

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3585124号

(P3585124)

(45) 発行日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(24) 登録日 平成16年8月13日(2004.8.13)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A

C 1 2 N 15/02

C 1 2 N 15/00

B

請求項の数 10 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2002-565082 (P2002-565082)	(73) 特許権者	000005245
(86) (22) 出願日	平成14年2月8日(2002.2.8)		藤沢薬品工業株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/001062		大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号
(87) 国際公開番号	W02002/064767	(74) 代理人	100109542
(87) 国際公開日	平成14年8月22日(2002.8.22)		弁理士 田伏 英治
審査請求日	平成15年9月10日(2003.9.10)	(72) 発明者	三好 荘介
(31) 優先権主張番号	特願2001-33176 (P2001-33176)		大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢
(32) 優先日	平成13年2月9日(2001.2.9)		薬品工業株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	大久保 聡子
早期審査対象出願			大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢
			薬品工業株式会社内
		(72) 発明者	森川 記行
			大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢
			薬品工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 選定分子導入方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞に、選定分子を導入する方法であって、細胞および/または選定分子を低温ガスプラズマで処理することにより、細胞の近傍に存在する選定分子を細胞内に導入することからなる選定分子導入方法。

【請求項2】

細胞の近傍にあらかじめ選定分子を存在せしめた後、細胞を低温ガスプラズマで処理することからなる請求項1の選定分子導入方法。

【請求項3】

選定分子がポリヌクレオチドである請求項1または2の選定分子導入方法。

【請求項4】

細胞を低温ガスプラズマで処理することにより、細胞を融合する方法

【請求項5】

細胞および/または選定分子を標的に、低温ガスプラズマで処理することにより、細胞の近傍に存在する選定分子を細胞内に導入することを可能とする、または細胞を低温ガスプラズマで処理することにより、細胞を融合することを可能とする低温ガスプラズマ発生装置をもつ、細胞融合および/または選定分子導入のための装置。

【請求項6】

請求項5において、開放形の放電による低温ガスプラズマ発生装置をもつ、細胞融合および/または選定分子導入のための装置。

10

20

【請求項 7】

請求項 5 または 6 において、ヘッド部で放電させる電気系統とヘッド部にガスを供給させるガス系統を含む装置。

【請求項 8】

請求項 7 において、プラズマ照射条件を変化させることができる装置。

【請求項 9】

細胞が動物細胞である請求項 1 または 2 の選定分子導入方法。

【請求項 10】

細胞が動物細胞である請求項 3 の選定分子導入方法。

【発明の詳細な説明】

10

技術分野

本発明は、遺伝子等のポリヌクレオチドや蛋白質、生理活性分子等の選定分子を細胞内に導入する方法および細胞の融合方法またはこれらのための装置に関する。

背景技術

近年、医学、薬学等の分野において、遺伝子工学や医薬品開発を行う際に、遺伝子等のポリヌクレオチドや蛋白質、生理活性分子、薬剤候補品等の選定分子を細胞内に導入し、細胞内での遺伝子の機能や生理活性分子の生理的な活性を試験する必要性が増している。現在、選定分子導入法としてエレクトロポレーション法、ジーンガン法、リポソーム法、細胞融合法、ウイルスベクター法などの方法が用いられているが、必ずしも十分に選定分子を細胞内に導入できるものではなかった。

20

エレクトロポレーション法やジーンガン法においては、多くの細胞に応用できるが、操作が煩雑であり、HTS化することは難しく、また、リポソーム法は、応用できる細胞が限定されるといった問題点があった。更に、いずれの方法も高価であるため、仮にHTS化できたとしても、非常に高価なものとなる。また、多くの場合、導入効率においても満足できるものではなかった。

ヒトやマウスの遺伝子配列の解読がなされ、機能未知な遺伝子の機能解析が急務になっているなかで、HTS化された遺伝子導入方法の開発が必要不可欠である。HTS化においても、高効率であること、また様々な遺伝子の機能解析を可能にするには、特定の限られた細胞への遺伝子導入ではなく、様々な細胞への高効率な遺伝子導入法の開発が急務である。

本発明は、かかる従来の問題点を解決し、高効率に多種の細胞に選定分子を導入する方法および細胞の融合方法を提供することを目的とする。

30

発明の開示

本願発明者等は、細胞および/または選定分子を低温ガスプラズマで処理することにより、細胞の近傍に存在する選定分子を細胞内に導入することを見だし本発明を完成した。さらに、細胞を低温ガスプラズマで処理することにより、細胞は融合は起こすことを見出した。

すなわち、本発明は以下の示す通りである。

[1] 細胞に、選定分子を導入する方法があって、細胞および/または選定分子を低温ガスプラズマで処理することにより、細胞の近傍に存在する選定分子を細胞内に導入することからなる選定分子導入方法。

40

[2] 細胞の近傍にあらかじめ選定分子を存在せしめた後、細胞低温プラズマで処理することからなる [1] の選定分子導入方法。

[3] 選定分子がポリヌクレオチドである [1] または [2] の選定分子導入方法。

[4] 細胞をプラズマで処理することにより、細胞を融合する方法。

[5] 細胞および/または選定分子を標的に、低温ガスプラズマで処理することにより、細胞の近傍に存在する選定分子を細胞内に導入することを可能とする、または細胞をプラズマで処理することにより細胞を融合すを可能とするための装置。

[6] [5] において、開放形の放電による低温ガスプラズマ発生装置をもつ装置。

本発明における選定分子とは、目的の細胞に導入するために選定した分子をいう。このような選定分子とは、DNA、RNA等のポリヌクレオチドまたはその誘導体、シグナル伝

50

達蛋白質や転写調節因子等の蛋白質やその誘導体等の高分子化合物、低分子生理活性物質、薬剤候補品が含まれる。このような選定分子の中でも、ポリヌクレオチドおよびその誘導体が好ましい。

本発明における細胞とは、選定分子を導入する目的の細胞であり、特に限定されない。このような細胞の例としては、大腸菌、放線菌、枯草菌等の原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞等の真核細胞が挙げられる。また、赤血球ゴーストやリポソーム等の脂質二重膜構造をもつものも本発明で言う細胞に含まれる。

これらの細胞への選定分子の導入効率を上げるためには、遺伝子導入の際に一般的に用いられるコンピータント細胞の作成法に準じて作成した細胞を用いても良い。また、リポフェクタミン（ギブコBRL社製）等のカチオン性脂質やリポソームを用いたリポソーム法等の他の遺伝子導入法と組み合わせることにより、更に選定分子の細胞への導入効率を高めることができる。

10

本発明においては、使用される低温ガスプラズマ（低温非平衡プラズマ、低温弱電離プラズマ）は、例えばコロナ放電により発生させることができるが、発生装置のタイプや発生条件によりその性質を変えることができる。本発明を実施するために使用するプラズマは、用いる細胞や選定分子、操作を行う環境等によりそのガスの種類やプラズマ密度、電子温度、処理時間等は、適宜選択される。低温ガスプラズマに、使用するガスの種類としては、酸素、空気、二酸化炭素、窒素、アルゴンからなる群から選ばれた少なくとも1種であることが好ましい。

本発明において、使用される低温ガスプラズマの発生装置は、密閉型、開放型いずれの発生装置を用いても良いが、細胞の処理の容易性からは開放型の装置が望ましい。

20

本発明の装置の具体的な例としては、例えば図1で示されたタイプのものがある。本装置は、電気系統とガス系統から構成され、電気系統の信号発生器、リニアンプ、整合回路、昇圧トランスにより、電極間電圧、電極間距離、周波数、パルス周期、Dutyなどのパラメータを種々の条件に設定することができ、その条件下でヘッド部で放電させることにより種々のプラズマが発生する。一方ガス系統では、ガスボンベまたはエアポンプより供給された単一または混合ガスが、ニードル弁で適当な流量に設定されてヘッド部に供給される。ヘッド部で生成したプラズマはガスによって吹き出され、その先に設置した試料に照射される。細胞、生物種、あるいは選定分子（遺伝子、低分子、蛋白などを含む）など、試料ごとにその試料に適した条件でプラズマを照射できるようにするため、これらの条件を変化させ、プラズマとその照射の条件の設定を変化させることができる。

30

本発明の具体的な態様としては、例えばプレート等の細胞培養容器上で培養した培養接着細胞もしくは遠心またはろ過等の操作で採取した細胞の培養液を除いた後、細胞表面に選定分子を含む溶液を少量加える。その後、プラズマ発生機による発生したプラズマを利用してプラズマ処理をおこなう。プラズマの処理時間は、その条件により異なるが、概ね数秒から数十秒である。プラズマ処理後、培地を加えて培養する。選定分子が遺伝子等を含むベクターである場合は、遺伝子組み換え実験に、選定分子が例えば、細胞内標的分子に対する薬剤候補物質である場合は、そのスクリーニングが有効に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

第1図は、この発明にかかる遺伝子導入または細胞融合のための装置の模式図である。

40

第2図は、この発明にかかる遺伝子導入または細胞融合のための装置のプラズマ発生部（電極部）と試料の関係を表す模式図である。

第3図、第4図および第5図は、この発明の実施例で用いた遺伝子導入または細胞融合のための装置から、種々の条件で発生するプラズマを分光的に測定した結果を示した。測定は大塚電子製分光器MCPD-3000を用いて、プローブをプラズマより約3cm離れた位置に設置して、プラズマの分光スペクトルを取得した。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

実施例 1

50

第1図に従い、本発明の装置を作成した。本装置は、プラズマ照射機の条件として、電極間電圧数kV～十数kV、電極間距離10～15mm、周波数20～40kHz、パルス周期30～90Hz、Duty 25～100%、ガスとしては空気、窒素、酸素、二酸化炭素、アルゴン、ヘリウム：空気＝1：1などの条件でそれぞれ約1～5秒間照射した。電極から試料までの距離はおよそ1～3cmで適正な条件を選択した。

本装置により、例えば第3図から第5図に表示したような分光スペクトルを有するプラズマを発生させることができる。同プラズマ発生装置により遺伝子導入を実施した。

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞CHL細胞を直径60mmのcell culture plateにまき、37℃、二酸化炭素5%条件下で一晩培養した。培養細胞数は1wellあたり 1×10^6 個で培養を開始した。細胞がプレート上によくはりついていることを確認後、培養プレートから培地を除去して、細胞表面に110μlのGFP発現プラスミド液(1μg/μl)を加え、本願の装置で様々な条件でプラズマ照射を行なった。プラズマ照射後直ちに培地を加えて一晩培養し、蛍光顕微鏡を用いてGFP蛋白の発現を観察し、視野あたりの発現細胞数を定量化した。また、FACS Flow cytometryを用いてwell内全細胞あたりのGFP蛋白発現細胞を定量化した。その結果、いずれの条件においてもGFPの発現が観察された。導入効率としては顕微鏡による目視で最大約60%、FACSによる検討で約5～25%であった。

なお、同タイプの装置として、KEYENCE社よりプラズマ照射器ST-7000が市販されており、同装置により、第5図に表示したような分光スペクトルを有するプラズマを発生させることができ、本発明の目的にも使用可能である。

実施例2.

2-1) 接着性動物樹立細胞株への導入

動物樹立細胞を6-well plateにまき、37℃、二酸化炭素5%条件下で一晩培養した。培養細胞数は1wellあたり、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞CHL細胞の場合 1×10^6 個、ヒト子宮癌由来HeLa細胞の場合 2.5×10^5 個で培養を開始した。細胞がプレート上によくはりついていることを確認後、培養プレートから培地を除去して、細胞表面に50μlのGFP発現プラスミド(pEGFP-C1)液(1μg/μl)を加え、プラズマ発生装置によるプラズマ照射を行なった。プラズマ照射機の条件として、放電時電極間電圧10～14kV、電極間距離13mm、周波数23.3kHz、パルス周期60Hz、Duty 50%、ガス空気、ガス流量38L/minの条件でそれぞれ約3秒間照射した。電極から試料までの距離は適正な条件を選択した。プラズマ照射後直ちに培地を加えて一晩培養し、蛍光顕微鏡を用いてGFP蛋白の発現を観察し、視野あたりの発現細胞数を定量化した。また、FACS Flow cytometryを用いてwell内全細胞あたりのGFP蛋白発現細胞を定量化した。

その結果、いずれの細胞においてもGFPの発現が観察された。導入効率としては放電時電極間電圧10～14kV、電極間距離13mm、周波数20kHz、パルス周期60Hz、Duty 50%、ガス空気、ガス流量38L/minの条件において、顕微鏡による目視で最大約70%、FACSによる検討(シャーレ内全細胞数当たりの遺伝子導入効率)で約30%であった。HeLa細胞は既存法では導入効率が低いとされているが、本発明の方法により領域によっては約70%程度と高い導入効率を得ることが可能になった。

実施例3. 浮遊性動物樹立細胞株への導入

ヒト急性リンパ芽球性白血病末梢血由来T細胞株Jurkat細胞を 2.25×10^7 cells/mlリン酸バッファー懸濁液を調製し、その25μlに等量のGFP発現プラスミド溶液(2μg/μl)を混合後、その混合液を新しい6well plateに1wellあたり50μl入れた。Well底面に薄く広げたのちプラズマ発生装置によるプラズマ照射を行なった。本願の装置の条件は実施例1に準じて実施した。プラズマ照射後直ちに培地を加えて37℃、二酸化炭素5%の条件下で一晩培養後、蛍光顕微鏡を用いてGFP蛋白の発現を観察し、さらにFACS Flow cytometryを用いてwell内全細胞あたりのGFP蛋白発現細胞を定量化した。

その結果、蛍光顕微鏡を用いた観察によりGFP蛋白の発現が観察された。FACSを用いて検討した導入効率としては約25%であった。

実施例4. ラット大脳皮質細胞への導入

ラット大脳皮質は次のように調製した。すなわち、妊娠ラット(Wister, 17日目)を麻醉

10

20

30

40

50

後開腹して胎仔を子宮ごとL-15 (GIBCO-BRL) 中に取り出し、胎仔全脳中より大脳皮質部位を切り分けた。大脳皮質部に0.25%トリプシン溶液40mlと1% DNase溶液80 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベート後、上清を捨ててFBS 10mlを加え、ピペティングで細胞をばくした。これをセルストレイナーに通し、Neurobasal培地 (GIBCO BRL) を20ml程度加えて遠心により細胞を集めた。5 $\times 10^5$ cells/mlになるように培養開始用Neurobasal培地 (25 μ Mグルタミン酸、500 μ Mグルタミン、30nM NaSeO₃、ペニシリン・ストレプトマイシン含有) に懸濁し、37 $^{\circ}$ C、二酸化炭素5%条件下で6well plateを用いて培養を開始した。

細胞がプレート上によくはりついていることを確認後、培養プレートから培地を除去して、細胞表面に50 μ lのGFP発現プラスミド液 (1 μ g/ μ l) を加え、プラズマ発生装置によるプラズマ照射を行なった。プラズマ照射機の条件として、放電時電極間電圧10~14kV、電極間距離13mm、周波数23.3kHz、パルス周期60Hz、Duty 50%、ガス空気、ガス流量38L/minの条件でそれぞれ約1秒間照射した。プラズマ照射後直ちに培地を加えて一晚培養し、蛍光顕微鏡を用いてGFP蛋白の発現を観察した。

その結果、GFP蛋白発現細胞が観察された。導入効率は一視野当たり、最大で約70%であった。既存の遺伝子導入法ではほとんど遺伝子の導入が得られなかった動物初代培養細胞において、本発明の方法により安全、簡便かつ効率的な遺伝子導入が可能になった。

実施例5. ラット小脳顆粒細胞への導入

生後9日目のWisterラットをエーテル麻酔し脳を摘出後、小脳を切り出し髄膜を除去した。小脳を細断後、パパイン溶液 (DL-システイン (Sigma) 2mg, アルブミン50mgを溶かしたリン酸緩衝液10mlに、パパイン (Worthington-biochem) 90単位を混ぜて37 $^{\circ}$ Cで暫く放置して活性化後、DNase I (TaKaRa) を50 μ l加え、使用時にはフィルター濾過滅菌した) 10mlを加え、37 $^{\circ}$ Cで約30分間浸透した。ウマ血清 (HS) 6mlを添加し遠心して沈殿した組織に血清培地 (5% PFCS, 5% HS, 含有DME/F12(1/1)培地) に懸濁した。これを2.5 $\times 10^6$ cells/wellになるようにポリエチレンニコートした6well plateにまきつけ、37 $^{\circ}$ C、二酸化炭素5%条件下で一晩培養後、1 μ M AraC (Sigma) 含有血清入り高カリウム (26mM) 培地 (5% HS, 重炭酸カリウム/2.1g, 30nM Na₂SeO₄ in MEM(SIGMA)) に培地交換し、37 $^{\circ}$ C、二酸化炭素5%条件下で5日間培養した。

細胞がプレート上によくはりついていることを確認後、培養プレートから培地を除去して、細胞表面に50 μ lのGFP発現プラスミド液 (1 μ g/ μ l) を加え、プラズマ発生装置によるプラズマ照射を行なった。プラズマ照射機の条件として、放電時電極間電圧10~14kV、電極間距離13mm、周波数23.3kHz、パルス周期60Hz、Duty 50%、ガス空気、ガス流量38L/minの条件でそれぞれ約1秒間照射した。プラズマ照射後直ちに培地を加えて一晚培養し、蛍光顕微鏡を用いてGFP蛋白の発現を観察した。

その結果、GFP蛋白発現細胞が観察された。導入効率は一視野当たり、最大で約40%であった。既存の遺伝子導入法ではほとんど遺伝子の導入が得られなかった動物初代培養細胞において、本発明の方法により安全、簡便かつ効率的な遺伝子導入が可能になった。

実施例6. ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) への導入

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞Total Kit (東洋紡) を用いて細胞を培養した。

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を6-well plateに1wellあたり2.5 $\times 10^5$ まき、37 $^{\circ}$ C、二酸化炭素5%条件下で一晩培養した。細胞がプレート上によくはりついていることを確認後、培養プレートから培地を除去して、細胞表面に50 μ lのGFP発現プラスミド液 (1 μ g/ μ l) を加え、プラズマ発生装置によるプラズマ照射を行なった。プラズマ照射機の条件として、放電時電極間電圧10~14kV、電極間距離13mm、周波数23.3kHz、パルス周期60Hz、Duty 50%、ガス空気、ガス流量38L/minの条件でそれぞれ約1, 3秒間照射した。プラズマ照射後直ちに培地を加えて一晚培養し、蛍光顕微鏡を用いてGFP蛋白の発現を観察した。

その結果、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞においてもGFP遺伝子の導入が観察された。導入効率は一視野当たり、最大で約50%であった。既存の遺伝子導入法ではほとんど遺伝子の導入が得られなかった動物初代培養細胞において、本発明の方法により安全、簡便かつ効率的な遺伝子導入が可能になった。

10

20

30

40

50

実施例7. PC12細胞の交感神経系への分化誘導

本発明の方法により遺伝子を導入された細胞がその細胞としての機能を維持しているか否かを検討するために、PC12細胞について交感神経系への分化能が維持されているか否かについて検討した。

実施例1.に準じて本発明の方法によるGFP遺伝子を導入したPC12細胞の培養液に、100ng/mlになるようにNGFを添加して6日間培養を行なった後、蛍光顕微鏡にてGFP蛋白の発現が確認されているPC12細胞の形態を観察して、交感神経様細胞への分化能を検討した。

その結果、本発明の方法によりGFP遺伝子の導入されたPC12細胞は、NGF添加6日後においてもGFP蛋白を発現し、かつ細胞の形態観察から確かに神経突起の伸展が行われていることが認められた。このことにより、プラズマ照射による遺伝子導入法は、PC12細胞が本来持っているNGFに対する交感神経様細胞への分化能という性質を変えていないことが確認された。

10

実施例8. PC12細胞への遺伝子導入によるCREBの活性化(レポーター遺伝子アッセイ)

本発明の方法により導入された遺伝子が細胞内でその機能を発揮できるか否かについて検討するために、PC12細胞へ導入されたCREBが同じく導入されたPKA遺伝子により活性化されるか否かをレポーター遺伝子アッセイを用いて検討した。

ラットpheochromocytoma PC12細胞(ATCC No. CRL-1721)をコラーゲンIVでコートした6-well plateに1wellあたり 1×10^6 個まき、37℃, 二酸化炭素5%条件下で一晩培養した。細胞がプレートによくはりついていることを確認した後、培養プレートから培地を除去して細胞表面に、PKA遺伝子(pFC-PKA)($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)と活性化CREBの応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子が連結されているCREBレポーター遺伝子(pCRE-Luc)($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)および内部標準としてウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子(pRL-SV40)をそれぞれ $17 \mu\text{l}$ ずつ混合した混合液を用い、実施例2.に準じて本発明の方法によって共導入したPC12細胞の導入1日後におけるルシフェラーゼ活性を検討した。

20

その結果、コントロールベクターを導入した細胞と比較して、PKAを導入した細胞は、有意にルシフェラーゼ活性の上昇、すなわちCREBの転写活性の上昇が認められた。このことによりプラズマ照射による遺伝子導入法において、樹立培養細胞であるPC12細胞において、導入された遺伝子とその機能を発現することが確認された。

実施例9. ラット小脳顆粒細胞への遺伝子導入によるCREBの活性化(レポーター遺伝子アッセイ)

30

従来法では遺伝子の導入が困難な動物初代培養細胞においても、同様のことが確認されるか否かを検討するために、ラット小脳顆粒細胞を用いて実施例8.と同様に検討した。

実施例5.に準じて樹立したラット小脳顆粒細胞に、PKA遺伝子(pFC-PKA)($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)と活性化CREBの応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子が連結されているCREBレポーター遺伝子(pCRE-Luc)($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)および内部標準としてウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子(pRL-SV40)を実施例2.に準じた方法にてプラズマ発生装置を用いて共導入して培養1日後、ルシフェラーゼ活性について検討した。

その結果、ラット初代神経細胞のルシフェラーゼ活性はコントロール遺伝子を導入した細胞と比較して有意に上昇していた。従って、ラット初代神経細胞(ラット小脳顆粒細胞)においても、プラズマ導入法はPKAによるCREBシグナル伝達経路に異常を与えていないことが確認された。

40

このようにプラズマ照射による遺伝子導入法は、従来法では遺伝子導入が困難であった初代神経細胞を用いても遺伝子が導入されてその機能が発現し、またこれを用いて簡単にレポーター遺伝子アッセイを行なえることが明らかとなった。

実施例10. ラット小脳顆粒細胞へのBAD遺伝子導入によるアポトーシスの誘導

ラット小脳顆粒細胞を実施例5.に準じて調製し、AraC添加後5日目の細胞について、培地を抜き取った後、1well当たりアポトーシス誘導遺伝子であるBAD遺伝子(pcDNA3.1/GS-BAD)溶液($1 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$) $50 \mu\text{l}$ を添加して実施例2.の条件下でプラズマ照射を行なった。

その後直ちに培地を添加し、37℃, 二酸化炭素5%条件で一晩培養後、Caspase FITC-VAD-FMK in situ Marker(Promega)によりCaspase活性を測定することによりアポトーシスが

50

誘導されているか否かについて検討した。

その結果、ベクターのみを導入したMOCK細胞に比べ、BAD遺伝子導入細胞では有意にCaspase活性を有する、つまり、アポトーシス誘導細胞が検出された。

また本発明の方法によりBAD遺伝子を導入された細胞が確かにアポトーシスを誘導されていることを確認するために、APO-DIRECT (Pharmingen) を用いてDNA断片化も合わせて検討した。

その結果、ベクターのみを導入したMOCK細胞に比べ、BAD遺伝子導入細胞では有意にDNA断片化を起こしている細胞が検出された。

これらの結果、本発明の方法によって導入されたBAD遺伝子はラット小脳顆粒細胞に対し有意にアポトーシスを誘導し、その機能を発揮することが確認された。以上のことから本発明の方法により初代培養細胞に導入された遺伝子は細胞に対し確かにその機能を発揮することが確認された。

10

2)

実施例11. チャイニーズハムスター肺由来CHL細胞、ヒト子宮癌由来HeLa細胞、およびラットpheochromocytoma PC12細胞を用いた細胞融合の検討

実施例2. に準じてGFP遺伝子を導入したCHL細胞、およびHeLa細胞について、蛍光顕微鏡を用いて融合細胞の検出を行なった。またディフ・クイック (国際試薬) を用いて核を染色し、融合細胞の様子を顕微鏡にて観察した。核の染色は次のように行なった。すなわち、プラズマ処理して培養1日後の細胞について、細胞培養液を吸い取りリン酸緩衝液でシャーレに接着している細胞を洗浄後、1well当たりメタノール (和光) を約5ml加え、室温にて5分間固定した。その後染色液Iを1well当たり約2ml添加後すぐ吸い取り続いて染色液IIを約2ml添加後またすぐ吸い取った。イオン交換水で接着細胞を数回洗浄後顕微鏡にて細胞を観察した。

20

本発明の方法によりGFP遺伝子を導入されたCHL、およびHeLa細胞の中には、細胞が融合されて大きくなった細胞が観察された。またプラズマを照射されたそれぞれの細胞の核を染色したところ、細胞とともに核も融合しているもの、また細胞が融合して多核になっているものが観察された。

また、細胞数を6-well plateの1wellに 5×10^6 個とやや多めにまいた条件で、実施例1. に準じた方法でGFP遺伝子を導入したラットpheochromocytoma PC12細胞について、実施例7. に準じた方法でNGFを添加し分化能を検討した。

30

融合細胞についてもNGF添加6日後においてGFP蛋白を発現し、かつ確かに神経突起の伸展会が行われていることが認められた。このことにより、プラズマ照射により形成された融合細胞もPC12細胞が本来持っているNGFに対する交感神経様細胞への分化能という性質を変えていないことが示唆された。

実施例12. リポソーム法との組み合わせ

本発明の方法を利用することによりリポソーム法では導入されにくい条件における、細胞への遺伝子導入を可能にするか否かについて検討した。

リポソーム法は、リポソーム試薬と導入プラスミドとの混合により適切なサイズの混合粒子を作製し、細胞に取り込ませる方法である。そのため、細胞に取り込まれる適正なサイズ、数量の粒子を作製する必要がある。適正化された条件より濃い濃度のプラスミド、およびリポソーム試薬の条件において細胞への遺伝子導入効率が改善されるか否かをGFP遺伝子を用いて次のように検討した。

40

すなわち、予めGFP発現用プラスミド100 μ gとLipofectin2000 (GIBCO-BRL) 100 μ lを混合し、室温で15分間静置してプラスミド/Lipofectin conjugateを作製した。前日から6-well plateにて培養していたCHL細胞の培養上清を抜き取り、プラスミド/Lipofectin conjugateを200 μ l添加した。プラズマ照射機にて周波数23.3kHz、パルス周期60Hz、Duty 50%、ガス空気、ガス流量38L/minの条件でプラズマを照射後、直ちに培地を加えて37 $^{\circ}$ C、二酸化炭素5%条件下で培養した。1日培養後、蛍光顕微鏡、およびFACSを用いてGFP蛋白発現細胞を検出した。

この条件下においてもリポソーム法単独でわずかにGFPの導入された細胞が検出された。

50

本発明の方法を組み合わせたものは、リポソーム法単独に比べ、プラズマ照射領域において遺伝子導入細胞が増加していた。またwell中の総細胞数に対する遺伝子導入細胞の割合をFACSを用いて検討したところ、本発明の方法を組み合わせたものはリポソーム法単独の約1.6倍の導入効率の増加が見られた。従って、本発明の方法は他の遺伝子導入法と組み合わせることにより、また、リポソーム、またはそれに変わるようなプラスミドに細胞への移動を促す担体などを結合させることにより、これまで導入効率の悪かった条件下、および細胞において導入効率の改善が見込まれることが期待される。

実施例13. プラズマ照射器による培養細胞へのGFP発現プラスミドの導入を検討した。

方法：ラットpheochromocytoma PC12細胞(ATCC NO.CRL-1721)をコラーゲンIVでコートした6-well plateに1ウェルあたり 1×10^6 個まき、一夜培養を行った。細胞がプレート上によく張り付いていることを確認した後、培養プレートから培地を除去して、細胞表面に50ulのGFP発現プラスミド液(1ug/ul)を加え、プラズマ照射機ST-7000(株式会社キーエンス社製)によるプラズマ照射を行った。プラズマ照射機ST-7000の条件として、周波数はHigh、LowまたはMetalの3条件において、それぞれ約5秒間照射した。プラズマ照射後、直ちに培地を加えて一晚培養し、蛍光顕微鏡を用いてGFP蛋白の発現を観察した。

10

結果：いずれの条件においても、GFPの発現が確認された。

導入効率としては周波数がHighの条件において最も高く、50~60%であった

実施例14

ヌードマウス(8週齢、メス、日本チャールスリバー)を麻酔下で腹部一面に薄くEvans blue(10mg/ml生理食塩水溶液)を塗り付けた。プラズマ照射装置を用いて、放電時電極間電圧10~14kV、電極間距離13mm、周波数23.3kHz、パルス周期60Hz、Duty 50%、ガス空気、ガス流量38L/minの条件で2.5秒間照射した。電極から腹部までの距離は、遠い箇所では約24mm、近い箇所では約18mmであった。そのまま3分程度放置後、Evans blueを塗り付けた場所を水を含んだ脱脂綿、続いて70%エタノールを含んだ脱脂綿できれいに拭き取り、皮膚への色素の沈着を観察した。そして、プラズマのみを照射したもの、Evans blueを塗り付けてプラズマを照射しなかったものと、それぞれ比較した。

20

その結果、プラズマを照射しただけのマウス、Evans blueを塗り付けてプラズマを照射しなかったマウスはいずれも皮膚に色素の沈着は見られなかった。それに対し、Evans blueを塗り付けてプラズマを照射したものは、腹部のプラズマ照射領域に青色の斑点がいくつか観察された。また、約24時間後においてもその斑点は観察された。従って、プラズマによりEvans blueなみの分子量の物質は動物個体に導入されたと考えられる。

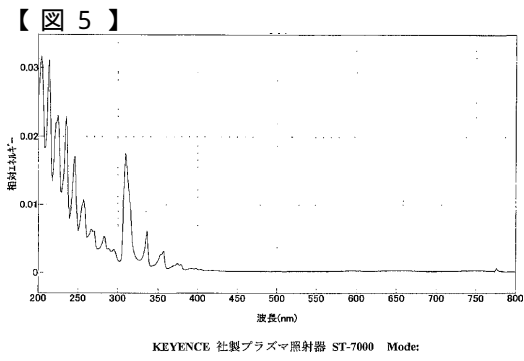
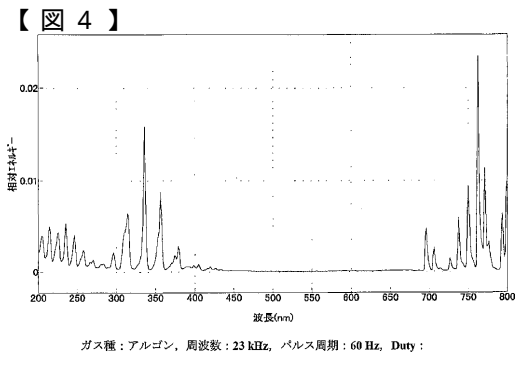
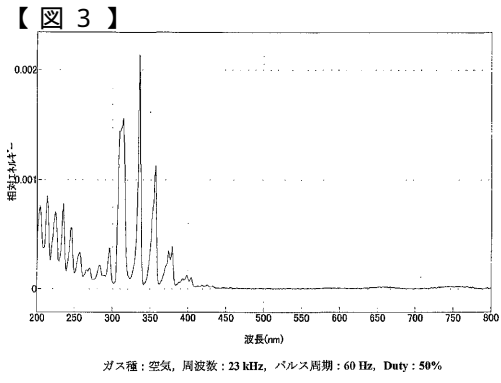
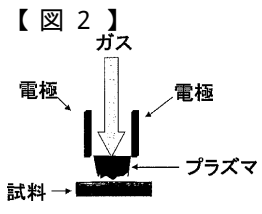
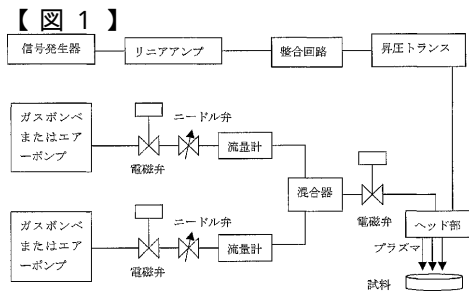
30

これまで、非温熱超音波により動物個体に経皮的に色素が導入されることが発表されている(立花克郎;福岡大医/2001年日本分子生物学会)が、プラズマ法でも同様に動物個体への物質の導入が可能であることが示唆される。

産業上の利用可能性

本発明により、多種多様な選定分子を多種多様な細胞に高効率に導入することができる。また細胞融合も行うことができる。さらに、エレクトロポレーションのように、1つ1つの試料に対し電極を用いて、電界をかける様な煩雑な操作の必要もなく、また遺伝子銃のような大がかりな装置も必要としない。

40



フロントページの続き

- (72)発明者 小川 恭弘
大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 西村 伸太郎
大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 深川 正夫
大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 荒川 弘之
大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 善光 純子
茨城県つくば市松代1-22-29
- (72)発明者 佐藤 晋
大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内

審査官 田村 明照

- (56)参考文献 特開平06-303963(JP,A)
特表平08-511680(JP,A)
特表平05-508316(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 15/00
C12M 1/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)
JICSTファイル(JOIS)