

リバーストランスフェクション法とその応用

藤田 聡史*・長崎 晃・三宅 正人

リバーストランスフェクション (reverse transfection) 法とは、固相面から細胞にトランスフェクション (遺伝子導入) を行う手法である。核酸 (DNA や siRNA など) と核酸導入補助剤 (リポソームやポリアミンなど) を混合したトランスフェクション用混合試薬 (以後、TF-mix と呼ぶ) を播種された細胞に対して加えるのが一般的なトランスフェクションだが、本手法ではその順序が逆転 (リバース) している。つまり、TF-mix をガラスやプラスチックなどの固相表面に接着または塗布し、続いて細胞をその上面から播種することで細胞への遺伝子の導入を行う (図 1)。ちなみに TF-mix を添加後、乾燥させることなく固相化せず細胞の播種を行う手法も「リバーストランスフェクション」と呼ばれることがあるので、注意が必要である。筆者らは本手法を特に区別する場合に「固相」リバーストランスフェクションと呼ぶ。

既存の手法に対して、さまざまなメリットがあるにもかかわらず、残念ながら国内においてあまり認知されておらず、一般的な手法として広まっていない。これは筆者らの宣伝不足もあるが、特殊で高価な製造機器 (インクジェット式やピンアレイ式のプリンターやスプレー型塗布装置など) や検出機器 (DNA アレイスキャナーなど) が必要と考えられていることもあり、本手法の敷居を高くしている。現在、筆者らは特殊な装置を使用せずに TF-mix を固相表面に固相化するための方法やさまざまな細胞表現型 (アポトーシス、神経分化、細胞運動など) に対応したアッセイ系の開発を進めており、かなり扱いやすい手法となっている。

本稿では、固相リバーストランスフェクション法とその応用法について解説したい。本手法への理解が深まり、研究の一助になれば幸いである。

背景と特徴

マサチューセッツ工科大学の Sabatini らおよび米スク립ス研究所に留学中だった三宅 (本稿著者) らが、それぞれ独自に開発競争を進めていたが、Sabatini らが先んじて 2001 年に Nature 誌にリバーストランスフェクション法を報告する。しかし当初、彼らが報告した方法では、トランスフェクションできる細胞に限られ、効率も低かったため、実用性に乏しかった。一方、三宅らはフィブロネクチンなどの細胞外マトリクス (ECM) が核酸の導入効率を促進することを見だし、2001 年 11 月に特許出願し²⁾、さらに産総研にて手法改良を加え、トランスフェクションが可能な細胞の適用範囲や効率を高めた実用的な手法への改良を行った³⁾。リバーストランスフェクション法には次に示すメリットがある。

固相化された TF-mix の長期保存が可能 核酸と核酸導入補助剤を混合した TF-mix を細胞用マイクロウェルプレートやスライドガラスなどの固相面に接着・乾燥させることによって、常温乾燥下で 6 ヶ月以上の長期保存が可能である。細胞への遺伝子の導入を行いたい時に細胞を播種するだけでトランスフェクションが可能である。

高効率・低毒性でのトランスフェクションが可能 細胞と固相との接触面から核酸が導入されるため、溶液に添加する場合に比べ、1/10–1/100 量の TF-mix の固相化で十分に細胞に核酸が導入される。また低容量であるため、リポソームが与える細胞毒性が低い。

現在、筆者らはリバーストランスフェクション法を応用した「トランスフェクションマイクロアレイ」^{3,4)} 基盤や「細胞に対して核酸を均一にリバーストランスフェクション」^{4,5)} を行うマイクロプレートの開発を行っている。これらの作製には TF-mix の固相表面への付着性と徐放性のコントロールが非常に重要になってくる。

トランスフェクションマイクロアレイ

トランスフェクションマイクロアレイ (transfection microarray) チップは、核酸-リポソーム複合体を含む TF-mix をしきいのない固相面 (ガラス基盤やプラスチックなど) の上に配列させた核酸マイクロアレイチップの一種である (図 1 A, B, E)。筆者らのグループでは最大でスライドガラス 1 枚あたり 1512 スポットのアレイ化を実現している。これによって、細胞の表現型に基づいた大規模分析 (遺伝子のハイスループットスクリーニングなど) 系のミニチュア化ができ、希少な細胞の節約・実験コスト・時間の削減が可能となる。

アレイ状にさまざまな遺伝子を含む TF-mix を固相化するため、核酸が導入される領域をきわめて小さい (直径 300–800 μm) 範囲に限定する必要がある。よって、液体培地が注がれても固相表面から容易に離脱せず (高い付着性)、徐々に細胞に浸透し接触した細胞にのみ核酸が導入される (低い徐放性) よう、固相化される TF-mix の付着性と徐放性をコントロールする。Sabatini らは、プラスミド DNA のチップへの保持剤・徐放剤としてゼラチンを選択しているが、筆者らはこれらの材料に加え、さまざまな ECM がトランスフェクション促進剤・徐放剤として有効であることを確認し、また細胞によって最適な ECM が異なることが分かってきた^{3,4)}。ECM の一つであるフィブロネクチンは、トランスフェクション効率を上げる細胞種が非常にブロードであり、また細胞種によっては、効率を 10 倍以上に増強する。従来のトランスフェクション法では遺伝子導入が困難とされるヒト由来

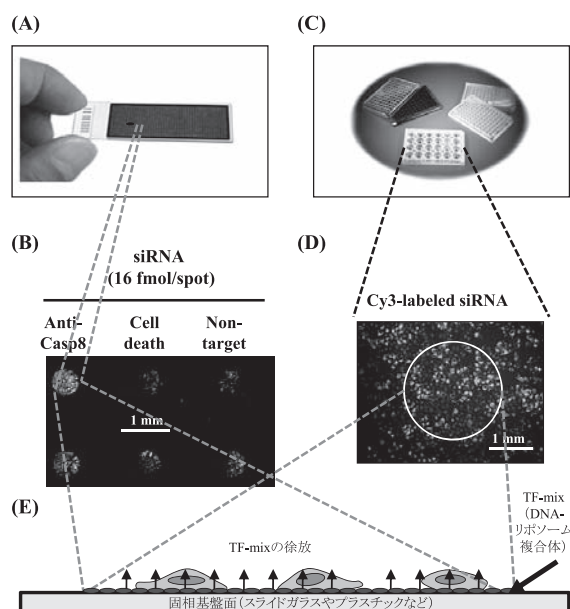


図1. (A) トランスフェクションマイクロアレイチップ, (B) siRNAのリバーストランスフェクション: Caspase 8 遺伝子のノックダウンにより薬剤によるアポトーシスに抵抗したHeLa細胞が染色されている (左上), (C) ウェルで行うリバーストランスフェクション, (D) siRNAが導入されたウェル上の細胞, (E) 固相面からの核酸の徐放 (固相化されたTF-mixが徐放し, 遺伝子が細胞にリボフェクションされる).

間葉系幹細胞にも高効率で遺伝子導入が可能である。フィブロネクチンにはインテグリンレセプターを介してストレスファイバーを誘引し, 細胞付着を促進する作用, エンドサイトーシスを活性化させる作用があり, これらの2つの効果でトランスフェクション効率を高めていると考えられている。また最近の論文では, フィブロネクチンが $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンに結合することで, 細胞に取り込まれ, さらにインテグリン $\alpha 5$ サブユニットのユビキチン化を介したインテグリンの分解と細胞運動の促進が起こることが報告されており, この現象に起因したエンドサイトーシスの活性化がおこっているのかもしれない⁶⁾。一方, フィブロネクチンがトランスフェクションを促進しない例として, ラットPC12細胞があり, こちらの 경우에는コラーゲンIVが有効である⁷⁾。以上のことから筆者らは, 遺伝子導入効率が高く, 広範な細胞種への適用が可能なことから, 最初に選択すべき促進剤としてフィブロネクチンを用いている。製造元間やロット間での性能差が大きいことが, フィブロネクチンを用いる最大の欠点であり, 現在でも明確な解決法がない。筆者らは数10種類のフィブロネクチンのロットチェックを行い, もっとも効率の良いものをバルク注文することで, この問題を解決している。

本手法の手順は非常に簡便である。1 μ lのプラスミドDNA溶液 (1 μ g/ μ l) またはsiRNA溶液 (20–140 μ M) に17 μ lの血清フリーのDMEMを混合し, 続いて2 μ lのLipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen

社製)を加え, 20分室温で静置する。その後, フィブロネクチン (4 mg/ml) を5 μ lを加え, 15 nlずつインクジェット型プリンターで細胞用シャーレやスライドガラスにスポットすればよい。プリンターがない場合は, ピペットチップ (200 μ l用または10 μ l用) の先をTF-mixに浸し, 毛細管現象で吸い上げられた液体を固相面に押しつけることで, 定量性はないものの, 数10 nlの溶液をスポットすることが可能である。

筆者らのプロトコルの詳細は, 書籍⁴⁾にて掲載している。また, Sabatiniらは, ウェブ上にプロトコルを公開しているので参考にされたい⁸⁾。

ウェルで行うリバーストランスフェクション

トランスフェクションマイクロアレイには, 実験系のミニチュア化により, 少ない細胞数で大規模なアッセイが可能というメリットがある一方で, スポット間にしきいがないため, 各スポットに異なる可溶性の薬剤を添加するといった実験には対応できないという問題がある。また現状では, マイクロプレート (24, 96, 384 wellなど) やディッシュを用いた細胞アッセイやスクリーニングが主流で, 分析機器もこれらのフォーマットにフィットするケースが多い。よってマイクロプレートのウェルやディッシュ上に, 固相化できるTF-mixを開発し, 固相面のTF-mixの長期安定化や高効率・低毒性トランスフェクションを実現するメリットは大きい。

上記のトランスフェクションマイクロアレイとは異なり, ウェル内に存在する細胞すべてに対して均一な遺伝子導入を行う必要があるため, 固相化したTF-mixの徐放性を上げ, ウェル表面全体の細胞に対して, 均一に拡散させる必要がある。筆者らは, ポリビニルアルコール (M.W. 500) とデキストラン (M.W. 40,000) をTF-mixに加えることでこの問題を解決した (図1 C D, E)。ポリビニルアルコールは粘性が低く, スポットされたTF-mixがウェル表面の広範囲に広がる。また, デキストランによって, 固相化されたTF-mixの徐放速度が促進され, 固相表面に拡散しながら沈殿する。これらの効果によって, 通常のトランスフェクション試薬を用いる場合と比較して, 1/10から1/100の核酸を固相化するだけで, 均一な遺伝子導入や遺伝子発現の抑制が可能となった。また, 固相化されたTF-mixが少なくとも7ヶ月以上安定で, トランスフェクション効率の低下がほとんど見られないことを確認している^{4,5)}。

以下, 本手法の手順を簡単に述べる。デキストランをブレイコートしたウェルに1 μ lのプラスミドDNA溶液 (1 μ g/ μ l) またはsiRNA溶液 (20–140 μ M) に22 μ lのデキストラン溶液 (4.5 g/l in PBS buffer) を混合し, 続いて2 μ lのLipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen社製)を加え, 20分室温で静置する。その後0.5%のポリビニルアルコールを92 μ l加え, 96 wellでは4 μ l/well, 24 wellは22 μ l/wellという具合に, 使用するウェルの面積に応じて適量を加え, 真空乾燥機内で乾燥させればよい。

siRNA導入を行った場合、どの細胞種においても、ほとんど細胞毒性は見られなかったが、残念ながらプラスミドDNAの細胞への導入において、一部の細胞を除く多くの細胞に対して、細胞毒性が見られた。よって、現状では本手法を用いたプラスミドの導入は推奨していない。本プロトコルの詳細は、書籍⁴⁾にて掲載しているので参考にしていただきたい。

細胞運動能評価への応用

これまで筆者らは、リバーストランスフェクション法を応用し、さまざまな細胞の表現型（アポトーシス、神経分化、細胞運動など）に対応したアッセイ系の開発を進めている。ここで、すべてを紹介することはできないので、最近の成果である細胞運動性評価セルチップ⁹⁾を用いた運動関連遺伝子の大規模スクリーニングについて紹介する。

長らく人間を苦しめている癌において、その死因の9割は「転移」によるものである。切除や放射線を主体とした原発性癌の治療では完全な癌細胞の除去が難しいため、転移抑制剤などにより、残存した癌細胞の転移を抑制することが、今後の癌治療における重要な戦略と言える。転移には、複数のプロセス（運動能の獲得、接着性の喪失、プロテアーゼの産生、間質・血管への浸潤、他臓器への転移）が関与しているため、これまで主に、プロテアーゼ阻害、血管新生阻害などをターゲットとした転移抑制剤の開発が進められてきた。しかし、細胞運動阻害剤の開発はほとんど進んでいない。そこで、血行性転移に関わると考えられる癌細胞の単独運遊走（運動）に関わる遺伝子の大規模スクリーニングを行うチップ（細胞運動性評価セルチップ）の開発を行った⁹⁾（図2）。本チップは、細胞の単独運動の評価を可能にする世界初のチップである。

通常の「トランスフェクションマイクロアレイ」チップと同様にTF-mixをスライドガラスにスポットし、アレイ状に配置する。TF-mixには、遺伝子導入された細胞を可視化する蛍光タンパク質発現用プラスミド、各遺伝子をノックダウンするsiRNA、各スポット領域をスキャナーで容易に規定できるようにローダミンラベルしたフィブロネクチン、核酸の徐放性を抑制しトランスフェクション効率を高めるゼラチンおよびフィブロネクチン、リポフェクション試薬が含まれる。このチップに運動性の高い癌細胞（ラット膀胱癌由来のNBT-L2bなど）を播種するとチップ上で細胞が運動を始める。細胞がスポット上を通過する際に核酸の導入が起こり、蛍光タンパク質の発現、siRNAによる遺伝子のノックダウンが起こる。もし、siRNAによる遺伝子抑制により、細胞運動が抑制された場合、細胞はスポット領域内で停止するが、抑制されない場合、細胞はランダムに直進運動をしなが

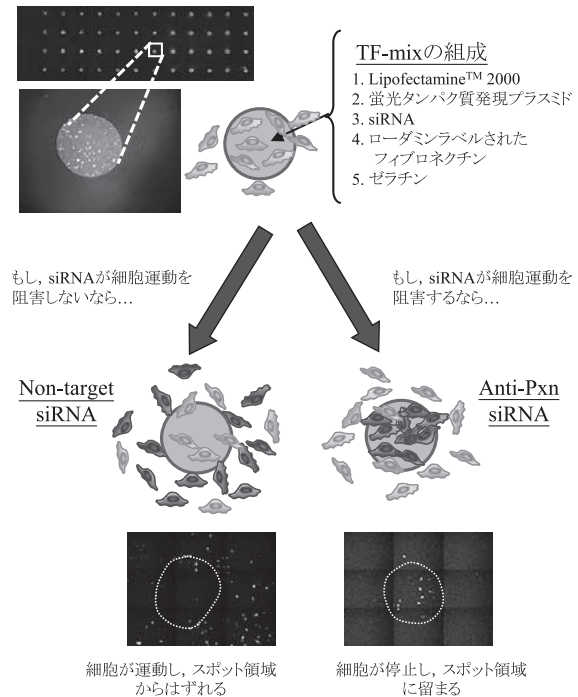


図2. 細胞運動性評価セルチップ

ら、時間経過とともにスポット領域からはずれていく。スポット領域および細胞が蛍光でラベルされているため、DNAマイクロアレイスキャナーを用いて容易かつ大規模に細胞の運動距離を評価することができる。

現在、ラットの全キナーゼに対するスクリーニングを行い、新規の運動関連遺伝子候補について評価している。

本プロトコルの詳細も、書籍¹⁰⁾にて掲載しているので参考にしていただきたい。

本研究はNEDO受託事業「健康安心プログラム・モデル細胞を用いた遺伝子機能解析技術開発/細胞アレイなどによる遺伝子機能の解析技術開発」に基づいて行われた。

文 献

- 1) Ziauddin, J. *et al.*: *Nature*, **411**, 107 (2001).
- 2) Miyake, M. *et al.*: *PCT/US02/09265*
- 3) Yoshikawa, T. *et al.*: *J. Control Release*, **96**, 227 (2004).
- 4) Fujita, S. *et al.*: *Methods in Molecular Biology*, **623**, 197 (2010).
- 5) Fujita, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 429 (2007).
- 6) Lobert, V. H. *et al.*: *Dev. Cell*, **19**, 148 (2010).
- 7) Uchimura, E. *et al.*: *Neurosci. Lett.*, **378**, 40 (2005).
- 8) http://jura.wi.mit.edu/sabatini_public/reverse_transfection/frame.htm
- 9) Onuki-Nagasaki, R. *et al.*: *Lab. Chip*, **8**, 1502 (2008).
- 10) Onuki-Nagasaki, R. *et al.*: *Methods in Molecular Biology*, **629**, 193 (2010).