔が形成され、また、周囲に高速の液体マイクロジェット流が発生して細胞膜に衝突する。このとき細胞膜付近にある薬物、遺伝子は細胞内へ取り込まれる(Fig. 1-7)。細胞膜には小孔が形成される(Fig. 1-8)、その復元は照射30 s後[67]とも24時間後[68, 69]とも報告されている。一般に高い導入効率を得るためには、1~10 μm のマイクロバブルが封入された超音波造影剤の併用が必要である(Fig. 1-9)。導入効率は超音波の強度、周波数、照射時間、併用する超音波造影剤の特性等に依存するが、他の物理的遺伝子導入法と比較して、得られる導入効率のばらつきが大きいとされている。

1.4.3 レーザを用いた遺伝子導入技術の研究動向

レーザーを用いる方法は1980年代から報告され、空間制御性が高いこと、非接触での応用が可能であること、生体安全性が高いことなどの利点により注目を集めている。初期の報告はレーザーを細胞に直接照射する方法が主流であったが、1990年代以降、多様な方法が報告されるようになった。Table 1-1に、これまでに報告されているレーザーや光を用いた遺伝子導入法および遺伝子導入への応用が期待される方法を示す[80]。多くは治療効果を持たないレポーター遺伝子を対象としたものである。

ここでは、レーザーの直接照射による方法、色素や金微粒子等補助による方法、レーザー誘起応力波による方法について説明する。

1.4.3.1 レーザの直接照射による方法

レーザー光を集光して細胞膜に照射し、アブレーションにより小孔を形成することで、外来遺伝子を細胞内に導入する方法[81-91]で、1984年にTsukakoshiらにより初めて報告された[81]。同報告では、波長 355 nmのQスイッチNd:YAGレーザーの第3次高調波を個々の細胞の細胞膜に照射し、直径数 μm の小孔を形成した(Fig. 1-10)。細胞膜の脂質二重層の性質により、形成された小孔は数秒で閉じると報告されている。また、この方法につきレーザー走査の高速化や光ピンセットの併用といった報告もなされている[82-84]。光源には主として紫外レーザーが用いられてきた。その理由は、波長が短いために小さなビーム径に集光しやすいこと、細胞における光吸収係数が大きいことなどによる。ただし、波長 300 nm以下ではDNAによる光吸収が大きく、障害が問題となるため、その波長域の利用は避けられている。しかし、一般にパルス幅がナノ秒(10^{-9} s)オーダーであるため、照射部周囲に熱影響層(heat affected zone, HAZ)が生じ、細胞機能に影響を与える場合があること等の問題点があった。2002年にTirlapurらはフェムト秒レーザーを用いることにより、細胞機能に影響を与えることなく 100%の確率で遺伝子を導入できたと報告した[85]。彼らは波長 800 nm、繰り返し周波数 80 MHz、ピーク光強度 10^{12} W/cm²のフェムト秒Ti:sapphireレーザーを用い、平均出力 50~100 mWのレーザー光を高い開口数(NA)の対物レンズで集光することで、チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary, CHO)細胞の細胞膜に小孔を形成した。また、他種の型番哺乳類細胞への導入も確認されている。

2005年には、半導体レーザー(波長 405 nm)を用いる遺伝子導入法も報告された[89]。これは線形光吸収を利用する方法ではあるが、光源が小型、低価格である。また、米国のCyntellect社はNd:YAGレーザーの基本波(波長 1064 nm)、第2高調波(波長 532 nm)、第3次高調波(波長 355 nm)の三波長を用いた外来分子導入装置を製品化し(Fig. 1-11)、siRNA (short interfering RNA)を細胞内へ導入できることを報告している[88]。

以上は培養細胞を対象とした *in vitro* における遺伝子導入であるが、レーザーを用いた *in vivo* における遺伝子導入は、2003年に初めて報告された。Zeiraらは、Ti:sapphire フェムト秒レーザー(波長 780 nm、パルス幅 200 fs、繰り返し周波数

76 MHz)の出力パルスで倒立型顕微鏡下でステージ上のマウスに対物レンズで集光し照射した。ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA を脛骨筋に注入し、NA = 0.5 の対物レンズで 1 μm 以下のスポットに集光し、同部位の皮下焦点深さ 2 mm に走査させながら照射した。照射範囲 95 μm \times 95 μm 、照射時間 5 s、皮下焦点位置 2 mm の条件で、40 日以上にわたり高いレベルのルシフェラーゼの発現が得られた。さらに本方法によりエリスロポエチン(赤血球生成促進因子)をコードしたプラスミド DNA の導入を試みたところ、8 週間後においてヘマトクリット値が約 2 割高くなったと報告している[94]。また、Nd:YAG レーザ(波長 532 nm, パルス幅 6 ns)[95]や Er:YAG レーザ(波長 2940 nm, パルス幅 250 μs)[96]を用いた *in vivo*における遺伝子導入に関する報告もなされているが、いずれもレポーター遺伝子の導入に限られている。

1.4.3.2 色素や金微粒子等を補助に用いる方法

細胞培養液に色素としてフェノールレッドを加え、その吸収帯の波長のレーザーを照射することで局所加熱を行うと細胞膜透過性が亢進する。Palumboらは、細胞膜に波長 488 nmのArイオンレーザーを集光照射し、マウス由来NIH 3T3細胞に β -ガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチル転移酵素遺伝子を導入した[97]。フェノールレッドはこの波長において光吸収係数が大きい(モル吸光係数 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。この方法において小孔形成は観察されておらず、彼らは溶液中の色素フェノールレッドの光吸収により細胞膜が局所加熱され、これにより膜透過性が亢進して遺伝子が導入されたと推測している。彼らは利点として、フェノールレッドは通常の培地に含まれており新たに光吸収体を用いる必要がないことや、細胞膜をアブレーションしないので細胞障害性が低いことをあげている。また、Schneckenburgerらは同様の方法について、細胞膜のゲル相から液晶相の変化に伴い蛍光スペクトルが変化するマーカーとして laudanを用い、温度上昇に起因する細胞膜流動性の変化を確認している[98]。

一方、レーザー光をマイクロ粒子やナノ粒子に吸収させることで、細胞膜の透過性を亢進することもできる[99-101]。主として 520 nm 付近に吸収極大を持つ金粒子が用いられている。この方法では粒子と抗体を結合させることで細胞選

択性を得ている(Fig. 1-12). 粒子と結合した抗体は、選択的に特定の抗原を有する細胞膜に付着する. その後レーザ光を照射することにより特定の細胞の膜透過性を亢進する. このときレーザのパルス幅が熱緩和時間よりも短ければ, 発生する熱を局所的に閉じ込めることができる. 膜透過性亢進のメカニズムは明確にはわかっていない.

レーザによる直接的遺伝子導入法ではないが, 遺伝子発現効率を高める方法として光化学反応を利用した方法(Photochemical internalization, PCI)も報告されている[102-106]. エンドサイトーシスによって取り込まれた外来遺伝子はエンドソームに内包され, その多くはライソソームに運ばれ分解されてしまう. PCI では, 光感受性薬剤をエンドソームに融合させ, エンドソームの膜に光照射を行うことで光化学的に破壊し, 遺伝子を細胞質内に放出する(Fig. 1-13). 外来遺伝子の細胞内への導入効率はエンドサイトーシスの頻度に制限されるが, 細胞内の外来遺伝子の挙動を制御する方法として注目される.

1.4.3.3 レーザ誘起応力波による方法

固体媒質にパルスレーザ光を照射すると, その強度に応じた様々な過程により応力波(Laser-induced stress wave: LISW)が放出される. レーザアブレーション閾値以下では, 光侵達長内において媒質が急激に断熱膨張し熱弾性波が発生する. レーザフルエンスが材料の光アブレーション閾値を超えると, 飛散物による反力が発生する. 光強度が十分に高いと媒質表面において光学的絶縁破壊が生じ, プラズマを伴う応力波発生機構が支配的となる. LISW の特性はレーザの波長, パルス幅, フルエンス, 媒質の光学的・機械的特性等で支配される. このとき媒質のレーザ照射側に透明層を接着することでレーザ生成プラズマが閉じこめられ, より高いピーク圧力, 長いパルス幅を持つ LISW を発生できる. LISW の発生に関するメカニズムの詳細については次章において述べる.

LISWを細胞または組織に作用させることにより細胞膜に過渡的な変性や変形を誘起し, 薬剤分子を細胞内に輸送することが可能である. この方式につき, Doukasらによる多くの成果が報告されている[107-114]. 培養細胞を対象とした実験装置の構成例をFig. 1-14 に示す. レーザ光の吸収体を底面にもつウェルに

細胞を培養し、薬剤を添加後、ウェルの下側からパルスレーザー光を照射し、発生したLISWと細胞を相互作用させる。レーザーは光吸収体を透過しないため、細胞とレーザーは直接相互作用しない。細胞膜透過性を亢進させるためのLISWの条件は完全には明らかにされていないが、Doukasらの報告によると、圧力上昇速度が約6 MPa/ns以上で細胞膜透過性が亢進すること[111]、また、圧力の時間積分値が大きくなるにつれて細胞内への外来分子輸送効率が上昇する[112]。また、LinらはQスイッチルビーレーザー(波長 694.3 nm, パルス幅 28 ns, レーザフルエンス 53 J/cm²)を用いてLISWを発生させ、末梢血液細胞に72 kDaのFITC-デキストランを導入した。LISWは細胞膜のみならず核膜の透過性も亢進できる。LISWによる薬剤導入メカニズムは十分に解明されていないが、細胞膜に存在するタンパク質の変性、剪断応力による一時的な膜変形ないし変性などが考えられる。

LISWを用いた遺伝子導入は、*in vitro*においてはFlotteらの論文に記載がみられる[114]。LISWを用いてサル腎臓由来細胞にLac Z遺伝子を導入し、発現が認められたと記述されているが、その照射条件、導入効率などの詳細は不明である。*In vivo*では、Oguraらによりラット皮膚へのレポーター遺伝子の導入が報告されている[115]。ラット背部の皮膚に各種レポーター遺伝子をコードしたプラスミドDNAを注入し、その上にレーザーターゲットを接触させてレーザーを照射することでLISWと皮膚組織を相互作用させる。ルシフェラーゼ発現遺伝子を導入した実験では、照射なし(プラスミドDNA注入のみ)の場合と比較し、2桁以上高い発現レベルが得られている。また、Fig. 1-15はEGFPをコードした遺伝子を導入した皮膚表面における遺伝子発現分布を示している。遺伝子発現がレーザー照射スポット径に対応した直径3 mmにおいてみられることから、部位選択的な遺伝子導入が可能であることがわかる。その他、マウス脳へのGFP発現遺伝子ベクターの導入も報告されている[116]。LISWを用いた遺伝子導入法はレーザーを直接照射する方法と比較してスルーポイント(単位時間あたりに処理できる細胞数)が高く、また応力波の組織内における侵達長が大きいいため、より深部への適用が可能であると考えられる。しかし、これまでの報告はレポーター遺伝子の導入に限られており、著者の知る限り、治療効果のある遺伝子の導入および治療効果を実証した報告はなされていない。また導入が

実証された組織もラット表皮およびマウス脳の 2 例に限られている。

1.5 組織工学

組織工学(Tissue engineering)[117]は、その主な応用領域である再生医療と一体で扱われることが多く、現在のところその用語の使い方は研究者、研究機関によって使い方が異なる。再生医療は Regenerative medicine の直訳であるが、国内においては Tissue engineering を再生医療と訳すこともある。米国国立衛生研究所(National Institutes of Health, NIH)においても”Tissue engineering / regenerative medicine is an emerging multidisciplinary field involving biology, medicine, and engineering that is likely to revolutionize the ways we improve the health and quality of life for millions of people worldwide by restoring, maintaining, or enhancing tissue and organ function”と、”Tissue engineering と Regenerative medicine は一体に扱われている[118]。また、日本組織工学会では、その活動目的を(1)生体を構成する細胞と基質を再び器官として再構成すること、(2)細胞と組織の性質を望む方向へ変えることとしている。厳密に再生医療と組織工学を分けるとすれば、再生医療は組織工学の応用のひとつであり、組織工学は再生医療のために必要な工学的手法と考えることができる。工学的手法により細胞、組織、および基質を望ましい状態へ構成、ならびに変質させる技術を組織工学として考えても大きな誤りではないであろう。

遺伝子を導入することにより成長因子等の生成を増大させることができる遺伝子治療は、組織工学においても重要な技術である。例えば移植治療では、移植組織が生着するためには適切な血行が必要となる。このためには移植組織を薄いものとするか人工血管を用いることが考えられる。しかし、サイトカイン等の生成量の視点から、ある程度の移植組織の厚さは必要不可欠であり、また、人工血管についての基礎研究および臨床試験には少なからぬ歴史があるにもかかわらず、合成ポリマーで作成された血管はその品質が十分ではない場合が多い。材料に強い免疫原性はないが、炎症反応の誘発や腐食性が指摘されている。これらの解決策として、遺伝子治療が期待できる。移植組織に含まれる細胞に

特定の遺伝子を導入することにより、血管新生を促進させるタンパク質を生成させることができる。すなわち、人工的な器官を用いることなく、十分な血行が得られる移植組織を作成することができると期待される。

1.6 本研究の目的と論文の構成

本研究の目的は、LISW を用いた遺伝子導入技術を組織工学に応用することである。LISW を用いた遺伝子導入法は、上述したように多くの利点がある。しかし、これまで導入が実証された対象はラット表皮およびマウス脳に限定されており、その条件依存性に関するデータも限定的である。また、レポーター遺伝子が用いられており、治療効果のある遺伝子の導入は実証されていない。従って、本研究では、まず LISW の特性と細胞への影響について詳細に調べる。また、異なる種類の細胞への遺伝子導入を試み、LISW による遺伝子導入法が表皮細胞以外へも応用可能であることを示す。そして、これらの実験で得られた知見に基づき、治療効果の期待される遺伝子の導入を実証する。さらにこの技術を発展させ、組織工学への応用として、遺伝子導入による移植皮膚の生着促進を試みる。

Figure 1-16 に本論文のフローチャートを示す。

第 2 章では、LISW の発生原理について述べた後、Q スイッチ Nd:YAG レーザを用いた LISW の発生とその測定について述べる。レーザ照射条件を変化させたときの LISW 特性として、ピーク圧力、立ち上がり時間、圧力の時間積分値等のパラメータ特性について述べる。

第 3 章では、LISW を用いた培養細胞への遺伝子導入について述べる。レポーター遺伝子を用いた実験により、LISW の特性と遺伝子導入効率の関係を明らかにし、遺伝子導入において重要となるパラメータについて考察する。また、*in vitro* における遺伝子導入のメカニズムについて考察する。さらに、複数の哺乳類の異なる細胞種への遺伝子導入実験の結果から、LISW による遺伝子導入法が、異なる種類の細胞へも応用できることを示す。

第 4 章では、LISW を用いた遺伝子導入の組織工学的応用として、移植皮膚

の生着促進を目的とした肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクターの導入について述べる。外傷の動物実験において代表的に用いられるラットを対象とした。まず、ラット皮膚へ上記の遺伝子導入を導入し、肝細胞増殖因子生成の有無およびその濃度を調べた結果を示し、次に、ラット移植皮膚へ同遺伝子を導入し、新生血管の生成に関する組織学的分析より、生着促進を評価した結果について述べる。

第5章では、LISWと生体との相互作用について述べる。LISWを適用したラット皮膚を組織学的に観察した結果を示す。さらに、この結果を踏まえ、LISWを用いた *in vivo* における遺伝子導入のメカニズムについて検討する。

第6章は本研究の結論である。本研究により得られた成果を総括するとともに今後の展望を述べる。

なお本研究において実施した動物実験は、全て防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認のもとに実施されたものである。

参考文献 (第1章)

- [1] 岡田善雄, 高久史麿, 寺田雅昭, 豊島久眞男, 遺伝子治療開発研究ハンドブック, (日本遺伝子治療学会編, 1999).
- [2] A. Rolland ed., *Advanced Gene Delivery*, (harwood academic publishers, Amsterdam, 1999).
- [3] 小澤敬也, "遺伝子治療の現状と展望," *現代医療* **35**, 1552 (2003).
- [4] 小澤敬也, "遺伝子治療の将来展望," *からだの科学* **238**, 92 (2002).
- [5] 金田安史, "遺伝子治療の考察," *Med. Sci. Digest* **29**, 94 (2003).
- [6] A. Colosimo, K. K. Goncz, A. R. Homes, K. Junzelmann, G. Novelli, R. W. Malone, M. J. Bennett, and D. C. Gruenert, "Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells," *Biotechniques* **29**, 314 (2004).
- [7] J. D. Watson, F. H. Crick, "The structure of DNA," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **18**, 123 (1953).
- [8] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Essential 細胞生物学* (南江堂, 1999).
- [9] Website of The Journal of Gene Medicine, WILEY
(<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>)
- [10] 阿部純子, 濱田洋文, "サイトカイン遺伝子を用いた癌の免疫遺伝子治療" 遺伝子治療の基礎技術 (羊土社, 1996).
- [11] E. Lin, J. Nemunaitis, "Oncolytic viral therapies," *Cancer Gene Ther.* **11**, 643 (2004).
- [12] M. M. Gottesman, "Cancer gene therapy: an awkward adolescence," *Cancer Gene Ther.* **10**, 501 (2003).
- [13] S. U. Gan, R. Y. Calne, "Gene therapy for hemophilia A," *Discov. Med.* **6**, 198 (2006).
- [14] K. P. Ponder, "Gene therapy for hemophilia," *Curr. Opin. Hematol.* **13**, 301 (2006).
- [15] "Gene therapy on Trial," *Science* **288**, 951 (2000).
- [16] "RAC hears a plea for resuming trials, despite cancer risk," *Science*, **299**,

- 991 (2003).
- [17] Position statement from the European Society of Gene Therapy (ESGT), “France gene therapy group reports on the adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID),” *J. Gene Med.* **5**, 82 (2003).
- [18] Position statement from the European Society of Gene Therapy (ESGT), “Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID),” *J. Gene Med.* **5**, 261 (2003).
- [19] Letter to the editors of *Nature* from the American Society of Gene Therapy (ASGT) and the European Society of Gene Therapy (ESGT), *J. Gene Med.* **5**, 641 (2003).
- [20] M. V. Chaubal, T. J. Roseman, “Drug delivery trends for parenteral therapeutics,” *Drug Deliv. Sys.* **21**, 388 (2006).
- [21] 橋田充, ドラッグデリバリーシステム—創薬と治療への新たなる挑戦—, (化学同人, 1995).
- [22] 高橋俊雄, 橋田充, 今日の DDS・薬物送達システム (医療ジャーナル社, 1999).
- [23] P. Mancheno-Corvo, P. Martin-Duque, “Viral gene therapy,” *Clin. Transl. Oncol.* **8**, 858 (2006).
- [24] 濱田洋文, “次世代ウイルスベクターの開発と遺伝子治療への応用,” *細胞工学*, **20**, 1216 (2001).
- [25] M. T. Lotze, T. A. Kost, “Viruses as gene delivery vectors: Application to gene function, target validation, and assay development,” *Cancer Gene Ther.* **9**, 692 (2002).
- [26] C. Y. Woo, T. Osada, T. M. Clay, H. K. Lyerly, M. A. Morse, “Recent clinical progress in virus-based therapies for cancer,” *Expert. Opin. Biol. Ther.* **6**, 1123 (2006).
- [27] 早川堯夫, 水口裕之, “遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて～新世代アデノウイルスベクターの開発～,” *医薬ジャーナル* **37**, 1541

- (2001).
- [28] L. Collins, "Nonviral vectors," *Methods Mol. Biol.* **333**, 201 (2006).
- [29] M. D. Lavigne, D. C. Gorecki, "Emerging vectors and targeting methods for nonviral gene therapy," *Expert Opin. Emerg. Drugs* **11**, 541 (2006).
- [30] X. Gao, K. S. Kim, D. Liu, "Nonviral gene delivery: what we know and what is next," *AAPS J.* **9**, E92 (2007).
- [31] T. Niidome, L. Huang, "Gene therapy progress and prospects: Nonviral vectors," *Gene Ther.* **9**, 1647 (2002).
- [32] S. Li, Z. Ma, "Nonviral gene therapy," *Curr. Gene Ther.* **1**, 201 (2001).
- [33] 松田修, "非ウイルス性ベクター開発の動向," *医学の歩み* **179**, 489 (1996).
- [34] 橋田充, "遺伝子デリバリー," *分子がん治療* **2**, 188 (2001).
- [35] M. Nishikawa, L. Huang, "Nonviral vectors in the new millennium: Delivery barriers in gene transfer," *Hum. Gene Ther.* **12**, 861 (2001).
- [36] P. R. Clark, E. M. Hersh, "Cationic lipid-mediated gene transfer: Current concepts," *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1**, 158 (1999).
- [37] S. D. Li, L. Huang, "Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery," *Gene Ther.* **13**, 1313 (2006).
- [38] G. Sharma, S. Anabousi, C. Ehrhardt, M. N. Ravi Kumar, "Liposomes as targeted drug delivery system in the treatment of breast cancer," *J. Drug Target.* **14**, 301 (2006).
- [39] 中川晋作, 真弓忠範, "遺伝子医薬品の DDS," *医薬ジャーナル* **37**, 1559 (2001).
- [40] 柳衛宏宣, "遺伝子治療におけるベクターの開発," *外科* **63**, 63 (2001).
- [41] 橋田充, "細胞特異的遺伝子デリバリー," *医薬ジャーナル* **37**, 1553 (2001).
- [42] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7413 (1987).
- [43] D. J. Wells, "Gene therapy progress and prospects: Electroporation and other physical methods," *Gene Ther.* **11**, 1 (2004).

- [44] 中川晋作, 真弓忠範, “遺伝子医薬品の DDS,” 医薬ジャーナル, 37, 101 (2001).
- [45] 田畑泰彦 編, ドラッグデリバリーシステム DDS 技術の新たな展開とその活用法 (メディカルドゥ, 2003).
- [46] 原島秀吉, 田畑泰彦 編, ウイルスを用いない遺伝子導入法の方法論, 技術, 方法論の新たな展開 (メディカルドゥ, 2006).
- [47] C. Favard, D. S. Dean, M. P. Rols, “Electrotransfer as a non viral method of gene delivery,” *Curr. Gene Ther.* **7**, 67 (2007).
- [48] M. Cemazar, M. Golzio, G. Sersa, M. P. Rols, J. Teissie, “Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues *in vivo*: where do we stand?,” *Curr. Pharm. Des.* **12**, 3871 (2006).
- [49] L. C. Heller, R. Heller, “*In vivo* electroporation for gene therapy,” *Hum. Gene Ther.* **17**, 890 (2006).
- [50] L. M. Mir, P. H. Moller, F. Andre, J. Gehl, “Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues,” *Adv. Genet.* **54**, 83 (2005).
- [51] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields, *EMBO J.* **1**, 841 (1982).
- [52] 森村茂, 松村正実, “エレクトロポレーション(電気穿孔法),” 遺伝子工学ハンドブック, 260 (羊土社, 1991).
- [53] S. Somiari, J. Glasspool-Malone, J. J. Drabick, R. A. Gilbert, R. Heller, M.J. Jaroszeski, and R. W. Malone, “Theory and *in vivo* application of electroporative gene delivery,” *Mol. Ther.* **2**, 178 (2000).
- [54] L. Zhang, L. Li, G. A. Hoffmann, and R. M. Hoffman, “Depth-targeted efficient gene delivery and expression in the skin by pulsed electric fields: An approach to gene therapy of skin aging and other diseases,” *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **220**, 633 (1996)
- [55] L. M. Mir, M. F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J. M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, Bertrand Schwartz, and D. Scherman, “High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric

- pulses,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 4262 (1999). [55] J. Gehl, “Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research,” Acta Physiol. Scand. **177**, 437 (2003).
- [56] J. Gehl, “Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research,” Acta Physiol. Scand. **177**, 437 (2003).
- [57] Q. Zheng and D.C. Chang, “High-efficiency gene transfection by in situ electroporation of cultured cells,” Biochim. Biophys. Acta. **1088**, 104 (1991).
- [58] P. F. Lurquin, “Gene transfer by electroporation,” Mol. Biotechnol. **7**, 5 (1997).
- [59] K. Sugihara, H. M. Park, T. Muramatsu, “Foreign gene expression by *in vivo* gene electroporation in the quail testis,” Comp. Biochem Physiol. B **125**, 47 (2000).
- [60] M. Selby, C. Goldbeck, T. Pertile, R. Walsh, and J. Ulmer, “Enhancement of DNA vaccine potency electroporation *in vivo*,” J. Biotech. **83**, 147 (2000).
- [61] 猪阪善隆, 今井圓裕, 高原史郎, “エレクトロポレーション法,” ウイルスを用いない遺伝子導入法の方法論, 技術, 方法論の新たな展開, 148 (2006).
- [62] N. Dujardin, P. Van Der Smissen, V. Preat, “Topical gene transfer into rat skin using electroporation,” Pharm. Res. **18**, 61 (2001).
- [63] M. Fechheimer, J. F. Boylan, S. Parker, J. E. Siskin, G. L. Patel, S. G. Zimmer, “Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading,” Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **84**, 8463 (1987).
- [64] H. J. Kim, J. F. Greenleaf, R. R. Kinnick, J. T. Bronk, M. E. Bolander, “Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells,” Hum. Gene. Ther. **7**, 1339 (1996).
- [65] 谷山義明, 島村宗尚, 富田奈留也, 荻原俊男, 森下竜一, “超音波を用いた遺伝子導入法の開発,” ウイルスを用いない遺伝子導入法の方法論, 技術, 方法論の新たな展開, 152 (2006).
- [66] Y. Taniyama, K. Tachibana, K. Hiraoka, M. Aoki, S. Yamamoto, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Ogihara, and Y. Morishita, “Development of

- safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: Enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle,” *Gene Ther.* **9**, 372 (2002).
- [67] S. Bao, B.D. Thrall, and D. L. Miller, “Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation *in vitro*,” *Ultrasound Med. Biol.* **23**, 953 (1997).
- [68] S. V. Pislaru, C. Pislaru, R.R. Kinnick, R. Singh, R. Gulati, J. F. Greenleaf, R. D. Simari, “Optimization of ultrasound-mediated gene transfer: comparison of contrast agents and ultrasound modalities,” **24**, 1690 (2003).
- [69] 立花克郎, “超音波遺伝子導入法,” 遺伝子導入と発現解析プロトコール, 46 (羊土社, 2003).
- [70] P. E. Huber and P. Pfisterer, “*In vitro* and *in vivo* transfection of plasmid DNA in the dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound,” *Gene Ther.* **7**, 1516 (2000).
- [71] T. Nozaki, R. Ogawa, L. B. Feril Jr., G. Kagiya, H. Fuse, and T. Kondo, “Enhancement of ultrasound-mediated gene transfection by membrane modification,” *J. Gene Med.* **5**, 1046 (2003).
- [72] R. Ogawa, G. Kagiya, L. B. Feril Jr., N. Nakaya, T. Nozaki, H. Fuse, and T. Kondo, “Ultrasound mediated intravesical transfection enhanced by treatment with lidocaine or heat,” *J. Urol.* **172**, 1469 (2004).
- [73] V. G. Zarnitsyn and M. R. Prausnitz, “Physical parameters influencing optimization of ultrasound-mediated DNA transfection,” *Ultrasound Med. Biol.* **30**, 527 (2004).
- [74] 山崎慶太, 青木元邦, 森下竜一, 萩原俊男, “超音波・造影剤による循環器疾患に対する遺伝子治療法の開発,” *遺伝子医学* **6**, 59 (2002).
- [75] Y. Manome, M. Nakamura, T. Ohno, H. Furuhashi, “Ultrasound facilitate transduction of naked plasmid DNA into colon carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*,” *Hum. Gene Ther.* **11**, 1521 (2000).
- [76] Y. Taniyama, K. Tachibana, K. Hiraoka, T. Namba, K. Yamasaki, N.

- Hashiya, M. Aoki, T. Ogihara, Y. Kaneda, R. Morishita, "Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound," *Circulation* **105**, 1233 (2002).
- [77] 立花克郎, "超音波コントラスト法による遺伝子導入の開発," *遺伝子医学* **6**, 55 (2002).
- [78] J. Sundaram, B. R. Mellein, S. Mitragotri, "An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes," *Biophys. J.* **84**, 3087 (2003).
- [79] 超音波便覧編集委員会, *超音波便覧* (丸善, 1999).
- [80] 佐藤俊一, 寺川光洋, 小原實, "レーザー光を用いた遺伝子導入," *ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料, 技術, 方法論の新たな展開*, 160 (2006).
- [81] M. Tsukakoshi, S. Kurata, Y. Nomiya, Y. Ikawa, and T. Kasuya, "A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery," *Appl. Phys. B* **35**, 135 (1984).
- [82] G. Weber and K. O. Greulich, "Manipulation of cells, organelles, and genomes by laser microbeam and optical trap," *Int. Rev. Cytol.* **133**, 1 (1992).
- [83] S. Kurata, M. Tsukakoshi, T. Kasuya, and Y. Ikawa, "The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells," *Exp. Cell Res.* **162**, 372 (1986).
- [84] M. W. Berns, W. H. Wright, R. W. Steubing, "Laser microbeam as a tool in cell biology," *Int. Rev. Cytol.* **129**, 1 (1991).
- [85] U. K. Tirlapur and K. Konig, "Targeted transfection by femtosecond laser," *Nature*, **418**, 290 (2002).
- [86] S. K. Mohanty, M. Sharma, P. K. Gupta, "Laser-assisted microinjection into targeted animal cells," *Biotech. Lett.* **25**, 895 (2003).
- [87] Y. Guo, H. Liang, M. W. Berns, "Laser-mediated gene transfer in rice," *Phys. Plant.* **93**, 19 (1995).
- [88] I. B. Clark, E. G. Hanania, J. Stevens, M. Gallina, A. Fieck, R. Brandes, B. O. Palsson, M. R. Koller, "Optoinjection for efficient targeted delivery of

- a broad range of compounds and macromolecules into diverse cell types,” *J. Biomed. Opt.* **11**, 014034 (2006).
- [89] L. Paterson, B. Agate, M. Comrie, R. Ferguson, T. K. Lake, J. E. Morris, A. E. Carruthers, C. T. A. Brown, W. Sibbett, P. E. Bryant, F. Gunn-Moore, A. C. Riches, K. Dholakia, “Photoporation and cell transfection using a violet diode laser,” *Opt. Exp.* **13**, 595, (2005).
- [90] F. Stracke, I. Rieman, K. Konig, “Optical nanoinjection of macromolecules into vital cells,” *J. Photochem. Photobiol. B.* **81**, 136 (2005).
- [91] D. Stevenson, B. Agate, X. Tsampoula, P. Fischer, C. T. A. Brown, W. Sibbett, A. Riches, F. Gunn-Moore, K. Dholakia, “Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency,” *Opt. Exp.* **14**, 7125 (2006).
- [92] A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman, G. Paltauf, “Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues,” *Appl. Phys. B* **81**, 1015 (2005).
- [93] K. Konig, I. Riemann, P. Fischer, K. Halbhuber, “Intracellular nanosurgery with near infrared femtosecond laser pulses,” *Cell. Mol. Biol.* **45**, 195 (1999).
- [94] E. Zeira, A. Manevitch, A. Khatchatourians, O. Pappo, E. Hyam, M. Darash-Yahana, E. Tavor, A. Honigman, A. Lewis, and E. Galun, “Femtosecond infrared laser-An efficient and safe *in vivo* gene delivery system for prolonged expression,” *Mol. Ther.* **8**, 342 (2003).
- [95] M. Ogura, S. Sato, H. Ashida, M. Obara, “*In vivo* targeted gene transfer by direct irradiation with nanosecond pulsed laser,” *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**, 1268 (2004).
- [96] W. Lee, S. Shen, C. Liu, C. Fang, C. Hu, J. Fang, “Erbium:YAG laser-mediated oligonucleotide and DNA delivery via the skin: An animal study,” *J. Control. Release*, **115**, 344 (2006).
- [97] G. Palumbo, M. Caruso, E. Crescenzi, M. F. Tecce, G. Roberti, and A. Colasanti, “Targeted gene transfer in eucaryotic cells by dye-assisted laser optoporation,” *J. Photochem. Photobiol. B* **36**, 41 (1996).

- [98] H. Schneckenburger, A. Hendinger, R. Sailer, W. S. L. Straus, and M. Schmitt, "Laser-assisted optoporation of single cells," *J. Biomed. Opt.* **7**, 410 (2002).
- [99] C. M. Pitsillides, E. K. Joe, Xunbin Wei, R. R. Anderson, C. P. Lin, "Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles," *Biophys. J.* **84**, 4023 (2003).
- [100] C. Yao, R. Rahmanzadeh, E. Endl, Z. Zhang, J. Gerdes, G. Huttmann, "Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles," *J. Biomed. Opt.* **10**, 064012 (2005).
- [101] 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**, 219 (2003).
- [102] P. K. Selbo, A. Hogset, L. Prasmickaite, and K. Berg, "Photochemical internalisation: A novel drug delivery system," *Tumor Biol.* **23**, 103 (2002).
- [103] A. Hogset, L. Prasmickaite, Pal K. Selbo, M. Hellum, B. O. Engesaeter, A. Bonsted, and K. Berg, "Photochemical internalisation in drug and gene delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 95 (2004).
- [104] A. Ndoye, S. Bouali, G. Dolivet, A. Leroux, P. Erbacher, J. P. Hehr, K. Berg, F. Guillemin, J. L. Merlin, "Sustained gene transfer and enhanced cell death following glucosylated-PEI-mediated p53 gene transfer with photochemical internalisation in p53-mutated head and neck carcinoma cells," *Int. J. Oncol.* **25**, 1575 (2004).
- [105] L. Prasmickaite, A. Hogset, B. BO Engesaeter, A. Bonsted, K. Berg, "Light-directed gene delivery by photochemical internalisation," *Expert Opin. Biol. Ther.* **4**, 1403 (2004).
- [106] S. Oliveira, M. M. Fretz, A. Hogset, G. Storm, R. M. Schiffelers, "Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA," *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1211 (2007).
- [107] A. G. Doukas and T. J. Flotte, "Physical characteristics and biological

- effects of laser-induced stress waves,” *Ultrasound Med. Biol.* **22**, 151 (1996).
- [108] S. Lee, T. Anderson, H. Zhang, T. J. Flotte, and A. G. Doukas, “Alteration of cell membrane by stress waves *in vitro*,” *Ultrasound Med. Biol.* **22**, 1285 (1996).
- [109] D. J. McAuliffe, S. Lee, T. J. Flotte, and A. G. Doukas, “Stress-wave-assisted transport through the plasma membrane *in vitro*,” *Lasers Surg. Med.* **20**, 513 (1997).
- [110] S. Lee, D. J. McAuliffe, H. Zhang, Z. Xu, J. Taitelbaum, T. J. Flotte, and A. G. Doukas, “Stress-wave-induced membrane permeation of red blood cell is facilitated by aquaporins,” *Ultrasound Med. Biol.* **23**, 1089, (1997).
- [111] S. E. Mulholland, S. Lee, D. J. McAuliffe, and A. G. Doukas, “Cell loading with laser-generated stress waves: The role of the stress gradient,” *Pharm. Res.* **16**, 514 (1999).
- [112] T. D. Lin, D. J. McAuliffe, N. Michaud, H. Zhang, S. Lee, A. G. Doukas, and T. J. Flotte, “Nuclear transport by laser-induced pressure transients,” *Pharm. Res.* **20**, 879 (2003).
- [113] T. Kodama, M. R. Hamblin, A. G. Doukas, “Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: Importance of impulse,” *Biophys. J.* **79**, 1821 (2000).
- [114] T. J. Flotte, S. Lee, H. Zhang, D. McAuliffe, T. Douki, A. G. Doukas, “Laser-induced stress transients: Applications for molecular delivery,” *Proc. SPIE* **2391**, 202 (1995).
- [115] M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saito, T. Ikeda, H. Ashida, M. Obara, “*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves.” *Lasers Surg Med.* **34**, 242 (2004).
- [116] Y. Satoh, Y. Kanda, M. Terakawa, M. Obara, K. Mizuno, Y. Watanabe, S. Endo, S. Sato, K. Takishima, “Targeted DNA transfection into the mouse central nerves system using a laser-induced stress wave,” *J. Biomed. Opt.* **10**, 060501 (2005).

- [117] R. P. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, ed. 大野典也, 相澤益男, 偏, 再生医学～ティッシュエンジニアリングの基礎から最先端まで～ (エヌ・ティー・エス, 2002).
- [118] Website of National Institutes of Health, (<http://www.nih.gov/>).

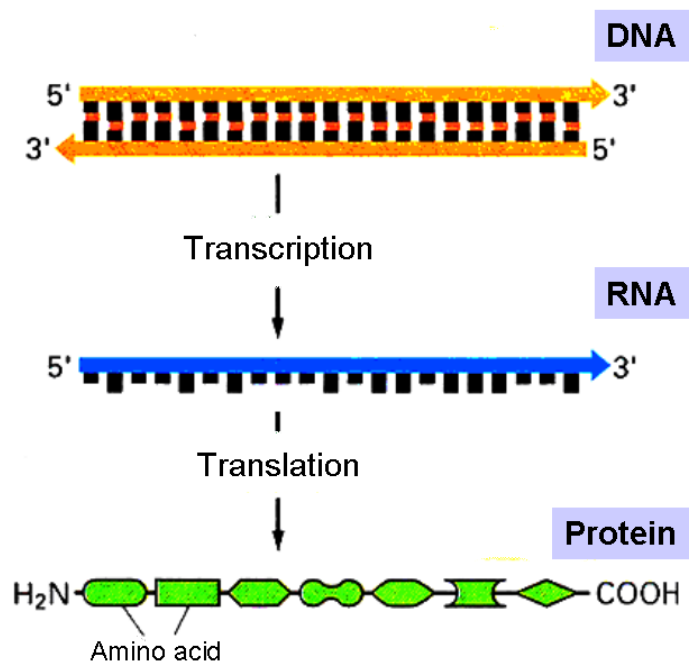


Fig.1-1 Central dogma [参考文献 8 より引用].

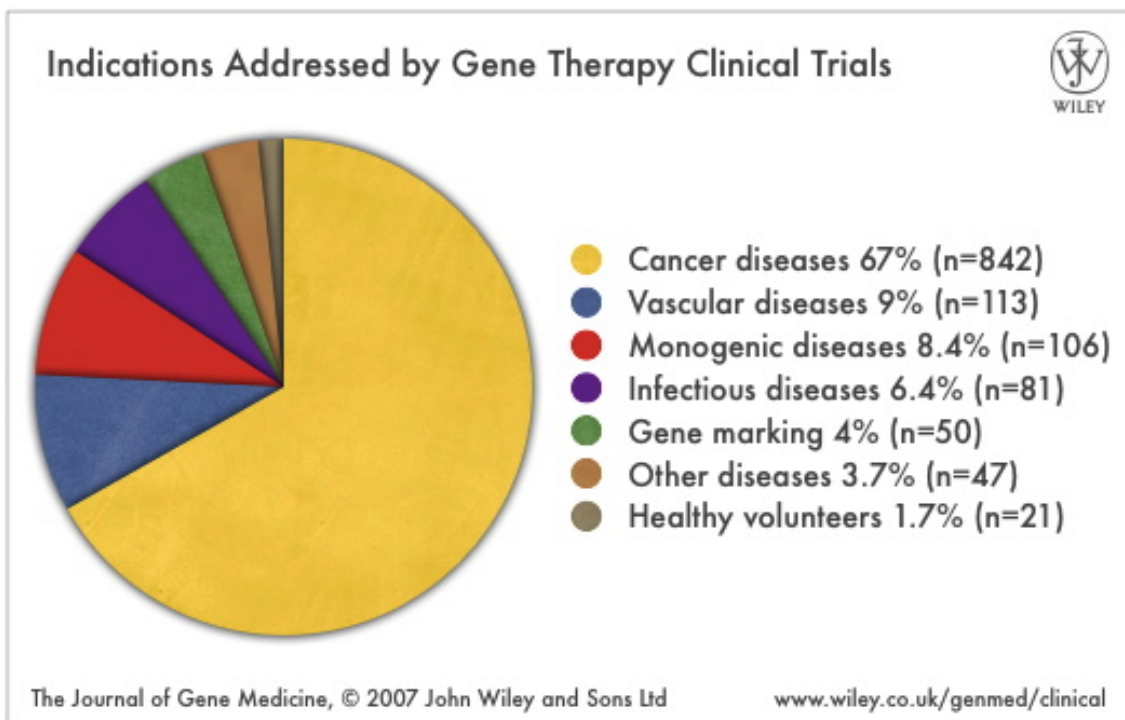


Fig.1-2 Indications addressed by gene therapy clinical trials [参考文献 9 より引用].

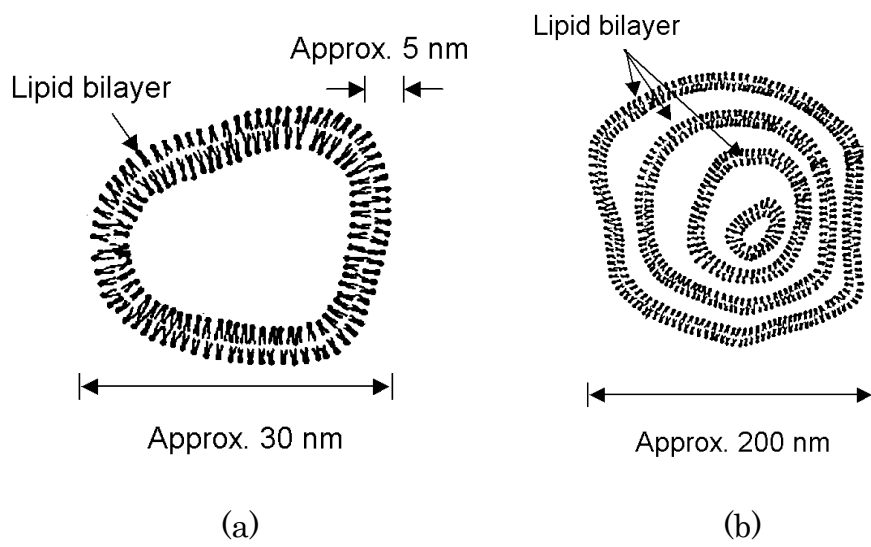


Fig. 1-3 Schematic diagram of liposome [参考文献 1 より引用]: (a) Single compartment liposome, (b) multilamellar liposome.

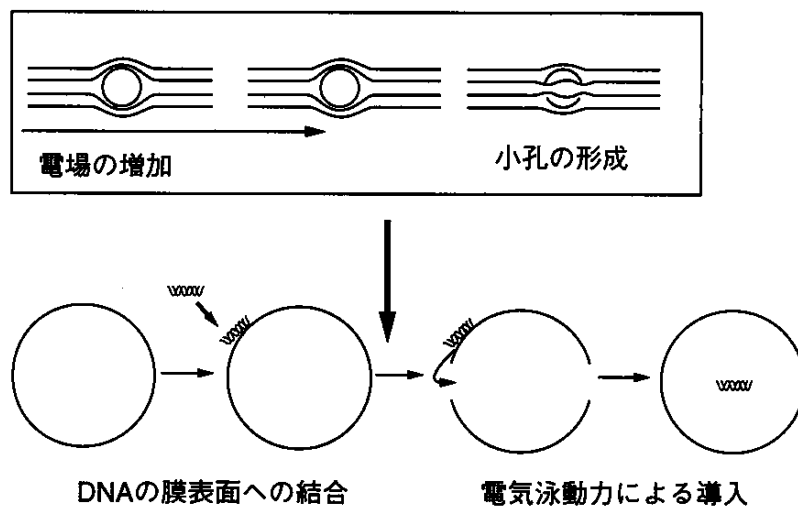


Fig. 1-4 Hypothesis for the mechanism of gene transfection using electroporation; electrophoresis force [参考文献 61 より引用].

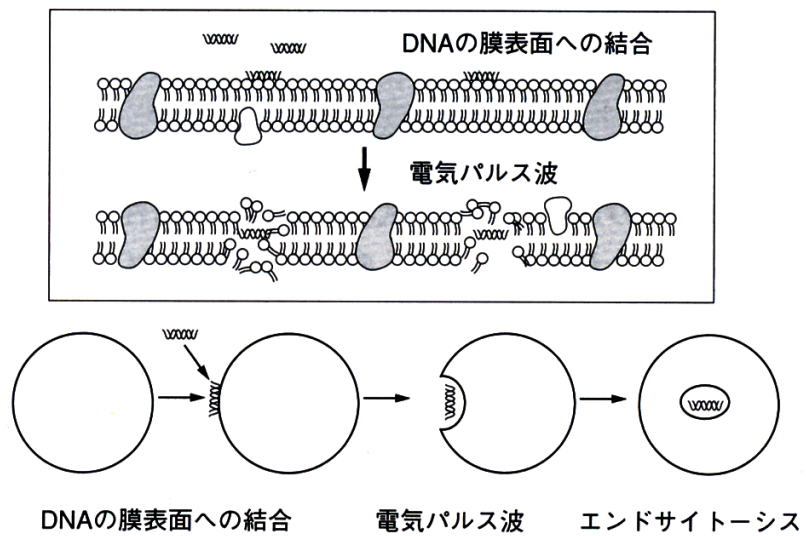


Fig. 1-5 Hypothesis for the mechanism of gene transfection using electroporation; acceleration of endocytosis [参考文献 61 より引用].

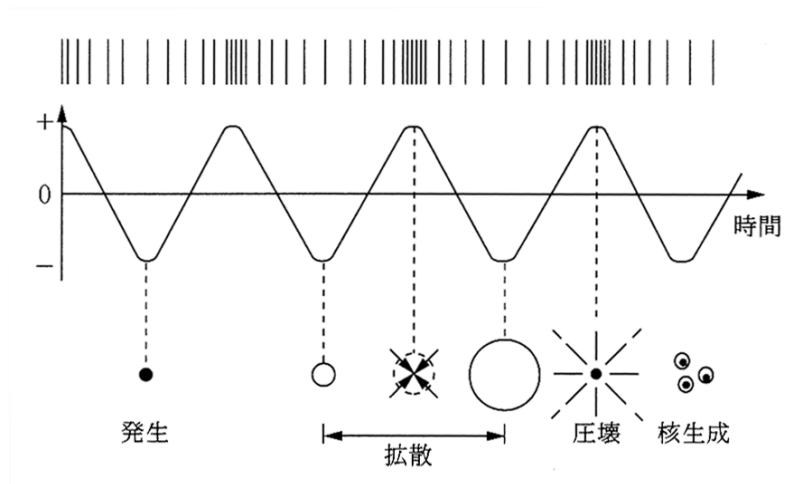


Fig. 1-6 Generation of cavitation bubble [参考文献 79 より引用].

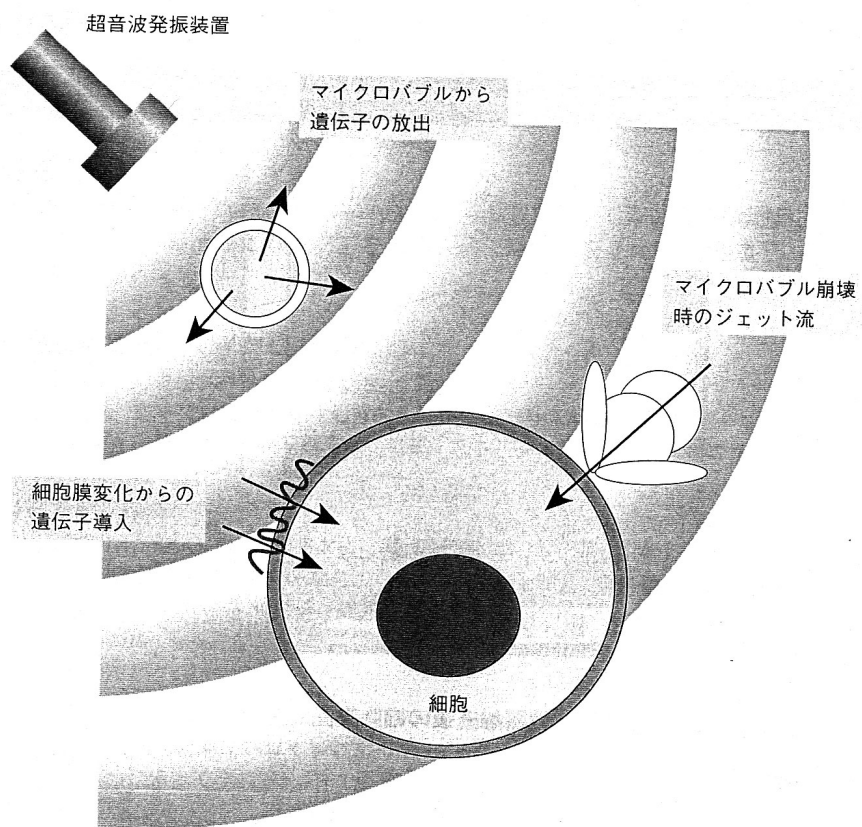


Fig. 1-7 Conceptual diagram of the mechanism of gene transfection using ultrasound [参考文献 69 より引用].

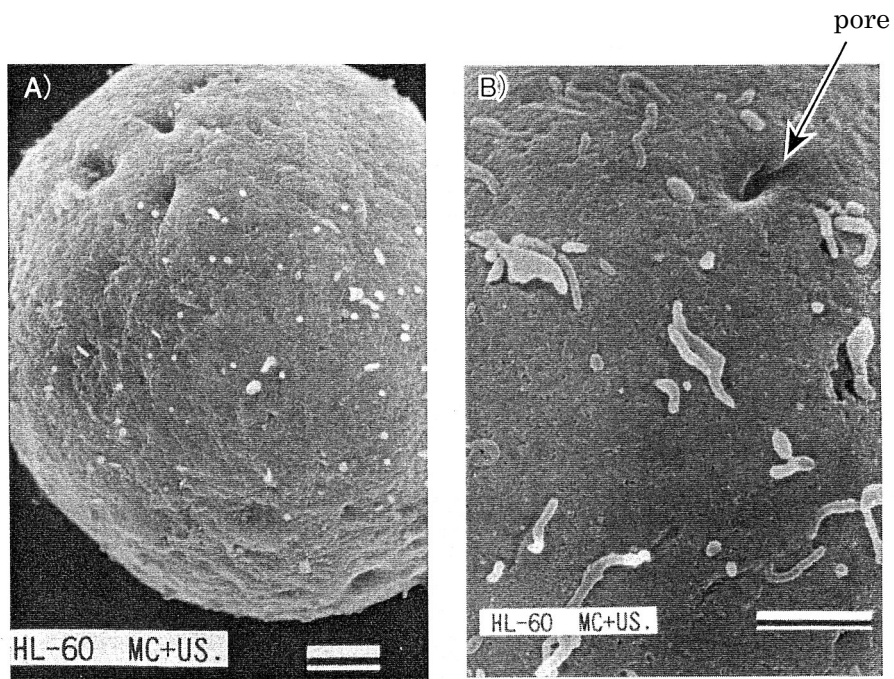


Fig. 1-8 Electron micrographs for cells applied with ultrasound. Arrow indicates pore on cell membrane [参考文献 69 より引用].

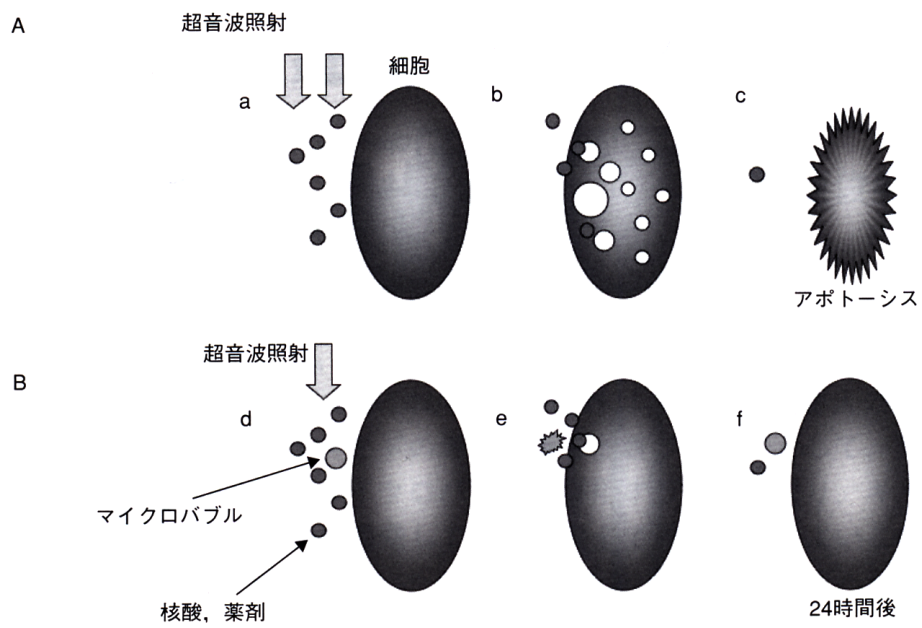


Fig. 1-9 Effect of the use of micro bubble for ultrasound-mediated gene transfection [参考文献 65 より引用]. Application of ultrasound alone (A) and combinational application of ultrasound and micro bubble (B).

Table 1-1 Methods for gene transfection using laser beam

[参考文献 80 より引用].

(*: CW, others: pulsed laser)

方法・対象		レーザー光源	細胞・組織	導入遺伝子		
直接照射	培養細胞 (<i>in vitro</i>)	単一細胞処理	Nd: YAGレーザー 第三高調波 (355nm)	NRK, 他	<i>Eco-gpt</i> , 他	
			半導体レーザー (405 nm) *	CHO	<i>EGFP</i> , 耐抗生剤遺伝子	
			フェムト秒Ti: sapphire レーザー	CHO, PtK2	<i>EGFP</i>	
		同時多細胞処理	Ho: YAGレーザー	MatLu, UM-UC3, LLC-PK1	<i>EGFP</i>	
	生体組織	生体内 (<i>in vivo</i>)		Nd: YAGレーザー 第二高調波 (532nm)	ラット皮膚	<i>EGFP</i>
				フェムト秒Ti: sapphire レーザー	マウス筋	<i>EGFP, Luc, Lac-Z,</i> <i>mEpo</i>
生体外 (<i>ex vivo</i>)		Ho: YAGレーザー	ブタ腎	<i>EGFP</i>		
レーザー誘起応力波	培養細胞 (<i>in vitro</i>)	同時多細胞処理	Nd: YAGレーザー 第二高調波 (532nm)	NIH3T3, 他	<i>EGFP</i>	
	生体組織	生体内 (<i>in vivo</i>)	Nd: YAGレーザー 第二高調波 (532nm)	ラット皮膚, マウス脳	<i>EGFP, Luc, Lac-Z</i>	
その他	色素補助レーザー オプトポレーション	培養細胞 (<i>in vitro</i>)	単一細胞処理	Arイオンレーザー *	NIH3T3, CHO	<i>Lac-Z, CAT, EGFP</i>
	光化学的インター ナリゼーション	培養細胞 (<i>in vitro</i>)	同時多細胞処理	各種連続光 *	HCT116, 他	<i>EGFP</i> , 他

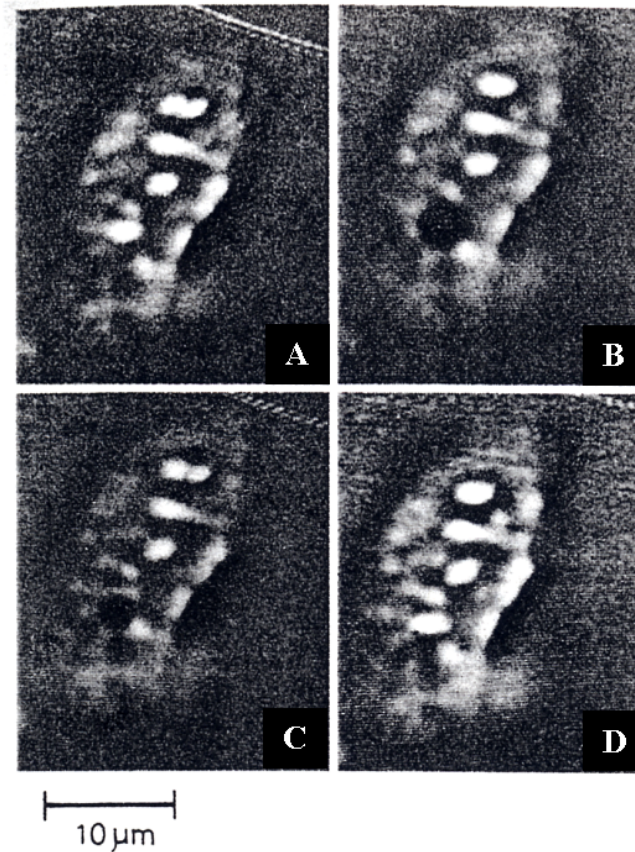
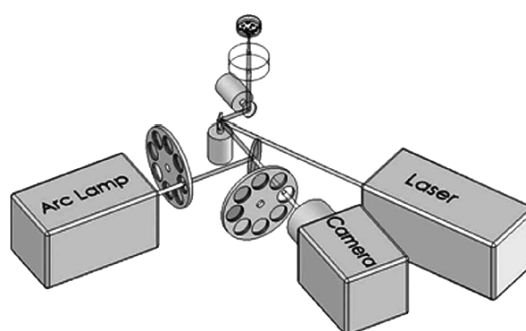


Fig. 1-10 Cells irradiated with UV laser [参考文献 81 より引用]. (A) Before irradiation, (B) immediately after irradiation, (C) initiation of hole obturation, (D) hole almost obturated. Required time for steps (B) through (D) is about 0.5 s.



(a)



(b)

Fig. 1-11 Laser-enabled analysis and processing system (LEAPTM). (a) An apparatus of LEAP [参考文献 88 より引用]. (b) Schematic representation of the key components of LEAP.

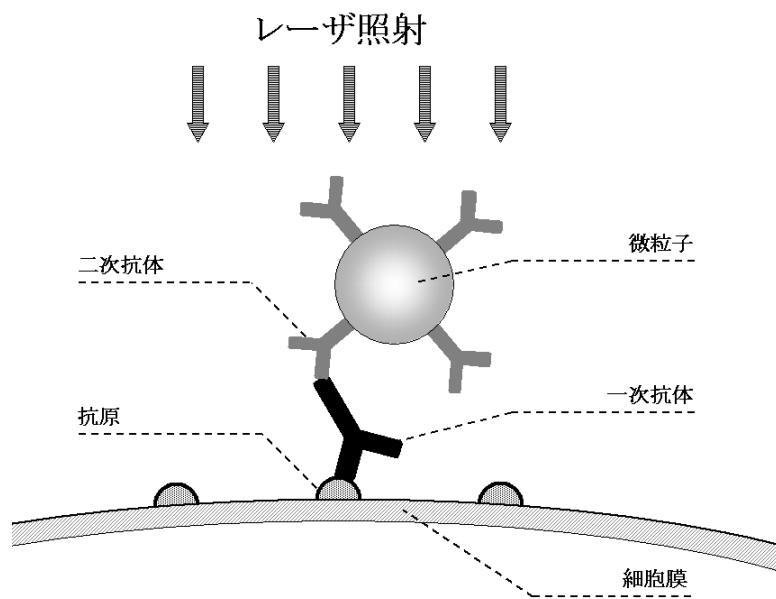


Fig. 1-12 Conceptual diagram of particle-assisted permeabilization using laser beam and antigen-antibody reaction.

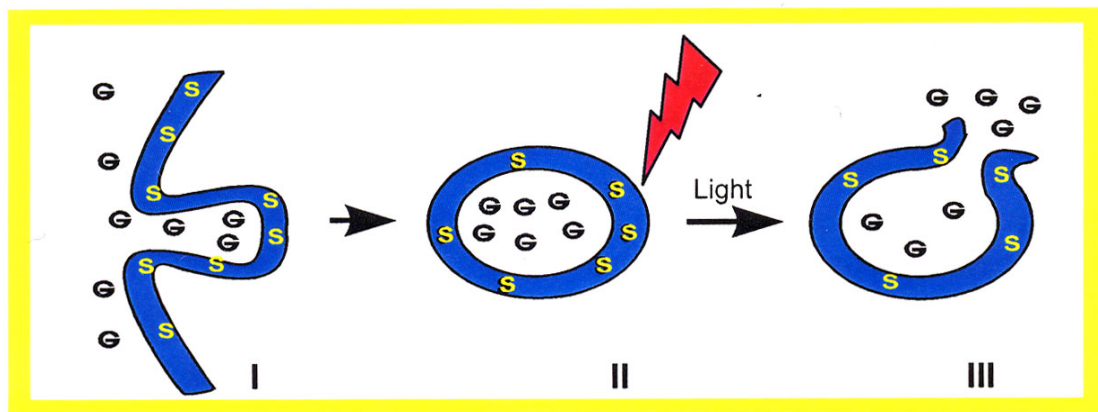


Fig. 1-13 Mechanism of photochemical internalisation [参考文献 103 より引用]. (I) The photosensitizer (S) localizes to the cell membrane, and the molecule to be delivered (G) is invaginated into endocytic vesicles. (II) S and G are taken up into the cell by endocytosis. (III) Illumination leads to photochemical damage and rupture of the endosome membranes, releasing G into the cytosol.

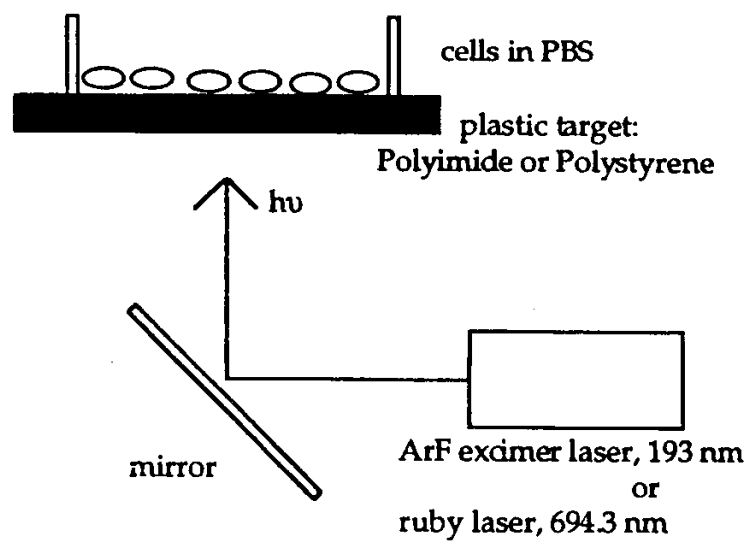


Fig. 1-14 Diagram of the setup for drug delivery using LISW [参考文献 111 より引用].

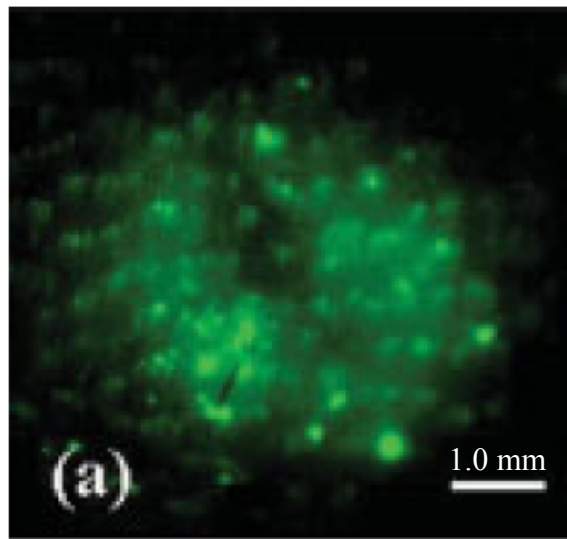


Fig. 1-15 Expression of EGFP in rat skin surface 24 hours after LISW application [参考文献 115 より引用].

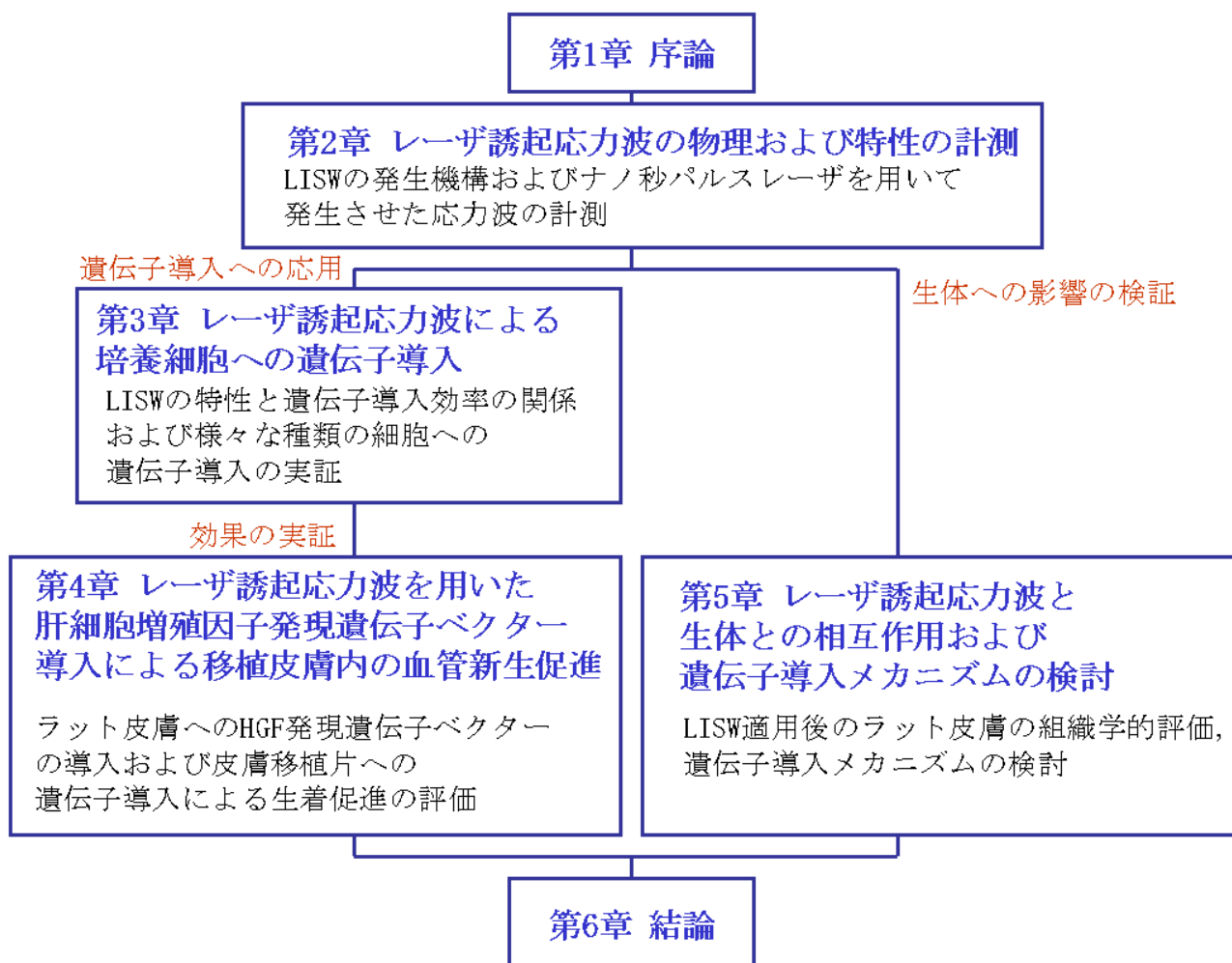


Fig. 1-16 Flow chart of this dissertation.

第 2 章

レーザ誘起応力波の物理および特性の計測

2.1 はじめに

パルスレーザーを光吸収体に照射すると、様々な過程により応力波 (Laser-induced stress waves, LISW) が発生する。短パルスレーザーによる応力波発生は、1964年 Carome らの初めての報告以来[1], 1970年代から1980年代にかけてその発生と特性に関する広範囲にわたる研究が進められた[2-5]。LISW と生体との相互作用は、当初、組織損傷や殺細胞効果に関する報告が中心であったが、1995年 Doukas グループの Flotte らにより LISW の作用を受けた細胞は一時的に細胞膜透過性が亢進することが報告された[6]。同グループの Mulholland らは、圧力上昇速度が約 6 MPa/ns 以上で細胞膜透過性が亢進すると報告した[7]。一方、レーザーではないが、Kodama らは衝撃波管により応力波を発生させ、71,600 Da の Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) を前骨髄球性白血病に導入し、細胞膜透過性の向上は応力波のインパルス(ここでは圧力の時間積分値と定義する)に依存すると報告した[8]。彼らは、インパルスの大きい応力波は細胞外の物質を加速し、細胞膜にずり応力を発生させると推測している。

数百 Da から数十 kDa の低分子量薬剤の導入では、上述したように LISW の特性と細胞膜亢進の関係が報告されている。一方、数 MDa の巨大分子であるプラスミド DNA 等の導入では、Ogura らによるルシフェラーゼ発現遺伝子の導入において、ルシフェラーゼ活性のレーザーフルエンス依存性およびパルス数依存性が報告されているのみであり[9]、著者の知る限り、LISW 特性と遺伝子導入効率に関する報告例はない。

本章では、LISW の発生機構およびその特性を説明する。また、レーザー生成プラズマを伴う LISW 発生では、レーザー生成プラズマを閉じこめることでより効率的に応力波を発生させることができる。この発生理論を説明する。さらに、第3章では遺伝子導入実験につき、遺伝子導入効率と LISW 特性の関係を考察する。本章ではその前段階として、LISW の時間特性、圧力、インパルス、および周波数を計測した実験について述べる。

2.2 レーザ誘起応力波の物理

2.2.1 レーザ誘起応力波の発生

固体材料にパルスレーザー光を照射すると発生するLISWの特性は、レーザーの波長、パルス幅、フルエンス、光強度、固体材料の光学的、機械的特性に依存する。レーザーアブレーション閾値以下では、レーザーエネルギーの注入により、一定体積(照射面積×光侵達長)の急激な熱膨張過程(熱弾性過程)により応力波が発生する。レーザーフルエンスが材料のアブレーション閾値を超えると、飛散物による反力が発生する。さらにレーザーフルエンスが高くなるとレーザー生成プラズマを伴う応力波発生機構に遷移する。例えば、本章 2.4 節で述べる実験に用いる黒色ゴムは、波長 532 nm、パルス幅 6 ns のレーザーを照射した場合、レーザーアブレーション閾値は 80 mJ/cm² であり、0.3 J/cm² 以上においてレーザー生成プラズマ発光が観察される。発生する応力波のピーク圧力は、LISW 発生機構が熱弾性過程、飛散物の反力、プラズマ発生を伴う発生機構と変化するにともなって高くなる(Fig 2-1)。

2.2.1.1 熱弾性過程

パルス幅 τ のレーザーが光吸収体に照射され、以下の条件を満たすとき、光侵達長内において媒質が急激に断熱膨張し物質内において応力波が発生する[10, 11].

$$\tau < \frac{\delta}{v} \quad (2.1)$$

ここで δ は光侵達長、 v は音速である。吸収体中の光の散乱が吸収に比べて無視できるほど小さいとき、(2-1)式は、

$$\tau < \frac{1}{\mu_a v} \quad (2.2)$$

となる．ここで μ_a は光吸収係数である．

また，発生する応力波のピーク圧力 σ は次の式で与えられる．

$$\sigma = \frac{\{1 - \exp(-\tau_0)\} \Gamma F}{2\tau_0 \delta} \quad (2.3)$$

ここで τ_0 はレーザーのパルス幅と応力波伝搬時間の比， F はレーザーフルエンス， Γ は熱膨張理論におけるグリュナイゼンパラメータ(光熱変換効率)を表す．光吸収体と同じであれば， Γ は一定となる．高いピーク圧力を得るためには，レーザーフルエンス F を大きくするか，吸収が高い波長を選択する必要がある．

2.2.1.2 飛散物の反力

高出力パルスレーザーを固体表面に照射すると，あるしきい値フルエンス以上でアブレーションが生じる．プラズマの発生を伴わないとき，応力波の発生過程は固体表面からの飛散物の反力が主体となる[12, 13]．

Phippsらは，真空中における実験から，広い条件範囲(レーザー光強度：3 MW/cm²から70 TW/cm²，波長：248 nmから10.6 μ m，パルス幅：1.5 ms から500 ps)において，以下の式が成り立つことを示した[14]．

$$C_m = b(I\lambda\sqrt{\tau})^{-0.3} \quad (2-4)$$

ここで， C_m はカップリング効率， b は比例定数， I はレーザー光強度， λ はレーザーの波長である．カップリング効率とは，アブレーション時にレーザー光から固体材料へ移動するエネルギー，つまり光から力学的なエネルギーへの変換効率を表す．フルエンスが変化しても応力の波形とレーザーパルスの波形が一定であると仮定すると，カップリング効率は応力波のピーク圧力をレーザー光強度で割った値(σ/I)に近似できる．このとき，照射材料表面における応力波のピーク圧

力 σ は

$$\sigma = bI^{0.7}(\lambda\sqrt{\tau})^{-0.3} \quad (2-5)$$

で表すことができる。

2.2.1.3 プラズマを伴う LISW 発生

高強度短パルスレーザを固体材料に照射すると、固体材料表面において光学的絶縁破壊が生じプラズマが発生する。このプラズマの膨張に伴い、応力波が固体中に発生する[15,16]。以下、プラズマ膨張による LISW 発生に関する Fabbro らによる一次元モデルで説明する[16](式 2-17 まで)。Figure 2-2 において、レーザエネルギーは透明層(glass overlay)を透過し、不透明材料(metallic target)の表面に吸収される。このとき不透明材料表面は加熱され、イオン化した飛散物は透明材料により閉じ込められ、内圧が増大する。時刻 t における発生したプラズマの厚さ $L(t)$ は

$$L(t) = \int_0^t [u_1(t) + u_2(t)] dt \quad (2-6)$$

と表される。ここで u_i ($i=1, 2$; それぞれ、透明材料と不透明材料を表す)はプラズマの膨張速度であり、次の式で定義される。

$$P = \rho_i D_i u_i = Z_i u_i \quad (2-7)$$

ここで、 P, ρ, D, Z はそれぞれ、応力波の圧力、媒質の密度、応力波の速度、応力波インピーダンスである。右の透明層が気体(プラズマ膨張型)であれば、

$$D_i = \left(\frac{\gamma + 1}{2} \frac{P}{\rho_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2-8)$$

が成り立つことが知られている．ここで， γ は定圧モル比熱と定積モル比熱の比である．(2-8)式と，(2-6)および(2-7)式より，

$$P(t) = K \left(\frac{dL(t)}{dt} \right)^2 \quad (2-9)$$

が得られる．ここで，

$$K = \frac{(\gamma+1)\rho_0}{8} \quad , \quad \rho_0 = 4 \left(\rho_1^{\frac{1}{2}} + \rho_2^{\frac{1}{2}} \right)^2 \quad (2-10)$$

である．

時間 dt 間に増加するプラズマの厚さを dL とすると，吸収されたレーザエネルギー $E_L(t)$ は，発生したプラズマを押し広げる定圧変化による仕事 $P(t)dL$ とプラズマの内部エネルギー $E_i(t)[J/cm^2]$ を $d[E_i(t)L]$ までの増加に使われる．

$$E_L(t) = P(t) \frac{dL}{dt} + \frac{d[E_i(t)L]}{dt} \quad (2-11)$$

内部エネルギー $E_i(t)$ が熱エネルギー $E_T(t)$ に変化する割合を α とすると， $1-\alpha$ は気体のイオン化に使われる．理想気体では，圧力 P は熱エネルギー $E_T(t)$ と以下の関係がある．

$$P(t) = \frac{2}{3} E_T(t) = \frac{2}{3} \alpha E_i(t) \quad (2-12)$$

この式を用いると(2-11)式は以下のようなになる．

$$E_L(t) = P(t) \frac{dL(t)}{dt} + \frac{3}{2\alpha} \frac{d}{dt} [P(t)L(t)] \quad (2-13)$$

レーザーパルスを強度 I_0 , $L(0) = 0$ と仮定すると, パルスレーザー照射間の圧力は一定となり, LISW の圧力は

$$P = 3220 \left(\frac{\alpha}{2\alpha + 3} \right)^{2/3} \rho_0^{1/3} \times I_0^{2/3} \quad (2-14)$$

で表される. ここで, 各パラメータの単位は, P : MPa (10^6 Pa), ρ_0 : g/cm³, I_0 : GW/cm² である. 発生する LISW の圧力はレーザー光強度の $2/3$ 乗に比例することがわかる.

2.2.2 プラズマ閉じ込めによる応力波の増大

プラズマを伴う LISW では, 発生したプラズマを閉じ込めることで, 高いピーク圧力および長いパルス幅を得ることができる[16]. 固体材料表面において発生したプラズマの膨張を透明材料により閉じこめたときの LISW 発生では, $Z_i = \rho_i D_i$ が一定であると仮定でき, 式(2-6)および(2-7)から以下の式が得られる.

$$P(t) = \frac{Z}{2} \frac{dL(t)}{dt} \quad (2-15)$$

ここで, $2/Z = 1/Z_1 + 1/Z_2$ である.

2.2.1.3 と同様に, (2-11)–(2-13)式が成立し, レーザーパルス強度 I_0 , パルス幅 τ の方形波と簡単化する. さらに, $L(0) = 0$ と仮定すると, プラズマ LISW のピーク圧力は以下の式のように示される.

$$P = 10 \left(\frac{\alpha}{2\alpha + 3} \right)^{1/2} Z^{1/2} \times I_0^{1/2} \quad (2-16)$$

また, 時刻 $t = t_1$ においてレーザー照射が完了し, プラズマが断熱変化で冷却す

るとき、 $t \gg t_1$ における圧力は以下の式で表される。

$$P(t) = P(t_1) \left(\frac{L(t_1)}{L(t)} \right)^{\gamma} \quad (2-17)$$

この式は、プラズマ膨張型、プラズマ閉じ込め型のいずれにも適用できる。プラズマを閉じ込めることにより $L(t)$ の増大が制限され、レーザ照射後の圧力がプラズマ膨張型と比較し、高い値をとることがわかる。

2.2.3 プラズマによるレーザエネルギーの吸収

2.2.1.3 および 2.2.2 では、プラズマがレーザエネルギーを吸収することを前提として LISW の発生について述べた。プラズマによるレーザの吸収メカニズムは主に逆制動放射(古典吸収)であり、吸収係数(時間平均)は以下の式で表される[17-19].

$$\alpha_{Plasma} \approx \frac{e^2 \tau_e / (m \varepsilon_0 c n)}{1 + (\omega \tau_e)^2} \times \frac{\int I(t) \rho_e(t) dt}{\int I(t) dt} \quad (2-18)$$

ここで e は電子の電荷、 τ_e は電子-原子間衝突時間、 m は電子の質量、 ε_0 は真空の誘電率、 c は光速、 n はプラズマの屈折率、 ω はレーザの角周波数、 I はレーザ光強度、 t は時間、 ρ_e は電子密度を表す。この式から、フルエンスが一定であるとき、プラズマによる吸収は電子密度数に依存することがわかる。電子密度は次のレート方程式で表される。

$$\frac{d\rho_e}{dt} = \left(\frac{d\rho_e}{dt} \right)_{mp} + \eta_{casc} \rho_e - g\rho_e - \eta_{rec} \rho_e^2 \quad (2-19)$$

ここで、右辺第 1 項は多光子吸収による光電離，第 2 項はアバランシェ電離，第 3 項は電子の拡散，第 4 項は電子の再結合を示す。

2.3 応力波の計測方法

絶対値校正されたハイドロフォンを用いることにより，発生した応力波の圧力を測定することができる。ただし，その形状や素子によっては高いピーク圧力やキャビテーションの損傷を受け，感度低下を招き使用不能になることもあるため，測定に適したハイドロフォンを慎重に選択する必要がある。圧電素子は，周波数が数 MHz 以下の圧力の測定には主として PZT(ジルコン・チタン酸鉛焦電効果素子)セラミック，より高周波の圧力測定には PVDF(ポリフッ化ビニリデン)系圧電膜が用いられる[20]。

2.4 レーザ誘起応力波発生と絶対値計測

ここでは，LISW を発生させ，その時間特性，圧力，インパルス，周波数を計測した実験について述べる。これまで報告されたラット皮膚を対象とした LISW による遺伝子導入では，プラズマ閉じ込め型の場合のみ遺伝子導入が確認されている[9]。そこで本研究においても，同様の方式を選択した。また第 3 章で述べる培養細胞への遺伝子導入実験では，レーザ照射ターゲットの変形による細胞損傷を防ぐ目的から，ターゲットと細胞の間にガラスシートを設置した。このとき細胞と相互作用する応力波の特性は，ガラスシートの影響を受けるため，ガラスシートを用いた条件の計測も同様に行った。

2.4.1 実験装置および方法

Figure 2-3 に LISW 計測のための実験構成図を示す。レーザターゲットとして，厚さ 0.5 mm の黒色天然ゴムを用いた。この黒色ゴムの光吸収係数は，波長 500 – 900 nm の白色光での吸収係数： 2000 cm^{-1} 以上[21]である。また，黒色ゴムの

音響インピーダンスは $1.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ であり、生体の音響インピーダンスに近い。このため、界面における反射を抑え効率的に応力波を生体に伝達できる。透明材料として、光学的に透明で加工しやすいポリエチレンテレフタレート (polyethylen terephthalate, PET) を用いた。PET の厚さは 0.1 mm である。黒色ゴムと PET をアクリル樹脂用接着剤で接着した。ハイドロフォンは素子部直径 9 mm のメムレン型 (東レエンジニアリング) を用いた。受圧部は厚さ約 20 μm の PVDF/TrFE (Polyvinylidene fluoride and trifluoroethylene copolymer) 薄膜である。その表面はポリイミドの保護膜で覆い、高圧力に対する耐久性を向上した。絶対値校正によるとこのハイドロフォンは、1 V あたり 13.1 bar (1.31 MPa) である [21]。ターゲットをハイドロフォンの検出面に真空グリース (FS silicone grease, Dow Corning) を介して設置し、Q スイッチ Nd:YAG レーザ (Surelite I-10, HOYA Continuum) の第 2 高調波 (波長 532 nm, パルス幅 6 ns) を平凸レンズ ($f = 170 \text{ mm}$) により集光して照射し LISW を発生させた。黒色ゴム表面におけるビーム直径は 3 mm とした。ハイドロフォンの出力信号は帯域 1 GHz のオシロスコープ (TDS4874D, Tektronics) を用いて記録した。また、ターゲットとハイドロフォンの間に厚さ 0.1 mm のホウ珪酸塩ガラスのシート (Microscope Cover Glass, Fisher Scientific) を挟み、同様の計測を行った (Fig 2-3 (b))。ターゲットとガラスシート、ガラスシートとハイドロフォンの間にはそれぞれ真空グリースを塗付した。各条件 10 回の計測を行い、平均値 \pm 標準誤差を求めた。

2.4.2 実験結果および考察

ハイドロフォンの時間分解能は以下の式で表すことができる [22]。

$$t = \frac{d}{v} \quad (2-20)$$

ここで、 d は圧電素子の厚さ、 v は圧電素子中における音速である。本研究で用いた PVDF/TrFE の厚さは約 20 μm であり、PVDF/TrFE 中における応力波の速度は $v = 2370 \text{ m/s}$ であるため [20]、時間分解能は 8.4 ns と見積もられる。

Figure 2-4 に測定した LISW の時間波形を示す。立ち上がりは短く、約 1 μs の間正の圧力が持続している。最初の鋭いピークの圧力は生成したレーザ誘起プラズマの膨張に伴う圧力、またそのピークから約 0.67 μs 後にみられる極大は黒色ゴムの上下の界面において生じた反射波であると考えられる。その理由は、黒色ゴム内における応力波の速度は $v \doteq 1500 \text{ m/s}$ であるため、0.67 μs の伝搬距離が 1.005 mm と求まる。これは黒色ゴムの厚さ 0.5 mm の 2 倍にほぼ一致する。また、立ち上がりのピーク圧力と約 0.67 μs 後の極大値の間の正の圧力は、レーザアブレーションにより黒色ゴムが気体の状態となり、その内圧によるものと考えられる。気体は時間の経過とともに収縮するため、内圧は減衰する。以上より、LISW はプラズマにより誘起された圧力と黒色ゴムのアブレーションにより発生した気体内圧の和であると考えることができる。

Figure 2-5 に正圧および負圧のピーク値のレーザフルエンス依存性を示す。レーザフルエンスが高まるとともに正のピーク圧力が上昇しているが、しだいにその勾配は緩やかになっている。実験により測定したピーク圧力の変化は近似曲線を求めると、

$$P = 39.0 \times F^{0.63} \quad (P: \text{MPa}, F: \text{J/cm}^2) \quad (2-21)$$

となり、レーザフルエンスの 0.63 乗に比例している。LISW のピーク圧力は、理論的には(2-14)式(プラズマ膨張型)もしくは(2-16)式(プラズマ閉じ込め型)により求められ、それぞれレーザフルエンスの 2/3 乗、1/2 乗に比例する。測定により得られたピーク圧力はプラズマ閉じ込め型にもかかわらず、プラズマ膨張型の 2/3 乗に近い。これは、(2-16)式が、プラズマ閉じ込め型モデルの(Fig. 2-2)において右の透明材料と左の不透明材料が変形しないと仮定しているためと考えられる。本計測では、吸収材料に黒色ゴムを用いたため、特に高レーザフルエンスにおいてはプラズマ発生に伴い黒色ゴムの変形が観測された。すなわち、高レーザフルエンスでは、黒色ゴムの変形により、発生した LISW ピーク圧力のレーザフルエンス依存性はプラズマ膨張型に近い変化をみせたと考えられる。

レーザフルエンスに対する LISW の立ち上がり時間を Fig. 2-6 に、1 ns あたりの立ち上がりの圧力上昇度(Pa/ns)を Fig. 2-7 に示す。レーザフルエンスが変

化しても立ち上がり時間は変化していないことから、圧力上昇速度はレーザフルエンスの上昇にともない増加していることがわかる。ターゲットに注入されるレーザのエネルギーは(2-11)式に示したように、プラズマの膨張および内部エネルギーの増加に用いられる。LISW の立ち上がり時間はレーザのパルス幅とターゲットの光吸収係数に依存する。実験ではレーザフルエンスを増加させてもレーザのパルス幅は一定であり、またターゲットも同一であることから、立ち上がり時間は一定になったと考えられる。LISW のインパルスのレーザフルエンス依存性を Fig. 2-8 に示す。レーザフルエンスが高くなるにつれてインパルスがほぼ線形に増加していることがわかる。ピーク圧力を示す Fig. 2-5 と比較して、ばらつきは小さい。

次に、ガラスシートを設置して計測した場合のそれぞれ正圧および負圧のピーク値のレーザフルエンス依存性を Fig. 2-9 に示す。レーザフルエンスが高まるとともに正のピーク圧力が上昇しているが、負圧のピーク値は減少している。また、Fig. 2-10 に LISW の時間波形を示す。ガラスシートを挟むことにより、その波形が変化していることがわかる。Fig. 2-11 に示すように立ち上がり時間が長くなり、これにともなって圧力上昇度も緩やかになっている(Fig. 2-12)。一方、インパルスはガラスシートを介しても Fig. 2-8 と同程度の値を得ている(Fig. 2-13)。

Figure 2-14 にガラスシートのある場合と無い場合の、レーザフルエンス 1.3 J/cm²における応力波の周波数特性を示す。ガラスシートを挟むことにより、高周波数成分が減衰していることがわかる。一般に、音響波がFig. 2-15 のような平板を透過するとき、透過率 T は入射エネルギーに対する透過エネルギーの比であり、以下の式で表すことができる[20]。

$$T = \frac{4}{4 \cos^2 k_b L + \left(\frac{\rho_b c_b}{\rho_a \rho_a} + \frac{\rho_a \rho_a}{\rho_b c_b} \right)^2 \sin^2 k_b L} \quad (2-22)$$

ここで k_b は平板内における波数、 L は平板の厚さ、 ρ_a 、 ρ_b はそれぞれ平板外の媒質と平板の密度を表す。ここで、平板の固有音響抵抗が周囲媒質よりも大き

くかつ十分薄い場合、すなわち $\sin kL = kL$ (k : 音響波の波数, L : 薄板の厚さ) と近似できるとき、(2-22)式から、

$$T = \frac{1}{1 + (2\pi f M / (2\rho_a v))^2} \quad (2-23)$$

と近似できる。ここで f は周波数, M は薄膜の単位面積当りの板の質量, v は板に隣接する媒質中の音速である。本実験では $M : 0.000373$ [g/mm²], $\rho_a : 0.001$ [g/mm³], $v : 1670$ [m/s]であり、これを(2-23)式に代入すると、応力波の透過率の周波数依存性はFig. 2-16 のようになる。この図から、ガラスシートにより、応力波の高周波成分が減衰することがわかる。これはFig. 2-14 に示した結果と一致する。LISWは広帯域の周波数を含む一方、Fig. 2-14 に示したとおり数MHzまでの成分が主体である。このことから、ガラスシートによる高周波成分の減衰がピーク圧力およびインパルスに大きな影響を与えなかったと考えられる。

2.5 おわりに

本章では、LISW の発生機構を概説した。また、プラズマを伴う応力波発生は、プラズマを透明材料により閉じこめることでピーク圧力が高く、パルス幅が長い LISW を発生できることを述べた。さらに、透明材料を接着した黒色ゴムにナノ秒パルスレーザを照射することで、LISW を発生させ、その時間特性、圧力、インパルス、周波数を計測した。次章では本章で述べた LISW を用いて培養細胞への遺伝子導入を試みた実験について述べる。

参考文献 (第 2 章)

- [1] E. F. Carome, N. A. Clark, C. E. Moeller, "Generation of acoustic signals in liquids by ruby laser-induced thermal stress transients," *Appl. Phys. Lett.* **4**, 95 (1964).
- [2] C. G. M. van Kessel and R. Sigel, "Observation of laser-driven shock waves in solid hydrogen," *Phys. Rev. Lett.* **33**, 1020 (1974).
- [3] K. P. Leung, S. S. Yao, A. G. Doukas, R. R. Alfano, P. Harris, "Photoluminescence determination of the pressure and temperature of the shock wave induced by picosecond laser pulse in the layered semiconductor GaSe," *Phys. Rev.* **1**, 942 (1985).
- [4] L. R. Veaser and J. C. Solem, "Studies of laser-driven shock waves in aluminum," *Phys. Rev. Lett.* **40**, 1392 (1978).
- [5] L. C. Yang, "Stress waves generated in thin metallic films by a Q-switched ruby laser," *J. Appl. Phys.* **45**, 2601 (1974).
- [6] T. J. Flotte, S. Lee, H. Zhang, D. J. McAuliffe, T. Douki, A. G. Doukas, "Laser-induced stress transients: applications for molecular delivery," *Proc. SPIE* **2391**, 202 (1995).
- [7] S. E. Mulholland, S. Lee, D. J. McAuliffe, and A. G. Doukas, "Cell loading with laser-generated stress waves: The role of the stress gradient," *Pharm. Res.* **16**, 514 (1999).
- [8] T. Kodama, M. R. Hamblin, A. G. Doukas, "Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: Importance of impulse," *Biophys. J.* **79**, 1821 (2000).
- [9] M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saito, T. Ikeda, H. Ashida, and M. Obara, "*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves," *Lasers Surg Med.* **34**, 242 (2004).
- [10] A. G. Doukas and T. J. Flotte, "Physical characteristics and biological effects of laser-induced stress waves," *Ultrasound Med. Biol.* **22**, 151 (1996).

- [11] 小原實, 荒井恒憲, 緑川克美, レーザ応用工学 (コロナ社, 1998).
- [12] A. D. Zweig, V. Venugopalan, and T. F. Deutsch, "Stress generated in polyimide by excimer-laser irradiation," *J. Appl. Phys.* **74**, 4181 (1993).
- [13] R. O. Esenaliev, A.A. Oraevski, V. S. Letokhov, A. A. Karabutov, and T. V. Malinsky, "Studies of acoustical and shock waves in the pulsed laser ablation of biotissue," *Lasers Surg. Med.* **13**, 470 (1993).
- [14] C. R. Phipps Jr., T. P. Turner, R. F. Harrison, G. W. York, W. Z. Osborne, G. K. Anderson, X. F. Corlis, L. C. Haynes, H. S. Steele, K. C. Spicochi, and T. R. King, "Impulse coupling to targets in vacuum by KrF, HF, and CO₂ single-pulse lasers," *J. Appl. Phys.* **64**, 1083 (1988).
- [15] A. G. Doukas and A. D. Zweig, "Characterization of plasma-induced shock waves," *Laser-tissue interactions. III. Proc. SPIE 1646*, 275 (1992).
- [16] R. Fabbro, J. Fournier, P. Ballard, D. Devaux, and J. Virmont, "Physical study of laser-produced plasma in confined geometry," *J. Appl. Phys.* **68**, 775 (1990)
- [17] A. Vogel, K. Nahen, D. Theisen, and J. Noack, "Plasma formation in water by picosecond and nanosecond Nd: YAG laser pulses- Part I: Optical breakdown at threshold superthreshold irradiance," *IEEE. J. Select. Topics Quant. Electron.* **2**, 847 (1996).
- [18] K. Nahen, and A. Vogel, "Plasma formation in water by picosecond and nanosecond Nd: YAG laser pulses- Part II: Transmission, scattering, and reflection," *IEEE. J. Select. Topics Quant. Electron.* **2**, 861 (1996).
- [19] J. Noack and A. Vogel, "Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales: Calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density," *IEEE. J. Select. Topics Quant. Electron.* **35** 1156 (1999).
- [20] 超音波便覧編集委員会, 超音波便覧 (丸善, 1999).
- [21] 小倉誠, 博士論文(慶應義塾大学), 2005.
- [22] H. Schoeffmann, H. Schmidt-Kloiber, E. Reichel, "Time-resolved investigations of laser-induced shock waves in water by use of

polyvinylidene fluoride hydrophones,” *J. Appl. Phys.* **63**, 46 (1988).

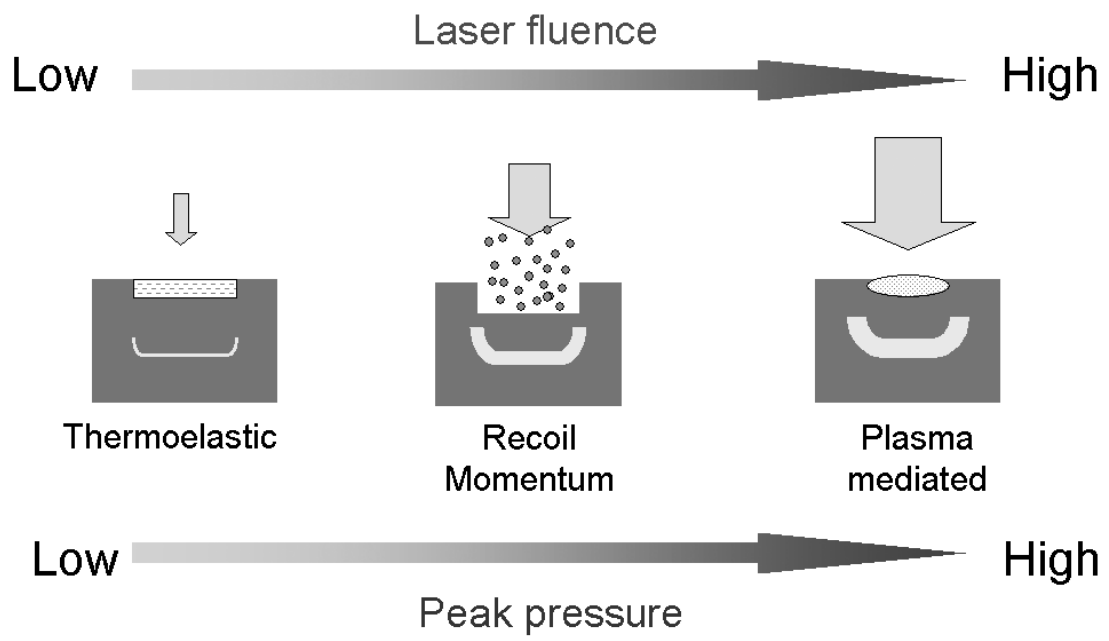


Fig. 2-1 Generation of laser-induced stress waves.

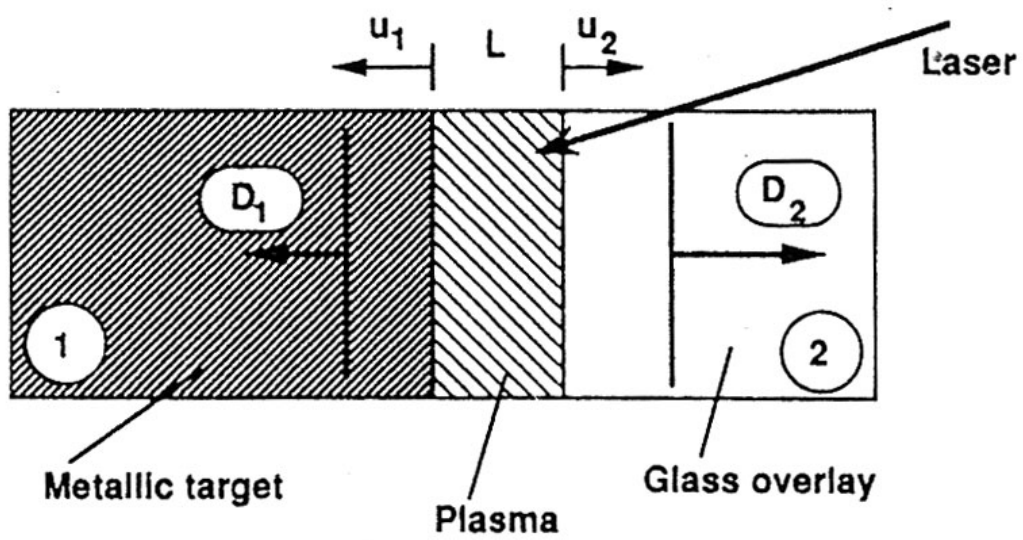


Fig. 2-2 Geometry of the target assembly in confined ablation[参考文献 16 より引用].

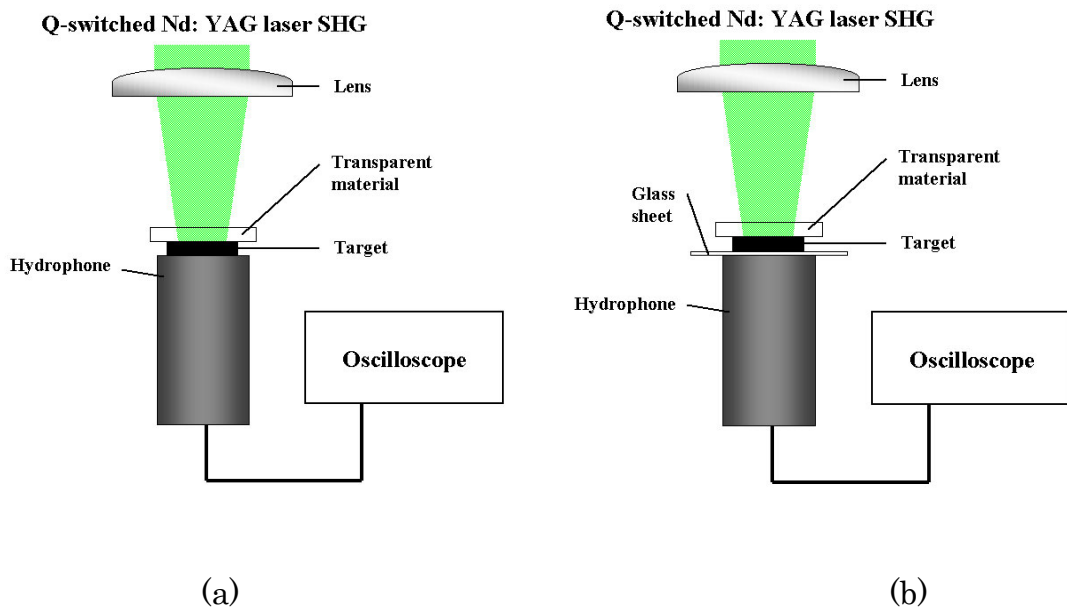


Fig. 2-3 Experimental setup for measurement of LISW: (a) without glass sheet, (b) glass sheet was placed under the target material.

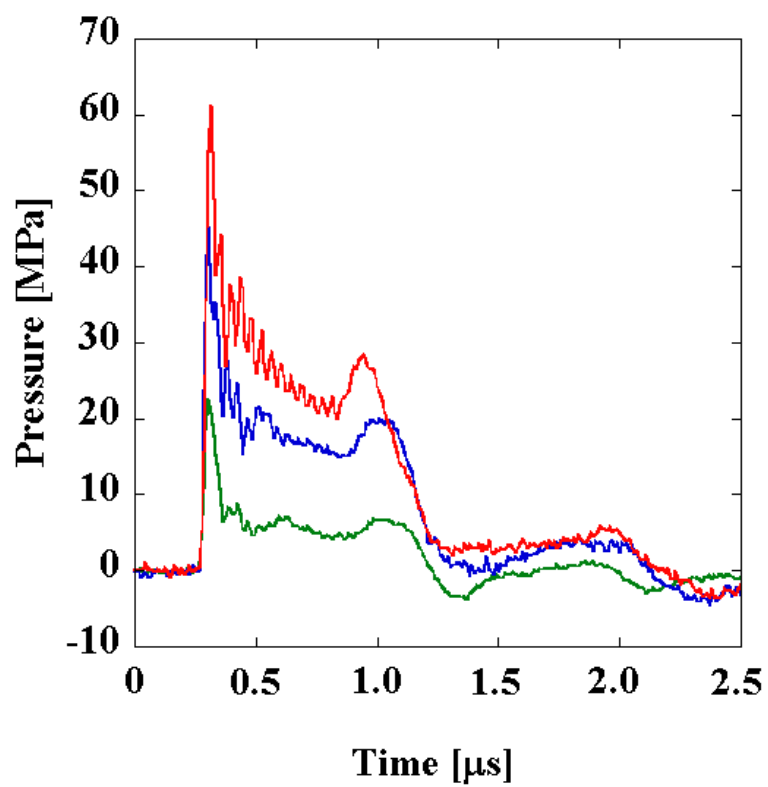


Fig. 2-4 Temporal profile of LISW at laser fluences of 0.4 J/cm^2 (green line), 1.3 J/cm^2 (blue line), and 2.1 J/cm^2 (red line).

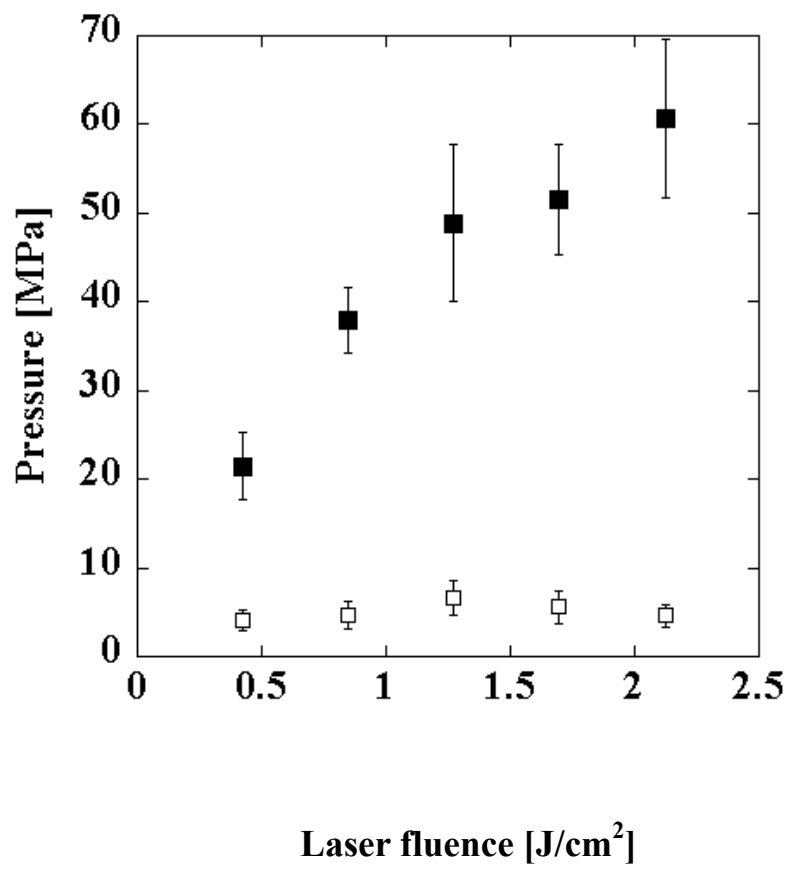


Fig. 2-5 Dependence of positive (closed square) and negative peak pressure (open square) of generated LISWs on laser fluence.

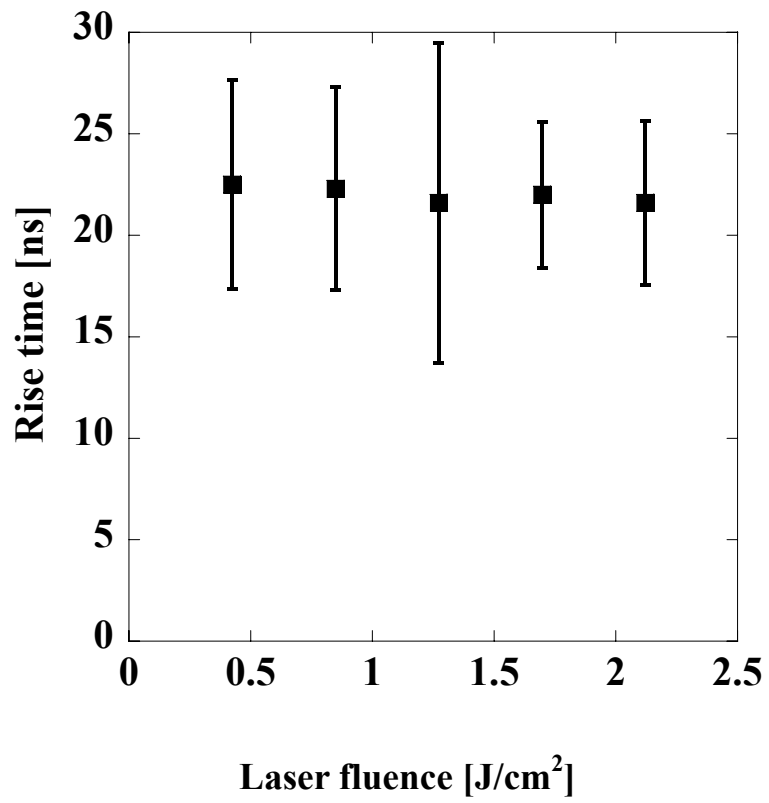


Fig. 2-6 Dependence of rise time on laser fluence.

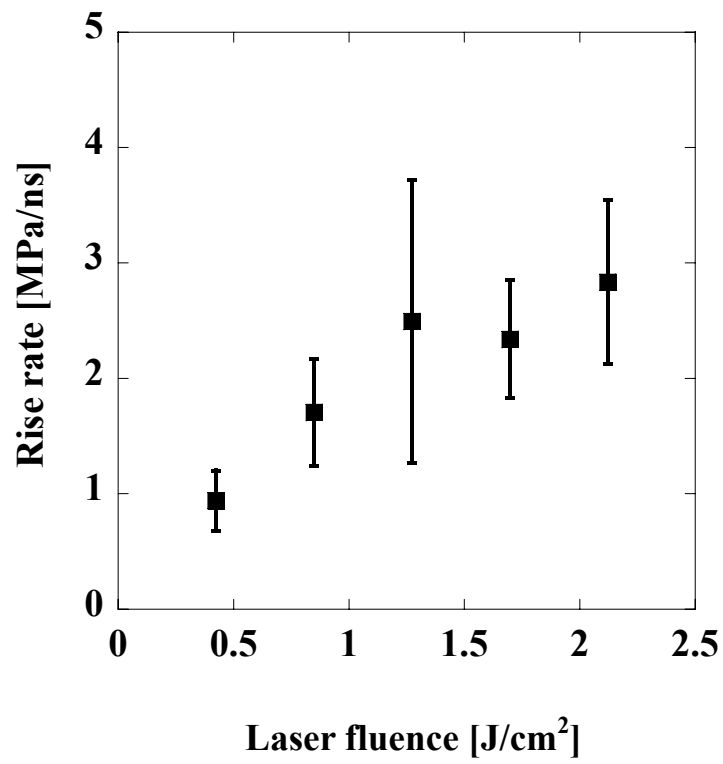


Fig. 2-7 Dependence of rise rate of stress wave on laser fluence.

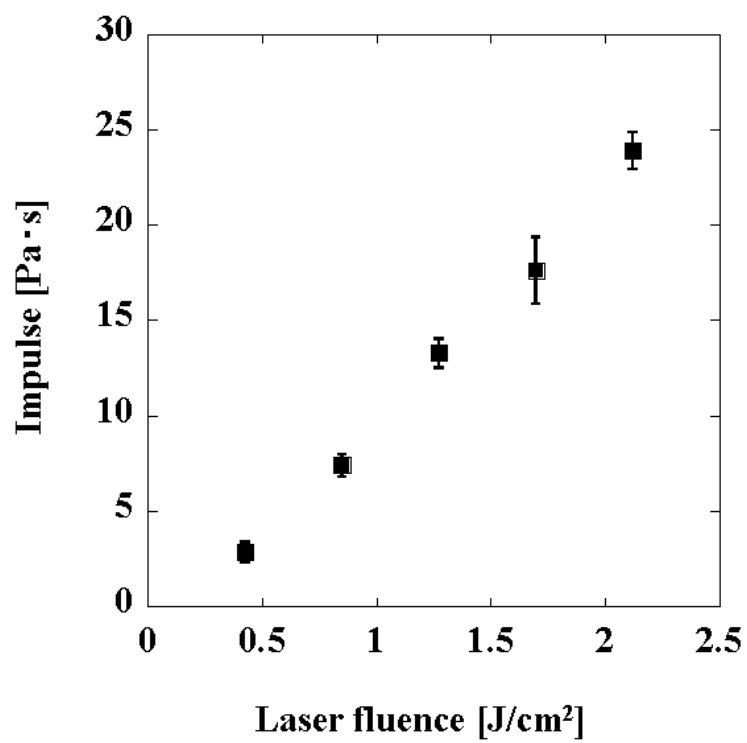


Fig. 2-8 Dependence of impulse (pressure · pulsewidth product) on laser fluence.

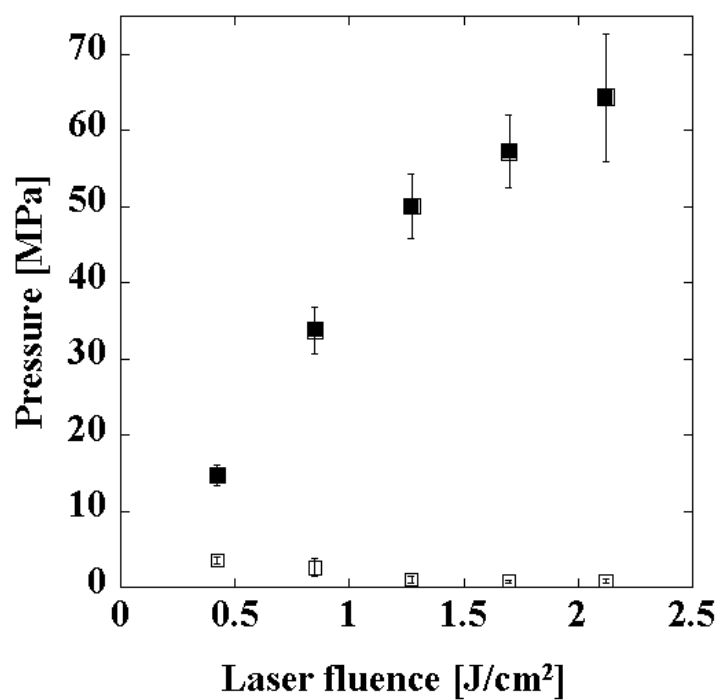


Fig. 2-9 Dependence of positive (closed square) and negative peak pressure (open square) of generated LISWs on laser fluence. Glass sheet was placed under the target material.

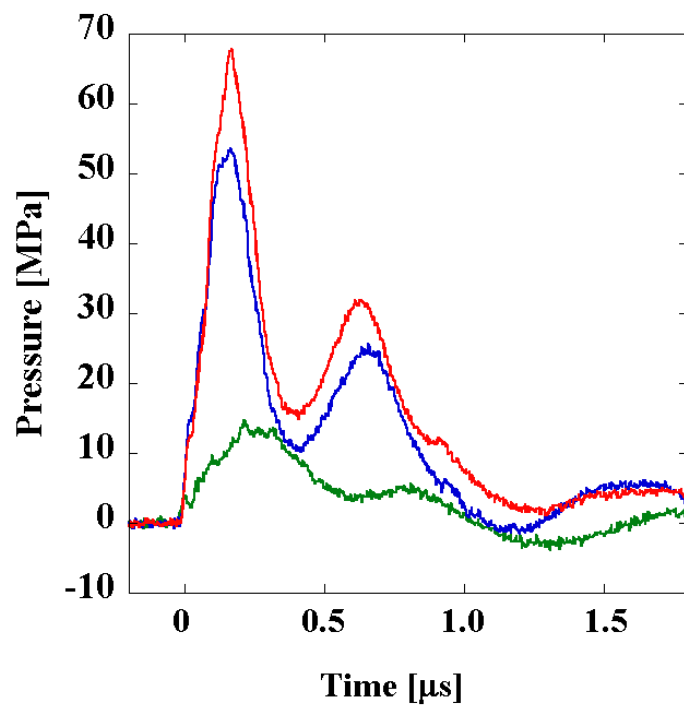


Fig. 2-10 Temporal profile of LISW when a glass sheet was placed under the target material at laser fluences of 0.4 J/cm^2 (green line), 1.3 J/cm^2 (blue line), and 2.1 J/cm^2 (red line).

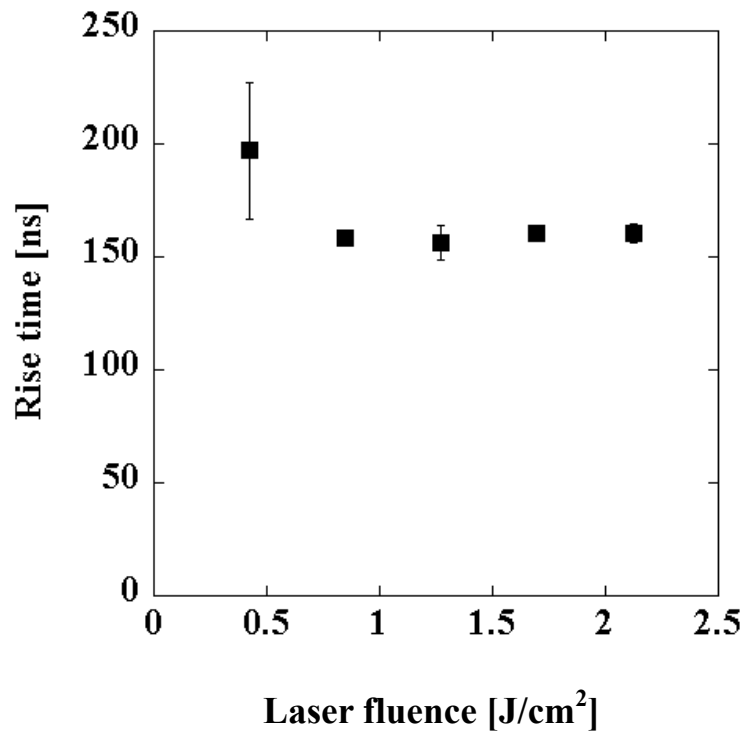


Fig. 2-11 Dependence of rise time on the laser fluence. The glass sheet was placed under the target material.

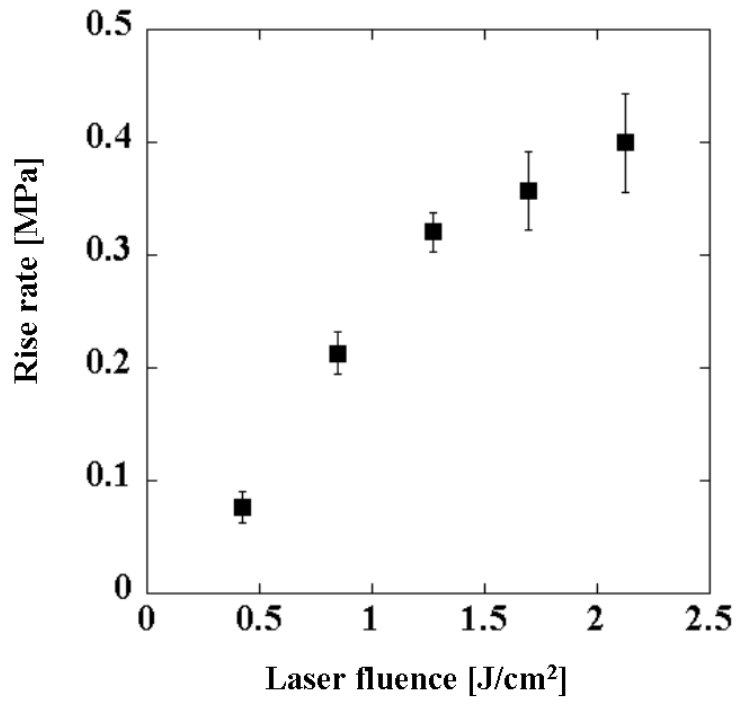


Fig. 2-12 Dependence of rise rate of stress wave on laser fluence. Glass sheet was placed under the target material.

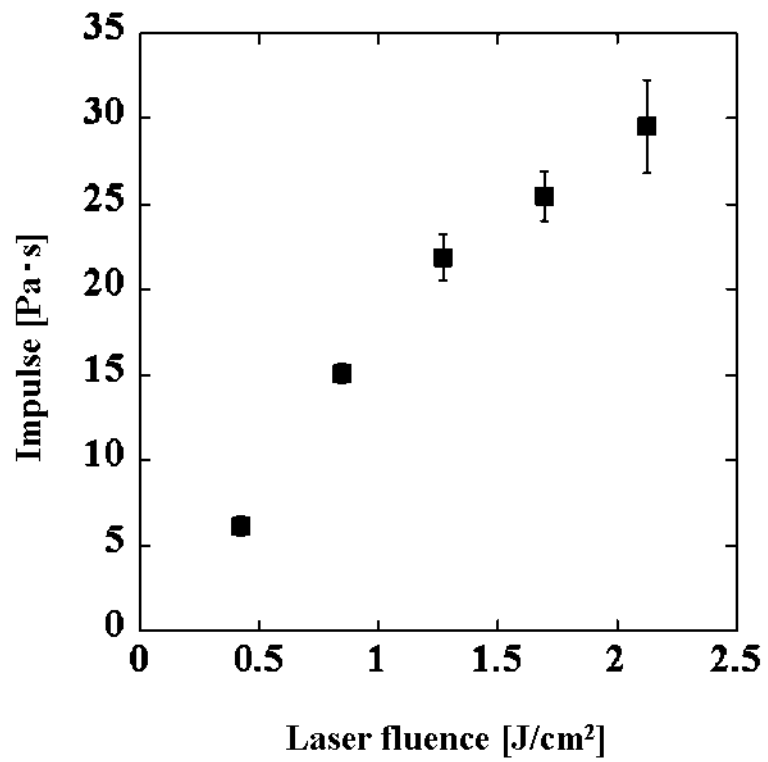


Fig. 2-13 Dependence of impulse (pressure·pulsewidth product) on laser fluence. Glass sheet was placed under the target material.

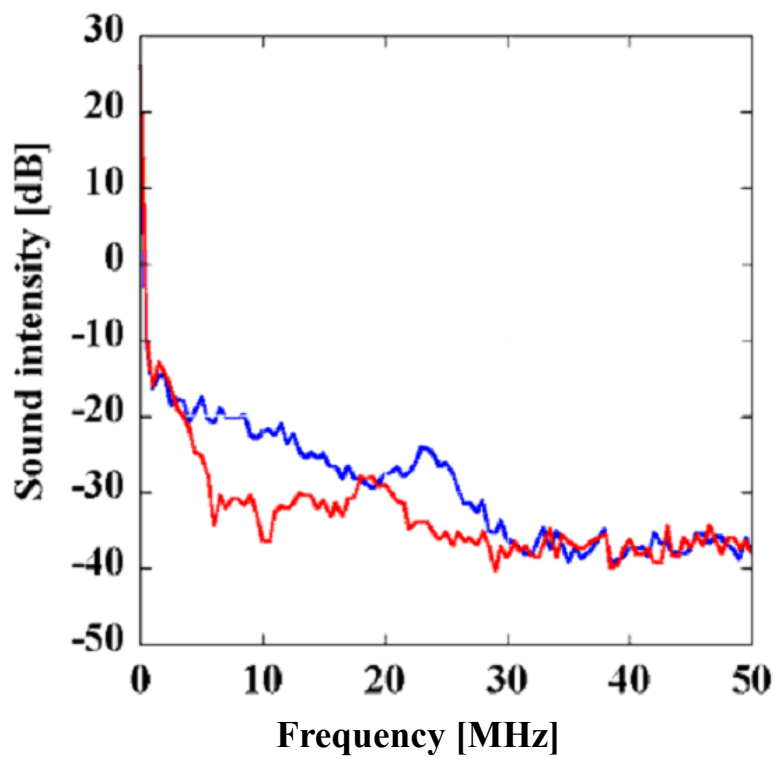


Fig. 2-14 Frequency spectrum of LISW generated without glass sheet (blue line) and with glass sheet (red line).

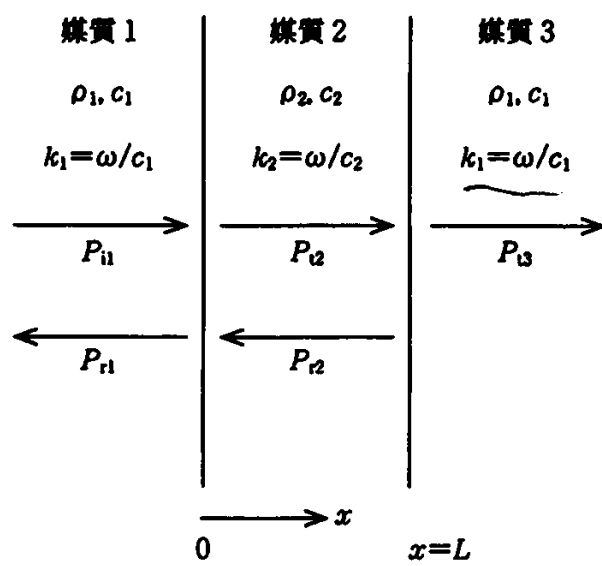


Fig. 2-15 Acoustic wave transmittance.

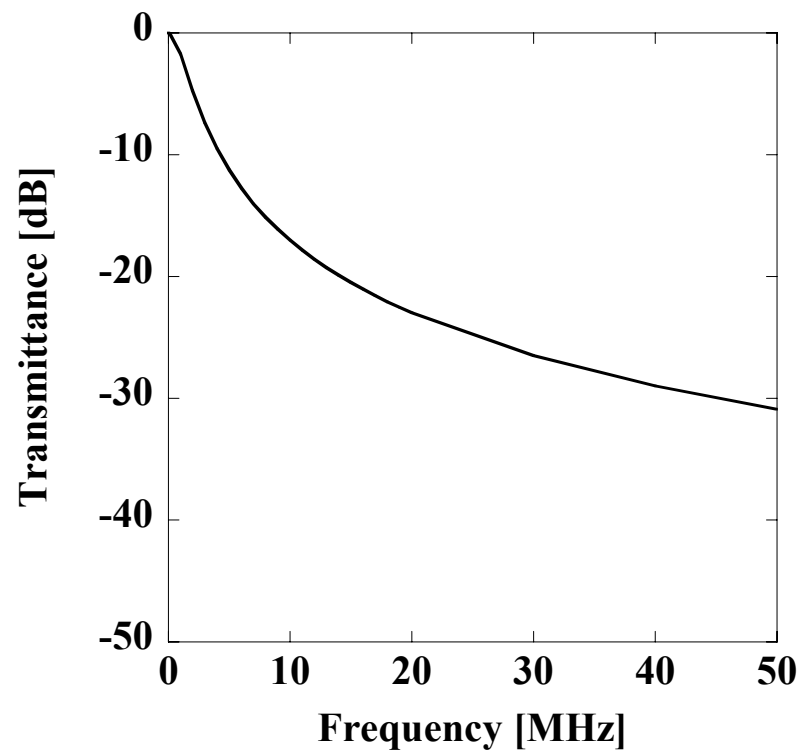


Fig. 2-16 Transmittance as a function of frequency for thin sheet.

第 3 章

レーザー誘起応力波による培養細胞への遺伝子導入

3.1 はじめに

LISW を用いた遺伝子導入法の報告は，ラット皮膚およびマウス脳を対象とした *in vivo* 実験に限られている．本章ではまず，LISW が導入遺伝子であるプラスミド DNA に与える影響について調べた結果を述べる．次に，LISW を用いた遺伝子導入技術を組織工学に応用するための前段階として，LISW の特性と遺伝子導入効率の関係について調べる目的で行った培養細胞を用いた *in vitro* 実験について述べる．また，遺伝子を導入する際に障壁となる細胞膜の流動性が加温により増大するという特性に着目し，LISW 適用時の細胞環境温度の影響について調べた．さらに，本方法が適用できる細胞の種類について調べるために，複数の哺乳類の細胞種を用いた遺伝子導入実験を行った．

3.2 遺伝子導入の方法論

遺伝子治療を成功させるためには，巨大分子である遺伝子を最終的に細胞の核内へ導入しなければならない．しかし遺伝子が細胞膜と核膜という二つの障壁を透過することは容易ではない．このため遺伝子治療においては，何らかの手法により，細胞膜，核膜の透過率を亢進させる必要がある．ここでは，遺伝子導入実験に用いるベクターとレポーター遺伝子について述べ，次に遺伝子を導入する際に障壁となる細胞膜および核膜の構造とその輸送経路について説明する．

3.2.1 ベクター

遺伝子治療においては，導入したい遺伝子を組み込んだベクター(運び屋)が用いられる．具体的には，ウイルスまたはプラスミド DNA が用いられ，前者をウイルスベクター，後者をプラスミドベクターという [1, 2]．ベクターは供与体 DNA の増幅を目的としたクローニングベクターと，遺伝子の機能発現を目的とした発現ベクターに分けられる．遺伝子治療においては後者を細胞内へ導入す

る。ウイルスベクターを用いる導入法の利点は高い導入効率であるが、第 1 章で述べたとおり、死亡例を含む重大な副作用が報告され安全性の問題がある [3-7]。一方、近年ウイルスベクターが持つ免疫反応誘発の危険性が無く、ウイルスベクターと比較して大量生産および品質維持が容易であることから、プラスミドベクターを利用した遺伝子治療が注目を集め、精力的な研究が進められている。一般に、遺伝子治療に用いられるプラスミド DNA (Fig. 3-1) は数 MDa であり、そのサイズは、幅 2 nm、長さ数 μm である。

3.2.2 レポーター遺伝子

遺伝子導入技術の有効性の確認はレポーター遺伝子を用いて行うことができる [8, 9]。レポーター遺伝子とは、遺伝子が導入されて発現すると染色性や蛍光ないし発光を生ずることから、遺伝子導入の成否あるいはその発現の強さを調べるために用いられる遺伝子である。クロラムフェニコールアセチル基転移酵素 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT), β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase), 発光生物由来のルシフェラーゼなど、多くのアッセイ (評価法) が存在するが、本章で述べる遺伝子導入実験では GFP (Green Fluorescent Protein) 法を用いたため、ここではその詳細を述べる。

GFP はオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) に由来するタンパク質で、生きた個体および細胞内での遺伝子発現およびタンパク質間の結合等のレポーター分子として応用されている [10]。GFP 分子は樽状の構造を持ち、紫外や青色光で励起すると淡緑色を発する。蛍光観察を行う際に他の基質を必要とせず、励起光のみで強い蛍光を得ることができるため、細胞を固定する必要がなく、生きたまま経時的に蛍光観察を行うことが可能である。野生型の GFP は不安定なために 37 °C において樽状構造を保てず、特に哺乳類の実験において問題があった。しかし、改変して安定化した EGFP (Enhanced GFP) 等が開発されている。本章で述べる実験で用いた EGFP (Clontech, pEGFP) (Fig. 3-2) は、励起波長 488 nm で 507 nm 近辺の波長帯域蛍光を用いて観察を行う。

3.2.3 細胞の構造

3.2.3.1 細胞膜の構造と輸送経路

Figure 3-3 に細胞の構造図を示す[12]. 核は細胞の働きの中核となる部分で、内部に染色糸(分裂時には染色体を形成する)と核小体がある. 染色糸には遺伝物質である DNA が含まれ、DNA のもつ遺伝情報に従って細胞内で物質合成が行なわれる. 遺伝子治療においてはこの核内へ、特定のタンパク質をコードした遺伝子を外部から導入しなければならないため、細胞膜と核膜という二つの障壁を透過させる必要がある.

細胞膜は、主に脂質とタンパク質が非共有結合により集合体を形成した厚さ 5 – 8 nm 程度の膜であり、細胞内外の物質輸送、および細胞間接着、さらには情報伝達を行なう [2]. 細胞膜を構成する脂質分子は、親水性の部分と疎水性の部分から構成されている(両親媒性). リン脂質分子がつくる膜の基本構造は、親水性の頭部は細胞膜の外側に面し、疎水性の尾部は細胞膜の内側に面する二重膜構造となっており、脂質二重層と呼ばれる(Fig. 3-4). 細胞膜は一種の仕切りであり障壁であるが、それと同時に特定の物質だけを通すルートも備えていなければならない. このような一見矛盾する特性を可能にする膜構造について、Singer と Nicolson は流動モザイクモデルを提唱し、現在大筋においてその妥当性が認められている (Fig. 3-5). 物質通過にかかわるタンパク質は脂質二重層中に一部埋め込まれ、膜中を貫通する形で存在している. 膜の脂質層は、生物の体温においてある程度の流動性(fluidity)を保っているため、タンパク質はその中を膜面に沿って動くことができる. 流動性は、膜内での構成因子の流動しやすさを表すのに用いられ、膜の粘性係数の逆数で表すことができる.

脂質二重層の各層中に配列するリン脂質分子は、低温ではアルキル鎖の屈曲運動がほとんどおこらず、鎖間距離を小さく保って秩序正しく配列するので、結晶状態に似た構造をとる [13-16]. 温度が上昇すると、アルキル鎖の運動が激しくなり、鎖間距離も開いて、液体の状態に近くなる(液晶, liquid crystal). 生体膜の脂質はこれら結晶と液晶との二つの状態をとるが、水分と脂質の割合や温度の変化に応じてこの両相の間で転移し、これを相転移(phase transition)という. この相転移にともなって、膜脂質の種々の物性は大きく変化する. 例え

ば脂質分子やタンパク質分子の拡散定数は、液晶相への相転移により数十倍から数百倍も大きくなるとともに、脂質一分子が膜内で占める面積は約 25%増加し、膜の厚さは約 20%減少する[2]。相転移を引き起こす温度は、脂質分子のアルキル鎖の長さや飽和度(二重結合の数)などの構造因子に大きく依存する。

細胞膜、生体膜を介しての物質の移動は、その移動にエネルギーを必要とするか否かによって受動輸送 (passive transport) と能動輸送 (active transport) の 2 種類に大別される。これら概念図を Fig. 3-6 に示す。電荷をもたない溶質分子が十分小さければ、濃度勾配にそって単純拡散により脂質二重層を通過して移動できる。このような物質の例としては、エタノールや二酸化炭素、酸素などがあげられる。しかし大部分の溶質は、その物質の運搬を行なう膜内輸送タンパクが存在するときのみ膜を透過できる。膜内輸送タンパクは、運搬体タンパクとチャネルタンパクに分類され、両者の基本的な違いは透過させる溶質の選別の仕方にある。チャネルタンパクは主として分子の大きさと電荷で選別しているのに対し、運搬体タンパクはタンパク質の結合部位にぴったりと合う溶質分子のみが透過でき、タンパク質自身が構造変化を起こすことで、こうした分子を一回に一つずつ膜を透過させる。濃度勾配にそった方向の受動輸送は自然に起こるが、濃度勾配に逆らう輸送(能動輸送)にはエネルギーの供給が必要である。能動輸送を行なえるのは運搬体タンパクだけであるが、受動輸送は運搬体タンパクもチャネルタンパクも行なうことができる。

以上のように、糖、アミノ酸、イオンなどの水溶性小分子は輸送タンパクを介して細胞膜を通過するが、タンパク質、多糖類およびポリペプチドなどの巨大分子は容易に膜を通過できない。これらの巨大分子の細胞内への取り込みまたは細胞外への放出は小胞を介して行なわれ、エンドサイトーシス(開口吸収)と呼ばれる(Fig. 3-7)。エンドサイトーシスでは細胞膜は内部へ陥入し、細胞膜から離断して膜小胞を形成することにより外環境から種々の物質を取り込む。これらの膜小胞はリソソームと融合し、内容物は分解を受ける。薬剤輸送においては、この過程により薬理効果がしばしば制限される。

3.2.3.2 核膜の構造と輸送経路

外部から導入した遺伝子が発現するためには、細胞膜透過後さらに核膜も透過し、RNAが存在する核内へ導入される必要がある。核膜は厚さ約6 nmの二重の膜から構成され、核膜を貫通している核膜孔により細胞質と連絡している。(Fig.3-8). この核膜孔は核に出入りするすべての分子に対するゲートの役目を果たしている。核膜孔の構造は複雑で、約100種類のタンパク質から構成される。孔のサイズは直径約5.5 nmであり、分子量40 kDa以下の分子はこの孔を自由に通過できる[17]。一方、RNAやタンパク質などの巨大な複合体分子は核膜孔の透過に適切な選別シグナル(信号)を必要とする。タンパク質を細胞質から核へと誘導するシグナル配列(核内保留シグナル, nuclear localization signal)は、普通、正電荷のリシンもしくはアルギニンを数個含む一つまたは二つの短い配列である。タンパク質が核膜孔に入るには核内取り込み受容体(nuclear import receptor)を必要とし、核内保留シグナルに結合した後、さらに核膜孔にある微細繊維と作用して核タンパクを誘導し、その後、能動輸送により核内に運び込まれる。核膜孔中央の構造は通過するタンパク質複合体がちょうど通れるだけ調節され、核内取り込み受容体は核膜孔を通過して細胞質に戻り、再利用される。

3.2.1で述べたように、遺伝子治療に用いられるプラスミドDNAは、長さ数 μm 、幅2 nm、分子量数MDaであり、通常の状態では核内への移行は困難であると考えられる。

3.3 LISWが導入遺伝子に与える影響の評価

遺伝子導入に用いるプラスミドDNAは物理的エネルギーにより破壊される危険性がある。具体的には、DNA鎖切断、水素結合の破壊といった導入遺伝子の損傷が、mRNAへ転写される機能的導入遺伝子の個数を減少させるため、目的とするタンパクの生成量を低下させうる。実際に、紫外光、エックス線、熱などの物理的刺激によってDNAは損傷を受けることが知られている[18]。また、例えば超音波を用いた遺伝子導入法では、キャビテーションバブルの崩壊や、化学反応性の高いフリーラジカルの発生により、導入遺伝子が破壊されることが報告されている[19, 20]。ここでは、LISWが導入遺伝子であるプラスミドDNAに与える影響について調べた結果を述べる。

3.3.1 実験方法

EGFPをコードしたプラスミドDNA(Fig. 3-2)を用いた。精製したプラスミドDNAをTE緩衝液(10 mM トリス, 1mM エチレンジアミンテトラ酢酸, EDTA)で0.1 mg/mlに調整した。Figure 3-9に実験構成図を示す。プラスミドDNA懸濁液を96 ウェルプレートに入れ, ウェル上部に設置したレーザターゲットにQスイッチ Nd:YAGレーザ(Surelight I-10, Hoya- Continuum, Tokyo, Japan)の第2高調波(波長 532 nm, パルス幅 6.0 ns FWHM)を平凸レンズ($f=170$ mm)で集光して照射し, LISWを発生させた。ターゲット表面のスポット径は3 mmで一定とし, レーザフルエンスは1.2, 1.8, 2.4 J/cm²と変化させた。LISWの特性は第2章に記述したものと同様である。各条件とも, 繰り返し周波数10 Hzで2 s照射を行った(パルス数20)。プラスミドDNAの損傷はアガロースゲルを用いた電気泳動法により評価した。電解液を含むアガロースなどのゲルに電界を印加すると, その中を荷電粒子が移動する。このとき荷電粒子の大きさ, 形, 荷電量などの違いにより粒子の移動速度に差が生じる。この移動速度の差より分子を分離, 分析する方法が電気泳動法である。0.8%アガロースとTAE緩衝液(0.4 M トリス-アセテート, 1 mM EDTA)によりゲルを作製し, 100 Vの電圧を40 min印加した。泳動後, 10 mg/Lのエチジウムブロマイドにより染色し, 純水で濯いだゲルをトランスイルミネーターに設置し, ポラロイドカメラで泳動パターンを記録した。また, 3.4で述べる実験では, LISWと加温の同時適用を行なうため, 加温条件下におけるLISWの影響も同様に調べた。ウェルを恒温槽中に設置し, 45°Cにおいてレーザフルエンス1.2 J/cm², パルス数20の条件でLISWを発生させた。実験は各条件とも二回実施するとともに($n=2$), 比較のため, 紫外光(51 μ W/cm²)照射によるプラスミドDNAの損傷評価も行った。用いた紫外ランプのスペクトルをFig. 3-10に示す[21]。

3.3.2 結果および考察

Figure 3-11に, 電気泳動によるプラスミドDNA損傷評価の結果を示す。各

レーンの下部に観察されるバンドは、損傷を受けていないプラスミド DNA を示している。バンドの蛍光強度(以下バンド強度と言う)は分子数に依存している。LISW を適用したプラスミド DNA (Lane 2, 3, 4)は、LISW を適用していないプラスミド DNA (Lane 1)と比較して、バンド強度に違いはみられないことから、LISW がプラスミド DNA に切断等の影響を与えていないことがわかる。一方、紫外光を 24 時間照射した条件では、バンドが完全に消失し(lane 6)、プラスミド DNA 分子が切断、破壊されていることを示している。各レーンにおいて、下部のバンドに続いている低強度のバンドは開環状 DNA を示している。本研究においてプラスミド DNA 精製に用いたアルカリライシス法では、開環状 DNA を完全に排除することが困難であるため、このバンドがみられると考えられる。

45°Cで LISW を適用したプラスミド DNA について、電気泳動を行なった結果を Fig.3-12 に示す。LISW を適用した条件(lane 2, 3)では、コントロール(lane 1)と比較して同等のバンド強度が得られた。すなわち、加温条件下においても LISW によるプラスミド DNA の損傷がみられないことがわかった。Marguet と Forterre らは、閉環状 DNA は 107°Cまでは変性しないと報告している[22]。本章で行った加温はこの温度よりも低く、また、LISW と加温による相乗的な損傷作用もなかったことから、変性が起こらなかったと考えられる。

3.4 培養細胞への遺伝子導入実験

3.4.1 プラスミド DNA

レポーター遺伝子として、緑色蛍光タンパクの変異体 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein)をコードしたプラスミド DNA (Clontech, pEGFP-C1, Palo Alto, CA) を用いた。用いたプラスミド DNA の塩基配列を Fig. 3-2 に示す。EGFP の上流にサイトメガロウイルス(cytomegalovirus, CMV)プロモーターが組み込まれている。このプラスミド DNA を大腸菌に組み込み、Qiagen Plasmid Giga Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA)を用いて増幅し、アルカリライシス法にて精製後、リン酸緩衝溶液(Phosphate buffered saline, PBS)により濃度 0.1 mg/ml に調整した。

3.4.2 培養細胞

マウス由来NIH 3T3 細胞(RIKEN, Tsukuba, Japan)をCO₂インキュベータ内(95% air, 5% CO₂)において 37℃で培養した。培地溶液としてDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) (11995-065, Invitrogen Carlsbad, CA)に10%ウシ血清(Calf serum, CS), 2%の抗生物質ペニシリン/ストレプトマイシンを加えたものを用いた。細胞はプラスチックディッシュ内で培養し, 70% - 90%コンフルエンスになった後に, トリプシン処理を行い, グラスボトムカルチャーディッシュ(P35Gcol-0-14-C, MatTek, Ashland, MA)に播種した。

チャイニーズハムスター卵巣細胞(Chinese hamster ovary cells, CHO cells), ヒト繊維芽細胞, HeLa 細胞, ヒトグリオーマ細胞も, NIH 3T3 細胞と同様のインキュベータを用いて培養した。チャイニーズハムスター卵巣細胞は培地溶液としてHAM's/F-12 (SH30026.01, HyClone, South Logan, UT)に10%ウシ胎児血清(Fetal bovine serum, FBS)を加えたものを用いた。HeLa 細胞はMinimum essential medium(11095-080, Invitrogen)に10%CSを加えたものを用いた。ヒト繊維芽細胞およびヒトグリオーマ細胞にはDMEMに10%FBSを加えたものを用いた。それぞれ抗生物質として2%ペニシリン/ストレプトマイシンを加えた。

3.4.3 レーザ誘起応力波の適用

Figure 3-3 に実験構成図を示す。細胞はディッシュの底部に接着しており, コンフルエンスが80%から90%の状態で行なった。温度を調節した水にディッシュを浸すことで, LISW適用時の細胞環境温度を制御した。LISW適用前に培地溶液を取り除き, PBSで2回すすいで, 0.1 mg/mlのEGFP発現遺伝子ベクタープラスミドDNA懸濁液を加えた。レーザターゲットは, 厚さ0.5 mmの黒色ゴムに透明材料としてポリエチレンテレフタレート(厚さ1.0 mm)をアクリル樹脂用接着剤で接着したものを, 細胞の上方に設置して用いた。黒色ゴムはレーザ照射時に発生するプラズマにより変形するため, ターゲットの下にガ

ラスシート(厚さ 0.1 mm)を配置することで、細胞と黒色ゴムの直接的接触を防いだ。ガラスシート底面から細胞までの距離は 0.7 mm であり、プラスミドDNA懸濁液で満たした。ターゲット設置 90 秒後に、Qスイッチ Nd:YAG レーザ(Surelight I-10, Hoya-Continuum)の第 2 高調波(波長 532 nm, パルス幅 6.0 ns FWHM)を平凸レンズ($f = 170$ mm)で集光しターゲットに照射した。ターゲット表面のスポット径は 3 mm とした。レーザエネルギーは全てターゲットに吸収されるため、直接細胞とは相互作用しない。複数のパルス照射する場合、同一のターゲットに繰り返し周波数 10 Hz で照射した。LISW と相互作用した細胞はディッシュ底部から一時的に剥離する。照射 120 s 後に剥離した細胞を回収して別のディッシュに播種し、培地溶液を加えてCO₂インキュベータ内(95% air, 5% CO₂)で 24 時間再培養した。

3.4.4 評価方法

LISW 適用 24 時間後に、EGFP の発現を蛍光顕微鏡(Eclipse E600, ニコン)を用いて観察した。EGFP の蛍光は、波長 460 – 500nm で励起し、510 – 560 nm のバンドパスフィルタを用いて観察した。導入効率は、直径 14 mm の培養領域内における EGFP 発現細胞数を数え、全細胞数に対する割合として定義した。全細胞数はランダムに取得した 640 μ m \times 480 μ m の画像中の細胞を数え、面積比から見積もった。

細胞生存率の評価は 0.4%トリパンブルー(Sigma, Saint Louis, MO)を用いたトリパンブルー色素排除法により、LISW 適用 24 時間後に行った。

各条件につきデータを 5 回取得し統計解析を行った。ノンパラメトリック Mann-Whitney 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。導入効率は平均値 \pm 標準誤差で示した。

3.4.5 実験結果

LISW を適用した NIH 3T3 細胞の明視野画像(透過光)および蛍光画像を

Fig.3-14 に示す. 緑色蛍光を発している細胞はEGFP遺伝子が発現している細胞である. LISWを適用していない細胞では遺伝子発現は観察されなかった. Figure 3-15 にNIH 3T3 細胞を対象に単一パルス照射した場合の導入効率のレーザーフルエンス依存性を示す. レーザーフルエンスが高くなるにつれて導入効率が増加していることがわかる. 特にレーザーフルエンスが 1.3 J/cm^2 以上において導入効率の増加が顕著であり, 1.7 J/cm^2 における値は 1.3 J/cm^2 における値と比べて 4 倍近く大きい. ただし, 導入効率のばらつきはレーザーフルエンスが高くなるにつれて増加した. 第 2 章で測定した結果を基に, ピーク圧力と遺伝子導入効率の関係を Figure 3-16 に示す. ピーク圧力 50 MPa 以上で遺伝子導入効率が急激に増加していることがわかる.

レーザーフルエンスを $0.4, 0.9, 1.3, 1.7 \text{ J/cm}^2$ としたときの NIH 3T3 細胞への導入効率の照射パルス数依存性を Fig. 3-17 に示す. レーザーフルエンス 1.3 J/cm^2 まではパルス数が増加するにつれて導入効率が増大したが, 20 パルス以上では 0.4 J/cm^2 の条件を除きほとんど増加がみられなかった. 1.7 J/cm^2 ではパルス数の増加に伴う導入効率の増大はみられなかった. 全ての条件において, 複数パルスを照射したレーザーターゲットでは透明材料が黒色ゴムから剥離し, 境界面に隙間が発生した (Fig. 3-18). 剥離は, 界面において発生したプラズマの膨張により生じたと考えられ, これにより空間が形成されて応力波が効率的に発生できなくなったと考えられる. レーザーフルエンス 1.7 J/cm^2 では 1 パルスのみでこの剥離が生じたため, パルス数の増加にともない導入効率が増大しなかったと推察される. また透明材料に, 黒色ゴム表面におけるレーザー照射による発熱に起因すると考えられる変性が観察された. これにより透明材料の透過率が低下し, 続いて照射されたパルスの固体材料表面への照射強度が低下したことが影響した可能性も考えられる.

Figure 3-19 に NIH 3T3 細胞への遺伝子導入効率の温度依存性を示す. レーザー照射は 1) フルエンス 0.4 J/cm^2 , 20 パルス, 2) フルエンス 1.3 J/cm^2 , 20 パルス, 3) フルエンス 1.7 J/cm^2 , 1 パルスの 3 条件で行った. 導入効率は温度が高くなるにつれて増大しており, 特に 43°C から 45°C における変化が大きく, 条件 1) および 2) では両温度のデータ間に統計的有意差がみられた. 条件 3) では導入効率のばらつきが大きく, 統計的有意差はみられなかった. また, LISWを適用

しない細胞では温度を高くしても遺伝子発現は得られなかった。

フルエンス 1.3 J/cm^2 , 20 パルスの照射条件で温度を変化させたときの細胞生存率をFig. 3-20 に示す(NIH 3T3 細胞). 生存率は温度の上昇に伴って低下がみられるが, 最も高い 45°C においても 80%以上を保った. また, 43°C と 45°C における細胞生存率の間に統計的有意差はみられなかった. 37°C で LISW を適用していない細胞の生存率は $99.4 \pm 0.1\%$ であった.

Figure3-21 に 37°C および 45°C における各種細胞への遺伝子導入効率を示す. 導入効率に違いはあるが, いずれの細胞においても遺伝子発現が確認された. ここで, チャイニーズハムスター卵巣細胞およびヒト繊維芽細胞では, NIH 3T3 細胞と同様に, 加温を適用した条件(45°C)で導入効率の増大がみられ, 増加率はそれぞれ約 3.4 倍, 1.8 倍であった. 一方, 興味深いことに, HeLa 細胞およびヒトグリオーマ細胞では 37°C における導入効率の方が高く, 加温により導入効率は低下した. LISW を適用しない条件ではいずれの細胞においても遺伝子発現は得られなかった.

3.4.6 考察

レーザ誘起応力波による遺伝子導入のメカニズムとして, 以下の 4 つの仮説があげられる. (1)細胞膜の膜タンパクが変性する, (2)キャビテーションにより細胞膜が破壊される, (3)外来遺伝子が加速され, 細胞膜に衝突して透過する, (4)せん断応力により一時的な膜変形ないし変性が生じる. 以下, これらの仮説について順に考察する.

3.4.6.1 仮説(1) “細胞膜の膜タンパクの変性” の検討

この仮説はLeeらにより 1997 年に提唱された[23]. ただし遺伝子導入ではなく, 低分子量薬剤の輸送に関する報告である. 彼らは, LISWを用いて 3 kDa の anionic tetramethylrhodamin- dextran分子をヒト赤血球および鶏赤血球に導入し, 膜タンパクであるアクアポリン(水チャネル)をもつヒト赤血球においての

み細胞膜透過性の亢進がみられたことから、LISW適用によりアクアポリンが開き、外来分子が導入されたと考察した。またMulhollandらは、立ち上がり時間の異なるLISWを用いて、分子量 4.4 kDaのdextran-fluorescein isothiocyanate (FITC-dextran)をヒト赤血球細胞に導入した。彼らは、圧力上昇速度が細胞膜透過性亢進において大きな影響を与え、約 6 MPa/nsでは細胞膜の透過性を亢進させることができるが、1.5 MPa/nsではできないと報告した[24]。しかし、本章において述べた実験で用いたプラスミドDNAは分子量 3 MDaで彼らが用いた薬剤分子よりも約 10^3 倍大きい。また長さは約 1600 nm、幅は 2 nmであり、アクアポリンの直径は約 0.3 nmであることから[25]、遺伝子導入経路とは考え難い。また遺伝子導入に用いたLISWの圧力上昇速度は最大 0.4 MPa/nsであり、Mulhollandらが細胞膜透過性を亢進できないとした 1.5 MPa/nsよりもさらに小さい。以上、導入遺伝子および膜タンパクの大きさ、および必要とされるLISWの条件の二点から、LISWによる遺伝子導入のメカニズムとして、膜タンパクの変性の可能性は低いと考えられる。すなわち、低分子量外来分子の導入と遺伝子のような巨大分子の導入では、導入メカニズムが異なると考えられる。

3.4.6.2 仮説(2) “キャビテーションによる細胞膜破壊”の検討

第2章の Fig. 2-10 に示したように、LISWは正圧が主体であるが、負圧成分もあり、負圧はキャビテーションバブルを発生させる可能性がある。超音波遺伝子導入法や衝撃波結石破碎装置を用いた遺伝子導入法では、このキャビテーションによる細胞膜破壊が細胞膜透過性亢進のメカニズムであると考えられている[26, 27]。しかし、これらの方法で遺伝子導入をするためには、数百以上の照射パルス数が必要となる。例えば、Millerらは正圧 24 MPa、負圧 5 MPaの衝撃波によりマウス皮膚メラノーマ細胞にルシフェラーゼ発現遺伝子を導入し、コントロールと比較して2桁高いルシフェラーゼ活性を得るためには400パルス必要であると報告した[28]。本章で述べた実験におけるパルス数は最大でも40と少ない。さらに Fig. 3-15 に示したように、レーザフルエンスの増大にともない遺伝子導入効率が上昇しているが、第2章 Fig. 2-9 からわかるように、LISWはレーザフルエンスが高まるほど負圧が減少する。以上より、キャビテ

ーションによる細胞膜破壊は LISW による遺伝子導入のメカニズムである可能性は低いと考えられる。

3.4.6.3 仮説(3) “外来遺伝子の加速” および仮説(4) “せん断応力による一時的な膜変形ないし変性” の検討

仮説(3), (4)について考察する前に, 細胞膜の音響学的特性および力学的特性について述べる. 細胞膜の特性に関する研究の多くは生理学的視点に基づいており, その音響学特性に関する報告はほとんどない. これは細胞膜の厚さと音響波の波長の関係より明らかであろう. 細胞膜の厚さは数nmであるため, 細胞膜透過前後の音響波の変化を計測するのは困難である. また, 音響インピーダンス($\text{Pa}\cdot\text{s}/\text{m}^3$)については, 皮膚など大気に面している部分や, 皮膚, 筋肉, 骨などの組織の境界面では差が大きい[29]. 一方, 細胞膜の主要な構成物質は脂質であり, その音響インピーダンスは明らかではないが, 水と大差ないと考えられる. 細胞膜の本章で述べた実験のように液体中に細胞が存在するとき, 細胞周囲と細胞膜における音響インピーダンスの差は非常に小さい. 以上と第 2 章(2-22)式より, 細胞膜による音響波の吸収および反射は無視しうると考えられる.

次に, 細胞膜の力学的特性については, 血管内皮細胞もしくは赤血球を対象とした報告が大部分を占める[30-35]. これは, これら二種の細胞は常に血流による動圧を受けながら機能するという他の細胞にはない特徴を持つためである. 細胞膜はリン脂質に埋め込まれた内在性膜タンパクおよびそのネットワーク構造やコレステロールにより補強されているため, その力学的特性は, 細胞種により異なる. また, 培養細胞か生体中かといった細胞周囲の環境によっても大きく異なるが, ここでは力学的特性の報告が充実している赤血球の細胞膜の力学的特性を代用して検討を行なうこととする. 赤血球の力学的特性はマイクロピペット吸引法により調べられている. これは, 内径数 μm のマイクロピペットで細胞膜を部分的に吸引し, 吸引圧とピペット内に吸い込まれた細胞膜の長さから, 細胞膜の力学的特性を求める方法である[36]. Randによると, 細胞膜変形が生じるときの細胞膜垂直方向の圧力 P_E は 0.73–30 MPa であった[31]. ただし, 細胞膜の変形は細胞膜に生じる細胞膜水平方向の伸縮によるものである

と考えられるため、このとき細胞膜水平方向にかかる力 G を求める必要がある。 G は上記 P_E を用いて以下の式で求められる。

$$G = \frac{P_E}{2(1+\gamma_p)} \quad (3-1)$$

ここで、 γ_p はポアソン比を示す。液体などの体積変化が小さい物質のポアソン比は 0.45–0.50 の値をとる。ここでは簡単のため $\gamma = 0.5$ と仮定すると、細胞膜水平方向の力により細胞膜変形が生じるときの G は前述した Rand らが報告した値を(3-1)式に代入すると 0.23–10 MPa と求まる。

以上を考慮し、仮説(3)および(4)について考察する。プラスミド DNA の加速および細胞膜におけるせん断応力が、LISW により発生した流れにより生じるとする。Kodama らによると、細胞懸濁液において過渡的な圧力により液体に生じる速度は、

$$w = \frac{\bar{\rho}}{\rho_m \sqrt{\frac{n(\bar{\rho} + B)}{\rho_m}}} [\alpha(\beta - 1) + 1] \left[\left(1 + \frac{1}{\beta} \right) \alpha - 1 \right] \quad (3-2)$$

と表せる[37]。 $\bar{\rho}$ はインパルスをパルス幅で割った値、 ρ_m は液体の密度、 α は細胞の体積分率、 β は細胞と液体の密度比である。 n と B は、20°C の水中ではそれぞれ 7.15、 3.047×10^8 Pa と報告されている[38]。第2章の Fig. 2-10 および Fig. 2-13 より、LISW のパルス幅を 1 μ s、インパルスを 25 Pa \cdot s (導入効率が大きく変化した値) とすると、 $\bar{\rho} = 25$ MPa と求まる。また、液体の密度を $\rho_m = 1$ kg/m³、 $\alpha = 0$ 、 $\beta = 1$ とおくと、LISW により生じるプラスミド DNA 懸濁液の流体速度は 515 m/s と求まる。

515 m/s の速度でプラスミド DNA が厚さ 7 nm の細胞膜に衝突するとき、運動方程式から加速度が -1.89×10^{11} [m/s²] 以下であれば細胞膜を通過することができると思積られる。プラスミド DNA の質量は 5.15×10^{-21} g であるため、こ

のとき細胞膜にかかる力は $F = ma$ より 9.75×10^{-10} N である。上述した細胞膜垂直方向の変形の閾値は 0.73 – 30 MPa であり，プラスミドの大きさから衝突する面積を 7.85×10^{-15} m² と仮定すると，変形閾値は 2.4×10^{-7} – 5.7×10^{-9} N となる。プラスミド DNA 衝突により細胞膜にかかる力はこの範囲より若干低い，実際には衝突面積，細胞膜厚さの不均一性などが存在するため，一桁の違いでは，仮説(3)が生じうる可能性は残される。

仮説(4)は，Kodama らにより提唱された[37]。遺伝子ではないが，衝撃波管により発生させた衝撃波を用いて 71.6 kDa の FITC-dextran をヒト前骨髄性白血病細胞に導入し，せん断応力による一時的な細胞膜変形ないし変性が，応力波による外来分子導入のメカニズムではないかと考察している。Figure 3-22 に，第 2 章 Fig. 2-13 と Fig. 3-15 から求めた遺伝子導入効率の圧力時間積分値依存性を示す。遺伝子導入効率は圧力の時間積分値の増大に伴い上昇し，特に 25 Pa·s 以上では急激な上昇がみられる。この値における上昇は Kodama らによる薬剤輸送における急激に上昇する値とほぼ一致する。よって LISW による遺伝子導入においても，せん断応力による膜変形ないし変性が遺伝子導入メカニズムである可能性がある。流体から細胞が受けるせん断応力 S は以下の式で表される。

$$S = \eta \frac{dx}{dt} \quad (3-3)$$

ここで， η は粘性係数， dx/dt はずり速度である。ここで， η を水の値 0.089 Pa·s で代用する。また dx/dt は場合は流体と細胞膜の相対速度であり，上側からの流体が向きをかえ，細胞の形状に沿って流れる速度である。先に求めた 515 m/s と大きくは違わないと仮定し，この値を用いる。以上より， $S = 46$ Pa·m と求まる。細胞膜の横方向破壊閾値は 2.3–100 Pa·m であるため，せん断応力が一時的な細胞膜変形ないし変性を生じ，プラスミド DNA が通過可能な小孔を形成する可能性は十分にあると考えられる。Fig. 3-22 において，インパルスが 25 Pa·s 以上ではその傾きが急激に変化している。すなわちこの値において横方向破壊閾値を超え，25 Pa·s 以下とは異なる遺伝子導入過程が上乘せされていると推察

される。また、細胞内外のプラスミドDNA濃度差が一定であると仮定できるとき、小孔形成直後に、小孔を通過する外来分子の移動は、フィックの第一法則を用いて表すことが出来る[39].

$$J = D \frac{\Delta c}{\Delta x} \quad (3-4)$$

ここで、 J は単位時間あたりに単位面積を通過し拡散する物質の質量(拡散束)、 D は導入物質の液体中の拡散係数、 Δc は細胞内と細胞外における導入物質の濃度差、 Δx は距離を表す。拡散係数 D は導入物質の形状や大きさによって決定される。以下、プラスミドDNAが通過可能と考えられる大きさの小孔が生じ、その面積を $1.0 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ と仮定して議論する。Figure 3-23に、Nkodoらによって報告された尿素溶媒中における二本鎖DNAの拡散係数と塩基対数の関係を示す[40]。拡散係数は粘性係数に反比例し、彼らが用いた尿素溶媒の粘性係数は水より41%高いことを考慮すると、同図の縦軸の値を1.41倍した $28.2 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ が水中における二本鎖DNAの拡散係数であると見積もられる。また、本章で述べた実験で用いた濃度 $0.1 \times 10^3 \text{ g/m}^3$ 、細胞膜の厚さ7 nmを代入すると、 $J = 4.03 \times 10^{-2} \text{ g/m}^2\text{s}$ となる。このとき、単位時間に通過する分子の質量は $4.03 \times 10^{-16} \text{ g/s}$ となり、プラスミドDNA分子一つの質量が $5.15 \times 10^{-18} \text{ g}$ であるため、小孔形成直後に単位時間あたりに小孔を通過するプラスミドDNA分子は783個であると算出される。小孔が修復されるまでの時間は明らかではないため、導入されるDNA分子の個数を正確に見積もることはできないが、仮に超音波を用いた遺伝子導入法の修復時間(30 sから24 h. 文献により異なる(1.4.2.2 参照))と同じと仮定すると、 2.3×10^4 から 6.8×10^7 個となる。実際には、細胞内と細胞外の濃度差は時間の経過とともに小さくなり拡散速度は次第に低下すると考えられるが、仮説(4)はLISWによる遺伝子導入メカニズムとして支持しうるのではないかと考えられる。

以上をまとめると、数kDa以下の低分子量外来分子の導入と遺伝子のような巨大分子(数十kDa以上)の導入では導入メカニズムが異なり、巨大分子の導入では、加速された外来分子の胞膜の透過ないしせん断応力による細胞膜の一時

的な変形・変性のいずれか、もしくは両者の複合的な作用によるのではないかと考えられる。

遺伝子発現を得るためには、細胞質から核内へと導入される必要がある。しかし、核膜に存在する孔は直径約 5.5 nm であり、分子量 40 kDa 以下の分子はこの孔を自由に通過できるが[41]、プラスミド DNA のような巨大分子は通過が容易ではない。薬剤輸送に関しては、LISW は細胞膜だけでなく核膜へも影響を与えることが報告されている[42]。本研究においても遺伝子発現が得られたことから、LISW が核膜へ影響を与えることにより遺伝子が核内へ導入されたと考えられる。今後、蛍光指標したプラスミド DNA を用いて導入遺伝子の細胞内分布を観察することにより LISW が核膜に与える影響の解明がなされるものと期待される。

3.4.6.4 加温効果の検討

Figure 3-19 に示したように、遺伝子導入効率は 43°C 以上で顕著に上昇した。加温による細胞膜への影響としては、その流動性の上昇が考えられる。前述したように、遺伝子を導入する際に障壁となる細胞膜は、ある特定の温度においてゲル相から液晶相へ相転移が生じ[43]、40°C～45°C の加温を行うことで、抗がん剤などの外来分子の細胞内への取り込みが促進されることが多く報告されている[44-46]。しかしこの加温による膜透過性の上昇は、低分子量かつ疎水性薬剤分子のみに効果的であるとも指摘されている[47]。本章で述べた実験において、加温単独適用(LISW 適用なし)では遺伝子発現は全くみられなかった。一方で、LISW を適用した条件下では、43°C 以上において遺伝子導入効率が顕著に上昇した。この温度は細胞膜相転移に一致することから、LISW による遺伝子導入において、細胞膜の流動性が導入効率に大きな影響を与えていることがわかる。3.2.3 で述べたように、温度上昇にともない脂質二重層が相転移すると、細胞膜の厚さは約 20% 減少する。著者の知る限り相転移後の細胞膜の力学的特性は報告されていないために単純な比較はできないが、細胞膜が薄くなることで加速されたプラスミド DNA が細胞質まで通過する距離が短くなるため、導入効率が増大したのではないかと推察される。せん断応力に対する破壊閾値が相

転移によりどのように変化するかは不明である。

3.4.6.5 細胞種依存性の検討

LISW による殺細胞効果や薬剤輸送の効率は細胞種に依存することが報告されており、細胞膜の流動性および細胞膜内における細胞小器官の密度の違いに起因すると推測されている[48, 49]。Figure 3-21 に示したように、遺伝子導入効率は細胞種により異なった。この原因としては、流動性や細胞小器官だけでなく、細胞の大きさが影響していると考えられる。遺伝子発現を得るために必要な核内以降プラスミド DNA の数は 2, 3 個であることが知られており[50]、この数は細胞の大きさに依存しない。従って、標的である細胞が大きいほど LISW と相互作用する面積が大きく、遺伝子が導入される確率が高くなると推察される。本研究で用いた HeLa 細胞およびヒトグリオーマ細胞はその他の細胞よりも大きいことから、高い遺伝子導入効率であったと考えられる。

45°Cの加温により NIH 3T3 細胞, チャイニーズハムスター卵巣細胞, ヒト繊維芽細胞では導入効率が増大したが, HeLa 細胞とヒトグリオーマ細胞では, 導入効率が減少した。一般に, 悪性腫瘍細胞は熱に対して脆弱であることが報告されており[51-53], がんの温熱療法はこの特性を利用している。本研究においては, 遺伝子の導入効率をタンパク質生成後の蛍光から評価しているため, 細胞内における遺伝子の転写, 翻訳が影響を与える。HeLa 細胞およびヒトグリオーマ細胞にみられた加温による導入効率低下の原因の一つとして, 熱の影響により転写および翻訳効率が低下して発現効率が低下した可能性が考えられる。

3.5 おわりに

ナノ秒パルスレーザーをターゲットに照射することにより発生させた LISW を用いて, NIH 3T3 細胞を対象に EGFP をコードしたプラスミド DNA が導入可能であることを示した。また, 得られた導入効率につき, 第 2 章で述べた LISW 特性との関係を述べた。その結果, LISW により加速されたプラスミド DNA の

細胞膜透過ないしせん断応力により生じる膜変形・変性のいずれか、もしくは両者の複合的な作用により遺伝子が導入されると推察された。さらに、各種細胞種を用いた遺伝子導入実験から、LISW を用いた遺伝子導入実験が様々な種類の細胞へも応用可能であることを示した。

実用化の視点からは、生体へ直接遺伝子を導入する *in vivo* だけでなく、*in vitro* における遺伝子導入も遺伝子治療としての応用範囲が広い。例えば組織移植を対象とした遺伝子治療においては、ドナーへの *in vivo* 遺伝子導入および切り離した移植片への *ex vivo* 遺伝子導入だけでなく、培養細胞へ導入する *in vitro* 遺伝子導入は細胞から新たに移植組織を構築する際に適している。

次章では、本章で述べた実験により明らかになった LISW 特性と遺伝子導入効率の関係、および本方法の異なる細胞種への有効性に基づいて行なった LISW を用いた遺伝子導入による移植皮膚生着促進実験について述べる。

参考文献 (第3章)

- [1] 岡田善雄, 高久史麿, 寺田雅昭, 豊島久眞男, 遺伝子治療開発研究ハンドブック(日本遺伝子治療学会編, 1999).
- [2] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Essential 細胞生物学* (南江堂, 1999).
- [3] “Gene therapy on Trial,” *Science* **288**, 951 (2000).
- [4] “RAC hears a plea for resuming trials, despite cancer risk,” *Science*, **299**, 991 (2003).
- [5] Position statement from the European Society of Gene Therapy (ESGT), “France gene therapy group reports on the adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID),” *J. Gene Med.* **5**, 82 (2003).
- [6] Position statement from the European Society of Gene Therapy (ESGT), “Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID),” *J. Gene Med.* **5**, 261 (2003).
- [7] Letter to the editors of *Nature* from the American Society of Gene Therapy (ASGT) and the European Society of Gene Therapy (ESGT), *J. Gene Med.* **5**, 641 (2003).
- [8] 斎藤泉, 菅野純男, 遺伝子導入&発現解析実験法 (羊土社, 1997).
- [9] 松村正實, 山本雅, 新遺伝子工学ハンドブック改訂第4版 (羊土社, 2003).
- [10] R. Y. Tsien, “The green fluorescent protein,” *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509 (1998).
- [11] Website of Clontech Laboratories Inc. (<http://www.clontech.com>).
- [12] 遠山益, 図説細胞生物学 (丸善, 1998).
- [13] 藤井達三, 細胞膜 (中外医学社, 1985).
- [14] 野澤義則, 大木和夫, 生体膜のバイオダイナミクス (羊土社, 1993).
- [15] 日本生物物理学会編, 生体膜—生命の基本形を形づくるもの (吉岡書店, 1996).

- [16] 小川和朗, 中根一穂, 名倉宏, 藤本豊士, 馬屋原宏, 村田長芳編, 細胞膜, (朝倉書店, 1989).
- [17] S. Li, Z. Ma, "Nonviral gene therapy," *Curr. Gene Ther.* **1**, 201 (2001).
- [18] L. S. Lerman, L. J. Tolmach, "Genetic transformation II. The significance of damage to the DNA molecule," *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 371 (1959).
- [19] T. Kondo, S. Arai, M. Kuwabara, G. Yoshii, E. Kano, "Damage in DNA irradiated with 1.2 MHz ultrasound and its effect of template activity of DNA for RNA synthesis," *Radiat. Res.* **104**, 284 (1985).
- [20] E. K. Wasan, D. L. Reimer, M. B. Bally, "Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes," *J. Pharm. Sci.* **85**, 427 (1996).
- [21] 東芝ランプ総合カタログ 2006
- [22] E. Marguet, P. Forterre, "DNA stability at temperatures typical for hyperthermophiles," *Nucleic Acids Res.* **22**, 1681 (1994).
- [23] S. Lee, D. J. McAuliffe, H. Zhang, Z. Xu, J. Taitelbaum, T. J. Flotte, and A. G. Doukas, "Stress-wave-induced membrane permeation of red blood cell is facilitated by aquaporins," *Ultrasound Med. Biol.* **23**, 1089, (1997).
- [24] S. E. Mulholland, S. Lee, D. J. McAuliffe, and A. G. Doukas, "Cell loading with laser-generated stress waves: The role of the stress gradient," *Pharm. Res.* **16**, 514 (1999).
- [25] D. Kozono, M. Yasui, L. S. King, P. Agre, *J. Clin. Invest.* **109**, 1395 (2002).
- [26] V. G. Zarnitsyn and M. R. Prausnitz, "Physical parameters influencing optimization of ultrasound-mediated DNA transfection," *Ultrasound Med. Biol.* **30**, 527 (2004).
- [27] 谷山義明, 島村宗尚, 富田奈留也, 荻原俊男, 森下竜一, "超音波を用いた遺伝子導入法の開発," ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料, 技術, 方法論の新たな展開, 152 (2006).
- [28] D. L. Miller, S. Bao, R. A. Gies, and B. D. Thrall, "Ultrasonic

- enhancement of gene transfection in murine melanoma tumors,”
Ultrasound Med. Bio. **25**, 1425 (1999)
- [29] 菊池喜充 編, 超音波医学第2版 (医学書院, 1973).
- [30] E. A. Evans, R. M. Hochmuth, “Membrane viscoelasticity,” *Biophys. J.* **16**, 1 (1976).
- [31] R. P. Rand, “Mechanical properties of the red cell membrane,” *Biophys. J.*, **4**, 303, (1964).
- [32] E. A. Evans, R. Waugh, L. Melnik, “Elastic area compressibility modulus of red cell membrane,” *Biophys. J.* **16**, 585 (1976).
- [33] R. Waugh, E. A. Evans, “Thermoelasticity of red blood cell membrane,” *Biophys. J.* **26**, 115 (1979).
- [34] K. A. Barbee, “Mechanical cell injury,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1066**, 67 (2005).
- [35] R. M. Hochmuth, N. Mohandas, P. L. Blackshear, JR., “Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique,” *Biophys. J.* **13**, 747 (1973).
- [36] 日本エム・イー学会, 生体細胞・組織のリモデリングのバイオメカニクス (コロナ社, 2003).
- [37] T. Kodama, M. R. Hamblin, A. G. Doukas, “Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: Importance of impulse,” *Biophys. J.* **79**, 1821 (2000).
- [38] R. H. Cole, *Underwater explosions* (Princeton University Press, Princeton 1948).
- [39] Vikram Kohli, Jason P. Acker, Abdulhakem Y. Elezzabi, “Reversible permeabilization using high-intensity femtosecond laser pulses: application to biopreservation,” *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 889 (2005).
- [40] A. E. Nkodo, J. M. Garnier, B. Tinland, H. Ren, C. Desruisseaux, L. C. McCormick, G. Drouin, G. W. Slater, “Diffusion coefficient of DNA molecules during free solution electrophoresis,” *Electrophoresis* **22**, 2424 (2001).

- [41] S. Li and Z. Ma, "Nonviral gene therapy," *Curr. Gene Ther.* **1**, 201 (2001).
- [42] T. D. Lin, D. J. McAuliffe, N. Michaud, H. Zhang, S. Lee, A. G. Doukas, T. J. Flotte, "Nuclear transport by laser-induced pressure transients," *Pharm. Res.*, **20**, 879 (2003).
- [43] J. R. Dynlacht and M. H. Fox, "Heat-induced changes in the membrane fluidity of chinese hamster ovary cells measured by flow cytometry," *Radiat. Res.* **130**, 48 (1992).
- [44] J. B. Block, P. A. Harris, and A. Peale, "Preliminary observations on temperature-enhanced drug uptake by leukemic leukocytes *in vitro*," *Cancer Chemother. Rep.* **59**, 985 (1975).
- [45] D. M. Brown, M. S. Cohen, R. H. Sagerman, R. Gonzalez-Mendez, G. M. Hahn, and J. M. Brown, "Influence of heat on the intracellular uptake and radiosensitization of 2-nitroimidazole hypoxic cell sensitizers *in vitro*," *Cancer Res.* **43**, 3138 (1983).
- [46] D. Raucher and A. Chilkoti, "Enhanced uptake of a thermally responsive polypeptide by tumor cells in response to its hyperthermia-mediated phase transition," *Cancer Res.* **61**, 7163 (2001).
- [47] Y. Liu, C. Cho, X. Yan, T. K. Henthorn, K. O. Lillehei, W. N. Cobb, and K. Ng, "Ultrasound-induced hyperthermia increases cellular uptake and cytotoxicity of P-glycoprotein substrates in multi-drug resistant cells," *Pharm. Res.* **18**, 1255 (2001).
- [48] A. G. Doukas, D. J. McAuliffe, T. J. Flotte, "Biological effects of laser-induced stress waves: Structural and functional cell damage *in vitro*," *Ultrasound Med. Biol.* **19**, 137 (1993).
- [49] A. G. Doukas, D. J. McAuliffe, S. Lee, V. Venugopalan, T. J. Flotte, "Physical factors involved in stress-wave-induced cell injury: The effect of stress gradient," *Ultrasound Med. Biol.* **21**, 961 (1995).
- [50] J. A. Wolff and V. Budker, "The mechanism of naked DNA uptake and expression," *Adv. Genet.*, **54**, 3 (2005).
- [51] I. F. Tannock, R. P. Hill, 谷口直之, 松浦成昭, 鈴木敬一郎, 手島昭樹, が

んのベーシックサイエンス (メディカルサイエンスインターナショナル, 2000).

- [52] E. J. McCarthy, "Malignant hyperthermia: pathophysiology, clinical presentation, and treatment," AACN Clin. Issues. **14**, 231 (2004).
- [53] H. Terashima, "Hyperthermia of malignant tumor," Fukuoka Igaku Zasshi **95**, 89 (2004).

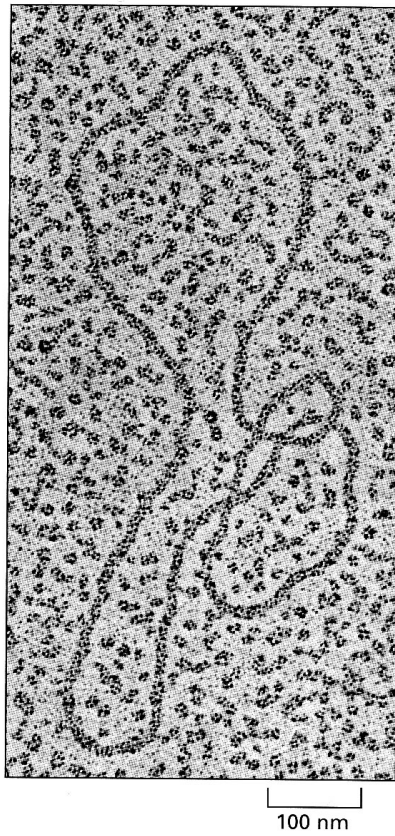


Fig. 3-1 Plasmid DNA observed with an electron microscope [参考文献 2 より引用].

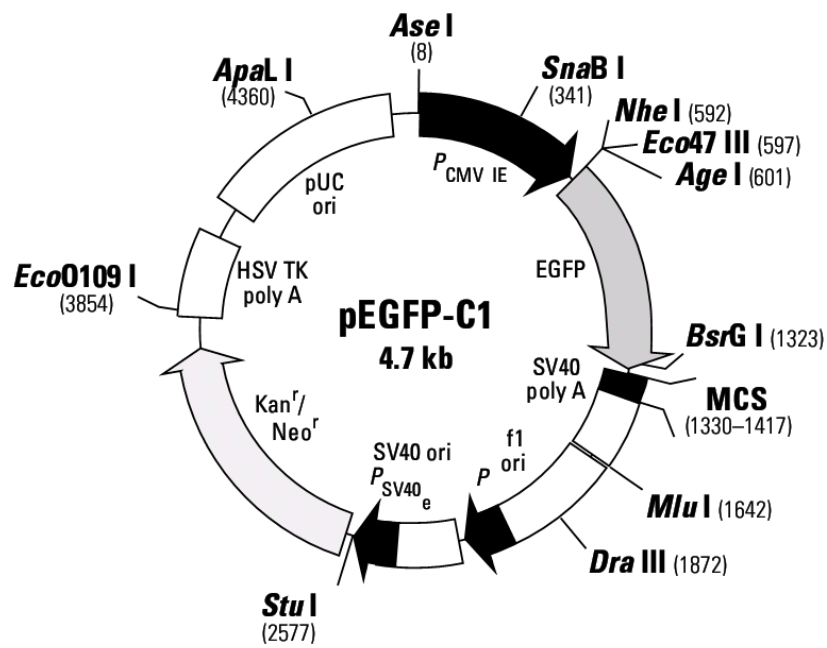


Fig. 3-2 Restriction map and multiple cloning site of pEGFP-C1 [参考文献 11 より引用].

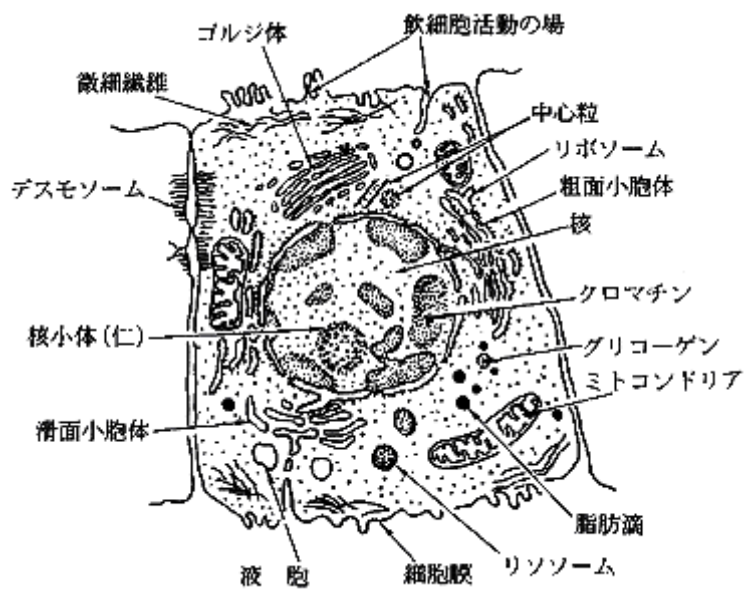


Fig. 3-3 Schematic diagram of an idealized cell [参考文献 12 より引用].

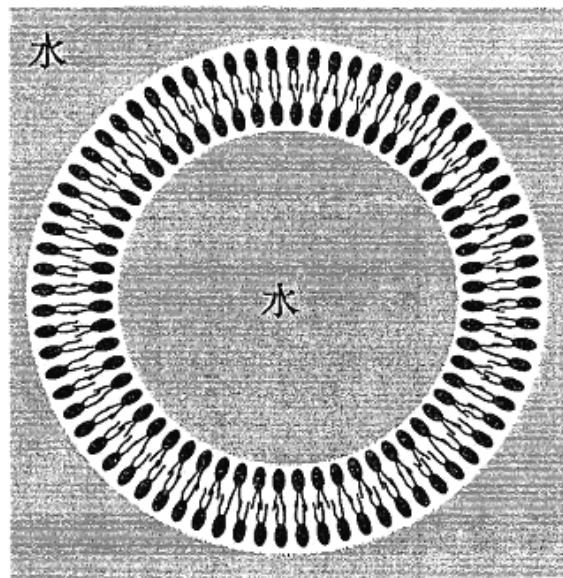


Fig. 3-4 Schematic diagram of a lipid bilayer [参考文献 12 より引用].

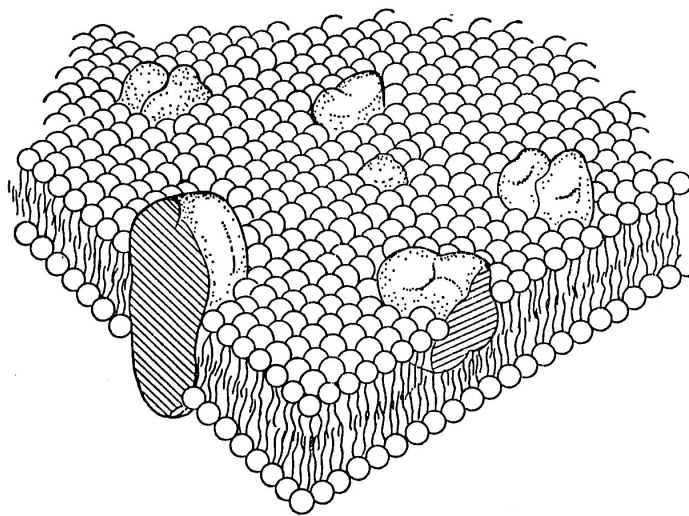


Fig. 3-5 Diagrammatic representation of the fluid mosaic model [参考文献 13
より引用].

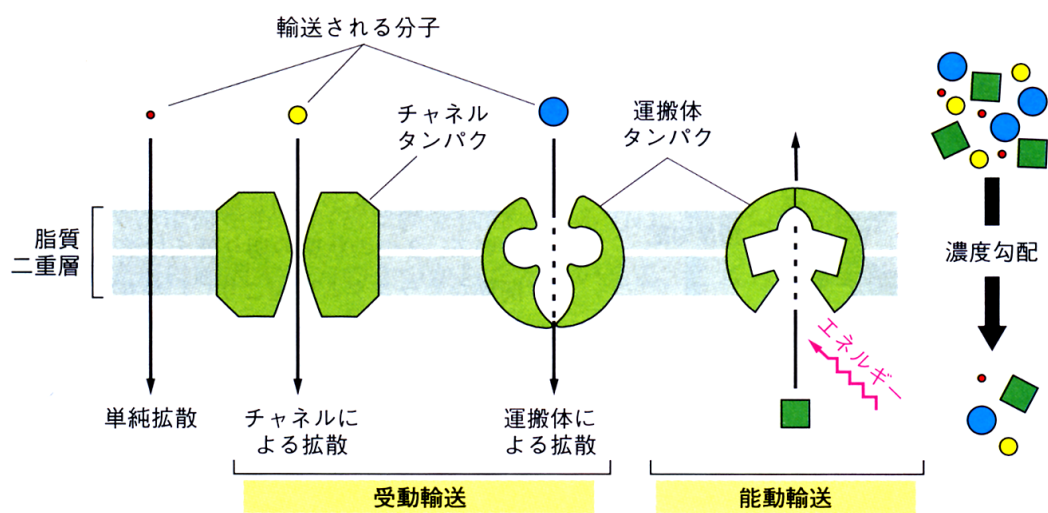


Fig. 3-6 Selective permeability of phospholipid bilayers [参考文献 2 より引用].

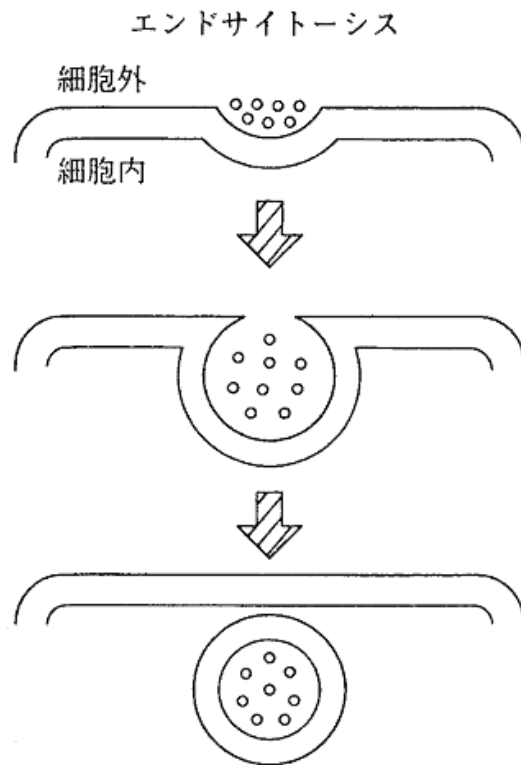


Fig. 3-7 Endocytosis [参考文献 12 より引用].

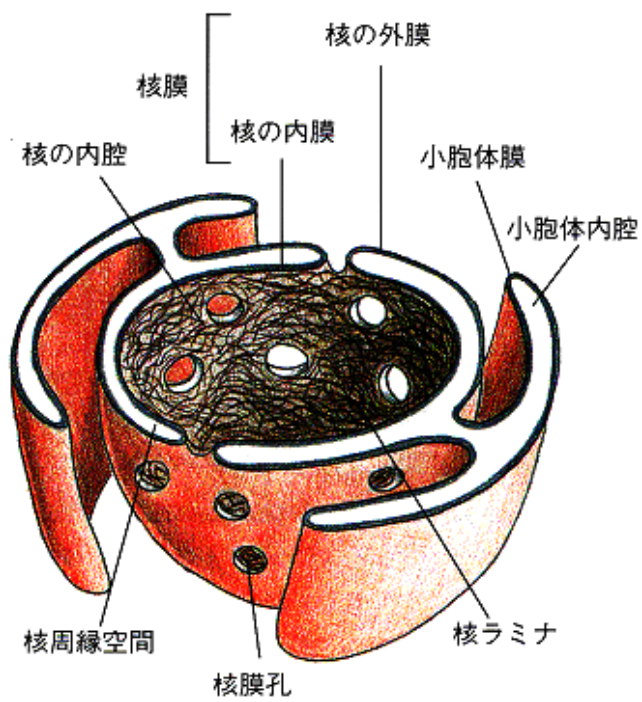


Fig. 3-8 Schematic diagram of an idealized nucleus [参考文献 2 より引用].

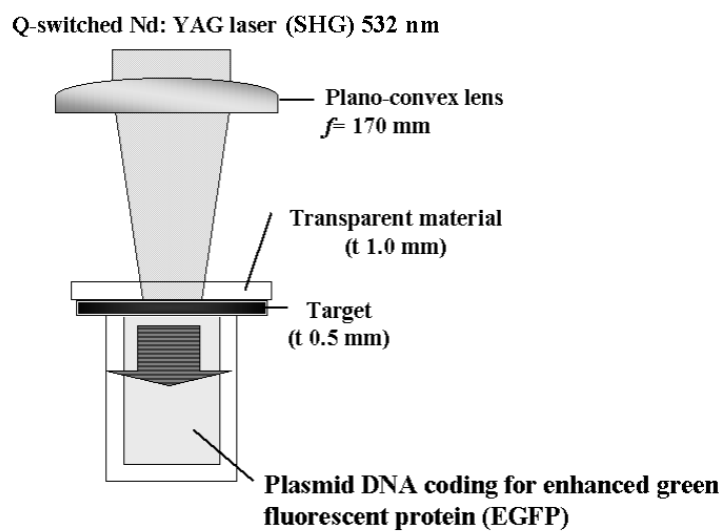


Fig. 3-9 Experimental setup for LISWs application to plasmid DNA suspension.

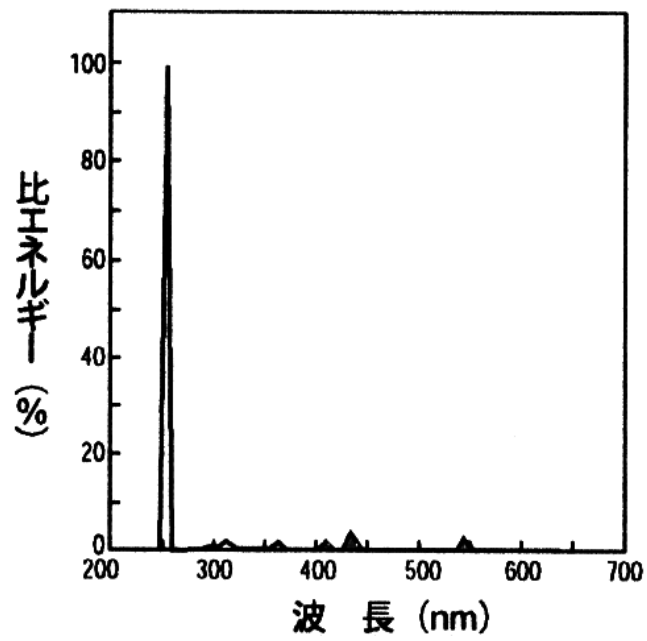


Fig. 3-10 Spectral distribution of mercury UV lamp [参考文献 8 より引用].

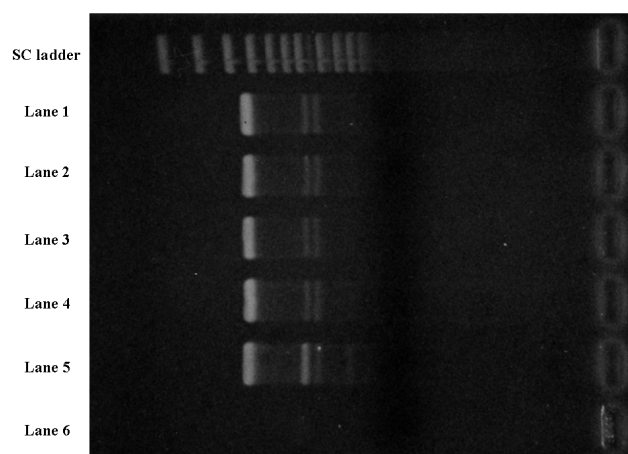


Fig. 3-11 Results of electrophoresis of the plasmid DNA: Lane 1, control (plasmid DNA without application of LISWs); lane 2, plasmid DNA with application of LISWs (laser fluence: 1.2 J/cm^2); lane 3, plasmid DNA with application of LISWs (laser fluence: 1.8 J/cm^2); lane 4, plasmid DNA with application of LISWs (laser fluence: 2.4 J/cm^2); lanes 5 and 6, plasmid DNA exposed to ultraviolet for 1 h and 24 h, respectively.

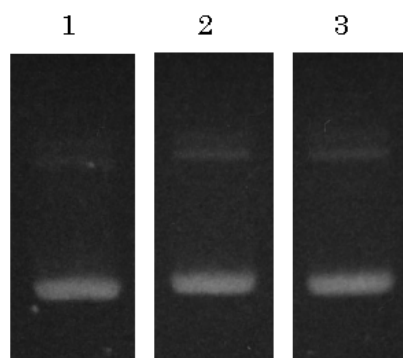


Fig. 3-12 Results of electrophoresis of the plasmid DNA exposed to LISWs at a temperature of 45°C. Lane 1, control (plasmid DNA without application of LISWs); lane 2 and lane 3, plasmid DNA with application of LISWs at laser fluence of 1.2 J/cm² under the temperature of 45°C for 210 s.

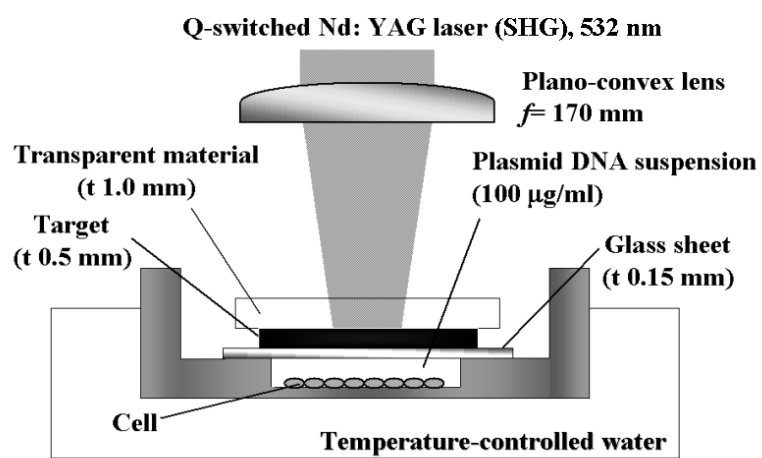


Fig. 3-13 Experimental configuration for gene transfection by use of laser-induced stress waves.

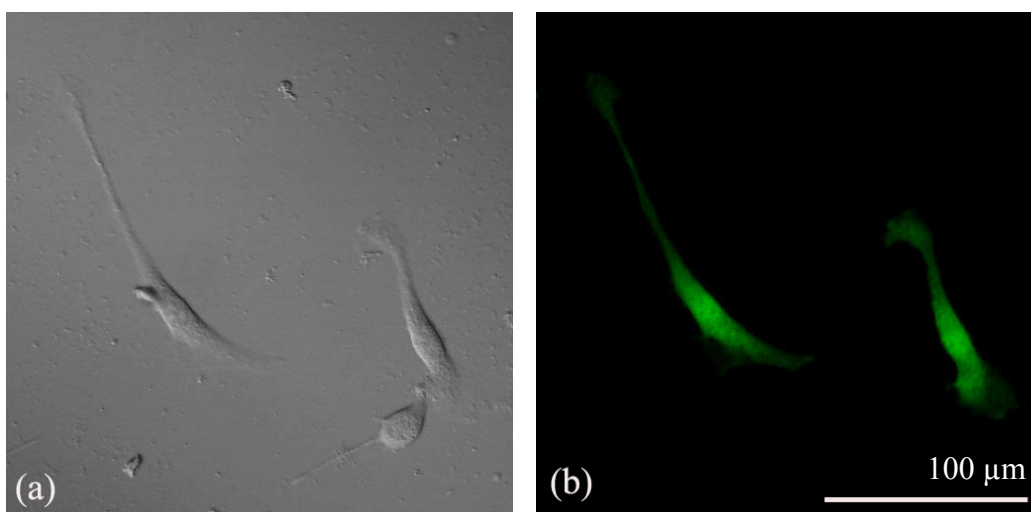


Fig. 3-14 Differential-interference-contrast image (a) and fluorescence image (b) of the cells to which LISWs were applied. The images were obtained 24 hours after the treatment. Green cells shown in (b) represent the expression of EGFP. Scale bar indicates 100 μm .

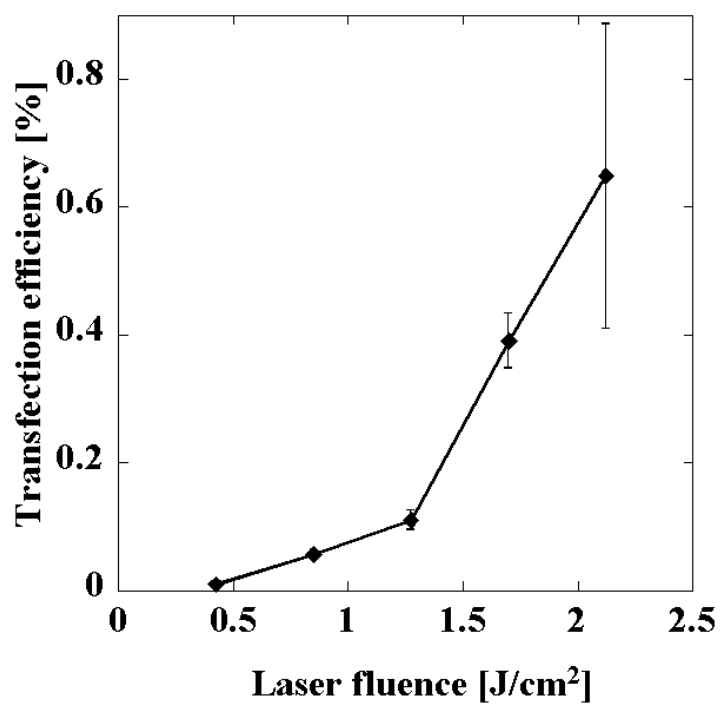


Fig. 3-15 Effect of laser fluence on the transfection efficiency for NIH 3T3 cells exposed to a single-pulse LISW. The temperature was 37°C.

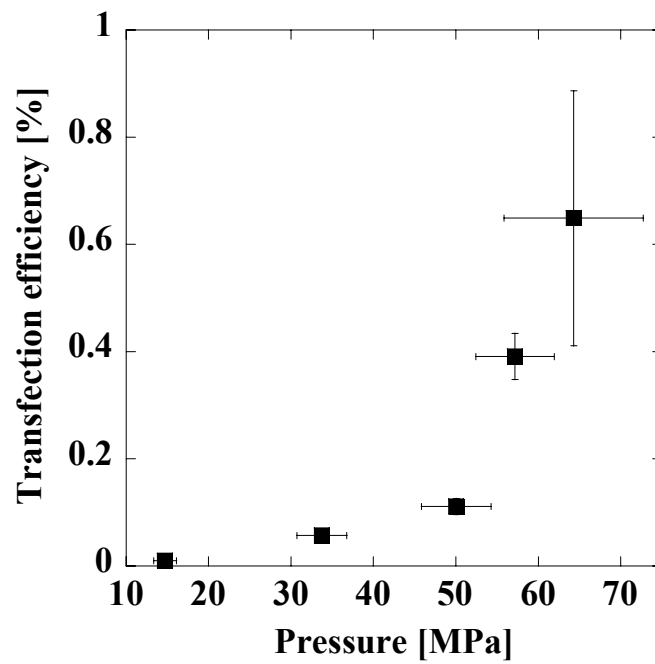


Fig. 3-16 Effect of peak pressure on the transfection efficiency for NIH 3T3 cells exposed to a single-pulse LISW. The temperature was 37°C.

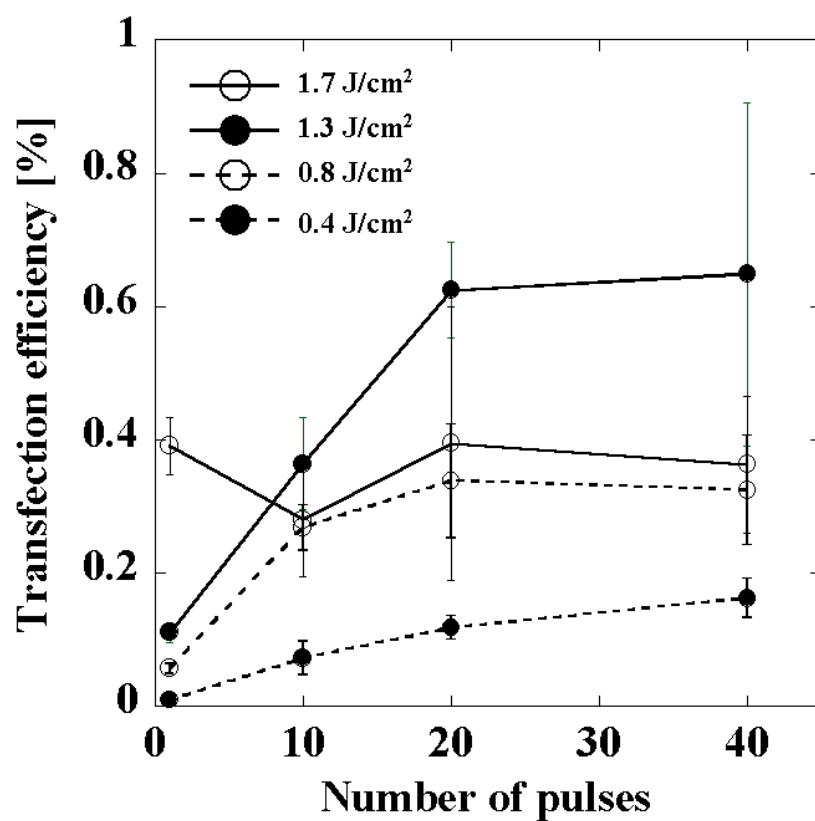


Fig. 3-17 Effect of pulse number on the transfection efficiency for NIH 3T3 cells. The temperature was 37°C.

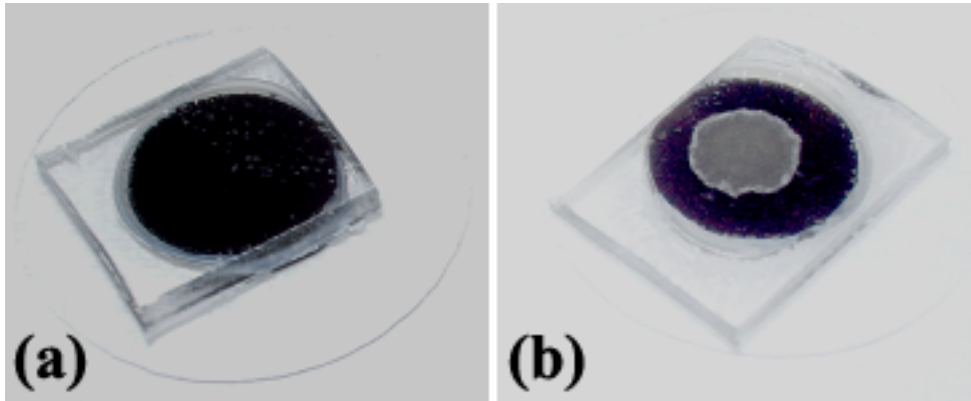


Fig. 3-18 Photographs of a target before irradiation (a) and a target after irradiation with multiple pulses (b). In (b), a space created at the boundary is observed.

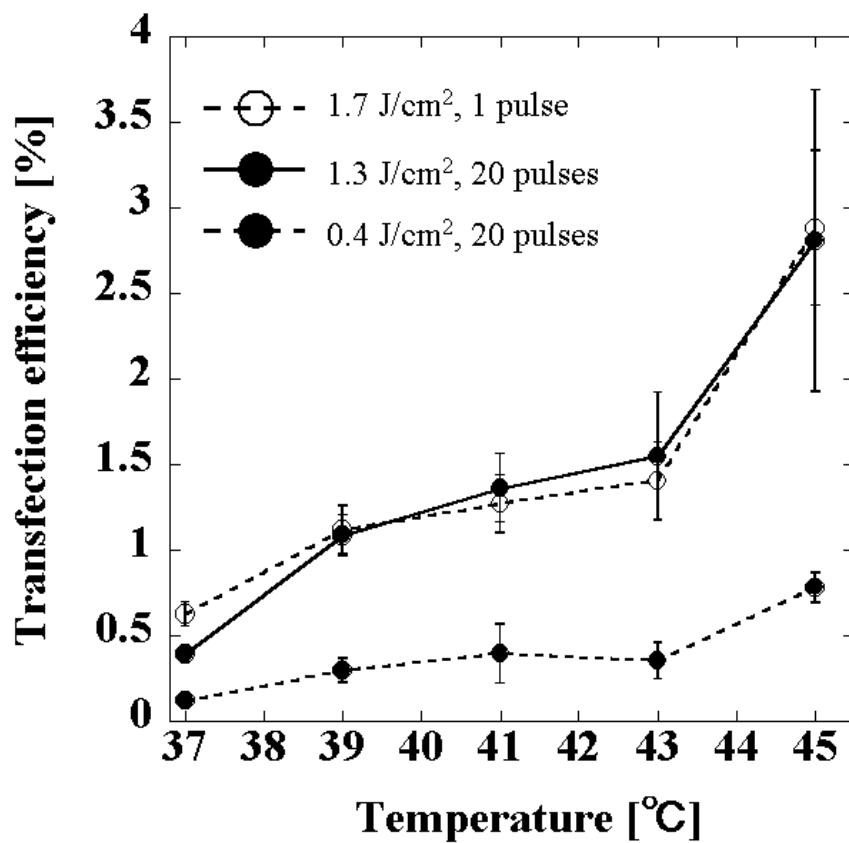


Fig. 3-19 Effect of temperature on the transfection efficiency for NIH 3T3 cells irradiated.

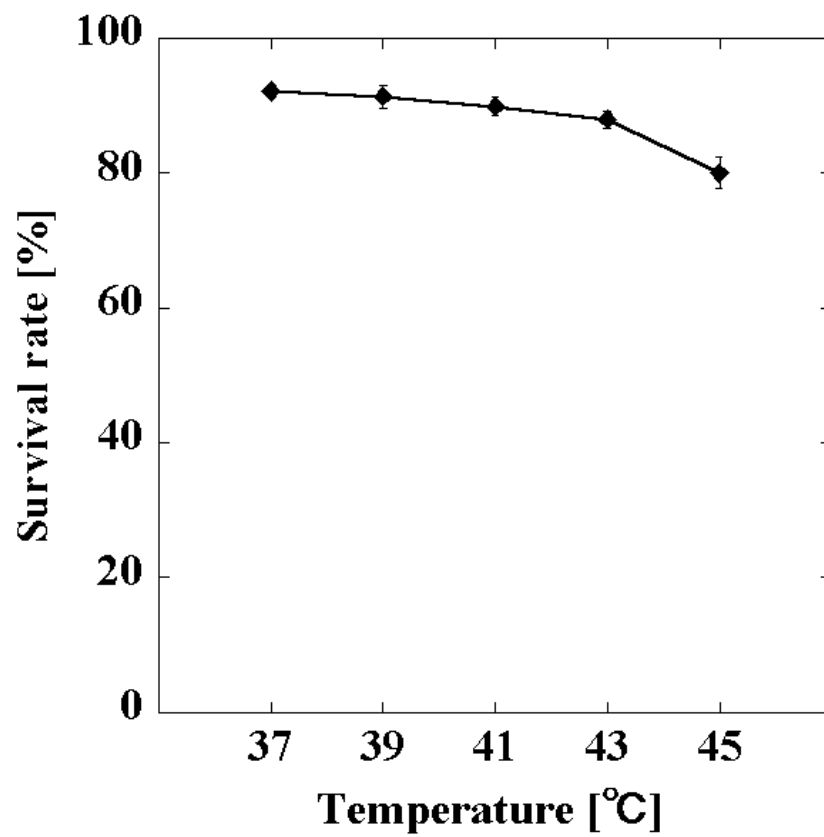


Fig. 3-20 Effect of temperature on the viability of the cells exposed to LISW.

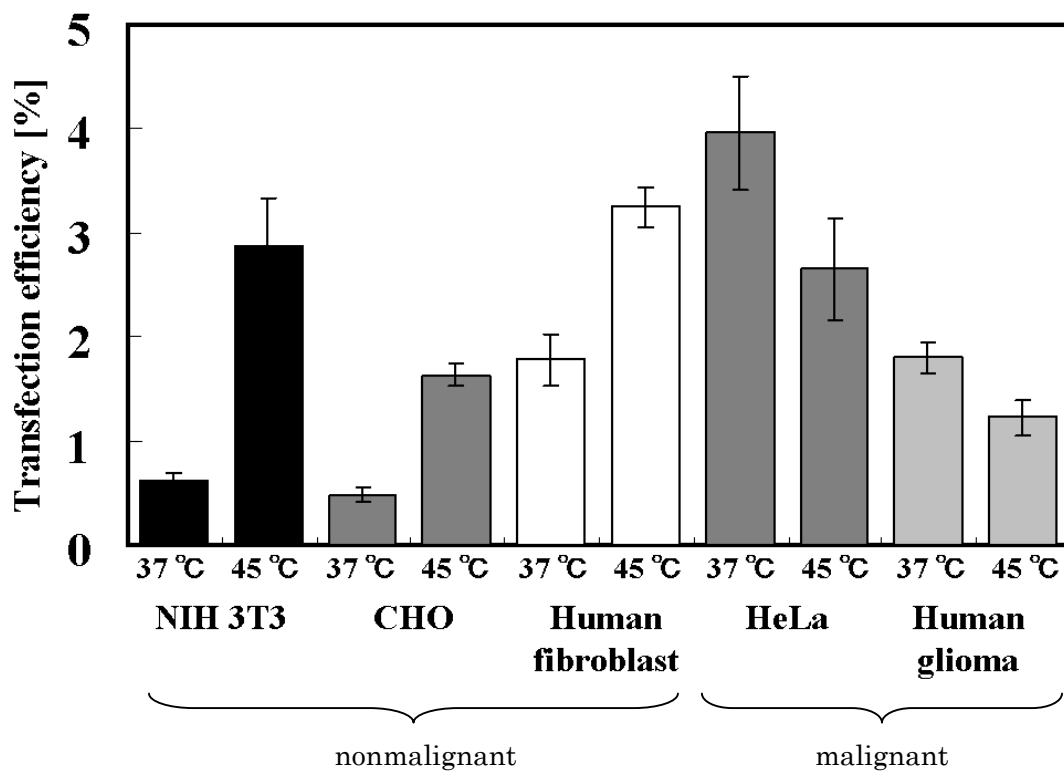


Fig.3-21 Comparison of transfection efficiency for different cell lines at temperatures of 37°C and 45°C. NIH 3T3 cells, Chinese hamster ovary cells, human fibroblasts, HeLa cells, and Glioma were transfected.

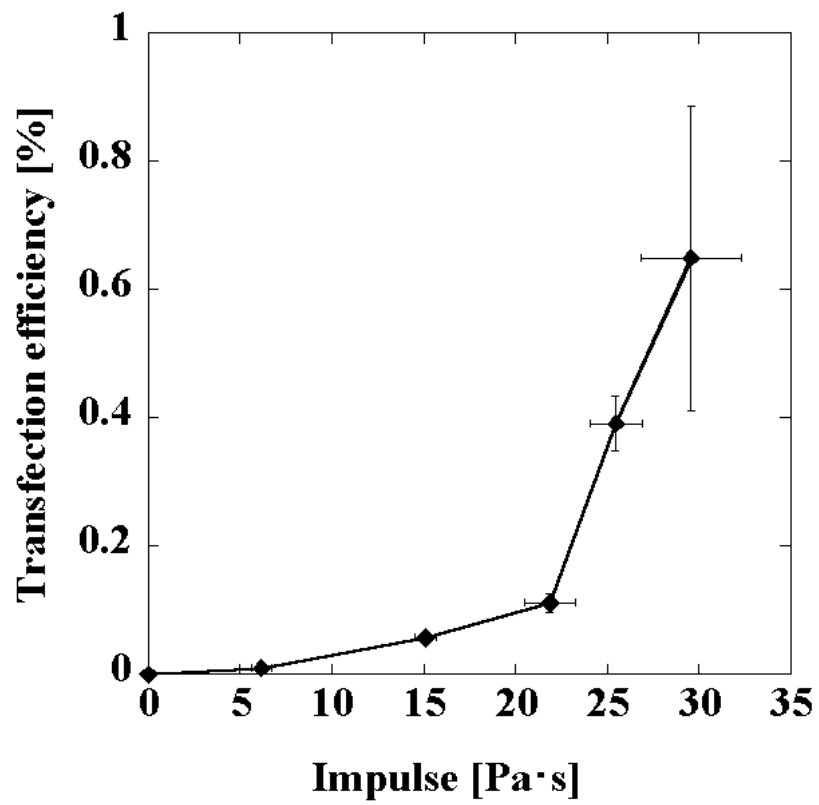


Fig. 3-22 Relationship between transfection efficiency and impulse of the LISW.

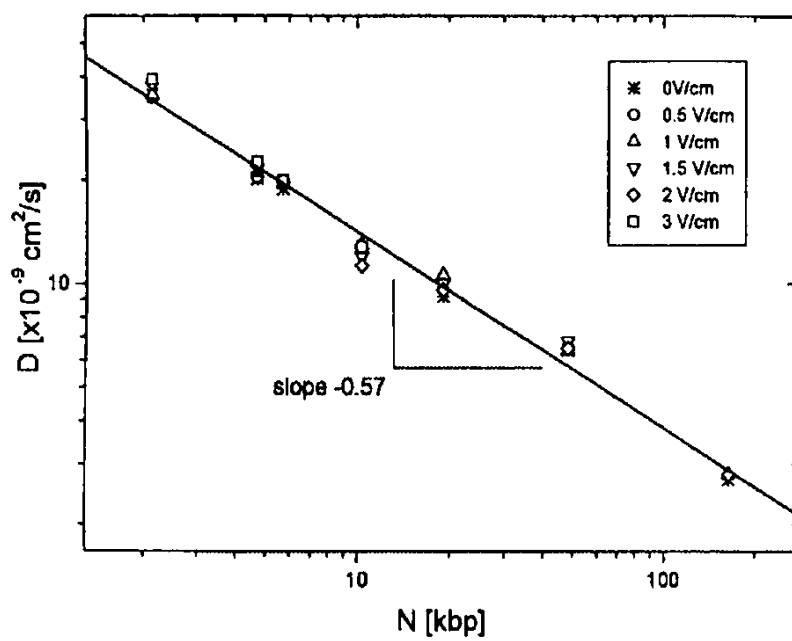


Fig. 3-23 Diffusion coefficient vs. dsDNA lengths (in base pairs) [参考文献 40 より引用].

第 4 章

レーザー誘起応力波を用いた肝細胞増殖因子発現遺伝子
ベクター導入による移植皮膚内の血管新生促進

4.1 はじめに

本章では、移植皮膚の生着促進を目的とし、LISW を用いて移植片内に肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor, HGF)発現遺伝子の導入を試みた実験について述べる。HGF は血管内皮細胞など多くの細胞に対して細胞分裂促進、細胞遊走促進など多彩な機能を持つ因子であり、器官形成や組織再生に重要な役割を果たすことが知られている[1-3]。これまでにラット心筋[4]、角膜[5]、創傷皮膚[6, 7]を対象に、HGF 発現遺伝子導入により血管新生が増大することが示されている。また、Nakamura らはヒト内皮細胞を対象とした実験において、HGF は血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)や塩基性繊維芽細胞成長因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)よりも強力な増殖作用を持つことを報告している[8]。従って、HGF 発現遺伝子を移植片に導入することで血管新生が増大し、生着を促進させることが可能であると考えた。

本章では、まず植皮に関する遺伝子治療の研究動向について述べ、次に、著者が行ったラットを対象とした遺伝子導入実験について述べる。実験は、第一段階として、LISW 法に基づいて、ラット皮膚(非移植皮膚)へ HGF 発現遺伝子ベクターを導入し、皮内において発現した HGF 濃度の測定結果から遺伝子導入に最適な実験条件を明らかにした。第二段階として、HGF 発現遺伝子ベクターをラットから切除した移植片に導入して自家皮膚移植を行い、移植後の移植片内の新生血管生成について組織学的に評価した。

4.2 植皮と遺伝子治療の研究動向

移植片の生着は、移植組織内の血管形成によってもたらされる酸素および各種栄養素の供給に大きく影響を受ける。しかし、皮膚移植では移植時に血管吻合を行わないため、その生着は自然治癒過程に頼らざるを得ない。そのため、一般に移植した皮膚の生着には時間を要し、また生着に失敗する場合もある[9, 10]。生着が不完全である皮膚では感染のリスクが高まる。これらの問題点を解決し移植の生着を改善する方法として、遺伝子治療が注目されている。すなわ

ち、血管形成や創傷治癒を促進することが知られている成長因子をコードした遺伝子を導入することにより、成長因子の分泌を増大させ、移植組織の生着を促進することが期待される。

創被覆に関する遺伝子治療の試みの大部分は、一部を茎として残して切り離すことで血流を確保する皮弁移植を対象としており、その多くは VEGF 発現遺伝子を用いている。Gurunluoglu らは、アデノウイルスベクターを用いて、皮下に VEGF 発現遺伝子を導入することで、上腹部に作成した皮弁の生残率が改善されることを示した[11, 12]。また Taub らは、VEGF をコードしたアデノ随伴ウイルスベクターとリポソームを併用することにより、虚血皮弁の生残率が上昇したと報告している[13]。その他、アデノウイルスによる形質転換成長因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)発現遺伝子の導入により、虚血壊死を抑制した報告例もある[14]。しかし、これらの方法は突然変異生成やトール様受容体(病原体を感知して自然免疫を作動させる受容体タンパク)活性化による先天性免疫応答といった問題が伴うため[15, 16]、非ウイルスベクター法の応用が望ましい。Liu らはリポフェクチンを用いて VEGF, 血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF), bFGF をコードした各遺伝子を同時に導入することにより、虚血性皮弁内の血流が改善したと報告している[17]。一方で皮弁移植は、その適用範囲が皮膚を引き伸ばすことができる周辺部位に限定される。完全に切り離された皮膚の移植を行う遊離植皮においてその生着を促進できる技術が確立されれば、皮膚移植や再生医療への貢献は極めて大きい。

そこで本章では、遊離植皮を対象に遺伝子導入を行い、その生着を試みた実験について述べる。

4.3 実験方法

4.3.1 プラスミド DNA

Invitrogen 社の pcDNA3.1 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)の *NotI* site にヒト HGF の cDNA を組み込んだプラスミドベクターを用いた。このヒ

ト HGF はラットに導入することで創傷治癒促進などの効果があることが実証されている[6, 7]. このプラスミド DNA の塩基配列を Fig. 4-1 に示す. ヒト HGF の上流に CMV (Cytomegalovirus) プロモータが挿入されている. 大腸菌コンピテント細胞にこのプラスミド DNA を取り込ませ, Qiagen Plasmid Giga Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA)を用いて増幅し, アルカリライシス法にて精製した.

4.3.2 レーザ誘起応力波

第 3 章で述べた実験と同様に, レーザターゲットには厚さ 0.5 mm の黒色ゴムに厚さ 1.0 mm のポリエチレンテレフタラートを接着したものをを用いた. Q スイッチ Nd:YAG レーザ(Surelite I-10, Hoya Continuum)の第 2 高調波(波長 532 nm, パルス幅 6 ns (FWHM))を平凸レンズ($f = 170$ mm)で集光し, レーザターゲットに照射スポット径 3 mm で照射した.

4.3.3 *In vivo*におけるラット皮膚への HGF 発現遺伝子ベクター導入

導入実験の構成図をFig. 4-2 に示す. 対象としてSprague-Dawleyラット(日本エス・エル・シー, 静岡), オス, 体重 300–380 gを用いた. 麻酔としてペントバルビタール 50 mg/kg animal weightを腹腔内投与し, 背部を除毛した. マイクロシリンジ 80601 (Hamilton Company, Reno, Nevada)に 27 ゲージの注射針(テルモ, 東京)を装着し, 上記プラスミドベクター(濃度 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)を皮内へ注入した. 同部位の皮膚表面にレーザーターゲットを配置してレーザーを照射し, LISWを発生させた. 音響インピーダンス整合のため, ターゲット底面と皮膚表面の間にシリコングリース(東レ・ダウコーニング, 東京)を塗布した. ターゲット表面での照射スポット径は 3 mm, 照射パルス数は 3 で一定とし, ターゲットはパルス毎に交換した. レーザフルエンス 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 J/cm^2 において発生させたLISWのピーク圧力はそれぞれ 16, 26, 39, 45, 50, 52 MPa であった.

4.3.4 HGF 濃度の測定

遺伝子導入 24 時間後に、直径 3 mm の生検トレパンにより遺伝子導入部位の皮膚および皮下組織を採取し、フェニルメチルスルホニルフッ化物(1 mM/L)を含む HGF 抽出液(特殊免疫研究所, 東京)中で 1 分間ホモジナイズ(24,000 rpm)した。同サンプルを遠心(15,000×g, 30 分, 4°C下)後、中間液層を回収し、抗ヒト HGF モノクローナル抗体を用いた酵素結合免疫吸着検査法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)により皮内ヒト HGF 濃度を測定した。3 日後および 5 日後の皮内ヒト HGF 濃度についても同様の評価を行った。

4.3.5 ラット移植皮膚への HGF 発現遺伝子ベクター導入

ラット自家皮膚移植モデルを対象に実験を行った。実験の構成図と手順を Fig.4-3 に示す。背部から 20 mm × 20 mm の皮膚および皮下組織を採取後、皮下脂肪を除去して移植片とした。マイクロシリンジ 80601 (Hamilton Company, Reno, Nevada)に 27 ゲージ(テルモ, 東京)を装着し、移植片の裏側から皮内にヒト HGF 発現プラスミドベクター(10 μl, 1.0 μg/μl)を注入した。厚さ 3 mm のプラスチック板上に真皮を上側にして移植片を静置し、その中心にレーザーターゲットを配置した後、レーザーを照射して応力波を発生させた。4.3.3 における最適条件からレーザーフルエンスは 1.2 J/cm²で一定とし、このとき発生した LISW のピーク圧力は 45 MPa であった。パルス数は 3 で一定とした。応力波適用後の移植片を同採取部位に貼付し縫合して自家皮膚移植した。実験は次の 4 条件で行った。(a)ヒト HGF 発現プラスミドベクターの注入も LISW の適用も行っていない条件、(b)ヒト HGF 発現プラスミドベクターを注入し、LISW を適用していない条件、(c)コントロールベクター(比較対照実験に用いる、ヒト HGF をコードしていない点以外は同様の塩基配列を持つベクター)として pcDNA3.1 を注入し、LISW を適用した条件、(d)ヒト HGF 発現プラスミドベクター注入後、LISW を適用した条件。

4.3.6 新生血管生成の評価

移植 1–3 日後に移植皮膚を採取し、抗ラット CD31/PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1)抗体による免疫染色により新生血管を組織学的に評価した。CD31/PECAM-1 は細胞膜貫通タンパクであり、血管内皮細胞などの内皮細胞において発現する[18]。脱パラフィン・水和処理を行った移植片検体を抗ラット CD31 抗体(希釈率 1:5, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)中で一晩インキュベートした後、ビオチン標識抗マウス IgG(希釈率 1:200, DAKO)を用いて 30 分間インキュベートした。新生血管の定量的評価のため、得られた組織断層デジタル画像から RGB 値に基づき CD31 陽性を示すピクセルを選別し、各深度における CD31 陽性を示すピクセルの数をカウントした。各条件ともラット 5 匹を対象に実験を行ない、その平均値を求めた。

4.3.7 統計解析

上記各条件における組織内 HGF 濃度および、CD31 陽性を示すピクセル数について、ノンパラメトリック Mann-Whitney 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。実験により得られた値は平均値±標準誤差で示した。

4.4 実験結果

4.4.1 *In vivo* におけるラット皮膚への HGF 発現遺伝子ベクター導入

Figure 4-4 に、レーザフルエンス 1.2 J/cm^2 において LISW を適用した場合の 24 時間後における組織内ヒト HGF 濃度のプラスミド DNA 注入容積依存性を示す。比較のため、非 LISW 適用群(naked plasmid DNA injection)のヒト HGF 濃度も示した。全ての条件において、LISW を適用した皮膚は、適用しない皮膚より高いヒト HGF 濃度平均値を示していることがわかる。ここでプラスミド DNA 注入容積 $10 \mu\text{l}$ において LISW 適用群と非 LISW 適用群に統計的有意差がみられ

たため、これ以降の実験ではプラスミドDNA注入容積を 10 μ lで一定とした。LISW適用 24 時間後に取得した組織内ヒトHGF濃度のレーザフルエンス依存性をFig. 4-5 に示す。レーザフルエンス 1.2 J/cm²以上では、ヒトHGF濃度の上昇はみられなかったが、レーザフルエンス 1.2 J/cm²の条件では、非LISW適用群と比較してヒトHGF濃度が約 4 倍に増大した($p < 0.05$)。Figure 4-6 に遺伝子導入後皮内において生成されたヒトHGF濃度の経時変化を示す。全ての条件において日数の経過とともにヒトHGF濃度が減少しているが、遺伝子導入 5 日後においてもLISW適用群は非適用群よりも高いヒトHGF濃度を示していることがわかる。

4.4.2 ラット移植皮膚への HGF 発現遺伝子ベクター導入

いずれの条件においても、移植後 2 日以内では、新生血管の生成は限定的であった。Figure 4-7 に移植 3 日後の皮膚断層像を示す。赤褐色の染色は CD31 抗体により識別された新生血管を示している。ヒト HGF 発現プラスミドベクターの注入も LISW の適用のいずれも行っていない条件(a)(normal grafting)と比較して、ヒト HGF 発現プラスミドベクター注入のみで LISW を適用していない条件(b)(hHGF alone)およびコントロールベクター注入後 LISW を適用した条件(c)では、CD31 陽性新生血管が多くみられた。しかしながらこれらの条件下では、新生血管の分布は不均一であった。ヒト HGF 発現プラスミドベクター注入後 LISW を適用した条件(d)では、他の 3 条件と比較してさらに多くの染色部すなわち新生血管の生成がみられた。Figure 4-7 より、(b)、(c)、(d)では血管周囲においてリンパ球の増加がみられたが、顕著な組織損傷はみられなかった。

Figure 4-8 に CD31 陽性を示すピクセル数の皮膚深さ方向分布を示す。各条件ともラット 5 匹を対象に実験を行ない、その平均値を示している($n = 5$)。ヒト HGF 発現プラスミドベクターの注入も LISW の適用も行っていない条件(a)では、全ての深度において CD31 陽性ピクセルはわずかであった。LISW によりヒト HGF 発現プラスミドベクターを導入した条件(d)では、他の条件と比較して CD31 陽性ピクセルが顕著に増大し、皮膚深さ 0.7 mm から 1.5 mm にわたって高密度の血管新生が得られた。Figure 4-9 に各条件における CD31 陽性

を示すピクセルの総数を示す。LISWによりヒト HGF 発現プラスミドベクターを導入した移植片は、他の三条件と比較して統計的に有意に高い値が得られた。ヒト HGF 発現プラスミドベクターの注入のみを行い LISW を適用していない条件(b)およびコントロールベクター注入後 LISW を適用した条件(c)では、ヒト HGF 発現プラスミドベクターの注入も LISW の適用も行っていない条件(a)よりも高い平均値を示したが、統計的有意差はみられなかった。

4.5 考察

ラット皮内におけるヒト HGF 濃度は遺伝子導入後時間と共に減少した(Fig. 4-6)。この経時変化は、Ogura らによるルシフェラーゼ遺伝子を用いた実験[19]と同様の傾向であり、プラスミド DNA の細胞内における分解もしくは皮膚代謝によるものと考えられる。一方で、この結果は導入遺伝子がゲノムに挿入されていないことを示しており、挿入突然変異や染色体異常による腫瘍形成等のリスクが低いことを示唆している。本研究の目的である皮膚移植の生着促進においては、移植後早期における血管新生が重要であり、長期にわたる導入遺伝子発現は必要としない。

HGF は α 鎖に4つのクリングルドメインを持つ特異的な構造をとっている[1]。クリングルドメインとは、三つのジスルフィド結合によって構成されるタンパク質独特の立体構造であり、この構造を持つ多くのタンパク質が血管内皮機能に関係していることが知られている。HGF も同様に、多くの組織内において新生血管の生成を増大させることからわかるように、内皮細胞において分裂促進因子としての作用を持つ。Figure 4-8 に示したように、ヒト HGF 発現遺伝子ベクター注入のみの条件(b)では、深さ 1.6 mm 付近に CD31 陽性ピクセル数のピークがみられた。移植片の厚さは 1.3–1.7 mm であったことから、移植床近傍における新生血管の密度が高いことがわかる。ヒト HGF 注入後、LISW を適用した条件(d)では、広い深さ領域で新生血管が増大しており、0.7 mm 程度の比較的浅いところにおいても増大がみられ、移植片全層への酸素および栄養素の供給が促進されていることを示唆している。

HGF 発現遺伝子を注入せず、Control vector 注入後 LISW を適用した条件(c)においても新生血管の増大がみられたことは、予想外の結果であった。この原因は明らかではないが、LISW 適用により組織の活性が高まった可能性が考えられる。これと似た現象が、体外衝撃波結石破碎装置により発生させた衝撃波を用いた実験において報告されている。Huemer らは、ラット虚血皮弁へ衝撃波を適用することで、血管密度が増大し、皮弁の虚血性壊死領域が減少することを報告している[20]。また Wang らは、衝撃波を適用することで、腱近傍の関節において血管新生が増大すると報告している[21, 22]。これらのメカニズムとして、衝撃波適用により VEGF 等の成長因子の生成が増大することが報告されているが、なぜ成長因子生成が増大するのかは明らかにされていない。LISW 単独適用による血管新生の増大につき、今後、成長因子の測定等によりそのメカニズムが解明されるものと考えられる。また、他の可能性として非メチル化 CpG 配列により自然免疫応答が誘導されたことも考えられる。血管新生の促進が生成された HGF タンパクによるものか、それとも自然免疫応答によるものかは、今後 Control vector 注入のみの条件(LISW 非適用)に関する詳細な検討により明らかにされるものと考えられる。

本方法は自家皮膚移植だけでなく、同種異系移植や培養皮膚代替物へも応用可能であると考えられる。自家皮膚移植は拒絶反応が生じないという大きな利点がある一方、広範囲熱傷等においては創被覆を行える面積が限られる。このため、創傷治癒促進、痛みの軽減、体液漏出の防止を目的とした同種異系移植や培養皮膚代替物が用いられる[23, 24]。また早期に被覆することで感染症のリスクを軽減することができる。1979年に Green らにより表皮細胞を培養してシートを作成する技術が報告され[25]、以降、培養真皮、培養皮膚といった培養皮膚代替物が開発された。しかし培養皮膚代替物は血管網を持たないため、虚血による脱落や栄養の欠乏が生じやすい。また一般に移植皮膚は厚いほど皮膚構成成分を多く含んでいると言えるが、厚さが増すほど十分な血行を得ることが難しくなり、生着率の低下をまねく。これらの問題点を解決するため、遺伝子操作によるバイオエンジニア皮膚代替物の開発が進められている[26-28]。ただし、これらの報告の大部分はウイルスベクターによるケラチノサイトへの遺伝子導入によるものである。レトロウイルスを用いて成長因子生成を増大させた

ケラチノサイトを培養することにより、厚い表皮層の形成や細胞密度の増大、血管新生の促進が可能であることが報告されている。非ウイルスベクターを用いた報告例としては、Rio らがリポフェクタミンを用いてブタケラチノサイトに VEGF 発現遺伝子を導入してマウスに移植したところ、基底層および毛細血管の周辺に血管形成がみられたと報告している[29]。一方これらの方法では、まずケラチノサイトに遺伝子導入し、その後皮膚代替物を構成するという複雑な手順と長い時間を必要とするという問題がある。LISW を用いた方法は移植直前においても遺伝子導入が可能であり、非ウイルスベクターによる高性能移植皮膚作成法として有望である。

上述してきたように、非ウイルスベクターによる遺伝子治療は、ウイルス由来の突然変異誘発性、免疫反応、発ガン性などの潜在的危険性がない。また、用いるプラスミド DNA の大量生産および品質のコントロールが容易であるといった特徴を持つ。これまでに様々な非ウイルス遺伝子導入法が提案されているが、エレクトロポレーションや超音波法を用いた場合は、移植片への遺伝子導入では電極ないしトランスデューサを移動させる必要があり、接触法であるこれらの方法では大面積処理による大量生産は容易ではない。LISW に基づく遺伝子導入システムは、DNA を注入した後レーザー光を走査させることにより大面積処理が行え、自動化が容易であることから高性能移植皮膚の大量生産も可能であろう。例えば本方法に基づくシステムをスキンバンクに導入し、高性能移植皮膚(スーパースキン)の作成が可能であると考えられる。また、第3章で示したように LISW を用いた遺伝子導入法は異なる種類の細胞へ応用可能であるため、各種移植臓器の生着促進や、再生医療における血管形成促進など広汎な応用が期待される。

4.6 おわりに

ナノ秒パルスレーザーを固体材料に照射することにより発生させた LISW により、*in vivo*においてラット皮膚へ HGF 発現遺伝子を導入可能であることを実証した。さらに、ラット背部から切除した皮膚へ LISW を用いてヒト HGF 発

現遺伝子ベクターを導入して自家移植を行ったところ、新生血管の生成が促進されることを示した。移植片の生着は血管により供給される酸素及び各種栄養素に大きく影響を受けるため、本方法は移植皮膚の性能を向上させるための有用な方法となり得る。また、LISW を用いた遺伝子導入法は他の組織・細胞へも応用可能であるため、各種移植治療や再生医療等で必要とされる組織工学の新しい技術として活用が期待される。

参考文献 (第4章)

- [1] K. Conway, P. Price, K. G. Harding, W. G. Jiang, "The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing," *Wound Repair Regen.* **14**, 2 (2006).
- [2] K. Matsumoto, T. Nakamura, "Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 639 (1997).
- [3] 荻原俊男, 森下竜一, HGFはHappy Growth Factorか? (メディカルレビュー社, 1999).
- [4] M. Aoki, R. Morishita, Y. Taniyama, I. Kida, A. Moriguchi, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, J. Higaki, T. Ogihara, "Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, etc.," *Gene Ther.* **7**, 417 (2000).
- [5] E. M. Rosen, D. S. Grant, H. K. Kleinman, I. D. Goldberg, M. M. Bhargava, B. J. Nickoloff, J. L. Kinsella and P. Polverini, "Scatter factor (hepatocyte growth factor) is a potent angiogenesis factor *in vivo*," *Symp. Soc. Exp. Biol.* **47**, 227 (1993).
- [6] K. Nakanishi, M. Uenoyama, N. Tomita, R. Morishita, Y. Kaneda, T. Oguhara T, K. Matsumoto, T. Nakamura, A. Maruta, S. Matsuyama, T. Kawai, T. Aurues, T. Hayashi and T. Ikeda, "Gene transfer of human hepatocyte growth factor into rat skin wounds mediated by liposomes coated with the sendai virus (hemagglutinating virus of Japan)," *Am. J. Pathol.* **161**, 1761 (2002).
- [7] Y. Kunugiza, N. Tomita, Y. Taniyama, T. Tomita, M. K. Osako, K. Tamai, T. Tanabe, Y. Kaneda, H. Yoshikawa and R. Morishita, "Acceleration of wound healing by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase with Shima Jet," *Gene Ther.* **13**, 1143 (2006).
- [8] Y. Nakamura Y, R. Morishita, S. Nakamura, M. Aoki, A. Moriguchi, K.

- Matsumoto, T. Nakamura, J. Higashi and T. Ogiwara, "A vascular modulator, hepatocyte growth factor, is associated with systolic pressure" *Hypertension* **28**, 409 (1996).
- [9] 荻野洋一, 倉田喜一郎, 牧野惟男, 編, 形成外科学入門 (南山堂, 1978).
- [10] 塚田貞夫, 編, 最新形成再建外科学 (医歯薬出版, 1998).
- [11] R. Gurunluoglu, R. Meirer, M. Shafighi, G. M. Huemer, B. Yilmaz, and H. Piza-Katzer, "Gene therapy with adenovirus-mediated VEGF enhances skin flap prefabrication," *Microsurgery* **25**, 433 (2005).
- [12] P. Lubiawski, C. K. Goldman, R. Gurunluoglu, K. Carnevale and M. Siemionow, "Enhancement of epigastric skin flap survival by adenovirus-mediated VEGF gene therapy," *Plast. Reconstr. Surg.* **109**, 1986 (2002).
- [13] P. J. Taub, J. D. Marmur, W. X. Zhang, D. Senderoff, P. D. Nhat, R. Phelps, M. L. Urken, L. Silver and H. Weinberg, "Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps," *Plast. Reconstr. Surg.* **102**, 2033 (1998).
- [14] G. M. Huemer, M. Shafighi, R. Meirer, P. Debagge, H. Piza-Katzer and R. Gurunluoglu, "Adenovirus-mediated transforming growth factor- β ameliorates ischemic necrosis of epigastric skin flaps in a rat model," *J. Surg. Res.* **121**, 101 (2004).
- [15] D. Tudor, C. Dubuquoy, V. Gaboriau, F. Lefevre, B. Charley, S. Riffault, "TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines," *Vaccine* **23**, 1258 (2005).
- [16] I. Gursel, M. Gursel, K. J. Ishii, D. M. Klinman, "Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides," *J. Immunol.* **167**, 3324 (2001).
- [17] P. Y. Liu, K. Liu, X. T. Wang, E. Badiavas, K. M. Rieger-Christ, J. B. Tang and I. C. Summerhayes, "Efficacy of combination gene therapy with multiple growth factor cDNAs to enhance skin flap survival in a rat model," *DNA Cell Biol.* **24**, 751 (2005).

- [18] H. M. DeLisser, M. Christofidou-Solomidou, R. M. Strieter, M. D. Burdick, C. S. Robinson, R. S. Wexler, J. S. Kerr, C. Garlanda, J. R. Merwin, J. A. Madri and S. M. Albelda, "Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis," *Am. J. Pathol.* **151**, 671 (1997).
- [19] M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saito, T. Ikeda, H. Ashida, and M. Obara, "*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves." *Lasers Surg Med.* **34**, 242 (2004).
- [20] G. M. Huemer, R. Meirer, R. Gurunluoglu, F. S. Kamelger, K. M. Dunst, S. Wanner, H. Piza-Katzer, "Comparison of the effectiveness of gene therapy with transforming growth factor-beta or extracorporeal shock wave therapy to reduce ischemic necrosis in an epigastric skin flap model in rats," *Wound Repair Regen.* **13**, 262 (2005).
- [21] C. J. Wang, F. S. Wang, K. D. Yang, L. H. Weng, C. C. Hsu, C. S. Huang, L. C. Yang, "Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits," *J. Orthop. Res.* **21**, 984 (2003).
- [22] F. S. Wang, C. J. Wang, Y. J. Chen, P. R. Chang, Y. T. Huang, Y. C. Sun, H. C. Huang, Y. J. Yang, K. D. Yang, "Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts," *J. Biol. Chem.* **279**, 10331 (2004).
- [23] B. S. Atiyeh, S. W. Gunn and S. N. Hayek, "State of the art in burn treatment," *World J. Surg.* **29**,131 (2005).
- [24] R. E. Horch, J. Kopp, U. Kneser, J. Beier and A. D. Bach, "Tissue engineering of cultured skin substitutes, *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 592 (2005).
- [25] H. Green, O. Kehinde, J. Thomas, "Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5665 (1979).
- [26] G. Erdag, D. A. Medalie, H. Rakhorst, G. G. Krueger and J. R. Morgan, "FGF-7 expression enhances the performance of bioengineered skin," *Mol. Ther.* **10**, 76 (2004).

- [27] K. E. Hamoen and J. R. Morgan, "Transient hyperproliferation of a transgenic human epidermis expressing hepatocyte growth factor," *Cell Transplant.* **11**, 385 (2002).
- [28] P. M. Vogt, S. Thompson, C. Andree, P. Liu, K. Breuing, D. Hatzis, H. Brown, R. C. Mulligan and E. Eriksson, "Genetically modified keratinocytes transplanted to wounds reconstitute the epidermis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9307 (1994).
- [29] M. D. Rio, F. Larcher, A. Meana, J. C. Segovia, A. Alvarez and J. L. Jorcano, "Nonviral transfer of genes to pig primary keratinocytes. Induction of angiogenesis by composite grafts of modified keratinocytes overexpressing VEGF driven by a keratin promoter," *Gene Ther.* **6**, 1734 (1999).

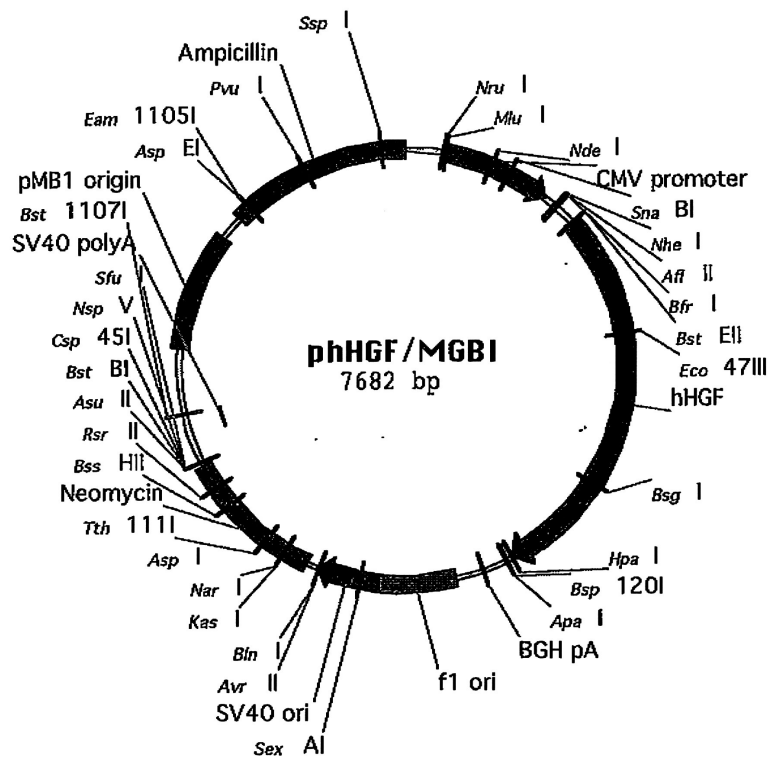


Fig. 4-1 Plasmid DNA coding for HGF [ジェノメディア株式会社より供与].

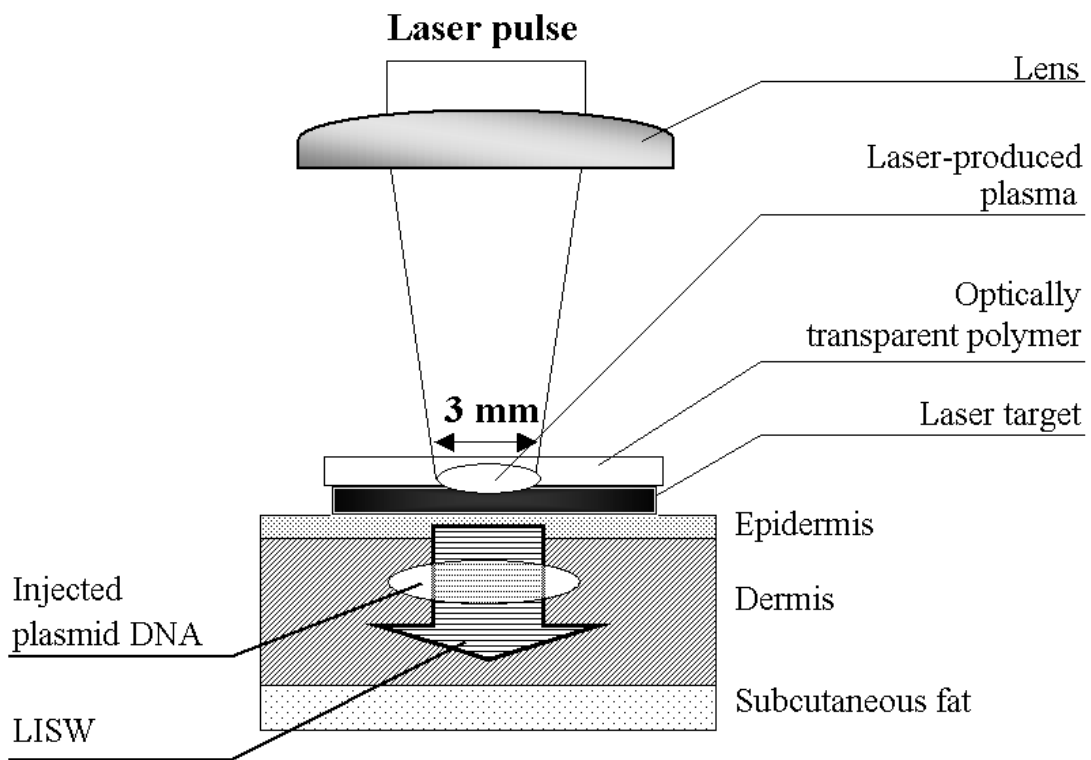


Fig. 4-2 Setup for HGF gene transfer into rat native skin by the use of LISWs.

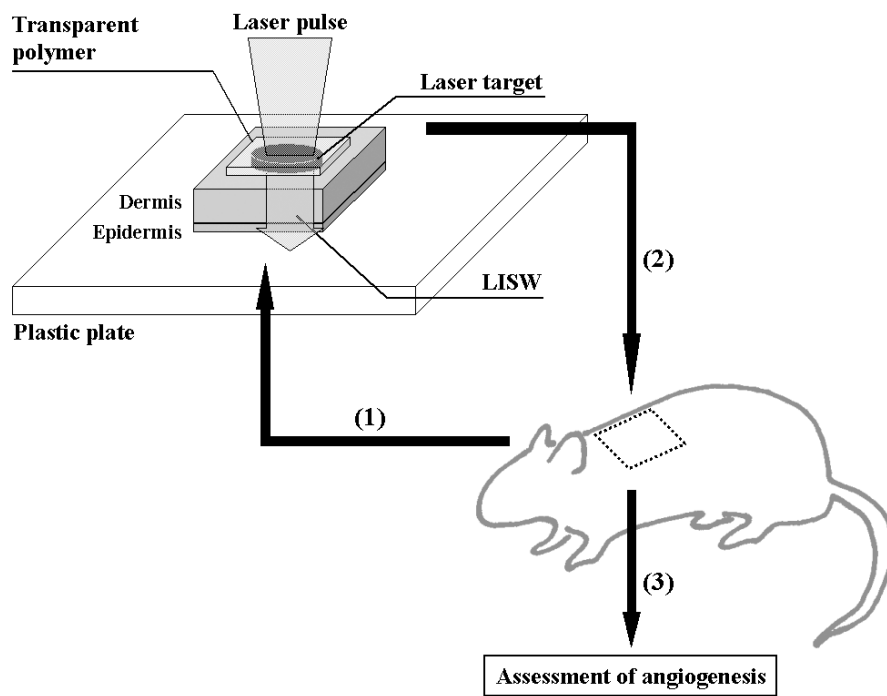


Fig. 4-3 Setup for HGF gene transfer into rat skin grafts by the use of LISWs.

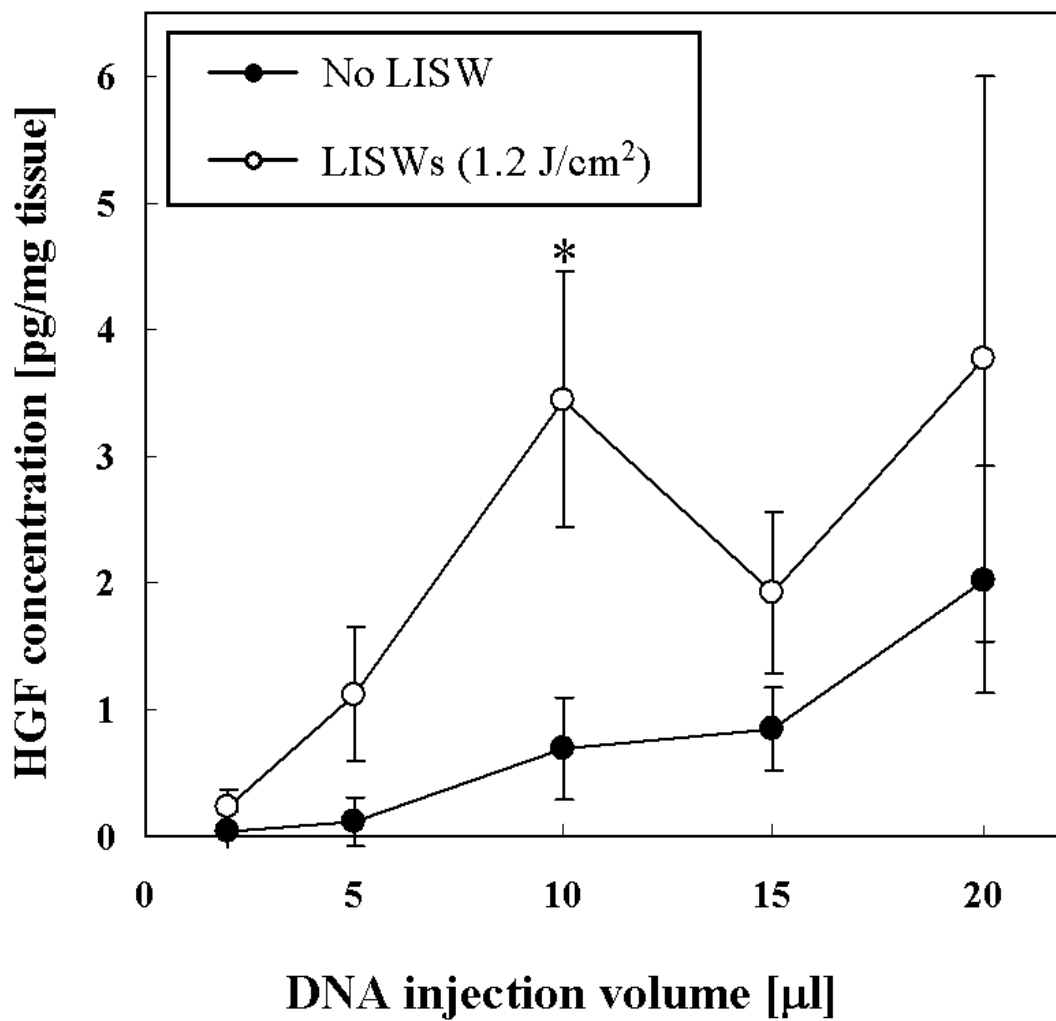


Fig. 4-4 Effect of DNA injection volume on hHGF concentration expressed in rat skins 24 h after the LISW application. Skins were irradiated with 3 pulses of LISW. $n = 8 - 11$. Values are expressed as means \pm standard error. (* $p < 0.05$, LISWs vs. No LISW).

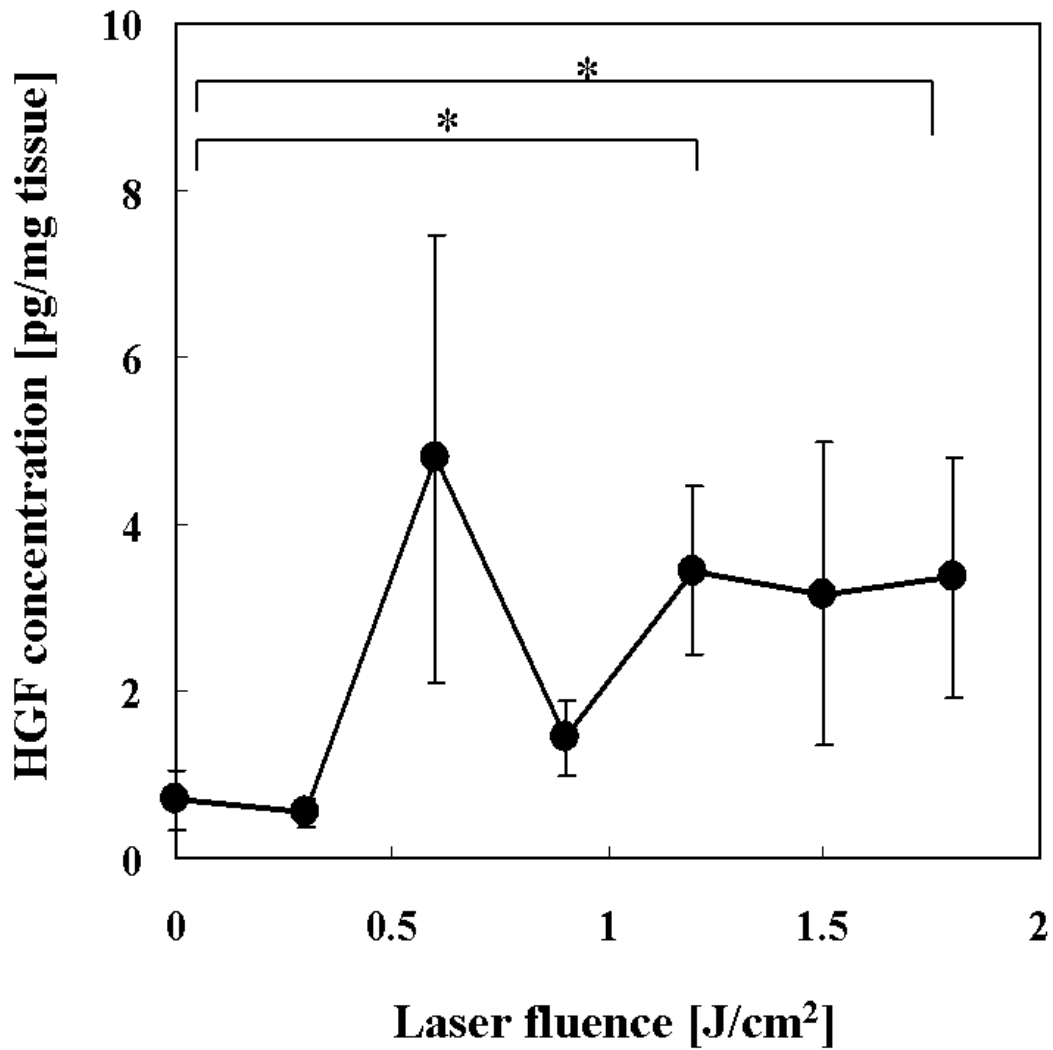


Fig. 4-5 Effect of laser fluence on hHGF concentration expressed in rat skins 24 h after the LISW application. Skins were injected with 10 μ l of plasmid DNA suspension. n = 11. Values are expressed as means \pm standard error. (* p < 0.05).

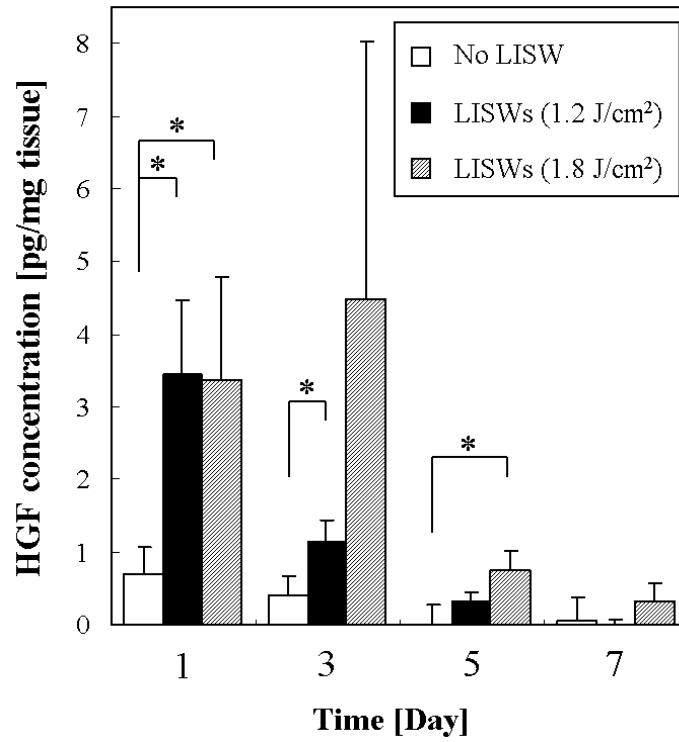


Fig. 4-6 Time courses of hHGF concentration expressed in rat skins after gene transfection. Skins were irradiated with 3 pulses of LISW. $n = 8 - 11$. Values are expressed as means \pm standard error. (* $p < 0.05$).

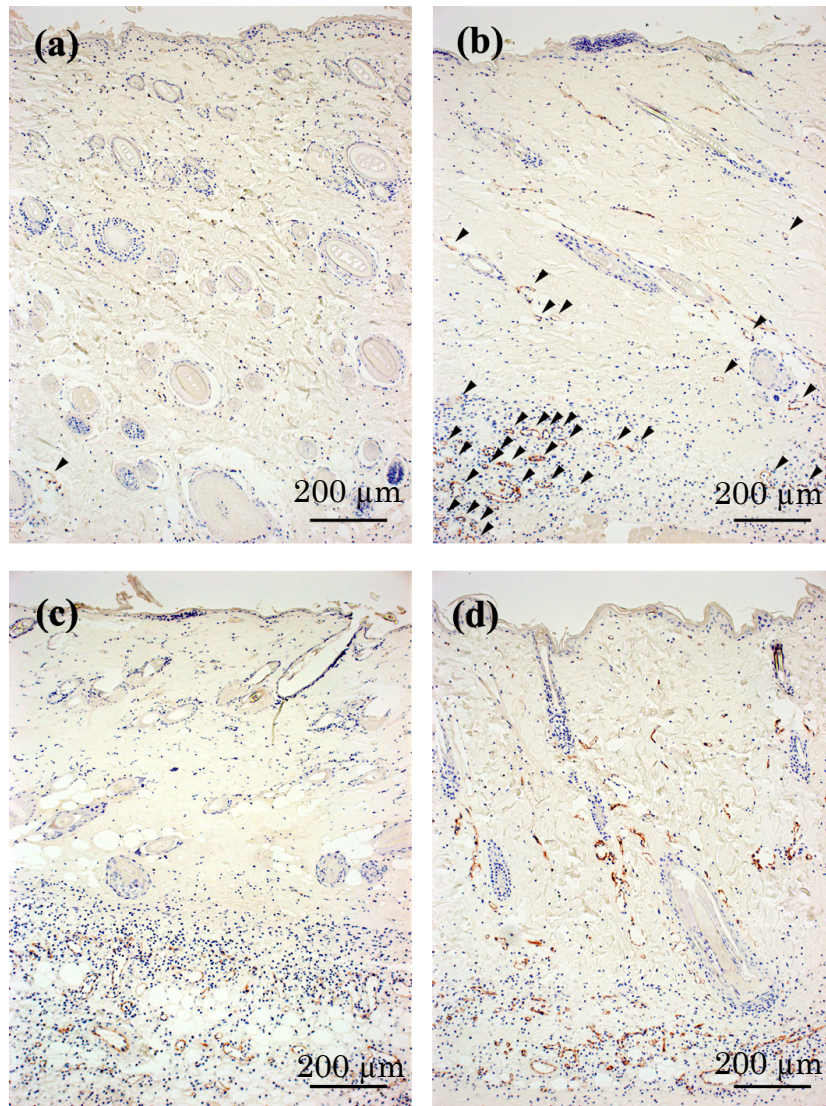


Fig. 4-7 Cross-sectional images of rat skin grafts with immunohistochemical staining using anti-rat CD31/PECAM-1 antibody 3 days after gene transfection. (a) Neither hHGF gene nor LISW was applied (normal grafting), (b) hHGF gene was injected without LISW application (hHGF alone), (c) control vector plasmid DNA was injected with LISW application (control vector with LISWs), (d) LISWs were applied after hHGF gene injection (hHGF with LISWs). Arrow heads indicate pronounced blood vessels indicated by immunohistochemistry ((a) and (b)). No arrow heads are shown in (c) and (d), because there are too many naovascularities. Scale bars indicate 200 μm .

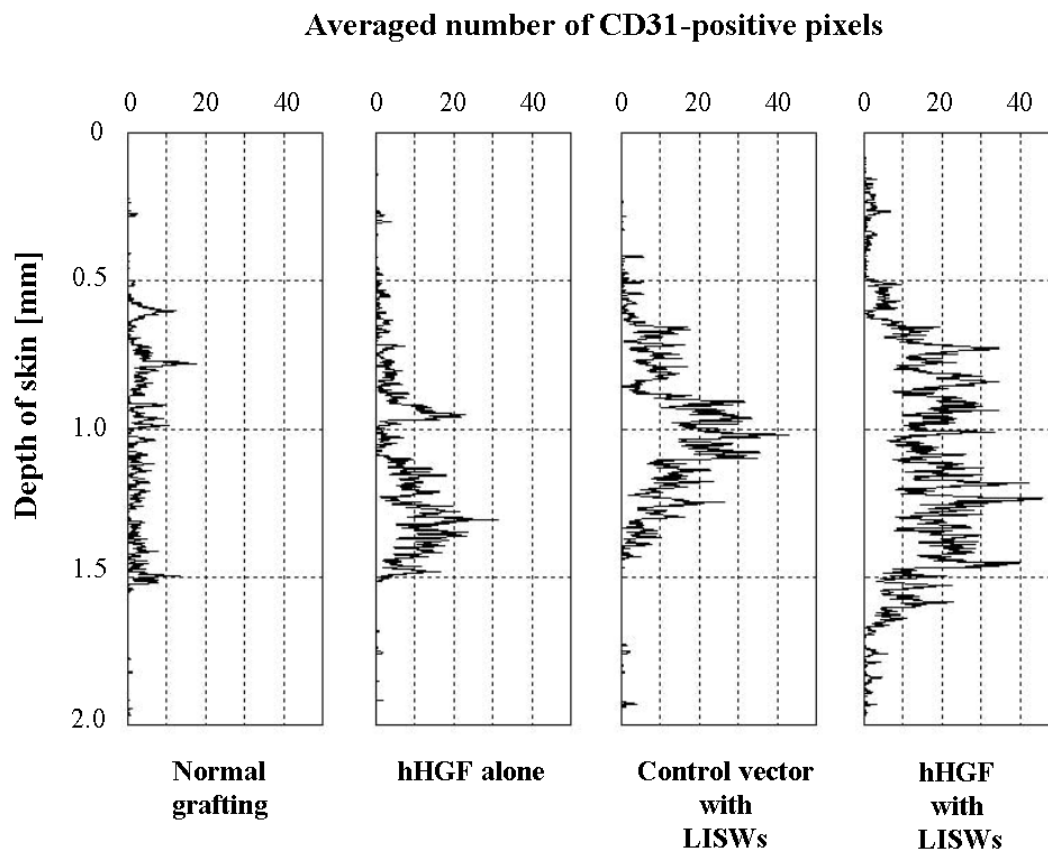


Fig. 4-8 Depth profiles of the number of CD31-positive pixels for grafted skins treated under the four different conditions: (a) neither injection of hHGF gene nor application of LISWs (normal grafting), (b) injection of hHGF gene without LISW application (hHGF alone), (c) injection of control vector plasmid DNA with LISW application (control vector with LISWs), (d) application of LISWs after hHGF gene injection (hHGF with LISWs). Horizontal axes show average number of CD31-positive pixels from 5 rats in each condition.

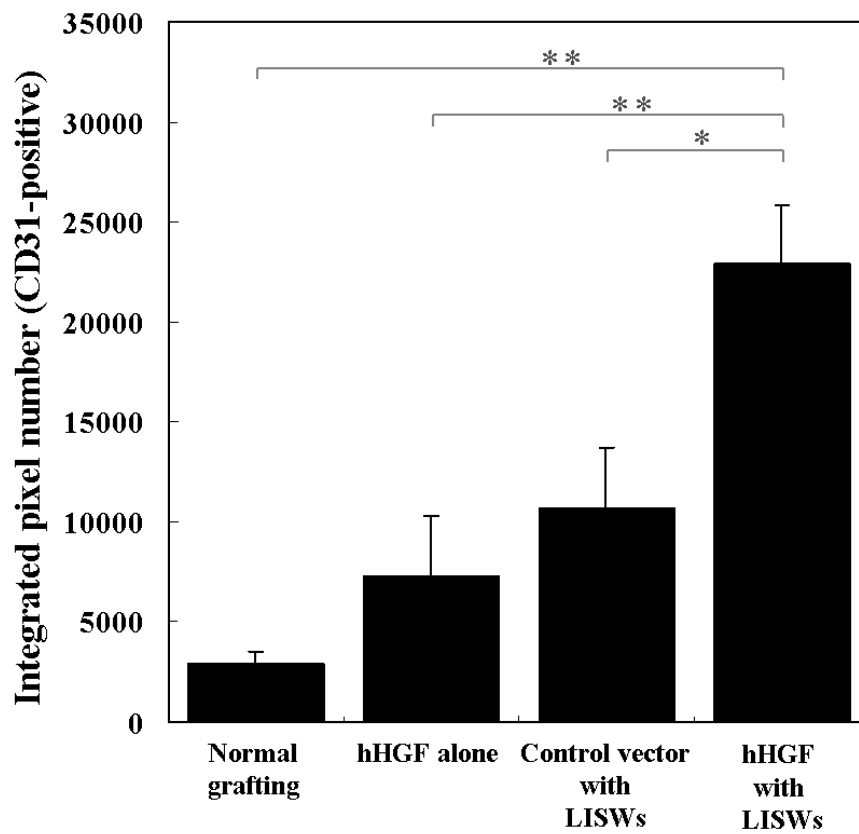


Fig. 4-9 Comparison of total numbers of CD31-positive pixels for grafted skins treated under the four different conditions, derived from Fig. 4-8. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

第 5 章

レーザー誘起応力波と生体との相互作用および
遺伝子導入メカニズムの検討

5.1 はじめに

遺伝子治療では生体の設計図ともいえる遺伝子を取り扱うことから、安全性が特に重要視される。この背景には、遺伝子治療が「遺伝子を治す」という治療法として考えられていたことから、「健全な遺伝子とは何か」、「遺伝的多様性の喪失の恐れはないか」といった倫理的な議論が側面に含まれていたことがあげられる。しかし、遺伝子治療の対象が先天性疾患から他の疾患へと拡大し、外部からの遺伝子導入という方法が主体となり、「遺伝子で治す」という概念にシフトしたことにより、議論の複雑化が回避され、安全性そのものに注目されるようになってきた[1]。第1章で述べたウイルスベクター法に由来する深刻な副作用に関する報告以降、遺伝子治療には長期にわたる慎重な安全性の検討が強く求められるようになってきている。

プラスミドベクターを用いる物理的遺伝子導入法は、ウイルスベクターと比較して安全性が高いとされているが、物理エネルギーによる組織損傷が生じる危険性がある。例えばエレクトロポレーション法では、ブタ皮膚を対象とした遺伝子導入において、皮膚に損傷が生じ、マクロファージおよび好中球が増加したことが報告されている[2]。

LISWが皮膚組織に与える影響については、いくつかの論文において電子顕微鏡観察の結果が示されている。Flotteらは皮膚にArFエキシマレーザー(波長 193 nm, パルス幅 14 ns)をレーザーフルエンス 156 mJ/cm²で 30–150 パルス照射してレーザーアブレーションで角質を除去し、透過型電子顕微鏡を用いて観察を行ったところ、深さ 400 μmまで損傷がみられたことを報告している[3, 4]。この波長では、皮膚における光侵達長(吸収長)は約 1 μmであることから、皮膚損傷はレーザーによる直接的な影響ではなく、発生した応力波によるものであると述べている。彼らの使用したLISWのピーク圧力やインパルスなどその特性は明らかにされていないが、本研究で用いたLISWは、透明材料を接着した黒色ゴムをレーザーターゲットに用いて発生させたため、彼らの用いたLISWよりも高いインパルスであると考えられる。

本章の目的は、第3章および第4章で述べた遺伝子導入に用いた LISW と生体との相互作用について検討することである。 LISW が皮膚組織に与える影響

について、ラット皮膚を対象に行った実験について述べる。具体的には、LISWを適用した皮膚を対象に、組織学的評価を目的とした(1)HE (hematoxylin and eosin)染色による評価、炎症評価を目的とした(2)抗 CD68 抗体を用いた染色による検討、アポトーシス細胞の識別を目的とした(3)TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling)染色による評価、細胞膜および細胞小器官に与える影響の評価を目的とした(4)透過型電子顕微鏡を用いた観察を行った。さらに、これらの結果を踏まえ、LISWを用いた *in vivo* における遺伝子導入のメカニズムについて検討することを目的とした実験を行った。その結果および考察を述べる。

5.2 LISW が皮膚組織へ与える影響の評価

5.2.1 実験方法

LISWを適用したラット皮膚について、組織学的評価を行った。Sprague-Dawleyラット(日本エス・エル・シー, 静岡), オス, 体重 300–380 g に、麻酔としてペントバルビタール 50 mg/kg animal weightを腹腔内投与し、背部を除毛した。皮膚表面にレーザターゲットを配置し、Qスイッチ Nd:YAG レーザ(Surelight I-10, Hoya- Continuum, Tokyo, Japan)の第 2 高調波(波長 532 nm, パルス幅 6.0 ns(FWHM))を平凸レンズ($f = 170$ mm)で集光して照射し、LISWを発生させた。LISWの特性は第 2 章で記述したものと同様である。ターゲット表面での照射スポット径は 3 mm, 照射パルス数は 3 で一定とし、ターゲットはパルス毎に交換した。レーザフルエンスは 1.2, 1.8, 2.4 J/cm²と変化させた。

LISW 適用 24 時間後に、直径 3 mm の生検トレパンにより LISW を適用した皮膚と皮下組織を採取し、HE 染色, CD68 染色, および TUNEL 染色を行った。CD68 抗原はライソソーム関連膜タンパクファミリー分子であり、マクロファージ, 好中球などの表面に検出される。CD68 染色では、脱パラフィン・水和処理を行った皮膚組織を、室温で 30 min 0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシターゼ阻止を行い、その後、室温で 30 min 正常ブタ血清で非特異反応

の阻止を行った。一次抗体反応として MCA341R (serotec)(1:100), 二次抗体反応としてビオチン標識抗マウス IgG(Dako)を用いた。PBS で洗浄後, ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン(1:500)で 30 分間インキュベートした。組織を再び PBS で洗浄し, ジメチルアミノアゾベンゼン(dimethylaminoazobenzene, DAB)で 5 min 発色させた。またカウンター染色としてヘマトキシリンで核染色を行った。TUNEL 陽性細胞はアポトーシスの指標となる。TUNEL 染色では, 脱パラフィン・水和処理を行った皮膚組織を, 室温で 30 min 0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシターゼ阻止を行った。その後, Terminal Transferase 3 μ l, Biotin-16-dUTP 8 μ l, TUNEL Dilution Buffer 1000 μ l で反応させ, PBS で洗浄後, ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン(1:500)で 30 分間インキュベートした。組織を再び PBS で洗浄し, ジメチルアミノアゾベンゼン(dimethylaminoazobenzene, DAB)で 5 min 発色させた。またカウンター染色として 1%メチルグリーンで核染色を行った。TUNEL 陽性細胞数の定量的評価のため, 得られた組織断層像から, 全細胞数中の TUNEL 陽性細胞数の比を求めた(n = 5)。上記各条件における TUNEL 陽性細胞数は平均値 \pm 標準誤差で表し, ノンパラメトリック Mann-Whitney 検定を用い, $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

さらに, LISW が細胞膜および各種細胞小器官に与える影響を評価するため, 電子顕微鏡観察を行った。LISW 適用 24 時間後に, 皮膚組織を生検トレパンにより採取し, 2.5%グルタルアルデヒド, 2%パラホルムアルデヒドで前固定した。その後, リン酸緩衝液で洗滌し, 2%オスミウム酸で後固定した。固定後再びリン酸緩衝液にて洗滌し, 次にエタノールで脱水して酸化プロピレンを経てエポキシ樹脂に包埋し熱重合させた。その後, 薄切片を作成して染色した検体を透過電子顕微鏡 JEM-1010(日本電子, 東京)を用いて観察した。

5.2.2 結果および考察

Figure 5-1 に HE 染色を行った皮膚の断層像を示す。表皮, 真皮のいずれにも, LISW 適用による大きな形態学的変化はみられなかった。Figure 5-2 に真皮層の拡大像を示す。第 4 章で述べた移植片への遺伝子導入実験に用いたレーザー照射

条件であるレーザーフルエンス 1.2 J/cm^2 の条件(b)では、LISWを適用していない条件(a)と比較して、ほとんど変化がみられなかった。一方、レーザーフルエンス 1.8 J/cm^2 および 2.4 J/cm^2 の条件では、図中の矢印で示すように、破砕され断片化した核がみられた。ただし、この原因がアポトーシスによるものかLISWによる物理的な破壊であるのかは不明である。

Figure 5-3 にCD68 染色の結果を示す。レーザーフルエンス 1.2 J/cm^2 の条件(b)では、LISWを適用していない条件(a)と比較して、ほとんど変化がみられなかった。一方、レーザーフルエンス 1.8 J/cm^2 および 2.4 J/cm^2 条件では、真皮全層においてCD68 陽性細胞の増加、すなわち、マクロファージの浸潤が生じている。このことから、炎症が生じる閾値がレーザーフルエンス 1.2 J/cm^2 と 1.8 J/cm^2 の間にあると推察される。

Figure 5-4 にTUNEL染色を行った皮膚の断層像を示す。レーザーフルエンス 1.8 J/cm^2 および 2.4 J/cm^2 の条件では、表皮細胞、真皮細胞のいずれにおいても褐色のTUNEL陽性細胞数が増大していることがわかる。Figure 5-5 にTUNEL陽性を示す表皮細胞数の全表皮細胞数に対する比率のレーザーフルエンス依存性を示す。第4章で述べた移植皮膚への遺伝子導入に用いたレーザーフルエンス 1.2 J/cm^2 では、TUNEL陽性表皮細胞比率は、LISWを適用していない皮膚と比較して統計的有意差はみられなかった。一方、レーザーフルエンス 1.8 J/cm^2 および 2.4 J/cm^2 においては、TUNEL陽性表皮細胞比率は高い平均値を示した。レーザーフルエンス 1.8 J/cm^2 ではばらつきが大きく、LISWを適用していない条件に対し統計的有意差はみられなかったが、 2.4 J/cm^2 では統計的有意差がみられた。Figure 5-6 にTUNEL陽性を示す繊維芽細胞数の全繊維芽細胞数に対する比率を皮膚深さ領域別に示す。レーザーフルエンス 1.2 J/cm^2 では、TUNEL陽性細胞比率はLISWを適用していない皮膚と比較して、全ての深さ領域において統計的有意差はみられなかった。一方、レーザーフルエンス 1.8 J/cm^2 および 2.4 J/cm^2 では、コントロールおよび 1.2 J/cm^2 と比較し、TUNEL陽性繊維芽細胞数の比率が顕著に高くなった。TUNEL陽性繊維芽細胞比率は深くなるにつれて減少し、深さ $0-262 \mu\text{m}$ の領域において最も高くなった。皮内における音響波の振幅 u は、

$$u = u_0 \exp(-\alpha x)$$

で表される．ここで， u_0 は皮膚表面($x=0$)での振幅， α は音の減衰係数， x は皮膚表面からの距離(深さ)を示す． α は周波数や温度に依存するが，軟組織における典型的な値である $f \times 1.0 \times 10^{-7} \text{ m}^{-1}$ を用いると，音響波の組織厚さ方向の減衰は Fig. 5-7 に示すようになる．Figure 5-6 のレーザフルエンス 1.8 J/cm^2 および 2.4 J/cm^2 における TUNEL 陽性繊維芽細胞の深さ依存性と比較すると，20 MHz 程度以上の高周波数成分が細胞のアポトーシスを誘起していることを示唆している．LISW は高いレーザフルエンスにおいて立ち上がり時間が一定でピーク圧力が増大するため，圧力上昇速度が増大する．すなわち，レーザフルエンスの上昇に伴い高周波成分が増大し，TUNEL 陽性細胞数が増大したと推定される．

皮膚表面から 100–200 μm の範囲に存在する繊維芽細胞の透過型電子顕微鏡画像を Fig. 5-8 に示す．レーザフルエンス 1.2 J/cm^2 で LISW を適用した条件(b) では，LISW を適用していない条件(a)と比較して，クロマチンの凝縮がみられるが，細胞膜および核膜における損傷は観察されなかった．一方，レーザフルエンス 2.4 J/cm^2 で LISW を適用した条件(c)では，約 69% の細胞において核の形態の変化や顕著なクロマチンの凝縮，細胞膜の消失および細胞質の崩壊がみられた(観察細胞数: 35)．この現象が物理的破壊によるものかアポトーシスによるものかは不明であるが，高フルエンスでは細胞に損傷が生じていることが電子顕微鏡観察においても観察された．

5.3 *In vivo* における LISW による遺伝子導入のメカニズムの検討

第 3 章では，*in vitro* における遺伝子導入メカニズムについての考察を記述した．ここでは *in vivo* での遺伝子導入メカニズムについての考察を述べる．

これまで，*in vivo* での LISW を用いた遺伝子導入は，ラット皮膚[5]およびマウス脳[6]を対象とした研究が報告されている．Ogura らはラット皮膚を対象にレポーター遺伝子 3 種(ルシフェラーゼ遺伝子，Lac Z 遺伝子，EGFP 遺伝子)を導入し，表皮においてのみ遺伝子発現が得られたと報告している．遺伝子導

入メカニズムは明らかにされていないが、(1)外来遺伝子が加速され、細胞膜を透過する、(2)せん断応力等により細胞膜に過渡的な変形ないし変性が生じる、という二つの仮説が述べられている。

本節では、まず、ラット皮膚における表皮細胞選択的な遺伝子導入につき検証を行った結果について述べる。また、上述した仮説(1)について検討を行なうため、遺伝子注入と LISW 適用の順序を逆にした実験を行った結果について述べる。この順序によると、LISW 適用時に細胞周囲にプラスミド DNA は存在しない。従って、遺伝子発現が観察されれば仮説(1)は否定できる。次に、仮説(2)について、細胞膜変形・変性を評価するために、ラット皮膚に遺伝子導入に用いたのと同じレーザー照射条件で LISW を適用し、電子顕微鏡観察を行った結果を述べる。

5.3.1 実験方法

5.3.1.1 表皮細胞選択性の検証

Sprague-Dawleyラット背部から切除した皮膚片の真皮側にターゲットを設置し、遺伝子導入実験を行なった。表皮選択的遺伝子導入がLISWの減衰によるものであれば真皮において遺伝子発現が観察され、また、表皮細胞に選択的に導入されるのであれば、真皮層において遺伝子発現は得られないと推測される。皮膚片内に真皮側(裏側)から、EGFPをコードしたプラスミドDNA(1.0 µg/µl, 10 µl)を注入し、同部位にポリエチレンテレフタラートを接着した黒色ゴムを設置してQスイッチNd:YAGレーザーの第二高調波を平凸レンズで集光し、照射スポット径 3 mmで照射した。レーザーフルエンスは 1.2 J/cm²、照射パルス数は3で一定とし、ターゲットはパルス毎に交換した。LISW適用後、ラット同採取部位に貼付し縫合して自家皮膚移植し、24 時間後に同部位を採取して、凍結させた状態で薄切し、蛍光顕微鏡(Eclipse E600, ニコン)を用いてEGFPの発現を観察した。

5.3.1.2 「外来遺伝子が加速され細胞膜を透過する」仮説の検証

除毛したSprague-Dawleyラットの背部の皮膚表面に前述したレーザターゲットを配置し、QスイッチNd:YAGレーザの第2高調波を平凸レンズで集光して照射した。ターゲット表面での照射スポット径は3 mm, レーザフルエンスは1.2 J/cm², 照射パルス数は3で一定とし, ターゲットはパルス毎に交換した。通常の遺伝子導入の場合とは逆に, LISW適用後に同部位に27ゲージの注射針(テルモ, 東京)を装着したマイクロシリンジ80601 (Hamilton Company, Reno, Nevada)を用いてルシフェラーゼ発現プラスミドベクター(濃度 1.0 µg/µl)を皮内へ注入した。使用したルシフェラーゼ発現遺伝子ベクターの塩基配列をFig. 5-9に示す。LISW適用からルシフェラーゼ発現遺伝子ベクター注入までの時間は, 10 sから24時間の範囲で変化させた。

遺伝子発現の評価には, ルシフェラーゼ定量化キット(E1500, Promega, Madison, WI)を用いた。遺伝子注入をして一定時間後に直径3 mmの生検トレパンにより導入部位の皮膚および皮下組織を採取し, 1000 µlの細胞溶解液に浸して剪刀により切断し均一化した。同サンプルを1500 rpmで15分遠心した後, 上澄み20 µlに100 µlのルシフェリンを滴下し, 攪拌後にルミノメータによりルシフェラーゼ活性を計測した。

5.3.1.3 LISWによる細胞膜変形ないし変性の評価

Sprague-Dawleyラットの皮膚表面にターゲットを設置し, 前述した方法でLISWを適用した。レーザフルエンスは1.2 J/cm², ターゲット表面での照射スポット径は3 mm, 照射パルス数は3で一定とし, ターゲットはパルス毎に交換した。LISW適用の10分後, 1時間後, 24時間後にそれぞれ皮膚組織を生検トレパンにより採取し, 5.3.1と同様に固定, 脱水, 包埋した後, 透過電子顕微鏡を用いて観察した。

5.3.2 結果

5.3.2.1 表皮細胞選択性の検証

移植片への EGFP 発現遺伝子プラスミドベクターの導入実験の結果を Fig. 5-10 に示す. 真皮側より LISW を適用したにもかかわらず, レーザターゲットから約 1.5 mm の距離にある表皮において遺伝子発現が得られた. また, Fig. 5-10 (c)に Fig. 5-10 (a)の一部を拡大した図を示す. 遺伝子の顕著な発現が, 表皮細胞のみならず毛包の細胞においてもみられた.

5.3.2.2 「外来遺伝子が加速され細胞膜を透過する」仮説の検証

Fig. 5-11 に各条件におけるルシフェラーゼ活性を示す. ここで時間は, LISW 適用後, プラスミド DNA を注入するまでの時間を表す. 通常の方法すなわちプラスミド DNA 注入後に LISW を適用した条件(LISW after injection)では, プラスミド DNA 注入のみの場合と比較して, ルシフェラーゼ活性に 2 桁近い増大がみられた. LISW 適用の 10 秒後にプラスミド DNA を注入した条件でも, LISW after injection と統計的有意差はみられず, 同程度の遺伝子発現が得られた. 驚いたことに, LISW 適用 1 時間後までは LISW after injection と統計的有意差がなく, 高い遺伝子発現レベルが維持された. LISW 適用の 12 時間後にプラスミド DNA を注入した条件においてルシフェラーゼ活性はようやく有意に減少し, 24 時間では, LISW を適用していない条件とほぼ同じ値であった.

5.3.2.3 LISW による細胞膜変形ないし変性の評価

LISW適用後(レーザフルエンス 1.2 J/cm², パルス数 3), 各時間において観察した繊維芽細胞の電子顕微鏡画像をFig. 5-12 に示す. LISW適用 10 分後では核の形態が変化し, クロマチンの凝縮が顕著であり, LISW適用の 1 時間後においても同様の傾向がみられた. LISW適用 24 時間後では, LISWを適用していない条件に近い形態の細胞が観察された. しかし, 今回の実験条件の範囲では, 細胞膜破壊など遺伝子の細胞膜透過に直接関与すると考えられる現象はみられなかった. またFig. 5-13 に, LISW適用後の基底細胞の電子顕微鏡画像を示す. 基底細胞においても, 本実験では細胞膜に顕著な変化はみられなかった.

5.3.3 考察

Figure 5-7 に示したように、皮内における音響波の減衰は周波数に大きく依存する。表皮と真皮の境界では音波が反射されるため[7]単純な比較はできないが、Ogura らによって報告された厚さ 30-50 μm の表皮のみで遺伝子の発現が観察されたことが[5]、音響波の減衰によると仮定すると、数百 MHz 以上の成分が遺伝子導入に関与していることになる。しかし、Fig. 5-10 に示したように、本節で述べた実験では、レーザーターゲットから約 1.5 mm の距離にあった表皮において遺伝子発現が得られた。伝搬距離 1.5 mm では、200 MHz では約 95%、500 MHz では 99%も減衰する(Fig. 5-7)。第 4 章では、皮膚断層像に基づいた遺伝子発現深さ分布を評価していないため遺伝子が導入される各周波数の振幅の閾値は明らかではないが、100 MHz 以下が遺伝子導入に寄与しているのではないかと考えられる。また、本実験において遺伝子の発現は表皮だけでなく、真皮層の毛包においても観察された(Fig. 5-10 (c))。毛包の細胞の大部分はケラチノサイトであるため、表皮と同様の細胞である。このことから、LISW による遺伝子の導入および発現に、表皮細胞選択性がある可能性がある。ただし、毛包を除く真皮ではコラーゲン等の細胞外マトリックスがその大部分を占めるため、繊維芽細胞等は点在しており細胞密度は低い。このことから、観察に十分な蛍光が得られず遺伝子発現が認められなかった可能性もある。

LISW 適用後にプラスミド DNA を注入した条件では、LISW 適用時に細胞周囲にプラスミド DNA が存在しない。従って、外来遺伝子の加速による細胞膜通過の仮説は、今回の実験条件の範囲では、*in vivo*における遺伝子導入においては支配的ではないと考えられる。また、LISW 適用の 1 時間後にプラスミド DNA を注入した条件においても、遺伝子注入後に LISW を適用した条件と同程度のルシフェラーゼ活性が得られたことから、少なくとも LISW 適用後 1 時間は細胞膜透過性の亢進が持続されているか、もしくは他の過程が働いていると考えられる。

電子顕微鏡を用いた観察では、表皮細胞、繊維芽細胞いずれも、細胞膜破壊

等の遺伝子の細胞膜透過に直接関係があると考えられる現象はみられなかった。この結果から、LISW による *in vivo* における遺伝子導入では、以下の二つの可能性が考えられる。

- (1) LISW 適用による細胞膜の変形ないし変性後、短時間にプラスミド DNA は細胞内に導入され、細胞膜は LISW 適用後 10 min 程度以内に修復する。
- (2) LISW は遺伝子の細胞膜透過には直接寄与しておらず、naked DNA 法と同様のメカニズムで導入された遺伝子の細胞内での翻訳、転写といったプロセスを促進する。

このうち(1)は、Fig. 5-11 に示したように LISW 適用 1 時間後にプラスミド DNA を注入しても高いルシフェラーゼ活性が得られたことから否定できる。(2)は、第 4 章で述べた実験結果と矛盾しない。第 4 章において、コントロールベクター注入後 LISW を適用したところ、HGF 発現遺伝子プラスミドベクターを注入していないにもかかわらず、血管新生の促進がみられた(Fig. 4-8)。すなわち、LISW 適用により組織の活性が高まった可能性がある。

以上から、*in vivo* と *in vitro* では LISW がもたらす影響が異なる、もしくは支配的な過程が異なると考えられる。*In vivo* では naked DNA 法(プラスミド DNA 注入のみ)においても、わずかではあるが遺伝子発現が得られる。LISW 適用により、遺伝子導入後の細胞内プロセスが促進され、タンパク質の生成が促進される可能性が考えられる。一方 *in vitro* では、第 3 章で述べたように LISW を適用していない細胞では遺伝子発現は全く得られなかった。すなわち LISW は細胞膜透過性の亢進に何らかの影響を与えていると考えられる。*In vitro* における LISW 適用の細胞内プロセスへの影響は、サイトカインの測定や LISW 適用後に導入遺伝子を接触させる実験により明らかにされるものと期待される。

5.4 おわりに

LISW が生体組織に与える影響について調べた。LISW が皮膚に与える影響について組織学的に調べたところ、レーザフルエンス 1.8 J/cm^2 以上では損傷が

みられ、この損傷は 20 MHz以上の周波数成分によるものであると推察された。一方、第 4 章で述べた移植片への遺伝子導入に用いたレーザ照射条件では、皮膚における損傷はほとんどみられなかった。

次に、LISW による *in vivo* における遺伝子導入のメカニズムの検討を目的とし、表皮細胞に選択的な遺伝子導入に関する検証、遺伝子注入と LISW 適用の順序を逆にした実験、および電子顕微鏡を用いた観察を行った。その結果、外来遺伝子の加速による細胞膜通過という仮説は、今回の実験条件の範囲では可能性が低いことが示唆された。新たな可能性として、LISW によって遺伝子導入後の細胞内プロセスが促進される仮説を提唱した。

参考文献 (第5章)

- [1] 岡田善雄, 高久史麿, 寺田雅昭, 豊島久眞男, 遺伝子治療開発研究ハンドブック(日本遺伝子治療学会編, 1999).
- [2] S. Babiuk, M. E. Baca-Estrada, M. Foldvari, L. Baizer, R. Stout, M. Storms, D. Rabussay, G. Widera, L. Babiuk, "Needle-free topical electroporation improves gene expression from plasmids administered in porcine skin," *Mol. Ther.* **8**, 992 (2003).
- [3] S. Watanabe, T. J. Flotte, D. J. McAuliffe, S. L. Jacques, "Putative photoacoustic damage in skin induced by pulsed ArF excimer laser," *J. Invest. Dermatol.* **90**, 761 (1988).
- [4] Y. Yashima, D. J. McAuliffe, S. L. Jaques, T. J. Flotte, "Laser-induced photoacoustic injury of skin: effect of inertial confinement," *Lasers Surg. Med.* **11**, 62 (1991).
- [5] M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saito, T. Ikeda, H. Ashida, and M. Obara, "*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves." *Lasers Surg Med.* **34**, 242 (2004).
- [6] Y. Satoh, Y. Kanda, M. Terakawa, M. Obara, K. Mizuno, Y. Watanabe, S. Endo, S. Sato, K. Takishima, "Targeted DNA transfection into the mouse central nerves system using a laser-induced stress wave," *J. Biomed. Opt.* **10**, 060501 (2005).
- [7] D. H. Turnbull, B. G. Starkoski, K. A. Harasiewicz, J. L. Semple, L. From, A. K. Gupta, D. N. Sauder, F. S. Foster, "A 40 – 100 MHz B-scan ultrasound backscatter microscope for skin imaging," *Ultrasound Med. Biol.* **21**, 79 (1995).

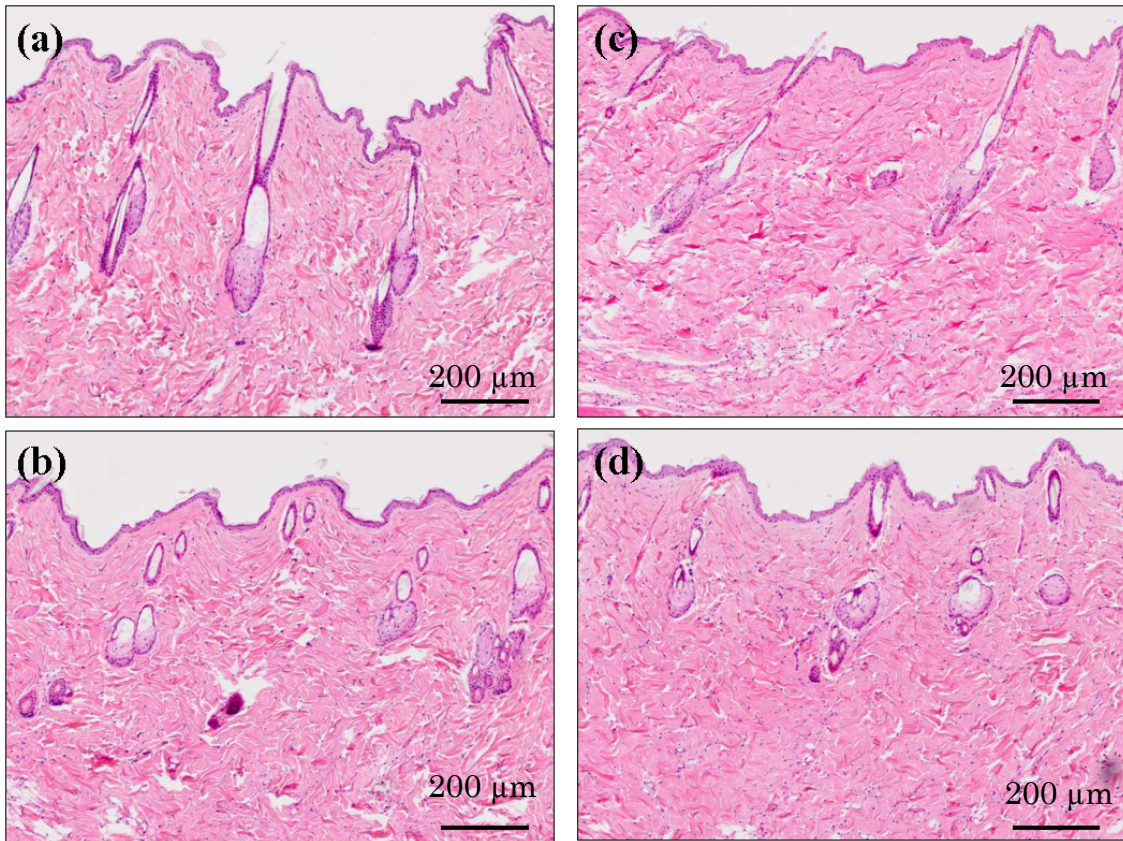


Fig. 5-1 Histological images of rat skins stained with hematoxylin and eosin. (a) No LISW was applied, (b) LISWs were applied at laser fluence of 1.2 J/cm², (c) LISWs were applied at laser fluence of 1.8 J/cm², (d) LISWs were applied at laser fluence of 2.4 J/cm². Scale bars indicate 200 μm.

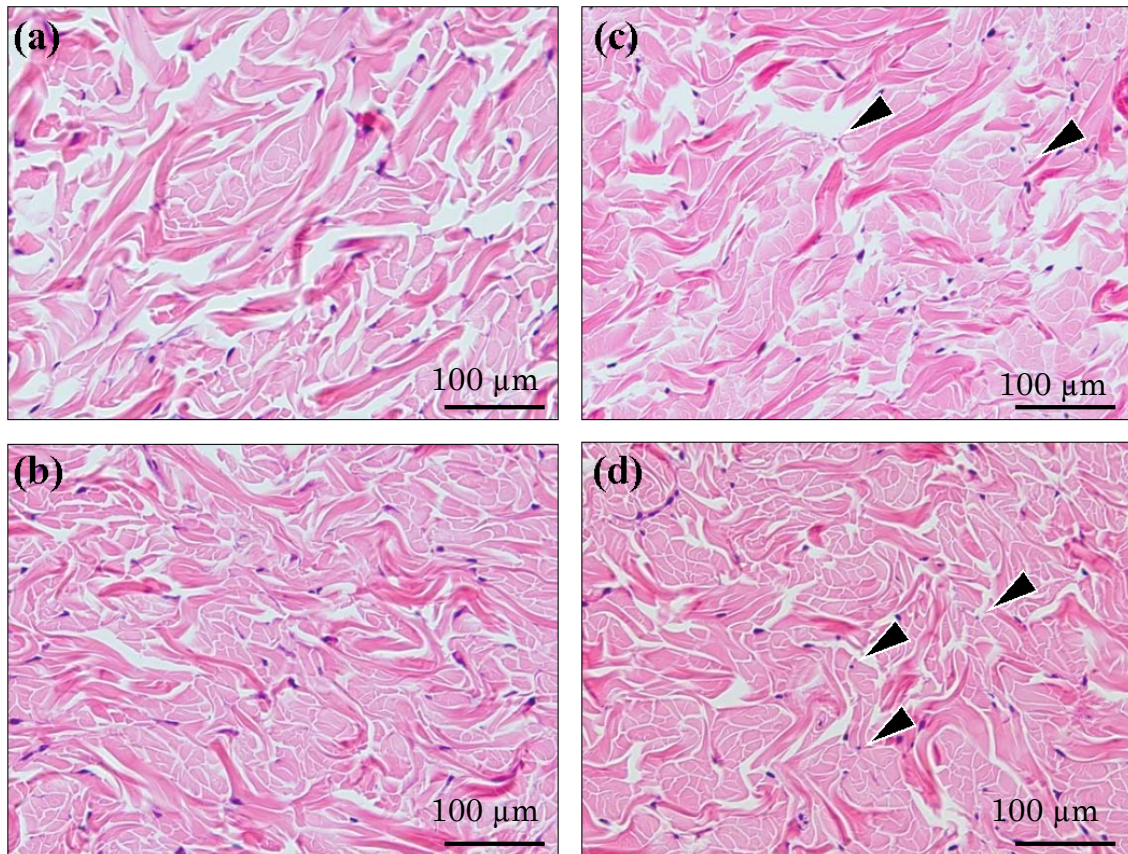


Fig. 5-2 Histological images of rat skins stained with hematoxylin and eosin at large magnification. (a) No LISW was applied, (b) LISWs were applied at laser fluence of 1.2 J/cm^2 , (c) LISWs were applied at laser fluence of 1.8 J/cm^2 , (d) LISWs were applied at laser fluence of 2.4 J/cm^2 . Scale bars indicate $100 \text{ }\mu\text{m}$.

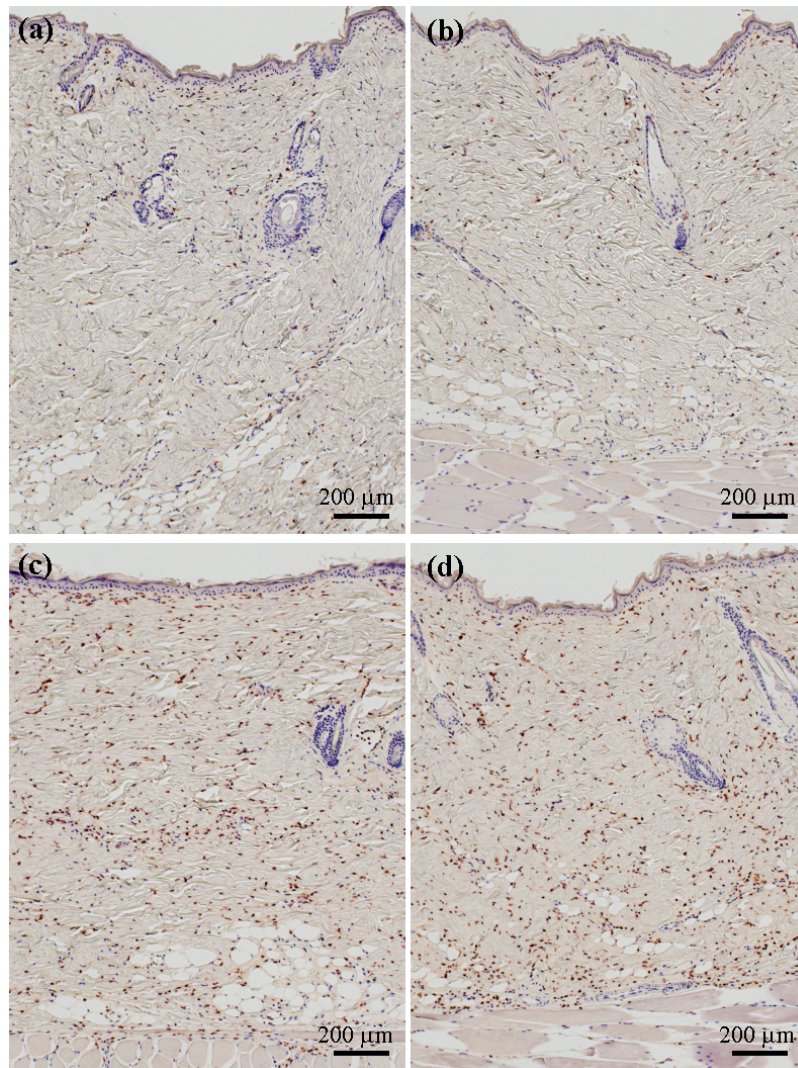


Fig. 5-3 Histological images of rat skins with immunohistochemical staining using anti-rat CD68. (a) No LISW was applied, (b) LISWs were applied at laser fluence of 1.2 J/cm², (c) LISWs were applied at laser fluence of 1.8 J/cm², (d) LISWs were applied at laser fluence of 2.4 J/cm². Scale bars indicate 200 μm.

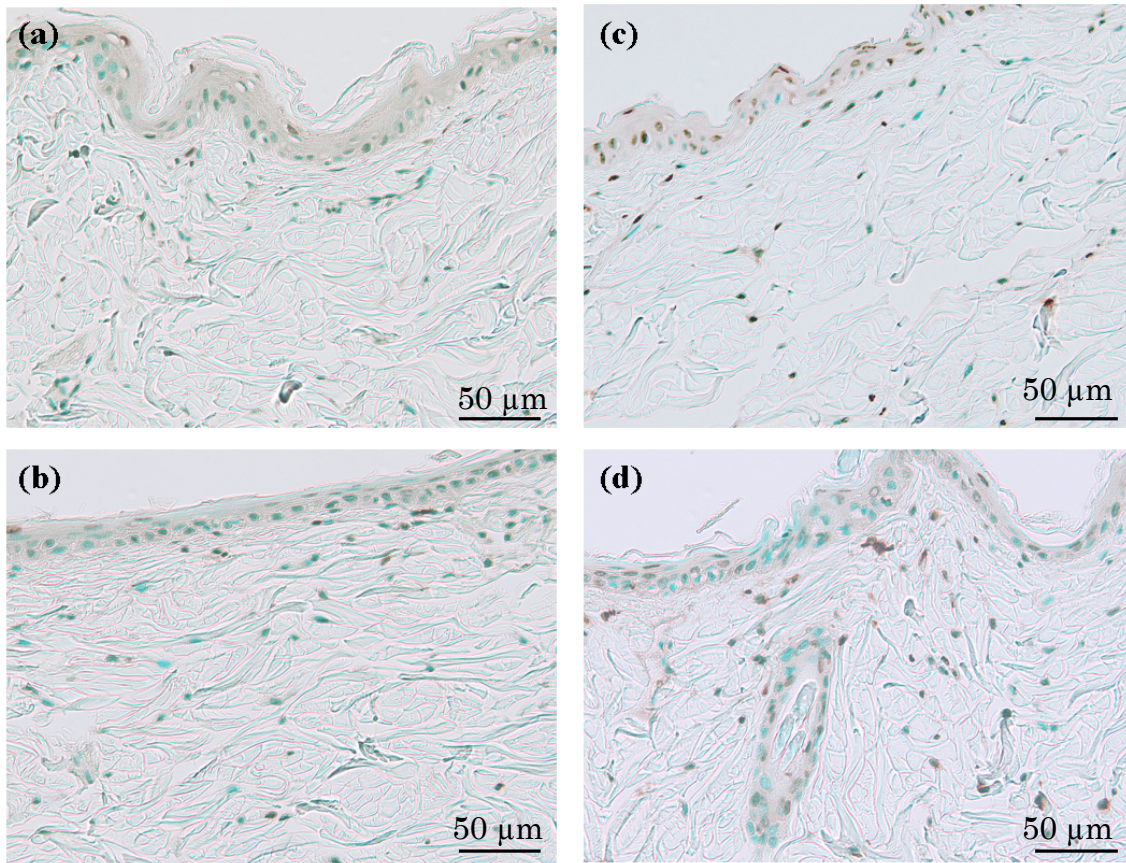


Fig. 5-4 Histological images of rat skins stained with TUNEL. (a) No LISW was applied, (b) LISWs were applied at laser fluence of 1.2 J/cm^2 , (c) LISWs were applied at laser fluence of 1.8 J/cm^2 , (d) LISWs were applied at laser fluence of 2.4 J/cm^2 . Scale bars indicate $50 \mu\text{m}$.

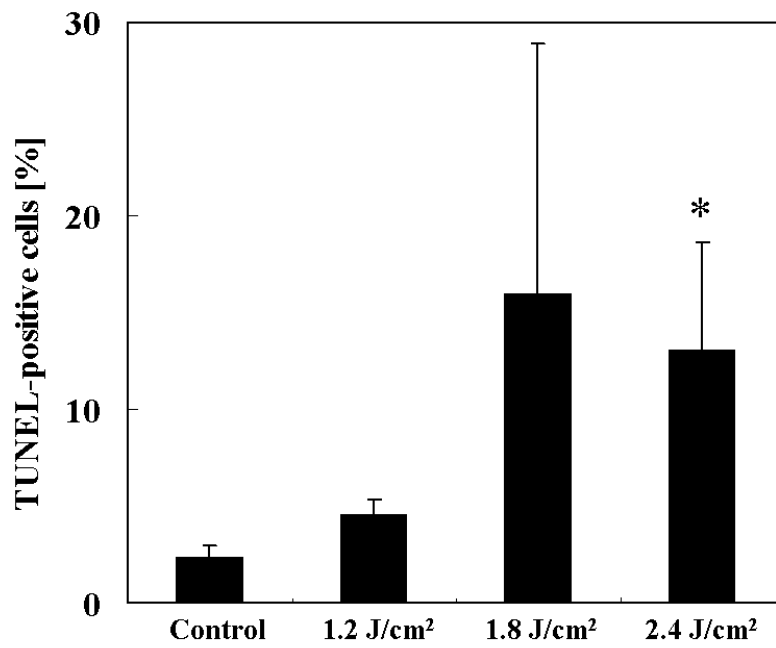


Fig. 5-5 Percentage of TUNEL-positive keratinocytes under four different conditions. $n = 5$. (* $p < 0.05$)

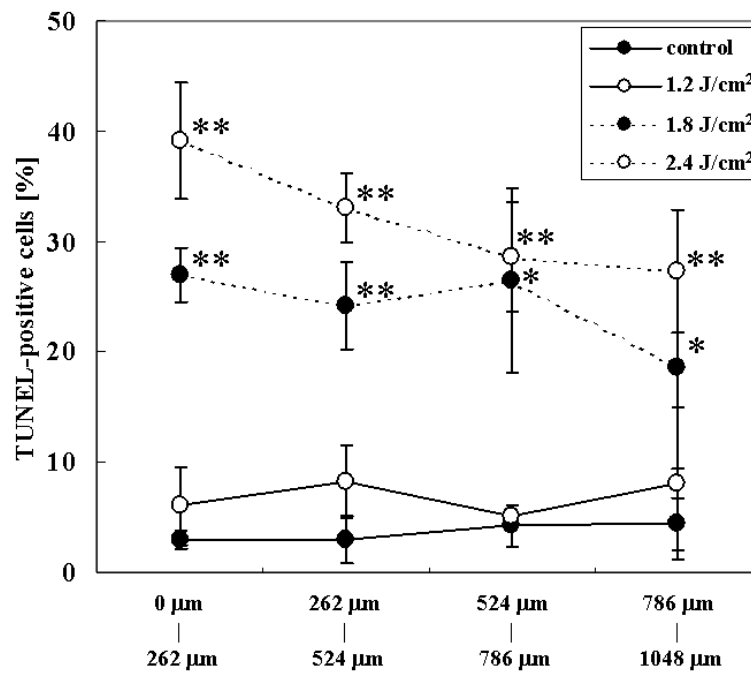


Fig. 5-6 Depth dependence of TUNEL-positive fibroblasts in rat skins. n = 5.
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

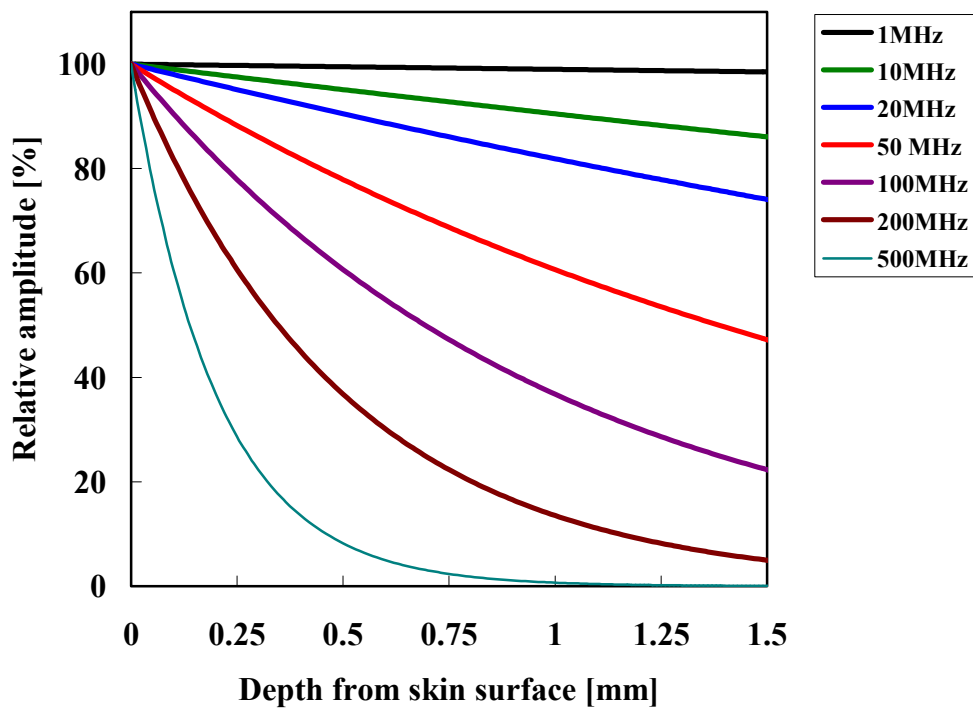


Fig. 5-7 Relative amplitude of stress waves as a function of skin depth at the different frequencies.

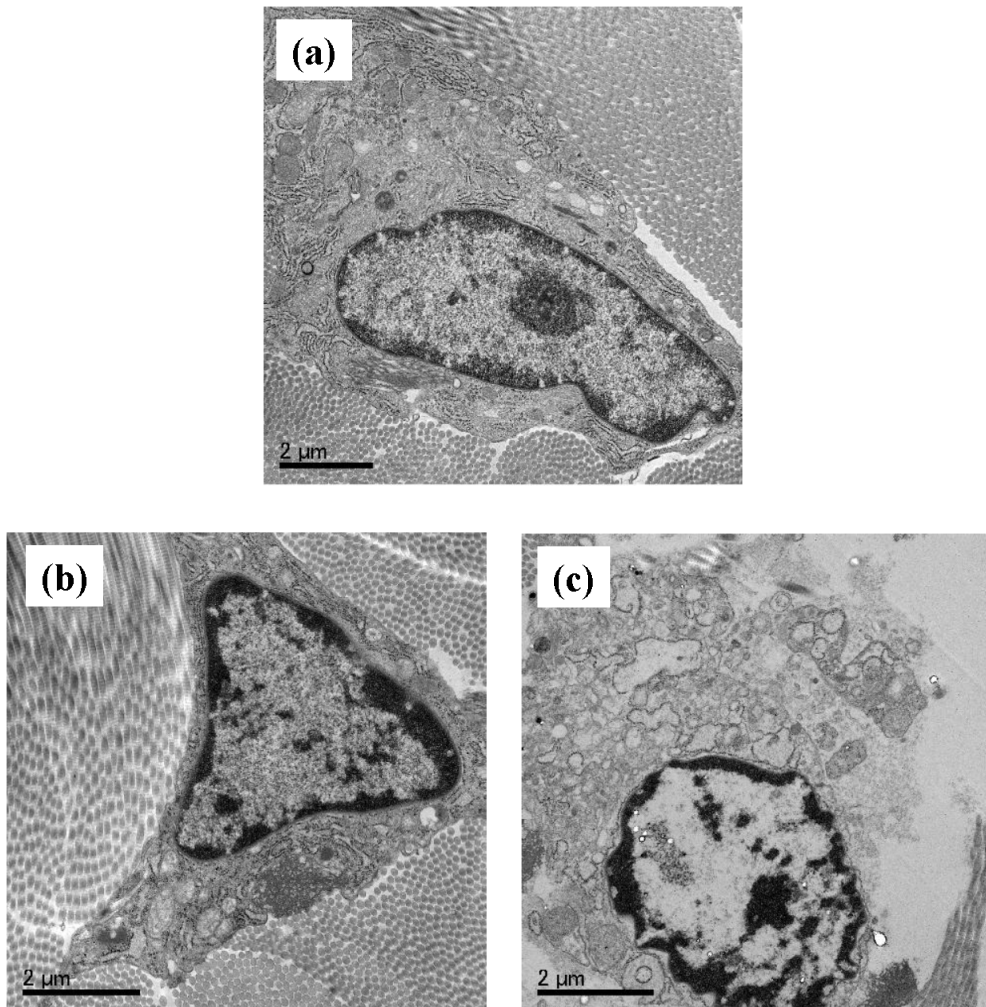


Fig. 5-8 Transmission electron microscope images of fibroblasts in rat skins. (a) No LISW was applied, (b) LISWs were applied at laser fluence of 1.2 J/cm², (c) LISWs were applied at laser fluence of 2.4 J/cm²

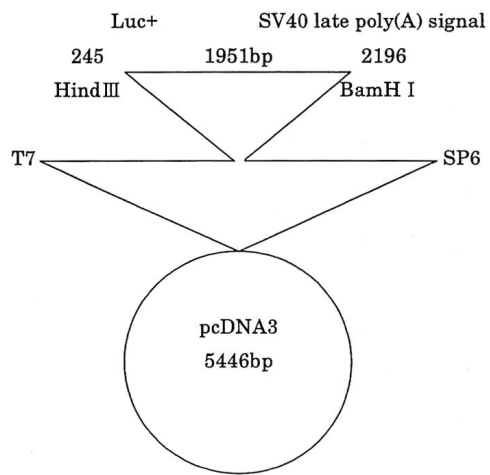


Fig. 5-9 Plasmid DNA coding Luciferase.

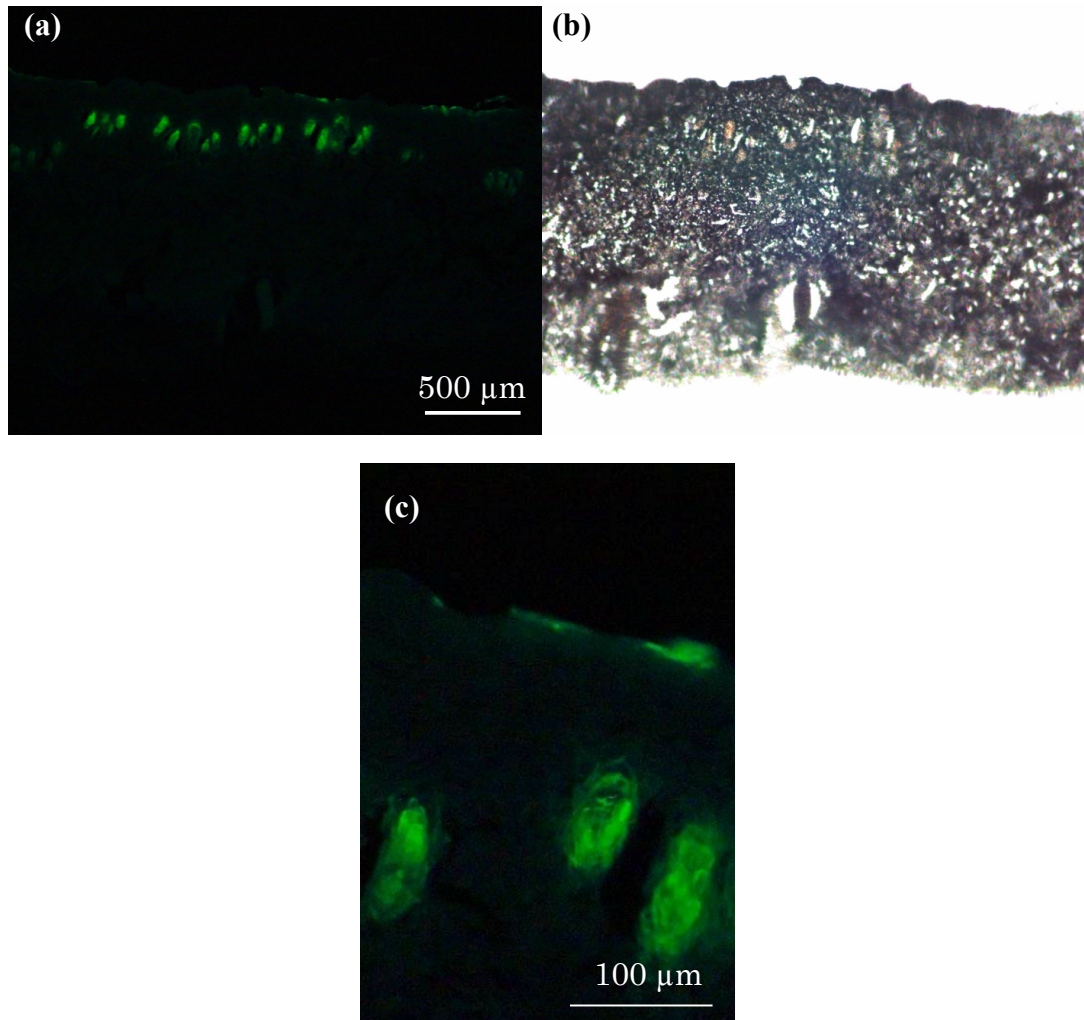


Fig. 5-10 Cross-sectional images of rat skin graft 24 hours after gene transfection. (a) Fluorescence image of skin graft in which shows EGFP expression. Scale bar indicates 500 μm . (b) White-light photograph corresponding to the (a). (c) Magnified image of (a).

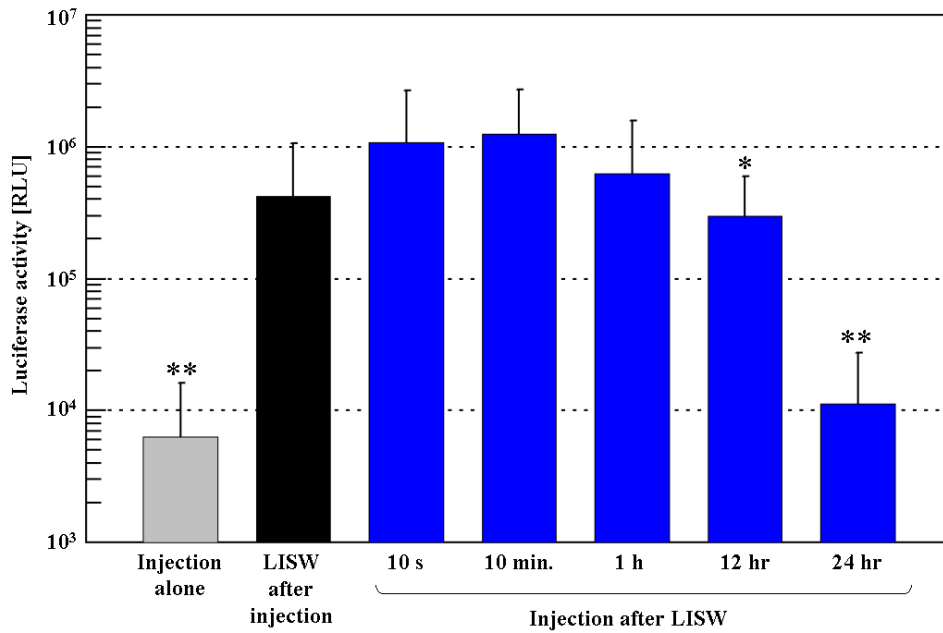


Fig. 5-11 Comparison of luciferase gene expression. Blue bars indicate the condition that gene injection was performed after LISW application. The times listed under the bars indicate the time between application of LISW and gene-injection. $n = 10$. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

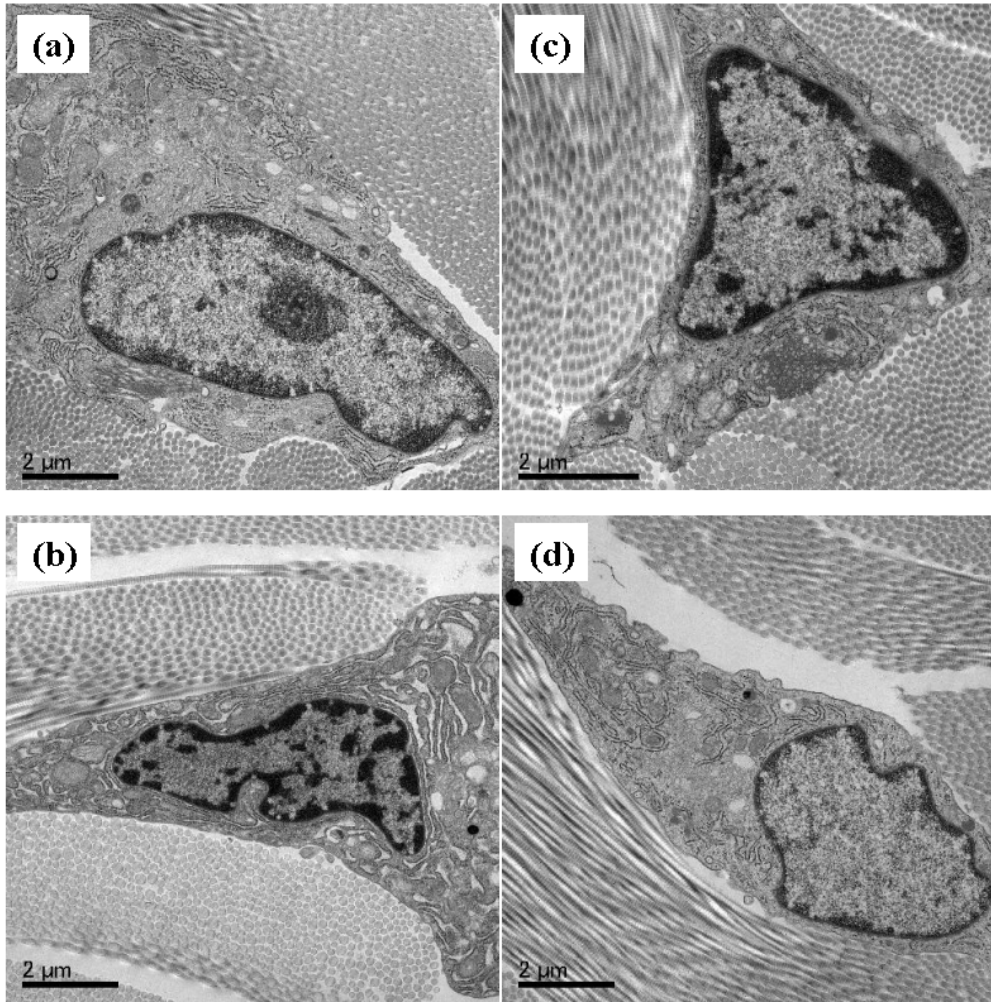


Fig. 5-12 Transmission electron microscope images of fibroblasts in rat skins. (a) No LISW was applied. (b) 10 min. after application of LISW, (c) 1 h after application of LISW, (d) 24 h after application of LISW.

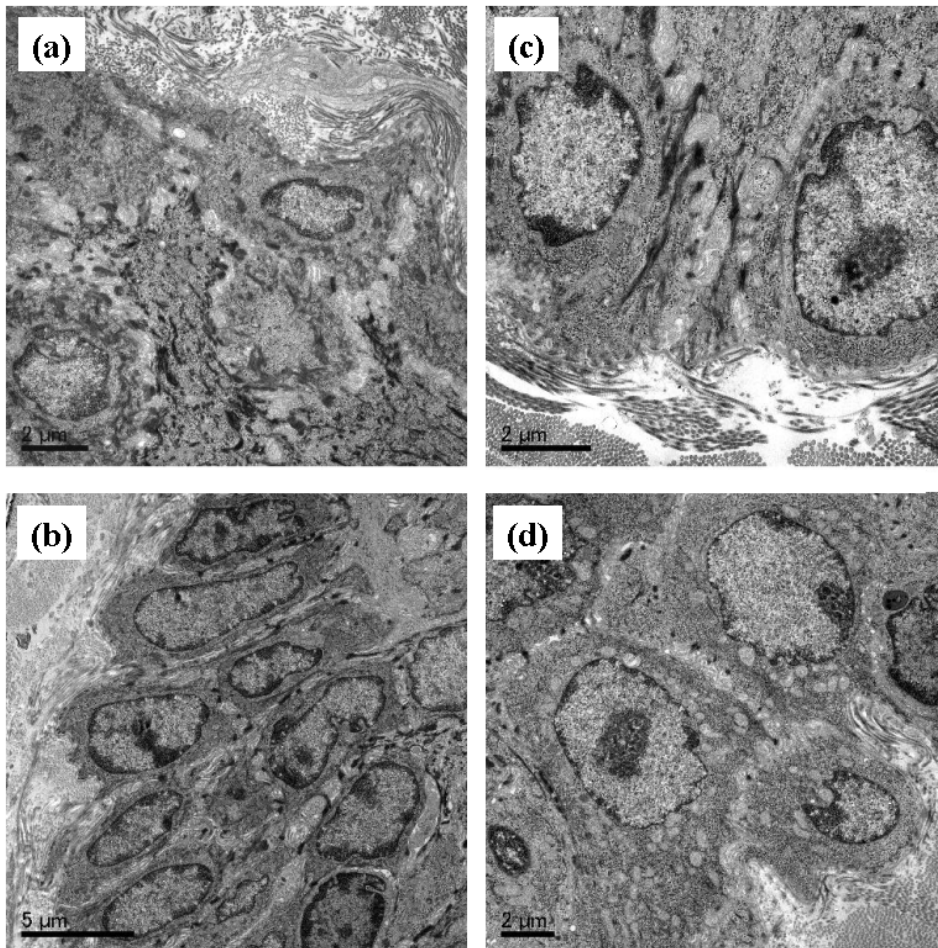


Fig. 5-13 Transmission electron microscope images of keratinocytes in rat skins. (a) No LISW was applied. (b) 10 min. after application of LISW, (c) 1 h after application of LISW, (d) 24 h after application of LISW.

第 6 章

結論

6.1 はじめに

1990年に米国でADA欠損症を対象に初めて遺伝子治療が行われ、以後、治療対象となる疾患は年々増加している。2007年現在までに1000を超える臨床試験が承認されているが、現在までに実施された多くの遺伝子治療は期待ほどの成果を上げていない。その最も大きな要因の一つとして、遺伝子治療の根幹である遺伝子導入技術が確立していないことがあげられる。このため、ドラッグデリバリーシステム技術を利用し、標的細胞への遺伝子導入効率を高める試みが精力的に進められている。工学的手法により細胞、組織、および基質を望ましい状態へ構成、改変させる組織工学においても、遺伝子導入は重要な技術である。例えば、移植治療では、特定の遺伝子を導入することにより血管新生を増大させ、生着を促進させるといった方法が期待されている。

レーザを用いる遺伝子導入法は、空間制御性が高いことや経内視鏡的・経カテーテル的遺伝子治療への適合性が高いといった特徴を持つ。しかし、光の強散乱体である生体組織中ではレーザ光の減衰が大きいいため、レーザを組織に直接照射する方法は生体組織、特に組織深部への応用には適さない。一方、固体材料へのパルスレーザ光照射によって発生する応力波を用いた遺伝子導入法は、深部組織への適用が可能ばかりでなく、単位時間あたりに処理できる面積が大きいといった利点を備えている。本研究は、このLISWを用いた遺伝子導入技術を組織工学に応用することを目的として行われた。

これまで、LISWを用いて遺伝子導入が実証された対象はラット皮膚の表皮およびマウス脳、導入遺伝子としてはレポーター遺伝子のみ限定されていた。そこで本研究では、まずLISWの特性と細胞への影響について詳細に調べ、次に、各種細胞種への遺伝子導入が可能であることを実証した。さらに、遺伝子導入の組織工学的応用として、移植皮膚の生着促進を目的とした肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクターの導入を行い、導入を行った移植片を用いた移植では、血管新生が有意に促進されることを実証した。

以下に、本研究で得られた成果について章毎にまとめ、最後に総括する。

6.2 レーザ誘起応力波の物理および特性の計測 (第2章)

第2章では、まず LISW の発生機構について述べた。また、プラズマを伴う応力波発生は、プラズマを透明材料により閉じこめることでピーク圧力が高く、パルス幅が長い、すなわちインパルス(圧力の時間積分値)の大きい LISW を発生できることを説明した。これまで、LISW の特性と遺伝子導入効率の関係に関する報告例がないため、培養細胞への遺伝子導入実験の前段階として、発生させた LISW の特性について調べた。Q スイッチ Nd:YAG レーザの第2高調波(波長 532 nm, パルス幅 6 ns)を光学的に透明なポリエチレンテレフタラートを接着した黒色ゴムに照射することにより発生した LISW を、メンブレン型ハイドロフォンを用いて計測した。時間特性、圧力、インパルス、周波数を計測したところ、レーザフルエンスの上昇に伴い、正のピーク圧力、圧力上昇速度、インパルスが増大した。また、レーザターゲットと照射対象の間にガラスシートを挟んで同様の計測を試みたところ、約 4 MHz 以上の高周波数成分が減衰することがわかった。

6.3 レーザ誘起応力波による培養細胞への遺伝子導入 (第3章)

LISWの特性と遺伝子導入効率の関係を詳細に調べることを目的とし、培養細胞を用いた*in vitro*遺伝子導入実験を行った。NIH 3T3 細胞を対象にEGFPをコードしたプラスミドDNAを導入可能であることを示し、得られた導入効率と LISW特性の関係を調べたところ、37°Cではレーザフルエンス 1.3 J/cm², パルス数 40 において最も高い導入効率を得られた。また、LISW適用時の温度が遺伝子導入効率に与える影響を調べたところ、導入効率は 43°Cから 45°Cにおいて急激に上昇することがわかった。この原因として、細胞膜の相転移が影響していると推察された。さらに、各種細胞種を用いた遺伝子導入実験から、LISWを用いた遺伝子導入実験が多くの種類の細胞へ応用可能であることを示した。また、遺伝子導入効率に与えるLISW適用時の加温効果は、細胞種により異なることがわかった。これらの実験から、*in vitro*における遺伝子導入のメカニズムと

して、加速されたプラスミドDNAの細胞膜の透過、またはせん断応力により生じる膜破壊、もしくはそれらの複合的な作用が推察された。

6.4 レーザ誘起応力波を用いた肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクター導入による移植皮膚内の血管新生促進 (第4章)

第一段階として、LISWを用いてラット皮膚(非移植皮膚)へHGF発現遺伝子ベクターを導入した。皮内において発現したHGF濃度を測定したところ、レーザーフルエンス 1.2 J/cm^2 、パルス数3、DNA注入量 $10 \mu\text{l}$ の条件において安定して高い値が得られた。第二段階として、ラットから採取した皮膚移植片にHGF発現遺伝子ベクターを導入して自家皮膚移植を行い、移植後の新生血管生成について組織学的に評価した。その結果、前記第一段階の実験で得られた最適条件において、皮膚深さ 0.7 mm から 1.5 mm にわたって高密度の血管新生が観察された。移植片の生着は血管により供給される酸素及び各種栄養素に大きく影響を受けるため、本方法は移植皮膚の生着を促進させるための有用であると考えられる。また、LISWを用いた遺伝子導入法は他の組織・細胞へも応用可能であるため、各種移植治療や再生医療等において、組織工学の新しい技術として活用が期待される。

6.5 レーザ誘起応力波と生体との相互作用 (第5章)

LISWが生体組織に与える影響について述べた。LISWが皮膚組織に与える影響についてHE染色、TUNEL染色標本の光学顕微鏡観察、および透過型電子顕微鏡観察により調べたところ、移植皮膚への遺伝子導入に用いたレーザーフルエンス 1.2 J/cm^2 では組織損傷はみられなかったが、レーザーフルエンス 1.8 J/cm^2 以上では核の破砕やTUNEL陽性細胞の増加がみられた。この損傷はLISWの 20 MHz 以上の周波数成分によるものであると推察された。次に、*in vivo*における遺伝子導入のメカニズムの検討を目的とし、表皮細胞に選択的な遺伝子導入に

関する検証，遺伝子注入とLISW適用の順序を逆にした実験，電子顕微鏡を用いた観察を行った。その結果，外来遺伝子の加速による細胞膜通過の仮説は否定されるとともに，LISWによる膜破壊が支配的ではないことが示唆された。新たな可能性として，LISWによって転写，翻訳といったタンパク質生成に関連する細胞内プロセスが促進される仮説を提唱した。

6.6 総括

本研究は，LISW を用いた遺伝子導入技術を組織工学に応用することを目的として行われた。*In vitro* での実験において LISW と細胞の相互作用について調べ，各種の細胞へ遺伝子導入が可能であることを実証した。また，LISW を用いて HGF 発現遺伝子ベクターの導入を行った移植片を用いて移植を行なうことにより，血管新生が促進されることを示した。また，LISW と生体との相互作用について調べ，LISW により細胞内プロセスが促進される可能性を提唱した。

LISW を用いた遺伝子導入法は，空間制御性が高いことや経内視鏡的・経カテーテル的遺伝子治療への適合性が高いといった特徴に加え，深部組織への適用が可能であり，またスループットが高いといった利点を備えている。本研究により LISW を用いた遺伝子導入法の組織工学への応用の可能性を示したことは，工学および医療の発展に貢献するところが少なくないと考えられる。

6.7 展望

LISW と細胞ないし生体組織との相互作用の全容解明には，なお多くの研究を必要としている。生体と培養細胞では周囲の環境が大きく異なり，生体中では細胞は細胞外基質によって覆われているが *in vitro* ではその制限がなく，事実，本研究においても LISW 適用時にウェルからの剥離がみられた。従って，*in vivo* と *in vitro* で LISW 適用により生じる現象が大きく異なると考えられる。例えば *in vitro* においても，第 5 章で述べた LISW 適用後に遺伝子を注入するとい

う実験を行うことで両者の比較検討を行えば、メカニズム解明に有用であろう。また、LISW 単独適用においても血管新生の促進がみられたことから、LISW と生体組織との相互作用が解明されることで、“LISW therapy”が実現する可能性もある。

LISW 適用による生体安全性の評価については、今後コントロールベクター存在下での実験を行うことによって詳細な評価が行えると考えられる。プラスミド注入により音響インピーダンスが変化することが予測され、LISW が生体へ与える影響が変化すると考えられる。また、プラスミドによる自然免疫応答の誘導についても今後の検討により詳細が明らかにされることが期待される。

培養細胞を対象とした実験において、悪性細胞と非悪性細胞への遺伝子導入効率が LISW 適用時の加温に対して異なる反応をみせたことから、温度制御により遺伝子導入の細胞選択性を得られる可能性もある。複数の細胞において導入効率の温度依存性を調べることで選択的遺伝子導入が可能となれば、がん治療へ応用できる可能性もある。

LISW を用いた遺伝子導入により、移植皮膚内における血管新生の促進を実証したが、今後は自家皮膚移植だけでなく同種異系移植や培養皮膚代替物への導入が期待される。LISW に基づく遺伝子導入法はレーザ光を走査させることにより大面積処理が行え、自動化も容易であることから、高性能移植皮膚の大量生産への応用が期待できる。また、LISW を用いた遺伝子導入法は様々な種類の細胞へ応用可能であることから、皮膚だけでなく、各種移植臓器の生着促進システムの確立や、再生医療における血管形成促進など広汎な応用が考えられる。

さらに、LISW を用いた遺伝子導入法は多くの種類の細胞へ応用可能であるため、動脈硬化や虚血心筋など、治療対象が拡大していくと期待される。今後、光ファイバと組み合わせた経内視鏡的・経カテーテル的遺伝子導入システムが開発されれば、応用範囲の拡大は一層加速されるであろう。

用語説明

アポトーシス：細胞膜や細胞小器官などが正常な形態を保ちながら，まず核内のクロマチンが凝集し，細胞全体が萎縮しつつ断片化する細胞死。

エンドソーム：細胞の貪食作用によって形成される小胞構造物。

ケラチノサイト：表皮細胞のうち，角質化能力を持つ細胞．表皮角化細胞。

コンピテント細胞：核酸を取り込む能力をもっている状態にある菌。

サイトカイン：免疫応答にかかわる細胞相互の關係に影響を与えるような情報の伝達を担うペプチドの総称。

成長因子(growth factor)：各種細胞の分裂や発達(分化)を促すポリペプチドの総称。

繊維芽細胞：結合組織の主たる構成細胞．結合組織中に散在性にみられる。

自家移植：一旦取り出された細胞，組織あるいは臓器が再び元の同一個体に移入される移植。

創傷：外傷，傷害，創，損傷。

創被覆：創傷を覆うこと。

超音波造影剤：数 μm 程度の径を持つマイクロバブルを封入した液体．気泡もしくは難溶性のフッ素系ガスがアルブミン等のシェルによりコーティングされている．超音波を用いた遺伝子導入ではこのマイクロバブルが核となり，より大きなバブルの発生を促す。

同種異系移植：取り出された細胞，組織あるいは臓器が同じ種の別個体に移入される移植。

熱傷：熱により生体の組織が損傷されたもの。

プラスミド：染色体 DNA 以外の細胞質 DNA に対して用いられる名称。

プロモーター：RNA ポリメラーゼが特異的に結合して転写をはじめる DNA 上の領域。

ライソソーム：加水分解酵素を持ち，消化作用を営む細胞小器官。

ルシフェラーゼ：ホタル，発光細菌などの生物発光を触媒する酵素の総称で，酸素添加酵素の一種。

レセプター：外来性の物質を認識し，これと特異的に結合することによって細

胞に応答を誘起する構造体.

レポーター遺伝子：導入されて発現すると染色性や蛍光ないし発光を生ずる遺伝子で、遺伝子導入の有無あるいはその発現の強さを調べるために用いられ、治療効果を持たない. 代表的なものにルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク(GFP)をコードした遺伝子があげられる.

ADA(Adenosine deaminase)欠損症：アデノシンデアミナーゼは代謝酵素の一つであり、アデノシンを脱アミノ化しイノシンに変換する. この酵素の欠損症は常染色体劣性遺伝と考えられ、患者は重症複合免疫不全症をきたす.

Green fluorescence protein, GFP：オワンクラゲやウミシイタケの発光器から発見された緑色の蛍光を発する蛍光タンパク質.

In vivo：生きている細胞あるいは生体内に置かれている状態を指す語. 生体内で.

In vitro：人工的な器具内で行われる生物学的反応に関して. 試験管内で. 培養細胞等を用いた研究にも用いられる.

Naked DNA 法：プラスミド DNA を直接生体に注入する遺伝子導入法.

RNA 干渉:ある遺伝子と同じ配列を持つ二本鎖 RNA が細胞内に存在するとき、その遺伝子の発現が抑制される現象.

siRNA：短い二本鎖 RNA. siRNA とは、哺乳類において遺伝子を不活性化するインターフェロン応答を誘発しない短い RNA であり、RNA 干渉を目的に用いられる.

謝辞

本研究は、平成 15 年度から慶應義塾大学大学院理工学研究科総合デザイン工学専攻スマートデバイス・システム工学専修小原研究室において、小原 實 教授の御指導のもとに行われたものである。本研究を行うにあたり多大なる御指導、御鞭撻を賜りました 小原 實 教授に心から深く感謝の意を表します。

本論文に対して多くの御指導と貴重な御助言を頂いた慶應義塾大学理工学部 荒井 恒憲 教授，同 木下 岳司 准教授，同 斎木 敏治 准教授，慶應義塾大学 医学部 岡野 栄之 教授に心から深く感謝申し上げます。

防衛医科大学校防衛医学研究センター情報システム研究部門 佐藤 俊一 准教授には、常日頃より研究に関する御指導のみならず研究に対する心構えや姿勢等、多くの貴重な御助言を頂戴し、感謝の念が絶えません。深く感謝申し上げます。また、共同研究の実施に御理解をくださいました同部門の芦田 廣 教授，コンピュータ環境の整備および細胞培養に関し大変お世話になった 脇坂 仁 助教に深く感謝いたします。同部門の 関根 志保 技官には、様々なご援助、御配慮を頂き感謝致しております。外傷・移植治療についてご教示頂きました防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門の 齋藤 大蔵 教授，ならびに病理学・組織学的評価についてご教示頂きました防衛医科大学校病態病理学講座の 津田 均 准教授には、医学および臨床応用の視点から多くの貴重な御助言を頂戴いたしました。厚く御礼申し上げます。防衛医科大学校医用工学講座の 石原 美弥 准教授，川内 聡子 助教には貴重なご助言と激励を頂戴いたしました。深く感謝申し上げます。防衛医科大学校共同利用研究施設の 市来 やよい 技官には、電子顕微鏡観察につき快く御協力頂き、また貴重な御助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。医師 長谷川 真 先生には、医師の視点から御助言を頂戴しました。厚く御礼申し上げます。

相澤 和也 君，山口 亨 君(現 株式会社島津製作所)，大塚 理沙 君，高野 慎太 君，平尾 彰浩 君をはじめ慶應義塾大学理工学部小原研究室の諸兄，諸氏には公私にわたって配慮を頂きました。また、互いに切磋琢磨して研究に励むことで成長する機会に恵まれました。厚く御礼申し上げます。高野 慎太 君には、本論文第 5 章で述べた実験を遂行するにあたり、常に快く御協力を頂き感謝致

しております。

本研究を遂行するにあたり研究費や研究生活を財政面で支えて頂いた独立行政法人日本学術振興会に感謝いたします。

最後に、後期博士課程に進むことに理解を示し、絶え間ない支援および協力を頂いた両親に深く感謝致します。

著者論文目録

1. 原著論文

1.1 本研究に関連する論文

1. M. Terakawa, M. Ogura, S. Sato, H. Wakisaka, H. Ashida, M. Uenoyama, Y. Masaki, M. Obara, “Gene transfer into mammalian cells by use of a nanosecond pulsed laser-induced stress wave,” *Optics Letters*, Vol. 29, No. 11, pp. 1227-1229 (2004).
2. M. Terakawa, S. Sato, H. Ashida, K. Aizawa, M. Uenoyama, Y. Masaki, M. Obara, “*In vitro* gene transfer to mammalian cells by the use of laser-induced stress waves: effects of stress wave parameters, ambient temperature, and cell type,” *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 11, No. 1, pp. 014026/1 – 7 (2006).
3. M. Terakawa, S. Sato, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, “Integrity of plasmid DNA after application of laser-induced stress waves used for gene transfection,” *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 45, No. 29, pp. L768-L769 (2006).
4. M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, “Enhanced angiogenesis in grafted skins by laser-induced stress wave-assisted gene transfer of hepatocyte growth factor,” *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 12, No. 3, pp. 034031/1-8 (2007).

1.2 その他の論文

1. M. Ogura, S. Sato, M. Terakawa, H. Wakisaka, M. Uenoyama, T. Ikeda, H. Ashida, M. Obara, “Delivery of photosensitizer to cells by the stress wave induced by a single nanosecond laser pulse,” *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 42, No. 8A, pp. L977-L979 (2003).
2. M. Terakawa, S. Sato, S. Kawauchi, H. Ashida, M. Obara, “Enhanced

photodynamic effect by the assistance of nanosecond pulsed laser-induced stress wave,” Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 43, No. 7A, pp. L877-L878 (2004).

3. Y. Satoh, Y. Kanda, M. Terakawa, M. Obara, K. Mizuno, Y. Watanabe, S. Endo, S. Sato, K. Takishima, “Targeted DNA transfection into the mouse central nerves system using a laser-induced stress wave,” Journal of Biomedical Optics, Vol. 10, No. 6, pp. 060501/1-3 (2005).

2. 総説論文

1. 佐藤俊一, 寺川光洋, 小原實, ”レーザー誘起応力波を用いた選択的遺伝子導入,” 応用物理, 第76巻, 第4号, pp. 405-409, 2007年.

3. 国際会議

1. M. Ogura, M. Terakawa, S. Sato, H. Ashida, M. Obara, “Photosensitizer delivery into tissue and cells by simultaneous application of laser-induced stress wave and heating.” SPIE Photonics West 2003 Biomedical Optics (BiOS 2003), San Jose, CA, USA (January, 2003).
2. M. Terakawa, S. Sato, M. Ogura, K. Nakanishi, Y. Masaki, M. Uenoyama, H. Wakisaka, H. Ashida, M. Obara, “*In vitro* gene transfer by the application of laser-induced stress wave: Effect of cellular heating.” SPIE Photonics West 2004 Biomedical Optics (BiOS 2004), San Jose, CA, USA (January, 2004).
3. M. Terakawa, S. Sato, M. Ogura, Y. Masaki, M. Uenoyama, H. Wakisaka, H. Ashida, M. Obara, “*In vitro* gene transfer by the use of laser-induced stress wave: Effect of laser irradiation conditions on transfection efficiency.” SPIE Photonics West 2005 Biomedical Optics (BiOS 2005), San Jose, CA, USA (January, 2005).
4. M. Terakawa, S. Sato, H. Ashida, M. Obara, “Gene transfer by the use of laser-induced stress wave: cell type dependence of transfection Efficiency,” European Conference on Biomedical Optics 2005 (ECBO 2005), Munich

Germany (June, 2005).

5. M. Ogura, S. Sato, M. Terakawa, H. Ashida, M. Obara, "Gene delivery to skin with laser-induced stress wave," Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO-PR) Tokyo, Japan (July, 2005).
6. M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, "Targeted gene transfer of human hepatocyte growth factor into rat skin by the use of laser-induced stress waves," SPIE Photonics West 2006 Biomedical Optics (BiOS 2006), San Jose, CA, USA (January, 2006).
7. M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, "Gene transfer of human Hepatocyte Growth Factor by the use of nanosecond pulsed laser-induced stress waves," SPIE High-Power Laser Ablation (HPLA 2006), Taos, NM, USA (May, 2006).
8. Y. Satoh, Y. Kanda, M. Terakawa, M. Obara, Y. Watanabe, S. Sato, K. Takishima, "Gene transfer into the mouse central nervous system using laser-induced stress waves," 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan (June, 2006).
9. M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, "Angiogenesis enhancement by laser-induced stress waves-assisted gene transfer of hepatocyte growth factor in grafted skins," IEEE Lasers & Electro-Optics Society Annual 2006 (LEOS 2006), Montreal, Quebec, Canada (October, 2006).
10. M. Terakawa, R. Otsuka, S. Sato, Y. Satoh, K. Takishima, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, "Improved transfection efficiency by the use of lipofectamine-modified plasmid DNA in laser-induced stress wave-assisted gene transfer: *In vitro* study," IEEE Lasers & Electro-Optics Society Annual 2006 (LEOS 2006), Montreal, Quebec, Canada (October, 2006).
11. M. Terakawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, H. Okano, M. Obara, "Enhanced angiogenesis in grafted skins by gene transfer of human hepatocyte growth factor using laser-induced stress waves," SPIE Photonics West 2007 Biomedical Optics (BiOS 2007), San Jose, CA, USA (January, 2007).
12. R. Otsuka, M. Terakawa, S. Sato, Y. Satoh, K. Takishima, H. Ashida, H. Okano,

M. Obara, "Laser-induced stress wave-assisted gene transfection: improved transfection efficiency with cationic liposome-modified plasmid DNA," SPIE Photonics West 2007 Biomedical Optics (BIOS 2007), San Jose, CA, USA (January, 2007).

4. 国内会議

1. 寺川光洋, 佐藤俊一, 小倉誠, 脇坂仁, 芦田廣, 小原實, "レーザー誘起音響波による細胞内の光感受性物質の濃度制御," 第13回日本光線力学学会, 東京, 2003年3月.
2. 寺川光洋, 佐藤俊一, 小倉誠, 眞崎義憲, 上野山真紀, 脇坂仁, 芦田廣, 小原實, "レーザー誘起音響波による遺伝子導入: *in vitro*実験," 第24回日本レーザー医学会総会, 岐阜, 2003年11月.
3. 寺川光洋, 佐藤俊一, 小倉誠, 眞崎義憲, 上野山真紀, 脇坂仁, 芦田廣, 小原實, "レーザー誘起音響波による培養細胞への遺伝子導入," 第4回レーザー学会東京支部研究会, P12, 埼玉, 2004年3月.
4. 寺川光洋, 佐藤俊一, 小倉誠, 眞崎義憲, 上野山真紀, 脇坂仁, 芦田廣, 小原實, "レーザー誘起音響波による培養細胞への遺伝子導入," 第20回日本DDS学会, 東京, 1-B-5, 2004年7月.
5. 寺川光洋, 佐藤俊一, 川内聡子, 芦田廣, 小原實, "レーザー誘起音響波による培養細胞への光感受性薬剤の輸送とPDT効果," 第20回日本DDS学会, 2-C-6, 東京, 2004年7月.
6. 寺川光洋, 佐藤俊一, 小倉誠, 眞崎義憲, 上野山真紀, 脇坂仁, 芦田廣, 小原實, "ナノ秒パルスレーザー誘起応力波による遺伝子導入: *in vitro*実験," 日本光学会年次学術講演会(Optics Japan 2004), 4pES10, 大阪, 2004年11月.
7. 寺川光洋, 佐藤俊一, 小倉誠, 芦田廣, 小原實, "レーザー誘起応力波による培養細胞への遺伝子導入: 各種細胞への適用性評価," 第5回レーザー学会東京支部研究会, P1, 神奈川, 2005年3月.
8. 寺川光洋, 佐藤俊一, 齋藤大蔵, 芦田廣, 岡野栄之, 小原實, "ナノ秒パ

- ルスレーザー誘起応力波によるラット皮膚へのHGF発現遺伝子ベクターの導入,” 日本光学会年次学術講演会(Optics Japan 2005), 23aE1, 東京, 2005年11月.
9. 諫田泰成, 寺川光洋, 佐藤俊一, 小原實, 渡辺康祐, 佐藤泰司, 瀧嶋邦夫, ”レーザー誘起応力波による中枢神経系への遺伝子導入技術の開発,” 第28回日本分子生物学会年会, 3P-1132, 福岡, 2005年12月.
 10. 寺川光洋, 佐藤俊一, 齋藤大蔵, 芦田廣, 岡野栄之, 小原實, “レーザー誘起応力波を用いた肝細胞増殖因子(HGF)発現遺伝子ベクターの導入,” レーザー学会学術講演会第26回年次大会, 10pXI-5, 埼玉, 2006年2月.
 11. 佐藤泰司, 諫田泰成, 寺川光洋, 小原實, 渡辺康祐, 佐藤俊一, 瀧嶋邦夫, ”レーザー誘起応力波による中枢神経系への遺伝子導入技術の開発,” 第126年回日本薬学会, 仙台, 2006年3月.
 12. 諫田泰成, 佐藤泰司, 寺川光洋, 佐藤俊一, 小原實, 瀧嶋邦夫, 渡辺康祐, ”レーザー誘起応力波を用いた中枢神経系への遺伝子導入技術,” 第79回日本薬理学会年会, 横浜, 2006年3月.
 13. 大塚理沙, 寺川光洋, 佐藤俊一, 佐藤泰司, 瀧嶋邦夫, 芦田廣, 小原實, ”レーザー誘起応力波を用いた遺伝子導入におけるカチオン性脂質によるプラスミドDNA化学修飾の効果,” 第22回日本DDS学会, 2-C-3, 東京, 2006年7月.
 14. 佐藤俊一, 寺川光洋, 小原實, ”レーザー誘起応力波による選択的遺伝子導入技術の開発,” 第67回応用物理学会学術講演会, 滋賀, 2006年8月.
 15. 寺川光洋, 佐藤俊一, 齋藤大蔵, 芦田廣, 岡野栄之, 小原實, ”レーザー誘起応力波を用いた肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクター導入による移植皮膚内の血管新生促進,” 第5回日本組織移植学会, 演題9, 東京, 2006年8月.
 16. 大塚理沙, 寺川光洋, 佐藤俊一, 佐藤泰司, 瀧嶋邦夫, 芦田廣, 岡野栄之, 小原實, レーザー誘起応力波を用いた遺伝子導入:カチオン性脂質併用による導入効率の高効率化,” 第27回日本レーザー医学会, O4-3, 千葉, 2006年11月.
 17. 佐藤俊一, 寺川光洋, 小原實, ”レーザー誘起応力波を用いた標的化遺伝

子導入技術の開発,” 日本光学会年次学術講演会(OPJ2006), 9pAS4, 東京, 2006年11月.

18. 寺川光洋, 佐藤俊一, 齋藤大蔵, 芦田廣, 岡野栄之, 小原實, ”レーザー誘起応力波を用いた肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクター導入による移植皮膚内の血管新生促進,” 日本光学会年次学術講演会(OPJ2006), 8pE5, 東京, 2006年11月.
19. 寺川光洋, 小原實, 佐藤俊一, ”レーザー誘起応力波を用いたスーパースキンの創出: 移植皮膚への肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクターの導入,” 電気学会研究会光・量子デバイス研究会, OQD-07-7, 大阪, 2007年2月.

5. 受賞

1. 寺川光洋, 慶應義塾大学, 平成19年3月, 藤原賞.
2. 寺川光洋, 佐藤俊一, 齋藤大蔵, 芦田廣, 岡野栄之, 小原實, ”レーザー誘起応力波を用いた肝細胞増殖因子発現遺伝子ベクター導入による移植皮膚内の血管新生促進,” 日本光学会年次学術講演会(OPJ2006), 東京, 平成18年11月, OPTICS JAPANベストプレゼンテーション賞.
3. 寺川光洋, 慶應義塾大学, 平成18年1月, 理工学研究科国際会議論文発表奨励賞.
4. 寺川光洋, 佐藤俊一, 小倉誠, 眞崎義憲, 上野山真紀, 脇坂仁, 芦田廣, 小原實, ”レーザー誘起音響波による培養細胞への遺伝子導入,” 第4回レーザー学会東京支部研究会, 埼玉, 平成16年3月. ポスター講演支部長賞.