

固相界面より1細胞に遺伝子を導入する技術

藤田 聡史

はじめに

近年の再生医療，診断治療，創薬開発などの医療技術の発展は目覚ましい。政府は，科学技術イノベーション総合戦略において，医薬品創出，オーダーメイド・ゲノム医療，再生医療を重点的取組み課題として取り上げ，研究推進を進めている。しかし一方で，特に創薬開発分野では，臨床治験における副作用の発現，不十分な奏効性による候補薬剤のドロップアウトなどによる開発コストの増大が問題となっている。近年の医療費高騰を踏まえると，医療経済性を鑑みた「費用対効果の高い医療技術開発」を併せて考慮することが必要不可欠である。

この問題を解決する手段の一つとして，微小電気機械システム (micro electro mechanical systems : MEMS) 技術を応用した生体チップや細胞チップが注目されるようになってきた。マイクロチップやマイクロデバイス基板に生細胞や生体組織を配置し解析することで，低コストで大規模 (high throughput)，多次元 (high content) 解析を行うことを目指している。創薬開発前期の細胞アッセイの効率と正確性を高めることで，開発後期のドロップアウトを抑えることができると期待される。

生体・細胞チップ技術の精度を高めるうえで重要になるのが，組織や細胞の状態や機能を「見る」(output) 技

術である。超解像技術・1細胞解析技術・電気化学・表面プラズモン共鳴 (SPR)・ラマン分光などの検出ハードウェア，高度な検出プローブ設計・細胞画像解析・時系列画像処理などのソフトウェアの両面で開発が積極的に進められている。一方，筆者らのグループではもう一つの要であるさまざまな細胞状態を「創る」(input) 技術を「機能分子を細胞に導入するマイクロアレイチップ」を応用することで開発してきた。「創る」(input) 技術と「見る」(output) 技術とセットにすることで，細胞から得られる知見が飛躍的に広がると期待される。

遺伝子を細胞に導入するマイクロアレイチップ

2001年に私の上司だった産総研の三宅らと米国MITのSabatiniらによって同時期に開発された遺伝子導入細胞マイクロアレイ (transfected cell microarray) は，DNAやsiRNAなど遺伝子をコードする核酸を，ガラスなどの基板にアレイ状にプリントし，その上に接着細胞を播種することで，接着した細胞に核酸遺伝子を取り込ませる技術である^{1,2)}。さまざまな遺伝子をコードする核酸 (DNAやsiRNA) をアレイ化することで，同一チップ上にさまざまな遺伝子を発現あるいはノックダウンした細胞を「創る」ことができる (図1)。

筆者らのグループでは，この技術を基盤としたさまざ

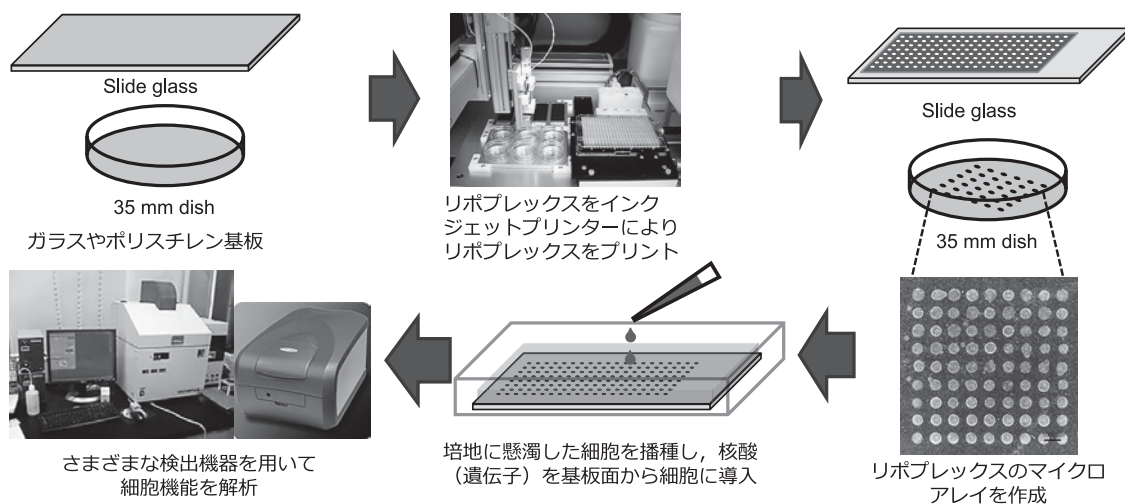


図1. 機能分子を導入する細胞マイクロアレイチップの基本的な構築方法

著者紹介 (国研) 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 (研究グループ長) E-mail: s-fujita@aist.go.jp

まな大規模スクリーニング (high throughput screening) や多次元解析 (high content analysis) 手法を開発し、診断・創薬用ツールとして応用を進めている³⁻⁶⁾。

固相界面から細胞に機能分子を導入する

ガラスやプラスチック基板面を酸素プラズマなどで処理することで、酸素が基板にドーピングされ、負電荷を帯びた界面を作製することができる。この表面に固相化した機能分子を結合させる。カチオン性リポソームに内包した低分子やタンパク質、核酸との複合体であるカチオン性リポプレックスやポリプレックスは、負電荷の界面との親和性が非常に高く、お互いが強固に結合する。酸素のドーピングは必ずしも必要ではないが、カチオン性分子を表面に安定に保持でき、分子が表面から培地中にリークするのを防止する。続いて、細胞の播種を行う。細胞膜の表面は負に帯電しているため、カチオン性分子に覆われた表面に細胞は容易に結合できる。その後、細胞の生命活動により、基板上的分子がエンドサイトーシスや膜融合によって取り込まれる(図2)。

1層の機能分子の固相化では細胞への導入量が不十分な場合は、界面に正電荷、負電荷の表面を持つ分子を交互に重層 (layer by layer) することで固相化する機能分子の量を増やしていくことも可能である。たとえば、核酸の場合は、カチオン性脂質との複合体 (リポプレックス) と生体適合性の高いヒアルロン酸を交互に重層していくことで、細胞に導入する核酸の量を増やすことができる。核酸は、遺伝子という多様な機能性をコードする一方、化学的性質は一定であるため、本技術を適用する

うえで優れた特性といえる。一方、他の機能分子 (低分子化合物、タンパク質) は、表面電荷などの化学的性質が分子種でそれぞれ異なるため、表面への固相化の条件検討を個別に行う必要がある。現在、筆者らは核酸だけでなく、他の機能分子 (タンパク質や低分子化合物など) を細胞に導入する細胞マイクロアレイチップの開発も進めているが、未発表の内容が含まれることもあり、次項では、最近の成果である「1細胞に遺伝子を導入する細胞マイクロアレイ」について解説を進める。

遺伝子導入1細胞マイクロアレイ

従来の核酸を細胞に取り込ませる手法では、細胞膜を透過させるためにカチオン性のリポプレックスやポリプレックスを用いる手法、または電氣的に細胞膜を穿孔する手法 (エレクトロポレーション法) などを用いて、核酸を液相 (培地など) より細胞質に送達させる。一方、固相界面から細胞に核酸を導入する場合、固相化したリポプレックスまたはポリプレックスを細胞との接触面から直接細胞に取り込ませる。これが細胞マイクロアレイを実現する固相化の大きなメリットである。細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれたカチオン性のリポプレックスは、エンドソームに運ばれ、脂質の膜融合により核酸が細胞質に放出される。ポリエチレンイミンなどを用いたポリプレックスの場合、プロトンスポンジ効果により、エンドソームが破壊され、核酸が細胞質に放出される。

ヒトの細胞の大きさは、もっとも大きい卵子で200 μm程度、通常の体細胞で10-100 μm程度の幅がある。1細胞ごとに異なる遺伝子を導入するためには、細胞のサイズと同程度の大きさの核酸の固相化パターンを作製することになる。従来の遺伝子導入細胞マイクロアレイでは500-1000 μm直径の円形のドットパターンだったが、筆者らは、1細胞アレイを実現するために50 μm直径のドットパターンを200 μm間隔で作製することを試みた。

高密度のドットパターンでは、細胞の遊走速度が問題となってくる。ドット上で遺伝子を取り込んだ接着細胞が、短時間の間に容易に隣接するドットに遊走してしまう。よって、細胞アレイを維持するため、細胞運動をドット領域内に閉じ込める必要がある。そこで、ポリエチレングリコール (PEG) をグラフト化した表面に細胞外マトリクス (ECM) タンパク質をアレイ状にドットし、細胞の接着領域パターンの作製を試みた⁷⁾。PEGをグラフト化した表面は、極性を持ち水分子と会合するため、非常に親水的な表面を持つ。PEGは、固相界面を覆い隠すように存在し、これによる体積排除効果が高い。そ

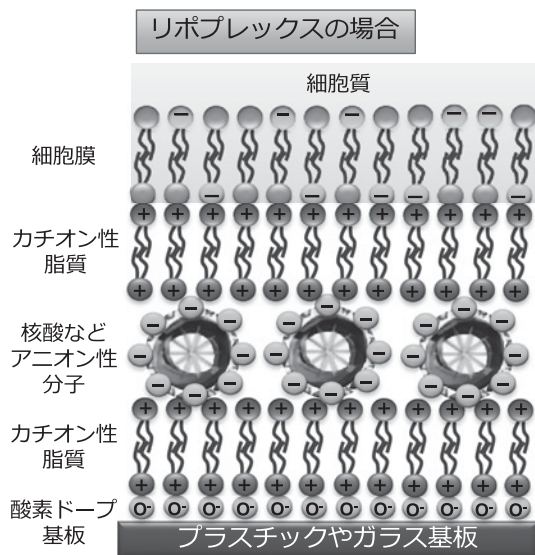


図2. 核酸を細胞に導入する重層表面

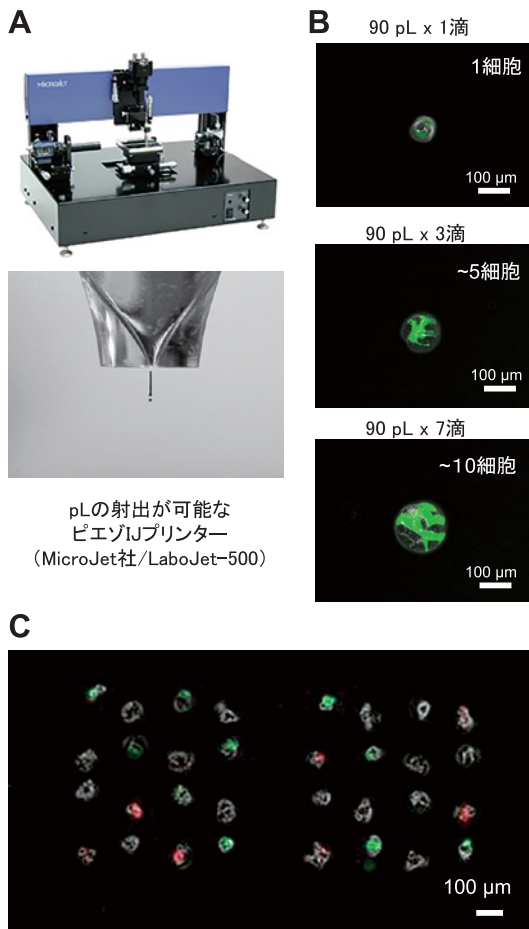


図3. 遺伝子を導入する1細胞マイクロアレイの作製. A: ピエゾ型のインクジェットプリンターによりPEG表面に遺伝子導入パターンを作製する. B: 90 pLの吐出で、1細胞のみがスポット領域に接着し、遺伝子が導入される. C: 異なる2種類の遺伝子（緑色および赤色タンパク質をコードする遺伝子）をマトリクス上に配置.

の結果、細胞の足場となるECMタンパク質が界面に近づけず、吸着が阻害され、同様に細胞の接着も強く阻害される。しかし、筆者らはインクジェットプリンターを用いて、高濃度のフィブロネクチンやコラーゲンなどのECMタンパク質を、PEGをグラフト化したガラス基板表面にドットすることで、PEG上にECMが保持されることを見いだした。さらに、リポプレックスを混合したECMタンパク質でも同様のドットパターンが作製できることを見いだした。

リポプレックスを混合したECMタンパク質を50 μm 直径のドットパターンとしてプリントするには、高精度なインクジェットプリント技術が必要となる。高濃度のECM溶液は粘性が高く、プリントが非常に難しい。検討の結果、プリント時の溶液変性を受けにくいピエゾ素子を用いたMicroJet社のインクジェットプリンターを

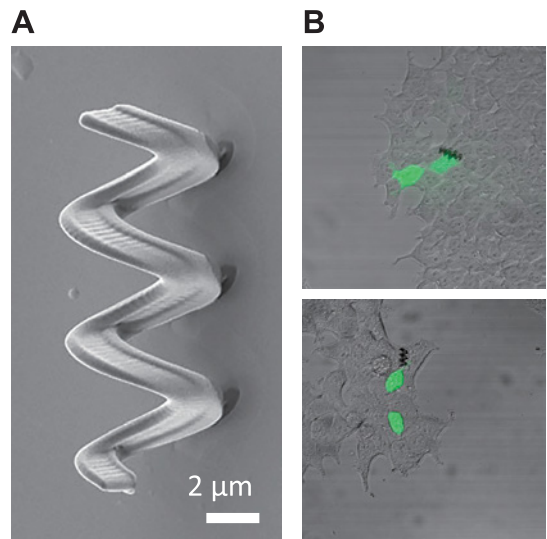


図4. A: 鞭毛型マイクロマシン, B: マイクロマシンで1細胞に遺伝子を導入. 細胞が分裂したため、2細胞に蛍光が観察される.

を用いて90 pLの吐出を行ったところ、50 μm 直径のドットパターンを作製することに成功した(図3A, B).

パターン上にヒト由来がん細胞(HeLa)を播種した所、細胞は表面を転がりながら、ドット上の接着領域に接着し、その界面から遺伝子を取り込み、1細胞に対して、選択的に遺伝子導入ができることを確認した。異なる2種類の遺伝子（緑色および赤色タンパク質をコードする遺伝子）をマトリクス上に配置したところ、各ドット上で、緑色または赤色に蛍光を示す細胞を確認することに成功した(図3C)。

ドラッグデリバリーへの展開

筆者らの固相から分子を導入する技術は、ドラッグデリバリーにも応用可能である。チューリッヒ工科大学(ETHZ)と共同研究を行い、本技術を応用したDDS用のマイクロマシンの開発も進めている。マルチフォトリソグラフィ(DLW)による直接描画により紫外線硬化性エポキシ樹脂を硬化させることで微小な人工鞭毛構造(artificial bacterial flagella: ABF)のマイクロマシンを作製することができる。さらにマイクロマシンをニッケルチタンなどでコーティングすることでヘルムホルツコイルによる磁力で操作することが可能となる。低分子を内包したりポソームや核酸を内包したりポプレックスを、このマイクロマシン上に固相化することが可能であり、最近の研究において、マイクロマシンを磁力でコントロールし、目的の細胞にマイクロマシンを到達させ、1細胞のみに遺伝子や低分子を導入することに成功

した(図4C)^{8,9)}.

以上のように固相面から遺伝子を導入する本技術は、次世代の創薬開発、診断技術、DDS技術の基盤となる技術となり得え、本技術が重要な役割を担うと確信している。

本技術開発は、恩師である三宅正人先生(産総研)、三宅淳先生(阪大)、吉川氏(東ソー)、Voeroes先生(ETHZ)、Nelson先生、Qui氏(ETHZ)をはじめとする先生方のご指導により進めた研究開発です。心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Ziauddin, J. *et al.*: *Nature*, **411**, 107 (2001).
- 2) Yoshikawa, T. *et al.*: *J. Control Release*, **96**, 227 (2004).
- 3) Onuki-Nagasaki, R. *et al.*: *Lab Chip*, **8**, 1502 (2008).
- 4) Yamada, S. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 1493 (2008).
- 5) Enomoto, J. *et al.*: *Sens. Actuators B Chem.*, **190**, 896 (2014).
- 6) Onuki-Nagasaki, R. *et al.*: *BMC Genet.*, **16**, 9 (2015).
- 7) Fujita, S. *et al.*: *Lab Chip*, **13**, 77 (2013).
- 8) Qiu, F. *et al.*: *Sens. Actuators B Chem.*, **196**, 676 (2014).
- 9) Qiu, F. *et al.*: *Adv. Funct. Mater.*, **25**, 1666 (2015).