

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-82402

(P2007-82402A)

(43) 公開日 平成19年4月5日(2007.4.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
	C 1 2 N 15/00 F	

審査請求 未請求 請求項の数 62 O L (全 54 頁)

(21) 出願番号 特願2004-24861 (P2004-24861) (22) 出願日 平成16年1月30日 (2004.1.30)	(71) 出願人 301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1 (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 (74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明 (74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹 (72) 発明者 三宅 正人 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術総合研究所 関西セ ンター尼崎事業所内 最終頁に続く
---	---

(54) 【発明の名称】 遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するための組成物および方法

(57) 【要約】

【課題】

遺伝物質を簡便に支持体に任意のタイミングで任意の組み合わせで固定する方法を開発すること。

【解決手段】

本発明は、遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するためのキットであって、a) 遺伝物質と、b) 該遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、c) 塩と、を含み、該遺伝物質と該荷電性物質と該塩とを固相支持体上で混合することを指示する指示書を備える、キットに関する。本発明はまた、遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するための方法であって、I) 支持体を提供する工程と、I I) 該支持体に、a) 遺伝物質と、b) 該遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、c) 塩と、を別々のまたは一緒に提供する工程と、I I I) 該遺伝物質と該荷電性物質と塩とを固相支持体上で混合する工程と、を包含する、方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するためのキットであって、

- a) 遺伝物質と、
- b) 該遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、
- c) 塩と、

を含み、

該遺伝物質と該荷電性物質と該塩とを固相支持体上で混合することを指示する指示書を備える、キット。

【請求項 2】

10

前記遺伝物質と、前記荷電性物質と、前記塩とからなる群より選択される少なくとも 2 つの物質は、混合されて提供される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

前記遺伝物質は、少なくとも 2 種類存在する、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 4】

前記遺伝物質は、DNA、RNA、PNA およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 5】

前記荷電性物質は、細胞親和性を有する、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 6】

20

前記荷電性物質は、生体分子を含む、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 7】

前記生体分子は、DNA、RNA、ポリペプチド、脂質、糖、有機低分子、およびこれらの複合体からなる群より選択される、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

前記荷電性物質は、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸およびその複合体からなる群より選択される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 9】

前記荷電性物質は、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リポソーム系試薬および帯電コロイドからなる群より選択される、請求項 1 に記載のキット。

30

【請求項 10】

前記塩は、有機酸または無機酸の水素を金属に置換したものであるか、あるいは塩基の水酸基を有機酸基または無機酸基で置換したものである、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 11】

前記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 12】

前記塩は、緩衝液、培養液および血清の形態で提供される、請求項 1 に記載のキット。

40

【請求項 13】

前記遺伝物質は、細胞に導入された後生物学的活性を有する物質をコードする、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 14】

前記遺伝物質、前記荷電性物質および前記塩は薬学的に受容可能である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 15】

前記遺伝物質、前記荷電性物質および前記塩は、マイクロカプセル中に含まれる、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 16】

50

遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するための方法であって、

I) 支持体を提供する工程と、

I I) 該支持体に、a) 遺伝物質と、b) 該遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、c) 塩と、を別々のまたは一緒に提供する工程と、

I I I) 該遺伝物質と該荷電性物質と塩とを固相支持体上で混合する工程と、を包含する、方法。

【請求項 17】

前記遺伝物質と、荷電性物質と、塩とからなる群より選択される少なくとも 2 つの物質は、混合されて提供される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記遺伝物質は、少なくとも 2 種類存在する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記遺伝物質は、DNA、RNA、PNA およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記荷電性物質は、細胞親和性を有する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記荷電性物質は、生体分子を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記生体分子は、DNA、RNA、ポリペプチド、脂質、糖、有機低分子、およびこれらの複合体からなる群より選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記荷電性物質は、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸およびその複合体からなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 24】

前記荷電性物質は、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リポソーム系試薬および帯電コロイドからなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 25】

前記塩は、有機酸または無機酸の水素を金属に置換したものであるか、あるいは塩基の水酸基を有機酸基または無機酸基で置換したものである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 26】

前記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 27】

前記塩は、緩衝液、培養液および血清の形態で提供される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 28】

前記遺伝物質は、細胞に導入された後生物学的活性を有する物質をコードする、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 29】

前記遺伝物質、前記荷電性物質および前記塩は薬学的に受容可能である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 30】

前記遺伝物質、前記荷電性物質および前記塩は、マイクロカプセル中に含まれる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 31】

前記支持体は、固相支持体である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 32】

前記支持体は、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金

10

20

30

40

50

属、天然ポリマーおよび合成ポリマーからなる群より選択される材料を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記支持体は、コーティングされる、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記コーティングは、ポリーLーリジン、シラン、A P S、M A S、疎水性フッ素樹脂および金属からなる群より選択される物質を含むコーティング剤によって行われる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記支持体はチップである、請求項 1 6 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

前記支持体はチップであり、前記複合体は該チップ上にアレイ状に配列される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記生体分子は、細胞に導入されて生物学的活性を有する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記工程 I I) は、生体分子を破壊しない条件下で行われる、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記工程 I I I) は、生体分子を破壊しない条件下で行われる、請求項 1 6 に記載の方法。

20

【請求項 4 0】

前記混合物を固相支持体に付着した後、その混合物中の溶媒を低減または除去する工程をさらに包含する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 4 1】

遺伝物質と、該遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、塩とが表面に固定された、支持体。

【請求項 4 2】

前記遺伝物質は、細胞に導入され得る、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 4 3】

前記遺伝物質は、2 種類以上含まれる、請求項 4 1 に記載の支持体。

30

【請求項 4 4】

前記遺伝物質は、D N A、R N A、P N A およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 4 5】

前記荷電性物質は、細胞親和性を有する、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 4 6】

前記荷電性物質は、生体分子を含む、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 4 7】

前記生体分子は、D N A、R N A、ポリペプチド、脂質、糖、有機低分子、およびこれらの複合体からなる群より選択される、請求項 4 1 に記載の支持体。

40

【請求項 4 8】

前記荷電性物質は、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸およびその複合体からなる群より選択される、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 4 9】

前記荷電性物質は、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リポソーム系試薬および帯電コロイドからなる群より選択される、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 0】

前記塩は、有機酸または無機酸の水素を金属に置換したものであるか、あるいは塩基の水酸基を有機酸基または無機酸基で置換したものである、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 1】

50

前記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、H E P E S、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 2】

前記塩は、緩衝液、培養液および血清の形態で提供される、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 3】

前記遺伝物質は、細胞に導入された後生物学的活性を有する物質をコードする、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 4】

前記支持体、前記遺伝物質、前記荷電性物質および前記塩は薬学的に受容可能である、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 5】

前記遺伝物質、前記荷電性物質および前記塩は、マイクロカプセル中に含まれる、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 6】

前記支持体は、固相支持体である、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 7】

前記支持体は、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属、天然ポリマーおよび合成ポリマーからなる群より選択される材料を含む、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 8】

前記支持体は、コーティングされる、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 5 9】

前記コーティングは、ポリーLーリジン、シラン、A P S、M A S、疎水性フッ素樹脂および金属からなる群より選択される物質を含むコーティング剤によって行われる、請求項 5 8 に記載の支持体。

【請求項 6 0】

前記支持体はチップである、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 6 1】

前記支持体はチップであり、前記遺伝物質、前記荷電性物質および前記塩を含む混合物は該チップ上にアレイ状に配列される、請求項 4 1 に記載の支持体。

【請求項 6 2】

前記生体分子は、細胞に導入されて生物学的活性を有する、請求項 4 1 に記載の支持体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝物質の固定技術に関する。より詳細には、本発明は、固相支持体に生体分子などの物質を固定するための方法およびそれに関するキット、組成物などに関する。

【背景技術】

【0002】

マイクロタイタープレートなどの支持体に D N A などの遺伝物質を固定して種々の分析を行う試みが広く行われている。

【0003】

従来支持体に生体分子を固定するやり方としては、例えば、共有結合を介する方法、疎水性相互作用、吸着、シラン化などの固相の表面処理などの方法がある。

【0004】

例えば、N i k i f o r o v e t a l . は、陽イオン性界面活性剤を媒体としたオリゴマーのポリスチレンウエルへの結合を利用する方法を開示した（非特許文献 1）。

【0005】

10

20

30

40

50

Nagata et al. は、未知量のクローニングDNAを0.1M MgCl₂の存在下でマイクロタイターウェルに結合させる技術を開示した（非特許文献2）。Dahlen, P. et al. は、マイクロタイターウェル中でのサンドイッチハイブリダイゼーションにおいて、クローニング捕捉DNAをウェルに吸着させることを記載している（非特許文献3）。NaClを媒体としたオリゴマーのポリスチレンウェルへの結合がNikiforov Nikiforov et al.（非特許文献4）により検討されている。

【0006】

しかし、これらの方法は、固定工程において、一定の工数を必要とするか、特殊な処理を必要とすることから、より簡便な生体分子などの物質の固定方法への需要は大いにある。

【0007】

また、固定後に徐放することが望ましい場合も多い。そのような場合として、例えば、マイクロタイタープレートなどのプレート上でいったん生体分子を固定した後、アッセイにおいてアッセイ溶液にそのプレートを浸した後にその固定された生体分子が徐々に放出することが必要な場合などが挙げられる。あるいは、細胞などの生体に対して固定後に親和性を保持することが求められる場合もあるが、従来の方法では達成されていないか、あるいは固定後の生体への親和性が大いに低減することが多く、満足な固定方法が開発されていないのが現状である。

【0008】

また、本発明者らは、支持体上に生体物質を固定するために、塩を介在させる方法を見出したが、当該分野においては、支持体上で簡易、遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入することを可能にさせるようなことが求められている。特に、複数の遺伝物質を任意に支持体（例えば、アレイなど）上で混合することで、種々のパターンのアレイを作成することができれば、細胞に関する開発スピードは格段に上昇することが期待されることから、そのような技術の登場が待ち望まれている。

【非特許文献1】Nikiforov et al.、Nucleic Acids Res. 22:4167~4175、1994

【非特許文献2】Nagata et al.、FEBS Letters 183:379~382（1985）

【非特許文献3】Dahlen et al.、Mol. Cell. Probes 1:159~168（1987）

【非特許文献4】PCR Methods Applic. 3:285~291、1994

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上記現状に鑑み、本発明では、遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入する方法を開発することを課題の一つとした。本発明はまた、支持体への固定後に、特定の溶液に溶解したときに固定された生体分子などの物質が徐放され、あるいは細胞などの生体への親和性が実質的に保持または改善されるような効果を達成する固定方法を開発することも課題の一つとした。特に、複数の遺伝物質を支持体上で任意のパターンで配置し、その後細胞に導入することができるような技術を開発することを目的とした。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記課題は、DNA、RNA、ポリペプチドなどの遺伝物質を、それとは反対の電荷を有する物質と、塩（有機塩、無機塩（例えば、培地に含まれるリン酸カルシウムなどの無機塩））とを、支持体上で混合することによって、予想外に、簡便に支持体に固定され、その後細胞に取り込まれ、細胞において発現することを本発明者らが見いだしたことによって解決された。本発明者らはまた、上記構成によって、固定された遺伝物質が、固定さ

れた後、アッセイ溶液などの溶液に支持体（例えば、プレート）を浸すと徐放されることを予想外に見いだした。本発明者らはまた、上記構成を用いると、生体（例えば、組織、細胞）に対する親和性が保持または改善されることを見いだした。

【0011】

このように、本発明は、以下を提供する。

1. 遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するためのキットであって、

a) 遺伝物質と、

b) 上記遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、

c) 塩と、

を含み、

10

上記遺伝物質と上記荷電性物質と塩とを固相支持体上で混合することを指示する指示書を備える、キット。

2. 上記遺伝物質と、荷電性物質と、塩とからなる群より選択される少なくとも2つの物質は、混合されて提供される、項目1に記載のキット。

3. 上記遺伝物質は、少なくとも2種類存在する、項目1に記載のキット。

4. 上記遺伝物質は、DNA、RNA、PNAおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目1に記載のキット。

5. 上記荷電性物質は、細胞親和性を有する、項目1に記載のキット。

6. 上記荷電性物質は、生体分子を含む、項目1に記載のキット。

7. 上記生体分子は、DNA、RNA、ポリペプチド、脂質、糖、有機低分子、およびこれらの複合体からなる群より選択される、項目6に記載のキット。 20

8. 上記荷電性物質は、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸およびその複合体からなる群より選択される、項目1に記載のキット。

9. 上記荷電性物質は、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リポソーム系試薬および帯電コロイドからなる群より選択される、項目1に記載のキット。

10. 上記塩は、有機酸または無機酸の水素を金属に置換したものであるか、あるいは塩基の水酸基を有機酸基または無機酸基で置換したものである、項目1に記載のキット。

【0012】

30

11. 上記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される、項目1に記載のキット。

12. 上記塩は、緩衝液、培養液および血清の形態で提供される、項目1に記載のキット。

13. 上記遺伝物質は、細胞に導入された後生物学的活性を有する物質をコードする、項目1に記載のキット。

14. 上記遺伝物質、上記荷電性物質および上記塩は薬学的に受容可能である、項目1に記載のキット。 40

15. 上記遺伝物質、上記荷電性物質および上記塩は、マイクロカプセル中に含まれる、項目1に記載のキット。

16. 遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するための方法であって、

I) 支持体を提供する工程と、

II) 上記支持体に、a) 遺伝物質と、b) 上記遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、c) 塩と、を別々のまたは一緒に提供する工程と、

III) 上記遺伝物質と上記荷電性物質と塩とを固相支持体上で混合する工程と、を包含する、方法。

17. 上記遺伝物質と、荷電性物質と、塩とからなる群より選択される少なくとも2つの物質は、混合されて提供される、項目16に記載の方法。 50

18. 上記遺伝物質は、少なくとも2種類存在する、項目16に記載の方法。
19. 上記遺伝物質は、DNA、RNA、PNAおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目16に記載の方法。
20. 上記荷電性物質は、細胞親和性を有する、項目16に記載の方法。
21. 上記荷電性物質は、生体分子を含む、項目16に記載の方法。
22. 上記生体分子は、DNA、RNA、ポリペプチド、脂質、糖、有機低分子、およびこれらの複合体からなる群より選択される、項目21に記載の方法。
23. 上記荷電性物質は、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸およびその複合体からなる群より選択される、項目16に記載の方法。
24. 上記荷電性物質は、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リポソーム系試薬および帯電コロイドからなる群より選択される、項目16に記載の方法。 10
25. 上記塩は、有機酸または無機酸の水素を金属に置換したものであるか、あるいは塩基の水酸基を有機酸基または無機酸基で置換したものである、項目16に記載の方法。
26. 上記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される、項目16に記載の方法。
27. 上記塩は、緩衝液、培養液および血清の形態で提供される、項目16に記載の方法。
28. 上記遺伝物質は、細胞に導入された後生物学的活性を有する物質をコードする、項目16に記載の方法。 20
29. 上記遺伝物質、上記荷電性物質および上記塩は薬学的に受容可能である、項目16に記載の方法。
30. 上記遺伝物質、上記荷電性物質および上記塩は、マイクロカプセル中に含まれる、項目16に記載の方法。
31. 上記支持体は、固相支持体である、項目16に記載の方法。
32. 上記支持体は、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属、天然ポリマーおよび合成ポリマーからなる群より選択される材料を含む、項目16に記載の方法。
33. 上記支持体は、コーティングされる、項目16に記載の方法。 30
34. 上記コーティングは、ポリーLーリジン、シラン、APS、MAS、疎水性フッ素樹脂および金属からなる群より選択される物質を含むコーティング剤によって行われる、項目33に記載の方法。
35. 上記支持体はチップである、項目16に記載の方法。
36. 上記支持体はチップであり、上記複合体は上記チップ上にアレイ状に配列される、項目16に記載の方法。
37. 上記生体分子は、細胞に導入されて生物学的活性を有する、項目16に記載の方法。
38. 上記工程II)は、生体分子を破壊しない条件下で行われる、項目16に記載の方法。 40
39. 上記工程III)は、生体分子を破壊しない条件下で行われる、項目16に記載の方法。
40. 上記混合物を固相支持体に付着した後、その混合物中の溶媒を低減または除去する工程をさらに包含する、項目16に記載の方法。
41. 遺伝物質と、上記遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、塩とが表面に固定された、支持体。
42. 上記遺伝物質は、細胞に導入され得る、項目41に記載の支持体。
43. 上記遺伝物質は、2種類以上含まれる、項目41に記載の支持体。
44. 上記遺伝物質は、DNA、RNA、PNAおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目41に記載の支持体。 50

45. 上記荷電性物質は、細胞親和性を有する、項目41に記載の支持体。
46. 上記荷電性物質は、生体分子を含む、項目41に記載の支持体。
47. 上記生体分子は、DNA、RNA、ポリペプチド、脂質、糖、有機低分子、およびこれらの複合体からなる群より選択される、項目41に記載の支持体。
48. 上記荷電性物質は、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸およびその複合体からなる群より選択される、項目41に記載の支持体。
49. 上記荷電性物質は、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リポソーム系試薬および帯電コロイドからなる群より選択される、項目41に記載の支持体。
50. 上記塩は、有機酸または無機酸の水素を金属に置換したものであるか、あるいは塩基の水酸基を有機酸基または無機酸基で置換したものである、項目41に記載の支持体。 10
51. 上記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される、項目41に記載の支持体。
52. 上記塩は、緩衝液、培養液および血清の形態で提供される、項目41に記載の支持体。
53. 上記遺伝物質は、細胞に導入された後生物学的活性を有する物質をコードする、項目41に記載の支持体。
54. 上記遺伝物質、上記荷電性物質および上記塩は薬学的に受容可能である、項目41に記載の支持体。 20
55. 上記遺伝物質、上記荷電性物質および上記塩は、マイクロカプセル中に含まれる、項目41に記載の支持体。
56. 上記支持体は、固相支持体である、項目41に記載の支持体。
57. 上記支持体は、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属、天然ポリマーおよび合成ポリマーからなる群より選択される材料を含む、項目41に記載の支持体。
58. 上記支持体は、コーティングされる、項目41に記載の支持体。
59. 上記コーティングは、ポリーLーリジン、シラン、APS、MAS、疎水性フッ素樹脂および金属からなる群より選択される物質を含むコーティング剤によって行われる、項目58に記載の支持体。 30
60. 上記支持体はチップである、項目41に記載の支持体。
61. 上記支持体はチップであり、上記複合体は上記チップ上にアレイ状に配列される、項目41に記載の支持体。
62. 上記生体分子は、細胞に導入されて生物学的活性を有する、項目41に記載の支持体。

【0013】

本発明のこれらおよび他の利点は、添付の図面を参照して、以下の詳細な説明を読みかつ理解すれば、当業者には明白になることが理解される。

【発明の効果】

【0014】

遺伝物質を、支持体（例えば、アレイ、プレートなど）上で任意のパターンで混合し、細胞に導入し、遺伝子発現させることが可能となった。従って、複数の遺伝子を同時に細胞に導入した場合などの細胞における影響を調べることが可能となった。細胞は、医療技術、医薬開発などにおいて重要なツールであり、そのツールを種々開発できることから、その産業上における有用性も評価されるべきである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられるこ 50

とが理解されるべきである。

【0016】

(用語)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【0017】

本明細書において使用される用語「物質」は、当該分野において用いられる最も広義な意味と同じ意味で含まれ、正または負に荷電することができるものを含む。

【0018】

本明細書において「遺伝物質」とは、遺伝情報を担う任意の物質をいう。そのような物質としては、例えば、DNA、RNA、PNA、タンパク質などが挙げられるがそれらに限定されない。DNAは、cDNA、ゲノムDNA、人工DNA、RNAiなど任意の形態のものであり得る。RNAは、mRNA、tRNA、rRNA、RNAiなどであってもよい。

10

【0019】

本明細書において「荷電性物質」とは、電荷を有し得るかまたは有する物質をいう。そのような物質には、正に荷電した物質および負に荷電した物質などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0020】

本明細書において「正に荷電した物質」は、正荷電を有するすべての物質を包含する。そのような物質としては、例えば、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質などのカチオン性物質が含まれるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような正に荷電した物質は、複合体を形成することができる物質であることが有利である。そのような複合体を形成することができる正に荷電した物質としては、例えば、カチオン性ポリマーのようにある程度の分子量を有する物質、あるいは、カチオン性脂質のように特定の溶媒（例えば、水、水溶液など）中においてある程度溶解せずに残存することができる物質などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい正に荷電した物質としては、例えば、ポリエチレンジイミン、ポリLリシン、合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、正に荷電した物質としては、ヒストン、合成ポリペプチドなどのような生体分子が挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい正に荷電した物質の種類は、複合体を形成するパートナーである負に荷電した物質の種類に応じて変動する。好ましい複合体形成パートナーを選択することは、当業者には容易であり、そのような選択は、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。そのような好ましい複合体形成パートナーの選択においては、種々のパラメータを考慮することができる。そのようなパラメータとしては、例えば、電荷、分子量、疎水性、親水性、置換基の性質、pH、温度、塩濃度、圧力などの種々の物理的パラメータ、化学的パラメータなどが挙げられるがそれらに限定されない。

20

30

【0021】

本明細書において「カチオン性ポリマー」は、カチオン性の官能基を有するポリマーをいい、例えば、ポリエチレンジイミン、ポリLリシン、合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体が挙げられるがそれらに限定されない。

40

【0022】

本明細書において「カチオン性脂質」は、カチオン性の官能基を有する脂質をいい、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、及びその誘導体が挙げられるがそれらに限定されない。

【0023】

ここで、カチオン性の官能基としては、例えば、一級アミン、二級アミン、三級アミンが挙げられるがそれらに限定されない。

【0024】

本明細書において「負に荷電した物質」は、負荷電を有するすべての物質を包含する。そのような物質としては、例えば、DNAなどの生体分子ポリマー、アニオン性脂質など

50

のアニオン性物質が含まれるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような負に荷電した物質は、複合体を形成することができる物質であることが有利である。そのような複合体を形成することができる負に荷電した物質としては、例えば、DNAのようなアニオン性ポリマーのようにある程度の分子量を有する物質、あるいは、アニオン性脂質のように特定の溶媒（例えば、水、水溶液など）中においてある程度溶解せずに残存することができる物質などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい負に荷電した物質としては、例えば、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化学化合物、及びその複合体などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、負に荷電した物質としては、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化学化合物、及びその複合体などのような生体分子が挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい負に荷電した物質の種類は、複合体を形成するパートナーである正に荷電した物質の種類に応じて変動する。好ましい複合体形成パートナーを選択することは、当業者には容易であり、そのような選択は、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。そのような好ましい複合体形成パートナーの選択においては、種々のパラメータを考慮することができる。そのようなパラメータもまた、上述の正に荷電した物質において考慮すべきパラメータと同様、種々のものを包含する。

10

【0025】

本明細書において「アニオン性ポリマー」は、アニオン性の官能基を有するポリマーをいい、例えば、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化学化合物、及びその複合体が挙げられるがそれらに限定されない。

20

【0026】

本明細書において「アニオン性脂質」は、アニオン性の官能基を有する脂質をいい、例えば、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリンが挙げられるがそれらに限定されない。

【0027】

ここで、アニオン性の官能基としては、例えば、カルボキシル基、リン酸基が挙げられるがそれらに限定されない。

【0028】

従って、本発明の遺伝物質とは、「反対の荷電を有する荷電性物質」とは、遺伝物質が上述のような正に荷電した物質の場合は、負に荷電した物質をいい、遺伝物質が上述のような負に荷電した物質の場合は、正に荷電した物質をいう。

30

【0029】

また、目的の物質に対して、正電荷または負電荷を有する置換基などの部分を付加することによって、その目的の物質の電荷を変換することも可能である。好ましい複合体パートナーが固定を目的とする物質と同じ電荷を有している場合に、いずれかの電荷を変換することによって複合体形成を促進することが可能である。

【0030】

本明細書において「相互作用」とは、2つの物体について言及するとき、その2つの物体が相互に力を及ぼしあうことをいう。そのような相互作用としては、例えば、共有結合、水素結合、ファンデルワールス力、イオン性相互作用、非イオン性相互作用、疎水性相互作用、静電的相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、相互作用は、水素結合、疎水性相互作用などである。本明細書において「共有結合」とは、当該分野における通常の意味で用いられ、電子対が2つの原子に共有されて形成する化学結合をいう。本明細書において「水素結合」とは、当該分野における通常の意味で用いられ、電氣的陰性度の高い原子に一つしかない水素原子の核外電子が引き寄せられて水素原子核が露出し、これが別の電氣的陰性度の高い原子を引き寄せて生じる結合をいい、例えば、水素原子と電氣的陰性度の高い（フッ素、酸素、窒素などの）原子との間にできる。

40

【0031】

本明細書において使用される用語「生体物質」または「生体分子」とは、本明細書において互換可能に用いられ、生体に関連する物質または分子をいう。生体分子は、生体から抽出される分子を包含するが、それに限定されない。生体に影響を与え得る分子であれば

50

生体分子の定義に入る。したがって、コンビナトリアルケミストリで合成された分子も生体への効果を目的としている限り、生体物質の定義に入る。生体物質には、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、低分子（例えば、有機低分子など）、これらの複合分子などが包含されるがそれらに限定されない。従って、ポリマー分子と複合体を形成し得る限り、生体物質には、細胞自体、組織の一部、他の物質も包含され得る。

【0032】

本明細書において「ポリマー分子」とは、モノマーが重合してできる高分子量の物質をさし、通常、分子量が約5000以上のものをいう。

10

【0033】

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において互換可能に使用され、任意の長さのアミノ酸またはその改変体のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものも包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この用語の定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。

20

【0034】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」は、本明細書において互換可能に使用され、任意の長さのヌクレオチドまたはその改変体のポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。本明細書では、用語「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」と互換可能に使用され得る。本明細書において用語「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／

30

40

50

またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (B a t z e r ら、N u c l e i c A c i d R e s . 19 : 5081 (1991) ; O h t s u k a ら、J . B i o l . C h e m . 260 : 2605 - 2608 (1985) ; R o s s o l i n i ら、M o l . C e l l . P r o b e s 8 : 91 - 98 (1994)) 。
【0035】

本明細書において「RNA i」とは、RNA i n t e r f e r e n c e の略称で、二本鎖RNA (d s RNAともいう) のようなRNA i を引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同なmRNAが特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書においてRNA i はまた、場合によっては、RNA i を引き起こす因子と同義に用いられ得る。

10

【0036】

本明細書において「RNA i を引き起こす因子」とは、RNA i を引き起こすことができるような任意の因子をいう。本明細書において「遺伝子」に対して「RNA i を引き起こす因子」とは、その遺伝子に関するRNA i を引き起こし、RNA i がもたらす効果 (例えば、その遺伝子の発現抑制など) が達成されることをいう。そのようなRNA i を引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約70%の相同性を有する配列またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも10ヌクレオチド長の二本鎖部分を含むRNAまたはその改変体が挙げられるがそれに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、3'突出末端を含み、より好ましくは、3'突出末端は、2ヌクレオチド長以上のDNA (例えば、2~4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

20

【0037】

理論に束縛されないが、RNA i が働く機構として考えられるものの一つとして、d s RNAのようなRNA i を引き起こす分子が細胞に導入されると、比較的長い (例えば、40塩基対以上) RNAの場合、ヘリカーゼドメインを持つダイサー (D i c e r) と呼ばれるRNase III様のヌクレアーゼがATP存在下で、その分子を3'末端から約20塩基対ずつ切り出し、短鎖d s RNA (s i RNAとも呼ばれる) を生じる。本明細書において「s i RNA」とは、s h o r t i n t e r f e r i n g RNAの略称であり、人工的に化学合成されるかまたは生化学的に合成されたものか、あるいは生物体内で合成されたものか、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてできた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNAをいい、通常、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。このs i RNAに特異的なタンパク質が結合して、RISC (RNA-induced-silencing-complex) が形成される。この複合体は、s i RNAと同じ配列を有するmRNAを認識して結合し、RNase III様の酵素活性によってs i RNAの中央部でmRNAを切断する。s i RNAの配列と標的として切断するmRNAの配列の関係については、100%一致することが好ましい。しかし、s i RNAの中央から外れた位置についての塩基の変異については、完全にRNA i による切断活性がなくなるのではなく、部分的な活性が残存する。他方、s i RNAの中央部の塩基の変異は影響が大きく、RNA i によるmRNAの切断活性が極度に低下する。このような性質を利用して、変異をもつmRNAについては、その変異を中央に配したs i RNAを合成し、細胞内に導入することで特異的に変異を含むmRNAだけを分解することができる。従って、本発明では、s i RNAそのものをRNA i を引き起こす因子として用いることができるし、s i RNAを生成するような因子 (例えば、代表的に約40塩基以上のd s RNA) をそのような因子として用いることができる。

30

40

【0038】

また、理論に束縛されることを希望しないが、s i RNAは、上記経路とは別に、s i RNAのアンチセンス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ (R d R P) のプライマーとして作用し、d s RNAが合成され、このd s RNAが再びダイサーの基質となり、新たなs i RNAを生じて作用を増幅することも企図される。従って、本

50

発明では、s i R N A 自体およびs i R N A が生じるような因子もまた、有用である。実際に、昆虫などでは、例えば35分子のd s R N A 分子が、1,000コピー以上ある細胞内のm R N A をほぼ完全に分解することから、s i R N A 自体およびs i R N A が生じるような因子が有用であることが理解される。

【0039】

本発明においてs i R N A と呼ばれる、約20塩基前後（例えば、代表的には約21～23塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖R N A を用いることができる。このようなs i R N A は、細胞に発現させることにより遺伝子発現を抑制し、そのs i R N A の標的となる病原遺伝子の発現を抑えることから、疾患の治療、予防、予後などに使用することができる。

10

【0040】

本発明において用いられるs i R N A は、R N A i を引き起こすことができる限り、どのような形態を採っていてもよい。

【0041】

別の実施形態において、本発明のR N A i を引き起こす因子は、3'末端に突出部を有する短いヘアピン構造（s h R N A ; s h o r t h a i r p i n R N A ）であり得る。本明細書において「s h R N A」とは、一本鎖R N A で部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約20塩基対以上の分子をいう。そのようなs h R N A は、人工的に化学合成される。あるいは、そのようなs h R N A は、センス鎖およびアンチセンス鎖のD N A 配列を逆向きに連結したヘアピン構造のD N A をT7 R N A ポリメラーゼによりインビトロでR N A を合成することによって生成することができる。理論に束縛されることは希望しないが、そのようなs h R N A は、細胞内に導入された後、細胞内で約20塩基（代表的には例えば、21塩基、22塩基、23塩基）の長さに分解され、s i R N A と同様にR N A i を引き起こし、本発明の処置効果があることが理解されるべきである。このような効果は、昆虫、植物、動物（哺乳動物を含む）など広汎な生物において発揮されることが理解されるべきである。このように、s h R N A は、s i R N A と同様にR N A i を引き起こすことから、本発明の有効成分として用いることができる。s h R N A はまた、好ましくは、3'突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3'突出末端は、好ましくはD N A であり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上のD N A であり得、さらに好ましくは2～4ヌクレオチド長のD N A であり得る。

20

30

【0042】

本発明において用いられるR N A i を引き起こす因子は、人工的に合成した（例えば、化学的または生化学的）ものでも、天然に存在するものでも用いることができ、この両者の間で本発明の効果に本質的な違いは生じない。化学的に合成したものでは、液体クロマトグラフィーなどにより精製をすることが好ましい。

【0043】

本発明において用いられるR N A i を引き起こす因子は、インビトロで合成することもできる。この合成系において、T7 R N A ポリメラーゼおよびT7プロモーターを用いて、鋳型D N A からアンチセンスおよびセンスのR N A を合成する。これらをインビトロでアニーリングした後、細胞に導入すると、上述のような機構を通じてR N A i が引き起こされ、本発明の効果が達成される。ここでは、例えば、リン酸カルシウム法でそのようなR N A を細胞内に導入することができる。

40

【0044】

本発明のR N A i を引き起こす因子としてはまた、m R N A とハイブリダイズし得る一本鎖、あるいはそれらのすべての類似の核酸アナログのような因子も挙げられる。そのような因子もまた、本発明の処置方法および組成物において有用である。

【0045】

本明細書において「塩」は、当該分野において通常用いられる意味と同じ意味で用いら

50

れ、無機塩および有機塩の両方を含む。塩は、通常、酸と塩基との中和反応によって生成する。従って、塩は、有機酸または無機酸の水素を金属に置換したものであっても、塩基の水酸基を有機酸基または無機酸基で置換したものであってもよい。塩には中和反応で生成する NaCl 、 K_2SO_4 などといったもののほかに、金属と酸との反応で生成する PbSO_4 、 ZnCl_2 など種々の種類があり、これらは、直接中和反応によって生成したものでなくても、酸と塩基との中和反応から生成したとみなすことができる。塩としては、正塩（酸のHや塩基のOHが塩に含まれていないもの、例えば、 NaCl 、 NH_4Cl 、 CH_3COONa 、 Na_2CO_3 ）、酸性塩（酸のHが塩に残っているもの、例えば、 NaHCO_3 、 KHSO_4 、 CaHPO_4 ）、塩基性塩（塩基のOHが塩の中に残っているもの、例えば、 MgCl(OH) 、 CuCl(OH) ）などに分類することができるが 10
それらの分類は、本発明においてはそれほど重要ではない。好ましい塩としては、培地を構成する塩（例えば、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、 HEPES 、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸、ビタミン、緩衝液を構成する塩（例えば、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、リン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム）などが好ましい。細胞に対する親和性を保持または改善する効果がより高いからである。これらの塩は、単独で用いてもよいし、複数用いてもよい。複数用いることが好ましい。細胞に対する親和性が高くなる傾向があるからである。従って、 NaCl などを単独で用いるよりも、培地中に含まれる塩（例えば、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、リン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム）を複数を用いることが好ましく、より好ましくは、培地中に含まれる塩全部 20
をそのまま使用することが有利であり得る。別の好ましい実施形態では、グルコースを加えてもよい。

【0046】

本明細書において使用される「支持体」は、「基板」と同じ意味で使用され、生体分子のような物質を固定することができる材料（material）をいう。支持体の材料としては、共有結合かまたは非共有結合のいずれかで、本発明において使用される生体分子のような物質に結合する特性を有するかまたはそのような特性を有するように誘導体化され得る、任意の固体材料が挙げられる。

【0047】

支持体として使用するためのそのような材料としては、固体表面を形成し得る任意の材料が使用され得るが、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属（合金も含まれる）、天然および合成のポリマー（例えば、ポリスチレン、セルロース、キトサン、デキストラン、およびナイロン）などが挙げられるがそれらに限定されない。支持体は、複数の異なる材料の層から形成されていてもよい。例えば、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスファイト、酸化珪素、炭化珪素、窒化珪素などの無機絶縁材料を使用することができる。ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコーン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホンなどの有機材料を用いることができる。本発明においてはまた、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、PVD膜など、プロットングに使用される膜を用いることもできる。支持体を構成する材料が固相である場合、本明細書において特に「固相支持体」という。本明細書において、プレート、マイクロウェルプレート、チップ、スライドガラス、フィルム、ビーズ、金属（表面）などの形態をとり得る。 30
40

【0048】

1つの実施形態では、本発明では、電極材料を使用して、基板と電極とを兼用した基板電極とすることもできる。このような基板電極の場合、基板電極の表面を絶縁層領域で分 50

離し、分離されたそれぞれの電極領域に、それぞれ異なった生体分子を固定するのが好ましい。電極材料は特に限定されるものではない。そのような電極材料としては、例えば、金、金の合金、銀、プラチナ、水銀、ニッケル、パラジウム、シリコン、ゲルマニウム、ガリウム、タングステンなどの金属単体およびそれらの合金、あるいはグラファイト、グラシーカーボンなどの炭素など、またはこれらの酸化物、化合物を用いることができる。さらに、酸化珪素などの半導体化合物や、C C D、F E T、C M O Sなど各種半導体デバイスを用いることも可能である。絶縁基板上に電極膜を形成し、基板と電極とを一体化した基板電極を用いる場合、この電極膜は、メッキ、印刷、スパッタ、蒸着などで作製することができる。蒸着を行う場合は、抵抗加熱法、高周波加熱法、電子ビーム加熱法により電極膜を形成することができる。また、スパッタリングを行う場合は、直流2極スパッタリング、バイアススパッタリング、非対称交流スパッタリング、ゲッタスパッタリング、高周波スパッタリングなどにより電極膜を形成することが可能である。さらに、ポリピロール、ポリアニリンなどの電解重合膜や導電性高分子も用いることが可能である。本発明において、電極表面を分離するために用いられる絶縁材料は特に限定されるものではないが、フォトリソマー、フォトレジスト材料であることが好ましい。レジスト材料としては、光露光用フォトレジスト、遠紫外用フォトレジスト、X線用フォトレジスト、電子線用フォトレジストが用いられる。光露光用フォトレジストとしては、主原料が環化ゴム、ポリ桂皮酸、ノボラック樹脂であるものが挙げられる。遠紫外用フォトレジストには、環化ゴム、フェノール樹脂、ポリメチルイソプロペニルケトン（P M I P K）、ポリメチルメタクリレート（P M M A）などが用いられる。また、X線用レジストには、C O P、メタルアクリレートなどを用いることができる。さらに、電子線用レジストには、P M M Aなど公知の物質を用いることが可能である。

10

20

【0049】

本明細書において「チップ」とは、多様の機能をもち、システムの一部となる超小型集積回路をいう。本明細書において、「生体分子チップ」とは、基板と、生体分子とを含み、その基板には本明細書において定義された生体分子が少なくとも1つ配置されている。生体分子が細胞の場合、そのチップは、細胞チップまたは細胞アレイと呼ばれる。

【0050】

本明細書において「コーティング」とは、固相支持体について用いられるとき、その固相支持体の表面上にある物質の膜を形成させることおよびそのような膜をいう。コーティングは種々の目的で行われ、例えば、固相支持体の品質向上（例えば、寿命の向上、耐酸性などの耐環境性の向上）、固相支持体に結合されるべき物質の親和性の向上などを目的とすることが多い。そのようなコーティングのための物質としては、種々の物質が用いられ得、上述の固相支持体を使用される物質のほか、D N A、R N A、タンパク質、脂質などの生体物質、ポリマー（例えば、ポリ-L-リジン、A P S（例えば、γ-アミノプロピルシラン）、M A S、疎水性フッ素樹脂）、シラン、金属（例えば、金など）が使用され得るがそれらに限定されない。そのような物質の選択は当業者の技術範囲内にあり、当該分野において周知の技術を用いて場合ごとに選択することができる。一つの好ましい実施形態では、そのようなコーティングは、ポリ-L-リジン、シラン、A P S、M A S、疎水性フッ素樹脂、エポキシシランまたはメルカプトシランのようなシラン、金のような金属を用いることが有利であり得る。このような物質は、細胞または細胞を含む物体（例えば、生体、臓器など）に適合する物質を用いることが好ましくあり得る。

30

40

【0051】

本明細書において「固定」とは、固相支持体について用いられるとき、その対象となる物質（例えば、生体分子）がその支持体において少なくともある一定の時間の間保持される状態またはそのような状態にさせることをいう。従って、物質が固相支持体上で固定された後、条件が変化する（例えば、別の溶媒中に浸される）場合は、その固定状態が解除されてもよい。

【0052】

本明細書において用いられる「細胞親和性」とは、ある物質が細胞（例えば、細菌細胞

50

、動物細胞、酵母、植物細胞など）または細胞を含む物体（例えば、組織、臓器、生体など）と相互作用が可能な状態に置かれたときに、その細胞または細胞を含む物体に対して有害な影響を与えない性質をいう。好ましくは、細胞親和性を有する物質は、細胞が優先的に相互作用する物質であり得るがそれに限定されない。本発明では、固定されるべき物質（例えば、正に荷電した物質および／または負に荷電した物質）は、細胞親和性を有することが好ましいがそれに限定されない。固定されるべき物質が細胞親和性を有する場合、その物質が本発明にしたがって固定されると、細胞親和性が保持または改善されることが予想外に見いだされた。通常、細胞親和性を有する物質が固相支持体に固定される場合は、必ずしも細胞親和性が保持されとは限らなかったことに鑑みると、本発明の効果は計り知れない。

10

【0053】

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本明細書において使用される細胞は、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞）であってもよい。細胞の供給源としては、例えば、単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。

【0054】

20

本明細書において「組織」（tissue）とは、多細胞生物において、実質的に同一の機能および／または形態をもつ細胞集団をいう。通常「組織」は、同じ起源を有するが、異なる起源を持つ細胞集団であっても、同一の機能および／または形態を有するのであれば、組織と呼ばれ得る。

【0055】

本明細書において「臓器」または「器官」とは、互換可能に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物（例えば、動物、植物）では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、本発明が対象とする臓器は、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。

30

【0056】

本明細書において「単離された」とは、通常的环境において天然に付随する物質が少なくとも低減されていること、好ましくは実質的に含まないことをいう。従って、単離された細胞とは、天然の環境において付随する他の物質（たとえば、他の細胞、タンパク質、核酸など）を実質的に含まない細胞をいう。核酸またはポリペプチドについていう場合、「単離された」とは、たとえば、組換えDNA技術により作製された場合には細胞物質または培養培地を実質的に含まず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリペプチドを指す。

40

【0057】

本発明で用いられる細胞または細胞を含む物体（例えば、臓器、組織など）は、どの生物由来の細胞（たとえば、原核生物（例えば、大腸菌など）、真核生物の単細胞生物（酵母など）、任意の種類の多細胞生物（例えば、動物（たとえば、脊椎動物、無脊椎動物）、植物（たとえば、単子葉植物、双子葉植物など）など））でもよい。好ましくは、脊椎動物（たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など）由来の細胞が用いられ、より好ましくは、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など）由来の細胞が用いられる。さらに好ましくは、霊長類（たとえば、カニクイサル、チンパンジー、ニホンザ

50

ル、ヒト)由来の細胞が用いられる。ヒト由来の細胞が用いられてもよい。

【0058】

本明細書において「徐放」とは、ある物質がその物質を溶解する溶媒に浸される場合に、一定時間は固相を保ちつつ徐々に溶解することをいう。従って、ある物質が徐放性を有する場合は、通常、溶媒に浸された後も約5分間は固定された状態が保たれ、好ましくは少なくとも約10分間、より好ましくは少なくとも約15分間は、さらに好ましくは少なくとも約30分間固定された状態が保たれる。医薬として用いられる場合は、徐放性は、少なくとも約30分間、好ましくは少なくとも約1時間、より好ましくは少なくとも約3時間、さらに好ましくは少なくとも約6~12時間固定された状態が保たれることが有利である。DNAのトランスフェクションなど、細胞に直接固定された物質を導入する目的で使用される場合は、通常、少なくとも約15分間固定された状態が保たれる。 10

【0059】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子(例えば、ポリペプチドまたはタンパク質)が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能を発揮する活性が包含される。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、測定対象となる活性に応じて当該分野において周知の技術によって測定することができる。

【0060】

本明細書において「生体分子を破壊しない条件」とは、生体分子が発揮する少なくとも一つの生物学的活性(例えば、遺伝子発現活性、酵素活性など)が損なわれない条件をいう。そのような条件については、当業者はその生体分子に応じ、種々の考慮事項(例えば、温度、pH、圧力、化学的条件など)を考慮することによって、適宜設定することができる。また、生体分子を破壊しない条件が未知の場合でも、その生体物質について試験されるべき条件に曝し、その後目的とする生物学的活性が保持されているかを調べることによってあらかじめ決定することができる。従って、本発明を実施する際には、そのような条件は、目的とする生物学的活性が保たれている限り、どのような条件であってもよいことが当業者に理解される。 20

【0061】

本明細書において溶媒(例えば、水、有機溶媒(例えば、ヘキサンなど))の「低減」または「除去」は、その溶媒を含む混合物または組成物を、ある条件に置くことにより、その混合物または組成物中の溶媒比率が減少またはなくなることによって達成される。 30

【0062】

本明細書において「薬学的に受容可能」とは、ある物質について言及するとき、その物質が医薬として投与され得る性質をいう。

【0063】

本明細書において使用され得る「薬学的に受容可能な物質」としては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的アジュバント挙げられるがそれらに限定されない。代表的には、目的とする化合物(生物学的活性または医薬品の有効成分としての活性を有する化合物)、またはその改変体もしくは誘導体は、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で提供される。 40

【0064】

本明細書で使用される薬学的に受容可能な物質は、レシピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、例えば、酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸;アスコルビン酸、 α -トコフェロール;低分子量ポリペプチド;タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン);親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン);アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン);モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物(グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む);キレート剤(例 50

えば、EDTA)；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性表面活性化剤（例えば、Tween、プルロニック（pluronic）またはポリエチレングリコール（PEG））などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0065】

（生体分子チップ・アレイ）

本明細書において「チップ」とは、多様の機能をもち、システムの一部となる超小型集積回路をいう。本明細書では、積載される物質に応じて、「DNAチップ」、「プロテインチップ」、「細胞チップ」などと称することがある。

【0066】

本明細書において用いられる用語「アレイ」とは、基板または膜上の固定物体の固定されたパターンまたはパターン化された基板そのものをいう。アレイの中で、小さな基板（例えば、 10×10 mm上など）上にパターン化されているものはマイクロアレイというが、本明細書では、マイクロアレイとアレイとは互換可能に使用される。従って、上述の基板より大きなものにパターン化されたものでもマイクロアレイと呼ぶことがある。例えば、アレイはそれ自身固相表面または膜に固定されている所望のポリヌクレオチドのセットで構成される。アレイは好ましくは異なるポリヌクレオチドを少なくとも 10^2 個、より好ましくは少なくとも 10^3 個、およびさらに好ましくは少なくとも 10^4 個、さらにより好ましくは少なくとも 10^5 個を含む。これらのポリヌクレオチドは、例えば、 125×80 mm、 10×10 mmのような規格化されたフォーマット上に配置される。

10

20

【0067】

本明細書において使用される用語「アドレス」とは、基板上のユニークな位置をいい、他のユニークな位置から弁別可能であり得るものをいう。アドレスは、そのアドレスを伴う微粒子との関連づけに適切であり、そしてすべての各々のアドレスにおける存在物が他のアドレスにおける存在物から識別され得る（例えば、光学的）、任意の形状を採り得る。アドレスの形は、例えば、円状、楕円状、正方形、長方形であり得るか、または不規則な形であり得る。

【0068】

各々のアドレスのサイズは、とりわけ、その基板の大きさ、特定の基板上のアドレスの数、分析物の量および／または利用可能な試薬、微粒子のサイズおよびそのアレイが使用される任意の方法のために必要な解像度の程度に依存する。大きさは、例えば、 $1 \sim 2$ nmから数cmの範囲であり得るが、そのアレイの適用に一致した任意の大きさが可能である。

30

【0069】

アドレスの空間配置および形状は、そのマイクロアレイが使用される特定の適用に適合するように設計される。アドレスは、密に充填され得、広汎に分散され得るか、または特定の型の分析物に適切な所望のパターンへとサブグループ化され得る。

【0070】

マイクロアレイ（DNAが配置されている場合、DNAマイクロアレイとも呼ばれる）については、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。

40

【0071】

合成型DNAマイクロアレイにおける標識方法としては、例えば、二蛍光標識法が挙げられる。この方法では、2つの異なるmRNAサンプルをそれぞれ異なる蛍光で標識し、同一マイクロアレイ上で競合的ハイブリダイゼーションを行って、両方の蛍光を測定し、それを比較することで遺伝子発現の相違を検出する。蛍光色素としては、例えば、Cy5およびCy3などが最も用いられているが、それらに限定されない。Cy3およびCy5の利点は、蛍光波長の重なりが殆どないという点である。二蛍光標識法は、遺伝子発現の相違のみならず、変異または多型性を検出するためにも使用され得る。

【0072】

50

DNAマイクロアレイを用いたアッセイにおいては、DNAマイクロアレイ上でハイブリダイズした蛍光シグナルを蛍光検出器等で検出する。このような検出器は、現在までに種々の検出器が利用可能である。例えば、Stanford Universityのグループは、オリジナルスキャナを開発しており、このスキャナは、蛍光顕微鏡と稼動ステージとを組み合わせたものである (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown>を参照のこと)。従来型のゲル用蛍光イメージアナライザであるFMBIO (日立ソフトウェアエンジニアリング)、Storm (Molecular Dynamics) などでも、スポットがそれほど高密度でなければ、DNAマイクロアレイの読み取りを行い得る。その他に利用可能な検出器としては、ScanArray 4000、同5000 (General Scanning; スキャン型 (共焦点型))、GMS 418 Array Scanner (宝酒造; スキャン型 (共焦点型))、Gene Tip Scanner (日本レーザ電子; スキャン型 (非共焦点型))、Gene Tac 2000 (Genomic Solutions; CCDカメラ型)) などが挙げられる。

10

【0073】

マイクロアレイから得られるデータは膨大であることから、クローンとスポットとの対応の管理、データ解析などを行うためのデータ解析ソフトウェアが重要である。そのようなソフトウェアとしては、各種検出システムに付属のソフトウェアが利用可能である (Ermlaeva Oら (1998) Nat. Genet. 20:19-23)。また、データベースのフォーマットとしては、例えば、Affymetrixが提唱しているGATC (genetic analysis technology consortium) と呼ばれる形式が挙げられる。

20

【0074】

本発明において固相支持体に配置される生体分子 (例えば、DNA、RNA、ポリペプチドなど) は、生体由来物質 (例えば、mRNA) を用いて分子生物学的手法で作製され得、あるいは、当業者に公知の方法によつて化学的に合成され得る。例えば、自動固相ペプチド合成機を用いた合成方法は、以下により記載される: Stewart, J. M. et al. (1984). Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co.; Grant, G. A. (1992). Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman; Bodanszky, M. (1993). Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag; Bodanszky, M. et al. (1994). The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag; Fields, G. B. (1997). Phase Peptide Synthesis, Academic Press; Pennington, M. W. et al. (1994). Peptide Synthesis Protocols, Human aPress; Fields, G. B. (1997). Solid-Phase Peptide Synthesis, Academic Press。オリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems などにより市販されるDNA合成機の何れかを用いて、自動化学合成により調製され得る。自動オリゴヌクレオチドの合成のための組成物および方法は、例えば、米国特許第4,415,732号, Caruthers et al. (1983); 米国特許第4,500,707号およびCaruthers (1985); 米国特許第4,668,777号, Caruthers et al. (1987) に開示されており、当業者は、これらの方法を利用して、本発明において使用される生体分子を調製することができる。

30

40

【0075】

本発明はまた、生体から直接採取したサンプル以外に、PCR、SDA、NASBA法等で増幅した遺伝子の検出に対しても用いることは可能である。本発明はさらに、標的遺伝子は予め電気化学的に活性な物質や、FITC、ローダミン、アクリジン、Texas Red、フルオレセインなどの蛍光物質、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの酵素、ハプテン、発光物質、抗体、抗原、金コロイドなどのコロイド粒子、金属、金属イオン、およびトリスビピリジン、トリスフェナントロリン、ヘキサアミンなどとの金属キレートなどで標識しておくことも可能である。

【0076】

本明細書において使用される「マイクロカプセル」とは、分子などの薄膜で物質を包み

50

こんだ微小な粒子またはその容器状物質をいう。ふつうは球状で、大きさは数 μm から数百 μm である。一般には油中水滴型エマルションをつくり、その微小エマルション粒子と媒質液との界面で界面重縮合によって高分子薄膜をつくり粒子を覆う。ついで遠心分離で油からカプセルを分離し、透析で精製することによって製造することができる。エマルションをつくる時に水相に目的とする生体分子を溶解分散させて、カプセル中に包みこむことができる。薄膜の厚さは10~20 μm で、半透性を与えたり、表面電荷をもたせたりすることもできる。本発明においてマイクロカプセルは、生体分子のような内包物を保護・隔離し、必要に応じて溶出、混合または反応させることができる。本発明の生体分子基板を製造する方法では、マイクロカプセルは、インクジェット方式（バブルジェット（登録商標）方式など）、PIN方式のような吹きつけ工程によって基板に吹き付けられ、吹き付けられたマイクロカプセルは、シェルの融点より温度を上昇させることによって生体分子のような内容物を基板に固定することができる。この場合、基板上には、好ましくは、その生体分子と親和性のある物質でコーティングされている。

【0077】

微細加工技術については、例えば、Campbell, S. A. (1996). The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997). Fundamentals of Microfabrication, CRC Press; Rai-Choudhury, P. (1997). Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithographyなどを参照することができ、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

【0078】

インクジェット方式（技術）は、熱、圧電効果を利用し非常に小さい液滴を2次元平面の所定の位置に射出する技術であり、主にプリンター装置において広く用いられている。DNAアレイの製造には、圧電素子をガラスキャピラリーと組み合わせた構造のインクジェット装置が使用される。液体チャンバーに接続された圧電素子に電圧を加えることにより、圧電素子の体積の変化によってチャンバー内の液体が、チャンバーに接続された、キャピラリーから液滴となって射出される。射出される液滴の大きさは、キャピラリーの径、圧電素子の体積変化量、液体の物理的性質によって決定されるが、一般には、直径が30 μm 程度である。圧電素子を用いたインクジェット装置は、このような液滴を10kHz程度の周期で射出することができる。このようなインクジェット装置を使ったDNAアレイ製造装置は、インクジェット装置とDNAアレイ基板とを相対運動させることにより、DNAアレイ上の所望のスポットに所望の液滴を滴下することができる。インクジェット装置を使ったDNAアレイ製造装置には、大きくわけて2種類ある。1つはただ1台のインクジェット装置を用いたDNAアレイ製造装置であり、もう1つはマルチヘッドのインクジェット装置を用いた装置である。ただ1台のインクジェット装置を用いたDNAアレイ製造装置は、オリゴマー末端の保護基を除去する試薬を所望のスポットに滴下する構成になっている。所望の塩基を導入したいスポットの保護基を、このインクジェット装置を用いて除去して活性化状態にした後、DNAアレイ全体に所望の塩基の結合反応操作を実施する。この際、インクジェット装置からの試薬の滴下によって、末端が活性化したオリゴマーを持つスポットのみに所望の塩基が結合する。この後、新たに付加した塩基の末端を保護する操作を行う。次に、保護基を除去するスポットを変更してこの操作を所望のヌクレオチド配列が得られるまで繰り返す。一方、マルチヘッドのインクジェット装置を用いたDNAアレイ製造装置は、各塩基を含む試薬毎にインクジェット装置を用意することによって、各スポット毎に所望の塩基を直接結合させることができる構成になっており、前述した1台のインクジェット装置を用いたDNAアレイ製造装置よりも高いスループットが得られる。あらかじめ合成したオリゴヌクレオチドを基板に固定化させる方法のうち、メカニカルマイクロスポッティング技術は、ステンレス製のピンの先端についたオリゴヌクレオチドを含む液体を機械的に基板上に押し付けて固定化していく技術である。この方法で得られるスポットは、50~300 μm 程度になる。マイクロスポッティング後には、UV光による固定化等の後処理が行われる。

【0079】

本発明の方法に使用される吹き付ける工程としては、インクジェット方式（バブルジェット（登録商標）方式を含む）、PIN法などが挙げられる。好ましくは、バブルジェット（登録商標）方式であり得る。マイクロカプセルが効率よく固定化され得るからである。

【0080】

本発明の生体の情報を検査する方法の好ましい実施形態において、上記標識分子は、蛍光分子、リン光分子、化学発光分子または放射性同位体を含む。この場合、標識分子の種類に応じた検出手段が使用され得る。

【0081】

（本発明の好ましい実施形態の説明）

以下に本発明の好ましい実施形態を説明するが、これらの好ましい実施形態の説明は、例示のために提供され、本発明の範囲を限定すべきでないことが理解されるべきである。

【0082】

（遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するためのキット）

1つの局面において、本発明は、遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するためのキットを提供する。このキットは、a) 遺伝物質と、b) 該遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、c) 塩とを含み、ここで、このキットは、この遺伝物質とこの荷電性物質とこの塩とを固相支持体上で混合することを指示する指示書を備える。この技術は、遺伝物質と、その物質とは反対の電荷を有する物質と、塩（例えば、培地中に含まれる塩類）とを支持体上で混合することによって、予想外に固定され、その後の細胞内への導入がスムーズに行われることが予想外に見出されたことによって達成された。このような固定による効果は、固定後の物質の拡散が徐放であること、および固定後の物質が細胞親和性を保つか改善されていることなどが挙げられる。さらに、任意の遺伝物質を、支持体上で任意の混合パターンで混ぜた形で簡便に固定することが可能となったことから、そのような技術を必要とするアレイ作製などにおいて大いに有用である。

【0083】

好ましい実施形態では、本発明のキット中に含まれる遺伝物質と、荷電性物質と、塩とからなる群より選択される少なくとも2つの物質は、混合されて提供される。キットにおけるコンパートメントを削減することができるからである。2つ以上の遺伝物質の支持体上での混合を考える場合、これら3つの物質は、すべて混合された形で提供され得る。

【0084】

好ましい実施形態では、本発明において含まれる遺伝物質は、少なくとも2種類存在し、より好ましくは3つ以上存在し、別の好ましい実施形態では、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、20以上であり得る。あるいは、ゲノムセットなど、数千～数万の遺伝物質が本発明のキットに含まれていても良い。

【0085】

本発明のキットに含まれる遺伝物質は、DNA、RNA、PNAおよびそれらの組み合わせからなる群より選択され得る。

【0086】

1つの好ましい実施形態において、本発明に含まれるべき物質は、細胞親和性を有する。ある物質の細胞親和性は、その物質と細胞とを混合したときに、その物質が存在しないときに比べて、その細胞の生存が維持されるか否かを評価することによって判断することができる。そのような細胞の生存の維持は、細胞の種々のパラメータを測定することによって具体的に判断することができる。好ましくは、細胞親和性を有する物質は、その細胞の生存を改善することが有利であり得る。

【0087】

好ましい実施形態において、本発明に含まれるべき物質（例えば、荷電性物質）は、生体分子であり得る。ここで、この生体分子が固定の目的の対象であってもよいし、そうでなくてもよい。

10

20

30

40

50

【0088】

本発明の好ましい実施形態において使用され得るそのような生体分子としては、DNA（例えば、ゲノムDNA、cDNAなど）、RNA（例えば、mRNAなど）、ポリペプチド、脂質、糖、有機低分子（例えば、コンビナトリアルケミストリーのライブラリーメンバー）、およびこれらの複合体（例えば、糖タンパク質、糖脂質、核酸ペプチド、リポタンパク質などが含まれるがそれらに限定されない）が挙げられるがそれらに限定されない。

【0089】

1つの特定の実施形態では、本発明において固定されるべき生体分子は、DNAのような遺伝子コード分子であり得る。本発明において達成された固定方法を用いることによって、DNAがトランスフェクトのような遺伝子導入のための処置がされるときに、処置の完了に必要な時間（例えば、約15分から約30分程度）、継続して徐放が起こることによって、そのような分子の導入が効率よく行われるという効果が達成された。このような徐放効果は、従来の固定方法では達成されなかったか、十分ではなかったことから、このような効果は、本発明の特筆すべき効果として挙げることができる。また、本発明の組成物は、固定された後に、細胞に対する親和性が保持されるかあるいは改善され、特に、トランスフェクションのような遺伝子の導入において従来の固定方法よりも効率よくかつ細胞に対するダメージなしにそのような導入が行われることが見いだされた。

【0090】

本発明の好ましい実施形態において、固定されるべき荷電性物質は、生体分子でもよく、生体分子でなくてもよく、例えば、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質ポリLリシンなど合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体などであり得る。好ましい実施形態において、荷電性物質としては、例えば、ポリアミン系試薬（SuperFect, PolyFect）、ポリイミン系試薬（JetPEI, PEI, Eugene6）、リポソーム系試薬（LipofectAMINE, LipofectAMINE2000, OligofectAMINE, Effecten）、帯電コロイド（金コロイド）ポリイミンポリマー、ポリLリシン、合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体などのトランスフェクション試薬などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0091】

別の好ましい実施形態では、本発明において使用される荷電性物質は、ポリアミン系試薬（SuperFect, PolyFect）、ポリイミン系試薬（JetPEI, PEI, Eugene6）、リポソーム系試薬（LipofectAMINE, LipofectAMINE2000, OligofectAMINE, Effecten）、帯電コロイド（金コロイド）などを用いることが好ましい。プリンティングに好ましい形状、強度、ハンドリングの容易さを有しているからである。

【0092】

本明細書において「ポリアミン系試薬」とは、その構造中にポリアミン（アミノ基-NH₂またはイミノ基=NHを2つ以上もつ脂肪族化合物の総称）を有する試薬をいい、例えば、SuperFect, PolyFectなどが例示される。

【0093】

本明細書において「ポリイミン系試薬」とは、その構造中にポリイミンを有する試薬をいい、例えば、JetPEI, PEI, Eugene6などが例示される。

【0094】

本明細書において、「リポソーム系試薬」とは、リポソーム構造をとる遺伝子導入試薬をいい、例えば、LipofectAMINE2000, OligofectAMINE, Effectenなどが例示される。

【0095】

本明細書において、「帯電コロイド」とは、コロイドのうち、帯電しているものをいい、例えば、金属コロイド（例えば、金コロイド）が例示される。

【0096】

1つの実施形態において、本発明において使用される塩としては、塩は、有機酸または無機酸の水素を金属に置換したものであるか、あるいは塩基の水酸基を有機酸基または無機酸基で置換したものであり得る。より好ましくは、細胞に親和性のある塩（例えば、培

10

20

30

40

50

地に用いられる塩類、緩衝液中で用いられる塩類など）が挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、トランスフェクションを目的とする場合は、培地または緩衝液中に含まれる塩類すべての組み合わせを用いることが有利であり得る。このような塩類の組み合わせは、通常細胞にとって好ましい組み合わせであるからである。そのような培地の例示としては、例えば、ダルベッコMEM、HAM12培地、 α MEM培地、RPM1640（例えば、ニチレイから市販）が挙げられるがそれらに限定されない。そのような培地に含まれる塩類としては、例えば、塩化カルシウム、塩化カリウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンなどが挙げられるがそれらに限定されない。そのような塩の濃度は、当業者が適宜選択して調整することができるが、好ましくは、細胞の浸透圧とほぼ等しいことが有利であり得る。

10

【0097】

好ましい実施形態において、本発明において使用される塩は、緩衝液、培養液、血清などをあげることができる。

【0098】

好ましい実施形態では、固定される生体分子は、細胞に導入され、その細胞内で生物学的活性（例えば、薬効、酵素、シグナル伝達、遺伝子発現など）を発揮することが有利であり得る。遺伝子発現が目的とされる場合には、生体分子はその遺伝子をコードする配列を含むDNAであり得る。シグナル伝達が目的とされる場合には、生体分子はシグナル伝達刺激因子（例えば、サイトカイン、特定のリガンドなど）などであり得る。薬効が目的とされる場合は、生体分子は薬効を有する化学物質であり得る。そのような薬効を有する化学物質としては、例えば、中枢神経系用薬；末梢神経用剤；感覚器官用薬；循環器官用薬；呼吸器官用薬；消化器官用薬；ホルモン剤；泌尿生殖器官および肛門用薬；外皮用薬；歯科口腔用剤；その他の個々の器官系用薬；ビタミン剤；滋養強壮薬；血液および体液用薬；人工透析用薬；その他の代謝性医薬品（例えば、臓疾患用剤、解毒剤、習慣性中毒用剤、痛風治療剤、酵素製剤、糖尿病用剤、他に分類されない代謝性薬など）；細胞賦活用剤；腫瘍用薬；放射性医薬品；アレルギー用薬；抗生物質製剤；化学療法剤；生物学的製剤；調剤用薬；診断用薬；体外診断用医薬品；分類されない治療を主目的としない薬剤；ならびに麻薬などが挙げられるがそれらに限定されない。

20

30

【0099】

医薬としての使用を目的とする場合は、本発明の組成物において含まれる物質（遺伝物質、荷電性物質など）および塩は、薬学的に受容可能であることが好ましい。

【0100】

好ましい実施形態において、本発明において使用される遺伝物質は、細胞に導入された後生物学的活性を有する物質をコードする。

【0101】

別の実施形態において、本発明において含まれるべき遺伝物質、荷電性物質および塩は、マイクロカプセル中に含まれ得る。マイクロカプセル中に含まれることによって、携帯に便利であり、取り扱いも簡便となり、しかも、他の物質による汚染を低減させることができる。

40

【0102】

（遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するための方法）

別の局面において、本発明は、遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するための方法を提供する。この方法は、I）支持体を提供する工程と、II）該支持体に、a）遺伝物質と、b）該遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、c）塩と、を別々のまたは一緒に提供する工程と、III）該遺伝物質と該荷電性物質と塩とを固相支持体上で混合する工程と、を包含する。

【0103】

ここで、本発明の方法において用いられるべき遺伝物質、荷電性物質、塩は、遺伝物質

50

を支持体に固定し、細胞に導入するためのキットにおいて説明される任意の形態をとることができる。

【0104】

好ましい実施形態において、本発明において使用される支持体は、固相支持体である。支持体の材料としては、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属、天然ポリマーおよび合成ポリマーなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0105】

別の実施形態において、本発明において使用される支持体は、コーティングされていることが好ましい。本発明の方法では、使用される支持体がコーティングされたものでもよいし、方法の実施の際に支持体をコーティングする工程を包含していてもよい。このようなコーティングに使用される物質としては、ポリーLーリジン、シラン、APS、MAS、疎水性フッ素樹脂、金属などあるいはそれらの混合物を用いることができるが、それらに限定されず、通常支持体において使用することが企図される物質を利用して行うことができる。支持体は、本発明の方法において、新たに調製することもできるし、リサイクルすることもできる。好ましくは、コーティングすることが有利であり得る。コーティングは特に、リサイクリングを目的とする場合には有利であり得る。

【0106】

本発明の方法の好ましい実施形態では、支持体はチップであり得る。本発明の方法は、チップのような小型および集積されたデバイスのようなものを製造する際にも適用可能であり、その有用性は広範な範囲に及ぶ。この場合、チップ上に固定される物質は、アレイ状に配置されることが好ましい。このようにアレイ状に配置される場合、そのデバイスはアレイとも呼ばれる。従って、本発明の方法は、生体分子アレイまたは生体分子チップを製造する際に応用することができる。そのような方法によって製造されたチップまたはアレイは、徐放および／または細胞親和性が要求されるチップまたはアレイの用途において使用される場合に特に有用である。本発明の方法はまた、高い集積度が必要とされるアレイにおいて、簡便な固定従って簡便にかつ細かいスポットティングが必要とされる場合において特に有用性が高い。

【0107】

本発明の方法の好ましい実施形態では、遺伝物質は、細胞に導入された後、生物学的活性を有するものであることが所望され得る。このような場合、生物学的活性としては、例えば、薬効、遺伝子発現、酵素活性、シグナル伝達活性などが挙げられるがそれらに限定されない。遺伝子発現が目的とされる場合には、生体分子はその遺伝子をコードする配列を含むDNAであり得る。シグナル伝達が目的とされる場合には、遺伝物質はシグナル伝達刺激因子（例えば、サイトカイン、特定のリガンドなど）などであり得る。薬効が目的とされる場合は、生体分子は薬効を有する化学物質であり得る。薬効を有する化合物は、本明細書において別の場所において記載されるように種々の化合物の中から選択することができる。

【0108】

本発明の方法において、固定する工程は、どのような工程を用いてもよく、手動（ピペッティングなど）でも、自動（例えば、インクジェットプリンターなどのプリンター技術）でもよい。好ましくは、インクジェットプリンターのプリントピンを用いて付着させることができる。

【0109】

このような種々の目的において本発明の方法が使用される場合は、本発明の固定が達成された後に引き続いて上述の工程（例えば、トランスフェクションなどの遺伝子導入、シグナル伝達測定、薬剤送達など）が行われてもよく、あるいは、固定した後一定期間保存された後に上述の工程が行われてもよい。保存される場合は、本発明の方法によって固定された後に、徐放が開始しないような処置（徐放に使用される溶媒とは異なる保存溶媒に浸すか、あるいは、乾燥させるなど）を行うことが好ましい。

10

20

30

40

50

【0110】

支持体上のトランスフェクションを目的とした特定の実施形態において、遺伝物質としては、DNAが選択され、その遺伝物質と反対の電荷を有する荷電性物質としてはポリイミンポリマーのような正に荷電した物質が選択されることが好ましい。DNAは負に荷電しているからである。この場合、塩としては、細胞に親和性のある塩（例えば、培地に用いられる塩類、緩衝液中で用いられる塩類など）が挙げられるがそれらに限定されない。好ましい実施形態において使用される支持体の材料としては、例えば、スライドガラス（好ましくはポリ-L-リジン、シラン、APS、MAS、疎水性フッ素樹脂などによってコーティングされる）、ポリスチレン樹脂などが挙げられるがそれらに限定されない。ポリ-L-リジン、シラン、APS、MAS、疎水性フッ素樹脂などでコーティングされた固相支持体が好ましい。細胞との親和性、トランスフェクションの効率に好ましい効果を有することが知られているからである。このような場合、本発明の方法は、好ましくは、コーティング工程を包含し得る。

【0111】

本発明の方法の好ましい実施形態では、本発明の支持体に提供される物質を提供する工程は、生体分子を破壊しない条件下で行われる。このような生体分子を破壊しない条件は、当業者であれば、提供されるおのおのの複合体パートナーの種類、複合体形成の他の条件（例えば、pH、温度など）を考慮することによって適切に選択することができ、あるいは、予備的に適切な条件を試験することによって容易に選択することができる。そのような適切な条件の選択または試験は、当業者の技術常識の範囲内であり、当業者は過度な実験をすることなく決定することができる。上述の手動（ピペティングなど）でも、自動（例えば、インクジェットプリンターなどのプリンター技術）でも、本発明の目的（例えば、固定、細胞内移入、遺伝子発現など）が達成されることが本発明によって初めて判明した。本発明では、インクジェットプリンターのプリントピンを用いて遺伝物質を簡便に支持体上に固定させ、その後細胞内に導入することができ、細胞内での遺伝物質の発現解析などを行うことができるようになった。

【0112】

本発明の好ましい実施形態において、塩と遺伝物質と荷電性物質との混合物の提供は、生体分子を破壊しない条件下で行われ得る。このような生体分子を破壊しない条件は、当業者であれば、提供される複合体および塩の種類、複合体形成の他の条件（例えば、pH、温度など）を考慮することによって適切に選択することができ、あるいは、予備的に適切な条件を試験することによって容易に選択することができる。そのような適切な条件の選択または試験は、当業者の技術常識の範囲内であり、当業者は過度な実験をすることなく決定することができる。

【0113】

本発明の好ましい実施形態において、混合物を固相支持体に付着した後、その混合物中の溶媒を低減または除去する工程をさらに包含することが有利であり得る。そのような溶媒低減または除去は、自然乾燥、凍結乾燥、乾燥剤を用いた感想などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0114】

（遺伝物質担持支持体）

別の局面において、本発明は、遺伝物質と、該遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、塩とが表面に固定された、支持体を提供する。

【0115】

ここで、遺伝物質、荷電性物質、塩、支持体は、上記遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するためのキットまたは方法のセクションに記載される任意の形態をとることができる。遺伝物質（例えば、DNA、RNA、PNAおよびそれらの組み合わせであって、好ましくは細胞に導入された後生物学的活性を有する物質をコードする）は、細胞に導入され得る形態であれば、どのような形態で提供されても良い。そのような形態としては、例えば、Naked DNAの状態、プラスミド、ウイルスベクターの利用などが挙げら

れるがそれらに限定されない。本発明の支持体上には、遺伝物質は、2種類以上、または3種類以上、含まれ得る。そのような複数種類としては、遺伝子をコードするDNAとそれに対するRNAiが含まれ得る。荷電性物質（例えば、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸またはその複合体など）は、生体適合性であることが好ましく、遺伝子導入試薬として知られる試薬が例示され得る。塩（例えば、有機酸または無機酸の水素を金属に置換したものであるか、あるいは塩基の水酸基を有機酸基または無機酸基で置換したもの）としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、H E P E S、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸、ビタミンそれらの混合物であり得ることから、培地成分であってもよい。1つの実施形態では、本発明の支持体およびその上に固定される物質は、薬学的に受容可能であることが好ましい。あるいは、支持体上に固定されるべき物質は、マイクロカプセル中に含まれていても良い。

10

【0116】

1つの実施形態において、本発明の支持体は、固相支持体であることが好ましい。固相であれば、取り扱いが容易であるからである。従って、本発明の支持体の材料としては、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属、天然ポリマー、合成ポリマー、それらの混合物などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0117】

本発明のデバイスの1つの好ましい実施形態において、支持体は、コーティングされていてもよい。コーティングは、ポリーLーリジン、シラン、A P S、M A S、疎水性フッ素樹脂、金属など、通常固相支持体において使用することが企図される物質を利用して行うことができる。好ましい実施形態では、細胞培養において利用されるコーティング剤（例えば、ポリーLーリジン、シラン、A P S、M A S、疎水性フッ素樹脂、金属）などを使用することができる。

20

【0118】

本発明のデバイスの好ましい実施形態では、固相支持体はチップであってもよい。本発明の支持体がチップである場合、好ましくは、遺伝物質、荷電性物質および塩を含む混合物は、チップ上にアレイ状に配列される。このような場合、本発明の支持体は、アレイとも称され得る。

【0119】

本発明の好ましい実施形態では、遺伝物質は、細胞に導入された後、生物学的活性を有するものであることが所望され得る。このような場合、生物学的活性としては、例えば、薬効、遺伝子発現、酵素活性、シグナル伝達活性などが挙げられるがそれらに限定されない。遺伝子発現が目的とされる場合には、生体分子はその遺伝子をコードする配列を含むDNAであり得る。シグナル伝達が目的とされる場合には、生体分子はシグナル伝達刺激因子（例えば、サイトカイン、特定のリガンドなど）などであり得る。薬効が目的とされる場合は、生体分子は薬効を有する化学物質であり得る。薬効を有する化合物は、本明細書において別の場所において記載されるように種々の化合物の中から選択することができる。

30

【0120】

支持体（例えば、固相支持体）上のトランスフェクションを目的とした特定の実施形態において、固定されるべき遺伝物質としては、DNAが選択され、その遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質としてはポリイミンポリマーのような正に荷電した物質が選択されることが好ましい。DNAは一般に負に荷電しているからである。この場合、塩としては、細胞に親和性のある塩（例えば、培地に用いられる塩類、緩衝液中で用いられる塩類など）が挙げられるがそれらに限定されない。好ましい実施形態において使用される固相支持体の材料としては、例えば、スライドガラス（ポリーLーリジン、シラン、A P S、M A S、疎水性フッ素樹脂、好ましくはポリーLーリジンなどによってコーティングされる）、ポリスチレン樹脂などが挙げられるがそれらに限定されない。ポリーLーリジン、シラン、A P S、M A S、疎水性フッ素樹脂などでコーティングされた固相支持体が好

40

50

ましい。細胞との親和性、トランスフェクションの効率に好ましい効果を有することが知られているからである。

【0121】

(組成物)

1つの局面において、本発明は、遺伝物質を支持体に固定し、細胞に導入するための組成物を提供する。本発明の組成物は、a) 遺伝物質と、b) 該遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質と、c) 塩と、を含む。この組成物は、個々の成分を混合して含んでも良く、別個に含んでも良い。

【0122】

1つの好ましい実施形態において、本発明の組成物の成分は、細胞親和性を有する。ある物質の細胞親和性は、その物質と細胞とを混合したときに、その物質が存在しないときに比べて、その細胞の生存が維持されるか否かを評価することによって判断することができる。そのような細胞の生存の維持は、細胞の種々のパラメータを測定することによって具体的に判断することができる。好ましくは、細胞親和性を有する物質は、その細胞の生存を改善することが有利であり得る。 10

【0123】

好ましい実施形態において、本発明の組成物の成分は、生体分子であり得る。ここで、この生体分子は、固定の目的の対象であってもよいし、そうでなくてもよい。

【0124】

本発明の好ましい実施形態において使用され得るそのような生体分子としては、DNA (例えば、ゲノムDNA、cDNAなど)、RNA (例えば、mRNAなど)、ポリペプチド、脂質、糖、有機低分子 (例えば、コンビナトリアルケミストリーのライブラリーメンバー)、およびこれらの複合体 (例えば、糖タンパク質、糖脂質、核酸ペプチド、リポタンパク質などが含まれるがそれらに限定されない) が挙げられるがそれらに限定されない。 20

【0125】

1つの特定の実施形態では、本発明の組成物の成分は、DNAのような遺伝子コード分子であり得る。本発明において達成された固定方法を用いることによって、DNAがトランスフェクトのような遺伝子導入のための処置がされるときに、処置の完了に必要な時間 (例えば、約15分から約30分程度)、継続して徐放が起こることによって、そのような分子の導入が効率よく行われるという効果が達成された。このような徐放効果は、従来の固定方法では達成されなかったか、十分ではなかったことから、このような効果は、本発明の特筆すべき効果として挙げることができる。このような効果が、支持体上で直接混合する場合でも保持されたことは、注目すべきである。また、本発明の組成物は、固定された後に、細胞に対する親和性が保持されるかあるいは改善され、特に、トランスフェクションのような遺伝子の導入において従来の固定方法よりも効率よくかつ細胞に対するダメージなしにそのような導入が行われることが見いだされた。 30

【0126】

本発明の好ましい実施形態において、本発明の組成物の成分は、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド及びその複合体のような生体分子でもよく、アニオン性ポリマー、アニオン性脂質のように生体分子でなくてもよい。 40

【0127】

本発明の好ましい実施形態において、本発明の組成物の成分は、生体分子でもよく、生体分子でなくてもよく、例えば、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質ポリLリシンなど合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体などであり得る。好ましい実施形態において、正に荷電した物質としては、例えば、ポリイミンポリマー、ポリLリシン、合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体などのトランスフェクション試薬などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0128】

支持体上のトランスフェクションを目的とした特定の実施形態において、本発明の組成 50

物は、DNAおよびポリイミンポリマーのような正に荷電した物質を含み得る。

【0129】

好ましい実施形態では、本発明の組成物の成分は、細胞に導入され、その細胞内で生物学的活性（例えば、薬効、酵素、シグナル伝達、遺伝子発現など）を発揮することが有利であり得る。遺伝子発現が目的とされる場合には、本発明に含まれる遺伝物質は、その遺伝子をコードする配列を含むDNAであり得る。シグナル伝達が目的とされる場合には、遺伝物質はシグナル伝達刺激因子（例えば、サイトカイン、特定のリガンドなど）をコードするものなどであり得る。薬効が目的とされる場合は、遺伝物質は薬効を有するタンパク質をコードするものであり得る。そのような薬効を有する物質としては、例えば、中枢神経系用薬；末梢神経用剤；感覚器官用薬；循環器官用薬；呼吸器官用薬；消化器官用薬；ホルモン剤；泌尿生殖器官および肛門用薬；外皮用薬；歯科口腔用剤；その他の個々の器官系用薬；ビタミン剤；滋養強壮薬；血液および体液用薬；人工透析用薬；その他の代謝性医薬品（例えば、臓疾患用剤、解毒剤、習慣性中毒用剤、痛風治療剤、酵素製剤、糖尿病用剤、他に分類されない代謝性薬など）；細胞賦活用剤；腫瘍用薬；放射性医薬品；アレルギー用薬；抗生物質製剤；化学療法剤；生物学的製剤；調剤用薬；診断用薬；体外診断用医薬品；分類されない治療を主目的としない薬剤；ならびに麻薬などが挙げられるがそれらに限定されない。

10

【0130】

医薬としての使用を目的とする場合は、本発明の組成物の成分は、薬学的に受容可能であることが好ましい。

20

【0131】

（デバイス）

別の局面において、本発明はまた、目的の遺伝物質が固定されたデバイスを提供する。このデバイスでは、目的の遺伝物質（例えば、DNA）と、その物質とは反対の電荷を有する物質と、塩（例えば、培地中に含まれる塩類）とが混合されその支持体に固定されている。これらの混合は、支持体上で行われる。支持体上で混合することによって、混合しない場合とは、遺伝物質の安定性がよい、複数の遺伝物質を容易に混合できる、遺伝物質の濃度比を容易に作成可能、アレイ化する遺伝物質の調整が容易、チップ生産性の向上という点で相違点があり、このような効果は、予想外であるといえる。このような固定による効果により、本発明のデバイスは、固体支持体上に固定された物質の徐放性を有し、および／または固定された物質が細胞親和性を保つかまたは改善されていることなどが達成される。従って、本発明のデバイスは、細胞などの生体またはその一部を用いたアッセイなどに用いられるマイクロタイタープレート、アレイ（チップ）、ウェルなどの形態として提供され、固定されるべき物質（活性成分、発現遺伝子をコードするDNAなど）が徐放されることおよび／または細胞親和性が保持されることが所望されるアッセイなどにおいて有用である。あるいは、ある有効成分が徐放されることが好ましい場合において、医薬送達媒体として使用され得る。そのような場合は、遺伝物質、その遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質、塩および支持体は、生体適合性であり、好ましくは薬学的に受容可能であることが所望される。従って、本発明のデバイスは、a) 遺伝物質、b) その遺伝物質とは反対の荷電を有する荷電性物質；c) 塩；およびd) その複合体とその塩とが支持体上で混合され固定された固相支持体を含む。個々で使用される、支持体、遺伝物質、荷電性物質、塩などは、（遺伝物質担持支持体）のセクションにおいて記載される任意の形態を採ることができる。そのようなデバイスは、例えば、市販のものを加工してもよい（例えば、スライドガラス、マイクロタイタープレートなど）、自作であっても良い。本発明は、アッセイ用のデバイスまたは医薬送達デバイスを作製する際に使用することができ、その有用性は広い範囲に及ぶ。

30

40

【0132】

チップ上に固定される物質がアレイ状に配置される場合は、本発明のデバイスは、アレイとも呼ばれる。従って、本発明の方法は、生体分子アレイまたは生体分子チップを製造する際に応用することができる。そのような方法によって製造されたチップまたはアレイ

50

は、徐放および／または細胞親和性が要求されるチップまたはアレイの用途において使用される場合に特に有用である。本発明の方法はまた、高い集積度が必要とされるアレイにおいて、簡便な固定従って簡便にかつ細かいスポッティングが必要とされる場合において特に有用性が高い。

【0133】

本発明は、生物体に関連して使用する場合、ヒト用途でも使用され得るが、その他の宿主（例えば、哺乳動物など）を対象として使用されてもよい。従って、本発明は、農薬として使用されてもよい。

【0134】

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F.A.ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、NewYork、NY; Sambrook Jら (1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその3rd Edition (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、当業者は適宜そのような周知文献を当たることにより本発明を実施することができる。

【0135】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0136】

以下に本発明の例示を具体的な実施例を提示して示す。以下の実施例において用いられる試薬、支持体などは、例外を除き、Sigma、和光純薬などから市販されるものを用いた。

【0137】

（実施例1：固定組成物の作製）

本実施例では、遺伝物質としてDNAを選択し、DNAを固相支持体に固定するための組成物を調製した。

【0138】

DNAとしてトランスフェクションのためのプラスミドを調製した。プラスミドとして、pEGFP-N1およびpDsRed2-N1（ともにBD Biosciences, Clontech, CA, USA）を用いた。これらのプラスミドでは、遺伝子発現はサイトメガロウイルス（CMV）の制御下にある。プラスミドDNAを、E. coli (XL1 blue, Stratgene, TX, USA) 中で増幅し増幅したプラスミドDNAを複合体パートナーの一方として用いた。DNAは、DNaseもRNaseも含まない蒸留水中に溶解した。

【0139】

遺伝物質と反対の電荷を有する荷電性物質として、トランスフェクション試薬を用いた。使用したトランスフェクション試薬は以下の通りである：Effectene Transfection Reagent (cat. no. 301425, Qiagen, CA), TransFastTM Transfection Reagent (E2431, Promega, WI), TfxTM-20 Reagent (E2391, Promega, WI), SuperFect Transfection Reagent (301305, Qiagen, CA), PolyFect Transfection Reagent (301105, Qiagen, CA), LipofectAMINE 2000 Reagent (11668-019, Invitrogen corporation, CA), JetPEI (×4) conc. (101-30, Polyplus-transfection, France) およびExGen 500 (R0511, Fermentas Inc., MD)。

【0140】

これらのDNAプラスミドとトランスフェクション試薬とを、別々にまたは一緒に、DNaseもRNaseも含まない蒸留水（コントロール）、塩としてNaCl溶液（0.9%）、PBS緩衝液（Sigma）、およびダルベッコMEM培地（グルコース（4.5g/L）、L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウム（ナカライテスク、京都、日本）添加、10%仔ウシ血清アルブミン（大日本製薬、大阪、日本）を補充）を選択し、この培地中に溶解した。

【0141】

支持体としては、本発明では、スライドガラス、ならびにポリ-L-リジン、シラン、APS、PLLまたはMASでコーティングされたスライドガラス、およびポリスチレン製のマイクロタイタープレートを用いた。 10

【0142】

溶解されたDNA、荷電性物質および塩の溶液またはそれらの混合溶液を、おのこの支持体上にスポッティングし、スポットを自然乾燥させることによって目的の遺伝物質を固定した。

【0143】

次に、固定された遺伝物質をPBSに浸すことによって、固定の状況を確認した。確認は、PBSへの浸潤直後（0分）、5分後、10分後、15分後、20分後、25分後、30分後、40分後、50分後、60分後に目視することおよびDNA定量によって行った。 20

【0144】

（結果）

本発明の混合物を使用した例（NaCl溶液、PBS緩衝液、ダルベッコ培地）では、15分後でも固定が破壊されていないことが確認されたのに対して、蒸留水で調製した例では、PBSの浸した直後に固定が破壊され、DNAが流出していたことが明らかになった。従って、本発明の方法の物質固定効果は、顕著であることが明らかになった。塩を使用した例のうち、単塩（NaCl）では、固定が破壊される時間が比較的早かったが、複合塩を使用した例（PBSおよびダルベッコMEM培地）では、単塩よりも効果が持続した。特にダルベッコMEMを使用した例では、その効果は顕著であり、30分後でも固定の効果が持続した。この効果は、別々に用いた場合でも一緒に混合した場合でもほとんど変わらなかった。 30

【0145】

（実施例2：プリント技術を用いた、固定の検証－「重ね打ち」）

実施例1において用いたDNA溶液（塩溶液または蒸留水溶液）、トランスフェクション試薬溶液（塩溶液または蒸留水溶液）、および必要に応じて塩溶液を、プリント技術を用いて、実施例1において使用した支持体上に固定した。以下にその手順を示す。

【0146】

1) まず、DNAプラスミド溶液を支持体上にプリントした。DNAプラスミド溶液は、10～3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という濃度を採用し、プリントは、Cartesian Technologies MicroSys 4000 (Genomic Solution) という器機を室温（25℃）、湿度65%という条件を用いて行った。 40

【0147】

2) 次に、トランスフェクション試薬溶液を、0.5 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ ～3.0 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ という濃度で用いて、Cartesian Technologies MicroSys 4000 (Genomic Solution) という器機を室温（25℃）、湿度65%という条件を用いて上記支持体にプリントした。プリントは、上記DNAプラスミド溶液がプリントされた箇所に重ね打ちするように行った。

【0148】

3) DNAプラスミド溶液、トランスフェクション試薬溶液が塩を含まない場合は、この後、実施例1に示される塩溶液をプリントした、プリントは、Cartesian Technologies MicroSys 4000 (Genomic Solution) という器機を室温（25℃）、湿度65%という条 50

件を用いて行った。

【0149】

4) 必要に応じて、フィブロネクチン溶液 (0.5~5 mg/ml濃度をご教示願います) を、プリントした。プリントは、Cartesian Technologies MicroSys 4000 (GenomicSolution) という器機を室温 (25℃)、湿度65%という条件を用いて行った。すべての工程において、各溶液が乾燥した後に次の試薬の重ね打ちを行った。

【0150】

(結果)

これらのプリント後、実施例1と同様に、固定がされたかどうかを検証した。実施例1と同様に、蒸留水以外の塩溶液が用いられた場合、および後から塩溶液をプリントした場合は、実施例1と同様固定効果が確認された。なお、1)~4)の順序を交換した場合でも、同様の固定効果が見られたことから、特に、重ね打ちの順序は固定効果に影響がないことが明らかになった。 10

【0151】

(実施例3：複数の遺伝物質を用いた場合の、固定の検証)

次に、複数の遺伝物質を用いた場合にも、同様のプリントが可能かどうかを検証した。

【0152】

実施例2の手順に従い、ただし、1)の遺伝物質溶液のプリントにおいて、プラスミドDNA溶液のプリントに加え、shRNA (pUR6iGFP272 (インサートの配列はGFP272 caccGGCTAtGTCtAGGAGtGtACC TAGAATTACATCAAGGGAGATGGTGCGCTCCTGGACGTAGCCTTTT (配列番号1)) またはpDsRed2-1 (BD Biosciences Clontech, CA PT3602-5)、BD Biosciences Clontech, CA) 溶液をプリントした。プリントは、Cartesian Technologies MicroSys 4000 (Genomic Solution) という器機を室温 (25℃)、湿度65%という条件を用いて行った。 20

【0153】

1つの例として、このshRNAは、実施例3の1)と2)との間にプリントした。

【0154】

(結果)

これらのプリント後、実施例1および2と同様に、固定がされたかどうかを検証した。実施例1および2と同様に、蒸留水以外の塩溶液が用いられた場合、および後から塩溶液をプリントした場合は、実施例1と同様固定効果が確認された。なお、1)~4)およびshRNA溶液プリントの順序を交換した場合でも、同様の固定効果が見られたことから、特に、重ね打ちの順序は固定効果に影響がないことが明らかになった。 30

【0155】

(実施例4：細胞親和性の確認)

次に、本発明の細胞親和性および遺伝物質の細胞導入の効果を確認するために、上記実施例1および2において調製したDNA固定固相支持体を用いて、細胞のトランスフェクション実験を行った。

【0156】

本実施例では、以下の5種類の細胞を利用して、効果を確認した：ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs、PT-2501、Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)、ヒト胚性腎細胞 (HEK293、RCB1637、RIKEN Cell Bank, 日本)、NIH3T3-3細胞 (RCB0150, RIKEN Cell Bank, 日本)、HeLa細胞 (RCB0007、RIKEN Cell Bank, 日本) およびHepG2 (RCB1648、RIKEN Cell Bank, 日本)。 40

【0157】

実施例1~3においてDNAが固定された支持体をディッシュに入れ、その上に、上記細胞を含む培地を各々滴下した。その後、プレートを含むディッシュをインキュベータに移し、37℃で、5%CO₂の雰囲気下で2日または3日間そのプレートをインキュベ 50

トしてトランスフェクトさせた。

【0158】

（遺伝子発現の観察）

遺伝子発現の観察は、各々の遺伝子発現の発現産物（E F P、E G F PおよびD s R e d 2）が発する蛍光を観察することによって行った。蛍光の観察には、蛍光顕微鏡（I X - 7 1、O l y m p u s P R O M A R K E T I N G I n c.，日本）を用いた。細胞は、反応後にパラホルムアルデヒド（P F A）固定を行うこと（4 % P F A、室温で10分間処理）により、観察した。

【0159】

（結果）

図1～2にトランスフェクションの結果の一部を示す。図1は、最初から混合した場合（上にコントロール、下に混合物）を示す。固相に対して複合体を添加した直後（0分）ならびに、添加の1分後、5分後および10分後に細胞含有液を加えた後の複合体の溶出の様子を示す。図2は、実施例2の手順に従ってプリントした支持体における、ヒト間葉系幹細胞におけるトランスフェクション効果を示す。示されるように、プリントを連続的行った（重ね打ち）の場合でも、混合物と同様の遺伝物質の細胞導入効果が示された。

10

【0160】

この結果から明らかなように、混合して塩を加えてから支持体に固定された系に加えて、別個にプリントした場合でも、固定がなされ、D N Aが徐放されることも明らかになった。このような効果は、従来の技術では明らかでなかったことであり、これにより、プレート、チップなどで任意の遺伝子を任意の組み合わせで細胞内に導入して観察することができるという技術が初めて確立されたことになる。また、細胞導入の効果についても、重ね打ちの順序に関係ないことが明らかになった。

20

【0161】

また、このほかの本発明の塩を固定に使用した場合でも、トランスフェクションが起こっていたことが判明した。これは、トランスフェクションが起こるために必要なD N Aの細胞への移入が、いずれの例でも起こっていたことを示す。従って、本発明の支持体は、細胞親和性および細胞導入効果を維持または改善していたことになる。また、実施例1～2における放出のデータに加え、トランスフェクションが起こっていたことは固定された遺伝物質が活性を保持していたことを示すことになる。

30

【0162】

このような効果は、塩を用いない溶液では、観察されなかった。また、塩を用いた場合、プリント（重ね打ち）を行っても効果が保持されていた。従って、この結果は、本発明は、種々の形態で実施可能であることを示す。特に、固定の際に塩として培地を利用した系では、単塩を用いた系よりもトランスフェクション効率が高かったことから、固定の際に細胞に適合する塩類の組み合わせを用いることが、細胞親和性および遺伝物質の細胞導入効果の維持または改善にも適切であることがわかる。

【0163】

（実施例5：複数遺伝物質を用いた重ね打ちの効果）

実施例3において複数の遺伝物質を重ね打ちした場合に、いずれの遺伝物質の活性も保持されたまま細胞に導入されるかどうかを検証した。検証手順は、実施例4に記載のとおりであった。

40

【0164】

複数の遺伝物質の組み合わせとして、以下の表に記載のような組成比の組み合わせを使用した。なお、p D N AはプラスミドD N Aを示す。

【0165】

【表 1】

	pDNA 対 shRNAの比[$\mu\text{L}/\mu\text{L}$]				
	9:1	7:3	1:1	3:7	1:9
pEGFP-N1 (1mg/mL)	1.8	1.4	1.0	0.6	0.2
pPUR6iGFP272 (1mg/mL)	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8
pDsRed2-1 (1mg/mL)	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8
Lipofectamine2000	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
フィブロネクチン (4mg/mL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

10

結果を図 3 および図 4 に示す。

【0166】

図 3 には、HeLa-K細胞にトランスフェクトした後 3 日目の遺伝子発現の様子を示す。図 4 には、HeLa-K細胞にトランスフェクトした後 6 日目の遺伝子発現の様子を示す。+shGFPは、RNAi分子があるものを示し、Pro lessは、ないものを示す。Pro lessはpDsRed2-1というベクターがCMVプロモータを有しておらず、遺伝子発現を行わないので、これをネガティブコントロールとして、shGFPの代わりに使用した場合の結果である。

【0167】

20

結果から明らかなように、プラスミドDNAに含まれるGFPの蛍光が確認され、それに対するRNAi分子を重ね打ちした場合に、そのRNAi効果が確認され、蛍光が消長した。従って、遺伝物質が複数ある場合にも、本発明の細胞導入効果が示されたことになる。

【0168】

(実施例 6：アレイを用いた場合)

次に、上述の効果がアレイを用いた場合でも実証されるかどうかを確認するために規模拡大して実験を行った。

【0169】

(実験プロトコル)

(細胞供給源、培養培地、および培養条件)

この実施例では、5種類の異なる細胞株を使用した：ヒト間葉系幹細胞(hMSC、PT-2501、Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)、ヒト胚性腎細胞HEK293(RCB1637、RIKEN Cell Bank, 日本)、NIH3T3-3(RCB0150、RIKEN Cell Bank, 日本)、HeLa(RCB0007、RIKEN Cell Bank, 日本)、およびHepG2(RCB1648、RIKEN Cell Bank, 日本)。ヒトMSC細胞の場合、この細胞を、市販のヒト間葉細胞基底培地(MSCGM Bullet Kit PT-3001, Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)中で維持した。HEK293細胞、NIH3T3-3細胞、HeLa細胞およびHepG2細胞の場合、これらの細胞を、10% ウシ胎仔血清(FBS、29-167-54、Lot No. 2025F、Dainippon Pharmaceutical CO., LTD., 日本)を有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムを有する高グルコース(4.5g/L); 14246-25、Nakalai Tesque, 日本)中で維持した。全ての細胞株を、37℃、5% CO₂に制御されたインキュベーター中で培養した。hMSCを含む実験において、本発明者らは、表現型の変化を回避するために、5継代未満のhMSCを使用した。

40

【0170】

(プラスミドおよびトランスフェクション試薬)

50

トランスフェクションの効率を評価するために、pEGFP-N1ベクターおよびpDsRed2-N1ベクター（カタログ番号6085-1、6973-1、BD Biosciences Clontech, CA）を使用した。共に遺伝子発現は、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターの制御下であった。トランスフェクトされた細胞は、それぞれ、連続的にEGFPまたはDsRed2を発現した。プラスミドDNAを、Escherichia coli、XL1-blue株（200249, Stratagene, TX）を使用して増幅し、そしてEndoFree Plasmid Kit（EndoFree Plasmid Maxi Kit 12362, QIAGEN, CA）によって精製した。全ての場合において、プラスミドDNAを、DNaseおよびRNaseを含まない水に溶解した。トランスフェクション試薬は以下のようにして得た：Efffectene Transfection Reagent（カタログ番号301425, Qiagen, CA）、TransFastTM Transfection Reagent（E2431, Promega, WI）、TfxTM-20 Reagent（E2391, Promega, WI）、SuperFect Transfection Reagent（301305, Qiagen, CA）、PolyFect Transfection Reagent（301105, Qiagen, CA）、LipofectAMINE 2000 Reagent（11668-019, Invitrogen corporation, CA）、JetPEI（×4）conc.（101-30, Polypplus-transfection, France）、およびExGen 500（R0511, Fermentas Inc., MD）。 10 20

【0171】

（固相系トランスフェクションアレイ（SPTA）生成）

「リバーストランスフェクション」につてのプロトコルの詳細は、ウェブサイト http://staffa.wi.mit.edu/sabatini_public/reverse_transfection.htm の「Reverse Transfection Homepage」に記載されていた。本発明者らの固相系トランスフェクション（SPTA方法）において、疎水性フッ素樹脂コーティングによって分離した48平方パターン（3mm×3mm）を有する3つの型のスライドガラス（シラン処理したスライドガラス；APSスライド、およびポリ-L-リジンでコーティングしたスライドガラス；PLLスライド、およびMASでコーティングしたスライド；Matsunami Glass Ind., LTD., 日本）を研究した。 30

【0172】

（プラスミドDNAプリンティング溶液の調製）

SPTAを生成するための2つの異なる方法を開発した。その主な違いは、プラスミドDNAプリンティング溶液の調製にある。

【0173】

（方法A）

Efffectene Transfection Reagentを使用する場合、プリンティング溶液は、プラスミドDNAおよび細胞接着分子（4mg/mLの濃度で超純水に溶解したウシ血漿フィブロネクチン（カタログ番号16042-41, Nakalai Tesque, 日本））を含んだ。上記の溶液を、インクジェットプリンタ（synQUADTM, Cartesian Technologies, Inc., CA）を用いてか、または手動で0.5~10μLチップを用いて、スライドの表面に適用した。このプリントしたスライドガラスを安全キャビネットの内側で室温にて15分間かけて乾燥させた。トランスフェクションの前に、総Efffectene試薬を、DNAプリントしたスライドガラス上に静かに注ぎ、そして室温にて15分間インキュベートした。過剰のEfffectene溶液を、吸引アスピレーターを用いてスライドガラスから除去し、そして安全キャビネットの内側で室温にて15分間かけて乾燥させた。得られたDNAプリントしたスライドガラスを、100mm培養ディッシュの底に置き、そして約25mLの細胞懸濁液（2~4×10⁴細胞/mL）を、このディッシュに静かに注いだ。次いで、 40 50

このディッシュを 37℃、5% CO₂ のインキュベーターに移し、2～3日間インキュベートした。

【0174】

(方法B)

他のトランスフェクション試薬 (TransFastTM、TfxTM-20、Superfect、Polyfect、LipofectAMINE 2000、JetPEI (×4) conc. または ExGen) の場合、プラスミドDNA、フィブロネクチン、およびトランスフェクション試薬を、製造業業者が配布する指示書に示される比率に従って 1.5mL のマイクロチューブ中で均一に混合し、そしてチップ上にプリンティングする前に室温にて 15 分間インキュベートした。プリンティング溶液を、インクジェットプリンターまたは 0.5～10 μL チップを用いてスライドガラスの表面上に適用した。このプリントしたスライドガラスを、安全キャビネットの内側で室温にて 10 分間かけて完全に乾燥させた。プリントしたスライドガラスを 100mm 培養ディッシュの底に置き、そして約 3mL の細胞懸濁液 (2～4×10⁴ 細胞/mL) を添加し、安全キャビネットの内側で室温にて 15 分間にわたってインキュベートした。インキュベーション後、新鮮な培地をこのディッシュに静かに注いだ。次いで、このディッシュを 37℃、5% CO₂ のインキュベーターに移し、2～3日間インキュベートした。インキュベーション後、本発明者らは、蛍光顕微鏡 (IX-71、Olympus PROMARKETING, INC., 日本) を用いて、増強された蛍光タンパク質 (EGFP、EGFP、および DsRed2) の発現に基づいてトランスフェクト体を観察した。位相差画像を同じ顕微鏡を用いて撮った。両プロトコルにおいて、細胞をパラホルムアルデヒド (PFA) 固定方法 (PBS 中の 4% PFA、処理時間は、室温にて 10 分間) を用いることによって固定した。

【0175】

(レーザー走査および蛍光強度定量)

トランスフェクション効率を定量するために、本発明者らは、DNA マイクロアレイスキャナ (GeneTAC UC4×4、Genomic Solutions Inc., MI) を使用した。総蛍光強度 (任意の単位) を測定した後、表面積あたりの蛍光強度を計算した。

【0176】

(結果)

(ヒト間葉系幹細胞の固相系トランスフェクションアレイ)

多様な種類の細胞に分化するヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の能力は、組織再生および組織復活を標的化する研究にとって特に興味深いものになっている。特に、これらの細胞の形質転換体についての解析は、hMSC の多能性を制御する因子を解明する上で、関心が高まっている。hMSC の研究における重大な障害は、所望の遺伝物質を用いたトランスフェクションが不可能 (または、非常に困難) な点にある。

【0177】

これを達成するための従来の方法は、ウイルスベクターまたはエレクトロポレーションのいずれかの技術を含む。本発明者らが開発した複合体-塩という系を用いることにより、種々の細胞株 (hMSC を含む) に対して高いトランスフェクション効率ならびに密集したアレイ中での空間的な局在の獲得を可能にする固相系トランスフェクションが達成された。固相系トランスフェクションの概略を、図 5 に示す。

【0178】

固相系トランスフェクションにより、インビボ遺伝子送達のために使用され得る「トランスフェクションパッチ」の技術的な達成ならびに hMSC における高スループットの遺伝子機能研究のための固相系トランスフェクションアレイ (SPTA) が可能になることが判明した。

【0179】

哺乳動物細胞をトランスフェクトするための多数の標準的な方法が存在するが、遺伝物

質のhMSCへの導入については、HEK293、HeLaなどの細胞株と比較して不便かつ非常に困難であることが知られている。従来使用されるウイルスベクター送達またはエレクトロポレーションのいずれも重要であるが、潜在的な毒性（ウイルス方法）、ゲノムスケールでの高スループット分析を受けにくいこと、およびインビボ研究に対して制限された適用性（エレクトロポレーションに関して）のような不便さが存在する。

【0180】

固相支持体に簡便に固定することができ、かつ徐放性および細胞親和性を保持した固相支持体固定系が開発されたことにより、これらの欠点のほとんど克服することができた。

【0181】

上述の実験の結果の一例を、図6に示す。マイクロプリンティング技術を使用する本発明者らの技術を用いて、選択された遺伝物質、トランスフェクション試薬および適切な細胞接着分子、ならびに塩を含む混合物を、固体支持体上に固定化し得た。混合物を固定化した支持体上での細胞培養は、その培養細胞に対する、混合物中の遺伝子の取り込みを可能にした。その結果、支持体—接着細胞における、空間的に分離したDNAの取り込みを可能にした（図6）。 10

【0182】

本実施例の結果、いくつかの重要な効果が達成された：高いトランスフェクション効率（その結果、統計学的に有意な細胞集団が研究され得る）、異なるDNA分子を支持する領域間の低い相互夾雑（その結果、個々の遺伝子の効果が、別々に研究され得る）、トランスフェクト細胞の長期生存、高スループットの互換性のある形式および簡便な検出方法。これらの基準を全て満たすSPTAの開発は、さらなる研究のための適切な基盤となる。 20

【0183】

これらの目的の達成を明確に確立するために、上述のように本発明者らは、5種類の異なる細胞株（HEK293、HeLa、NIH3T3、HepG2およびhMSC）を、本発明者らの方法論（固相系でのトランスフェクション）および従来の液相系トランスフェクションの両方を用いて一連のトランスフェクション条件下で研究した。SPTAの場合、相互夾雑を評価するために、本発明者らは、チェック模様のパターンでガラス支持体上にプリントした赤色蛍光タンパク質（RFP）および緑色蛍光タンパク質（GFP）を使用し、一方、従来の液相系トランスフェクションを含む実験の場合（ここで、本来、トランスフェクト細胞の自発的な空間的分離は達成され得ない）、本発明者らは、GFPを使用した。いくつかのトランスフェクション試薬を評価した：4つの液体トランスフェクション試薬（Effectedene、TransFastTM、TfxTM-20、LopofectAMINE 2000）、2つのポリアミン（Superfect、Polyfect）、ならびに2つの型のポリイミン（JetPEI（×4）およびExGen 500）。 30

【0184】

トランスフェクション効率：トランスフェクション効率を、単位面積あたりの総蛍光強度として決定した（図7A）。使用した細胞株に従って、最適な液相の結果を、異なるトランスフェクション試薬を用いて得た。次いで、これらの効率的なトランスフェクション試薬を、固相系プロトコル（図7C～Dを参照のこと）の最適化に使用した。いくつかの傾向が観察された：容易にトランスフェクト可能な細胞株（例えば、HEK293、HeLa、NIH3T3）の場合、固相系プロトコルで観察されたトランスフェクション効率は、標準的な液相系プロトコルと比較してわずかに優れていたが、本質的に類似したレベルで達成されている（図7B）。 40

【0185】

しかし、細胞をトランスフェクトするのが困難な場合（例えば、hMSCおよびHepG2）においてSPTA方法論に最適化した条件を用いることによって、本発明者らは、細胞の特徴を維持しながら、トランスフェクション効率が40倍まで増加したことを観察した（上述のプロトコルおよび図4C～Dを参照のこと）。結果を、図7Bに示す。 50

【0186】

hMSCの特定の場合（図8）、最良条件は、ポリエチレンイミン（PEI）トランスフェクション試薬の使用を含んだ。予想したように、高いトランスフェクション効率を実現するための重要な因子は、ポリマー内の窒素原子（N）の数とプラスミドDNA内のリン酸残基（P）の数との間の電荷バランス（N/P比率）、ならびにDNA濃度である。一般的に、N/P比率および濃度における増大は、トランスフェクション効率の増大を生じる。並行して、本発明者らは、hMSCの溶液トランスフェクション実験における高いDNAおよび高いN/P比率の場合に、細胞生存率の有意な低下を観察した。これら2つの拮抗因子に起因して、hMSCの液相系トランスフェクションの効率は、かなり悪い非常に低い細胞生存率（N/P比率>10で観察された）であった。しかし、SPTAプロトコルは、細胞生存率にも細胞形態にも有意に影響を与えることなく、非常に高い（固体支持体に固定された）N/P比率およびDNA濃度を許容し（おそらく、細胞膜に対する固体支持体の安定化効果に起因する）、従って、このことがおそらく、トランスフェクション効率の劇的な改善の原因となっている。SPTAの場合、10のN/P比率が最適であることが見出され、細胞毒性を最小化しながら十分なトランスフェクションレベルを提供する。SPTAプロトコルにおいて観察されたトランスフェクション効率の増大に関するさらなる理由は、高い局所的なDNA濃度／トランスフェクション試薬濃度（これは、液相系トランスフェクション実験において使用される場合は細胞死を生成する）の達成である。

【0187】

チップ上での高いトランスフェクション効率の達成のための重要な点は、使用されるコーティングに使用する物質の種類である。ガラスチップを使用した際のコーティング剤として、PLLがトランスフェクション効率および相互夾雑の両方に関して、最良の結果を提供することを発見した。フィブロネクチンコーティングしない場合、少数のトランスフェクト体を観察した（他のすべての実験条件は一定に保った）。完全に確立したわけではないが、フィブロネクチンの役割はおそらく、細胞接着プロセスを加速し（データは示していない）、ゆえに、表面を離れたDNA拡散が可能になる時間を制限するということである。

【0188】

低い相互夾雑：SPTAプロトコルで観察されたより高いトランスフェクション効率は別として、本技術の重要な利点は、別個に分離された細胞アレイの実現であり、その各位置では、選択した遺伝子が発現する。本発明者らは、フィブロネクチンでコーティングしたガラス表面上に、JetPEI（「実験プロトコル」を参照のこと）およびフィブロネクチンと混合した2つの異なるレポーター遺伝子（RFPおよびGFP）をプリントした。得られたトランスフェクションチップを適切な細胞培養に提供した。最良であることを見出された実験条件下において、発現されたGFPおよびRFPは、それぞれのcDNAがスポットされた領域に局在した。相互夾雑はほとんど観察されなかった（図6）。しかし、フィブロネクチンまたはPLLの非存在下において、相互夾雑は重大な障害であり、そしてトランスフェクション効率は、有意に低かった（図7）。このことは、細胞接着および支持体表面から離れて拡散するプラスミドDNAの相対的な割合が、高いトランスフェクション効率および高い相互夾雑の両方に対して重要な因子であるという仮説を立証する。

【0189】

相互夾雑のさらなる原因は、固体支持体上のトランスフェクション細胞の移動性であり得る。本発明者らは、数個の支持体上での細胞接着速度（図6C）およびプラスミドDNAの拡散速度の両方を測定した。その結果は、最適条件下においてDNA拡散はほとんど生じなかった。しかし、高い相互夾雑条件下では、細胞接着が完了するまでの時間に、相当の量のプラスミドDNAが固相表面から拡散して枯渇した。

【0190】

この確立された技術は、経済的な高スループットの遺伝子機能スクリーニングの状況において特に重要である。実際に、必要とされる少量のトランスフェクション試薬およびD

NA、ならびに全プロセス（プラスミドの単離から検出まで）を自動化する可能性は、上記の方法の有用性を増大する。

【0191】

結論として、本発明者らは、複合体－塩を用いた系で、hMSCトランスフェクションアレイを好首尾に実現した。このことは、多能性幹細胞の分化を制御する遺伝子機構の解明など、固相系トランスフェクションを利用した種々の研究における高スループット研究を可能にすることになる。固相系トランスフェクションの詳細な機構ならびに高スループットのリアルタイム遺伝子発現モニタリングに対するこの技術の使用に関する方法論は種々の目的に応用可能であることが明らかになった。

【0192】

（実施例7：RNAiトランスフェクションマイクロアレイ）

実施例6に記載のようにアレイを作製した。遺伝物質として、プラスミドDNAとshRNAとを混合して使用した。その組成を以下の表2に示す。

【0193】

【表2】

	pDNA 対 shRNAの比 [μ L/ μ L]				
	9:1	7:3	1:1	3:7	1:9
pEGFP-N1 (1mg/mL)	1.8	1.4	1.0	0.6	0.2
pPUR6iGFP272 (1mg/mL)	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8
pDsRed2-1 (1mg/mL)	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8
Lipofectamine2000	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
フィブロネクチン(4mg/mL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

結果を図9に示す。この図の結果を数値化したデータを、5種類の細胞について、図10にまとめた。

【0194】

このように、どのような細胞を用いたとしても、本発明の技術が適用可能であることが判明した。

【0195】

（実施例7：RNAiマイクロアレイ＝siRNAを用いた場合）

実施例6と同様のプロトコールを用いて、今度はshRNAの代わりにsiRNAを用いて、RNAiトランスフェクションマイクロアレイを構築した。

【0196】

以下の表の18種類の転写因子レポーターおよびActinプロモーターベクターを用いて、各転写因子に対してのsiRNAを合成した28種類。また、コントロールとして、EGFPに対するsiRNAを用いて、siRNAが標的転写因子をノックダウンするか評価した。また、ネガティブコントロールとしては、scrambleRNAを用いて、これらの比を取って評価した。

【0197】

【表 3】

<u>Mercury</u> シグナル伝達 経路
pAP1(PMA)-EGFP
pAP1-EGFP
pCRE-EGFP
pERE-EGFP
pE2F-EGFP
pGAS-EGFP
pGRE-EGFP
pHSE-EGFP
pISRE-EGFP
pMyc-EGFP
pNFAT-EGFP
pNFkB-EGFP
p53-EGFP
pRARE-EGFP
pRb-EGFP
pSRE-EGFP
pSTAT3-EGFP
pTRE-EGFP

10

20

30

40

各細胞への固相系トランスフェクション後、2日間培養し、蛍光イメージスキャナーにて画像取得後、蛍光量を定量化した。

【0198】

(結果)

結果を図11に示す。この結果を各遺伝子ごとにまとめたものを図12に示す。

【0199】

図11～12から明らかなように、RNAiを用いた場合、各遺伝子の特異的に発現が

50

抑制されていることが示された。RNAiを用いた複数の遺伝物質のアレイを実現することができた。

【0200】

（実施例8：PCR断片を用いたトランスフェクションアレイ）

次に、PCR断片を遺伝物質として用いた場合でも、本発明が実現可能であることを実証した。以下にその手順を示す。

【0201】

PCRにより、図13に記載のような核酸断片を取得し、トランスフェクションマイクロアレイに用いる遺伝物質とした。その手順を以下に示す。

【0202】

PCRプライマーとしては、
GG ATAACCGTATTACCGCCATG CAT（配列番号2）と
ccctatctcgggtctattcttttg CAAAAGAATAGACCGAGATA GGG
（配列番号3）とを使用して、テンプレートとして、pEGFP-N1を用いた（図14を参照）。PCRの条件は、以下のとおりである。

【0203】

【表4】

蒸留水	33.5	μ L
10xKOD-Plus- 緩衝液	5	μ L
2mM dNTPs	5	μ L
25mM MgSO ₄	2	μ L
プライマー(各10 μ M)	1.5	μ L
テンプレート DNA (1ng)	2	μ L
KOD-Plus- (1unit/uL	1	μ L
合計	50	μ L

サイクル条件：94°C 2min → (94°C 15sec → 60°C 30sec → 68°C 3min) → 4°C（括弧内を30サイクル）。

得られたPCRフラグメントは、フェノール/クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿法にて精製した。そのPCR断片の配列は、

GG ATAACCGTATTACCGCCATG CAT TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCCG

CGTTACATAACTTACGGTAA ATGGCCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC CCCGCCATT
GACGTCAATAATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA
ATGGGTGGAGTATTTACGGT AAAGTGGCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC
AAGTACGCCCCCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
CATGACCTTATGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC
CATGGTGATGCGGTTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG
ATTTCCAAGTCTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG

GGACTTTCCAAAAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT
 ACGGTGGGAGGTCTATATAA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC CGTCAGATCC GCTAGCGCTA
 CCGGACTCAGATCTCGAGCT CAAGCTTCGA ATTCTGCAGT CGACGGTACC GCGGGCCCCG
 GATCCACCGGTGCGCCACCAT GGTGAGCAAG GGCGAGGAGC TGTTCACCGG GGTGGTGCCC
 ATCCTGGTCGAGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT TCAGCGTGTC CGGCGAGGGC
 GAGGGCGATGCCACCTACGG CAAGCTGACC CTGAAGTTCA TCTGCACCAC CGGCAAGCTG
 CCCGTGCCCT GGCCACCCTCGTGACCACC CTGACCTACG GCGTGCACTG CTTAGCCGC
 TACCCCGACCACATGAAGCA GCACGACTTC TTCAAGTCCG CCATGCCCCG AGGCTACGTC
 CAGGAGCGCACCATCTTCTT CAAGGACGAC GGCAACTACA AGACCCGCGC CGAGGTGAAG
 TTCGAGGGCGACACCCTGGT GAACCGCATC GAGCTGAAGG GCATCGACTT CAAGGAGGAC
 GGCAACATCCTGGGGCACAA GCTGGAGTAC AACTACAACA GCCACAACGT CTATATCATG
 GCCGACAAGCAGAAGAACGG CATCAAGGTG AACTTCAAGA TCCGCCACAA CATCGAGGAC
 GGCAGCGTGCACTCGCCGA CCACTACCAG CAGAACACCC CCATCGGCGA CGGCCCCGTG
 CTGCTGCCCCGACAACCACTA CCTGAGCACC CAGTCCGCCC TGAGCAAAGA CCCCACGAG
 AAGCGCGATCACATGGTCCT GCTGGAGTTC GTGACCGCCG CCGGGATCAC TCTCGGCATG
 GACGAGCTGTACAAGTAAAG CGGCCGCGAC TCTAGATCAT AATCAGCCAT ACCACATTTG
 TAGAGGTTTTACTTGCTTTA AAAACCTCC CACACCTCCC CCTGAACCTG AAACATAAAA
 TGAATGCAATTGTTGTTGTT AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA
 ATAGCATCACAAATTCACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT
 CCAAACATCAATGTATCT TAAGGCGTAA ATTGTAAGCG TTAATATTTT GTTAAAATTC
 GCGTTAAATTTTTGTAAAT CAGCTCATTT TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAAATC
 CCTTATAAATCAAAAAGAATA GACCGAGATA GGG（配列番号4）に記載のとおりである。

10

20

【0204】

これを用いて作製したチップに、MCF7を播種し、2日後に蛍光イメージスキャナーにて画像を取得した。その結果を図15に示す。図15では、環状DNAとPCRフラグメントとの比較を行っている。どちらの場合も、トランスフェクションがうまく行われており、PCR断片を遺伝物質として使用した場合でも、全長プラスミドと同様にトランスフェクションされることが明らかになった。

【0205】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

30

【産業上の利用可能性】

【0206】

本発明により、予想外に簡便で、生体適合性（例えば、細胞親和性）および／または徐放性を提供する物質の固相支持体への固定方法が提供された。このような効果を利用することにより、種々の生体现象、例えば、遺伝子導入、シグナル伝達、薬効などを固相支持体を用いて発揮させることができる。細胞は、医療技術、医薬開発などにおいて重要なツ

40

【図面の簡単な説明】

【0207】

【図1】図1は、実施例4における代表的な結果例である。図1は、複合体化していないDNA（上）と、正に荷電した物質と複合体化させたDNA（下、NP10処理）とを対比した結果を示す。固相に対して複合体を添加した直後（0分）ならびに、添加の1分後、5分後および10分後に細胞含有液を加えた後のトランスフェクションの様子を示す。

【図2】図2は、実施例4のヒト間葉系幹細胞でのプリント（重ね打ち）の場合の結果例を示す。固相基板上にpEGFP-N1ベクターをプリントし、乾燥後、LipofectAMINE2000を同

50

一座標にプリントし乾燥させた。その後、フィブロネクチン溶液を同一座標に重ねてプリントし乾燥させた。これに、間葉系幹細胞を播種し、2日間培養を行った後に、蛍光イメージスキャナにて画像を取得した。

【図3】図3には、実施例5におけるHeLa-K細胞にトランスフェクトした後3日目の遺伝子発現の様子を示す。固相基板上にpEGFP-N1とpDsRed2-1, pEGFP-N1とpPUR6iGFP272ベクターをそれぞれプリントし、乾燥後、LipofectAMINE2000を同一座標にプリントし乾燥させた。その後、フィブロネクチン溶液を同一座標に重ねてプリントし乾燥させた。これに、HeLa-K細胞を播種し、3日間培養を行った後に、蛍光イメージスキャナにて画像を取得した。

【図4】図4には、実施例5におけるHeLa-K細胞にトランスフェクトした後6日目の遺伝子発現の様子を示す。固相基板上にpEGFP-N1とpDsRed2-1, pEGFP-N1とpPUR6iGFP272ベクターをそれぞれプリントし、乾燥後、LipofectAMINE2000を同一座標にプリントし乾燥させた。その後、フィブロネクチン溶液を同一座標に重ねてプリントし乾燥させた。これに、HeLa-K細胞を播種し、6日間培養を行った後に、蛍光イメージスキャナにて画像を取得した。

【図5】図5は、固相系トランスフェクションアレイ（SPTA）作製方法を模式的に示した図である。この図は、固相トランスフェクションの方法論を示す。

【図6】図6は、固相トランスフェクションの結果を示す。HEK293細胞株を用いてSPTAを作製した結果を示す。緑色の部分は、トランスフェクションされた付着細胞を示す。

【図7A】図7Aおよび図7Bは、液相トランスフェクションとSPTAの比較を示す結果である。図7Aは、実験に用いた5つの細胞株について、GFP強度/mm²を測定した結果を示す。図7Aは、トランスフェクション効率を、単位面積あたりの総蛍光強度として決定する方法を示す。

【図7B】図7Aおよび図7Bは、液相トランスフェクションとSPTAの比較を示す結果である。図7Bは、図7Aの示すデータに対応する、EGFPを発現する細胞の蛍光画像である。図7Bにおいて、白丸で示された領域は、プラスミドDNAを固定化した領域を示す。プラスミドDNAを固定化した領域以外の領域では、細胞が固相に固定化されたにもかかわらず、EGFPを発現する細胞は観察されなかった。白棒は、500μmを示す。

【図7C】図7Cおよび7Dは、固相トランスフェクション法の代表的プロトコール例を示す。

【図7D】図7CおよびDは、固相トランスフェクション法の代表的プロトコール例を示す。

【図8】図8は、チップのコーティングによって相互夾雑が低減された結果を示す。図8は、HEK293細胞、HeLa細胞、NIT3T3細胞（「3T3」として示す）、HepG2細胞、およびhMSCを用いて、液相トランスフェクション法およびSPTAを行った結果を示す。トランスフェクション効率を、GFP強度で示す。

【図9】図9は、実施例7におけるRNAiトランスフェクションアレイのトランスフェクション結果を示す。固相基板上に表3に示す各レポーター遺伝子を一遺伝子あたり4スポットになるようプリントし、乾燥後、各転写因子に対してのsiRNA（28種類）を対応したレポーター遺伝子がプリントされている座標上にプリントし、乾燥させた。また、コントロールとして、EGFPに対するsiRNAを用い、ネガティブコントロールとしては、scrambleRNAをもちいた。その後、LipofectAMINE2000を各遺伝子プリント同一座標にプリントし乾燥させた。その後、フィブロネクチン溶液を同一座標に重ねてプリントし乾燥させた。これに、HeLa-K細胞を播種し、2日間培養を行った後に、蛍光イメージスキャナにて画像を取得した。

【図10】図10は、実施例7におけるRNAiトランスフェクションアレイのトランスフェクション結果を細胞ごとに示す。各レポーターの蛍光輝度を画像解析によって定量化した後に、ネガティブコントロールであるスクランブルRNAをプリントした各レポーター

10

20

30

40

50

の輝度に対する比率を算出した。これを、各レポーター・各細胞に対してすべて行った結果を示している。

【図 1 1】図 1 1 は、実施例 8 における RNA i トランスフェクションアレイのトランスフェクション結果を示す。固相基板上に表 3 に示す各レポーター遺伝子発現ユニット PCR 断片を一遺伝子あたり 4 スポットになるようプリントし、乾燥後、各転写因子に対しての siRNA (28 種類) を対応したレポーター遺伝子がプリントされている座標上にプリントし、乾燥させた。また、コントロールとして、EGFP に対する siRNA を用い、ネガティブコントロールとしては、スクランブル RNA をもちいた。その後、LipofectAMINE2000 を各遺伝子プリント同一座標にプリントし乾燥させた。その後、フィブロネクチン溶液を同一座標に重ねてプリントし乾燥させた。これに、各細胞を播種し、2 日間培養を行った後に、蛍光イメージスキャナにて画像を取得した。

10

【図 1 2】図 1 2 は、実施例 8 における RNA i トランスフェクションアレイのトランスフェクション結果を細胞ごとに示す。各レポーターの蛍光輝度を画像解析によって定量化した後に、ネガティブコントロールであるスクランブル RNA をプリントした各レポーターの輝度に対する比率を算出した。これを、各レポーター・各細胞に対してすべて行った結果を示している。

【図 1 3】図 1 3 は、実施例 8 において得た PCR 断片の構造を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、pEGFP-N1 の構造を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、環状 DNA と PCR 断片とを用いたトランスフェクションマイクロアレイのトランスフェクト効率の比較を示す。

20

【配列表フリーテキスト】

【0208】

(配列表の説明)

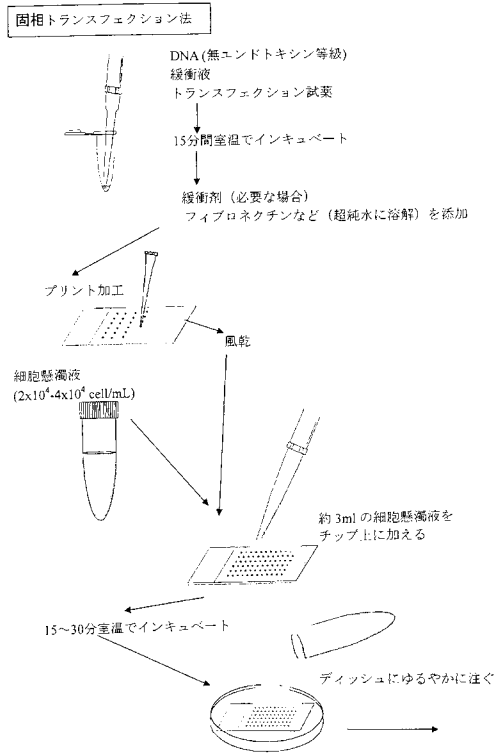
配列番号 1 : pUR6 iGFP272 インサートの配列

配列番号 2 : 実施例 8 で用いたプライマー 1

配列番号 3 : 実施例 8 で用いたプライマー 2

配列番号 4 : 実施例 8 の PCR 反応できた PCR 断片

【図 7 C】



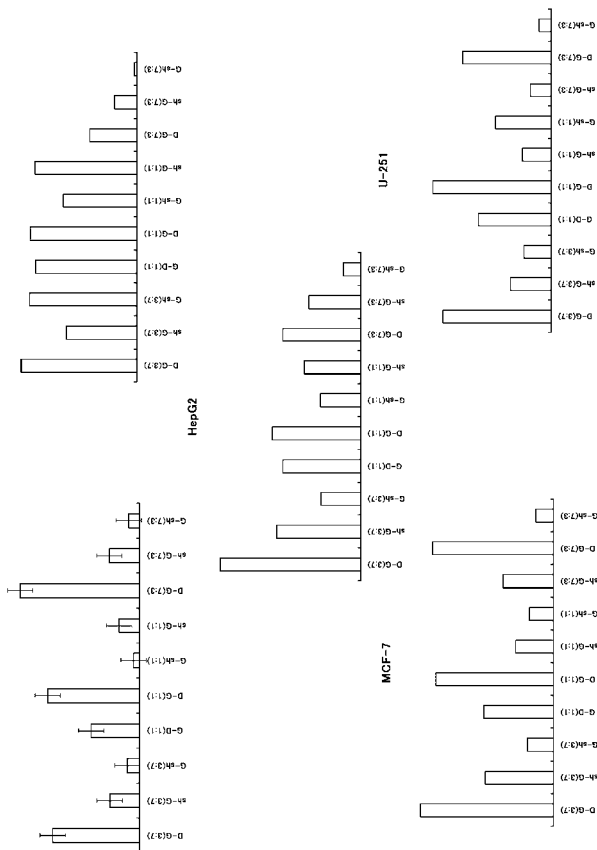
【図 7 D】

HEK293		HEK293 用スチーム	
DMEM (無血清)	9.5 μ L	1.5mL マイクロチューブ	↓DMEM
プラスミド DNA (1mg/mL)	1.5 μ L	↓プラスミド DNA	
TransFast (1mg/mL)	9.0 μ L	混合	2-3 日, 37°C, 5%CO ₂ で インキュベート
DMEM (serum free)	5.0 μ L	↓TransFast	
フィブロネクチン (4mg/mL)	5.0 μ L	完全に混合し 15 分室温で インキュベート	
最終容量	30.0 μ L	↓DMEM	
		↓フィブロネクチン	
		完全に混合	
		↓	
		プリント準備完了	

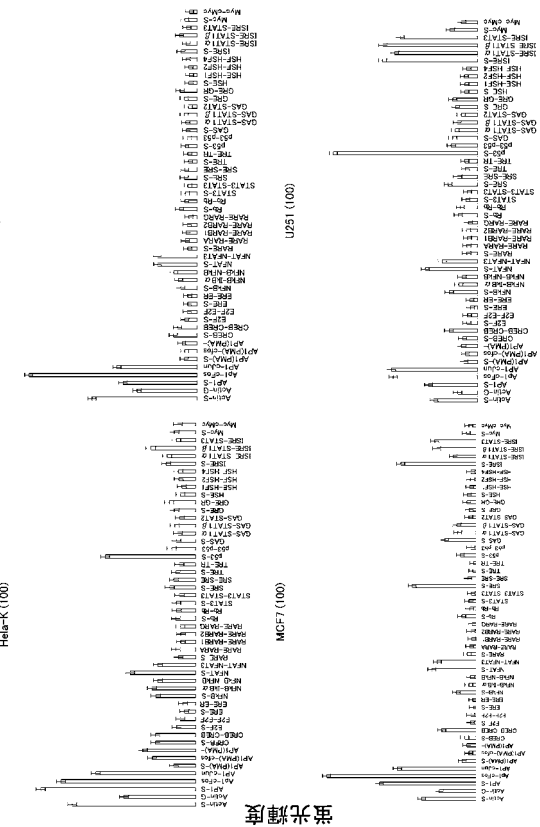
HeLa, NIH3T3-3, HepG2		HeLa, NIH3T3-3, および HepG2 用スチーム	
DMEM (無血清)	14.5 μ L	1.5mL マイクロチューブ	↓DMEM
プラスミド DNA (1mg/mL)	1.5 μ L	↓プラスミド DNA	
Lipofectamine2000	4.5 μ L	混合	
DMEM (serum free)	5.0 μ L	↓Lipofectamine2000	
フィブロネクチン (4mg/mL)	5.0 μ L	完全に混合し 15 分室温で インキュベート	
最終容量	30.0 μ L	↓DMEM	
		↓フィブロネクチン	
		完全に混合	
		↓	
		プリント準備完了	

hMSCs		hMSCs 用スチーム	
	N/P=5 N/P=10 N/P=20	1.5mL マイクロチューブ	↓DMEM
DMEM (無血清)	12.75 12.0 10.5 μ L	↓プラスミド DNA	
プラスミド DNA (1mg/mL)	1.5 1.5 1.5 μ L	混合	
JetPEI (x4) conc.	0.75 1.5 3.0 μ L	↓JetPEI	
フィブロネクチン (4mg/mL)	5.0 5.0 5.0 μ L	完全に混合し 15 分室温で インキュベート	
最終容量	20.0 20.0 20.0 μ L	↓フィブロネクチン	
		完全に混合	
		↓	
		プリント準備完了	

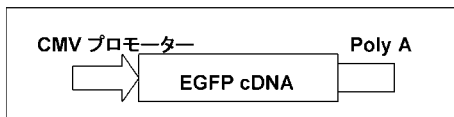
【図 10】



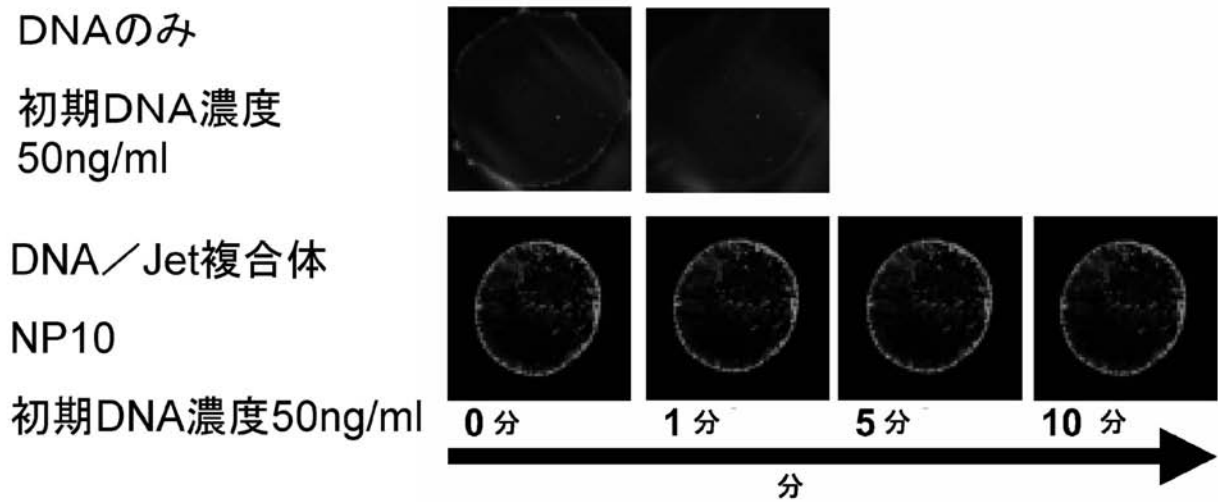
【図 12】



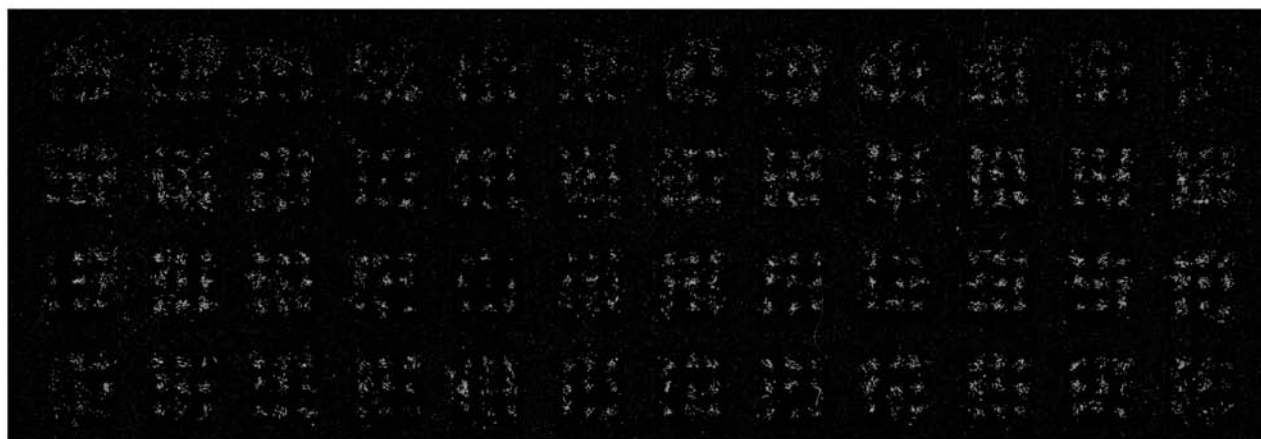
【図 1 3】



【図 1】



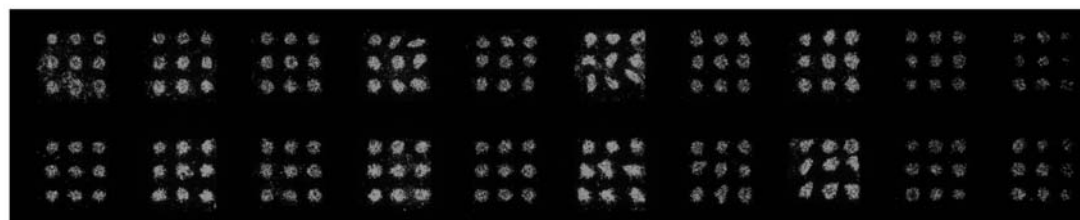
【図 2】



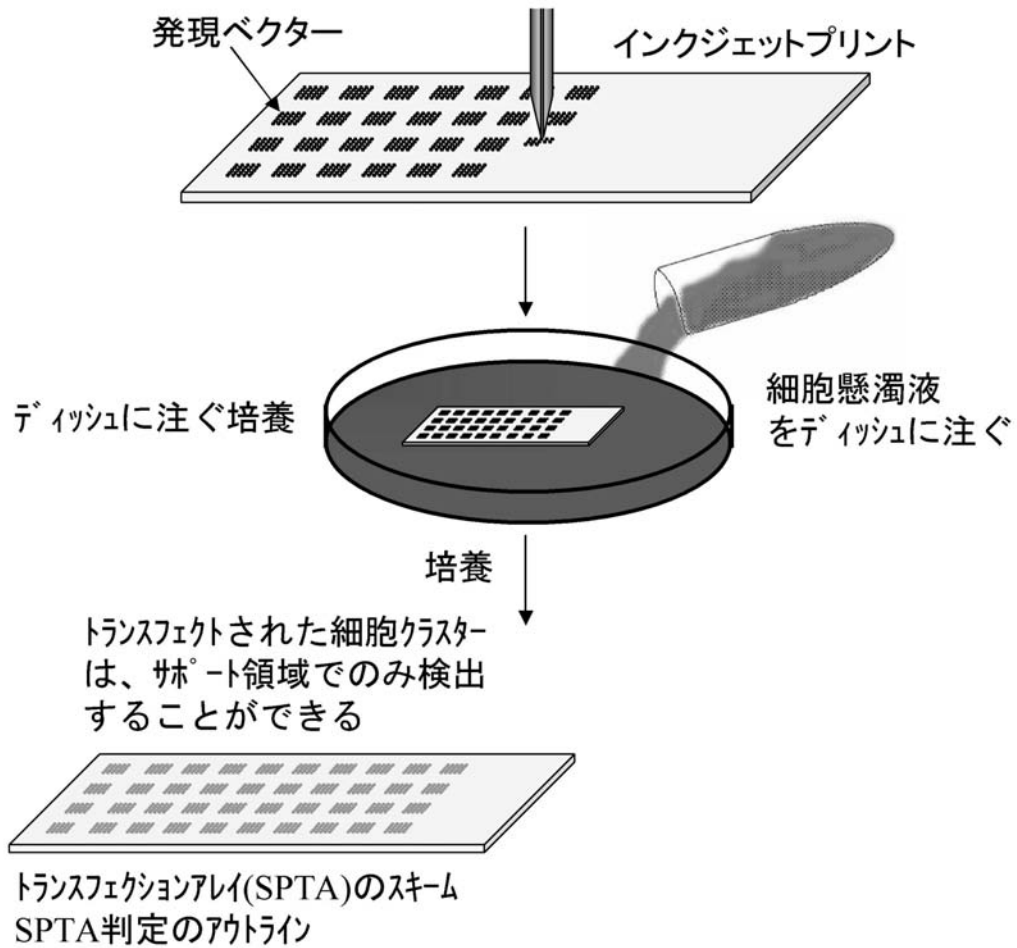
【図 3】



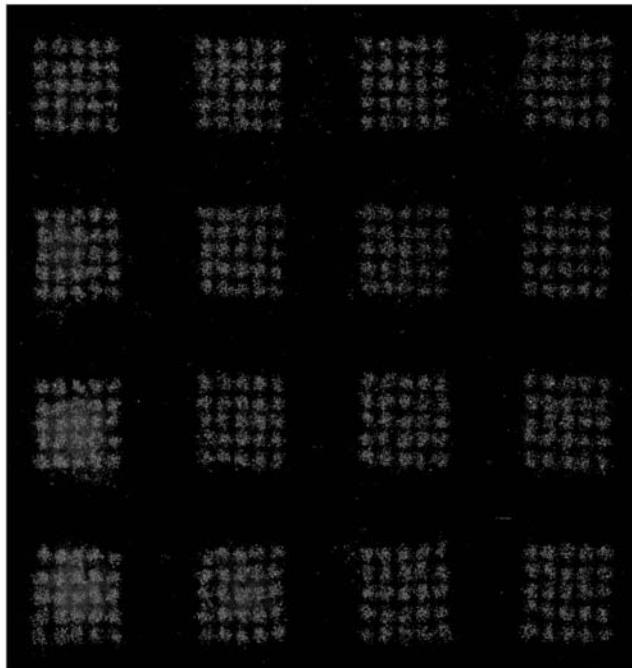
【図 4】



【図 5】



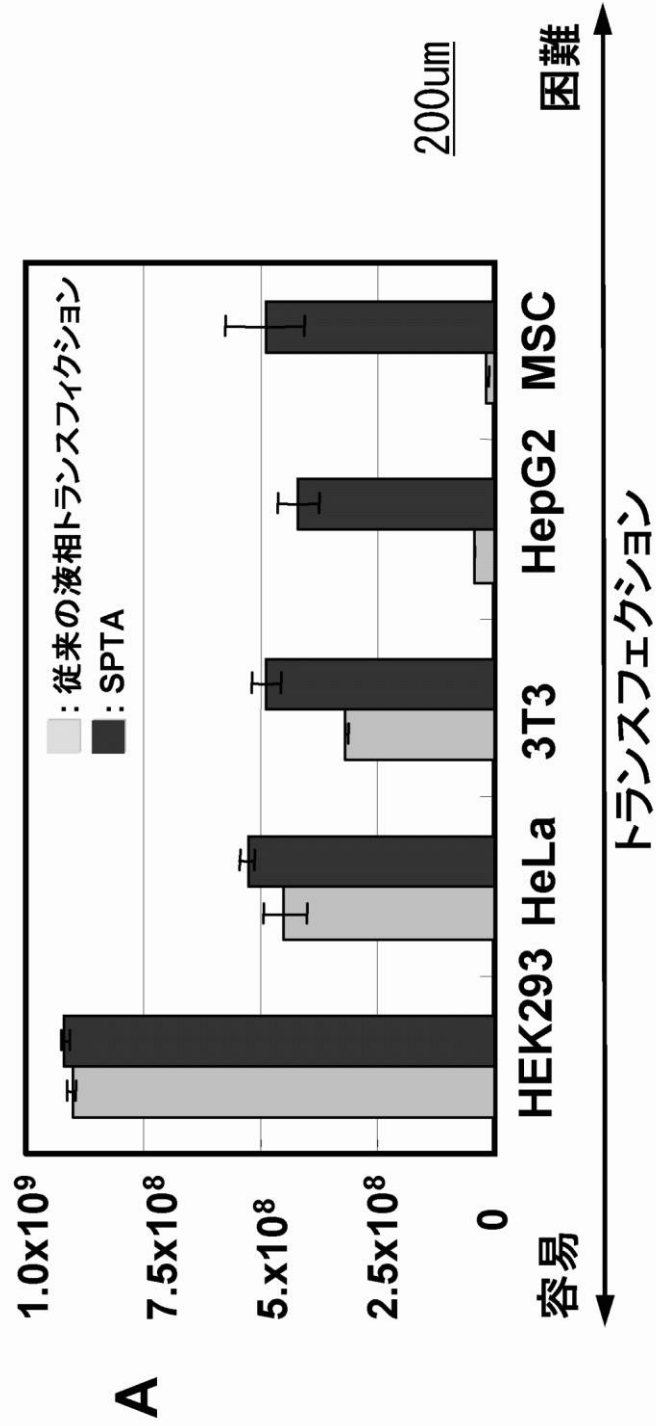
【図 6】



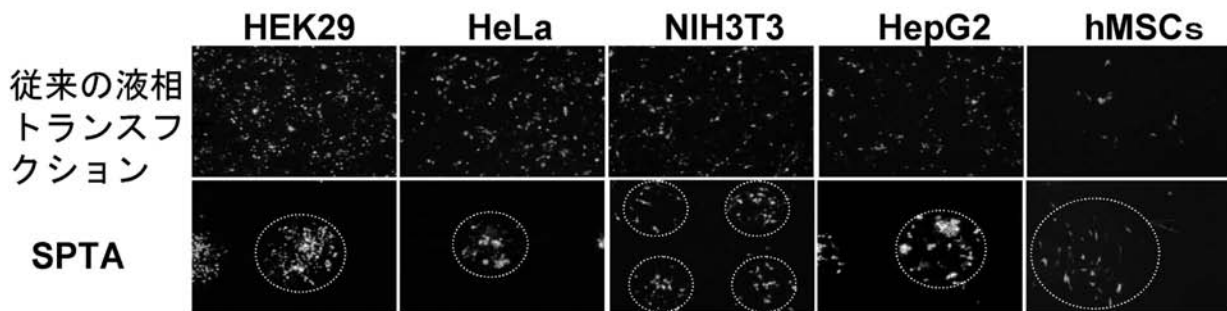
SPTA細胞株またはHEK293細胞株の結果。

バーは3mm

【図 7 A】

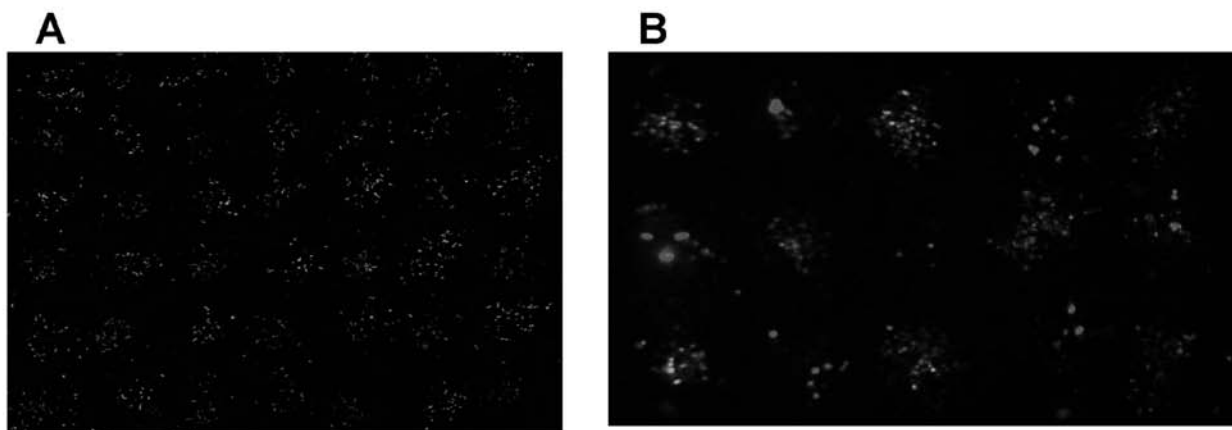


【図 7 B】



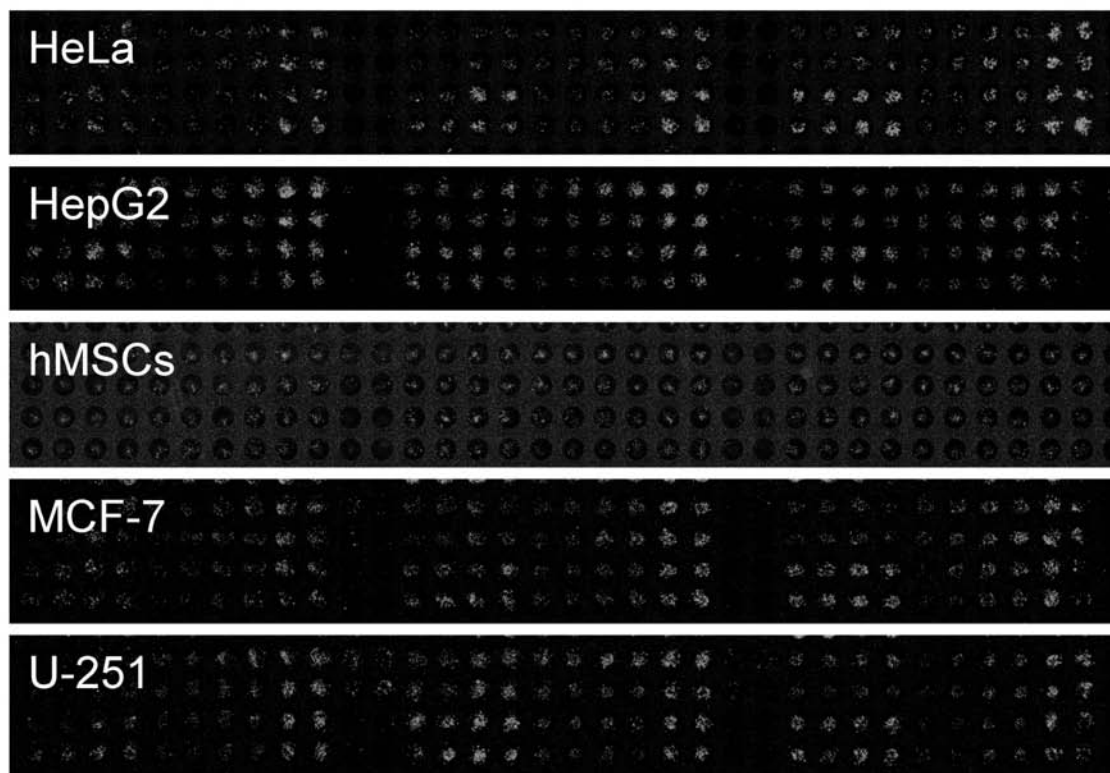
従来の液相トランスフェクションとSPTAとの間の比較。A)測定された蛍光/mm²5種の細胞株についてのA)に対応する。B)EGFP発現細胞の蛍光写真。白色の円状のものは、プラスミドDNAプリント領域にあたる。この領域の外の領域の細胞はEGFPを発現しているが、プリント領域以外の領域にも細胞は付着

【図 8】



相互夾雑についての研究：pEGFP-N1およびpDsRed2-N1を、市松模様プリントし、そしてhMSC（パネルA）またはHEK293（パネルB）を培養した。

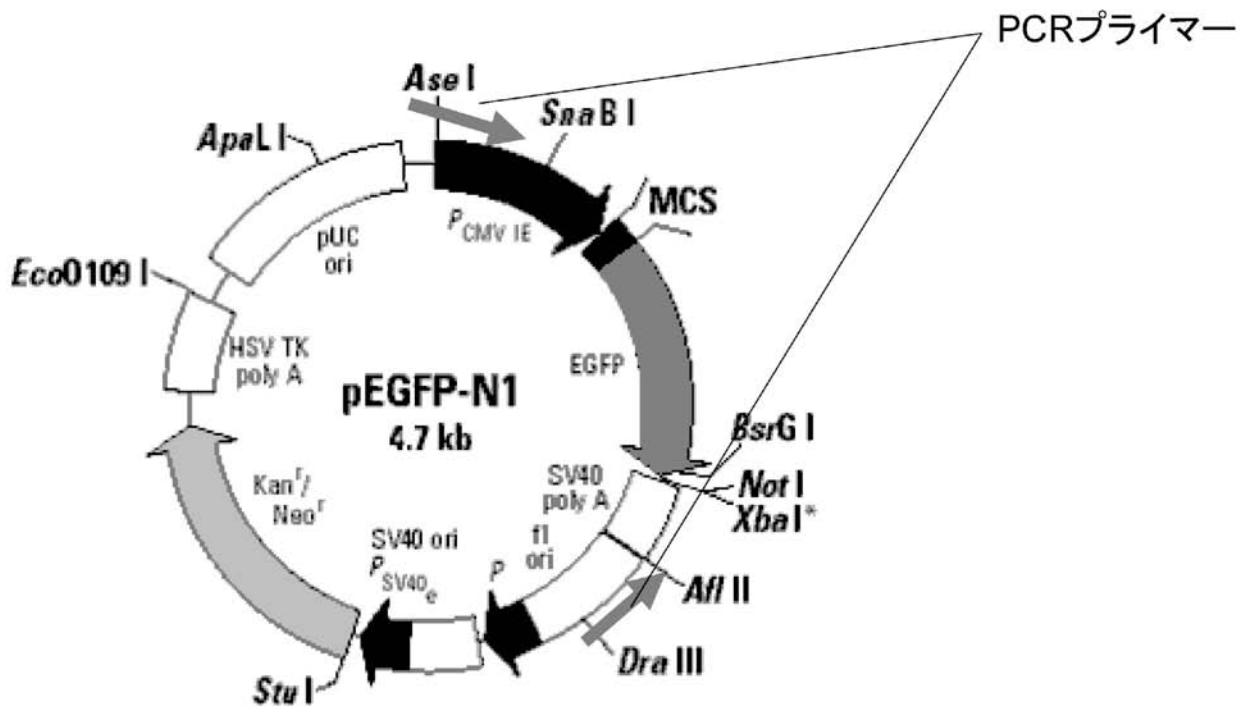
【図 9】



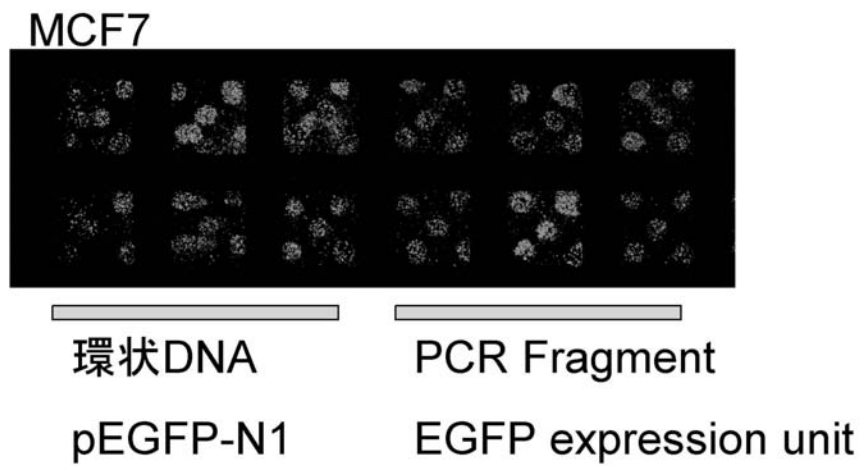
【図 11】



【図 1 4】



【図 1 5】



【配列表】

2007082402000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 吉川 智啓
兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術総合研究所 関西センター尼崎事業所内

(72)発明者 内村 英一郎
兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術総合研究所 関西センター尼崎事業所内

(72)発明者 三宅 淳
兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人産業技術総合研究所 関西センター尼崎事業所内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA01 CA11 CA20 DA02 EA04 GA11 GA30 HA08
HA20