

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656189

研究課題名（和文） 機能性核酸導入細胞転写技術を用いた癌細胞浸潤評価チップの開発

研究課題名（英文） Development of a cell microarray chip for evaluating invasion of cancer cells by transfer printing of transfected cells

研究代表者

長棟 輝行（NAGAMUNE TERUYUKI）

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：20124373

研究成果の概要（和文）：核酸を導入した細胞のマイクロアレイをガラス基板から細胞外マトリクスゲル上に転写する技術を開発した。この技術を用いて、核酸導入癌細胞のマイクロアレイを細胞外マトリクスゲル内に構築し、生体内に近い環境下で siRNA の癌浸潤抑制効果を評価することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We developed a method that can print a microarray of transfected cells from a glass substrate onto a hydrogel, and by using this method, microarrays of transfected cancer cells were successfully prepared in a three-dimensional extracellular matrix gel and employed for evaluating the anti-invasion activities of siRNA under an in vivo-like environment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能バイオプロセス

キーワード：細胞マイクロアレイ、癌細胞、浸潤、細胞転写、PEG 脂質、コラーゲンシート

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞マイクロアレイ技術は、種々の処理を施した多数の細胞を一度に、迅速簡便に調べられるため、対象とする生命現象に関わる遺伝子や薬剤のスクリーニングなど様々な用途への応用が期待されている。一方、細胞は生体内において単独で存在しているのではなく、その細胞が存在する組織の中の特殊な微小環境と相互作用している。この相互作用は細胞の増殖や分化をはじめとした様々な細胞機能に大きく影響を与え、接着状況の違いが細胞の運命を決定する例が多数

報告されている。従って、従来の細胞マイクロアレイにおいて、プラスチックやガラス製の基板上で観察している細胞の生理現象は、生体内と大きく異なる場合があることが問題となっている。また、癌の浸潤のように、細胞が周囲の生体内環境に対して作用する現象を評価対象とすることは、従来の細胞アレイでは不可能である。

(2) 悪性化した癌は、組織内を「浸潤」して血管内に到達後、全身に転移して患者の命を奪う。従って、浸潤抑制法の確立が癌治療

における喫緊の課題である。しかしながら、癌の浸潤に関わる鍵遺伝子の同定は、網羅的な評価系が存在しないために非常に困難で、浸潤についての理解や抑制薬の開発は大きく立ち遅れている。従って、浸潤に関わる遺伝子群の網羅的なスクリーニング系が強く求められている。

一方、我々は、これまでに細胞膜修飾剤 (**Biocompatible anchor for membrane: BAM**) を用いて基板上にパターンングした細胞を、細胞外マトリクス (**Extracellular matrix: ECM**) 上に転写する細胞転写技術の開発に成功した。また、遺伝子発現用プラスミドや siRNA と遺伝子導入試薬とを並べて BAM 基板上に固相化し、その上に細胞を播種固定化してトランスフェクションさせるリバーストランスフェクション法によって、遺伝子導入細胞のマイクロアレイを BAM 基板上に作製することにも成功している。そこで、これらの技術を組み合わせて、siRNA を導入した癌細胞のマイクロアレイを ECM ゲルに転写し、各癌細胞の浸潤性を網羅的に評価するシステムを構築すれば、浸潤に関わる遺伝子群を網羅的にスクリーニングできるのではないか、というアイデアを着想した

## 2. 研究の目的

組織モデル上に核酸を導入した癌細胞のマイクロアレイを転写し、各癌細胞の浸潤性を網羅的に評価するシステムを構築して、浸潤に関わる遺伝子群を網羅的にスクリーニングできる方法を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 核酸導入細胞の転写法の検討と評価

自動スポッターを用いて siRNA と核酸導入試薬との混合水溶液を BAM 修飾基板上にドット状にスポットし、その上に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を恒常発現しているヒト子宮頸癌 HeLa 細胞 (HeLa-EGFP) を播種して基板上でのリバーストランスフェクションにより anti-EGFP siRNA を細胞に取り込ませた。その細胞の上に、コラーゲンゲルシートを被せて 4 時間培養することによって、細胞をコラーゲンシート上に接着させた。さらに、血清入りの培地を添加することで BAM と細胞との相互作用を弱めた後にコラーゲンシートを剥離し、siRNA を導入した細胞をコラーゲンシート上に転写した。その後、種々の時間培養し、コラーゲンゲル表面の緑色蛍光像を蛍光スキャナーで撮像し、各細胞スポットでの siRNA の効果を評価した。

### (2) 細胞アレイのゲル内への包埋と評価

自動スポッターを用いて BAM をガラス基板上に直径数十マイクロメートルのスポットになるように噴霧し、BAM 修飾マイクロ

スポットのアレイを基板上に作製した。EGFP を恒常発現している癌細胞 (HeLa-EGFP 細胞、ヒト線維肉腫細胞 HT-1080、HT1080-EGFP) をこの BAM アレイ基板上に播種し、癌細胞のマイクロアレイを基板上に作製した。この細胞マイクロアレイを上記と同様にしてコラーゲンゲルシートに転写した。さらに、細胞を転写した表面上にコラーゲンゲルを塗布し、細胞マイクロアレイを三次元ゲル内に包埋後、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下、培地中で培養した。その後、蛍光スキャナーでゲルの緑色蛍光像を撮像し、細胞の浸潤性に従って細胞スポットが広がるかどうか、またそのスポットの拡大が検出可能かを調べた。

### (3) 浸潤抑制 siRNA の評価系の構築

上記のとおり、自動スポッターを用いて、BAM マイクロアレイを作製し、その上から siRNA と核酸導入試薬との混合水溶液をスポットした。上記と同様にこの上に HT1080-EGFP 細胞を播種し、リバーストランスフェクションおよびコラーゲンゲルへの転写、包埋を行った。その後、上記と同様に、ゲル内での細胞スポットの拡大を評価し、siRNA の浸潤抑制効果を本システムによって評価可能かどうかを調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 核酸導入細胞の転写法の検討と評価

BAM 修飾基板上にリバーストランスフェクション用試薬と細胞とを同時に固定化する際に、従来法では細胞の固定化に再現性が無かったため、詳細に条件検討を行った。スポットする BAM 濃度、リバーストランスフェクション用試薬に含まれるゼラチン濃度、フィブロネクチン濃度を最適化した結果、安定に細胞を固定化できる条件が決まった。

予備実験として、全面に BAM をコートした基板上で、スポット状に噴霧した siRNA のリバーストランスフェクションとコラーゲンゲルへの転写を試みたところ、66 時間後にゲル上で EGFP 発現量が低下した細胞が蛍光スキャナーによりドット状に観察された (図 1a)。また、画像解析の結果、siRNA の固定量に依存して低下することが確認できた (図 1b)。これより、siRNA を導入した癌細胞のアレイが転写でき、生体環境に近い ECM ゲル上で siRNA の機能を評価できることが示された。

### (2) 癌細胞の浸潤評価法の検討

様々な siRNA を導入した癌細胞が ECM ゲル内をそれぞれ浸潤する様子を、網羅的に評価するシステムを構築するために、癌細胞のマイクロスポットの「拡がり」を指標にする系を検討した。高い浸潤性が報告されている HT1080-EGFP 細胞と高い浸潤性が報告され

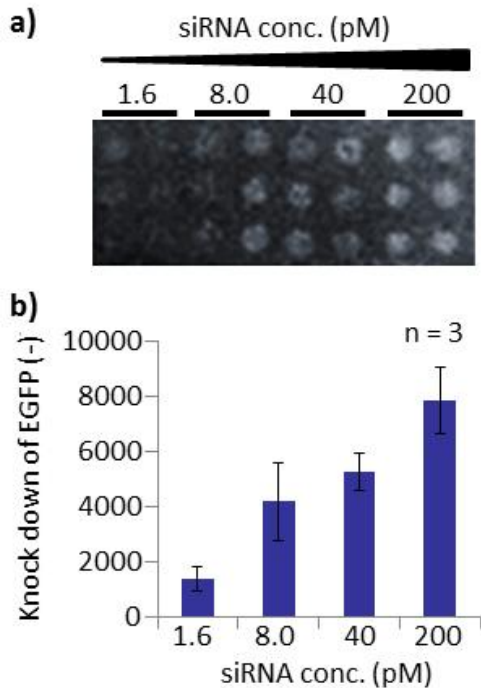


図 1 コラーゲンゲル上に転写した抗 EGFP siRNA 導入 EGFP 恒常発現 HeLa 細胞の蛍光画像 (a) と画像解析結果 (b)

ていない HeLa-EGFP 細胞とのマイクロアレイをコラーゲンゲル内に作製して、スポットの大きさの時間変化を蛍光観察した。その結果、HT1080-EGFP 細胞のスポットは 24 時間後には直径が約 2.5 倍に拡大し (図 2、c→d)、一方、HeLa-EGFP 細胞ではほとんどスポットの大きさに変化は無かった (図 2、a→b)。これより、ゲル内での細胞スポット径の変化を指標に、細胞の浸潤性が評価できることが示された。

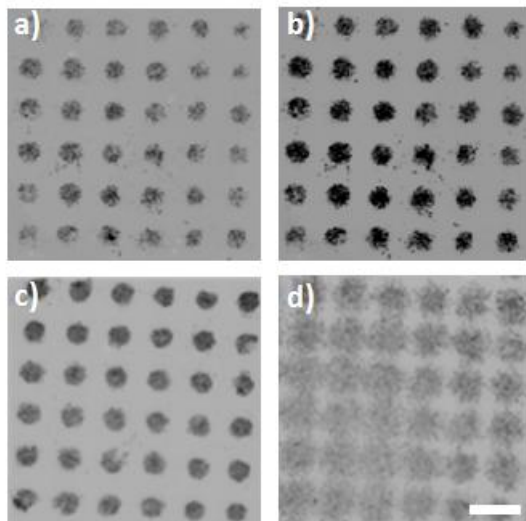


図 2 コラーゲンゲル上に転写した EGFP 恒常発現癌細胞の蛍光画像 (a, b) HeLa 細胞、(c, d) HT-1080 細胞 : (a, c) 転写直後、(b, d) 転写 24 時間後

### (3) 浸潤抑制 siRNA の評価

浸潤を抑制する siRNA のスクリーニングが可能な系が構築できるかを調べるために、HT1080 細胞の浸潤を抑制することが報告されている anti-MMP14 (抗マトリクス金属プロテアーゼ 14) siRNA や、他の細胞で浸潤抑制が報告されている anti-PXN (抗パキシリン) siRNA を導入させた細胞マイクロアレイをコラーゲンゲル内に転写・包埋し、そのスポットの拡がりを観察した。その結果、anti-MMP14 siRNA を取り込ませることによって、スポットの拡大が抑えられ (図 3)、スポットの大きさを指標に siRNA の浸潤抑制能が評価できることが強く示唆された。また、同様に、HT1080 細胞への効果は未知であった anti-PXN siRNA の浸潤抑制能を確認することもできた。

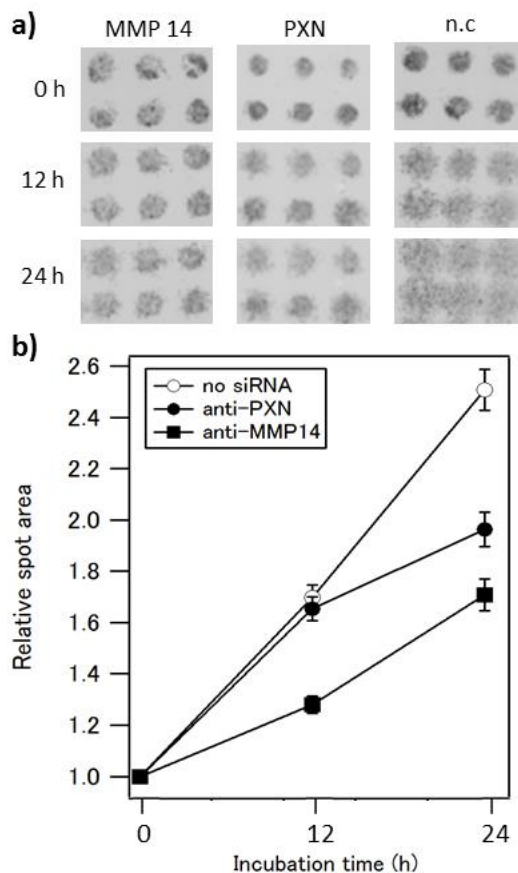


図 3 コラーゲンゲル上に転写した siRNA 導入 EGFP 恒常発現 HT-1080 細胞の蛍光画像 (a) とその画像解析によって得られたスポットサイズと培養時間との関係 (b)

## 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 1 件)

- ① T. Takano, S. Yamaguchi, E. Matsunuma, S. Komiya, M. Shinkai, T. Takezawa and T. Nagamune, "Cell transfer printing from patterned poly(ethylene glycol)-oleyl surfaces to biological hydrogels for rapid and efficient cell micropatterning", *Biotechnol. Bioeng.*, 109, 244-251 (2011). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山口哲志, 長棟輝行, 「PEG 脂質系細胞修飾剤を用いた細胞アレイ技術」, 第二回細胞アッセイ研究会, 三島, 東レ研修センター, 2011 年 1 月.
- ② S. Yamaguchi, S. Yamahira, T. Nagamune, "Cell Micro-Patterning with Photo-Cleavable Anchor for Cell Membrane", Asian Congress on Biotechnology (ACB-2011), Shanghai, China, 2011 年 5 月.
- ③ 山口哲志, 長棟輝行, 「PEG 脂質を用いた次世代細胞マイクロアレイの開発」, 第 4 回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム, 札幌, 北海道大学フラテ会館, 2011 年 6 月.
- ④ 小宮世乃吏, 山口哲志, 三宅淳, 河原正浩, 長棟輝行, 「癌浸潤性評価のためのゲル包埋型 siRNA スクリーニング細胞マイクロアレイの開発」, 化学工学会第 77 年会, 東京, 工学院大学, 2012 年 3 月.

[図書] (計 1 件)

- ① S. Yamaguchi, E. Matsunuma, and T. Nagamune, "Immobilized Culture and Transfection Microarray of Non-adherent Cells", *Cell-based microarrays, Methods in Molecular Biology 706* (E. Palmer ed.), Human Press., 151-159 (2010). 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長棟 輝行 (NAGAMUNE TERUYUKI)  
東京大学・大学院工学系研究科・教授  
研究者番号：20124373