

安全かつ高効率に遺伝子を細胞へ導入できるナノシート開発に成功

～血友病や糖尿病など、遺伝性疾患や難治性疾患の細胞治療へ応用～

平成24年8月2日

独立行政法人 物質・材料研究機構

概要

1. 独立行政法人物質・材料研究機構（理事長：潮田 資勝）国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点（拠点長：青野 正和）超分子ユニット（ユニット長：有賀 克彦）の吉 慶敏（じ ちんみん）MANA 研究者とバイオマテリアルユニット（ユニット長：青柳 隆夫）生命機能制御グループ（グループリーダー：花方 信孝）の山崎 智彦 MANA 研究者らは、動物細胞に特定の遺伝子を高効率かつ安全に導入できるナノ構造のシートを開発し、その成果を実証しました。
2. 遺伝子を細胞に導入する方法には、液体中で行う方法と、固体の表面に DNA を固定しそこに細胞を接着させることで DNA を取り込ませる方法があります。今回の成果は、固体を用いる『固相トランスフェクション法¹⁾』の1つで、液相トランスフェクションと比較して、少ない DNA 量でも高い効率で細胞に遺伝子を導入できる技術として注目されています。また固体表面に多種類の DNA を整列して、細胞に導入することができることから、遺伝子の効果の系統的解析、プロファイリングに有効です。
3. しかし、これまで固相トランスフェクションでは遺伝子導入促進剤として、動物由来のタンパク質であるフィブロネクチンという細胞外マトリクス²⁾などが用いられてきました。そのために、遺伝子導入された細胞を体内に戻すような臨床応用の場では安全性などの面でかなりハードルの高いことが問題視されてきました。
4. 今回の成果では、動物由来ではない無機物のシリカだけを用い、表面からナノスケールの壁が無数に突き出したナノシート³⁾を開発しました。このナノ構造シリカに遺伝子を固着させ、細胞を接触させると極めて効率よく遺伝子が細胞内に導入されることがわかりました。本方法では動物由来の遺伝子導入促進剤を必要としないことから、安全かつ簡便な固相トランスフェクション法となります。
5. 本研究成果は、画期的な遺伝子導入方法として、細胞治療に応用できます。先天性代謝異常症、血友病などの遺伝性疾患、また糖尿病などの難治性疾患の細胞治療に大きく貢献します。
6. 本研究成果は、7月30日（英国時間）より科学雑誌「Chemical Communications」でオンライン公開されています。

研究の背景

遺伝子を動物細胞に導入する技術は、疾患関連遺伝子・たんぱく質の機能解析から、医薬品等の開発、また遺伝子治療⁴⁾や細胞治療⁵⁾に貢献します。しかしながら、既存の技術は操作が煩雑であり、遺伝子の導入効率や安全性等の点で改良の余地は大きく、画期的な遺伝子導入・発現制御技術の開発が望まれています。遺伝子導入方法としてはウイルス性ベクター⁶⁾を用いる方法と、ウイルスを用いない方法である非ウイルス性ベクター⁷⁾（キャリア）を用いる方法の2つに大きく分類されます。ウイルスを用いる方法は遺伝子導入効率は高いのですが、ウイルスを用いる安全性の問題から、医療応用へのハードルが高いという問題があります。非ウイルス性ベクターを用いる方法としては、陽性荷電脂質などからなる脂質二重膜小胞（リポソーム）と導入するDNAの電気的な相互作用により複合体を形成させ、貪食や膜融合により細胞に取り込ませる方法であるリポフェクション法が多く用いられています。しかしながら、既存の方法では細胞種によっては導入効率が異なり、特に初代細胞やES、iPS細胞においてはトランスフェクションが困難でした。また、トランスフェクション試薬によっては細胞毒性が高いという問題点もありました。

2001年MITのSabatiniらは基板表面に固着したDNAを細胞に導入する固相トランスフェクション法（別名リバーストランスフェクション法）を最初に報告しました（Ziauddin, J. et al.: Nature, 411, 107 (2001)）。固相トランスフェクションはDNAと陽性荷電脂質などの非ウイルス性キャリアの複合体を培養基材表面にコーティングすることにより、細胞の接着面から細胞へ遺伝子を曝露することによって遺伝子を動物細胞に導入する方法です。液相トランスフェクション法と比較して、1/10–1/100量の遺伝子量で十分に細胞に遺伝子が導入されます。また低容量であるため、非ウイルス性キャリアが与える細胞毒性が低いという利点があります。さらには、固相トランスフェクション法は、アレイ技術を用いて遺伝子を基板の任意の場所に非常に小さなスポットで固着させることができ、少量の細胞に多数の遺伝子を同時に導入することができ、網羅的解析に非常に有効な手段となっています。

しかしながら、従来の固相トランスフェクション法ではヒトまたは動物由来成分を用いて生産される生物由来のたんぱく質を遺伝子導入促進材として使用しており、遺伝子治療や細胞治療といった臨床応用においては安全性に問題がありました。これを解決するために、たんぱく質を遺伝子導入促進材として用いない固相トランスフェクション基材の開発が望まれてきました。

成果の内容

本研究では、遺伝子導入促進材を必要としない無機物のみから構成される固相トランスフェクション基材を開発しました。この基材はシート状のシリカの表面において表面から垂直にシリカの壁を自己成長させることで、作成します。このシリカの壁“シリカ立て板”はシリカシート上で直立（Upright）しており、シリカの壁の厚さは5nmと非常に薄く、NaBH₄で処理する時間を変えることで立て板の密度を変えることができます。このようにして、高密度化された“シリカの立て板”を作成することに成功しました。（図1）

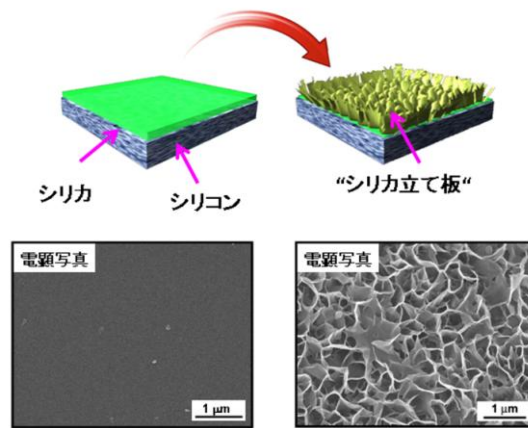


図1 ナノ構造“シリカ立て板”の電顕写真

この“シリカ立て板”へはDNAを固定できます。異なる密度をもつ“シリカ立て板”上にプラスミドDNAを塗布し、その固定量を調べたところ、立て板の密度に応じて、固定化するプラスミドDNA量を増やすことができました。今回作成した高密度“シリカ立て板”には、シリカシートと比較して、約5.5倍の高い密度でプラスミドDNAを固着することができました。遺伝子の固定化量は遺伝子発現量に関係しており、多くの遺伝子を固定化することで細胞あたりの遺伝子発現量を高くすることができます。このことから、高密度“シリカ立て板”は遺伝子導入に適した材料であるといえます。

この“シリカ立て板”をもつシリカフィルム上へはDNAだけでなく細胞を接着させることができます。緑色蛍光タンパク質をヒト細胞で発現することができるプラスミドDNAを遺伝子導入用カチオン性脂質と混合し、“シリカ立て板”に固着しました。次に、ヒト胎児腎細胞由来の接着細胞株であるHEK293細胞を添加しました。遺伝子の導入は細胞内での緑色蛍光タンパク質の発現を蛍光顕微鏡を用いて観察することでわかります。細胞をシリカフィルム上に添加してから48時間後の写真を示します。

(図2) 細胞で緑色蛍光タンパク質が生産されていることから、“シリカ立て板”をもつシリカフィルムから遺伝子導入促進材なしに、プラスミドDNAが細胞に導入されたことが示されました。また、通常の液相トランスフェクションと比較して高い遺伝子導入効率が得られました。

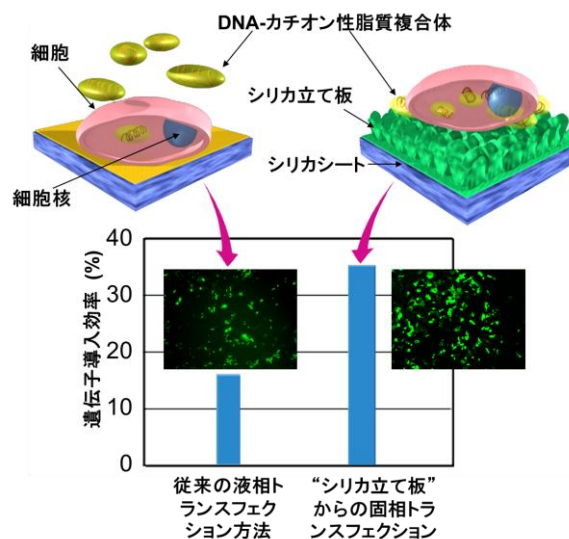


図2 “シリカ立て板”からの遺伝子導入

波及効果と今後の展開

固相トランスフェクションは液相トランスフェクションと比較して、少量多種の遺伝子を効果的に動物細胞に導入できるために、遺伝子の系統的解析、プロファイリングに有効である注目されています。また、細胞の走化性⁸⁾を用いることにより遺伝子を順番に細胞に導入していくことができます。これを応用して、疾患を持つ患者から体細胞を取り出し、DNA が固着された固相トランスフェクション基板上に加えることで、iPS 細胞を作製し、また iPS 細胞から患者さんの治療に用いる細胞に分化させることができます。今回開発したナノシートでは、動物由来成分（タンパク質）から構成される遺伝子導入促進剤を添加することなく、シリカシート上の“シリカ立て板”を介して DNA を固着でき、また細胞を接着させることができます。原材料として DNA と無機物のシリカのみからなる本ナノシートは安全かつ簡便な固相トランスフェクション基材であり、先天性代謝異常症、血友病などの遺伝性疾患、また糖尿病などの難治性疾患の遺伝子治療や細胞治療において大きく貢献します。

掲載論文

題目：F Silica-based Gene Reverse Transfection: Upright Nanosheet Network for Promoted DNA Delivery to Cell

著者：Qingmin Ji, Tomohiko Yamazaki, Nobutaka Hanagata, Michael V. Lee and Katsuhiko Ariga

雑誌：Chemical Communications (2012) (巻・号・ページは現時点では未定)

用語解説

1) トランスフェクション

核酸やたんぱく質などを動物細胞内へ導入すること。

2) 細胞外マトリクス

動物細胞外の空間を充填している糖とタンパク質の複合体のこと。細胞間の接着を制御し、細胞の増殖・分化にかかわっている。

3) ナノシート

層状酸化物などをソフト化学的な処理により、結晶構造の基本最小単位である層1枚にまで剥離することにより得られるナノ物質。

4) 遺伝子治療

異常な遺伝子を持っているため機能不全に陥っている細胞の欠陥を修復・修正することで病気を治療する手法。

5) 細胞治療

ヒトの細胞を体外に取り出し、選別、活性化、増幅、分化などの処理を行った後に体内に投与することにより、様々な疾病を治療すること。

6) ウィルス性ベクター

レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどに遺伝子治療に用いる遺伝子を導入した遺伝子導入用のプラスミド。遺伝子導入効率は高いが、安全性に問題がある。

7) 非ウイルス性ベクター

カチオン性リポソームやカチオン性高分子などを遺伝子の運搬体として用いる遺伝子導入方法もしくはその遺伝子キャリア。安全性が高いが、遺伝子導入効率が低い。

8) 細胞の走化性

細胞が周囲に存在する化学物質の濃度勾配に対して方向性を持った移動をすること。

本件に関するお問い合わせ先

(研究内容に関すること)

(1) 遺伝子導入について

独立行政法人物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (MANA)

MANA 研究者 山崎 智彦 (やまざき ともひこ)

E-mail: YAMAZAKI.Tomohiko@nims.go.jp

TEL: 029-860-4845

URL: http://www.nims.go.jp/mana/people/mana_scientist/t_yamazaki/index.html

独立行政法人物質・材料研究機構 中核機能部門 ナノテクノロジー融合ステーション
ステーション長 花方 信孝 (はながた のぶたか)

E-mail: HANAGATA.Nobutakanims.go.jp

TEL: 029-860-4774

URL: <http://www.nims.go.jp/bmc/group/control/GBSCUM/index.html>

(2) 材料作成について

独立行政法人物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (MANA)

主任研究者 有賀 克彦 (ありが かつひこ)

E-mail: ARIGA.Katsuhiko@nims.go.jp

TEL: 029-860-4597

URL: http://www.nims.go.jp/mana/people/principal_investigator/k_ariga/index.html

独立行政法人物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (MANA)

MANA 研究者 吉 慶敏 (じ ちんみん) ※日本語対応可

E-mail: JI.Qingmin@nims.go.jp

TEL: 029-851-3354 (内線 8923)

URL: http://www.nims.go.jp/mana/people/mana_scientist/qingmin_ji/index.html

(報道担当)

独立行政法人物質・材料研究機構 企画部門 広報室

〒305-0047 茨城県つくば市千現 1-2-1

TEL: 029-859-2026

FAX: 029-859-2017