

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果
2. 研究開発項目毎の成果

研究開発項目毎の成果

- ・ デバイス関連技術開発
- ・ 時系列解析技術開発
- ・ 応用研究

デバイス関連技術開発

- がん浸潤・転移能検出デバイスの開発
 - ✓ がん浸潤能検出デバイス(東大・長棟研)
 - ✓ がん運動性機能検出デバイス(産総研・RICE臨海)
- 低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発(東大・鷺津研)
- 遺伝子発現の同期化技術の開発(東大・長棟研)

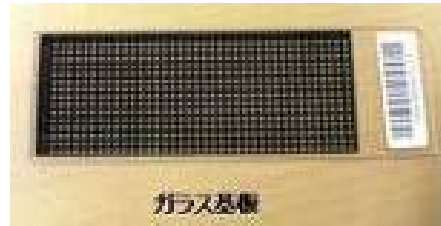
技術開発の背景

汎用的な高効率遺伝子
導入技術の必要性

細胞機能リードアウト技術
拡大の必要性

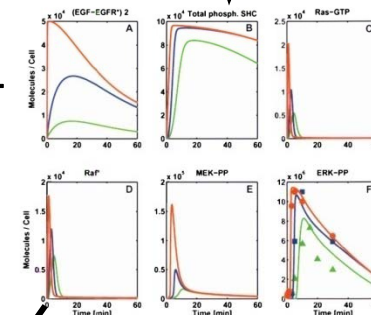
遺伝子発現・ノックアウト
の同期化の必要性

細胞へのDNA/
RNAi導入



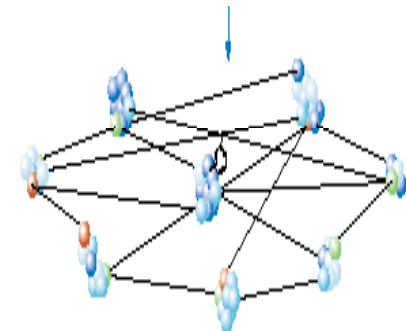
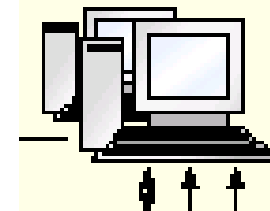
セルアレイ

パスウェイレポーター
による時系列
モニタリング

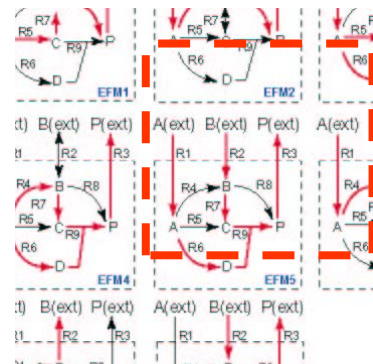


時系列データ解析

Computation



ターゲットパスウェイの抽出



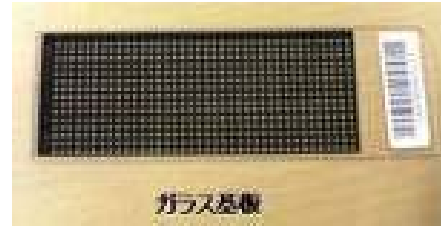
パスウェイモデルの抽出

技術開発の背景

細胞機能リードアウト技術
拡大の必要性

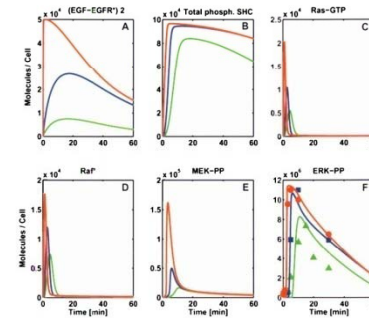
画像解析による

- 細胞形態変化
- 細胞間相互作用
- 細胞運動性 etc
の評価

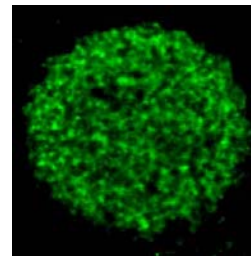
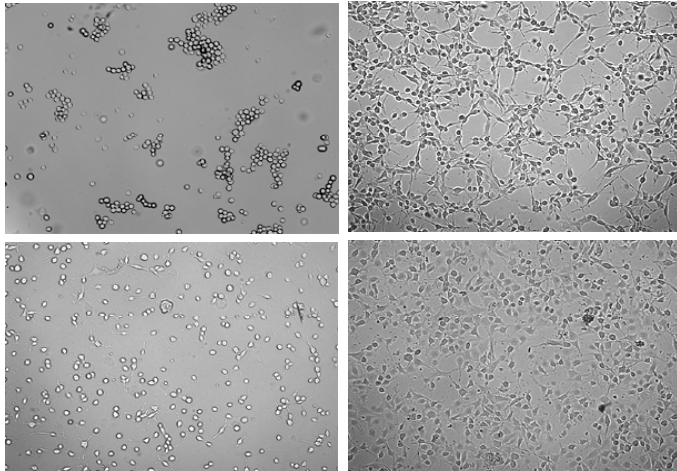


セルアレイ

パスイレポーター
による時系列
モニタリング



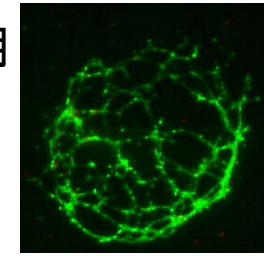
細胞形態変化



細胞間相互作用



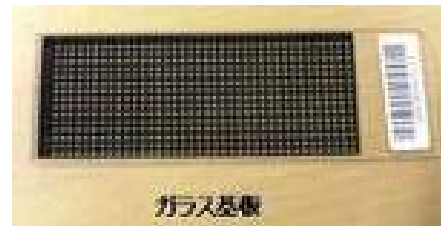
細胞運動性



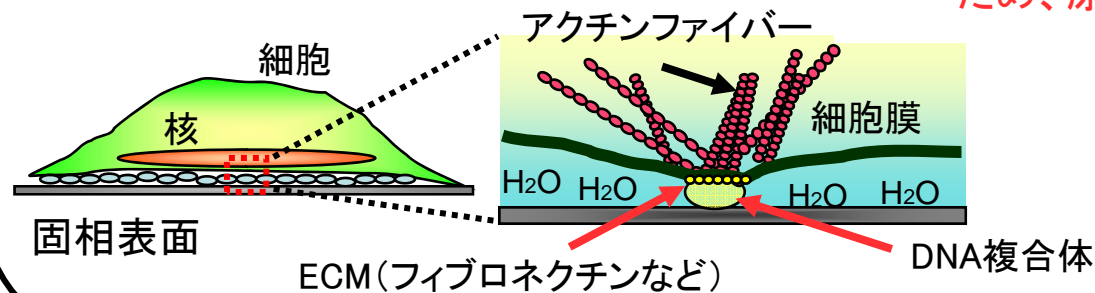
技術開発の背景

汎用的な高効率遺伝子
導入技術の必要性

細胞へのDNA/
RNAi導入



セルアレイ



以下の細胞では遺伝子導入・発現効率が20~40%程度

- ・ ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)
- ・ ラットヒト間葉系幹細胞 (rMSC)
- ・ マウス繊維芽細胞 (3T3-L1)

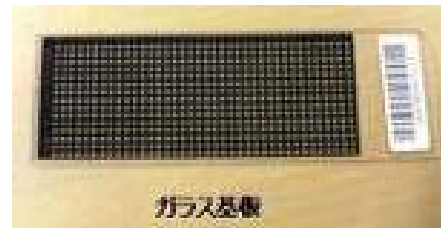
・ 接着系細胞の種類によっては固相リバーサルトランスフェクション法による遺伝子導入・発現効率が低い。

・ 浮遊系細胞は基板に接着できないため、原理的に遺伝子導入が困難。

技術開発の背景

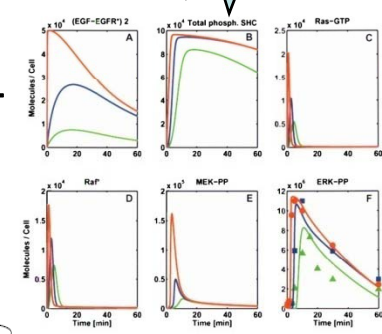
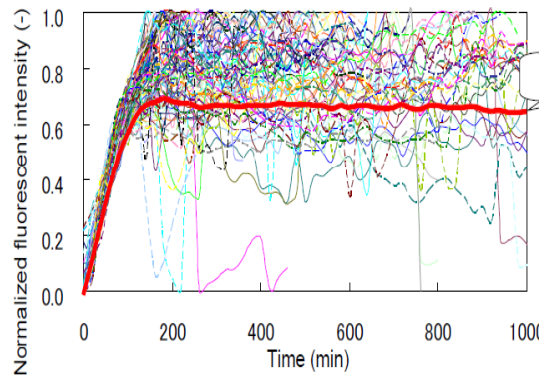
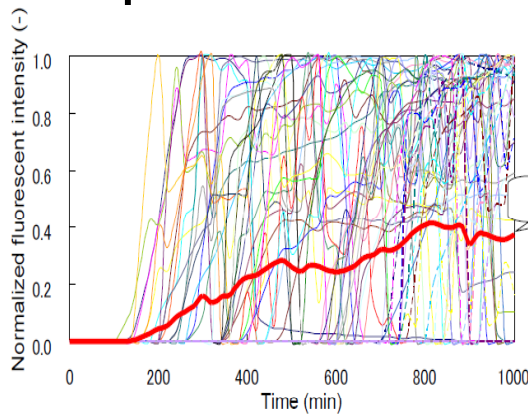
遺伝子発現・ノックアウトを同期化することにより、細胞毎のダイナミクスを損なうことなく、統一的に細胞を扱うことができる。

遺伝子発現・ノックアウトの同期化の必要性

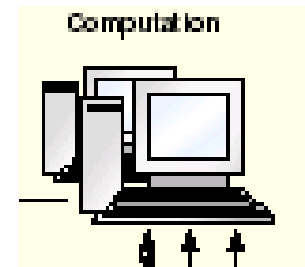


セルアレイ

パスイレポーターによる時系列モニタリング



時系列データ解析



1アレイ中の細胞全体で平均化した遺伝子発現のダイナミクスは細胞毎の遺伝子発現のダイナミクスと大きく異なる

デバイス関連技術の開発

目標

パスウェイ創薬のターゲットの拡張と解析精度の向上を支援する技術の開発

- ・ セルアレイ技術を用いた癌浸潤・転移能関連遺伝子ハイスループット検出デバイスの構築と低侵襲高効率な汎用的遺伝子導入デバイスの開発
⇒ **セルアレイ技術の汎用性・有用性の向上**
- ・ 遺伝子発現パスウェイ時系列解析のための遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発
⇒ **光を用いた遺伝子発現・抑制の時空間的制御**

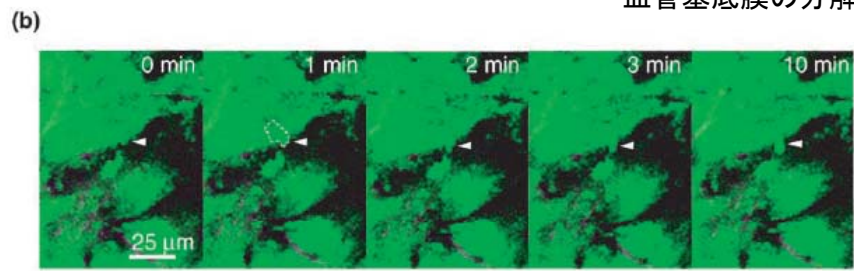
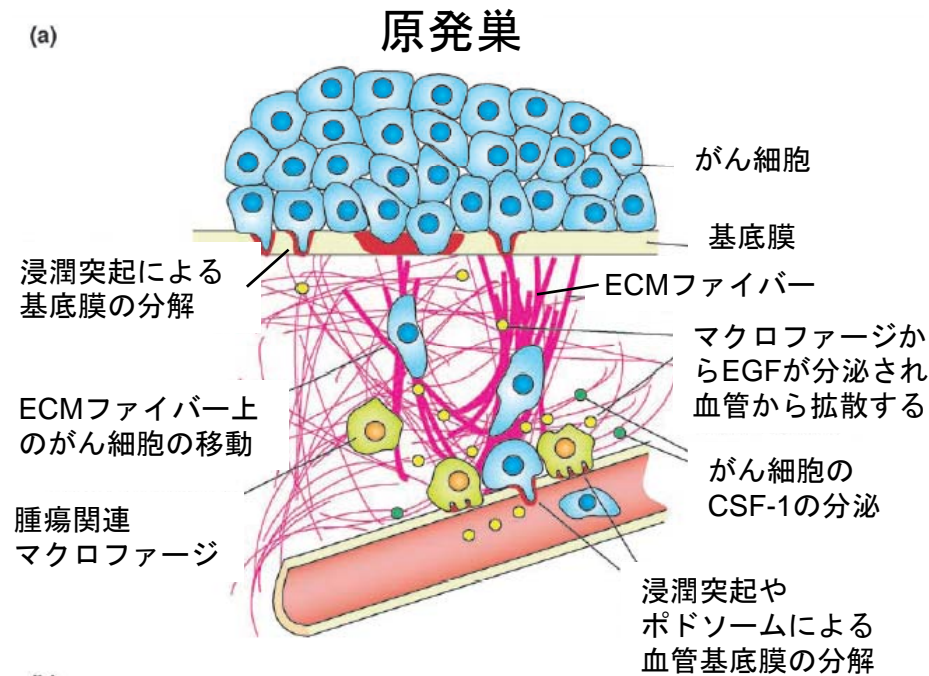


実施内容

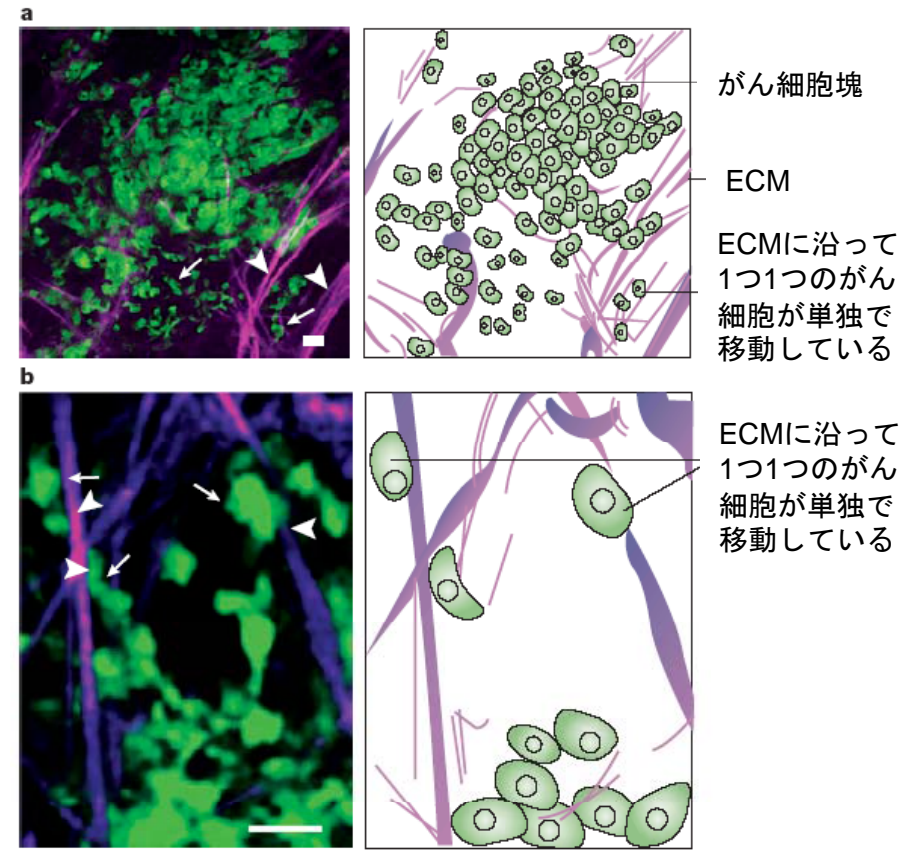
- ① 癌浸潤・転移能評価系へのセルアレイ技術の応用と浮遊系細胞、弱接着系細胞、接着系細胞など、各種細胞に適用可能な低侵襲高効率な汎用的セルアレイ技術の確立
⇒ **癌細胞浸潤・転移能評価デバイスの構築(長棟研・三宅研、産総研RICE臨海)**
⇒ **低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発(鷺津研、長棟研)**
- ② 細胞に導入された遺伝子やsiRNAの発現時期の同期化ならびに遺伝子発現量・抑制量の制御が可能な分子システムの確立
⇒ **遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発(長棟研)**

癌細胞運動性評価チップの開発

癌組織における細胞運動の可視化



Current Opinion in Cell Biology



癌細胞運動性評価チップの開発

細胞の方向性を持った遊走(細胞運動性)

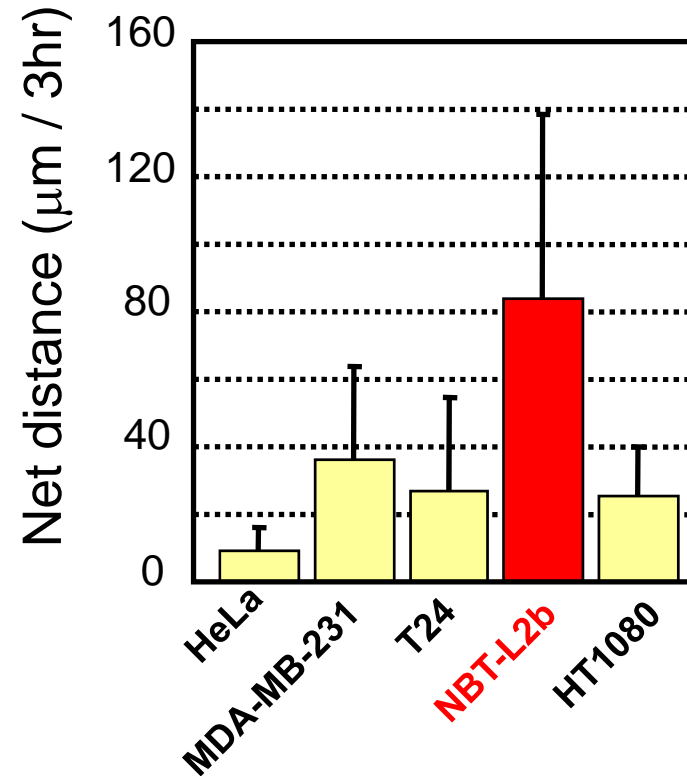
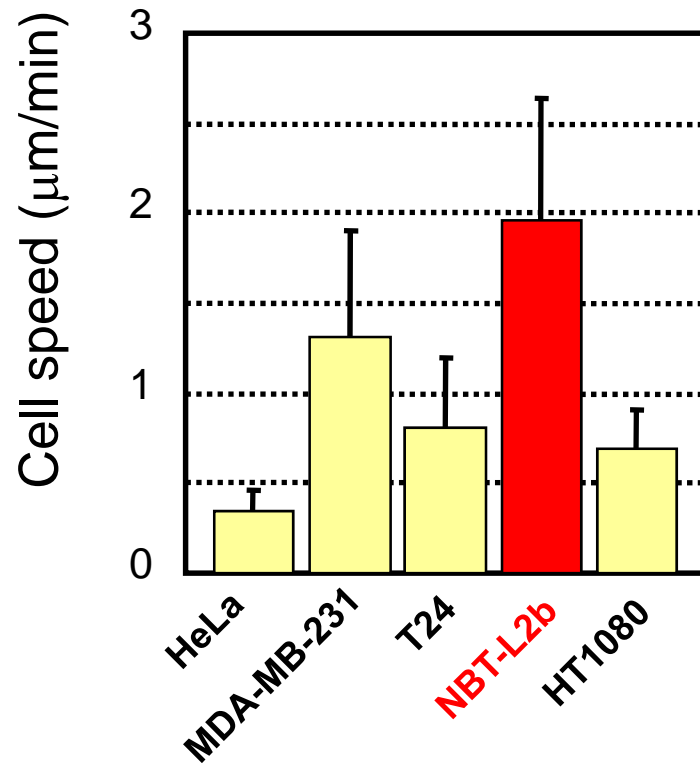


現行の細胞運動性の評価方法

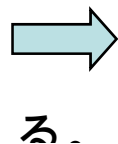
		長所	短所
Wound-healing assay		<ul style="list-style-type: none"> ・簡便。 ・マルチウェルを使ったスクリーニング系が確立されている。 	<ul style="list-style-type: none"> ・スクラッチする面積のコントロールが困難 ・Contact inhibitionの解除・細胞増殖に関する遺伝子群の影響を排除できない
Boyden chamber (Chemotaxis assay)		<ul style="list-style-type: none"> ・培地中に加えた誘引物質の評価が可能。 ・ゲルの重層によりプロテアーゼ分泌のステップも評価できる。 	<ul style="list-style-type: none"> ・再現性が取りにくい ・誘引物質に対するレセプターなど細胞運動にいたるまでの上流因子が多く取れてしまう。

癌細胞運動性評価チップの開発

細胞運動評価用細胞の選定



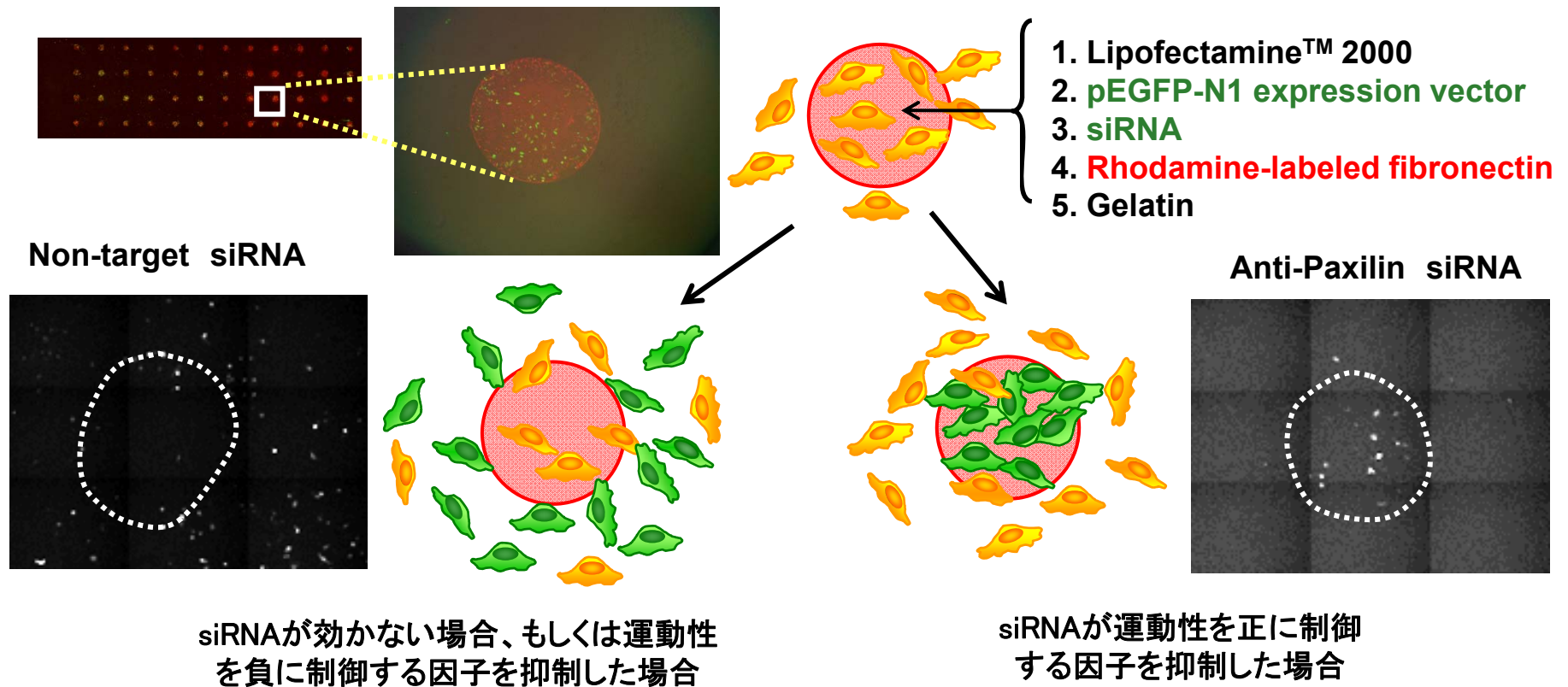
コラーゲンコートディッシュでNBT-L2b(ラット膀胱癌細胞)が最も速い運動性と高い直線運動性を示した。



運動を阻害する薬剤やsiRNAのスクリーニング、細胞運動能を促進する遺伝子のスクリーニングに適している。

癌細胞運動性評価チップの開発

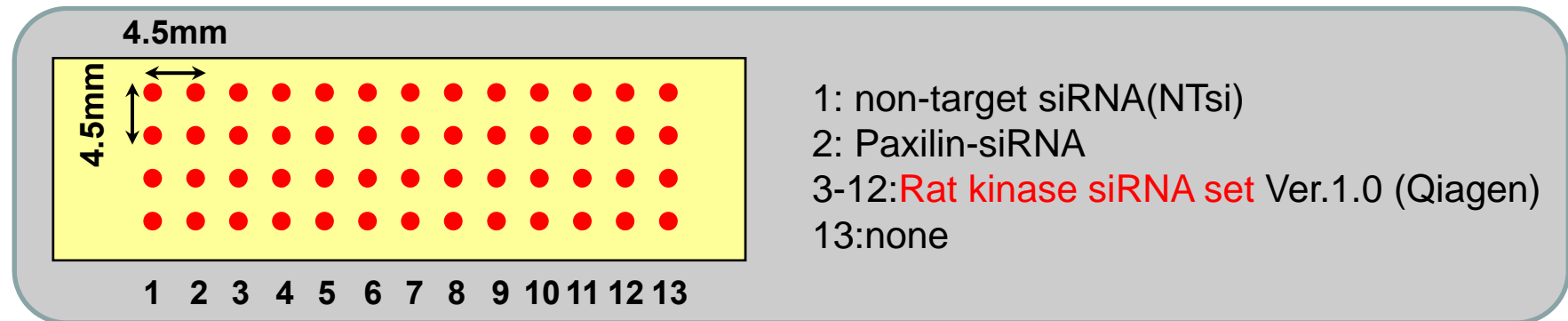
細胞運動性評価チップの開発



赤色蛍光内の緑色蛍光強度 (EGFP発現ベクターとsiRNAが共導入された細胞) で簡便に運動性が評価できる

癌細胞運動性評価チップの開発

細胞運動を阻害する候補遺伝子の
ハイスループットスクリーニング

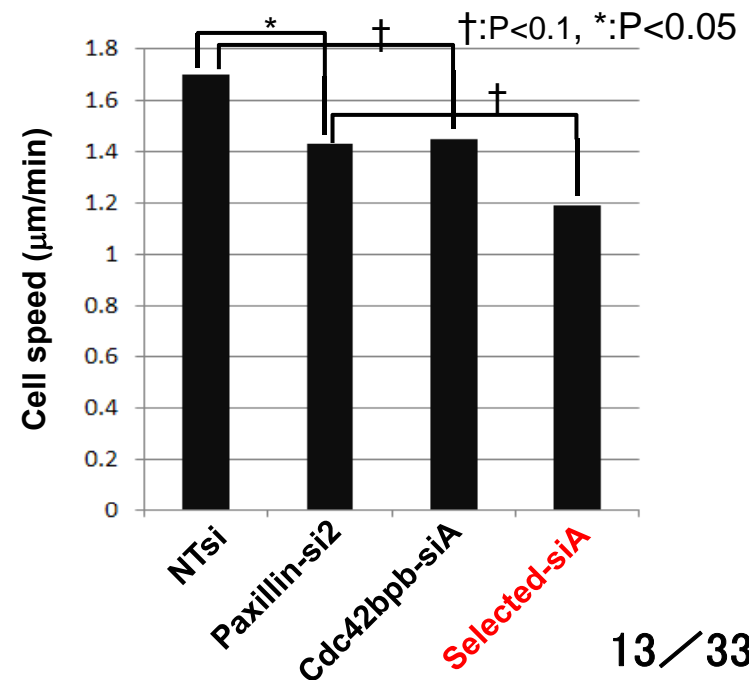


キナーゼ736遺伝子を阻害する1476 siRNA
を用いたセルチップ解析

時系列細胞イメージを取得

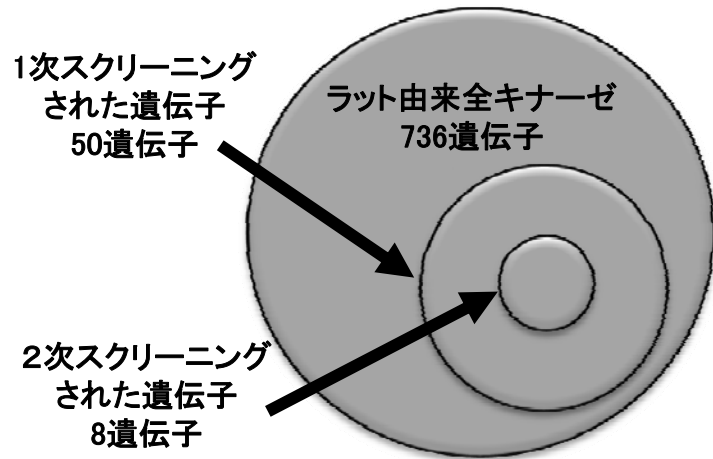
細胞の認識と細胞運動の追跡

細胞運動を阻害したsiRNAについて2次評価



癌細胞運動性評価チップの開発

スクリーニング手順と結果



手法：

☆1st screening (736遺伝子→50遺伝子)

- ・細胞運動評価チップ
- ・4倍レンズにより撮像した画像の時系列解析（細胞運動速度）

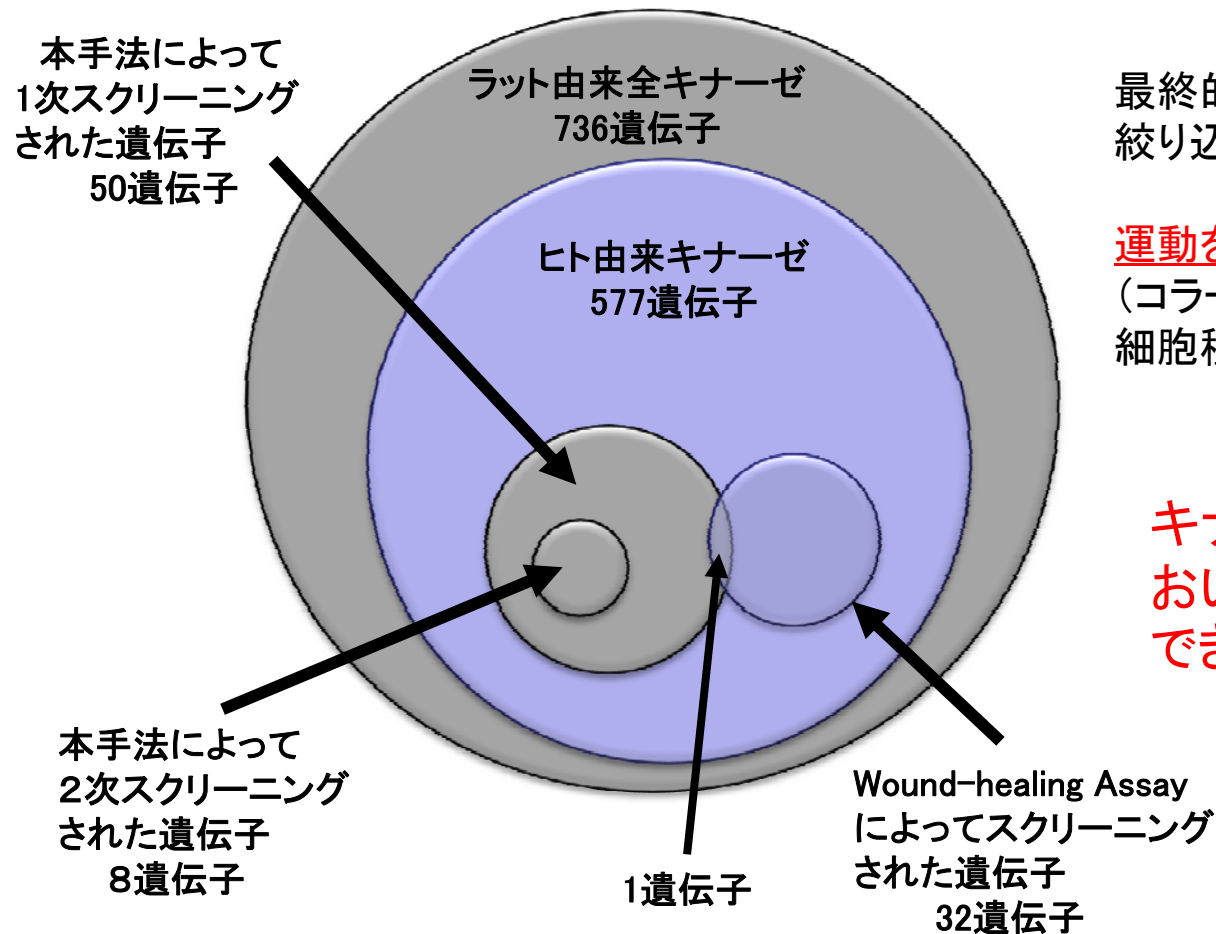
☆2nd screening (50遺伝子→8遺伝子)

- ・24well
- ・20倍レンズにより撮像した画像の時系列解析（細胞運動速度）
- ・siRNAによるノックダウン効果

Symbol	KD効率 %	細胞運動	疾患との関連	備考
gene12	50-60	既知??	糖尿病・肥満、膵管腺癌で発現↑	発現抑制により運動↓。調節機構未知(Wound-healing assay)
gene43	50-60	未知		ERK1/2の活性調節に関与。
Tgfbr1	20-30	既知		EMTに関与。
gene39	60-70	未知		細胞死を誘導。
gene36	70-80	既知	浸潤性の乳がんの20~40%において体細胞変異が見られる。	
gene42	30-40	未知	結腸直腸癌で発現が高い。	細胞増殖を制御。オートファジーやERストレスにも関与。
gene16	50-60	未知	転移性のメラノーマで発現が高い。	
gene22	50-60	既知	肺がん・肝細胞がんで発現↑	細胞骨格調節因子

癌細胞運動性評価チップの開発

本手法と既存手法 (Wound-healing Assay)
でのスクリーニングの比較



最終的に絞り込まれた遺伝子は、既報で絞り込まれた遺伝子と重複しなかった。



運動を誘導する手法の違い。
(コラーゲンコート vs 細胞の物理的剥離)
細胞種 (膀胱がん vs 乳がん) の違い。



キナーゼ以外のライブラリーにおいても未知の遺伝子を同定できる可能性が非常に高い。

癌細胞運動性評価チップの開発

まとめ

- ・ 細胞運動評価セルアレイ技術基盤を確立した。
- ・ Kinaseをターゲットとして細胞運動を亢進・抑制する因子の探索を行い、候補を抽出した。

実用化への方向性

- ・ 一細胞ごとの細胞評価により、遺伝子発現、薬剤応答、細胞運動を詳細に解析する技術を確立し、創薬・医薬品開発支援技術として役立てる。

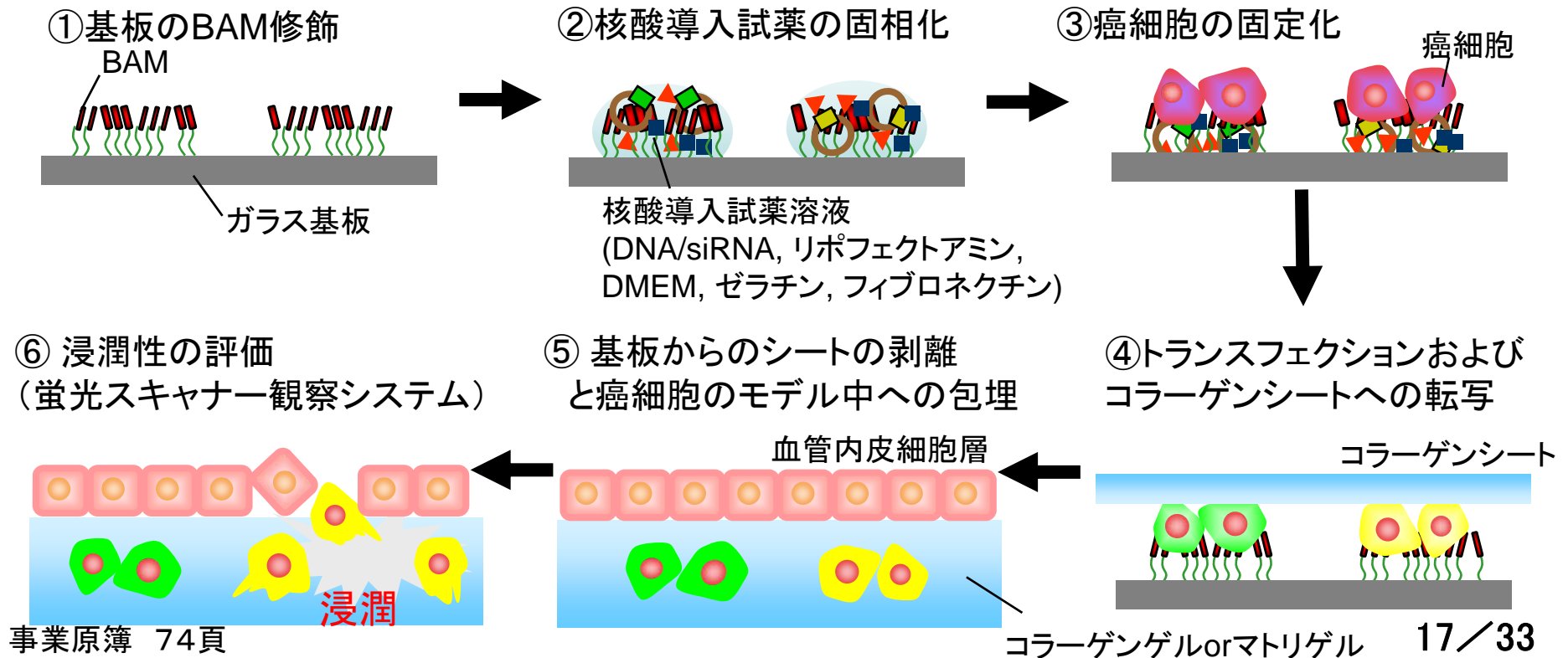
癌細胞浸潤性評価チップの開発

核酸導入細胞アレイ転写技術と癌細胞浸潤性評価技術の概要

セルアレイ技術で調製した核酸導入癌細胞アレイを、望みの環境場に転写できれば、より生体内環境に近い条件化でのスクリーニングや遺伝子解析が可能になる！！

(本研究では、siRNA導入癌細胞を、血管内皮モデルシート中に転写する)

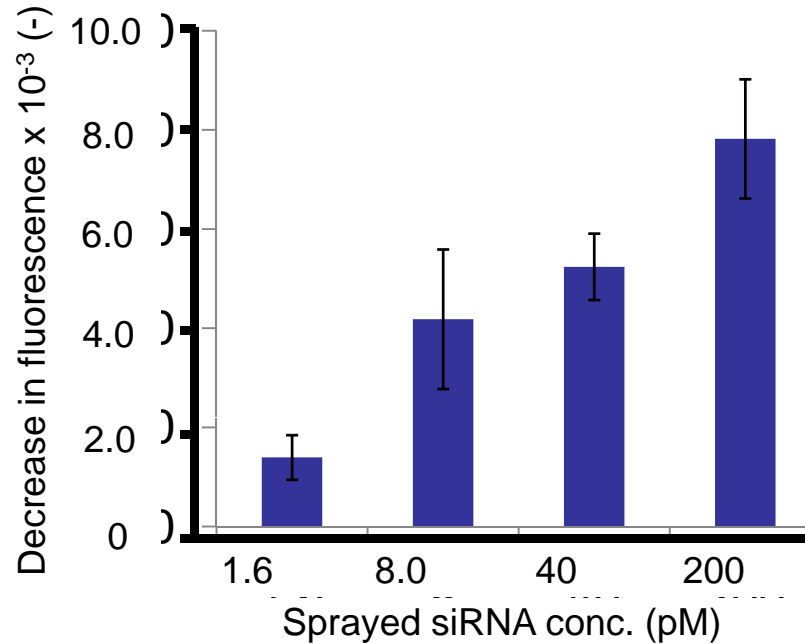
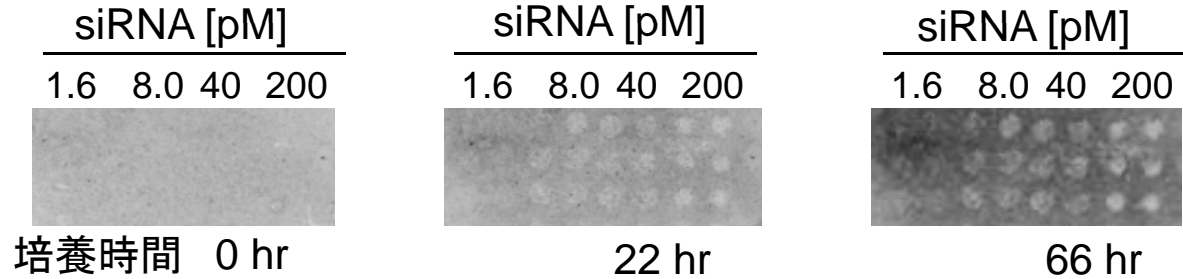
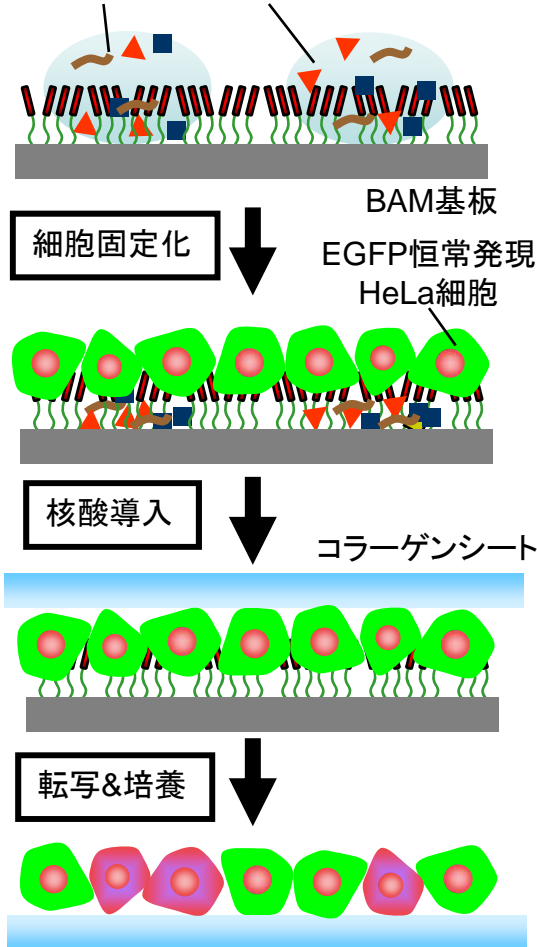
核酸導入細胞転写技術



癌細胞浸潤性評価チップの開発

siRNA導入癌細胞のコラーゲンゲルシートへの転写

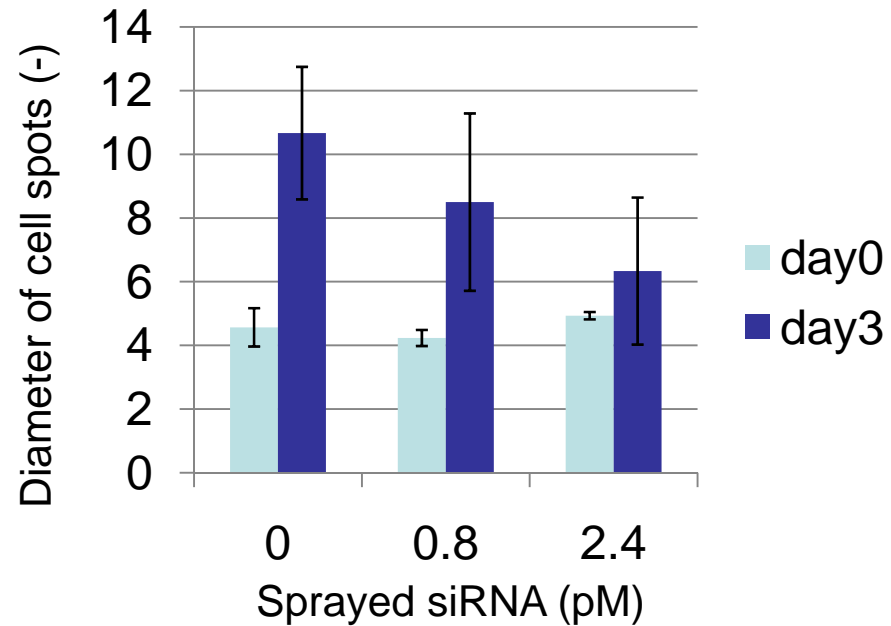
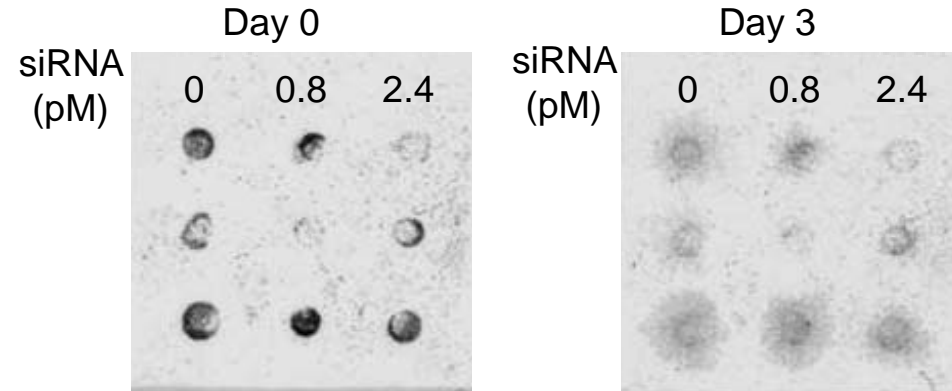
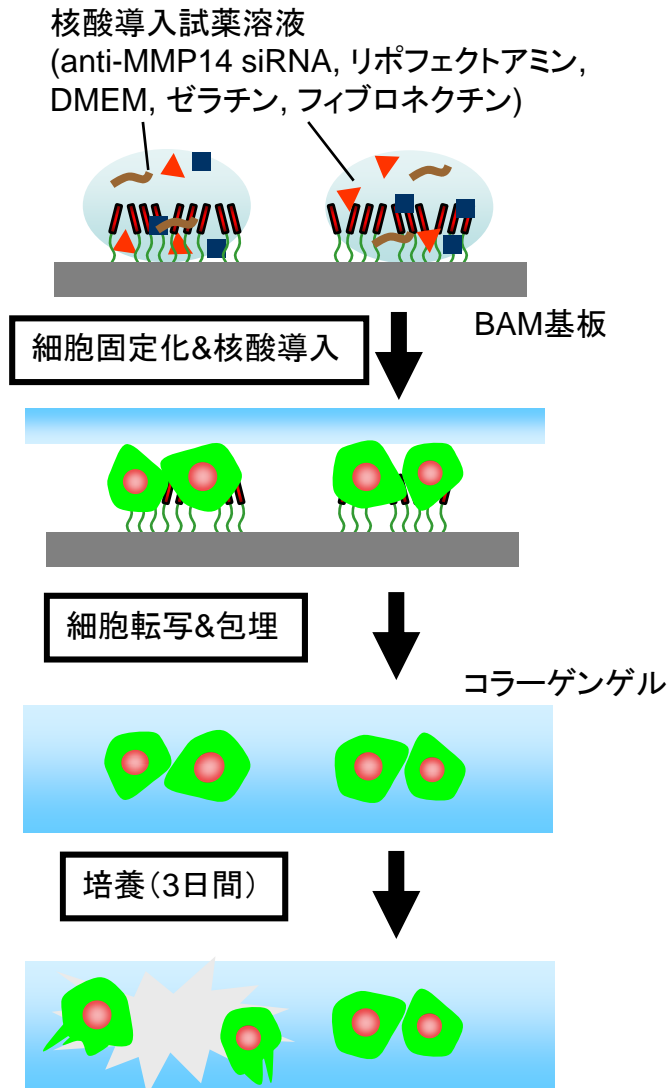
核酸導入試薬溶液
(anti-EGFP siRNA, リポフェクトアミン,
DMEM, ゼラチン, フィブロネクチン)



固相化したsiRNA量に応じた蛍光のノックダウンを確認

癌細胞浸潤性評価チップの開発

モデルマトリクス内での浸潤性評価

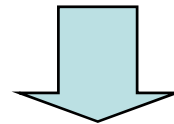


anti-MMP siRNAの浸潤抑制効果の評価に成功!

癌細胞浸潤性評価チップの開発

まとめ

- ・ 核酸導入細胞アレイをゲルシート上に転写する技術の開発
 - ⇒ プラスミドを導入した細胞の転写に成功
 - ⇒ siRNAを導入した細胞の転写に成功
- ・ モデルコラーゲンマトリクスにアレイした癌細胞の浸潤性を検討
 - ⇒ 浸潤性の高い癌細胞の拡散を可視化
- ・ siRNA導入細胞の浸潤性の評価に挑戦
 - ⇒ siRNAによる浸潤抑制の検出に成功



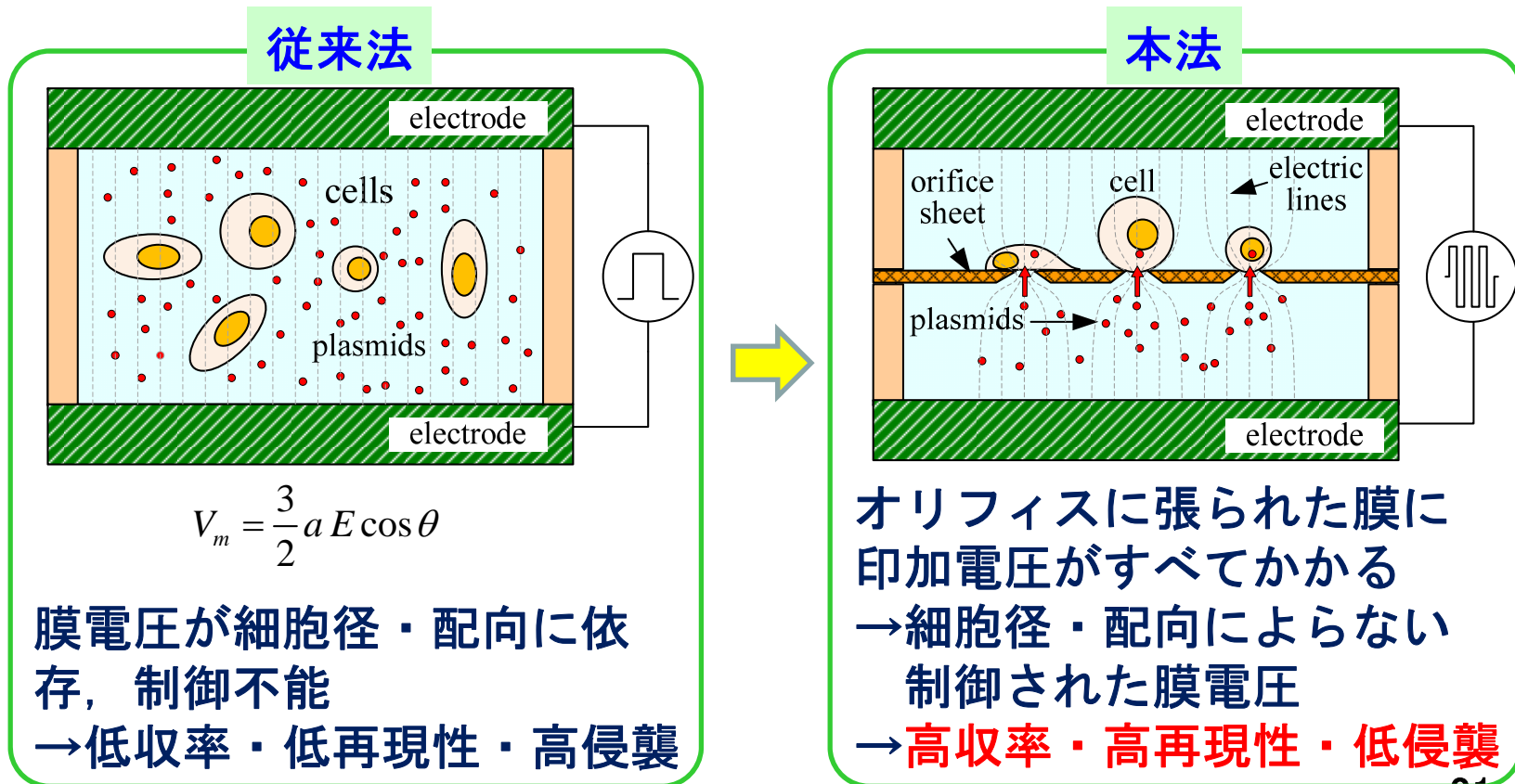
実用化への方向性

浸潤に関わる遺伝子や浸潤抑制効果を有するsiRNAやmicroRNAの網羅的スクリーニングを実施し、創薬支援技術となり得ることを示す

低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

オンチップエレクトロポレーション法

目的：アレイ上で培養しても遺伝子導入効率が低い接着系細胞や浮遊系細胞への低侵襲かつ高効率な汎用的遺伝子導入技術の開発



低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

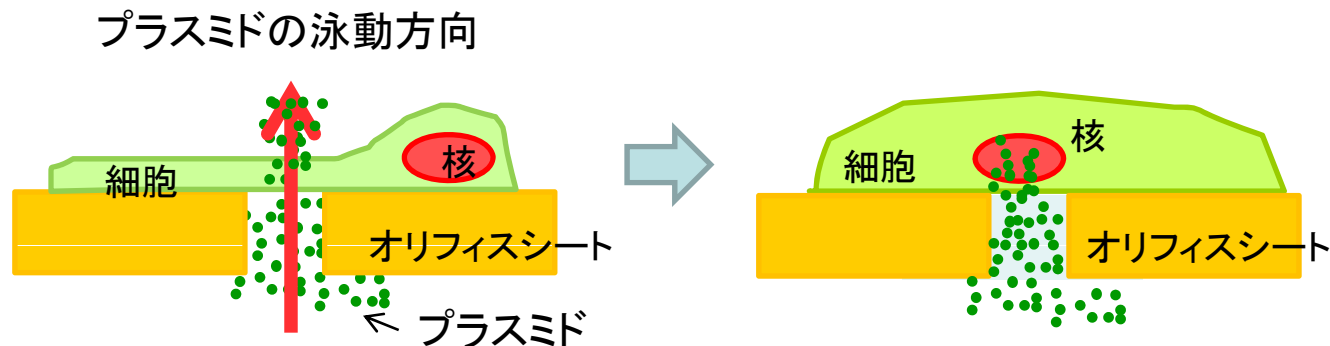
従来法の問題点

問題点：球形に近い細胞や、重層している細胞には入るが、疎にまかれた扁平に付着する細胞には入りにくい。

理由：扁平なため、プラスミドが通り抜けてしまい、核に到達できない

→ 媒質の導電率を下げる；電気泳動による濃縮効果

核の直下にオリフィスが1個あるように、オリフィス密度を上げる。

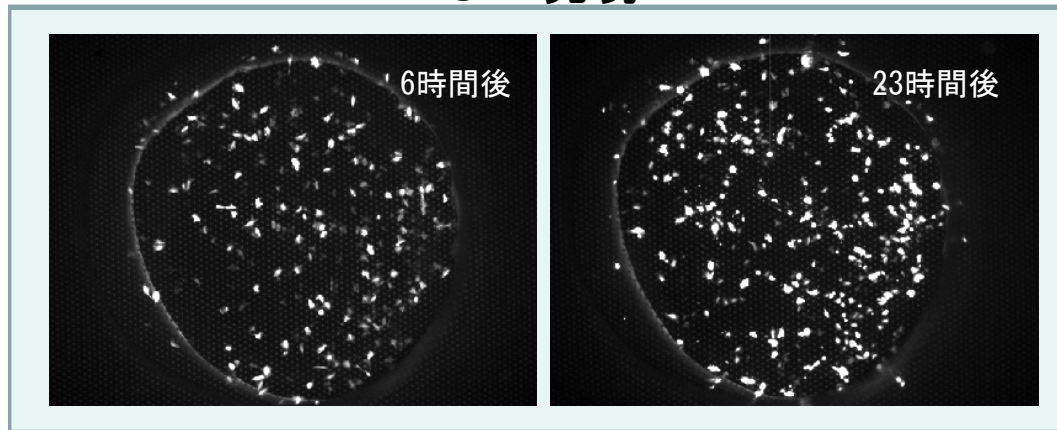


低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

実験結果

電気泳動による濃縮効果

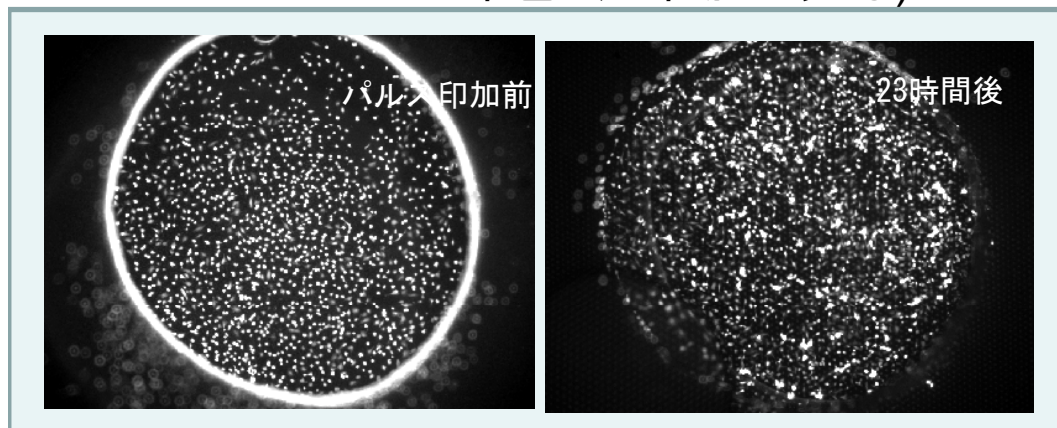
GFP発現



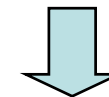
媒質：マンニトール溶液，濃度：150mM，
導電率：1mS /cm（生理塩濃度～10mS/cm）
細胞：MSC細胞，444個/mm
パルス：3V，100msec矩形波，1分間隔で2回印加

- ・パルス印可後2時間くらいで、すでにGFPの発現が見られる
- ・細胞の10-20%程度でGFPが発現，

カルセインAF染色（生細胞が光る）



- ・23時間後もパルス印加前とほぼ同じ生細胞数

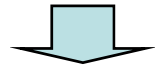


電界集中型エレクトロポレーション法
は細胞に対して低侵襲

低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

高密度オリフィスの開発

電気泳動により核にプラスミドを導入すれば高発現率

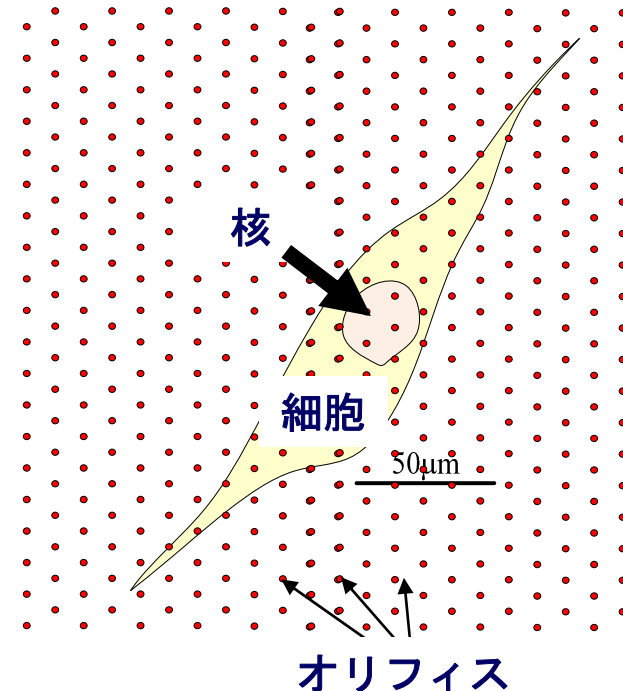
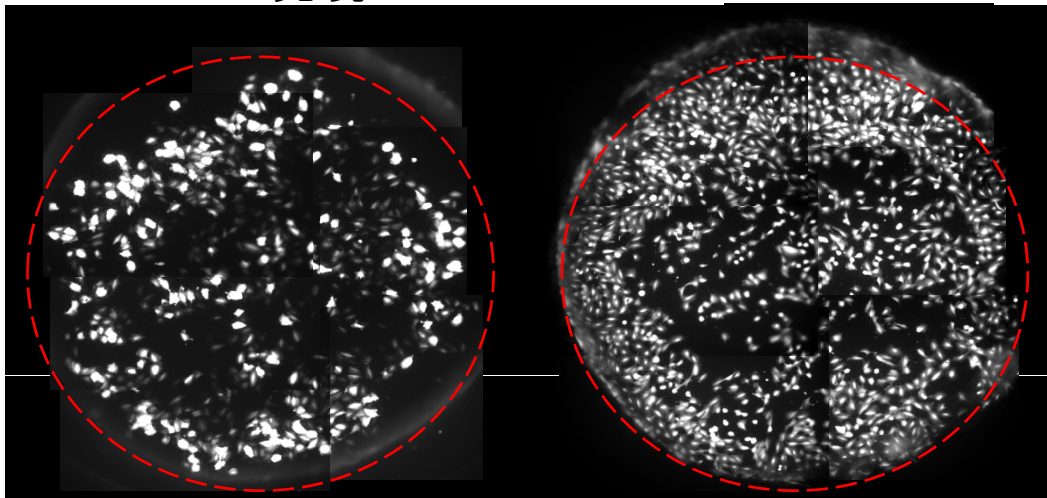


- ・核の直下に1つ以上のオリフィスがあり、かつ十分な電界集中が得られるよう、ピッチを最適化
- ・リソグラフィーによるオリフィスシート作製法の開発

実験結果

GFP発現

カルセイン染色
(生細胞が光る)

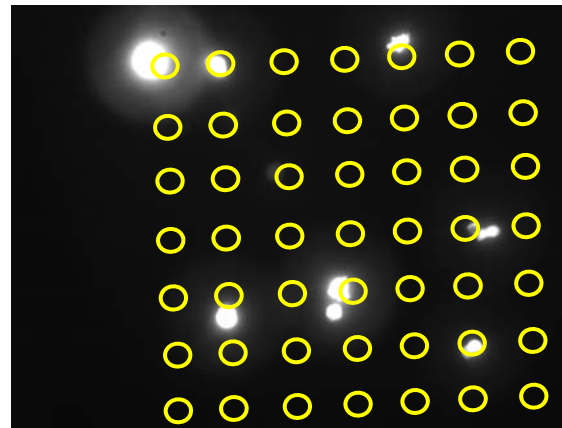
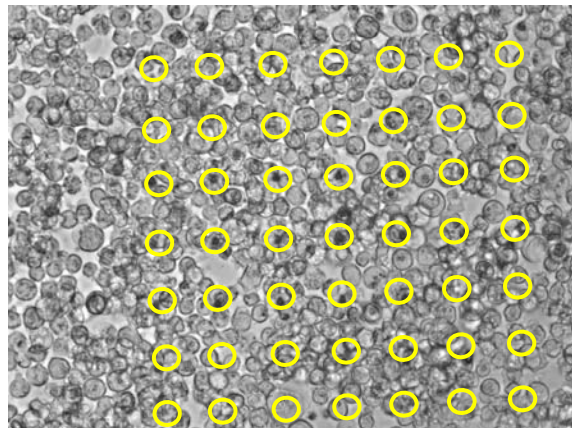
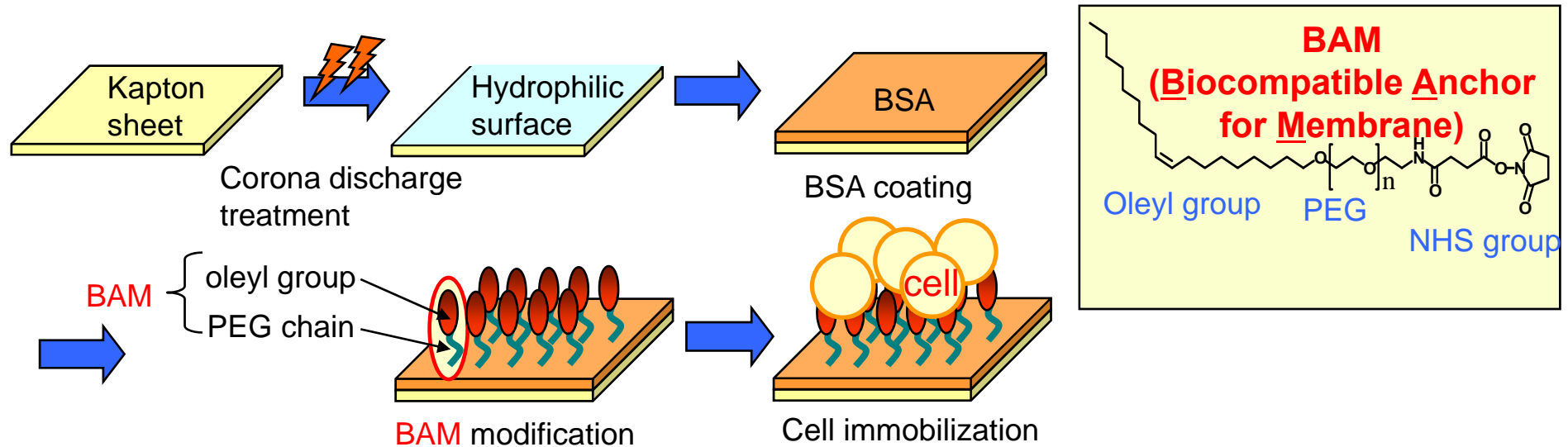


- ・数10%の導入率が安定して得られた
- ・パルス印加前とほぼ同じ生細胞数

媒質：マンニトール溶液，濃度：150mM，
導電率：1mS /cm (生理塩濃度~10mS/cm)
細胞：MSC細胞，444個/mm
パルス：4V，200msec矩形波，単発

低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

浮遊系細胞へのプラスミドの導入



細胞 : K562
プラスミド : 200ng/μl pVirus-C1
パルス : 矩形波, 10V, 100msec, single

低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

まとめ

- ・ 導入メカニズムの解析と安定した高収率の実現(鷺津研担当)
 - 電界条件および絶縁膜の改良 ⇒ **遺伝子発現に成功**
 - 電気泳動による濃縮 ⇒ **導入効率の向上**
 - 高密度オリフィスの使用 ⇒ **大量並列化**
- ・ 浮遊性細胞への遺伝子導入条件の検討(長棟研担当)
 - 浮遊系細胞へ応用 ⇒ **遺伝子発現に成功**
 - 簡易流路を用いて並列化 ⇒ **異種遺伝子の並列同時導入に成功**

実用化への方向性

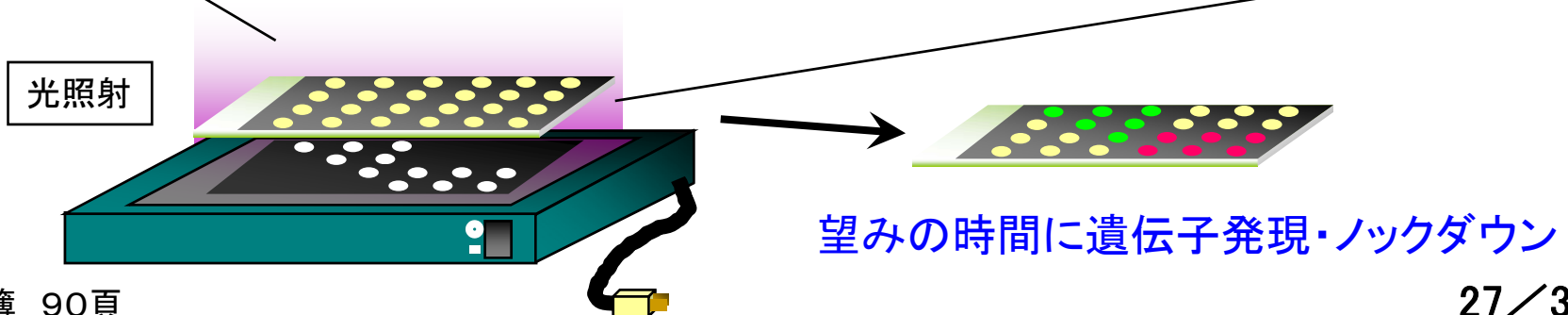
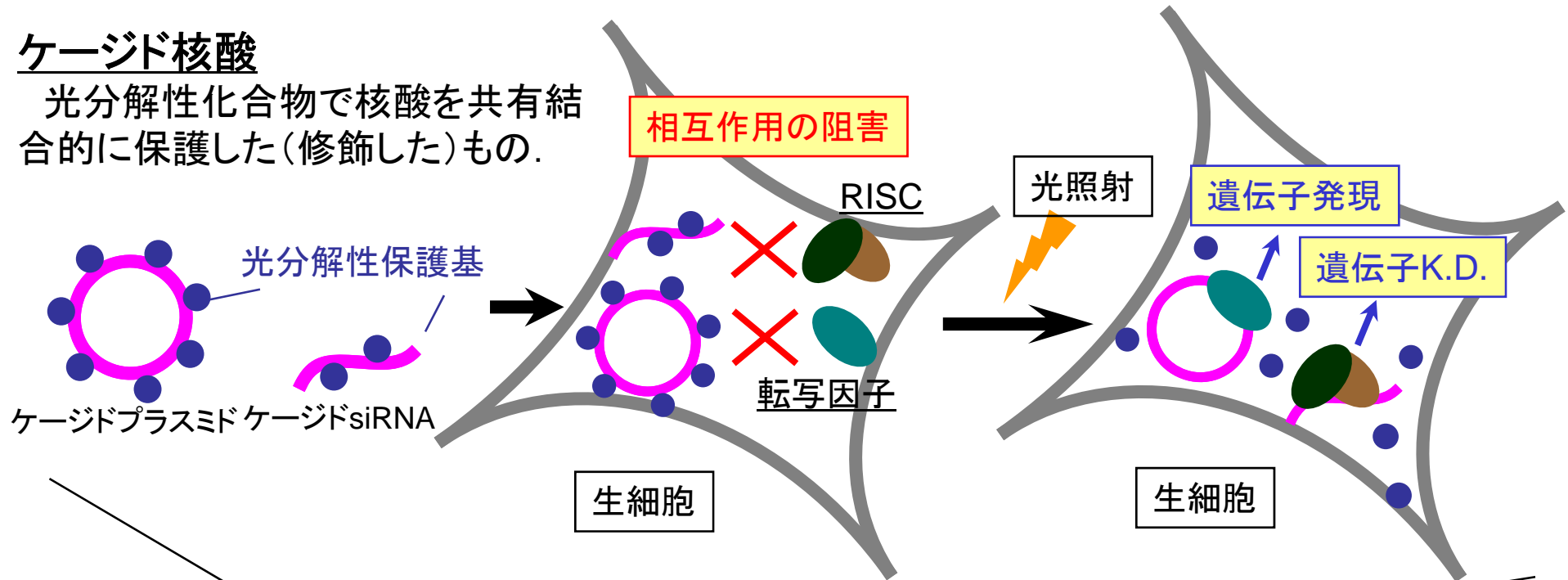
- ・ 接着性細胞を用いた検討によって改良された手法を、様々な種類の接着細胞や浮遊性細胞に応用し、汎用性を調べる。
- ・ 多種類の核酸試料を並列して同時に導入するために、微小チャンバーなどのMEMSデバイスを組み合わせる。

遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

ケージド核酸を用いた遺伝子発現制御

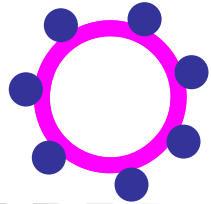
ケージド核酸

光分解性化合物で核酸を共有結合的に保護した(修飾した)もの。



遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

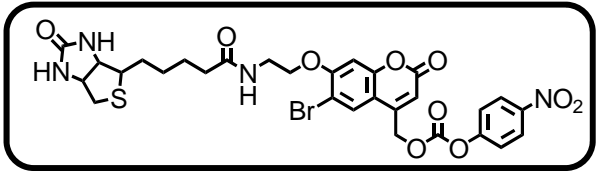
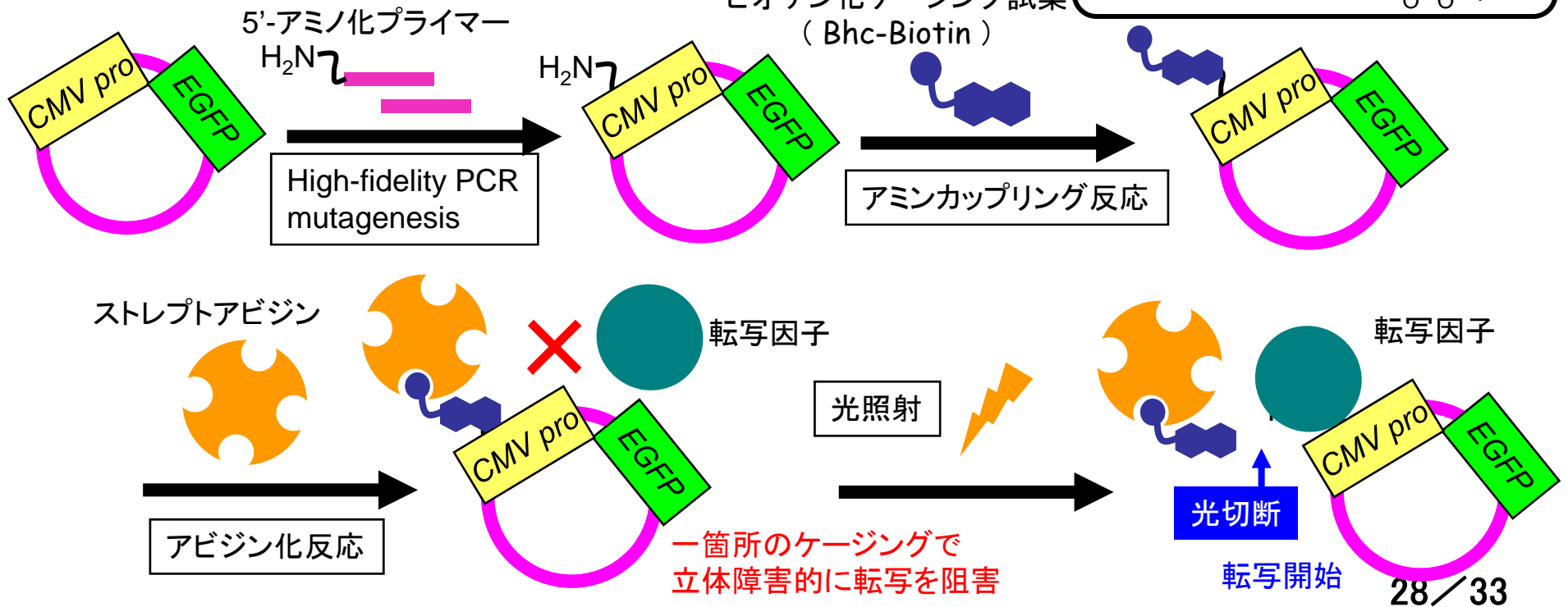
部位特異的ケーシング法の概要



従来のランダム修飾型ケージドプラスミドの問題点

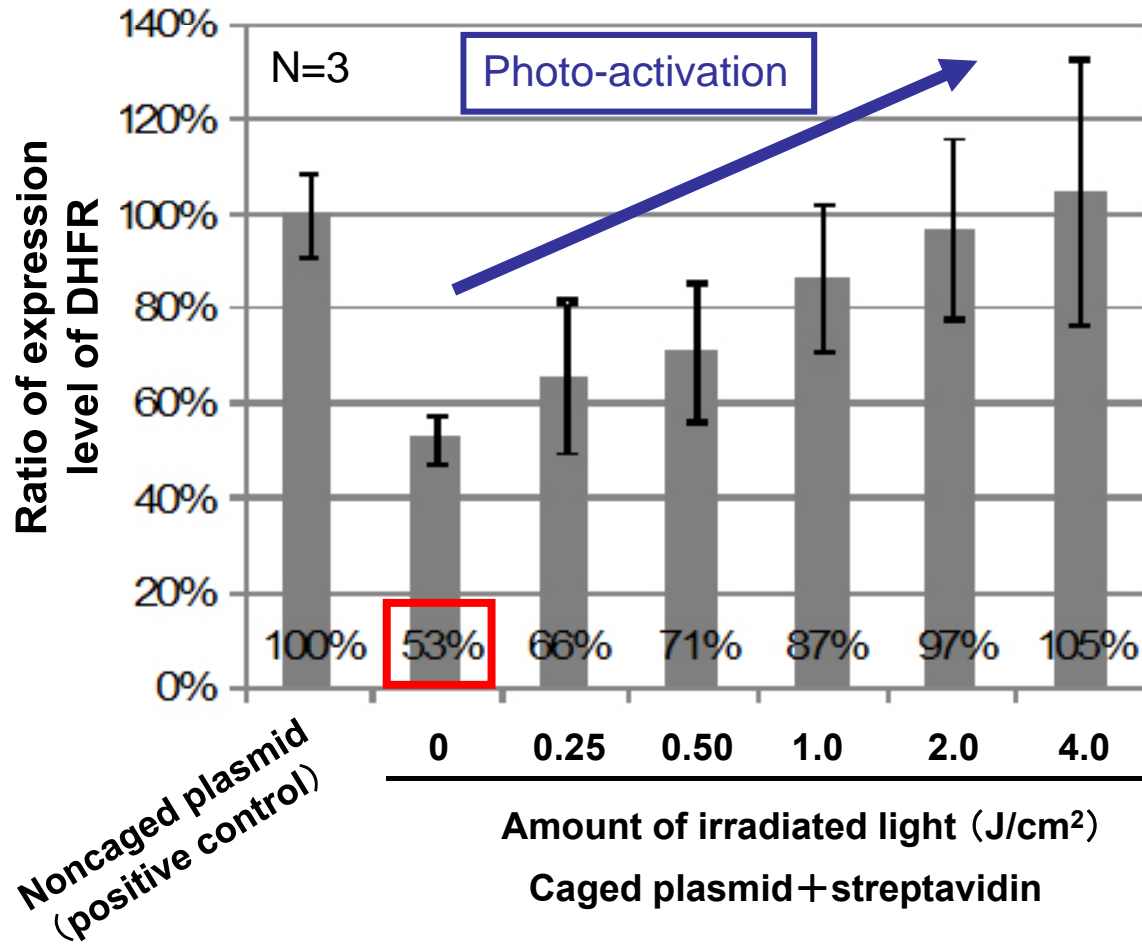
- ・ 光照射前の転写抑制率が低い
- ・ 転写を強く抑制するために過剰に修飾すると、光照射による発現誘導が不可能

プロモーター配列特異的ケーシング法



遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

無細胞蛋白質合成系による評価

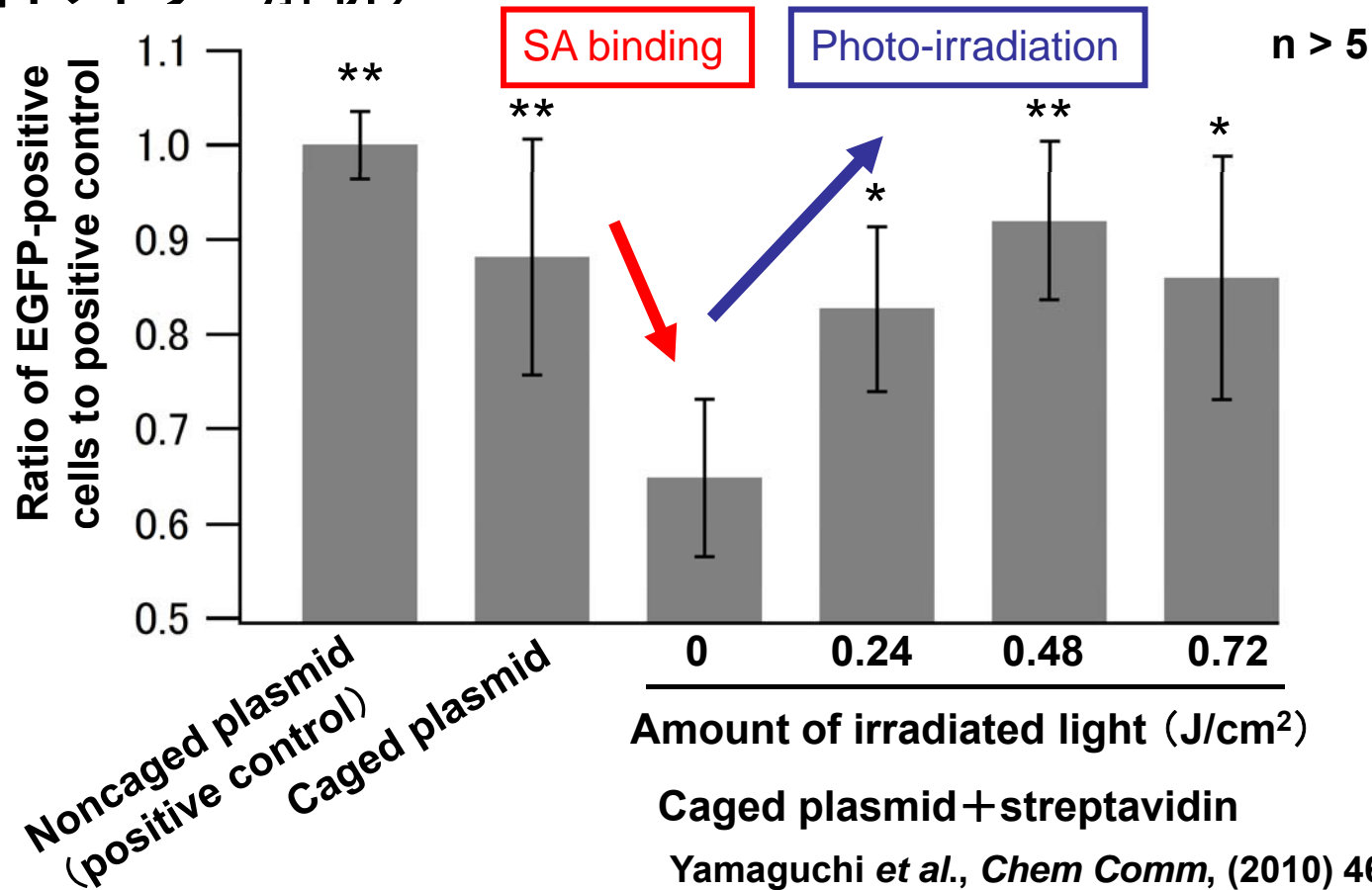


→ 光照射によって発現量を50~100%の範囲でコントロール可能!

遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

遺伝子発現の光制御 (フローサイトメトリー解析)

細胞 : HeLa細胞
培養時間 : 遺伝子導入後24 h
光照射 : 導入後2 h後に照射

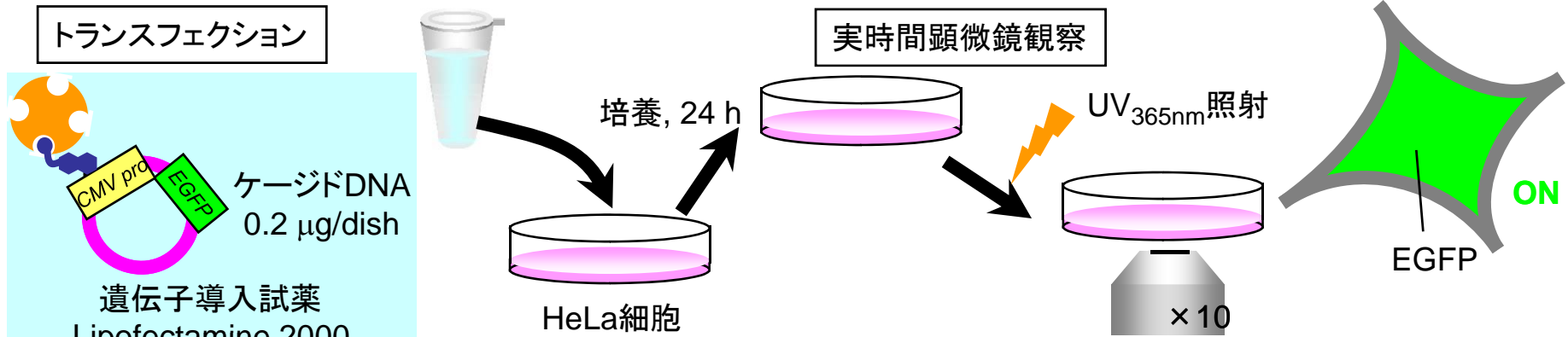


最大で抑制した陽性率の4分の3が光照射で回復

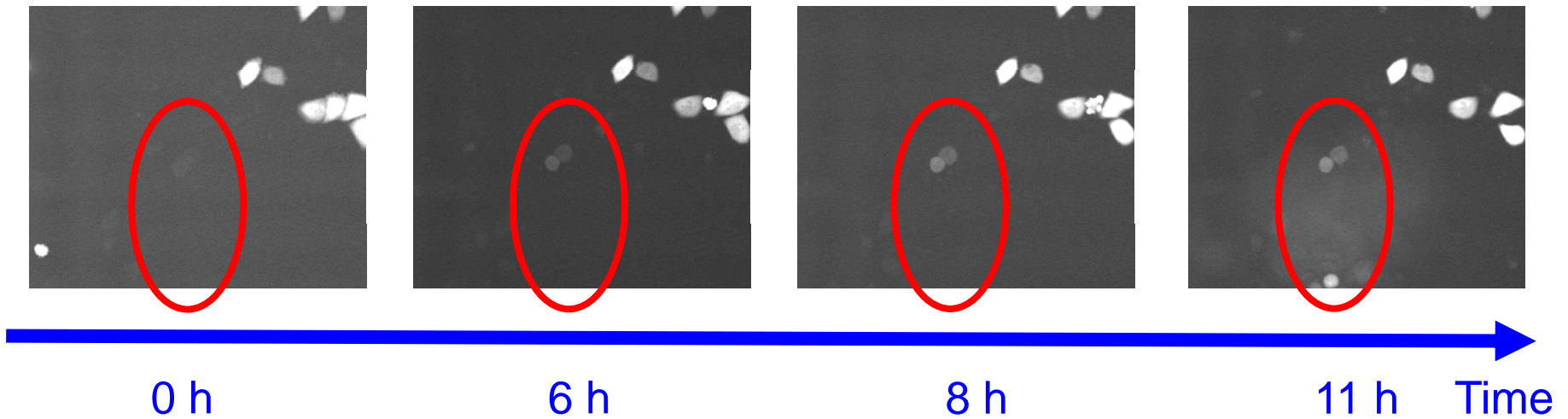
事業原簿 90頁 → 弱い光で遺伝子発現の活性化に成功！

遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

実時間観察



(注) 微分干渉像により、分裂直後の蛍光増加ではないことを確認

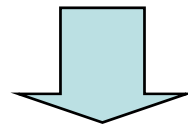


→ 画像解析を行うと、光照射後全体的に蛍光が増加した

遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

まとめ

- ・ 部位特異的ケージドプラスミドの開発
 - ⇒ 微量の光照射によって**遺伝子発現の光活性化に成功**
- ・ 部位特異的ケージドプラスミドによる光発現誘導の実時間観察
 - ⇒ **光照射による発現誘導を確認**
- ・ 無細胞発現系による部位特異的ケージドプラスミドの性能評価と改良
 - ⇒ **精製により光照射前の遺伝子発現量を低減**
 - ⇒ **発現量を50 ~ 100%の範囲で光制御**



実用化への方向性

- ・ 光照射前の転写をより厳密に抑制する改良
- ・ 部位特異的ビオチン化ケージドDNAをshRNAの転写制御に応用
- ・ 実時間細胞蛍光観察装置およびその解析プログラムと組み合わせて、光照射後の遺伝子発現過程を定量的に解析

成果のまとめ(発表論文など)

1. 癌細胞浸潤・転移能評価デバイスの構築

【産総研RICE・臨海グループ】

- 1) 特願2007-144215、特開2008-295351、WO2008/149809
- 2) Onuki-Nagasaki, R. *et al.*, Lab Chip, (2008) 8, 1502
- 3) 長崎晃ら、生化学 (2009) 81, 381
- 4) Onuki-Nagasaki, R. *et al.*, Method in Mol. Biol., (2010) in press

【東大】

- 1) 長棟輝行ら、“細胞転写技術を用いた細胞アレイ作製技術”, 遺伝子医学MOOK別冊, pp.230-234 (2008)
- 2) 山口哲志ら、“医薬品スクリーニング用細胞アレイのための細胞固定化および細胞転写技術”, バイオ医薬の開発技術とシーズ(山本重夫 監修)、CMC出版, pp.90-99 (2009)

2. 低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

- 1) Techaumnat, B. and Washizu, M., J. Phys. D: Appl. Phys. 40 1831-1837 (2007)
- 2) Washizu M. and Techaumna, B., IET Nanobiotechnology, Vol. 2, No. 3, p.62-71 (2008)
- 3) Kurosawa, O *et al.*, μ -TAS 2009, p.570-572 (2009)

3. 遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

- 1) Kawakami, T. ,*et al.*, ChemBioChem (2008) 9, 1583
- 2) Katayama, K. *et al.*, Chem. Commun. (2008) 5399
- 3) Hashiro, S. *et al.*, JACS (2009)131, 13569
- 4) Yamaguchi, S. *et al.*, Chem. Commun. (2010) 46, 2244