

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03472

研究課題名(和文)機能分子を導入する細胞マイクロアレイ技術の創成

研究課題名(英文)Cell microarray for introduction of functional molecules

研究代表者

藤田 聡史(FUJITA, SATOSHI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副ラボ長

研究者番号：00392655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々な特性を持つ機能分子をガラススライド等の表面上に固相アレイ化し、これらの機能分子を固相表面から細胞に導入する「機能分子を導入細胞マイクロアレイ技術」の開発を行った。まず多数の分子の固相領域をマイクロアレイ状に配置し細胞を接着させるための基板のコーティング法を開発した。続いて、すでに確立した核酸の細胞への導入技術に加えて、タンパク質(酵素)、低分子などの多様な機能分子の固相化・細胞導入技術を開発した。また、固相面から細胞に機能導入をする事が難しいと考えられた浮遊細胞について、細胞をゲルのドームに封入することで、浮遊細胞の配置を可能とする細胞アレイの作成方法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本技術を基盤として新しいIn vitro評価系(創薬ターゲットスクリーニング、毒性・薬効評価)の確立、ゲノム編集基盤、人工複合組織チップモデルの構築への展開が可能であり、今後の創薬開発・診断技術の基盤として意義のある技術である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed “cell microarray technology for introducing functional molecules into cells”. Functional molecules including nucleic acids, proteins (enzymes) and small molecules were attached and arrayed on the surface of glass substrate. At first, we developed the method for coating substrate to enhance adhesion of cells and efficiency of introduction of functional molecules. Subsequently, in addition to the already established technology for introducing nucleic acids into cells, we have developed a technology for introduction of various functional molecules such as proteins (enzymes) and small molecules. In addition, for non-adherent cells that is difficult to introduce functions into the cells from the solid surface, we made novel method for introduction of small molecules into non-adherent cells by encapsulating the cells in a gel dome.

研究分野：バイオチップ、細胞工学

キーワード：細胞マイクロアレイ デリバリー タンパク質 ヒドロゲル

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、固相界面（ガラス、ポリスチレンなど）に核酸遺伝子（プラスミドや siRNA など）を固相化し、その上面に接着した細胞に遺伝子を導入する技術開発を進めてきた。新たな固相化法として最近、基板をプラズマ処理する事で、負電荷を帯びた固相界面を作成し、カチオン性リポプレックスを非常に強固に表面に結合させる技術を確認した。この静電的相互作用は非常に強力であり、流動する液体培地中でも結合が非常に安定である。その表面に細胞を接着させると、

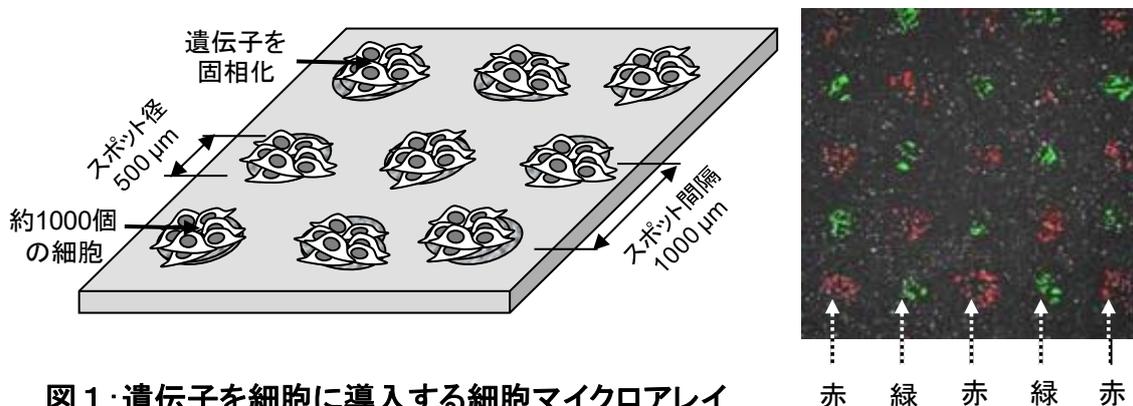


図1: 遺伝子を細胞に導入する細胞マイクロアレイ

異なる核酸遺伝子や siRNA をアレイ状に固相化し、その上面に細胞を播種し、細胞の接着界面より遺伝子を導入する。遺伝子は固相面に強く結合しているが、細胞が接着すると細胞に取り込まれる。右図は、赤または緑の蛍光タンパク質を発現する遺伝子を5x5でモザイク状の配列して細胞に導入した様子。

リポプレックスとの膜融合やエンドサイトーシスにより核酸が容易に細胞内に取り込まれる。申請者は、この核酸固相化技術を応用し、細胞への遺伝子導入領域マイクロパターンを自在に作製する技術の特許化し、遺伝子導入細胞マイクロアレイ (Transfected Cell Microarray: TCM) の開発 (図1) や、1細胞ドラッグデリバリーを可能にするマイクロマシンの開発を進めてきた。特に TCM チップ技術ではインクジェットプリンターを用いた核酸の新規マイクロアレイパターン作製法を開発し、世界最小の核酸結合パターン (直径 50 μm) 上に細胞を接着させ、1細胞毎に異なる遺伝子を導入する事に成功した (図2)。

申請者は、本技術開発をさらに進める事で、核酸のみならず、タンパク質・酵素・低分子化合物など様々な機能分子についても固相基板面から細胞に導入できる可能性に思い至った。「様々な機能性タンパク質や低分子化合物が細胞に与える影響の解析やその作用機序」、「ゲノム編集酵素によるゲノム機能解析などへの応用」が期待され、核酸遺伝子に加えて、酵素・タンパク質・低分子化合物を固相面から細胞に導入する技術を体系化する意義は非常に大きい。しかし、タンパク質や酵素は核酸とは異なり、種類によって様々な表面電荷を持つ上、結合活性や酵素活性を維持したまま基板上に長期間固定化する技術開発が必要となる。また、機能性低分子化合物の場合は、疎水性の分子である事も多く、細胞膜を容易に透過するため徐放制御の工夫が必要となる。従って、従来の遺伝子導入細胞マイクロアレイ (TCM) とは異なる表面化学的アプローチや表面構造設計戦略が必要となる。

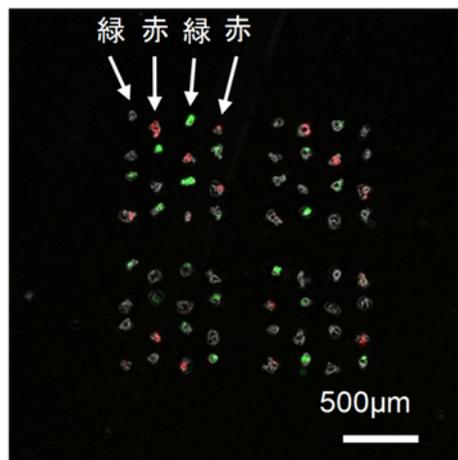


図2: 遺伝子導入1細胞マイクロアレイ

1細胞を8x8で配置した1細胞マイクロアレイ。その固相面から1細胞に赤色または緑色蛍光タンパク質を発現する遺伝子を導入した。1細胞ごとに異なる遺伝子が過剰発現しているのが確認できた。

## 2. 研究の目的

本研究開発では、核酸・酵素・タンパク質・低分子化合物など、様々な特性を持つ機能分子をガラススライドや細胞培養用ポリスチレンディッシュ等の表面上に固相アレイ化し、これらの機能分子を固相表面から細胞に導入する高密度、高精度、世界初の「機能分子を導入細胞マイクロアレイ技術の創成」を目的とする。

具体的には、まず多数の分子の固相領域をマイクロアレイ状に配置し細胞を接着させるための基板のコーティング法を開発する。続いて、すでに確立した核酸の細胞への導入技術に加えて、タンパク質、酵素、低分子などの多様な機能分子を固相化し、その固相面に接着した細胞にこれらの機能分子を導入する技術を開発し、その技術を浮遊細胞にも拡張する。

### 3. 研究の方法

(1) 多数の分子の固相領域をマイクロアレイ状に配置し細胞を接着させるための基板のコーティング法を開発

細胞に機能分子を導入するためには、分子が基板に強固に結合し、細胞が接着した時、分子がリリースして細胞内に取り込まれる技術開発が必要である。そこで、申請者らは、細胞を接着させる各種 ECM の検討、物質の徐放や基板上の安定性に関わる多糖類や乳酸ポリマーの検討、細胞導入効率に関わるポリイオン複合体の検討を行った。

(2) タンパク質（酵素）を導入する細胞マイクロアレイの開発

タンパク質や酵素は核酸とは異なり、種類によって様々な表面電荷を持つ上、結合活性や酵素活性を維持したまま基板上に長期間固定化する技術開発が必要となる。そこで、複数のモデルタンパク質（酵素）のマイクロアレイを作成し、その基板上に細胞を播種し、効率よくタンパク質を細胞内に導入する事を可能にする「細胞マイクロアレイ」の作成条件の検討と評価を実施した。

(3) 低分子を導入する細胞マイクロアレイの開発

低分子を徐放するため乳酸ポリマーを用いて低分子の徐放を可能にする細胞マイクロアレイの作成を行い、その性能を評価した。

(4) 浮遊細胞に機能分子を導入する細胞マイクロアレイの開発

細胞をゲルのドームに封入することで、浮遊細胞の配置を可能とする細胞アレイの作成方法の開発を試み、同マイクロアレイの性能を評価した。

### 4. 研究成果

(1) 多数の分子の固相領域をマイクロアレイ状に配置し細胞を接着させるための基板のコーティング法を開発

フィブロネクチンなどの ECM は細胞接着性を向上させるものの、タンパク質の導入効率にはほとんど影響しないことが示される一方、核酸の効率を十分向上させた。乳酸ポリマーは、生分解速度を決める乳酸とグリコール酸の割合と分子量が非常に重要である事が示された。ポリイオン複合体では、PEI などのポリプレックスと比較して、リポプレックスが核酸・タンパク質ともに導入効率が高かった。一部の多糖類は基板上のタンパク質の安定性を向上させたが、培地への可用性があがるため、マイクロアレイの解像度を悪化させた。

(2) タンパク質（酵素）を導入する細胞マイクロアレイの開発

4 種類の特性が異なる酵素についてそれぞれアレイ化した酵素を細胞に導入する細胞マイクロアレイを作製し、それぞれ固相面から細胞に導入し、酵素を細胞内で機能発現させる事に成功した。また、3 種類の酵素の導入効率を促進できると考えられるポリプレックス、リポプレックス化合物について混合条件の検討を行った。酵素がアレイ化されたチップ上で酵素活性が保持されるかについての検討もを行い、多糖類を添加物として用いる事で酵素活性が長期間保持され、細胞内に導入された際、活性が保たれる事が分かった。

(3) 低分子を導入する細胞マイクロアレイの開発

生分解性ポリマー（乳酸グリコール酸コポリマー）を試験管に添加し、120°C に加温する事で溶解し、さらにモデル低分子化合物としてカルセイン AM 又はパクリタキセルを添加した。続いて、内径 0.5mm の中空糸の末端を生分解性ポリマーの溶解液に浸し、ポンプを用いて中空糸内に溶解したポリマーと低分子化合物の混合液を中空糸内に充填した。充填済みの中空糸を複数アレイ状に配列し、樹脂で固定し、金太郎飴のように樹脂を水平方向に複数切断する事で、中空糸アレイチップを複数作製した。最後に、接着細胞のチップ上への播種を行った。中空糸内の低分子化合物は、ポリマーの分解に従って徐放され、接着した細胞に作用する事から、化合物に対する細胞応答の評価を行った。カルセインおよびカルセインレッドを中空糸内に充填した細胞マイクロアレイを構築し、その

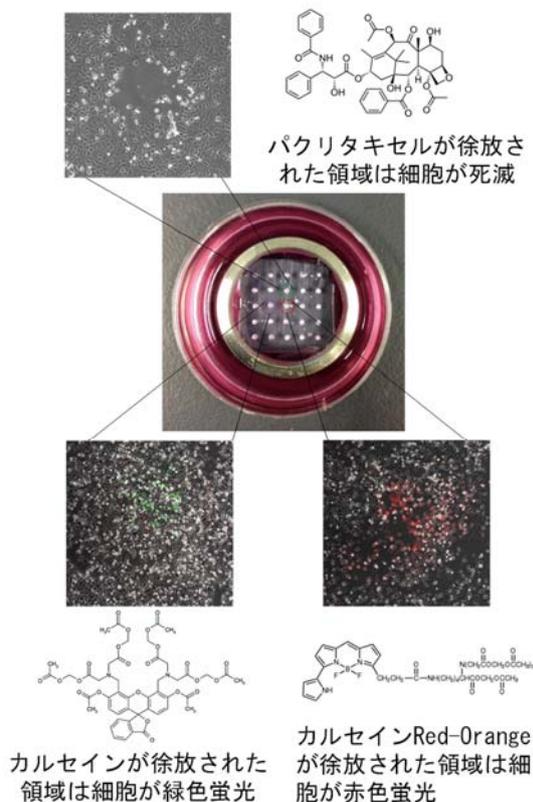


図 3 : 3種の低分子化合物の徐放

上面に細胞を播種した所、中空糸上の細胞がそれぞれ緑色および赤色の蛍光を示した。細胞毒性は低いレベルに抑えられた。パクリタキセルを中空糸内に充填した細胞マイクロアレイを構築し、その上面に細胞を播種した所、中空糸上の細胞が死滅した。以上のモデル研究結果により、低分子化合物を徐放する細胞マイクロチップの構築が可能である事を示した (図3)。

#### (4) 浮遊細胞に機能分子を導入する細胞マイクロアレイの開発

アルギン酸を  $\text{Ca}^{2+}$ により架橋して得られるアルギン酸ゲルをヒドロゲルとして用いた。基板として用いるアミノ基修飾ガラスをアルギン酸ナトリウム、水溶性カルボジイミドを含む緩衝溶液に含浸してアルギン酸を表面に修飾した。浮遊細胞とゼラチン、 $\text{CaCl}_2$  水溶液を含んだ細胞培養培地をガラス基板に直径約 1 mm でスポットした。その溶液を冷やしてゲル化させ、アルギン酸を含むリン酸緩衝液 (PBS) に含浸した後、加温することで内部のゼラチンゲルを溶解させ、直径約 2.5mm のアルギン酸ゲルドームを作製した (図4)。

アルギン酸で基板を修飾する事で、ゲルドームの接着性は大きく向上し、ドーム内で長期間の培養が可能となった。ドーム内の細胞毒性は低く、1 週間の培養において、細胞がダメージを受ける事なく、増殖する事が分った。また、異なる低分子化合物をそれぞれのアレイから導入出来る事も確認した。また、これまで手作業で行ってきた酵素架橋ゲルドームの作成について、インクジェット式プリンタを用いて自動化した。

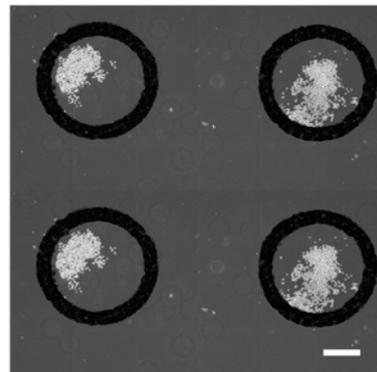


図4:ドーム内の浮遊細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toita, R., Fujita, S., Kang, J-H	4. 巻 67
2. 論文標題 Macrophage uptake behavior and anti-inflammatory response induced by liposomes containing bovine brain- or soybean-derived phosphatidylserine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 1131-1135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.5650/jos.ess18097">https://doi.org/10.5650/jos.ess18097</a>	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 Enkhtuul Gantumur, Miyu Kimura, Masahito Taya, Masanobu Horie, Makoto Nakamura and Shinji Sakai	4. 巻 12
2. 論文標題 Inkjet micropatterning through horseradish peroxidase-mediated hydrogelation for controlled cell immobilization and microtissue fabrication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 11001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1088/1758-5090/ab3b3c	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 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 藤田 聡史
2. 発表標題 タンパク質トランスダクション細胞マイクロアレイ作製の試み
3. 学会等名 最新バイオインターフェース研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 聡史
2. 発表標題 臓器チップ開発の動向と目指すべき方向性
3. 学会等名 第401回CBI学会研究講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 聡史
2. 発表標題 経済省の戦略的産業育成～バイオ産業を実例として～
3. 学会等名 化学工学会バイオ部会・平成30年度インフォーマルミーティング（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 聡史、藤原 央之、戸井 田力、田谷 正仁、境 慎司
2. 発表標題 ヒドロゲルドームを配列した浮遊細胞アレイの開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujita, S., Fujiwara, H., Toita, R., Taya, M., Sakai, S.
2. 発表標題 Cell Microarray for Non-Adherent Cells Encapsulated by Hydrogel Dome
3. 学会等名 Biointerfaces International 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujiwara, H., Toita, R., Taya, M., Sakai, S., Fujita, S.
2. 発表標題 Hydrogel dome cell-arrays for non-adherent cells
3. 学会等名 BIOSENSORS 2018 28th Anniversary World Congress on Biosensors (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 聡史
2. 発表標題 細胞・組織マイクロチップデバイス～細胞組織の機能解析へのアプローチ～
3. 学会等名 第105回ニューフロンティア材料部会例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 聡史、長崎 玲子、生田 健次郎、原雄 介
2. 発表標題 低分子化合物を徐放する細胞マイクロアレイの構築
3. 学会等名 第24回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田 聡史
2. 発表標題 Organs on a chip研究の世界最新動向
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田 聡史
2. 発表標題 固相界面より機能分子を細胞に導入する技術とその応用
3. 学会等名 CBI学会2017年大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fujita, S.
2. 発表標題 Intracellular Delivery of Functional Molecules on Cell Microarrays.
3. 学会等名 YABEC 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fujita, S.
2. 発表標題 Efficient Intracellular Delivery of the Functional Molecules on Cell Microarray
3. 学会等名 IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田 聡史
2. 発表標題 細胞を操作検出する技術の応用展開
3. 学会等名 平成29年度第4回「メディショナルナノテク研究会」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 聡史
2. 発表標題 低分子を徐放する中空系配列型細胞マイクロアレイ
3. 学会等名 第17回 LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原央之、戸井田力、境慎司、田谷正仁、藤田聡史
2. 発表標題 ヒドロゲルを用いた浮遊細胞マイクロアレイ技術の開発
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原央之、境慎司、戸井田力、中畑雅樹、田谷正仁、藤田聡史
2. 発表標題 ヒドロゲルドームを配列した浮遊細胞アレイの開発
3. 学会等名 化学工学会第83年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田聡史
2. 発表標題 チップデバイスを活用した細胞組織の機能解析へのアプローチ
3. 学会等名 第18回 LS-BT合同研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村美夢、Enkhtuul Gantumur、Mubarak Wildan、境 慎司
2. 発表標題 様々なゲル基板上における細胞遊走試験のためのinkjet式バイオプリンティングによる細胞パターンニング
3. 学会等名 化学工学会 第85年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyu Kimura, Enkhtuul Gantumur, Shinji Sakai, Masahito Taya
2. 発表標題 Inkjet plus enzyme-mediated bioprinting for controlled cell immobilization on substrates
3. 学会等名 The 14th Asian Congress on Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Enkhtuul Gantumur, Miyu Kimura, Masahito Taya, Shinji Sakai
2. 発表標題 Fabrication of disk and filament tissues through inkjet printing and enzymatic reaction
3. 学会等名 Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 固体支持体からタンパク質を細胞に送達する方法 およびそのためのアレイ	発明者 藤田聡史、加藤義雄	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-096500	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	境 慎司 (Sakai Shinji) (20359938)	大阪大学・基礎工学研究科・教授  (14401)	
研究分担者	戸井田 力 (Toita Riki) (40611554)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員  (82626)	