

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630431

研究課題名(和文) 刺激応答性オイルゲルを用いた革新的タンパク質導入技術の開発

研究課題名(英文) Development of protein transfection methods using stimuli responsive gels

研究代表者

通阪 栄一 (Toorisaka, Eiichi)

山口大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：40363543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子導入に代わって、毒性なくタンパク質を機能発現に適したタイミングで細胞内に導入できるオイルゲルの開発を目指した。しかし、オイルゲル表面での細胞培養を検討したところ、培養は可能であるが、ゲルの変成やそれに伴う細胞の観察、回収の難しさが問題となった。そこで、オイル表面での細胞増殖の挙動が確認しやすい油水界面での培養に変更した。油相として不活性液体であり水より比重の思いパーフルオロカーボンに注目し、この液体中にタンパク質を界面活性剤でコーティングした脂溶性集合体を分散させ利用した。この方法により、油水界面で細胞培養及びタンパク質導入が可能であることを発見した。

研究成果の概要(英文)：The cells for cell therapy have been generally prepared by gene transfection and protein expression. However, the gene transfection is difficult to obtain the stable protein expression and high safety. In this study, a Solid-in-Oil (S/O) suspension containing surfactant-coated proteins in oil phase was employed as the protein transfection tool. Since the coated proteins form a lipophilic nanoparticle, they have high compatibility with the cell membrane. Therefore, the S/O suspension induced the acceleration of protein transfection.

研究分野：医用化学工学

キーワード：タンパク質導入 再生医療 界面活性剤 油水界面 ナノ集合体

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療・細胞療法において、細胞内に活性型タンパク質を導入する技術は必要不可欠である。一般的には遺伝子導入で行われているが、癌化の危険性が問題視されている。また、遺伝子導入ではタンパク質が生成されるまで半日以上かかるため、細胞がタンパク質機能を必要とする時期にあわせて発現させることは難しい。そこで、遺伝子導入の代わりに、タンパク質の細胞内直接導入が注目されている。

現在開発されているタンパク質導入剤には遺伝子導入技術が応用されることが多いが、毒性なく機能発現に十分な量を導入できる技術が未だない。また、タンパク質は複雑な高次構造を持ち、種類による表面特性の違いが大きいことから、すべてのタンパク質に対応する導入剤の開発は難しいとされている。

### 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子導入に代わって、毒性なくタンパク質を機能発現に最適なタイミングで細胞内に導入できる、刺激応答性オイルゲルの開発を目指す。

これまでに、脂溶性集合体を封入した油状製剤を開発し、腸上皮細胞層からのタンパク質吸収を大幅に改善することに成功した。これらの成果から、脂溶性集合体を内封した油相 (Solid-in-Oil サスペンション) を細胞膜へ直接接触させることで、効果的にタンパク質を導入できると考えた (図1)。

本研究期間内で、細胞が接着する S/O サスペンション表面 (油水界面) を構築させ、タンパク質を効率的に細胞内へ導入させる。また、その導入のタイミングを制御できる刺激応答性 S/O ゲルを調製し、細胞培養・タンパク質導入が連続的に可能な生体適合性薄層オイルゲルを開発する。

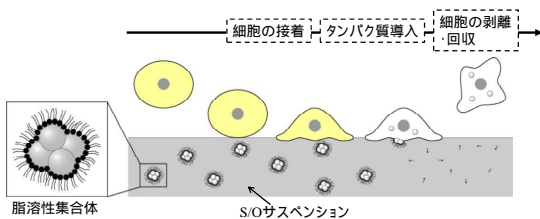


図1 S/O 表面を利用したタンパク質導入プロセス

### 3. 研究の方法

#### (1) パーフルオロカーボン (PFC) / 水界面での細胞培養

フッ素コーティングを行った 60mm ディッシュに 2mL の PFC (FC-40) を添加した。続いてその上部に、界面活性剤を含んだ細胞培地 (Ham's F-12) を 10mL 添加した。この培地中にチャニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) を播種し、インキュベーター内

(37℃, 5% CO<sub>2</sub>) で培養した。培養中の細胞の形態、細胞数を顕微鏡観察で評価した。培地に加える界面活性剤としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、シヨ糖ラウリン酸エステル (L-1695, L195)、シヨ糖エルカ酸エステル (ER-190) を使用した。

#### (2) PFC/水界面でのタンパク質導入

シヨ糖脂肪酸エステルを含むシクロヘキサン溶液 (20mL) と 1mg/mL FITC 修飾 BSA 水溶液 (10mL) をホモジナイザーで高速攪拌することで W/O エマルジョンを調製した。そのエマルジョンを一晩凍結乾燥し調製した脂溶性ナノ集合体を PFC に分散させ S/O サスペンション調製した。細胞培養後の PFC 相に S/O サスペンションを加え、ディッシュをインキュベーター内で 3 時間静置してタンパク質導入を行った。その後、培地を除去し、トリプシン/EDTA 溶液で剥離させた細胞をフローサイトメータで分析し、タンパク質導入量を評価した。

### 4. 研究成果

オイルゲル表面での細胞培養を試みたところ、ゲル表面の変性により、培養状況の確認が困難であった。これを改善するには、オイル、ゲル化剤、培養液組成などの最適化が必要と考えられ期間内での達成が難しいと判断した。そこで、オイルゲルの代わりとして PFC 溶液による S/O サスペンションを調製し、液液界面 (オイル表面) での細胞培養及びタンパク質導入というコンセプトの有用性を確認することを優先し検討した。PFC は水より比重が大きいいため、ゲル化せずに溶液状態での細胞培養、タンパク質導入の評価が可能となる。

#### (1) PFC/水界面での細胞培養

PFC/水界面に CHO 細胞を集積させ、細胞の増殖とタンパク質導入を試みた。まず、PFC と培地の界面での細胞培養を検討した。図2に培養して2日後の細胞の形態を示す。また、比較として、一般的な組織培養用ディッシュ上での培養した細胞の形態を示す。それぞれの細胞を観察したところ、通常使用されるディッシュ表面では細胞が付着後、その運動のため伸展していることが確認された。一方で、PFC 上では細胞の付着性が悪く、また球状で存在しているものが多く、そのため良好に増殖せず細胞数も少なかった。

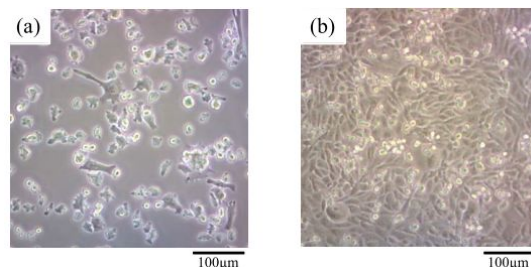


図2 異なる足場での細胞培養  
(a) 組織培養用ディッシュ, (b) PFC

そこで、PFC/水界面への細胞附着性を改善するために、界面活性剤の添加を検討した(図3)。アニオン性界面活性剤である SDS を培地に添加したところ、細胞の増殖速度の向上がみられたが、PFC 表面での伸展がほとんど観察されず、活性が低い状態であることが予想された。続いて非イオン界面活性剤としてショ糖ラウリン酸エステル L-1695 を使用した。この時、多少細胞の伸展が観察されたが、増殖の向上は確認できなかった。同様なショ糖ラウリン酸エステルであるが親油性界面活性剤である L-195 を添加したところ、細胞増殖の向上、細胞の伸展が観察され、活性に大きく影響することが確認された。そこで、アルキル鎖長の異なるショ糖エルカ酸エステル ER-190 を使用したところ、さらなる改善が確認された。

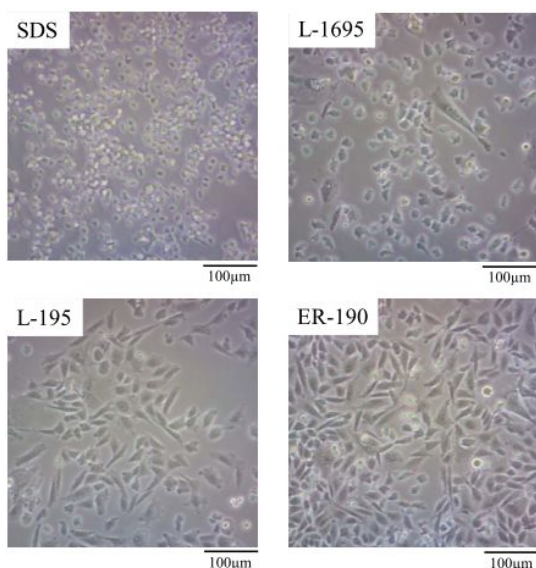


図3 細胞接着への界面活性剤添加の影響

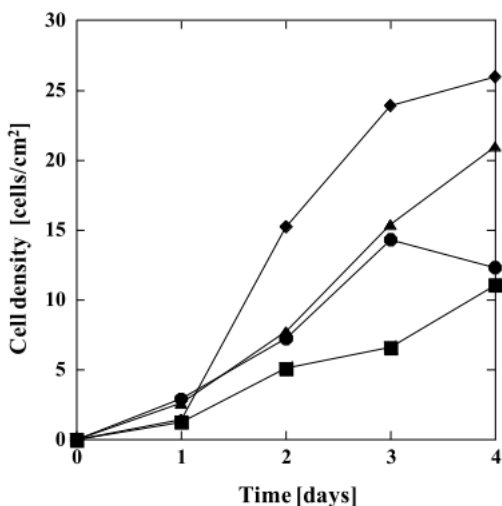


図4 細胞増殖への界面活性剤の影響  
 (○) Surfactant free, (□) ER-190,  
 (△) L-195, (◇) L-1695

これらの界面活性剤の影響を、細胞の増殖挙動で評価した(図4)。親水性界面活性剤が増殖を阻害しているのに対し、親油性界面活性剤は増殖を促進させていることが分かる。これは、親油性の界面活性剤が、細胞が付着の際に必要なとされる PFC 表面へのタンパク質の吸着を誘導する効果があるためだと考えられる。

#### (2) PFC/水界面でのタンパク質導入

続いて、界面に付着した細胞へのタンパク質導入を検討した。蛍光色素を修飾したタンパク質を用いて、導入後の細胞内蛍光強度を分析することで、脂溶性集合体のタンパク質導入への効果を評価した(図5)。脂溶性集合体を PFC に分散させることで細胞の蛍光強度が大きく上昇することから、PFC の S/O サスペンションに細胞を接触させることでほとんどの細胞へタンパク質が導入されたことが確認された。また、脂溶性集合体は細胞膜への親和性が高いため培地に分散させた場合でもタンパク質導入が可能であったが、S/O サスペンションを用いた方がより効率が良いことも確認された。

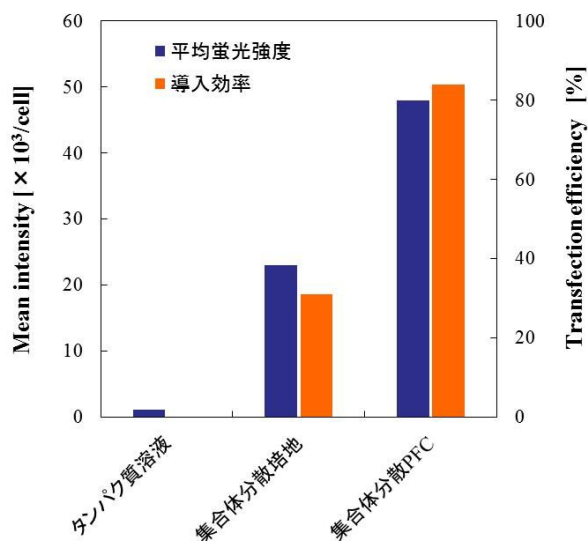


図5 タンパク質導入効率の比較

本研究では、脂溶性ナノ集合体がタンパク質の細胞内導入に有効であることを確認した。そのために PFC を基剤とした S/O サスペンションを用いたが、集合体の分散性は低かった。したがって、水/PFC 界面での細胞培養、タンパク質導入の効率を向上するためには、PFC へ溶解性の高い界面活性剤の選択が必要となる。一方で当初予定していたオイルゲルの利用にはオイルゲル表面の変性による評価の困難さを克服する必要がある。今後、それぞれの課題を克服し、細胞療法に応用できる技術への展開を目指す。

## 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 3件)

1. 萩原克樹, 通阪栄一, 膜融合ナノ粒子を用いた動物細胞へのタンパク質導入, 化学工学会中国四国支部・関西支部合同支部大会, 2015年12月12日, 岡山大学(岡山県岡山市)
2. Katsuki Hagiwara, Eiichi Toorisaka, Protein transfection into mammalian cells with membrane fusion nanoparticles, The 2<sup>nd</sup> international symposium on technologies for a safe and environmental friendly society, 2015年11月28日, 山口大学(山口県宇部市)
3. 萩原克樹, 通阪栄一, 液/液開演を利用した細胞培養とタンパク質導入の検討, 日本膜学会第37年会, 2015年5月14日, 早稲田大学(東京都新宿区)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

通阪 栄一 (TOORISAKA, Eiichi)  
山口大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号: 40363543