

3

エレクトロポレーション法による神経細胞への導入

1 子宮内胎仔脳への遺伝子導入

田畑秀典, 久保健一郎, 仲嶋一範

特徴

※エレクトロポレーションについては4-2-1も参照

<神経細胞への導入全般>

- ・短時間での実験が可能
- ・安全性が高い
- ・導入されるコピー数が多い
- ・部位/ステージごとに特異的な方法がある

<子宮内胎仔脳への導入に固有の特徴>

- ・方向性をもった導入が可能
- ・胎仔に与えるダメージが比較的強い
- ・個体ごとの導入率にばらつきが出やすい

エレクトロポレーションのなかでも神経細胞への導入は部位別に特徴があるため、①子宮内胎仔脳、②網膜、③成熟神経細胞、④分散した神経細胞、⑤脳スライスについてそれぞれとりあげる。本項で述べる子宮内エレクトロポレーション法は、子宮内で発生過程にある哺乳類胎仔の中枢神経系に、任意の遺伝子を発現させるための方法である¹⁾。本法では、注入するプラスミドの場所（側脳室、第3脳室、第4脳室など）と、電場の方向によって、脳内のさまざまな部位への遺伝子導入が可能である。本項では、大脳新皮質背外側領域、前頭前皮質、および海馬への遺伝子導入に関して解説する。

1 子宮内エレクトロポレーション法の原理

哺乳類の中枢神経系発生過程において、神経幹細胞は主に脳室周囲に存在し、神経細胞はここから直接、あるいは二次前駆細胞を介して間接的に産生され、それぞれ特有の場所へ移動し、配置される(図1)。子宮内エレクトロポレーションに際しては、まずプラスミドを子宮壁越しに脳室内へ注入し、次に子宮壁の外から電極を当てて、電気パルスを与える。これにより、注入したプラスミド溶液に接する細胞、つまり神経幹細胞を含む脳室帯細胞にプラスミドが取り込まれ、ここから移動する神経細胞にも外来性プラスミドが受け継がれる。このため、神経細胞の産生から移動、配置までのあらゆる発生段階での外来遺伝子の発現が可能である(図1)。

興味深いことに、CAGプロモーターを用いてGFPを発現させた場合、導入後、1カ月以上経過してもGFPの強い蛍光が認められ、神経細胞の成熟過程への影響も解析できる。同様の実験はウイルスベクターを用いた方法でも達成可能であるが、本法では発現プラスミドをつ

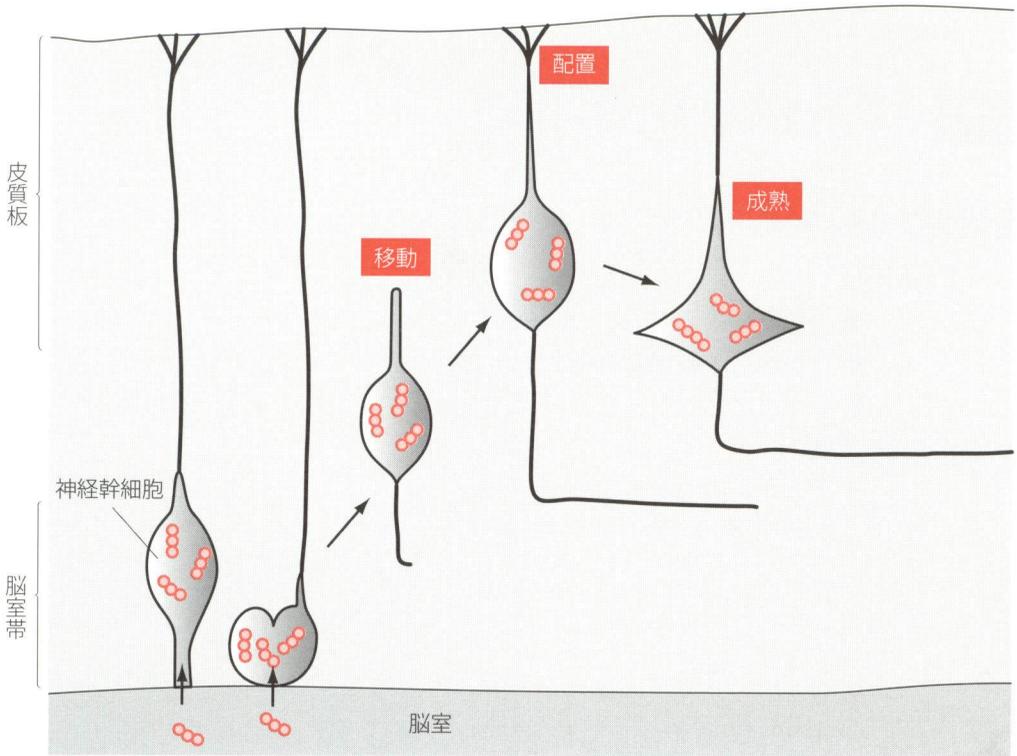


図1 子宮内エレクトロポレーション法による解析対象（大脳新皮質の例）

子宮内エレクトロポレーション法では、プラスミドは脳室帯に接する神経幹細胞に導入され、そこから生じる神経細胞にも受け継がれるため、その移動、配置、成熟の過程で外来遺伝子を発現させることができる

くりさえすれば、すぐに実験可能である。またウイルスベクターに比べて導入されるプラスミドのコピー数が多いので、発現量も高く、複数のプラスミドを同一細胞に発現させることも可能である。

エレクトロポレーションによる遺伝子導入の際立った特徴の1つとして、プラスミドDNAが与えられた電場の陽極側のみ導入される点がある。これにより、同じ側脳室への注入でも、電極の向きにより、大脳新皮質や大脳基底核原基、海馬²⁾などに選択的に導入することが可能である。また、新皮質内でも、例えば前頭前皮質に選択的に導入するなどの実験が可能で³⁾、適当なプロモーターがない場合には、特に本法は有効であろう。さらにプラスミドを第3脳室へ注入すれば視床（コラム⑥）、第4脳室へ注入すれば小脳や橋核への導入も可能である。侵襲もさほど強くないため、同一個体に2回の導入を行うことも可能で、例えば、異なった日に同一個体に導入を行うことで、異なった時期に生まれた神経細胞を別々にラベルすることができる^{4) 5)}。

また、導入されるコピー数の多い本法は、遺伝子の強制発現だけでなく、プラスミドを用いたRNA干渉法による遺伝子特異的なノックダウンにも非常に有効である⁶⁾。さらに、本法はプラスミドに基づいたさまざまな技術が利用可能である。例えば、Cre recombinase発現ベクターとloxP siteの組み合わせでは、条件的発現や、少数の細胞だけを可視化して個々の細胞の動態を観察することができる。またトランスポゾンを用いてトランスジーンをゲノムに組み込ませる系を用いて、分裂細胞においても希釈されない系譜解析を行う（コラム⑤）

など、その応用範囲はさらに広がっている。

1) 大脳新皮質への導入

準備するもの

▶ 1) 機器類

- 遺伝子導入装置…CUY21E, もしくはNEPA21 (ネッパジーン社)
- ピンセット型電極…CUY650P3, あるいはCUY650P5
- マイクロインジェクター…IM300 (ナリシゲ社) など

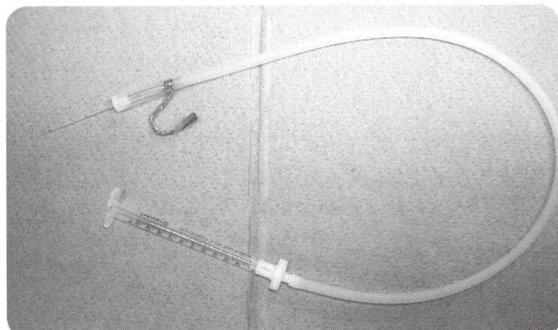
▶ 2) 消耗品類

● インジェクション用針

芯入硝子管 (ナリシゲ社, #GD-1) をプラーで引いてつくる。プラーにナリシゲ社のPC-10を用いた場合には、錘4つを付けてHeat adj. を75にする。この機械では上下にガラス管が引かれるが、下に引かれた方を用いる。

● 吸引チューブ…Drummond, #2-040-000

製品には赤いマウスピースが付いているが、これを外して、孔サイズ0.22 μ Lのフィルター (ミリポア社, Millex-LG, #SLLG013SL) を取り付け、さらにピストンを外した1 mLのシリンジを新しいマウスピースとして取り付ける (右図)。



● ファイバーライト…テクノライト (ケンコートキナ社 #KTS-150RSV) など

● 滅菌ガーゼ…ケーパイン, 7.5 × 7.5 cm

● 手術台

発砲スチロールの板を削ってくぼみをつくり、マウスを仰向けに寝かせたとき、うまくはまるようにする (右図)。

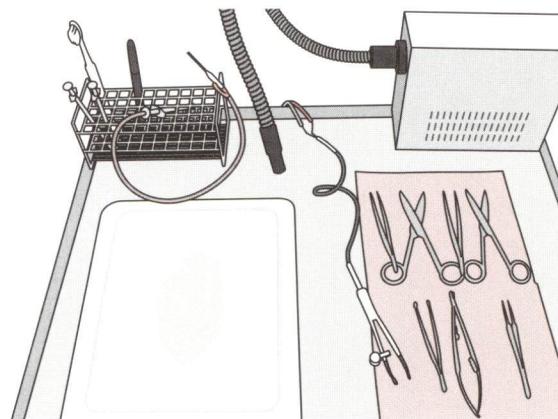
● 解剖用具

ピンセット×2, 解剖用はさみ×2, リングピンセット×1, 持針器×1, 尖鋭ピンセット (夏目製作所 #A-45など)

● 外科手術用テープ…3M, Transpore

● ナイロン製縫合糸 (ネスコ, #HT1605NA75)

● 絹製縫合糸 (D & G, #112451)



▶ 3) 試薬

● HEPES 緩衝液 (HBS)

シグマ・アルドリッチ社から2×濃度の溶液 (#51558) が入手できるので、これを滅菌水で1/2に希釈して使うのが便利である。

● プラスミドDNA溶液

キアゲン社のMaxi kitまたは、超遠心により精製したプラスミドDNAをHBSでなるべく濃い溶液となるように溶かす(5 mg/mL以上)。プラスミドの純度は非常に重要である。

● 0.1% FastGreen 溶液

シグマ・アルドリッチ社 (#F7258) の粉末を滅菌水で溶かす。

● PBS

滅菌したPBSを50 mLのシリンジに入れ、先端に孔サイズ0.22 μ mのフィルターを取り付ける。

● 1/10 希釈ネブタール注射液

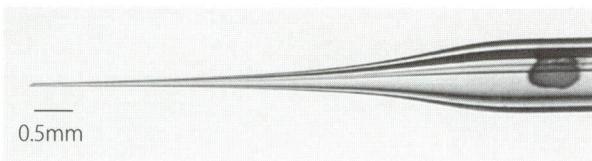
麻酔として使用。ネブタール注射液(50 mg/mLペントバルビタールNa溶液, 大日本住友製薬), またはソムノペンチル(64.8 mg/mLペントバルビタールNa溶液, 共立製薬)を滅菌水で1/10に希釈する。

プロトコール

▶ 1) プラスミド調製と胎仔の準備

① 1回分に分注したプラスミドDNA溶液(20 μ Lなど)に, 1/10量の0.1% FastGreenを加える^{a)}

② インジェクション用の針の先端を尖鋭ピンセットで適当な太さになるように折る。実体顕微鏡下で斜めに折って先端を鋭くすると, 刺しやすくなる



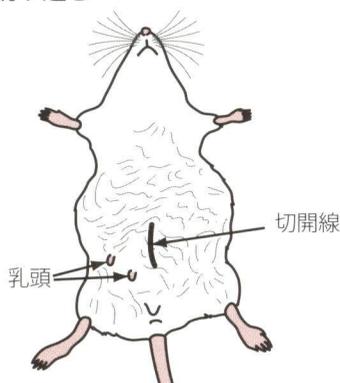
③ 1/10に希釈したネブタール注射液を体重10g当たり120 μ Lの割合で, 腹腔内に投与する

④ 10分ほど待って, 脱力し, 呼吸が深く安定した状態になったことを確かめた後, 手術台に仰向けに寝かせ, 四肢を外科手術用テープで固定し, 腹部を70%エタノールで消毒する^{b)}

⑤ ファイバーライトで照らしながら, 1組のはさみとピンセットで腹部の皮膚を正中線に沿って切開する。下位2組の乳頭の間の高さから切開を開始し, 上に約2cm切り進む

^{a)} **重要** プラスミドDNA溶液は, 例えばCAGプロモーターによるGFP発現ベクターで神経細胞を標識するためには, 0.5~1 μ g/ μ L程度, 通常の機能タンパク質を発現させる場合には1~5 μ g/ μ Lが適当である。

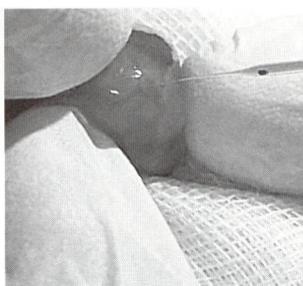
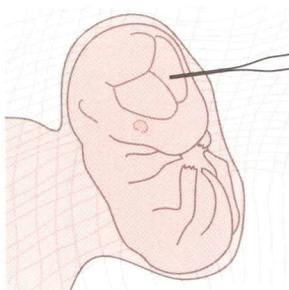
^{b)} 個体によっては, この条件でも麻酔が効かない場合がある。この場合には, 200 μ L追加投与する。



- ⑥皮膚を切開すると、腹壁の正中線に白線が見える。これに沿って、もう1組のはさみとピンセットで切開する
- ⑦滅菌ガーゼの中心を切り抜いて窓をつくり、切開部にあてがい、リングピンセットを用いて片方の子宮角を露出させる^c

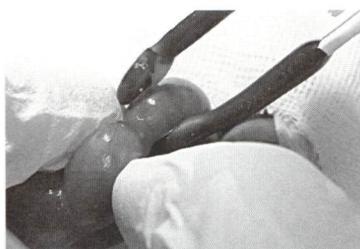
▶ 2) 大脳新皮質への導入^d

- ⑧吸引チューブの先に先端を折ったインジェクション用針を取り付け、プラスミドDNA溶液を吸い上げる
- ⑨子宮壁を通して胎児が見えるので、側脳室の片方、あるいは両方にプラスミドDNA溶液を呼気で注入する^{e,f}



インジェクションは胎児の頭部をしっかり保持し、側脳室の前側を狙う

- ⑩PBSで子宮壁をよく濡らし、ピンセット型の電極を用いて子宮壁越しに胎児の頭部を挟み、電気パルスを与える。皮質のなるべく広い範囲に導入するため、陰極を胎児の顎に当て、陽極を皮質の中心に据える^g



インジェクションした側脳室を覆うように陽極を斜めに当てる

- ⑪電気パルスは、ICRマウスを用いる場合には、以下の条件を目安にする^h

妊娠日数	電極の径	電圧	パルス幅	パルス間隔	回数
12.5日	3 mm	33 V	30 msec	970 msec	4
13日以降	5 mm	30~35 V	50 msec	950 msec	4

- ①このとき、子宮を強くつかんではいけない。ピンセットでひっかけて取り出す感覚である。また、ある程度露出したら、ピンセットは使わず、手で取り出した方がダメージは少ない。子宮がねじれて鬱血にならないように、気を付ける。
- ②文献1参照。またメタ・コーポレーション・ジャパン制作のビデオがウェブサイトから閲覧できる。
<http://www.actioforma.net/s3d/utero/index.html>
ID: keio01 pass: NEPA21

- ③吸引チューブを用いずに、マイクロインジェクターを用いてもよい。胎生10日目などの発生段階の早い胎児への導入では、針をより細く加工する必要がある。この場合にはマイクロインジェクターが非常に有効である。胎生14日目の胎児では、片方の側脳室当たり1 μ L程度が目安である。

- ④プラスミドのインジェクションにはある程度の熟練が必要である。針を刺すとき、胎児が動いてしまうことを防ぐため、胎児の後頭部を押して子宮壁に顔を押しつけながら、素早く一気に刺す。刺す深さはなるべく浅くする。子宮内で腔に一番近い胎児はアプローチしにくく、傷つくと流産の危険があるので、インジェクションしない。

- ⑤ただし、子宮内の胎児の位置によっては、これが不可能な場合もある。

- ⑥このとき、実測の電流値は40~60 mAとなる。電流値は子宮のPBSによる濡れ具合や、電極の当て方に大きく依存する。3 mmの電極は電流が流れにくいので電圧をやや高めに設定する必要がある。電極やエレクトロポレーター個性によっても電流値は異なってくるので、電流値が40~60 mAとなるように電圧を調整する。

- ⑫一方の子宮角に対する作業が終了したら、腹腔内に戻し、もう一方の子宮角に同様の操作を行う

▶ 3) マウスの処置

- ⑬子宮角を腹腔内に戻した後、PBSで腹腔内を満たす
 ⑭腹壁をナイロン製縫合糸で、皮膚を絹製縫合糸で縫合する。腹壁は3針、皮膚は5針が適当である^①
 ⑮子宮を露出したことと、麻酔の効果により、マウスの体温は低下している。手でしばらく温めるか、スライドウォーマーなどで保温する^①
 ⑯使用後の電極は、表面に汚れが残っていると抵抗値が変わってしまい、導入効率に影響が出る。使用後は電極部分を歯磨き粉と歯ブラシでよく磨いておく

①皮膚は専用のステープラーを用いてもよい（ベクトン・ディッキンソン社, Autoclip Applier 9 mm, 4 #27630など）。その場合には3針程度が適当である。

①手術に時間がかかると、マウスの体温低下が著しくなり、胎仔の致死率が高くなる。開腹から閉腹までの時間をなるべく30分以内に留める。時間を短縮するため、いくつかの胎仔だけに限定して操作を行う場合もある。胎生期に固定するのであれば、卵巣から何番目の胎仔にインジェクションしたかを記録しておけば、その個体だけを固定することができる。生後ではインジェクションしたものと、していないものが混ざってしまうが、GFPの発現が強ければ、生後1日目の段階で、皮膚を通して蛍光が見えるので、インジェクションした個体を選択することができる。

👉 2) 前頭前皮質への導入³⁾

大脳新皮質のなかでも前頭前皮質を狙う場合、電極の当て方に注意が必要である。図2に示すように、大脳新皮質背外側への遺伝子導入の場合はプラスミドをインジェクションした大脳新皮質の外側にプラス極を当てるが、前頭前皮質の場合はプラスミドをインジェクションした大脳新皮質の前方かつやや内側にプラス極を向ける。また、プラス極はマイナス極より心持ち水平よりも上方に当てる。注入するプラスミド溶液は、片方の側脳室あたり通常の半分程度（0.5 μL程度）を、なるべく側脳室の前方に注入する。電気パルスは通常の大脳新皮質に導入する場合と同じ電圧などの条件で与える。

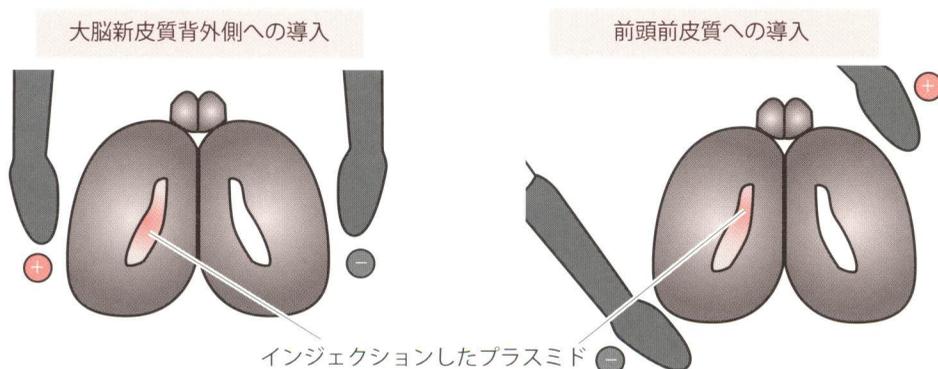


図2 大脳皮質背外側と前頭前皮質へのエレクトロポレーション法

👉 3) 海馬CA1領域への導入²⁾

プラスミドの脳室へのインジェクションは上記の大脳新皮質の場合と同様に行う。電圧値も大脳新皮質の場合と同様である。図3のように、大脳新皮質への遺伝子導入の場合はプラ

スミドをインジェクションした大脳新皮質の側にプラス極を当てるが、海馬CA1領域への遺伝子導入の場合はプラスミドをインジェクションした大脳新皮質の側にマイナス極を当てる。電極の角度は図3のように水平方向から30度程度傾ける。妊娠の胎生13～15日目に遺伝子導入を行うと、多くの細胞がラベルされる。妊娠の胎生12日目に遺伝子導入を行う場合には、電極をより水平に近い角度で当てる必要がある。

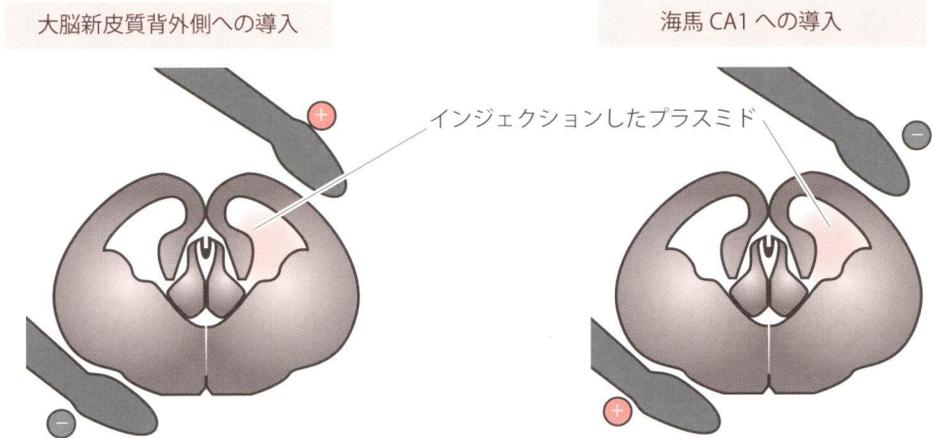


図3 大脳皮質背外側と海馬CA1へのエレクトロポレーション法

② プロモーターの選択のヒント

恒常的な発現を支持するプロモーターとしては、CMV (cytomegalovirus) プロモーターや、CAG プロモーター、EF1 α (elongation factor 1 α) プロモーターがよく知られている。しかし、これらのプロモーターは、発生中の脳の中では、必ずしも恒常的に発現しない。CMV プロモーターは脳室帯の細胞や、移動中の幼若神経細胞で良好に発現を支持するが、成熟した神経細胞では、発現が消失する⁵⁾。EF1 α プロモーターでは、全体的にCMV プロモーターよりも発現が強く、また移動が終了し、成熟した後でも発現が続く。CAG プロモーターは、移動中から成熟までの各段階でEF1 α よりもさらに強い発現が観察されるので、筆者らは日常的にこのプロモーターで実験している。また、このプロモーターはEF1 α に比べて、脳室帯での発現が速やかに減少する傾向があり、遺伝子導入した時点で誕生した神経細胞をかなり特異的に標識できる特徴がある。

T α 1プロモーターは、神経細胞特異的に発現する。本法で導入した場合には、移動神経細胞が皮質板に進入するころに発現が観察され始める(表)。

表 脳神経系への導入におけるプロモーターの比較

	通常細胞	脳室帯の神経細胞	移動中の神経細胞	成熟神経細胞	備考
CMVプロモーター	恒常的な発現	★	★	—	
CAGプロモーター	恒常的な発現	★★★★*	★★★★	★★★★	
EF1 α プロモーター	恒常的な発現	★★	★★	★★	
T α 1プロモーター	—	—	★	★	神経細胞特異的に発現

※：発現は速やかに減少



胎子の致死率が高い、もしくは流産してしまう



- 原因**
- ①手術時間が長い
 - ②操作中に胎子をつぶしている

原因の究明と対処法

- ①手術時間はなるべく30分以内に留める。手技に慣れないうちは、無理にすべての胎子に導入しようとせず、やりやすい胎子を選んで、操作する。
- ②個々の胎子は羊膜で包まれており、羊水中に浮かんでいるため、簡単に方向を変えることができる。胎子を強くもつと、羊膜が破れて、このような可動性を示さなくなる。このような状態では胎子は生き残ることができない。プラスミドの注入時に胎子をこね過ぎたり、子宮を腹腔内に戻す際に押しつぶしたりしないよう、注意する。



水頭症になる



- 原因**
- ①プラスミドDNAの純度が低い
 - ②電圧が高すぎる
 - ③注入するDNAの量が多すぎる
 - ④注入時のダメージが強い

原因の究明と対処法

- ①キアゲン社などのプラスミド抽出キットで精製したプラスミドは、さらにフェノール/クロロホルム処理2回、クロロホルム処理2回の後、エタノール沈殿してHBSに溶解する。
- ②ネッパジーン社の遺伝子導入装置では、電気パルス発生後、実際に流れた電流が表示される。この電流値が40～60 mAになるように、PBSによる湿らせ具合や、電極の当て方（電極の子宮への接触面積や電極間の距離）、設定電圧を調節する。また、電極が劣化すると、電流が高く流れがちになるので、その場合には新しいものと交換する。
- ③妊娠14～15日目では、片方の側脳室あたり1～2 μ Lが適当である。
- ④注入用のマイクロピペットの先端は斜めに折る。刺す際に大きな抵抗を感じる際には、先端を加工し直すか、別の針に換える。

謝辞

本項で紹介したプロトコルの確立にあたっては、文部科学省脳科学研究戦略推進プログラム、科学研究費補助金などの支援を受けた。

《特許》

遺伝子導入動物の製造方法、特許第4536233号

参考文献

- 1) Tabata, H. & Nakajima, K. : Neuroscience, 103 : 865–872, 2001
- 2) Tomita, K. et al. : Hum. Mol. Genet., 20 : 2834–2845, 2011
- 3) Niwa, M. et al. : Neuron, 65 : 480–489, 2010
- 4) Kubo, K. et al. : J. Neurosci., 30 : 10953–10966, 2010
- 5) Sekine, K. et al. : J. Neurosci., 31 : 9426–9439, 2011
- 6) Bai, J. et al. : Nat. Neurosci., 6 : 1277–1283, 2003