

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19947

研究課題名(和文) 遺伝子導入を制御するためのマイクロパターン材料の設計と作製

研究課題名(英文) Design and preparation of micro-patterned materials to control gene transfection

研究代表者

陳 国平 (CHEN, Guoping)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・グループリーダー

研究者番号：50357505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロパターン材料を用いてヒト骨髄由来の間葉系幹細胞(MSCs)を培養し、細胞の大きさやアスペクト比、形状、接着面積、伸展面積などの細胞の形態を制御し、細胞形態による遺伝子導入への影響を明らかにした。MSCsの大きさ、アスペクト比と接着面積が大きいほど、遺伝子導入効率は高くなった。また、細胞密度と細胞の巻角度も遺伝子導入に影響を与えた。しかしながら、細胞の形状、伸展面積と巻の向きは遺伝子導入効率に影響しなかった。細胞形態による遺伝子導入への影響は、細胞骨格の集合状態の変化、細胞内の力学的環境の変化とDNA合成活性によると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞への遺伝子導入において、外来の遺伝子をいかに効率よく細胞膜を通過させるかは極めて重要な課題である。これまでの研究開発では、遺伝子キャリアの設計に注目が集まっていたが、遺伝子を取り込まれる側である細胞の制御は非常に重要であるにも関わらず、ほとんど研究されていない。本研究では、細胞自身が外部の物質を取り込む能力に着目し、細胞の大きさやアスペクト比、形状、接着面積、伸展面積などの細胞の形態を制御することで、遺伝子導入の効率を高める要素を明らかにした。得られた成果は外来遺伝子の細胞への効率的な導入方法の開発に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell morphology such as size, aspect ratio, regular geometry, adhesion area and spreading area was controlled by culturing human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on micropatterns. The influence of cell morphology on gene transfection was investigated. The results showed that gene transfection efficiency increased with the increase of cell size, aspect ratio and adhesion area. Cell density and curvature angle also affected gene transfection efficiency. However, cell regular geometry, spreading area and curvature direction showed no influence. The morphological influence on gene transfection efficiency was related to the enhanced uptake of exogenous genes and accelerated DNA synthesis activity.

研究分野：生体材料

キーワード：マイクロパターン 細胞形態 遺伝子導入 幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

細胞への遺伝子導入において、外来の遺伝子をいかに効率よく細胞膜を通過させるかは極めて重要である。これまでの研究開発では、遺伝子キャリアの設計に注目が集まっていたが、遺伝子を取り込まれる側である細胞の制御は非常に重要であるにも関わらず、ほとんど研究されていない。近年、マイクロパターン化技術を利用し、細胞の大きさ、形状、伸展などの細胞形態を制御することにより、細胞骨格及び細胞核の構造を変化させると、細胞の増殖や分化などの機能に影響を与えることが明らかになってきた。そこで、このマイクロパターン化技術を利用して細胞の形態を制御すれば、それによる外来遺伝子の細胞への取り込み及び発現への影響も明らかになると考えられる。ここで得られる知見は、外来遺伝子の細胞への効率的な導入方法の開発につながると期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞の形態を制御するマイクロパターン材料を作製し、それを用いて幹細胞を培養し、マイクロパターンの構造により、細胞の大きさやアスペクト比、形状、接着面積、伸展面積などの細胞の形態を制御する。これによる細胞の骨格や弾性率、DNA合成活性、外来遺伝子の導入効率などを調べ、細胞形態の制御による外来遺伝子導入への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) マイクロパターン材料の作製

まず、ポリビニルアルコール（PVA）と光反応性化合物であるアジド安息香酸をエステル化反応させることにより、光反応性のPVA誘導体を合成した。次に、この光反応性PVAの水溶液を細胞培養用ポリスチレン基板の表面に塗布し、暗所で自然乾燥させた。つづいて、種々のマイクロパターンをもつフォトマスクでこの基板を覆い、紫外線照射によりPVAをポリスチレン基板の表面にグラフト固定化した。未反応のPVAを洗浄除去することによって、細胞培養用ポリスチレンの「島」を細胞が接着しないPVAの「海」で囲ったマイクロパターンが得られた。上記でフォトマスクのパターンを設計することにより、大きさ、アスペクト比、形状、細胞接着面積、及びキラリティーが異なる二次元マイクロパターン材料を作製した。

### (2) マイクロパターン材料の評価

作製したマイクロパターンの構造を位相差顕微鏡で観察した。また、マイクロパターンの微細構造を原子力顕微鏡（AFM）で調べた。ポリスチレン領域に細胞外マトリックスの成分であるフィブロネクチンをコーティングし、抗フィブロネクチン抗体による免疫染色を行った。

### (3) マイクロパターン材料における細胞培養及び細胞の機能解析

マイクロパターン材料でヒト骨髄由来の間葉系幹細胞（MSCs）の培養を行い、マイクロパターンによる細胞骨格の集合状態の変化を調べた。まず、1日間培養した細胞の形態を調べ、マイクロパターンによる形態制御、および細胞骨格の変化を確認した。その方法として、蛍光標識ファロイジンによる細胞骨格アクチンファイバーの染色、4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）による細胞核染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。次に、原子間力顕微鏡を用いたナノインデンテーションにより、細胞の力学特性であるヤング率を計測した。また、細胞への取り込み実験に使われる蛍光標識マイクロ粒子を細胞培養の培地に添加し、マイクロ粒子の細胞内での分布を評価し、細胞形態を制御したときのマイクロ粒子の細胞への取り込みを調べた。さらに、BrdU取り込みによるDNA合成活性を測定した。

#### (4) マイクロパターン材料で培養した細胞への遺伝子導入の評価

マイクロパターン材料でMSCsを培養し、遺伝子導入を行った。培養細胞を生きたまま遺伝子導入の状態を蛍光顕微鏡で観察することのできるGreen Fluorescent Protein (GFP) の発現ベクターを用いて、GFP遺伝子の細胞への導入効率を調べた。GFPの導入効率と項目(3)の結果を比較し、遺伝子導入と細胞の形態制御の関係を調べた。

#### 4. 研究成果

フォトマスクを用いて、光反応性のPVA誘導体を細胞培養用ポリスチレン基板の表面にマイクロパターン状にグラフト固定化した。フォトマスクの設計により、大きさが異なる円形マイクロパターン、面積一定でアスペクト比の異なるマイクロパターン、面積一定で幾何学的形状の異なるマイクロパターン、細胞の接着面積と伸展面積を個別に制御できるマイクロパターン、細胞密度を制御できるマイクロパターン、および面積一定でキラリティーが異なるマイクロパターンをもつマイクロパターン材料を作製した。作製した大きさが20、40、60、80  $\mu\text{m}$ の円形、及び面積(5,027平方 $\mu\text{m}$ )一定でアスペクト比が1:1、2:1、4:1、8:1の楕円形のマイクロパターンの位相差顕微鏡の写真を図1に示す。得られたマイクロパターン材料を位相差顕微鏡で観察したところ、材料の表面にフォトマスクのパターンを反映した細胞接着/非接着パターンの形成が確認された。

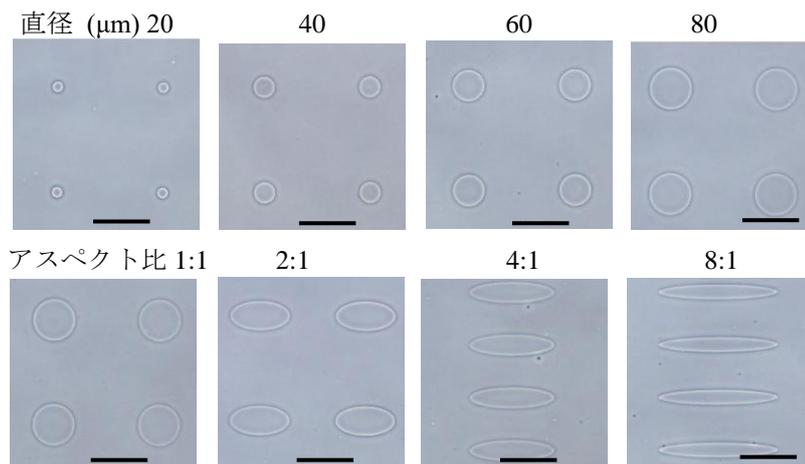


図1. 直径が20、40、60、80  $\mu\text{m}$ の円形とアスペクト比が1:1、2:1、4:1、8:1の楕円形のマイクロパターンの位相差顕微鏡の写真。Scale bar:100  $\mu\text{m}$ 。

また、水中でのマイクロパターン材料の表面をAFMで観察したところ、細胞培養用ポリスチレン基板の細胞接着表面を囲むPVAのグラフト固定化層が確認された。AFM断面像より、水中でのPVAグラフト固定化層の厚みを計測したところ、数十nmであることがわかった。

作製したマイクロパターン材料の表面を20  $\mu\text{g/mL}$ のフィブロネクチン水溶液で37 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間インキュベートすることにより、マイクロパターン材料の細胞接着ポリスチレンの領域(「島」)にフィブロネクチンをコーティングし、「島」のマイクロパターンの細胞接着性をさらに高め、細胞は「島」のマイクロパターンに接着しやすくした。抗フィブロネクチン抗体を用いた免疫染色より、マイクロパターンのポリスチレン領域にフィブロネクチンをコーティングされたことが分かった。

本マイクロパターン材料でMSCsを培養したところ、MSCsはマイクロパターンの「島」領域に従って接着し、種々のパターンの大きさや形状にしたがって伸展していた(図2)。この

ように、細胞の大きさと形状を単一細胞レベルで制御することができた。

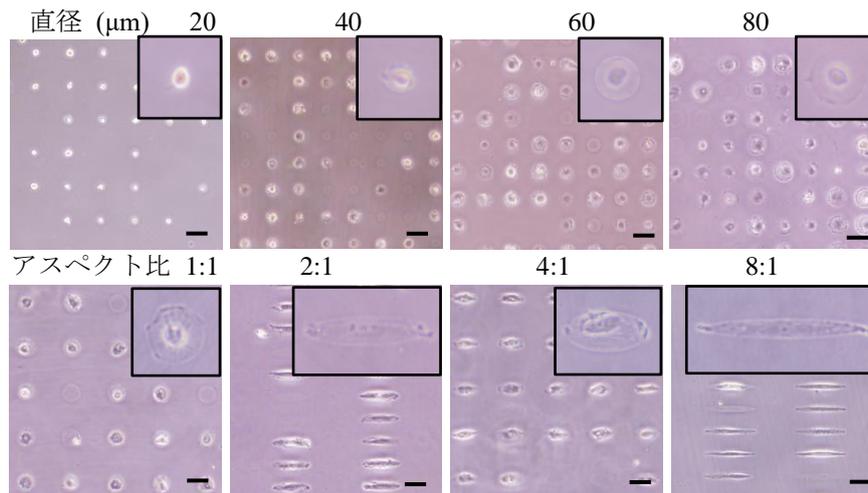


図2. マイクロパターン材料の表面で培養したMSCsの位相差顕微鏡像。挿入写真は細胞の拡大写真である。Scale bar:50  $\mu\text{m}$ 。

細胞骨格アクチンファイバーを蛍光標識ファロイジンで染色した後、蛍光顕微鏡で観察した（図3）。細胞が大きくなるにつれて、より多くのアクチンファイバーが形成された。円形マイクロパターンにおいては、アクチンファイバーは放射状かつ同心円状に集合していた。楕円形のマイクロパターンにおいては、アスペクト比の増大にともなって、アクチンファイバーは楕円の長軸方向に配向した。また、細胞のメカニカル特性、細胞への蛍光標識マイクロ粒子、および細胞核へのBrdUの取り込みをそれぞれ計測した結果、細胞のヤング率、マイクロ粒子の細胞への取り込み量、DNA合成活性は細胞の大きさおよびアスペクト比が増加するにつれて大きくなった。

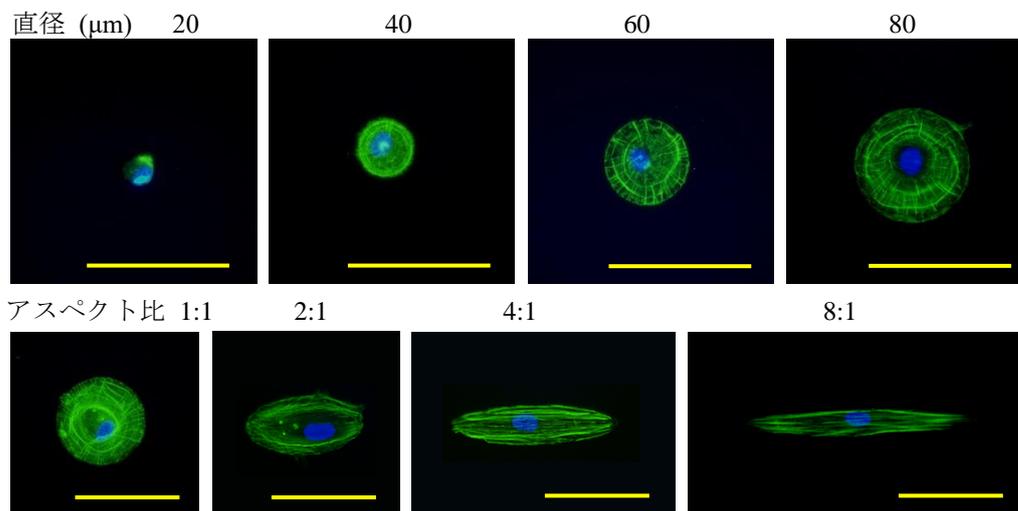


図3. 各種マイクロパターンで培養したMSCsの細胞核とアクチンファイバーを染色した蛍光顕微鏡像。細胞核は青色で、アクチンファイバーは緑色で染色される。Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ 。

さらに、マイクロパターン材料で培養したMSCsに、GFP遺伝子をコードしたプラスミドDNAをリポフェクションした。GFP遺伝子を取り込んだMSCsは緑色の蛍光を発した（図4）。緑色の蛍光を発した細胞の数を数え、全体の細胞数に対する割合を計算することによって、遺伝子導入効率を求めた。その結果、MSCsの大きさやアスペクト比が大きいほど、遺伝子導入効率は高く

なることが分かった (図4)。

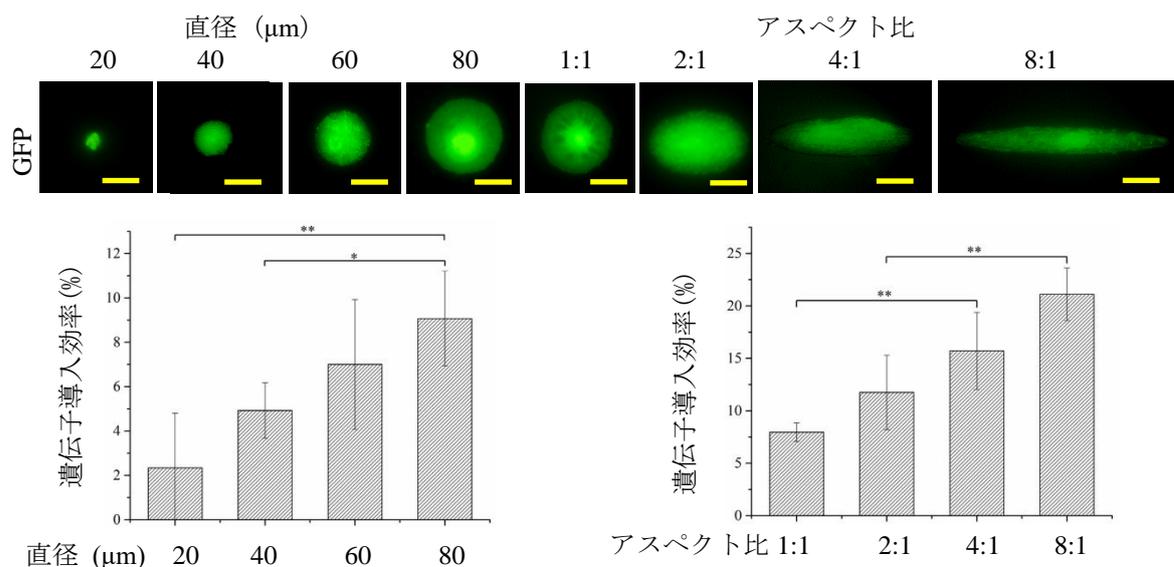


図4. 各種マイクロパターン材料で培養したMSCsへの遺伝子導入後の緑色蛍光タンパク質GFP遺伝子を発現した細胞の蛍光顕微鏡像とGFP遺伝子の導入率 (n = 5, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。 Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ 。

また、面積一定で幾何学的形状の異なるマイクロパターン、細胞の接着面積と伸展面積を個別に制御できるマイクロパターン、細胞密度を制御できるマイクロパターン、および面積一定でキラリティーが異なるマイクロパターンをもつマイクロパターン材料を用いて、同様な実験を行い、細胞形態による遺伝子導入への影響を調べた。その結果、異なる幾何学形状をもつ細胞の周縁部ではストレスファイバーが形成されたが、中央部ではファイバーの形成が妨げられた。細胞接着面積、細胞の巻角度、および細胞密度は細胞骨格に大きな影響を与えることが分かった。他方、細胞の形状、細胞の伸展面積および細胞の巻の向きは細胞骨格にあまり影響しなかった。また、細胞の接着面積、細胞の巻角度、および細胞密度は、細胞のヤング率、マイクロ粒子の細胞への取り込み、DNA合成活性に影響を与えたが、細胞の形状、細胞の伸展面積、細胞の巻の向きはこれらに影響しなかった。さらに、細胞の接着面積、細胞の巻角度および細胞密度は、遺伝子導入効率に影響を与えたが、細胞の形状、伸展面積とマイクロパターンの細胞の巻の向きは遺伝子導入効率に影響しなかった。マイクロパターンによる細胞の遺伝子導入効率への影響は、細胞骨格の集合状態の変化、およびそれに起因する細胞内の力学的環境の変化とDNA合成活性によると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yingjun Yang, Xinlong Wang, Yongtao Wang, Xiaohong Hu, Naoki Kawazoe, Yingnan Yang, Guoping Chen	4. 巻 VOL 9
2. 論文標題 Influence of Cell Spreading Area on the Osteogenic Commitment and Phenotype Maintenance of Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6891-1 ~ 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43362-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yingjun Yang, Xinlong Wang, Xiaohong Hu, Naoki Kawazoe, Yingnan Yang, Guoping Chen	4. 巻 VOL 11
2. 論文標題 Influence of Cell Morphology on Mesenchymal Stem Cell Transfection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 1932 ~ 1941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsami.8b20490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yingjun Yang, Xinlong Wang, Tsung-Chun Huang, Xiaohong Hu, Naoki Kawazoe, Wei-Bor Tsai, Yingnan Yang, Guoping Chen	4. 巻 VOL 6
2. 論文標題 Regulation of mesenchymal stem cell functions by micro-nano hybrid patterned surfaces	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 5424 ~ 5434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8tb01621f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 6件/うち国際学会 12件）

1. 発表者名 Guoping Chen, Xinlong Wang, Yingjun Yang, Naoki Kawazoe
2. 発表標題 Influence of Cell Morphology on Cell Nanomechanics and Gene Transfection Efficiency
3. 学会等名 17th Chinese Biophysics Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Guoping Chen, Yingjun Yang, Naoki Kawazoe
2. 発表標題 Cell Morphology Controlled by Micropatterned Surfaces and Its Influence on Gene Transfection
3. 学会等名 14th International Conference on Materials Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Guoping Chen, Yingjun Yang, Xinlong Wang, Naoki Kawazoe
2. 発表標題 Micropatterned Surfaces for Regulation of Cell Morphology and Functions
3. 学会等名 The 18th Asian Chemical Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Guoping Chen, Yingjun Yang, Xinlong Wang, Naoki Kawazoe
2. 発表標題 Regulation of Stem Cell Functions by Micropatterned Surfaces
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Smart Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Guoping Chen
2. 発表標題 Discrimination of Influence of Cell Adhesion and Spreading Area on hMSCs Differentiation Using Micropatterns
3. 学会等名 TERMIS EU 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陳 国平, ヤン インジュン, 王 永涛, 川添 直輝
2. 発表標題 マイクロパターン化基板による幹細胞の形態及び機能の制御
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Kawazoe, Yingjun Yang, Xinlong Wang, Guoping Chen
2. 発表標題 Gene Transfection into Mesenchymal Stem Cells on Micropatterned Surfaces
3. 学会等名 TERMIS-AP (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yongtao Wang, Yingjun Yang, Naoki Kawazoe, Guoping Chen
2. 発表標題 Regulation of Cell Size, Shape and Elongation on Gene Transfection of Mesenchymal Stem Cells
3. 学会等名 The 19th Asian BioCeramic Symposium (2019ABC) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yongtao Wang, Yingjun Yang, Naoki Kawazoe, Guoping Chen
2. 発表標題 Influence of Micropattern-Dependent Cell Morphology on Gene Transfection of Mesenchymal Stem Cells
3. 学会等名 2nd Glowing Polymer Symposium in KANTO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yongtao Wang, Yingjun Yang, Naoki Kawazoe, Guoping Chen
2. 発表標題 Gene Transfection of Mesenchymal Stem Cells Cultured on Micropatterned Surfaces with Different Shape, Size and Elongation
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yongtao Wang, Yingjun Yang, Naoki Kawazoe, Guoping Chen
2. 発表標題 Regulation of Mesenchymal Stem Cells Transfection through Micropatterned Surfaces
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川添 直輝, ヤン インジュン, 陳 国平
2. 発表標題 幹細胞の機能を制御するマイクロ-ナノ複合パターン化表面の構築
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川添 直輝, 王 新龍, 陳 国平
2. 発表標題 Cellular nanomechanics of stem cells and cancer cells confined to micropatterned surfaces
3. 学会等名 BIOMEDD ' 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川添 直輝、王 新龍、陳 国平
2. 発表標題 Cellular Mechanics of Tumour Microenvironment Cells on Micropatterned Surfaces
3. 学会等名 2018 TERMIS World Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陳 国平、Yingjun Yang、川添 直輝
2. 発表標題 Regulation of Mesenchymal Stem Cell Functions by Micro-Nano Hybrid Patterns
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----