

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23700533

研究課題名（和文） 細胞伸展培養用マイクロデバイスを用いた組織押圧核酸導入法のメカニズム解明

研究課題名（英文） An investigation of mechanisms of the tissue pressure-mediated transfection method using microdevices for cell stretch

研究代表者

清水 一憲 (SHIMIZU KAZUNORI)

京都大学・大学院薬学研究科・特定助教

研究者番号：70402500

研究成果の概要（和文）：我々は物理的な刺激を利用した naked 核酸導入法である押圧法を開発してきた。本研究では押圧法のメカニズム解明を目指して、培養細胞を用いた *in vitro* の研究を行った。押圧法では、押圧した臓器内の細胞に伸展刺激が負荷され、その伸展刺激が何らかの重要な役割を担っていると考えられる。そこで培養細胞に対して伸展刺激を効率よく負荷できるマイクロデバイスを開発し、それを用いて伸展刺激による血管内皮細胞層の物質透過性への影響と伸展刺激による培養細胞への核酸導入効率への影響を明らかにした。その結果、伸展刺激は血液中に投与したネイキッド核酸が血管内皮細胞層を透過することを促進し、押圧した組織におけるネイキッド核酸の分布量を増大させることには関与するが、ネイキッド核酸が細胞膜を突破し細胞内でのネイキッド核酸の分布量を増大させることには大きく関与しないことが示唆された。このように本研究により目標であった押圧法のメカニズムの一部が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We have developed tissue pressure-mediated *in vivo* transfection method for delivering naked nucleic acids. In the present study, we aimed to clarify the mechanism of the tissue pressure-mediated transfection method by *in vitro* experiments. Considering the process of the tissue pressure-mediated transfection method, cells in the pressurized organs/tissues should be stretched and the stretch stimuli may play an important role. Thus, we developed microdevices for cell stretch, and investigated the effects of stretch stimuli on the permeability of the endothelial cell monolayer constructed on the device and on the transfection efficiency of naked plasmid DNAs to the cells cultured on the device. As a results, it was suggested that the stretch stimuli increased the permeability of the endothelial cells transiently. Therefore, the mechanism of the tissue pressure-mediated transfection method was clarified partly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療薬や核酸医薬品を用いた治療は、次世代の医療技術として期待されている。その実現には標的部位特異的な *in vivo* 核酸導入法の開発が必要である。我々の研究グループでは生体臓器への押圧刺激を利用した“組織押圧核酸導入法(押圧法)”の開発を行ってきた。押圧法ではネイキッド核酸溶液を静脈注射後、標的臓器を指などで直接押圧することで、その臓器だけに効率よく核酸導入することが出来る。臓器押圧刺激を用いる点で革新的であり、従来手法とは異なり、ウイルスベクターや核酸導入試薬などの DDS キャリアを用いないため安全性や簡便性などの点で特に優れている。

我々は押圧法の臨床応用を目指してマウスを用いた *in vivo* 研究を進めてきた。その中で以下のことを明らかにしてきた。押圧法が適用可能な臓器と不可能な臓器がある [Mukai ら BBRC 2008]。押圧力の大きさと核酸発現量には相関がある [Mukai ら Human Gene Therapy 2009]。マウス体内埋込型押圧法用マイクロデバイスを開発した [Shimizu ら Journal of Controlled Release 2012]。低侵襲処置が可能な内視鏡搭載型押圧法用マイクロデバイスを開発した [Shimizu ら PLoS ONE 2012]。しかしながら押圧法のメカニズムは未だ明らかになっておらず、今後臨床応用への展開を進めるためには、押圧法のメカニズムを解明することが望まれる。

2. 研究の目的

本申請では押圧法のメカニズム解明を目指して、培養細胞を用いた *in vitro* の研究を行う。我々は押圧法のメカニズムとして次の仮説を立てている：押圧により臓器には伸展刺激が加わる。伸展刺激により血管内皮細胞層の物質透過性が向上し、血中の核酸が組織内に漏出する。また伸展刺激により臓器内細胞は核酸導入されやすい状態になっている。そのため漏出した核酸は、押圧臓器内細胞に効率よく導入される。本研究期間内にこの仮説の検証を行うため、次の2つの目的を設定した。一つ目は、伸展刺激による血管内皮細胞層の物質透過性への影響を明らかにすることである。二つ目は、伸展刺激により培養細胞への核酸導入効率は向上するのかを明らかにすることである。本研究により押圧法のメカニズムが明らかになることで、押圧法の技術改良が可能になり臨床応用への展開が進むと期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞伸展培養マイクロデバイスの開発
培養細胞に伸展刺激を加えることが出来るマイクロデバイスを開発した。まずフォトリソグラフィ技術とソフトモールドニング技術を用いてポリジメチルシロキサン (PDMS) を材料とするマイクロデバイスを製作した。開発したデバイスには主流路と支流路と細胞培養部であるバルーン部がある (図1)。空気圧を印加するとマイクロ流路における圧力損失により、バルーン部の膨張量が制御できる。これによりひとつのデバイス・ひとつの圧力源を用いて、培養細胞に対して多条件の伸展量を負荷可能になった。

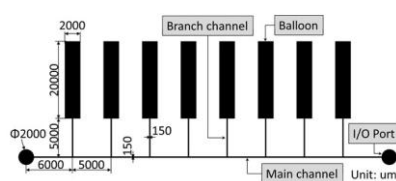


図1. デバイスの設計. 8つのバルーン構造をもつデバイスを開発した。

(2) デバイス上での細胞培養

デバイス上に細胞培養用のウェル (1450 mm²) を作製した (図2)。次に、ウェル内に厚み 100 μm のコラーゲンゲル薄膜 (type I-P, 新田ゼラチン) を製膜し、その上で細胞を培養した。血管内皮細胞の場合は、まず血管内皮細胞培養液 (EBM-2, Lonza) でウェルを満たし、インキュベーター内で一日静置した後に血管内皮細胞の培養を開始した。本実験では正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。3.6×10⁵ 個の細胞をウェル内に撒き、培地交換は毎日行った。ヒト肝ガン細胞 (HepG2)、マウス骨格筋芽細胞 (C2C12) の場合は、薄膜形成直後に細胞を播種した。

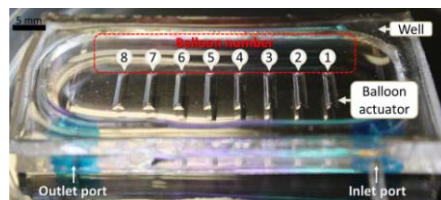


図2. 作製したデバイスの外観. Inlet port より空気圧を印加するとバルーンが膨張する。圧力損失により膨張量はバルーンナンバー1が最大となる。

(3) 物質透過量測定

デバイス上に形成した血管内皮細胞層の物質透過量は次のように測定した。培地を除去した後にリン酸緩衝液 (PBS) で2回洗浄した。FITC-アルブミン溶液 (0.1 mg/ml) をウ

ェル内に加えて 5 分間静置した。伸展刺激の影響を見る場合は、5 分静置した直後に 5 秒間バルーンを膨張させた。その後、再び PBS で 2 回洗浄した後に、コラーゲンゲル内に浸透した FITC-アルブミンを共焦点顕微鏡で測定した (図 3)。

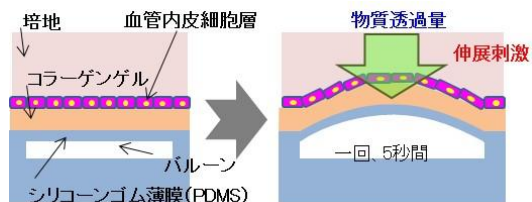


図 3. 物質透過量測定実験

(4) 核酸導入

デバイス上で培養した細胞への核酸導入は次のように行った。培地を除去した後にリン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄した。ネイキッドプラスミド DNA 溶液 (33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -PBS) をウェル内に加えて 5 分間静置し、5 秒間バルーンを膨張させた。その後、5 分間静置し、培地を加え、インキュベーター内に静置した。24 時間後、48 時間後に蛍光顕微鏡で観察し、GFP を発現する細胞数を測定した。

4. 研究成果

まず伸展刺激による血管内皮細胞層の物質透過性への影響を明らかにした。まずデバイス上で血管内皮細胞を 4 日間培養すると血管内皮細胞層が形成されバリア機能を保持することを確認した (図 4)。そこで 4 日間培養してバリア機能を保持した血管内皮細胞層を FITC-アルブミンを曝露した状態で伸展刺激を加え、コラーゲンゲル内に透過した FITC-アルブミン量を測定することで、血管内皮細胞層の透過性への影響を評価した。図 5 に示すように、大きなひずみを加えることにより血管内皮細胞層の物質透過性が上昇する傾向があることが明らかになった。

次に血管内皮細胞層のバリア機能が回復するかどうかを調べた。伸展刺激を印加して一定時間経過後に FITC-アルブミンを加え、透過量を測定した。その結果、伸展刺激を加えて 2 時間以上経過すると FITC-アルブミンの血管内皮細胞層を透過しなかったことから、伸展刺激によって失われたバリア機能は回復するということが示唆された (図 6)。

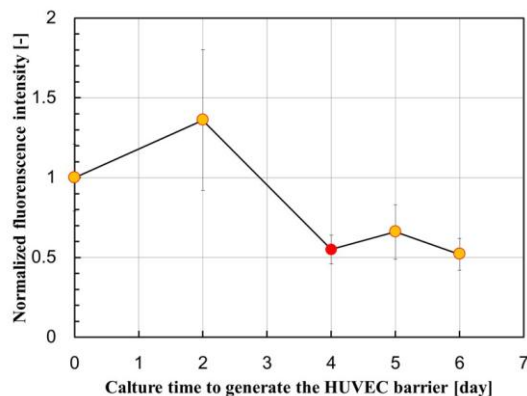


図 4. デバイス上で培養した血管内皮細胞層のバリア機能形成に必要な日数

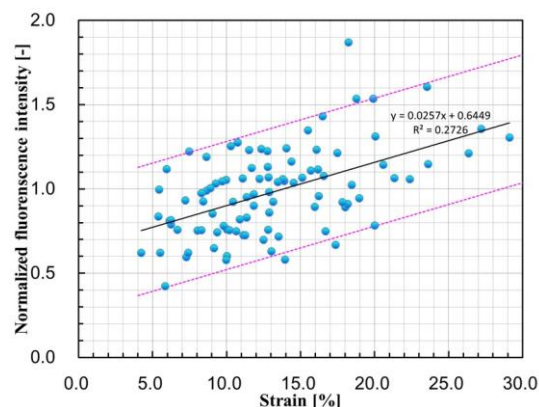


図 5. 伸展刺激量と血管内皮細胞層物質透過量の関係。

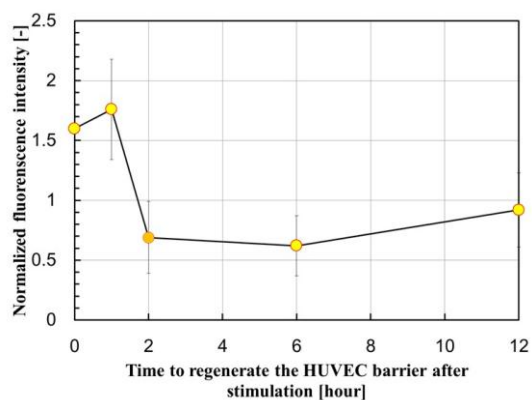


図 6. 血管内皮細胞層バリア機能の回復. 伸展刺激を負荷して 2 時間後にバリア機能が回復した。

次に伸展刺激により培養細胞への核酸導入効率は向上するのかを明らかにした。デバイス上で押圧法が適用できる臓器由来の細胞 2 種 (ヒト肝ガン細胞、血管内皮細胞) と適用できない臓器由来の細胞 1 種 (株化骨格筋筋芽細胞) を培養した。ネイキッド GFP 発現プラスミド DNA 存在下で、デバイスを駆動させ、それらの細胞に対して押圧法と同様の条件 (5 秒間 1 回) の伸展刺激を負荷した。結果として、最大 20% のひずみを細胞に負荷した

場合においても、使用したすべての細胞種においてネイキッドプラスミド DNA の導入効率は向上しなかった。このことから *in vitro* において一過性の伸展刺激のみではネイキッド核酸が細胞膜自体を突破し難いことが分かった。

本研究により押圧法において伸展刺激は、血液中に投与したネイキッド核酸が血管内皮細胞層を透過することを促進し、押圧した組織におけるネイキッド核酸の分布量を増大させることには関与するが、ネイキッド核酸が細胞膜を突破し細胞内でのネイキッド核酸の分布量を増大させることには大きく関与しないことが示唆された。このように本研究により目標であった押圧法のメカニズムの一部が明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

① Shunori, A., Shimizu, K., Hashida, M., Konishi, S.: Mechanical stimulator of cultured vascular endothelial cell for investigation of drug permeability of blood vessel. The 16th International Conference on Solid-state Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers' 11), Beijing, China, 2011 年 6 月 6 日 (月)

② 清水一憲、片野真吾、守法篤、橋田充、小西聡: 血管内皮細胞の物質透過性に対する伸展刺激の影響 化学工学会 第 44 回秋季大会, 東北大学, 2012 年 9 月 19 日 (水)

③ Shimizu, K.: MEMS Devices for Delivery of Nucleic Acid-Based Drugs, 2012 IEEE Nanotechnology Material and Devices Conference (IEEE-NMDC 2012), Hawaii, USA, 2012 年 10 月 18 日 (木)

④ 片野真吾、清水一憲、守法篤、橋田充、小西聡: 圧力駆動バルーンアクチュエータデバイスによる血管内皮細胞における物質透過現象評価, 第 29 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 西日本総合展示場, 2012 年 10 月 23 日 (火)

⑤ 清水一憲: 臓器への物理刺激を利用した遺伝子導入法, 第 25 回日本トレーニング化学会大会, 立命館大学 びわこくさつキャンパス, 2012 年 12 月 2 日 (日)

⑥ 清水一憲: 押圧/吸引圧を利用し

た *in vivo* 核酸導入法への MEMS 応用, 第 4 回ナノバイオ創薬研究シンポジウム, 京都大学, 2013 年 3 月 9 日 (土)

[その他]

ホームページ等

http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/innovative_nanobio/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 一憲 (SHIMIZU KAZUNORI)

京都大学・大学院薬学研究科・特定助教

研究者番号: 70402500

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし