

C303

遺伝子導入細胞転写技術の癌細胞浸潤性評価 TFA チップへの応用

(東大院工)C(学)松沼 絵里香・(正)山口 哲志・(正)新海 政重・(阪大院基工)木原 隆典・
(東大院工)徳元 康人・(阪大院基工)三宅 淳・(東大院工)正長棟 輝行*

【緒言】

トランスフェクションマイクロアレイ (TFA) 技術は、核酸試料を導入した細胞のアレイを基板上に調製する技術であり、各試料の細胞への影響をハイスループットに調べることを可能にする。本研究では、癌細胞の浸潤に関わる遺伝子や効果的に浸潤を抑制できる核酸医薬のスクリーニングを目的として、癌細胞の浸潤性を評価できる TFA チップの開発を試みている。具体的には、PEG-脂質修飾基板を用いた細胞転写技術を応用して、プラスミドや siRNA を導入した細胞のマイクロアレイを擬似血管モデル上に転写し、各細胞が血管モデルに浸潤する様子を網羅的に顕微鏡観察するシステムの構築を試みている。

【実験方法】

PEG-脂質修飾基板は、脂質と細胞膜との可逆的な相互作用を介して細胞を固定化できる。また、固定化された細胞の上に、細胞が接着可能な表面を押し付けて接着させ、その後剥離すると、接着表面上に細胞を転写できる。そこで、プラスミドや siRNA といった核酸試料とリポフェクション試薬とから成る核酸導入用複合体のアレイを、スポットターを用いて PEG-脂質基板上に作製した後、癌細胞を固定化させて、PEG-脂質基板上でリポフェクションを行った。次に、コーゲンシート上に血管内皮細胞 (HUVEC) を重層した血管モデルシートを PEG-脂質基板上の癌細胞に押し付け、血管モデルシート上に核酸試料を導入した癌細胞のアレイを転写した。

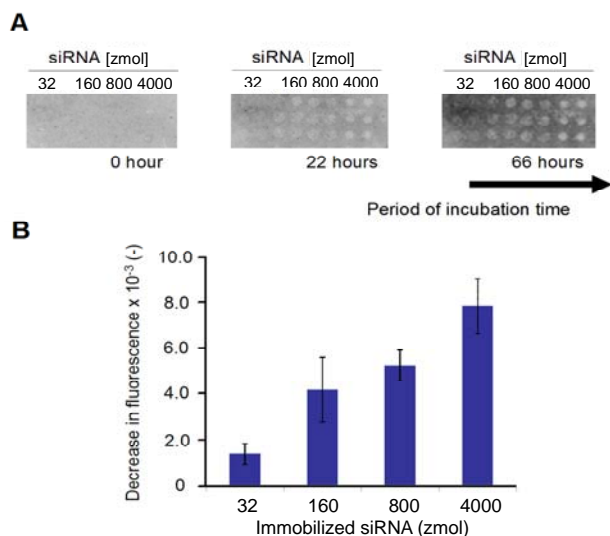


Fig. 1 siRNA を導入した GFP 恒常発現 HeLa 細胞の転写
(A)転写後に培養した細胞アレイの蛍光画像。
(B)(A)の画像解析によるサイレンシングの定量化 (66 時間後)(n = 6).

【結果および考察】

緑色蛍光蛋白質 (GFP) 発現プラスミドをアレイ化した PEG-脂質基板上から血管モデルシート上に HeLa 細胞を転写した。その結果、モデルシート上に緑色蛍光を有する HeLa 細胞のスポットが観察され、基板上での遺伝子導入とモデルシート上への細胞の転写が確認された。また、同様の方法で siRNA を導入した GFP 恒常発現 HeLa 細胞の転写を行い、モデルシート上で蛍光がスポット状に消失することも確認した (Fig. 1)。

次に、血管内皮モデル上に転写した癌細胞の浸潤性を網羅的に評価するシステムの開発も行った。血管内皮モデル中の血管内皮細胞 (HUVEC) 層を蛍光染色し、癌細胞の浸潤による HUVEC 層の破壊を蛍光検出するシステムの構築を試みた。その結果、HeLa 細胞を転写した場所では、HUVEC 層が崩壊して蛍光が減少することを、蛍光イメージャー観察および共焦点レーザー顕微鏡観察により確認した (Fig. 2)。一方、ヒト線維芽細胞 (NHDF) を転写した場合は、HUVEC 層に変化が見られなかった。これより、本システムによって癌細胞の浸潤性を評価できることが示された。

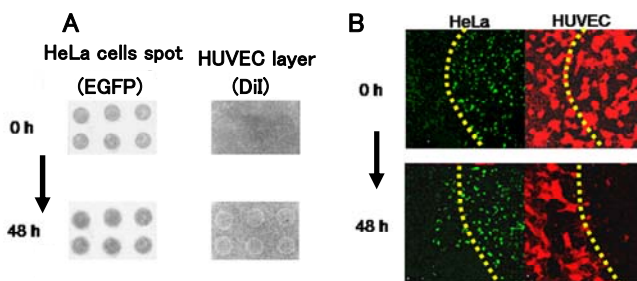


Fig. 2 HeLa 細胞スポットを転写した血管内皮モデルの蛍光イメージング
(A)蛍光イメージャー画像。(B)共焦点顕微鏡画像。HeLa 細胞は EGFP 恒常発現株を用い、血管内皮モデル内の HUVEC は DiI 染色を施して観察した。

【結言】

本研究では、遺伝子導入試薬を固相化した PEG-脂質修飾基板を用い、基板固定化細胞にプラスミドや siRNA を導入しながら細胞接着表面上へ細胞を転写する技術を確立した。今後、本研究で開発した評価系を用いて浸潤性抑制 siRNA の網羅的探索が可能であると期待される。

*e-mail:nagamune@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp