

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14498

研究課題名(和文)細胞への遺伝子導入の順序とタイミングの制御を可能にする遺伝子多重積層界面の作製

研究課題名(英文)Multi-layered interface of genes enables regulation of gene transfection timing

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・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：00392655

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)：細胞を積層界面に播種するだけで、複数の遺伝子を様々なタイミングで細胞に取り込ませることができる遺伝子多重積層界面の作製法の開発を行った。

カチオン性のPLL、アニオン性のヒアルロン酸、モデルとして蛍光タンパク質を発現するプラスミドを封入したカチオン性リポソーム複合体をガラス基板上に多重積層し、その表面上部に細胞を播種する事で、固相面から細胞に遺伝子を導入する事に成功し、またその導入のタイミングを20時間以上ずらすことに成功した。また、リポプレックスの構成を工夫する事で細胞に導入する遺伝子の種類を制御する界面の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to make the interface of multi-layered genes where plasmids encoding different genes are transfected into cells by controlling timing. Plasmid expressing a fluorescent protein was encapsulated into cationic lipid to make cationic lipoplex. And multi-layered interface on glass slide was made by the cationic lipoplex, PLL and anionic hyaluronic acid. After seeding cells on the interface, we checked transfection timing of genes. As a result, we found transfection timing between the gene in upper layer and in lower layer is different for more than 20 hours.

研究分野：マイクロバイオプロセス工学

キーワード：遺伝子導入 表面化学

### 1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品創出、オーダーメイド・ゲノム医療、再生医療が重点的取組課題として挙げられ、それらの研究推進が望まれる。また、医療費破綻を回避する「費用対効果の高い医療」も併せて考える事も重要である。上記命題の解決には、創薬・診断・再生医療を簡便、迅速、低コストで支援するツールの開発が必須であり、マイクロアレイやナノデバイス等のマイクロ・ナノバイオ技術の応用が有望視されている。

このような背景から申請者は、基板表面(ポリスチレンやガラス等)にコーティングされたリポプレックス(DNAやRNAなどの遺伝子とカチオン性脂質の複合体)を、室温で長期間安定化する手法を開発し、さらに細胞をその上部に播種・接着させるだけで、リポフェクションによる細胞への遺伝子導入が可能となる「固相リバーストランスフェクション技術」を確立した(Fujita, S. et al., 2013, Lab Chip, 13, 77)。また、この技術に基づいた細胞マイクロアレイチップの一種のTCMチップ(遺伝子導入細胞マイクロアレイチップ:チップ上の細胞に核酸遺伝子を導入し、その細胞応答を網羅的に検出する事が出来るチップ)を構築し、様々な細胞表現型を解析できる診断・創薬用ツールとして応用を進めてきた。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、細胞を積層界面に播種するだけで、複数の遺伝子を様々な好きなタイミングで細胞に取り込ませる事ができる画期的な手法「遺伝子導入の順序とタイミングの制御を可能にする遺伝子多重積層(Layer-by-Layer)界面の作製法」の開発を試みる。基盤の界面上に播種された細胞への遺伝子導入タイミングを自由に制御する事で、2種以上の遺伝子の発現タイミングの制御を行う。本技術を応用したTCMチップは、

(i) 新たなゲノム編集技術基板、創薬用解析基板、分化誘導用基板になる事、(ii) 予備検討で本手法の実現可能性が示された事から本研究開発を着想した。

### 3. 研究の方法

細胞を積層界面に播種するだけで、複数の遺伝子を様々なタイミングで細胞に取り込ませる事を可能にする遺伝子固相界面を構築する。具体的には、(I) 遺伝子多重積層界面の構築と安定化、(II) 遺伝子導入効率と細胞毒性の評価を行い、(III) 多重積層からの遺伝子導入タイミングを評価する。

続いて、異種遺伝子の逐次発現、遺伝子ON/OFF等の(IV) 遺伝子積層基板から細胞への遺伝子導入モデルの構築を進めた。

### 4. 研究成果

正電荷を持つカチオン性ポリプレックス

と負電荷を持ち生体親和性が高いヒアルロン酸を交互の重層でき、細胞毒性が低い事を見出した。赤色蛍光タンパク質および緑色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを4層ずつ重層したケースでは、24時間後の遺伝子導入効率が80%以上と高かったが、遺伝子発現のタイミングの差異が、ほとんど見られなかった。

そこで、積層面から細胞への遺伝子導入に時間差を取るために、上層と下層を隔離する中間層を、正電荷を持つポリLリジン(PLL)で構築する事を試みた。赤色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを含むリポプレックス2層と緑色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを含むリポプレックス2層を3層のPLL-ヒアルロン酸で隔離した所、24時間後の遺伝子発現に差異が見られた(図1)。

そこで、赤色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを含むリポプレックス2層と緑色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを含むリポプレックス2層を3種の厚さを持つPLL-ヒアルロン酸の中間層(3層、6層、9層)で隔離し、遺伝子導入のタイミングの制御の効果を経時的に遺伝子導入効率を測定する事で評価した(図2)。その結果、9層の重層で顕著に遺伝子導入のタイミングをずらすことができる事が判った。一方で、重層を30層まで積層し、評価を行った所、20層を超えると細胞の接着表面が柔らかくなり、表面への細胞接着性が低下し、細胞毒性も顕著になった。

続いて、遺伝子導入効率を評価するため、緑色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを含むリポプレックスを1~5層の重層した表面に細胞の播種を行った。その結果、期待通り層が増えれば増えるほど、遺伝子の導入効率および発現効率が上昇する事が示された。

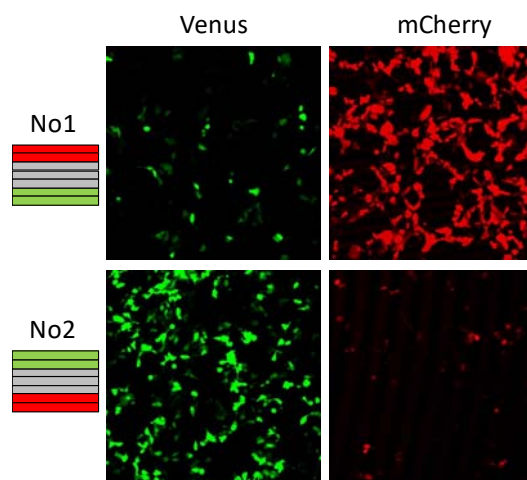


図1: 遺伝子導入タイミングの制御

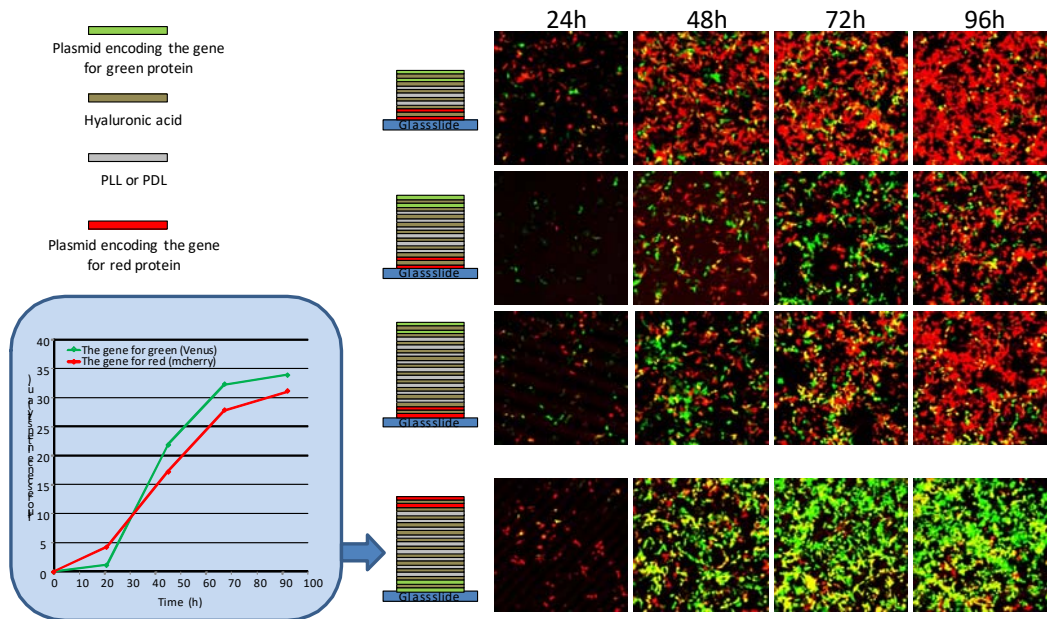


図 2：遺伝子導入タイミングの制御

次に、リポプレックスの作製方法について検討した。2種類のリポプレックス（赤色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを含むリポプレックスと緑色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを含むリポプレックス）を構成する際に、両者を隔離して作製した場合と、混合して作製した場合について、評価した所、細胞への遺伝子導入の割合に明らかな差がみられることが分かった（図3）

この結果を受けて、遺伝子多重積層上の細胞に導入される遺伝子を制御する技術の開発を行った。モデルとして（1）緑色蛍光を発現するプラスミドを封入したリポソーム複合体、（2）赤色蛍光を発現するプラスミドを封入したリポソーム複合体、（3）緑色および赤色蛍光を発現する2種類のプラスミドを封入したリポソーム複合体を準備し、こ

れらをいくつかのパターンで固相化した基板を作製し、基板から細胞に遺伝子の導入を行った。

（1）（2）のリポソーム複合体を混合し、固相化した積層基板から遺伝子を導入した場合、多くの細胞は赤色、緑色のいずれかの遺伝子を発現（65%以上）したが、（3）のリポソーム複合体の場合、多くの細胞は赤色、緑色の両方の遺伝子を発現した（95%以上）。

この結果は、遺伝子多重積層基板に積層するリポソーム複合体の制御により、細胞に導入される遺伝子発現を制御できる可能性を示した（図4）。

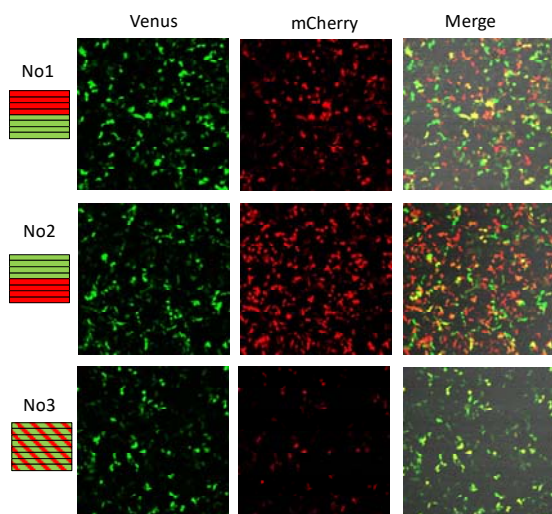


図 3：リポプレックス形成条件の検討

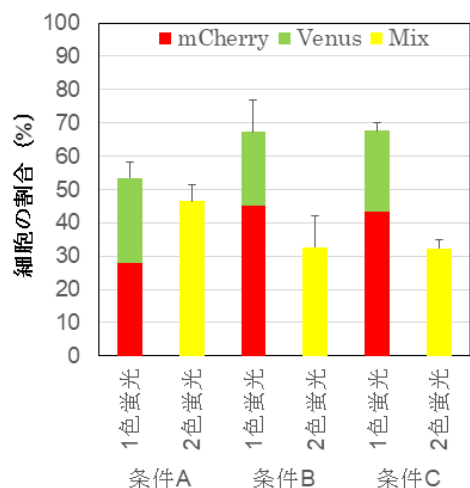


図 4：細胞への遺伝子導入の制御

## 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2件)

- (1) Fujita, S.\*, Onuki-Nagasaki, R., Ikuta, K. Hara, Y., (2017) A simple method for producing multiple copies of controlled release small molecule microarrays for cell-based screening. Biofabrication, 9, 011001.  
DOI: 10.1088/1758-5090/9/1/011001.
- (2) 藤田聡史\* (2016) 固相界面より1細胞に遺伝子を導入する技術、生物工程、94, 539-542

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：固相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：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2017-096500

出願年月日：平成 29 年 5 月 15 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bmd/gr/cms-4/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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 バイオメディカル研究部門  
細胞マイクロシステム研究グループ・研究グループ長

研究者番号：00392655

### (2) 連携研究者

杉浦 慎治 (Sugiura Shinji)

国立研究開発法人 産業技術総合研究所  
生命工学領域 創薬基盤研究部門 医薬品アッセイデバイス研究グループ・上級主任研究員

研究者番号：00392655