

3

エレクトロポレーション法による神経細胞への導入

② 網膜への遺伝子導入

松田孝彦

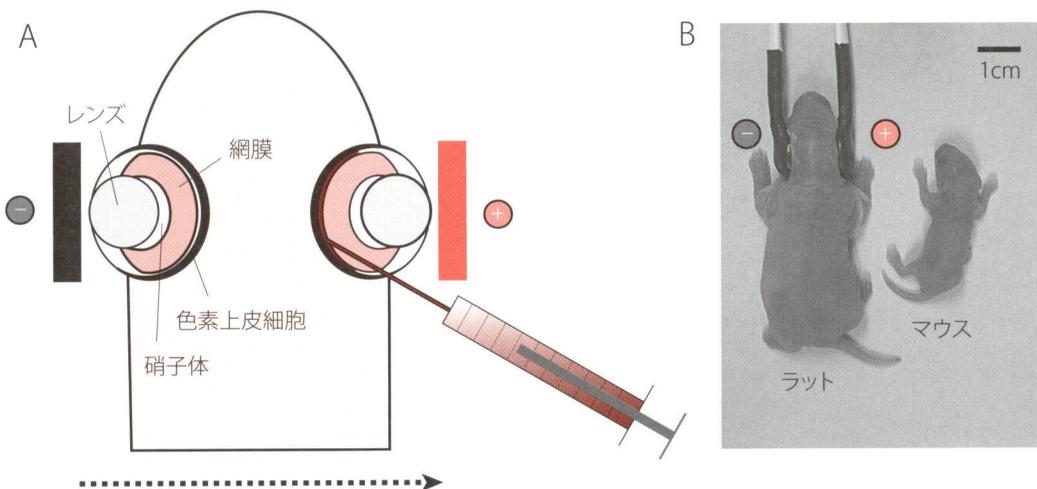
特徴

※神経細胞への導入全般については4-3-1も参照

- ・発生期の網膜に対して非常に有効な遺伝子導入法
- ・導入したプラスミドからの遺伝子発現は数カ月以上持続する
- ・2種類以上のDNAを100%に近い効率で同一細胞に導入できる
- ・BACなどの巨大DNAに対しても適用可能
- ・成体網膜に対するプラスミドの導入効率はいわゆる低い

① 網膜への遺伝子導入の原理

エレクトロポレーション法を用いて、発生期のマウス（ラット）網膜に簡便に遺伝子を導入することができる^{1)~3)}。この遺伝子導入法には、生きたままのマウスに*in vivo*でエレクトロポレーションを行う方法（図1）と、摘出した網膜に対して*in vitro*でエレクトロポレーションを行い、その後、網膜を組織培養する方法（図2）の2つがある。前者は、生体内で遺伝子機能を解析できるという大きな利点をもつ。しかしながら、（それほど難しい技法ではないものの）DNAインジェクション操作の習熟に若干の時間を要する。一方、後者の*in vitro*エレクトロポレーション法は、①技術的に容易である、②遺伝子導入効率のばらつきが少ない、③蛍光タンパク質の発現を経時的に観察しやすい、④薬剤投与との組み合わせが容易である、といった長所がある。しかし、網膜組織培養系で*in vivo*での環境を完全に模倣

図1 網膜への*in vivo*エレクトロポレーションA) *In vivo*エレクトロポレーションの概略図。B) 電気パルスはピンセット型円形電極を用いて与える

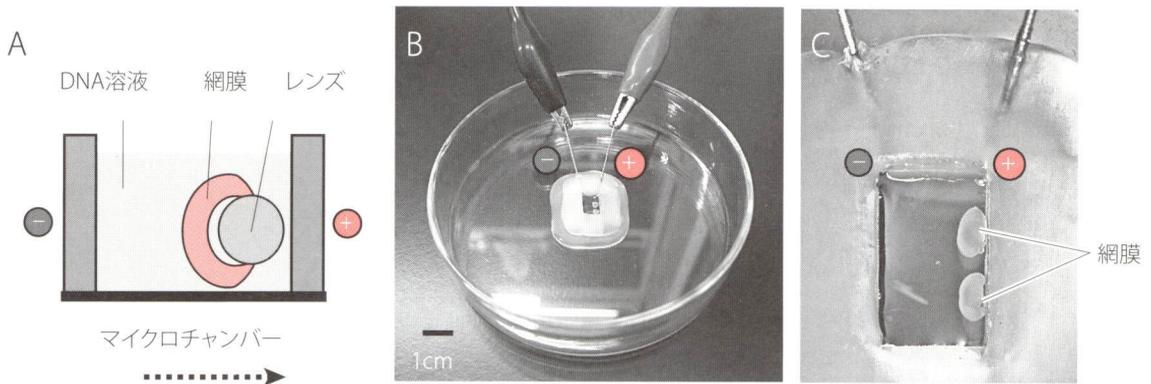


図2 網膜への*in vitro* エレクトロポレーション

A) *In vitro* エレクトロポレーションの概略図. BC) 電気パルスはチャンバー型電極を用いて与える

することは困難であり、健康な状態で網膜を培養できるのは最大2週間程度までであることなど、組織培養につきまとういくつかの限界がある。

In vivo エレクトロポレーションにおいては、DNA溶液を網膜と色素上皮細胞との間（網膜下腔）に注入し、図1に示す方向（破線矢印）で電気パルスをかける。これにより、網膜に高効率でプラスミドDNAが導入される。電極の向きを図1と逆にするることによって、色素上皮細胞に遺伝子を導入することも可能である^{4) 5)}。DNAを硝子体腔内に注入し、図1と逆の向きに電気パルスを与えて網膜神経節細胞に遺伝子を導入したとの報告もある。^{6)~8)}しかし、少なくとも筆者の実験条件下においては、硝子体側からの遺伝子導入効率は非常に低い。なお、プラスミドDNAよりも低分子の蛍光標識アンチセンスモルフォリノオリゴを用いた場合、エレクトロポレーションによって硝子体側からゼブラフィッシュの網膜に効率よく導入できるとの報告がある⁹⁾。*In vitro* エレクトロポレーションにおいては、DNA溶液で満たしたマイクロチャンバー内で、摘出した網膜の硝子体側（レンズ側）をプラス電極に向けて配置し、電気パルスを与える（図2）。

網膜に対してエレクトロポレーションを行った場合、基本的にDNAは未分化な網膜前駆細胞に導入される。理由は不明であるが、分化した神経細胞にプラスミドDNAはほとんど導入されない。したがってマウスの場合、エレクトロポレーション可能な時期は、増殖している網膜前駆細胞が存在する胎仔期から生後1週間目あたりまでで、発生期を過ぎるとエレクトロポレーション法を用いた網膜へのプラスミドDNAの導入は困難になる。

2 目的・導入部位による使い分け

網膜は大別すると6種類のニューロンと1種類のグリア細胞から構成される。これら細胞種は一定の決まった順序で産生されており、マウスの場合、胎仔期に神経節細胞、水平細胞、錐体視細胞、アマクリン細胞が主に産生され、生後に桿体視細胞、双極細胞、ミュラーグリア細胞が主に産生される（図3）。DNAは未分化な網膜前駆細胞に導入されるため、発生

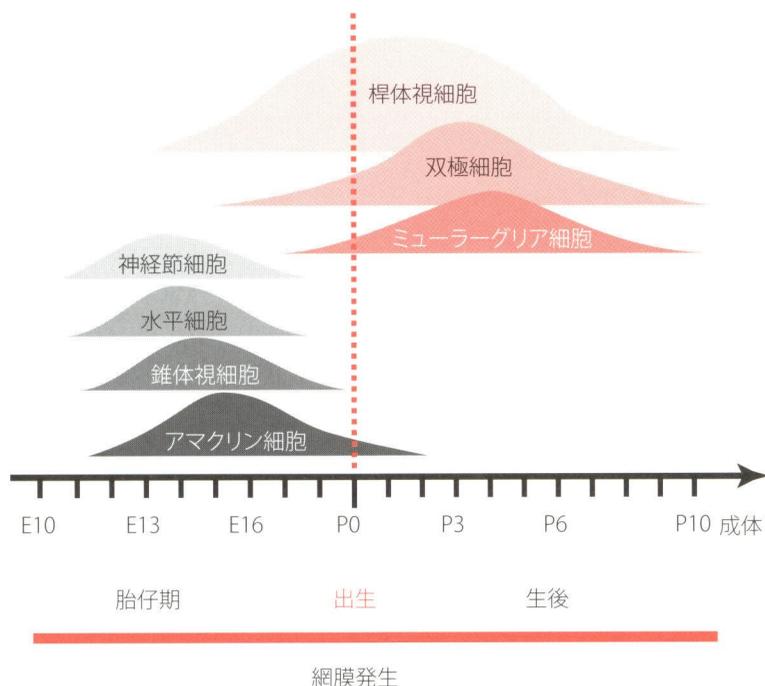


図3 マウス網膜における各種細胞の発生順序

出生直後（赤点線）の時点で存在する未分化網膜前駆細胞からは桿体視細胞，双極細胞，ミュラーグリア細胞ならびに（一部の）アマクリン細胞が産生される

のどの時期の網膜を標的とするかによって，最終的にラベルされる細胞種が異なってくる．例えば，出生直後（postnatal day 0 : P0）のマウス網膜を標的とした場合，遺伝子導入された網膜前駆細胞からは桿体視細胞，双極細胞，ミュラーグリア細胞，アマクリン細胞が産生されるが，神経節細胞，水平細胞，錐体視細胞は生まれなため，前者の4種類の細胞のみがラベルされる（図3，図4）．神経節細胞，水平細胞，錐体視細胞をラベルしたい場合には，胎仔期の網膜を標的にする必要がある．

マウス網膜への *in vivo* エレクトロポレーションは，胎生13.5日目（E13.5）あたりから可能である（それより早いステージでは，子宮壁を通して胎仔の眼球を認識するのが困難である）．しかし，出生前の胎仔網膜への遺伝子導入は，*in utero* での手術になるために比較的難易度が高い．筆者の場合，E13.5のマウス胎仔網膜にGFP発現ベクターを *in utero* で導入したときの成功率（GFP陽性になった網膜の割合）は，平均で30％程度である．胎仔期の網膜を標的とする場合には，まず *in vitro* エレクトロポレーションを試みるのが無難な選択であろう．一方，生後のマウス網膜への *in vivo* エレクトロポレーションは比較的容易であり，筆者の成功率はほぼ100％である．これまで多くの研究者にマウス新生仔の網膜への *in vivo* エレクトロポレーション法を指導してきたが，ほぼすべての人が最初のトライアルで成功させており，それほど難しいテクニックではないといえる．

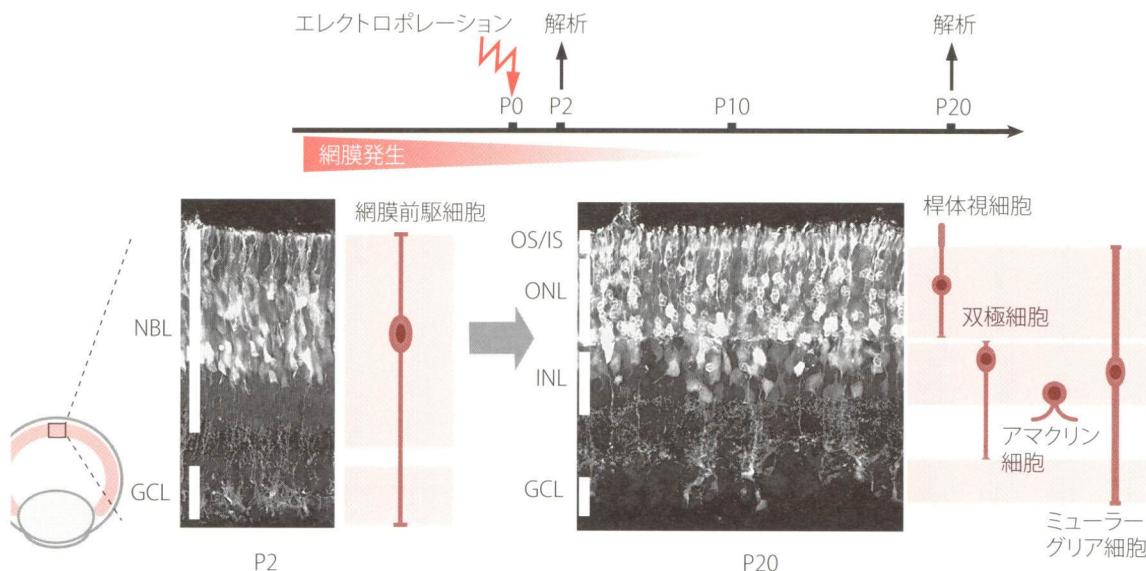


図4 新生仔網膜への *in vivo* エレクトロポレーション

出生直後 (P0) の網膜に pCAG-GFP 発現ベクターを *in vivo* エレクトロポレーション法で導入し、その2日後 (P2) および20日後 (P20) に網膜を解析した。P2の時点では、ほとんどのGFP陽性細胞が形態的に未分化な前駆細胞であるが、P20では、GFP陽性細胞は桿体視細胞、双極細胞、ミューラーグリア細胞およびアマクリン細胞に分化している。NBL：神経芽細胞層、GCL：神経節細胞層、OS/IS：視細胞外節/内節、ONL：外顆粒層、INL：内顆粒層

1) 出生直後のマウス網膜への *in vivo* エレクトロポレーション

準備するもの

▶ 1) サンプルなど

- 妊娠マウス

どの系統のマウスに対しても適用可能であるが、ICRなどの非近交系アルビノマウスを用いると、眼球に注入されたDNA溶液の様子を観察しやすい。

- プラスミドDNA

キアゲン社などの large prep kit で精製し -20°C で保存。最終的には PBS 中で $1 \sim 5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度になるように調整する。凍結融解を頻繁に繰り返すと、一部のDNAが凝集してインジェクション針が目詰まりする原因になるので避ける。筆者が論文で報告したエレクトロポレーション用のプラスミド^{2) 3)} は Add Gene (<http://www.addgene.org>) を通じて入手可能。

▶ 2) 機器類

- 遺伝子導入装置… CUY21 (ネッパジーン社)

他にもネッパジーン社の NEPA21, BTX社の ECM830 が同様に使えることを確認している。

- 実体顕微鏡

- ピンセット型円形電極 (*in vivo* 用)：直径 5 mm… CUY650-5 (ネッパジーン社)

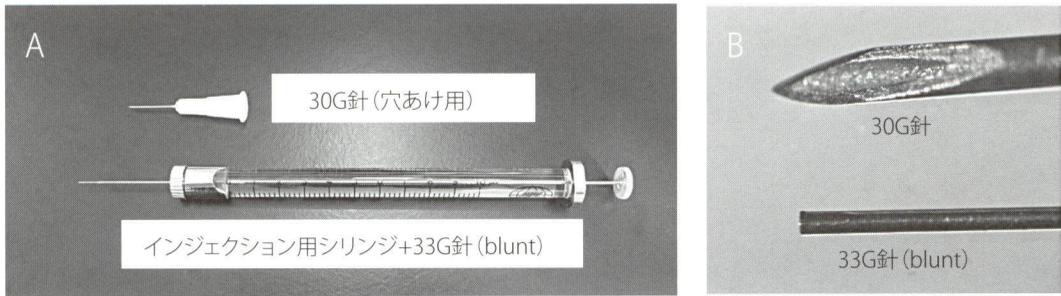


図5 マウス新生仔眼球へのDNAインジェクションに用いる針

A) 眼球に穴を開けるための30G針とインジェクション用のプラント末端33G針。B) 針先の拡大図

▶ 3) 試薬品類

- 1% Fast green FCS (シグマ・アルドリッチ社)

粉末を水に溶かして0.45 mmのフィルターを通した後、室温で保存。DNA溶液に1/20量(終濃度0.05%)を加えて着色する。

▶ 4) 消耗品など

- インジェクション用のシリンジと針

NanoFil 10 μ Lシリンジ (World Precision Instruments社, #NANOFIL) に33 G blunt NanoFil needle (World Precision Instruments社, #NF33BL-2) を装着(図5)。World Precision Instruments社は33, 34, 35, 36 Gのblunt end needleとbeveled needleを取り揃えており、必要に応じて針の形状を変更できる。針が細いほど組織へのダメージは小さくなるので、34 Gや35 Gのblunt end針を用いてもよい。しかし、針が細くなるにつれて針の目詰まりの頻度が増すので、その点も考慮に入れる必要がある。36 Gの針は目詰まりしやすいのでおすすめしない。マウス胎仔への*in utero*でのインジェクションには35 Gのbeveled針を用いている。

- 使い捨て注射針 30 G1/2 (ベクトン・ディッキンソン社 #5106)
- 使い捨てカミソリ (またはメス)
- リングピンセット (Fine Science Tools社 #11103-09)
- 綿棒
- 70%エタノール
- PBS
- 氷 (マウス新生仔の麻酔用)
- 手術後のマウス新生仔を温める装置 (スライドウォーマーなど)

プロトコール

- 1 Fast Green (終濃度0.05%) を加えたプラスミドDNA溶液(終濃度1~5 μ g/ μ L) を調製する^{a)}
- 2 33 Gのblunt針を装着したインジェクション用シリンジをDNAで満たす (~0.5 μ L程度)
- 3 新生仔を氷の上に数分間置き、麻酔する^{b)}
- 4 実体顕微鏡下、片側の眼球を上にして左手で麻酔したマウスを固定する (図6A) ^{c)}

- a) 凝集したDNAや、DNA溶液に混入したゴミによるインジェクション針の目詰まりを防ぐために、実験直前に室温で15,000 rpm (20,000 G)、3分遠心してその上清を用いる。
- b) 新生仔がほとんど動かなくなれば次の操作に移る。新生仔を氷上で長時間(10分以上)放置すると死亡することがあるので注意が必要。
- c) 新生仔を固定する際、強く指で押しすぎると「うっ血」して死亡するので、適度なさじ加減が必要。

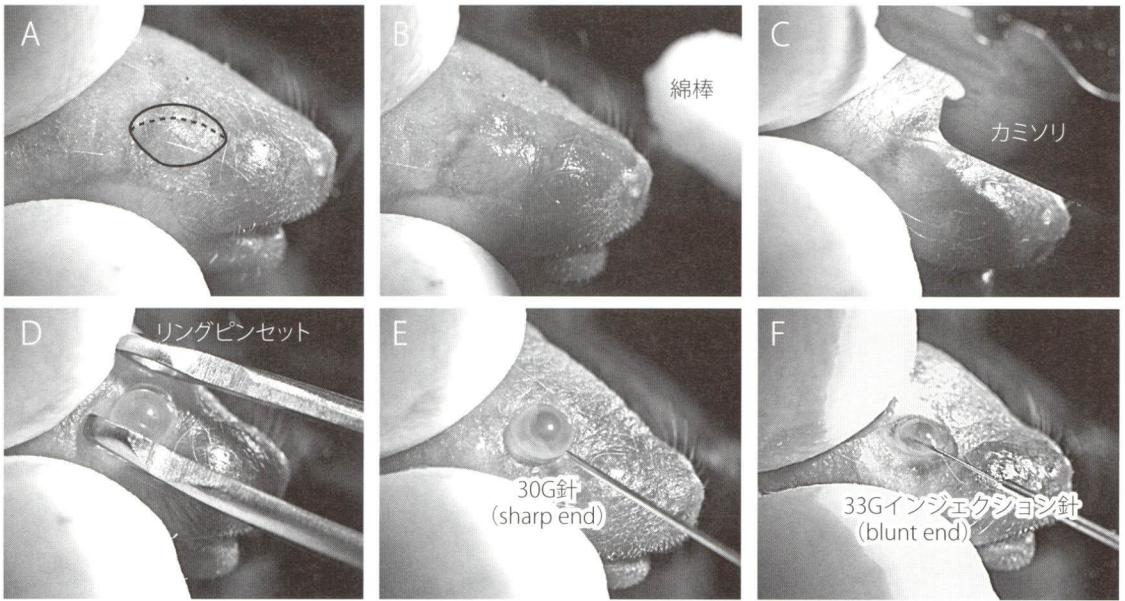


図6 マウス新生仔眼球へのDNAインジェクションの手順

詳細は本文参照。Aでは眼球の位置を実線で、カミソリで切開する部位を破線で示した

- 5 70%エタノールに浸した綿棒で眼球の上の皮膚を消毒する (図6B)
 - 6 鋭利なカミソリ(またはメス)を用いて瞼を切開する (図6C) ^d
 - 7 リングピンセットを用いて切開した瞼を押し下げ、眼球を露出させる (図6D)
 - 8 30Gの使い捨て注射針を用いて角膜近くの強膜に穴を開ける (図6E, 図7A)
 - 9 インジェクション用の33Gのblunt針を8でつくった穴に通し、眼球内に挿入する (図6F, 図7C)
 - 10 眼球内に挿入した針先に軽い抵抗を感じた時点でDNAをインジェクトする (0.3~0.5 μ L) ^e
 - 11 露出させた眼球をもとに戻し、瞼で覆われるようにする ^f
 - 12 PBSで濡らしたピンセット型円形電極をマウス新生仔の頭部にあてがう (図1B) ^g
 - 13 エレクトロポレーション (80 V, 50 msecの矩形波をパルス間隔950 msecで5回)
 - 14 手術後のマウスを温め、動き出したら母親の元に戻す ^h
 - 15 DNAを導入してから24時間後には遺伝子発現が観察される
- ^d 上下の瞼のつなぎ目(線として認識できる)に沿って切開する。上手く切断すればほとんど出血しない。出血が激しいと傷口が癒着して将来目が開かないことがある。
 - ^e **重要** 針先が網膜下腔に到達した時点で軽い抵抗を感じる。新生仔の眼球は柔らかいので、さらに強く押すとblunt針といえども容易に眼球(強膜)を突き破ってしまうので注意が必要。
 - ^f 角膜が電極に直接接触するとエレクトロポレーションの際にダメージを受ける可能性があるので、眼球を瞼で覆って直接電極と触れないようにする。
 - ^g DNAをインジェクトした眼球側にプラス電極、反対の眼球側にマイナス電極をあてがう。
 - ^h 筆者は通常、片側の眼球にのみ遺伝子を導入している。両方の目にエレクトロポレーションをする場合には、新生仔のダメージを考慮し、片側の目に遺伝子導入後、10分以上の間隔を空けてもう片方の目に導入するとよい。待ち時間の間、手術後の新生仔を温めて一旦、麻酔から回復させる。母親の元に戻す必要はない。

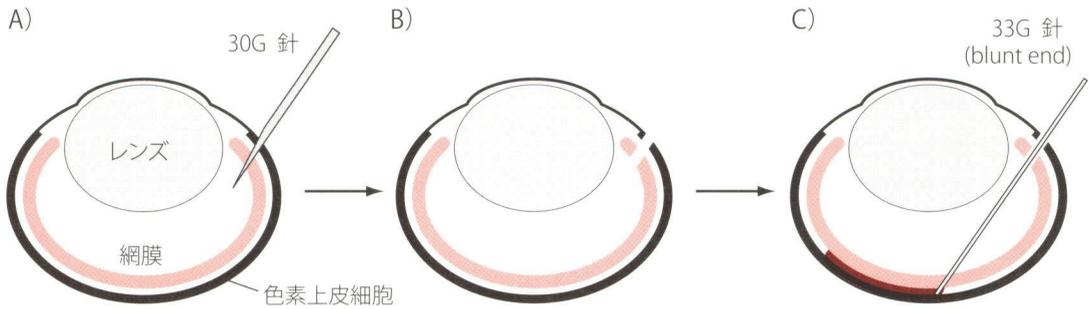


図7 網膜下腔 (subretinal space) へのDNAインジェクションの手順

シャープな30G針で眼球に穴を開け (A, B), その穴を通してインジェクション用の33Gのblunt針を挿入する (C). blunt針を用いることで, 眼球を突き破らずに網膜と色素上皮細胞の間へのDNA注入が容易になる



2) 出生直後のマウス網膜への*in vitro* エレクトロポレーション

準備するもの

▶ 1) サンプルなど

- 妊娠マウス
どの系統のマウスに対しても適用可能であるが, ICRなどの非近交系アルビノマウスを用いると, 眼球に注入されたDNA溶液の様子を観察しやすい。
- プラスミドDNA
キアゲン社などのlarge prepキットで精製し -20°C で保存. 最終的にはPBS中で $1\sim 5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度になるように調整する. 凍結融解を頻繁に繰り返すと, 一部のDNAが凝集してインジェクション針が目詰まりする原因になるので避ける. 筆者が論文で報告したエレクトロポレーション用のプラスミド^{2) 3)}はAdd Gene (<http://www.addgene.org>) を通じて入手可能。

▶ 2) 機器類

- 遺伝子導入装置… CUY21 (ネッパジーン社)
他にもネッパジーン社のNEPA21, BTX社のECM830が同様に使えることを確認している。
- 実体顕微鏡
- シャーレ型白金プレート電極 (*in vitro* 用) … CUY520P5 (ネッパジーン社)
- 網膜摘出用のピンセット (Dumont社 #5, #55)
- 眼科用剪刀 (FST社 #14085-08)
- 眼科用スプリング剪刀 (FST社 #15000-00)

▶ 3) 試薬品類

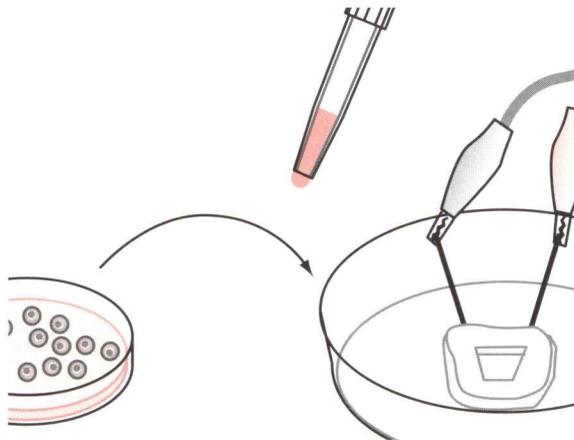
- 網膜組織培養用培地
調製後, 4°C で保存. 2週間程度で使い切る. 以下はすべてライフテクノロジーズ社インビトロジェン製品
- | | |
|------------------------------------|---------|
| Neurobasal-A (#10888-022) | 47.5 mL |
| N-2 supplement × 100 (#17502-048) | 0.5 mL |
| B-27 supplement × 50 (#17504-044) | 1.0 mL |
| GlutaMax × 100 (#35050-061) | 0.5 mL |
| ペニシリン-ストレプトマイシン × 100 (#15140-122) | 0.5 mL |
| Total | 50.0 mL |
- DMEM/F12 (HEPES含有) (ライフテクノロジーズ社インビトロジェン製品 #11039-021)

▶ 4) 消耗品など

- Nucleopore Track-Etched membrane 直径 25 mm (Whatmen 社 #110606)
- 6 ウェル組織培養プレート (コーニング社 #3516)
- 6 cm シャーレ
- 先端を切って太くした 200 μ L のチップ

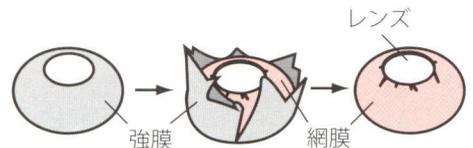
プロトコール

- 1 プラスミド DNA 溶液を調製する (終濃度 1~2 μ g/ μ L)
- 2 6 ウェルプレートに網膜組織培養用培地 (1 mL/well) を入れる^a
- 3 各ウェルに Nucleopore membrane フィルターを浮かべ、CO₂ インキュベーターに入れておく^b
- 4 安楽死させた新生仔から眼球を摘出し、DMEM/F12 で満たした 6 cm シャーレに移す^c
- 5 実体顕微鏡下、鋭利なピンセットと眼科用剪刀を使って眼球から網膜を取り出す^d
- 6 シャーレ型白金プレート電極のチャンバーを DNA 溶液で満たす (~140 μ L)
- 7 先端を切ったチップを装着した P200 マイクロピペッターを使って網膜をチャンバーに移す^{e,f}
- 8 ピンセットを使ってチャンバー内での網膜の向きを整える (レンズをプラス電極側に向ける, 図 2)



- 9 エレクトロポレーション (30 V, 50 msec の矩形波をパルス間隔 950 msec で 5 回) ^g
- 10 網膜を DMEM/F12 で満たした新しい 6 cm シャーレに移し、DNA 溶液を洗い落とす
- 11 先端を切った P200 チップを使って網膜を 6 ウェルプレートに浮かべたフィルター上に移す^h

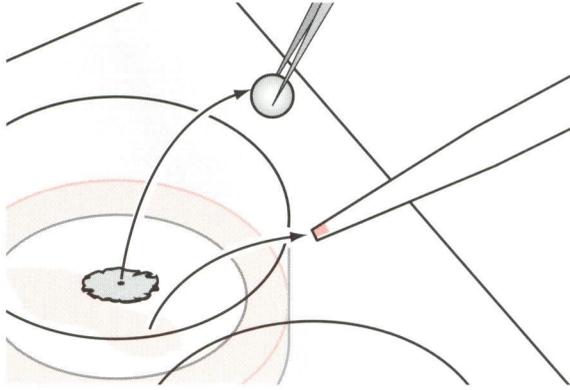
- a 無血清培地で安定して網膜が培養できるとの報告がある¹⁰⁾。筆者自身もウシやウマ血清入り培地などをいろいろ試してきたが、無血清培地を用いる方が結果は良好なようである。
- b 1~2 日程度ならば、フィルターを用いずに網膜を培養液中で維持する事は可能である。しかし、培養期間が長くなる場合、培養液中での静置培養では網膜の健康な状態を維持できない。また、培地を入れた培養プレートを長時間インキュベーターの外で放置すると、pH が変化して培地が変色してくる。
- c 使用する解剖用具や実験台を 70% エタノールで消毒し、できる限り雑菌をもち込まないようにする。
- d レンズが網膜に付いたままの状態を取り出すと後の操作が容易である。通常、眼球から取り出した網膜に色素上皮細胞は付着していない。



- e 網膜が吸い込める程度の太さのピペットマンチップを作製する。重力により網膜はピペットマンチップの先端部分に溜まるので、培地をほとんどもち込まずにチャンバーに移せる。
- f マウス新生仔の場合、1つのチャンバーに数個の網膜を同時に入れることができる。

- g 操作後、チャンバー内の DNA 溶液をピペティングによって攪拌すれば、そのまま別の網膜のエレクトロポレーションに使える。徐々に導入効率は落ちていくが、4~5 回は使い回せる。
- h フィルター上の中心部分にあらかじめ 100 μ L 程度の培地をマイクロピペッターで滴下しておく。この水滴があると網膜を移しやすい。

- 12 フィルター上でレンズ側が上にくるよう網膜を配置する
- 13 ピンセットで注意深くレンズを取り除く
- 14 P200のマイクロピペッターでフィルター上の余分な培地を吸い取り、網膜をフラットにする①



① **重要** 網膜が折り重なった部分をフラットにするときには、まず培地を少し滴下し、ピンセットを用いて培地の中で網膜の折り重なった部分を慎重に広げる。その後、余分な培地を吸い取る。

- 15 網膜の上から培地を～20 μ L 滴下する
- 16 37°CのCO₂インキュベーター内で培養する
- 17 2日おきに培地を交換する



⚠ 遺伝子が導入されない

- 原因**
- ① DNAが正しく眼球内（網膜下腔）に注入されていない
 - ② 正しくエレクトロポレーションされていない
 - ③ DNAの品質が悪い

原因の究明と対処法

- ① 色素で着色したPBSをインジェクトし、直後に眼球を摘出して網膜下腔が染まっているかをチェックする。インジェクション技術をマスターするまでは、多産でアルビノのICRマウスを使って練習するとよい。
- ② 実行電流値を調べる。電気パルスがかかる度にマウスの筋肉が軽く痙攣するので、それを指標にしてエレクトロポレーションの成否を判断してもよい。In vitroの場合、正しく電気パルスがかかれば、チャンバー内に気泡が発生する。
- ③ プラスミドDNAは通常のlarge prepキットで調整したもので十分であるが、少し高価なエンドキシンフリーのキットを用いてDNAを調整すれば、より少量のDNAで高い導入効率を得られる。

⚠ 遺伝子は導入されたが、網膜の形状が崩れている

- 原因**
- ① DNAインジェクションの際に網膜を傷つけた
 - ② インジェクトしたDNAの量が多すぎる

③インジェクトしたDNAの濃度が濃すぎる

原因の究明と対処法

- ① ゆっくりと慎重にインジェクション針を眼球内へ挿入し、針先にほんの僅かな抵抗感を感じた時点で止める。針の挿入によって眼球が変形するようであれば、強く押し過ぎである。
- ② 眼球にインジェクトする溶液量は0.5 μL 以下にとどめる。それ以上注入すると、深刻な網膜剥離を引き起こす。
- ③ 必要以上にDNA濃度が高すぎてもよくない。pCAG-GFPの場合、濃度1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ で十分明瞭なGFPの発現が観察できる。



培養した網膜の形状が崩れている



- ① 網膜組織培養の際、網膜を傷つけた
- ② 培養期間が長すぎる

原因の究明と対処法

- ① 網膜がダメージを受けた領域は層構造が乱れやすい。操作中、網膜を傷つけないように細心の注意を払う。特に、フィルター上で網膜をフラットにする際には、滴下した培地中で操作を行って網膜に余計な張力を与えないようにする。
- ② 培養日数が長くなるほど、網膜の形態が崩れやすくなる。培養日数は必要最小限にとどめる。



エレクトロポレーションの翌日マウス新生仔が死亡している



- ① 手術の際、マウスを手で強く押さえずぎた
- ② 氷上麻酔が長すぎた
- ③ 母親が面倒をみない

原因の究明と対処法

- ① 新生児マウスを指で強く固定しすぎると、うっ血して皮膚の色が黒ずんでくるので、手術中の皮膚の色の变化に注目する。
- ② 麻酔は5分程度までにとどめる。10分以上氷上で放置すると回復しないことが多い。
- ③ C57BL/6などの近交系マウスを用いた場合、母親が子育てせず手術後の新生仔が死亡することがよくある。必要ならば、ICRなどの非近交系マウスを里親につけることを検討する。

参考文献

- 1) Matsuda, T. & Cepko, C. L. : Methods Mol. Biol., 423 : 259-278, 2008
- 2) Matsuda, T. & Cepko, C. L. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 : 1027-1032, 2007
- 3) Matsuda, T. & Cepko, C. L. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 16-22, 2004
- 4) Chalberg, T. W. et al. : Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 46 : 2140-2146, 2005
- 5) Johnson, C. J. et al. : Mol. Vis., 14 : 2211-2216, 2008
- 6) Dezawa, M. et al. : Micron, 33 : 1-6, 2002
- 7) Kachi, S. et al. : Gene Ther., 12 : 843-851, 2005
- 8) Huberman, A. D. et al. : Nat. Neurosci., 8 : 1013-1021, 2005
- 9) Thummel, R. et al. : Dev. Neurobiol., 68 : 392-408, 2008
- 10) Johnson, T. V. & Martin, K. R. : Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 49 : 3503-3512, 2008