

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560216

研究課題名(和文)中空系配列体を用いた細胞マイクロアレイチップの開発

研究課題名(英文) Multiple copies of a microarray for the controlled release of small compounds in a cell-based screening assay

研究代表者

藤田 聡史 (FUJITA, Satoshi)

独立行政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)：小分子の細胞ベース評価を可能にする「中空系配列体を用いた細胞マイクロアレイチップ」の開発を行った。本チップの作製法は大量生産に向いており、簡単、迅速、安価にチップを生産することができる。その上、細胞アッセイを集積化することができ、貴重な細胞や小分子化合物を節約が可能となる。またそれぞれの中空系チャンネルには様々な小分子を充填する事が可能である。具体的には、緑色蛍光および赤色蛍光を示す2種類の薬剤とポリマーを混合し、中空系に充填し、これらをモザイク状に配列させたモデルチップを作製し、本手法が有効である事を実証した。本チップは小分子薬剤の細胞ベース評価やスクリーニング法として役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：We made a simple method for producing multiple copies of microarray chips for the controlled release of small molecules in a cell-based screening assay. The described method enables the production of multiple copies of the chip by using an easy, rapid, and inexpensive array fabrication without any specialized devices. Moreover, screening using a miniaturized platform such as the microarray chip minimizes the consumption of cells and chemicals. Both the biodegradable material and compound injected into each channel can be individually tuned for optimized performance. We envisage that this method will be useful for developing cell-based HTS of small chemical compounds to find drug candidates.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：セルマイクロアレイ 遺伝子導入 セルチップ

1. 研究開始当初の背景

H24年度の「医療イノベーション5か年戦略」に記載されているように、個別化医療など次世代医療を実現する体制構築が喫緊の課題である。一方、「費用対効果の高い医療」も合わせて考える必要があるため、近年、MEMS技術を駆使し、簡便性、迅速性に優れた診断用や創薬用のマイクロデバイスを構築する試みが盛んに行われている。しかし、その多くは、微細なチップ構造構築を優先するため、簡便且つ安価にチップを量産する事が難しい。

2. 研究の目的

本申請研究では簡便且つ安価に量産が可能で、小分子、ペプチド(タンパク質)、核酸などあらゆる細胞刺激因子に対する細胞の応答を直接且つ網羅的に検出し、薬剤化合物や細胞機能の評価が出来る新たな「中空系配列体を用いた細胞マイクロアレイチップ」を開発し、診断用や創薬用デバイスとして応用展開する。申請者はこれまで「マイクロ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:TCMチップ」の開発を進めてきた(Miyake, M. et al., 2009, Mol Sys. Biol, 5, 444)しかし本チップでは、核酸以外の小分子やペプチドなどの刺激に対する細胞応答を網羅的に検出する事が出来ず、効率よく小分子やペプチドをチップ上にアレイ化し細胞に導入する手法は世界的にも報告がなく、本研究の新規性・斬新性が高い。

3. 研究の方法

本研究計画は中空系配列体を用いた細胞マイクロアレイチップを構築し、これを用いた小分子の細胞への導入が出来る事、薬剤評

価や細胞機能評価が出来る事を示し、その技術基盤を確立する事にある(図1)。まず本チップ技術の確立のため、中空系細胞マイクロアレイチップのプロトタイプを試作し、(I)中空系の素材の決定と配列体の構築、(II)中空系内部への充填剤及び充填方法の検討、(III)中空系内部に充填された薬剤の徐放性能の解析、(IV)アレイ上で生育する細胞に対する毒性と細胞運動の解析を行う。試作結果に基づき、(V)最密中空系配列体を用いた細胞マイクロアレイチップを作製し、実際のチップを用いた細胞機能評価・薬剤評価を行い、その技術基盤を確立する。

4. 研究成果

本研究では、様々な小分子・ペプチドなどの分子の細胞応答評価を可能にする細胞チップの作成を目的としている。また、中空系を配列・固定し、これを金太郎飴のように輪切りにする技術開発を行う事で細胞マイクロアレイの大量生産技術の確立も目的としている。

高密度のマイクロアレイを完成させるためには、アレイ状に配置された様々な小分子がその上面に接着した細胞にのみ、とりこまれるように設計されなければならない。つまり、小分子がゆっくりとチップ基板上から徐放され、その上面に接着した細胞にのみ取り込まれるようにコントロールする必要がある。

(1) 生分解性ポリマーの選択

そこでまず、様々な分解活性を持つ4種類の生分解性ポリマーを用いて、その生分解性試験を行った。蛍光を示し、且つ細胞に取り込まれる小分子と各種生分解性ポリマーを混合し、融解し、ディッシュ上にコーティン

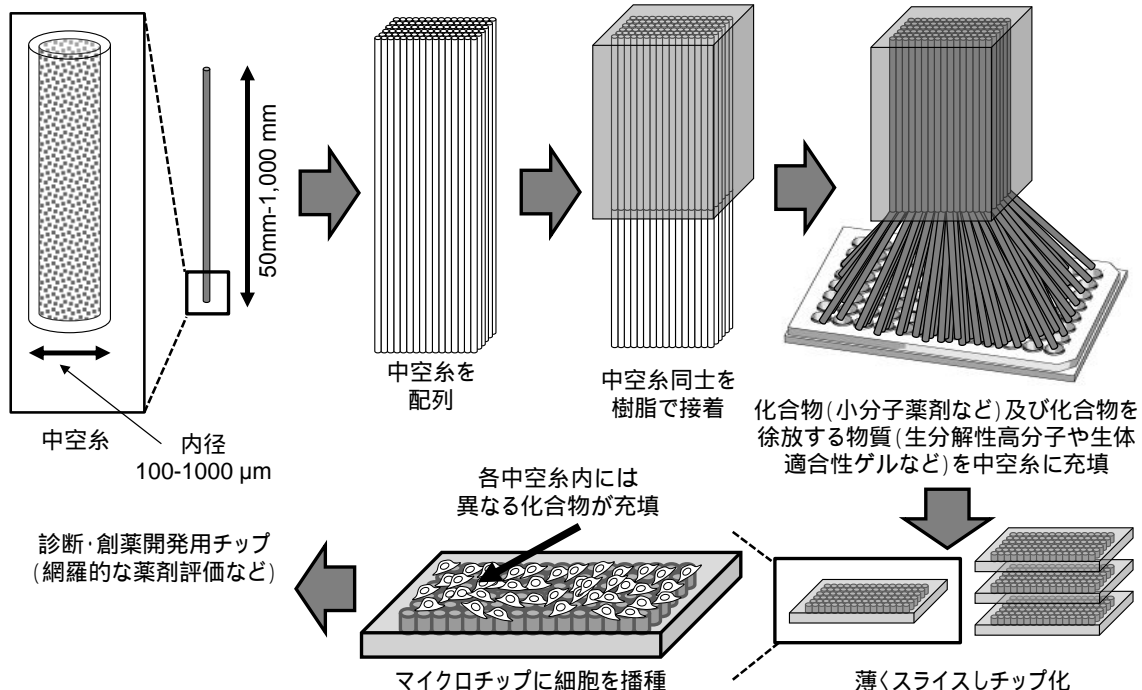


図1: 中空系細胞マイクロアレイチップ技術の概念図

グし、その上面に細胞を播種した。その結果、内1種のポリマーが適切なスピードで分解し、そこから小分子が徐放され、細胞が蛍光を示した。

(2) 生分解性ポリマーの細胞に対する毒性評価

次に毒性を評価した。「(1)生分解性ポリマーの選択」で選択した生分解性ポリマー上に細胞を播種し、適切な時間培養した後、細胞の生存率を評価した。その結果、ほとんどの細胞が生存している事が示された。

(3) 中空系の材質の検討

ポリマーを中空系に充填する手法と中空系の材質の検討を行った。当初、エタノールやクロロホルムなどの溶媒にポリマー溶解し中空系への充填を試みたが、乾燥の際に中空系から溶媒が噴出する、中空系内に気泡が残るなどの問題があり、ポリマーの充填が困難だった。そこで、ポリマーを高温で溶解し、中空系に充填する手法を試みた。

その結果、高温耐性を持つ中空系としてPTFEなどの素材を持つ中空系を用意し、ポリマーを充填する事に成功した。

(4) 中空系配列体の作製

緑色蛍光を示し細胞に取り込まれる小分子を生分解性ポリマーと共に高温で溶解し、ポリマーに充填した。これを整列させ、シリコン樹脂(PDMS)で固定化し、角柱を作製した。この角柱を金太郎飴のように切断することで数十枚のマイクロチップを作製する事に成功した。

(5) 小分子の徐放性能の検討

中央のみ緑色蛍光を示し細胞に取り込まれる小分子を導入した細胞マイクロチップを作製し、その徐放性能を確かめた。上面に細胞を播種し、適切な時間の培養を行った後にその取り込みを検出した。その結果、中央の中空系上の細胞は緑色の蛍光を示し、それ以外の細胞は蛍光を示さなかった。この結果は、中央の中空系内に乳酸ポリマーと混合された緑色蛍光小分子が徐々に徐放され、その上部の細胞にのみ取り込まれた事を意味する。それ以外の中空系上の細胞に拡散し取り込まれることが無いことが示された。ただし、中空系に充填された乳酸ポリマーが分解していくため、細胞が接着する表面が凸凹になってくるため、顕微鏡を使った観察や定量が困難になることがわかった。

そこでディッシュなどに細胞をまず播種し、その上部にチップを設置する事で細胞に適切に小分子が取り込まれるかを検討した。その結果、中央の細胞にのみ蛍光小分子が取り込まれる事が観察された。また、チップが上面に配置されることによる細胞毒性も少なかった。これは、PDMSの空気透過性能が高いためと考えられる。

(6) モザイク状に2種類の小分子を配置した中空系細胞マイクロアレイの作製

最後に赤色蛍光を示す小分子と緑色蛍光を示す小分子をモザイク状に配置した中空系配列型マイクロアレイを作製し、細胞への取り込みを確認した。細胞を播種し、適切な時間の培養を行った後、細胞に小分子が取り込まれる事を確認した。緑色と赤色の小分子は接触した細胞にのみとりこまれている事を確認した。両者はお互いに交じり合うことが無かった。この結果は、理論上、中空系配列型細胞マイクロアレイを用いて多数の小分子の細胞応答アッセイをすることが可能である事を意味する。

今後、本技術を応用し、チップを用いた細胞機能評価・薬剤評価を行い、その技術基盤の確立を目指す予定である。

なお、本記載内容の一部を含む結果を論文として投稿準備中である。

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1件)

- (1) Hara, Y., Ikuta, K., Onuki-Nagasaki, R., Fujita, S.*, (2014) Simple production of multiple copies of a microarray for the controlled release of small compounds in a cell-based screening assay. Proceedings of Biosensors 2014

〔学会発表〕(計1件)

- (1) Hara, Y., Ikuta, K., Onuki-Nagasaki, R., Fujita, S.*, (2014) Simple production of multiple copies of a microarray for the controlled release of small compounds in a cell-based screening assay. Biosensors 2014, 27-30 May, Melbourne, Australia
*Corresponding Author, (審査有)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(1件)

名称: 中空系配列体を用いた細胞マイクロアレイチップ

発明者: 藤田聡史、原雄介、生田健次郎

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所、(株)三菱レイヨン

種類: 特許

番号: 特開2014-176308、特願2013-050718

出願年月日: 2013.3.13

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

https://unit.aist.go.jp/biomed-ri/group/kadai4/saibou_micro_group06/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) 研究協力者

原 雄介 (HARA Yusuke)
国立研究開発法人 産業技術総合研究所
材料・化学領域 機能化学研究部門 化
学材料評価グループ 主任研究員

(3) 研究協力者

生田 健次郎 (IKUTA Kenjiro)
三菱レイヨン株式会社 横浜先端技術研
究所 バイオデバイス研究グループ