

プラズマ遺伝子導入における電氣的要因と化学的要因のシナジー効果

Synergistic Effect of Electrical and Chemical Factors in Plasma Gene Transfection

愛大院理工¹, パール工業², ワイズ³

○神野 雅文¹, 池田 善久¹, 木戸 祐吾^{1,2}, 佐藤 晋^{1,3}

Ehime Univ.¹, Pearl Kogyo Co., Ltd.², Y's Corp.³

○Masafumi Jinno¹, Yoshihisa Ikeda¹, Yugo Kido^{1,2}, Susumu Satoh^{1,3}

E-mail: mjin@mayu.ee.ehime-u.ac.jp

1. 緒言 我々は、極細電極から生成されるマイクロプラズマ(MDP)を用いることで、低侵襲で高効率なプラズマ遺伝子導入法を確立し[1]、その機序解明に取り組んでいる[2,3]。導入機序にはプラズマの持つ電氣的的作用要因と化学的作用要因の両方が寄与していると考えている[3,4]。本研究ではこれらの作用要因を選択的に阻害し、導入効率の変化を比較することで各要因の導入効率への寄与率を評価した結果、両要因のシナジー効果が不可欠であることが判明したので報告する。

2. 実験方法 標的細胞には線維芽細胞 L-929 (RCB1422: RBRC) を用いた。細胞を培養した 96Well プレートに GFP 発現プラスミド DNA (pAcGFP1-N1: 3630 kDa)溶液を 6 μ l(1 μ g/ μ l)滴下し、プラズマを照射した。(1)MDP 照射時の導入率を標準とし、(2)MDP で N-acetylcysteine (NAC)により化学的要因のうち活性酸素種を除去、(3)レーザ生成プラズマ(LPP)照射により電氣的的要因を伴わない、(4)プラズマを照射せず活性酸素種として H₂O₂を直接 DNA 溶液に混入、の 3 条件で導入率を比較する。Nd:YAG レーザ(Quantra-Ray PRO 230: Spectra-Physics)の波長 532 nm をレンズで集光して LPP を生成した。

3. 実験結果および考察 各条件について、MDP の導入率で規格化した導入効率を表 1 に示す。NAC(100 mM)により ROS を阻害すると導入効率は 0 となったことから、RON なしでは電氣的的要因があっても遺伝子は導入されず、化学的要因(ROS)が必要であると言える。また、MDP とほぼ同量の H₂O₂、NO₂を生成する LPP では遺伝子は導入されないことから、電氣的的要因が必須であることが分かる。導入機構についてはエンドサイトーシスが支配的であることが明らかとなっており[3]、エンドサイトーシスの誘導には電氣的的要因と化学的要因のシナジー効果が必要であると考えられる。

4. 結論 プラズマによる遺伝子の導には、電氣的的要因と化学的要因のシナジー効果が必須であり、化学的要因については ROS の寄与が 100%であることが明らかとなった。

謝辞 本研究の一部は、JSPS 科学研究費補助金新学術領域研究 (25108509, 15H00896) の助成により行われた。

[1] M. Jinno et al., Jpn. J. Appl. Phys. 55, 07LG09 (2016)

[2] Y. Ikeda et al., Jpn. J. Appl. Phys. 55, 07LG06 (2016)

[3] M. Jinno et al., Arch. Biochem. Biophys. 605, 59 (2016)

[4] M Jinno et al., Plasma Sources Sci. Technol. 26, 065016 (2017)

Table 1: Active factors in the buffer solution and the normalized gene transfection efficiency of each method.

	MDP	MDP with NAC	LPP	H ₂ O ₂ [2]
Electrical factors	✓	✓	—	—
Chemical factors: ROS	✓	—	✓	✓
Chemical factors: Other Reactive Species	✓	✓	✓	—
Normalized Transfection efficiency	1.0	0	0	0