

細胞遊走を評価するバイオインターフェイスの構築

藤田 聡史*・長崎 玲子・袴田 和巳・長崎 晃

はじめに

「バイオインターフェイス」を学問とした場合の定義は何だろうか？基礎科学的な立場では、「生命機能を界面化学の立場で解明する学問」といえるだろう。一方、工学的立場にも広げるならば、「生体膜を理解し、制御し、再現し、応用する学問」といえるだろう。たとえば、ドラッグデリバリーシステム（DDS）技術の開発（理解に基づく応用）、高機能バイオ界面の開発（制御技術の応用）、バイオミメティクス新材料開発（再現技術の応用）などがあり、ナノバイオ創薬・材料化学・合成生物学などの多様な分野にさまざまな知見を提供することから、筆者は今後特に注視すべき学問領域と考えている。

筆者らは、これまでに接着培養細胞とガラス・シリコン・ポリスチレンなどのバイオ界面を制御することで、機能分子を細胞に導入する技術の開発を進めてきた¹⁻⁵⁾。また、これらの技術を応用したさまざまな細胞アッセイ技術を提案してきた⁶⁻⁹⁾。本稿では、その一つである「細胞遊走」を評価する「遺伝子導入細胞マイクロアレイ（Transfected Cell Microarray: TCM）」チップ技術について紹介したい^{6,9)}。

リバーストランスフェクション法による遺伝子導入

まず、本チップ技術の基盤になるリバーストランスフェクション法を紹介する。培養細胞に核酸を導入する手法として、「リン酸カルシウム法」「マイクロインジェクション法」「エレクトロポレーション法」「ウイルスベクター法」「リポプレックス法」「ポリプレックス法」など多様な手法が知られているが、現在もっとも汎用的に用いられるのは、「リポプレックス法」であろう。

リポプレックス法は、カチオン性脂質と核酸の複合体を用いる手法である。カチオン性脂質は水中で自発的に集合し、疎水部を内側、親水部を外側に向けたベシクル構造（脂質二重膜構造）を形成する。親水部にカチオン性の官能基があるため、負電荷の核酸と結合し、核酸がベシクル構造で挟まれたマルチラメラ構造の複合体（リポプレックス）が形成される¹⁰⁾。通常は、リポプレックスを細胞培養培地中に添加・分散させ、細胞に吸着したリポプレックス内部の核酸遺伝子を細胞膜融合やエンド

サイトーシスにより取り込ませる。一方、筆者らは、固相界面からリポプレックスを細胞に導入する技術（リバーストランスフェクション法）の開発を進めてきた。

リバーストランスフェクション法の開発で重要となるのは、(i) リポプレックスが固相界面に強固に結合すること、(ii) 細胞のバイオ界面と接触により、速やかに細胞内にリポプレックスが取り込まれることである。筆者らは、酸素プラズマによりポリスチレンの表面改質を行い表面に負電荷を付加することで、正電荷を持つリポプレックスがポリスチレン表面に強固に結合することを見いだした⁴⁾。また、表面改質によりポリスチレン表面が親水化し、細胞の接着性が向上する。これは、培地や血清に含まれるさまざまな細胞外マトリクス（ECM）タンパク質がポリスチレン表面に結合しやすくなり、その結果、細胞の接着性が上がることによると考えている。また、フィブロネクチンやコラーゲンなどのECMタンパク質をリポプレックスと混合し配置することで、細胞接着と界面に固相化されたりリポプレックスのエンドサイトーシスが促進されることもわかってきた。

リバーストランスフェクション法の大きなメリットは、固相界面から核酸を細胞に導入するため、特定の領域に接着した細胞にのみ核酸を導入できることである。よって、遺伝子導入領域のパターン、たとえば、TCMチップを作製することができる。TCM技術の詳細は、2016年9月の生物工学会和文誌特集号にて詳細を紹介しているので、参考にされたい¹⁰⁾。

細胞遊走を評価するTCMチップ

近年がん治療が格段の進歩を遂げているが、1981年より日本人の死因の第1位となっている。原発がんは切除により完治が望めるが、転移がんの治療は手段に限られるのが現状である。がんを死滅させる従来型の抗がん剤に加えて、細胞遊走阻害、浸潤阻害、血管新生阻害などを含めた転移抑制を指向した新しいタイプの抗がん剤開発が望まれている。そこで、筆者らは、TCMを用いて細胞の単独遊走に関連する遺伝子をスクリーニングする技術開発を進めた。

細胞遊走の様式には単独遊走と集団遊走の二種類が知られているが、遠隔転移に係る細胞遊走として「単独遊

*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

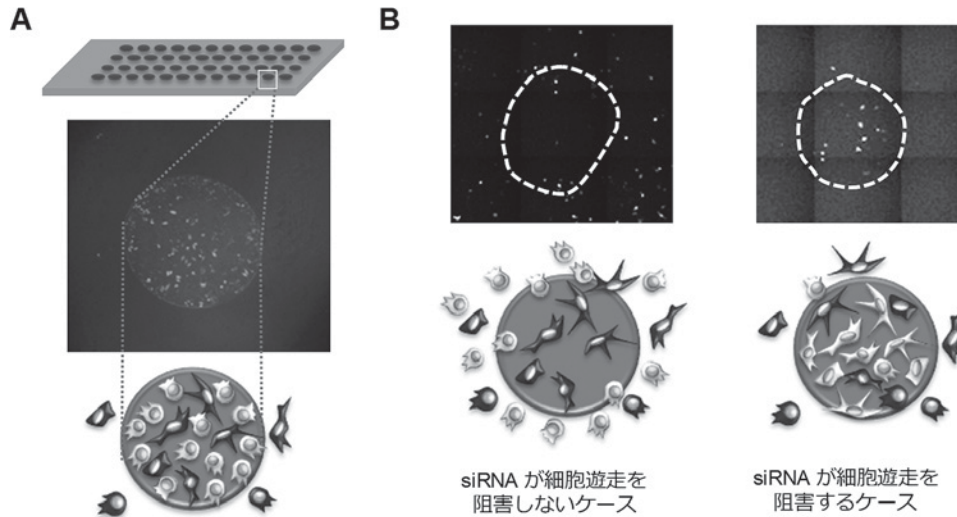


図1. 遺伝子導入細胞マイクロアレイ (TCM) チップを用いた細胞遊走評価の概念。A: 遺伝子導入を行うスポットが配列されたマイクロチップとスポットの拡大図。ラベル化フィブロネクチンは灰色の円形の領域、遺伝子を取り込んだ細胞は白色で示されている。B: 上図の白色のスポットは遺伝子が導入され光る細胞。白色点線はスポット領域を示している。siRNAが細胞遊走を阻害するとスポット内に細胞が留まる。

走」があることが明らかになっている⁶⁾。そこで、細胞モデルを決定するため、I型コラーゲンでコートした表面で遊走性の高い4種類の細胞株を評価したところ、ラット膀胱がん由来のNBT-L2b細胞は、分速2 μm で直線的かつ高速に遊走することが分かり、単独遊走モデルとして使用することとした。

「TCMチップを用いた細胞遊走評価法」は、図1に示す概念と、次に示す手順からなる。まず、緑黄色蛍光タンパク質 (Venus) を発現するプラスミドDNA, siRNA, 赤色蛍光を示すローダミンでラベルしたフィブロネクチン、カチオン性脂質である Lipofectamine 2000TMを混合したリポプレックスを作製し、I型コラーゲンでコートしたスライドガラス上に直径500 μm のスポットを縦4×横13スポット配置し、その上面にNBT-L2b細胞を播種した(図1A)。スポット上を通過した細胞はリポプレックス中のプラスミドと siRNAを界面より取り込み、Venusを発現し、かつ siRNAにより特定の遺伝子がノックダウンされる(図1A中の写真上の白色のドットおよび図1A下の白色の細胞)。もし siRNAが細胞遊走に無関係の遺伝子をノックダウンした場合、細胞はスポット上で停止せず遊走する(図1B左上の白色のドットおよび左下の白色の細胞)。siRNAにより細胞遊走に必須または促進する遺伝子がノックダウンされた場合、細胞遊走がスポット上で停止する(図1B右上の白色のドットおよび右下の白色の細胞)。逆に細胞遊走を阻害している遺伝子がノックダウンされた場合、細胞遊走が加速する(図1B左)。すなわち、緑黄色蛍光を持つ細胞(図1

では白黒写真のため、白色の細胞)がスポットからどの程度拡散しているかを評価することで、細胞遊走に係る遺伝子をスクリーニングすることができる。

本手法を評価するため、すでに細胞遊走に必須と考えられている *Pxn*, *Arp2*, *Arp3*, *Wave2* 遺伝子のノックダウンをモデルとしてTCMチップを作製した⁶⁾。 *Pxn* 遺伝子は接着斑の構成に重要なパキシリンをコードし、*Arp2*, *Arp3*はアクチン重合に係る7つのサブユニットから成る Arp2/3複合体の一部を構成するタンパク質をコードし、*Wave2*はアクチン調整タンパク質をコードすることが知られている。TCMチップ上に配置された siRNAにより上記の4遺伝子の発現をそれぞれ阻害したところ、NBT-L2b細胞の遊走速度が顕著に阻害された。

次に、抗がん剤の標的の半分以上はキナーゼであることから、キナーゼおよびその活性化または阻害因子として知られるタンパク質群(738遺伝子)をターゲットとした1次ハイスループットスクリーニング(HTS)を実施した。評価の手順を、図2に示す。各遺伝子に対して2か所の siRNAをデザインし、1476種類の siRNAを4点ずつ、計5904スポットを複数のスライドガラスチップ上にアレイ化した。また各スライドには、コントロールとしてターゲットを持たない siRNA (non-target siRNA)も同時にアレイ化した。その結果、チップ上でさまざまなキナーゼ関連遺伝子をノックダウンする siRNAを取り込んだ細胞の遊走速度が、non-target siRNAを取り込んだ細胞に対して有意に変化した52遺伝子をスクリーニングすることができた。

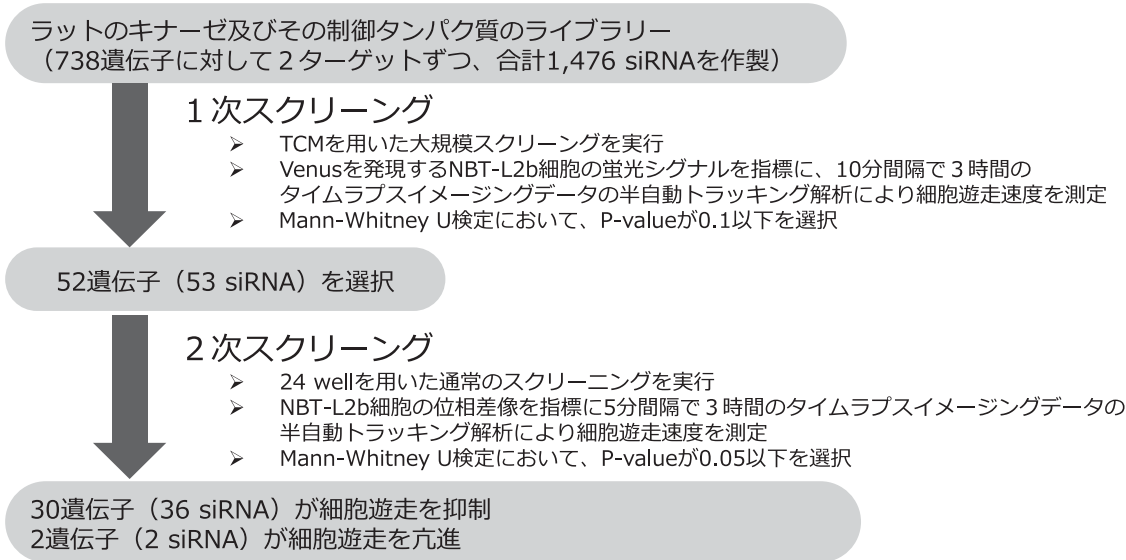


図2. 細胞遊走を評価するTCMチップを用いたHTSスクリーニングの手順

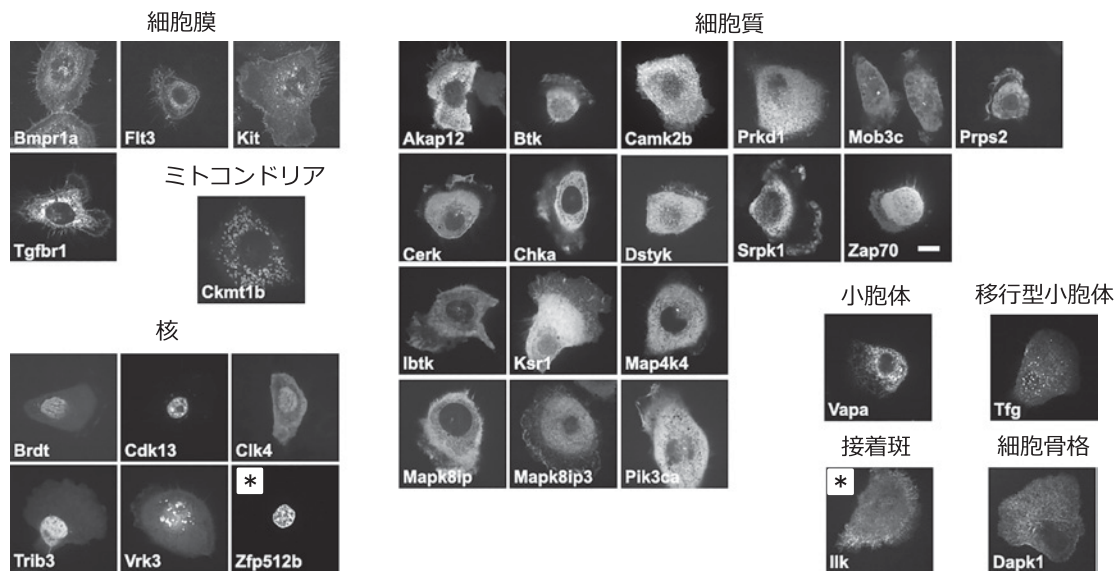


図3. スクリーニングされた32種類のタンパク質の局在性。*マークで示されたタンパク質は遊走阻害、それ以外は遊走を亢進又は必須のタンパク質と考えられる。

次に絞り込まれた52遺伝子について、従来の評価方法に基づいて2次スクリーニングを実施したところ、多くの遺伝子で十分な有意差が得られた。これは、TCMチップを用いた本手法が、1次HTSにおいて非常に有効であることを示している。うち32遺伝子は、Mann-WhitneyのU検定でP値が0.05未満となり、特に有意に遊走が変化することが示された。30遺伝子のノックダウンは、細胞遊走が阻害され、2遺伝子 (*Ilk*, *Zfp512b*) のノックダウンは細胞遊走を亢進した。30遺伝子から発現するタンパク質は細胞遊走に必須または亢進する因子と考えられ、転移抑制剤のターゲットとして有望なP13K/

AKTシグナル、JNKシグナル、ERKシグナルパスウェイに係る遺伝子が多く見つかった。一方、*Ilk* 遺伝子はインテグリンに結合性キナーゼでAKTシグナルの活性化因子、*Zfp512b*はZn fingerタンパク質として知られる。実験結果はこの二つのタンパク質が、細胞遊走を阻害することを示しており、大変興味深い。

スクリーニングされた32遺伝子から発現するタンパク質の細胞内局在性を明らかにするため、それぞれのタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、EGFPとの融合タンパク質の発現プラスミドを構築し、細胞内に導入した(図3)。その結果、細胞膜・ミトコンドリア・

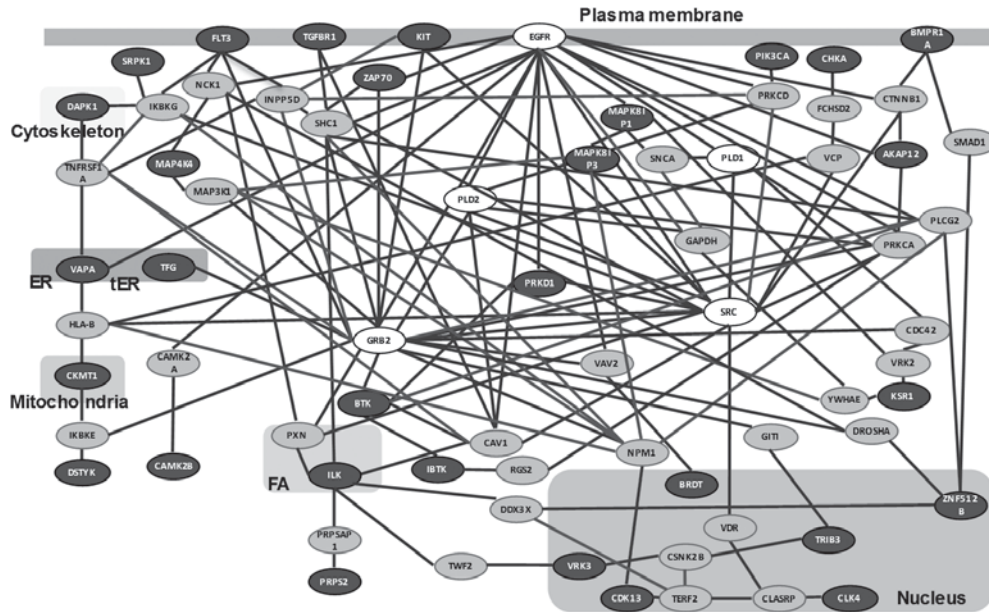


図4. スクリーニングされたタンパク質群の推定相互作用マップ. 黒丸はスクリーニングされた遺伝子. 白丸はPLD1, PLD2, EGFR, GRB2, SRCタンパク質. 灰色丸は推定パスウェイマップ上で新たに見つかったタンパク質.

核・細胞質・小胞体・移行型小胞体・接着班・細胞骨格ときわめて多様な部位に局在することが分かった.

最後にGenome Network Platform Viewer (<http://genomenetwork.nig.ac.jp/index.html>) を用いて、スクリーニングされた遺伝子から発現するタンパク質群の推定パスウェイマップの構築を試みた. しかし、スクリーニングされた32遺伝子産物のみでは情報量が少なく相互作用マップを構築することができなかった. そこで、すでに細胞遊走シグナルハブとして知られるPLD1, PLD2タンパク質と各32遺伝子産物との最短経路解析をしたところ、細胞膜上のチロシンキナーゼ受容体であるEGFR (上皮成長因子受容体)、膜上の成長因子受容体に結合するGRB2、がん原遺伝子で非受容体型チロシンキナーゼとして知られるSRCタンパク質との相互作用が多く示された. そこで最終的にこれらの5遺伝子を加えた37遺伝子との相互作用を示すタンパク質群で、推定パスウェイマップを構築した(図4).

EGFRのリン酸化はERKやAKTシグナルパスウェイと核内での転写活性化を介して、細胞増殖・アポトーシス抑制・浸潤・転移などを誘導することが知られている. 図4で示された細胞遊走に係る遺伝子の多くは、EGFRとその下流パスウェイと相互作用する事から、EGFRシグナルパスウェイをターゲットとした細胞遊走阻害剤の開発は有効かもしれない.

おわりに

本稿では、バイオインターフェイスを制御することで、細胞遊走を評価するTCMチップを構築し、実際に細胞運動に係る遺伝子のスクリーニングが可能であることを示した. 今後、バイオインターフェイスの制御により、さまざまなタイプの細胞チップの開発を進めていきたいと考えている.

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)、上田太郎先生(早稲田大)、吉川智啓氏(東ソー)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) Fujita, S. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 329 (2007).
- 2) Fujita, S. et al.: *Lab Chip*, **13**, 77 (2013).
- 3) Qiu, F. et al.: *Sens. Actuators B Chem.*, **196**, 676 (2014).
- 4) Qiu, F. et al.: *Adv. Funct. Mater.*, **25**, 1666 (2015).
- 5) Fujita, S. et al.: *Biofabrication*, in press (2016).
- 6) Onuki-Nagasaki, R. et al.: *Lab Chip*, **8**, 1502 (2008).
- 7) Yamada, S. et al.: *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 1493 (2009).
- 8) Enomoto, J. et al.: *Sens. Actuators B Chem.*, **190**, 896 (2014).
- 9) Onuki-Nagasaki, R. et al.: *BMC Genet.*, **16**:9 (2015).
- 10) 藤田聡史ら: 生物工学, **94**, 539 (2016).