

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12529

研究課題名(和文)単繊維基板をツールとした細胞内への新規物質導入法の探索

研究課題名(英文)Investigation of new materials introduction method into cells using filament matrix

研究代表者

小林 尚俊(Kobayashi, Hisatoshi)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・上席研究員

研究者番号：90354266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナノファイバーと細胞の強い相互作用を利用した遺伝子導入用のツールの開発を試みると共に、ファイバーの1次元の連続性と細胞の走化性を利用した遺伝子導入法の開発を試みた。FBSを走化性因子とした流路を構築し、単繊維上での遺伝子導入を、GFP-Hela細胞に対して、GFP siRNAを導入するモデルでGFPの消光を指標として遺伝子導入状況を評価するシステムを構築した。現時点では、細胞の繊維上への進展とGFPの消光が確認されているが、一部細胞死も認められ、当初の目論見の高効率に遺伝子導入の順番を制御できるツールを完成することはできていない。今後、更なる検討を進めてゆく所存である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop the new transfection device based on the nanofiber-cell strong interaction and using the 1D continuity of fiber and chemotaxis of the cell. Flow chamber system utilized FBS as chemotactic factor was developed. Using the above system, gene introduction to GFP-Hela cell on a filament was evaluated by analyzing the quenching of GFP by using GFP-siRNA as transgene. In the current status, cell spreading on the filamental substrate and quenching of the GFP were observed, but, apoptosis was also observed, targeted high efficiency system is not developed yet. We will push forward further examination in future.

研究分野：生体材料学

キーワード：単繊維 新規遺伝子導入ツール 流路 細胞走化性

1. 研究開始当初の背景

既存の遺伝子導入技術としては、ウイルスベクターを用いた高効率の遺伝子導入法があるが、ウイルスによる重大な副作用（患者の死亡や病気への感染）が報告され、非ウイルスベクターを持った方法が注目されている。エレクトロポレーション、遺伝子銃、リバーストランスフェクション法を用いたチップなどを利用した物理的な遺伝子導入法や、PEG やリポフェクタミンなどヘターゲット遺伝子を包摂したベシクルを細胞と接触させて細胞内へ送達するシステムや、PEI などと遺伝子とポリオンコンプレックスを形成させ粒子化するとともにポリマーの持つチャージを利用して細胞膜透過性を上げて細胞内へ遺伝子導入を行う化学的なアプローチなどが定法として行われている。これらは、遺伝子導入の効率が低い、遺伝子が細胞内小胞であるエンドソームへトラップされてしまうなどの問題を抱えており、効率的に核内へ導入する新規手法の開発が望まれている。現在は、デンドロンなどのプロトンスポンジ効果を利用したエンドソームからの離脱をターゲットとした分子設計を施されたキャリアなど新規非ウイルスベクターの開発が盛んに行われ、更なる改良が進んでいる。本研究では、種々のメリットのある MIT Sabatini や産総研三宅らにより開発されたリバーストランスフェクション法に注目してナノファイバーを用いた新たなトランスフェクション法を開発を企図している。これまで我々は、ナノファイバーモノフィラメント上に接着した細胞は極度に進展し、細胞を串刺しにしたような状態をとることを明らかにしており、この事実は、ナノファイバーが細胞核に近接できるような状況を作り出すことができることを示している。提案者は、この状態が細胞内への物質の導入及び細胞核への物質移行にとって有利に働くのではないかと考え、本提案に至ったわけである。

2. 研究の目的

iPS 細胞作製などをはじめ新規治療における遺伝子導入技術は重要性を増すばかりであるが、未だ完全に制御された信頼性の高い技術が構築されたわけではなく、更なる革新が求められる段階である。本提案では、ナノファイバーと細胞の強い相互作用を利用した新規な遺伝子導入用のツールの開発を試みるとともに、ナノサイズのファイバーが持つ1次元の連続性と細胞の走化性を利用した遺伝子の選択的逐次導入法を開発を試みる。この方法を用いた時の遺伝子導入効率などを既存技術と比較することで有効性を検証するとともに、有効性が確認された場合は、さらに、複数遺伝子の導入の際の遺伝子導入順が、導入結果に及ぼす影響などを検討することで信頼性の高い遺伝子導入法の開発に資する基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

【1】 流路デバイスの構築

まず初めに、単繊維基板をツールとした細胞内への新規物質導入法の探索に関する研究を行うため、ツールとなる流路デバイスの設計と試作を繰り返し行った。図1に示した3Dプリンターを用いてデバイスの構築を試みたが、造形制度が不十分なために、流路デバイスとして初期設計を満足できるような流路デバイスの構築には至らなかった。そこで、市販品のセパラブル培養皿に改良を加え、図2に示したような単繊維を固定できる流路ツールを作製した。流路としての役割を果たすかを検証するため、デュアルペリスタリックポンプを用いて流路内への培養液の送液、廃液の制御条件と細胞の走化性を制御するための血清の滴下条件などの検討を進めた。

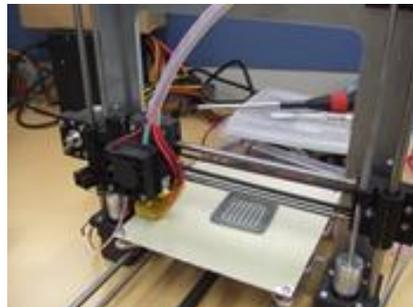
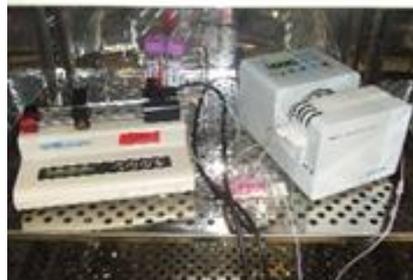


図1 3Dプリンター流路試作



A) 流路ヘッド



B) インキュベーター内に
セットした流路システム

図2 遺伝子導入用流路デバイス

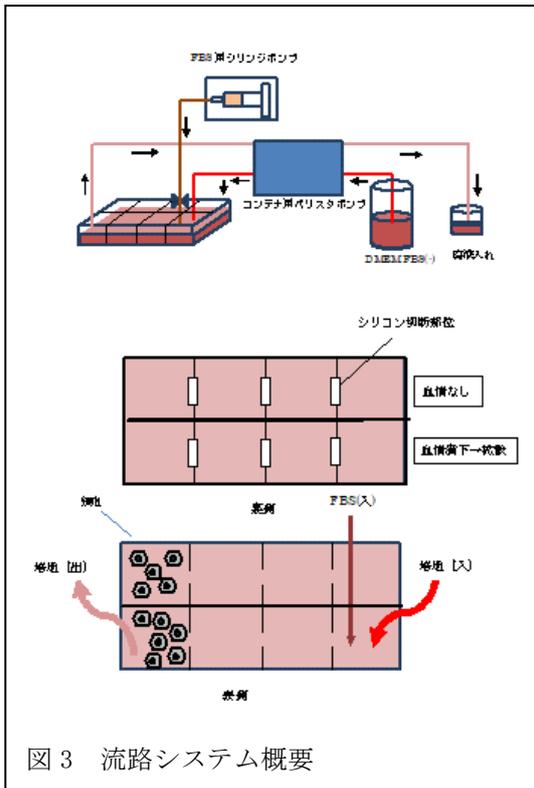


図3 流路システム概要

まず、FBS によって濃度勾配をつけた培養チャンパーにおいて、Hela-GFP を無血清培地で培養し、細胞の動きがあるかどうかを検証し

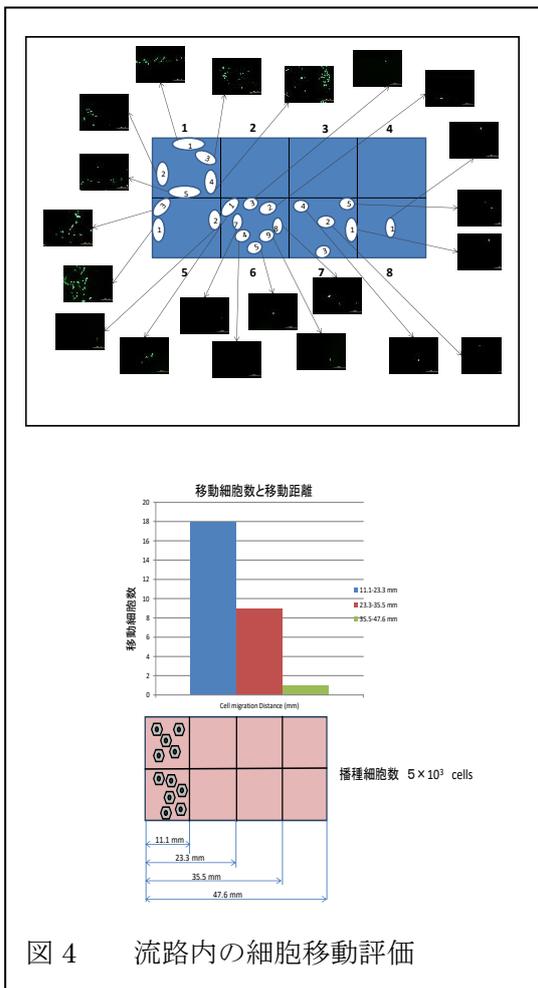


図4 流路内の細胞移動評価

た。

【細胞播種条件】

細胞：Hela-GFP 細胞数： 5×10^3 cells/well
 培地：血清入り培地 DMEM (4500 mg グルコース), PC/SM(1%), FBS(10%), プラストサイジン塩酸塩 (終濃度 $10 \cdot \text{g/ml}$)
 無血清培地：上記の①血清入り培地から FBS(10%)のみを除いた組成。

【実験概要】

Hela-GFP をスライドチャンパーで 48 時間培養後、無血清培地に交換し、培養を開始、24 時間血清滴下しながら、培養を行った。

具体的な手順は、上記 (図3参照) チャンパー スライドの1番5番に、①血清入り培地に懸濁した細胞播種 (FBS+)。48 時間培養した。移動性の評価は、図3に示したセットを組み上げ行った。

【2】遺伝子を導入する場としてのナノ繊維足場の作製

細胞を自走させ、導入する遺伝子を保持するための単繊維足場の作製のための電界紡糸条件の検討を行った。まずモデル材料として 100mg/ml の PGA/HFIP 溶液を用いた。紡糸条件は、送液スピード：0.3ml/hr、印加電圧：16kv、電極間距離：8cmとした。その上で細胞の接着制御を試みたが、再現性に乏しく、制御が難しい状況であった。そのため、ナノファイバーのマルチフィラメントからなる単繊維を用いることとし作成法を模索した。

【3】遺伝子不導入実験

モデル実験として、GFP-Hela細胞に対して GFP に対する si-RNA を導入することで、GFP の消光を指標として遺伝子の導入状況を評価する系を用いることとした。実験は、以下の操作手順で進めた。基材はPGAの配向ファイバーとした。また、実験には以下のものを使用した。培養容器：48-well plate にガラスリング(オートクレーブ済み)を置いたもの (トルエン耐性PETシートが浮かないように)、細胞：Hela-GFP (Passage-6)、培地：DMEM (4500mg glucose), PC/SM(2%), FBS(10%), プラストサイジン塩酸塩 (終濃度 $10 \cdot \text{g/ml}$)、細胞播種数：**4000 cells/well** ←通常48-well plateの実験では、10000 cells/wellで播種、Si導入をおこなった。

4. 研究成果

【1】流路デバイスの構築

蛍光顕微鏡を用いて、GFP-Hela 細胞の移動距離を各ユニット内に移動した細胞数をカウントすることで評価した結果を以下に示した。

図5に示したように、血清の濃度勾配があるレーンにおいては、細胞の移動は観察されるのに対して、血清の濃度勾配がないレーンにおいては、細胞は最初に播種された位置から大きく移動することはなく、血清の濃度勾配により細胞の走化性が誘導できる可能性を示唆する結果が得られた。

【2】遺伝子を導入する場としてのナノ繊維足場の作製

ディスクタイプのコレクター上への紡糸を行い繊維を回収する手法（コレクターディスク回転数：3000rpm）を開発し、直径60ミクロン程度のマルチフィラメントの単繊維を回収することが可能であった。作製したマル

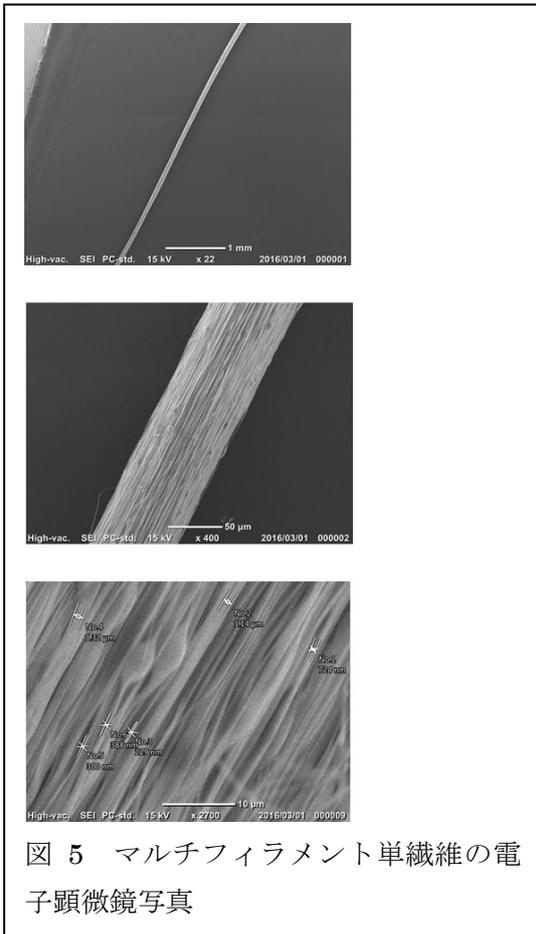


図 5 マルチフィラメント単繊維の電子顕微鏡写真

チフィラメントの短繊維の電子顕微鏡写真を図 5 に示した。ここで回収された単繊維の構成ユニットであるフィラメントの直径は300 ナノメートルから1.3 マイクロメートルとかなりの分布をもっていたが、高度に繊維方向に配向した構造をもとことが分かった。また、この単繊維は、上記で試作した流路デバイスへ組み込むことも可能であった。

細胞としては、血管内皮細胞とGFP-HeLaを検討対象とした。PGAマルチフィラメント上に細胞の付着が認められたが、細胞のマルチフィラメント内への潜り込み等が観察され、こ

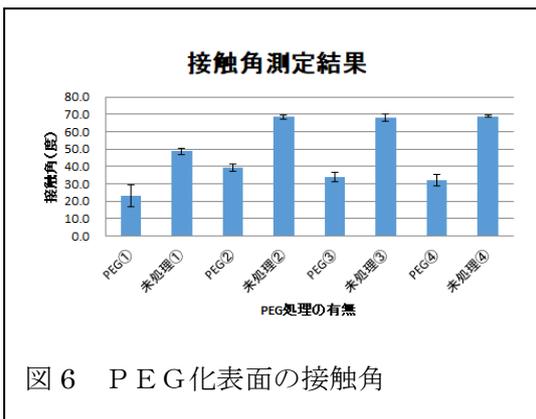


図 6 PEG化表面の接触角

れらの影響で細胞の顕著な移動は観察されなかった。そのため、高分子素材をPGAから細胞接着性が比較的弱い絹フィブリンを用いて検討を行った。比較試験として行った疎なフィブリンナノファイバーへの細胞接着試験では、疎なナノファイバー上でファイバーに沿った形で特にGFP-HeLa細胞の進展が観察された。細胞-基材相互作用が比較的弱いことは、細胞の走化性は有利に働くと考え、フィブリンナノファイバーからなるマルチフィラメント単繊維を作製して細胞の接着、移動に関して検討した。初期的に細胞は付着するが、培養を続けると細胞は、フィブリンマルチファイバー上から離脱してしまいデバイス化に向けては更なる工夫、改良が必要な状況にあった。そこで、単線を配置する流路のガラス表面をPEG化処理をすることで、単繊維上からの細胞離脱が抑制されるものと考え、処理を行った。PEG化処理は、流路上のガラス基板をまずシランカップリング剤で処理を行い、その後、PEG誘導体を固定化することで行った。PEG処理の結果、図 6 に示すように、処理により接触角の低下が認められ親水化処理により細胞接着抑制表面が形成された。実際に単繊維上に GFP-HeLa 細胞を播種し、その後 PEG 化処理流路上に配置して細胞の這い出し抑制効果を検証したところ（図 7 参照）、24 時間培養したのちも PEG 化基材表面への細胞接着はほとんど観察されず、単繊維上に細胞がとどまっている結果が得られた。しかしながら、細胞とマルチフィラメント単繊維の相互作用が強いためか、細胞が繊維内に潜り込み、蛍光観察による細胞の確認が難しい状況となった。マルチフィラメントの単繊維ファバーを細胞キャリアとした場合、ファイバー内に細胞が潜り込み、細胞移動の観察が行いにくいことが判明したため、マルチフィラメントの単繊維よりは、PEG 化した基材の上に形成する配向性を持った疎なファイバーシートの方が有効性が高いと考えられた。そこで、遺伝子導入を行うシステムには、ナノ繊維をPEG化した基盤上に配向させた基材とした。

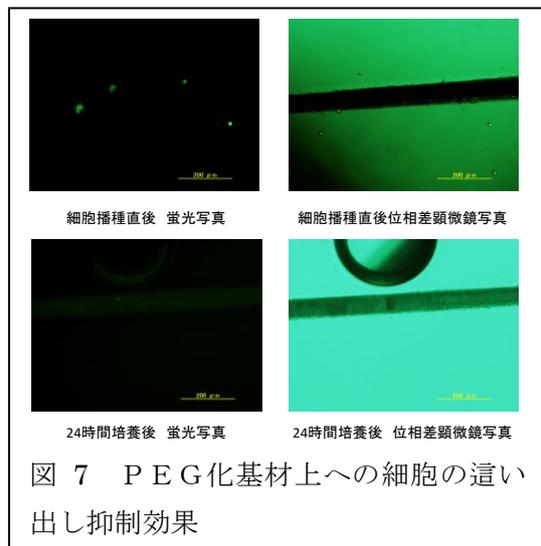


図 7 PEG化基材上への細胞の這い出し抑制効果

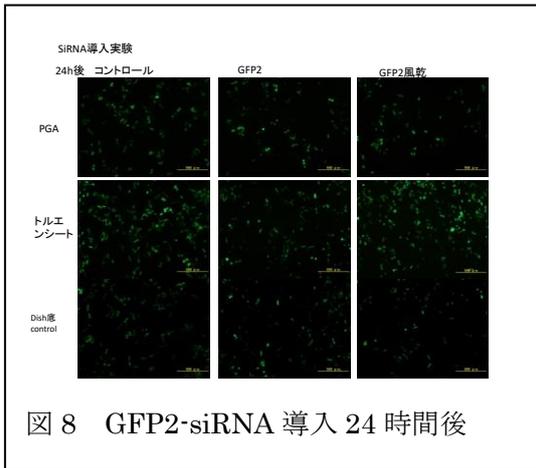


図8 GFP2-siRNA 導入 24 時間後

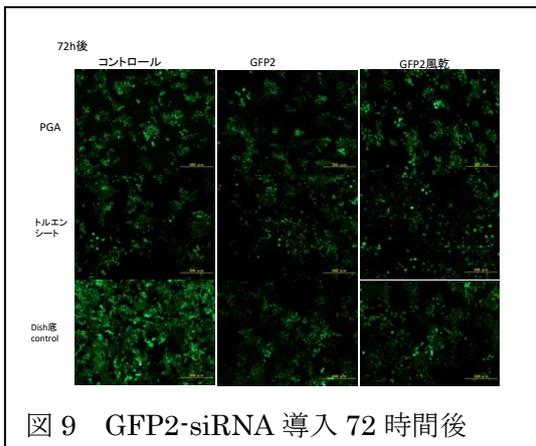


図9 GFP2-siRNA 導入 72 時間後

【3】遺伝子不導入実験

GFP-Hela細胞のGFP2-siRNA導入によるGFPによる蛍光の消光は、24時間、48時間目までは確認されるが、72時間目においては、細胞の増殖などの影響を受けて評価が難しくなるため(図8、図9参照)、GFP2-siRNA導入後48時間目で評価を行うこととした。

図10には、GFP2-siRNA導入後48時間後のGFP蛍光陽性細胞の割合をしめした。

この結果から、ファイバー表面上に接着した細胞においても遺伝子導入が起こることが確認されたが、それは、通常の細胞培養基材表面と優位な差はなかった。通常トランススフェクションとリバーストランスフェクションの手法の比較においては、今回の条件では優位な差はないものの、いずれの場合も消光している細胞の割合が多い蛍光があり、条件を整えることでより効率的な遺伝子導入法として利用できる可能性を示した。また、ナノファイバー上では、細胞が大きく変形し、細胞膜から核までの距離が通常より近接した状態をとり、核への物質移行が有利な状態になっている可能性は共焦点レーザー顕微鏡の観察等で確認出来た。

上記【1】【2】【3】で進めてきたシステムパーツを組み合わせて、細胞自走性の遺伝子導入デバイスとしての可能性を評価したが、細胞の十分な走化性が得られるレベルま

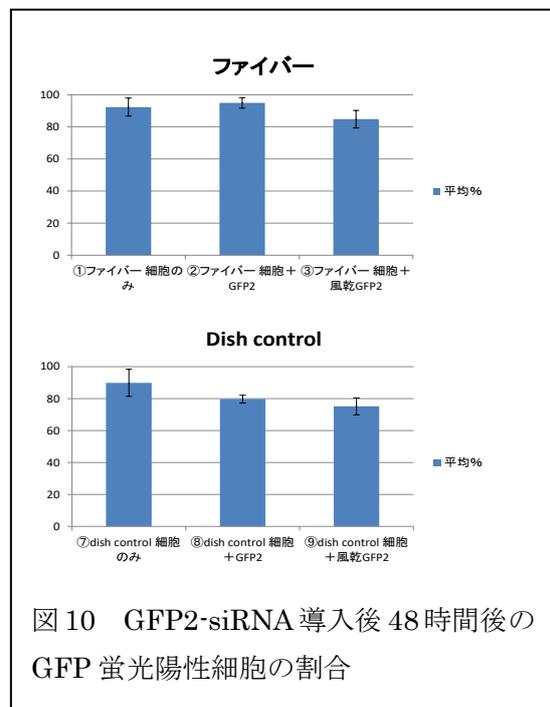


図10 GFP2-siRNA 導入後 48 時間後の GFP 蛍光陽性細胞の割合

で技術を成熟させるには至らなかった。現在も、遺伝子導入効率を上げるための材料の工夫として、パッションフル様構造を持つコアシェル型ナノ粒子(内部にポリエチレンイミンと GFP ターゲットの siRNA を内包したシェルがシリカで構成されるナノ粒子)とポリグリコール酸(PGA)のナノファイバーのコンポジットを作製し、GFP-Hela 細胞の進展、移動及び GFP の消光に関して評価を行っている。現時点では、細胞の初期的なファイバー上への進展と GFP の消光が確認されているが、併せて細胞毒性のための細胞死も認められ、残念ながら当初の目論見の高効率に遺伝子導入の順番を制御できるツールを完成することはできていない。今後、更なる検討を進めてゆく所存である。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 小林尚俊、絹フィブロンナノ繊維構造体の角膜再生足場材としての応用、シーエムシー出版 生体適合性高分子材料の最前線医療用バイオマテリアルの開発と応用、査読無、2017、pp. 195-204
2. 小林尚俊、再生医療足場材料、NTN 出版 繊維のスマート化技術体系 -生活・産業・社会のイノベーションへ向けて、査読無、2017、pp. 465-471
3. HIRAK K. Patra, Y. SHARMA, Mohammad Mirazul Islam, Mohammad Javad Jafari, N. Arul Murugan, 小林尚俊, Anthony P.F. Turner, A. Tiwari, Inflammation-sensitive in situ smart scaffolding for regenerative medicine, NANOSCALE, 査読有、Vol.8, 2016, pp.

- 17213-17222
4. H. Yoshihide, S. Hattori, S. Sasaki, T. Honda, T. Kimura, S. Funamoto, 小林尚俊, A. Kishid, Ultrastructural analysis of the decellularized cornea after interlamellar keratoplasty and microkeratome-assisted anterior lamel, SCIENTIFIC REPORTS, 査読有, Vol.6, 2016, pp. 1~6
 5. D. Terada, Y. Yokoyama, S. Hattori, 小林尚俊, Y. Tamada, The outermost surface properties of silk fibroin films reflect ethanol-treatment conditions used in biomaterial preparation, MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS, 査読有, 2015, pp. 119-126

[学会発表] (計 17 件)

1. 小林尚俊, Comparison study of endothelial adhesion on the aged and no-aged surface of the various PCI Drug eluting stents in vitro, 28th ESB 2017, 2017/9/4, Athens(Greece)
2. 小林尚俊, PGA/Collagen composite nanofiber scaffold for chronic wound care, European Advanced Matrics Congress 2017, 2017/08/22, Stockholm (Sweden)
3. 小林尚俊, ナノ繊維アーキテクチャーを足場とした角膜実質再生の試み, T 第 150 回ポスター会, 2017/7/1, 京大宇治化学研究所 (京都府・宇治市)
4. 小林尚俊, DES ポリマーの基礎各種ステントデバイスにおける材料学的特性比較, 第 34 回小倉ライブデモンストレーション, 2017/5/12, 西日本総合展示場新館 (福岡県・小倉市)
5. 小林尚俊, Nanofibrous architecture for corneal disorder, ASAMC 2017, 2017/3/11, Singapore (Singapore)
6. 小林尚俊, Nanofibrous architecture for tissue regeneration, ICNANO2017, 2017/3/1, Allahbad (India)
7. 小林尚俊, Nanofibrous materials for tissue regeneration application, RBS International Workshop on Biocompatible Nanomaterials and Nanotechnology, 2016/12/15, Universiti Teknologi Malaysia, Kuala Lumpur (Malaysia)
8. 小林尚俊, Study on nanofibrous materials-body system interaction -from single cell interaction to real tissue interaction, European Advanced Materials Congress 2016, 2016/08/23, Stockholm, (Sweden)
9. 小林尚俊, Nanofibrous materials for tissue regeneration, Ireland-Japan MedTech Industry-Academia Workshop, 2016/06/22, Nanofibrous materials for tissue regeneration, Galway (Ireland)
10. 小林尚俊, ナノ繊維構造制御による材料の機能化 -組織再生足場、医療デバイスの機能化に向けて、異分野融合勉強会, 2016/06/14, (東京都)
11. 小林尚俊, S. Hattori, T. Honda, T. Kameda, Y. Tamada, Long term implantation of silk fibroin nanofiber in rabbit cornea as a scaffold for corneal stromal regeneration, World Biomaterials Congress, 2016/05/17, Montreal (Canada)
12. 小林尚俊, Nanofibrous materials for tissue engineering application, NIMS-CSIRO WS, 2016/03/16, (茨城・つくば)
13. 小林尚俊, 3D nanofiber architecture for the model system to investigate the generation of corneal superstructure under the growing up stress, MANA International symposium 2016, 2016/03/09, (茨城・つくば)
14. 小林尚俊, Bioinspired nanofibrous materials for corneal tissue regeneration, 2016/03/01, Delhi (India)
15. 小林尚俊, 医療デバイスの開発・実用化について, 東京医科歯科大セミナー, 2015/11/02, 東京医科歯科大学生体材料工学研究所 (東京都)
16. 小林尚俊, Body-fluid permeable nanofibrous materials for corneal stromal regeneration, The Twelfth International Conference on Flow Dynamics(ICFD2015), 2015/10/27, 仙台湾際会議場 (宮城県・仙台市)
17. 小林尚俊, 3D nanofiber architecture for the model system to investigate the generation of cornea superstructure under the growing up stress, International symposium on nanoarchitectonics for mechanobiology, 2015/07/29, (茨城・つくば)

[図書] (計 1 件)

- ① 寺田堂彦, 小林尚俊, 電界紡糸法による高分子量キトサン単一成分ファイバー, “キチン・キトサンの最新科学技術 機能性ファイバーと先端医療材料, 日本キチン・キトサン学会編” 技報堂出版, 2016, 53-73

[その他]

ホームページ等

http://samurai.nims.go.jp/KOBAYASHI_Hisatoshi-j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 尚俊 (KOBAYASHI. Hisatoshi)

物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクニクス研究拠点・上席研究員

研究者番号 : 90354266