

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02009

研究課題名(和文)細胞融合現象を用いた1細胞手術によるエピジェネティック機能の制御に関する研究

研究課題名(英文)Cell-fusion-based single-cell surgery and its application to epigenetic studies

研究代表者

鷲津 正夫(WASHIZU, Masao)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：10201162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、微細加工技術により作製した流体回路を利用して、オリフィス両側に誘電泳動により細胞を誘導・固定した後、電気パルスを与えることにより、それら2つの細胞間で高い収率(>80%)で1:1の細胞融合を行い、融合した細胞の間で、遺伝子・細胞質中の因子・細胞膜チャネル等を移植するという独創技術を開発した。この技術を用いて、体細胞とES細胞との融合を行い、体細胞が初期化するまでの1細胞レベルでの経時追跡観察を行った。この結果に基づき、より入手性に優れるiPS細胞と体細胞の融合・分離を繰り返すことにより、体細胞の細胞質をiPS細胞の細胞質で置き換え、体細胞の初期化をはかる手法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロデバイス内での細胞融合を用いて、1細胞レベルでの細胞質や細胞膜チャネルなどの交換を行う、細胞手術の手法の開発に成功した。この技術は、ガン細胞との融合により感作した免疫細胞を用いる免疫治療や、幹細胞の持つ初期化因子を用いて体細胞を初期化する技術の基礎的メカニズムを解明するとともに、それらの実用化への道を開くものと期待される。特に、本課題により行った、体細胞とES細胞との融合による初期化の1細胞レベルでの経時追跡観察や、体細胞とiPS細胞の細胞質の交換により細胞の初期化を行う技術の開発は、電界集中を利用した高収率の細胞融合の手法によって世界で初めて達成されたものである。

研究成果の概要(英文)：A novel method of cell fusion is developed that allows the 1:1 fusion among two types of cells with 80-90% yield. The method uses a micro-fluidic device with an array of orifice between two flow channels, and when the voltage is applied between the channels, filed constrictions are created at the orifice, by which the cells are attracted to the orifice to form cell pair. The method enables the mixing of gene / cytoplasmic factors / membrane channels between the fused cells. Using the method, a real-time observation is made on the initialization of a somatic cell fused with an ES cell. Based on the result, a microdevice is developed for the initialization utilizing iPS cell, having more availability compared with ES, where the cytoplasm of the somatic cell is replaced with that of the iPS cell through repeated fusion and separation.

研究分野：バイオナノテクノロジー

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 再生医療 静電気工学 細胞融合 バイオナノテクノロジー

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、微細加工技術により作られた細胞の直径より小さいオリフィスを用い、その両側に設けた電極に電圧を印加することによりオリフィス近傍に電界集中を作り、オリフィスをはさんで置かれた一対の細胞の接触点付近にのみ膜電圧を発生させることにより、細胞の融合を行う（図1-1）という新しい技術を開発した。

### 2. 研究の目的

本研究では、この技術の応用として、腫瘍細胞と樹状細胞を一旦融合し、その後、再分離することにより、腫瘍細胞の遺伝子自体は腫瘍細胞の中に閉じ込めたまま、腫瘍細胞の持つ細胞内/細胞表面抗原を樹状細胞へと移植し、樹状細胞の抗原提示能を利用して、免疫療法の細胞ワクチンとして用いる、という新たな細胞機能修飾法の開発を目的とする。

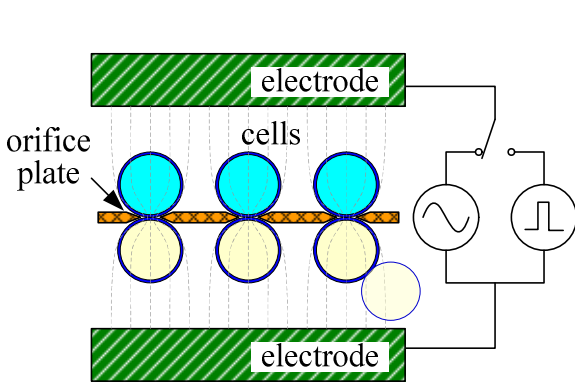


図1-1 電界集中型細胞融合

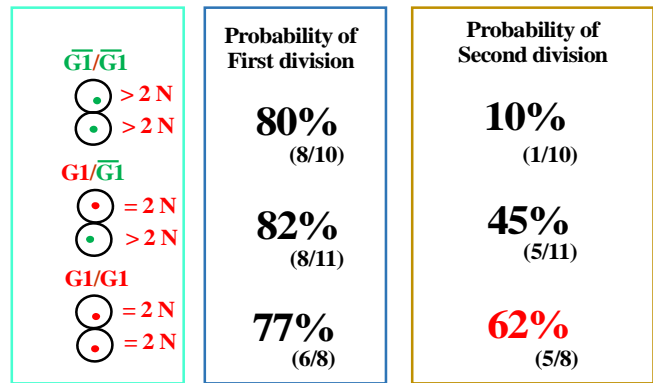


図2-1 融合後1回目と2回目の分裂を起こす率

### 3. 研究の方法

電界集中型細胞融合においては、細胞接触点にかかる膜電圧が細胞の大きさに依存しないため、非常に高い収率（たとえば90%）が得られ、また、膜電圧が一対の細胞の接触点のみに発生するため、必ず1:1の融合産物が得られる。この特長を生かし、リアルタイムの融合およびその後の細胞内イベントの実時間観察を行う。さらに、細胞核よりも小さいオリフィスを用いて融合操作を行い、融合後にオリフィスの片側を陰圧にして吸引すると、核はオリフィスを通過できないため、核内の遺伝子の移動を伴わずに、細胞質中の因子や細胞膜チャネル等を移植することが可能になることを示す。

### 4. 研究成果

#### (1) 融合前の細胞周期と融合後の分裂・生存性：

細胞融合を行う時に、融合されるべき2個の細胞がどの細胞周期にあるかということは、融合の正否、特に融合後の生存率に大きな影響を与える物と考えられる。異なる細胞周期にある細胞を融合した後の細胞の同期化などに関しては、Rao & Johnsonの1970年代の先駆的研究があるが、融合細胞を何世代かに渡って経時的に観察した例はほとんど無い。その理由の1つには、特定のタイミングで高収率に融合を行う手段がなかったことがあると考えられる。そこで、本研究では、これらの手段を提供する電界集中型の電気融合法を、周期に依存して異なる蛍光を発するFucci HeLa細胞（理研宮脇敦史先生のご厚意による）と組み合わせて用い、融合後約4日間の観察を行うことにより、融合前の細胞周期と融合後の分裂・生存性について研究を行った。

Fucci HeLa細胞は、G1期には赤色、S/G2/M期には緑色の蛍光を発するように遺伝子操作された細胞である。この細胞を、オリフィス両側にランダムに導入すると、G1とS/G2/M、S/G2/M同士、G1同士のペアができる。これらに電気パルスを印加して融合した後、約100時間にわたりタイムラプス観察すると、融合細胞は

オリフィスを抜け出し、あるものは途中で死ぬが、一方、何回か分裂を繰り返すものもある。Fucci HeLa細胞自体の周期は24時間程度であるが、実際、この図の例でも、他例でも、最初の1回目の分裂は10～20時間程度で生じる。通常のポリエチレングリコール(PEG)を用いた融合などでは、融合してから分裂するまで長い時間がかかり、PEGの毒性のためとされているが、今回の結果は、電界集中型の電気融合が細胞に低侵襲であることを示唆しているものと思われる。

図2-1は、タイムラプスの結果から、融合後1回目と2回目の分裂を起こす率を、上記①～④の組み合わせに対し求めたものである(図中、S/G2/Mは、Not G1という意味で $\overline{G1}$ と表記してある)。この結果は、1回目の分裂は、いずれの組み合わせでも生ずるものの、2回目の分裂はG1同士の融合のものが有意に高い率で生ずる、ということを示している。S/G2/M期の細胞は、すでに合成を始めていて余分な(2倍体以上の)DNAを持っているので、分裂のための分子サイクルが1回は回ったとしても、その次の分裂の際のチェックポイントを通過できないためと思われる。

この結果を利用して、あらかじめ細胞周期を同調することにより、モノクローナル抗体取得に用いられるミエローマとB細胞との融合の収率を上げる試みを行った。まず、ミエローマ細胞にのみ血清スタベーションをかけてG1期に同調した。その結果、ハイブリドーマの1回目の分裂率が、同調を行っていない場合に比し、34%から45%に、2回目以降の分裂率が7%から14%に上がるという結果が得られた。

これらの結果に基づき、a)ミエローマのみG1期に同調培養を行った場合、b)両者をG1期に同調培養を行った場合、の両方について、分裂後のタイムラプス観察を行ったところ、1)融合後の1回目の分裂はa)b)いずれでも80%程度の確率で生ずる、2)1回目の分裂を行った細胞のうち、2回目の分裂に至るものは、a)の場合は14%程度であるのに対し、b)であれば54%となる、すなわち、融合する両方の細胞をG1期に同調培養することが、融合後の生存率を高めるのに有効であることがわかった。必ず1:1で融合するような条件で、その各々について経時追跡観察を行ってこのような知見を得たのは、おそらく本研究が初めてであると思われる。

## (2) ES細胞との融合を用いた体細胞の初期化の経時観察：

ES細胞と体細胞を融合すると体細胞が初期化されるという京都大学の多田らの発見が、ES細胞の中で発現している数種類の遺伝子を注入することにより体細胞を初期化するiPS細胞の発明へとつながったことはよく知られているが、ES細胞との融合により体細胞が初期化される過程は解明されていない。この過程の経時的探求のためには、高収率で、融合のタイミングが制御でき、かつ細胞に低侵襲である融合法が求められるが、これには我々の電界集中型細胞融合法が最適である。そこで、本研究においては、ES細胞と体細胞の融合後の経時観察を行ったところ、実際に初期化マーカー遺伝子の発現を観察したので以下に述べる。

この研究においては、初期化されると緑色の蛍光を発するOct4-GFP蛍光レポーターを挿入したMEF細胞と、マウスES細胞(両者とも東京大学山崎聡先生の好意による)である。これらを、図1-1のように、オリフィスをはさんで設けられた上下2つのチャンネルにそれぞれ供給し、誘電泳動を用いてオリフィスに細胞を導き、融合を行う。ここで、融合自体は高い収率で容易に行えるのに対し、融合後の細胞がチャンネル壁面へと接着・進展・移動し、タイムラプス観察の視野外に出て行ってしまふことが問題となった。そこで、オリフィス周囲以外のチャンネル壁面へは細胞が接着できないよう、接着阻害コーティングを行う、エアロックパターンと名付けた手法を開発した。

図3-1の顕微鏡写真は、上側に赤色蛍光染色したES細胞、下側に緑色蛍光染色したMEF細胞があり、誘電泳動によりそれぞれ数個のパールチェーンを形成している。ここにパルスを印加すると、オリフィスをはさんで対向している2個の細胞間のみで融合が生ずる。そのため、図3-1(C)のように、真ん中の2個のみで細胞質の混合が生じ、赤と緑の混合色である黄色の蛍光を発するようになる。融合に関与しなかった細胞は、チャンネルに水流を作ることにより洗い流される。

このようにして得られた融合細胞の1つで、図3-4(a)-(f)に経時的に示すように、体細胞初期化による緑色蛍光が観察された(図3-1とは異なり、この実験では初期化を示す緑色蛍光と区別できるよう、融合前の細胞は、ES細胞のみ赤色蛍光染色してあり、MEF細胞は染色していない)。それを系図として描いた物が同図(g)である。融合後7時間で1回目の分裂が生じ(対応する写真は(b))、そのうちの1つが融合から25時間目付近からOct4レポータ(緑色蛍光)の発現を始めた(c)。その後、26時間目・57時間目に分裂をするとともに、Oct4レポータの緑色蛍光がいよいよ強まった。

このような初期化の経時観察例は世界レベルで他に例を見ない。

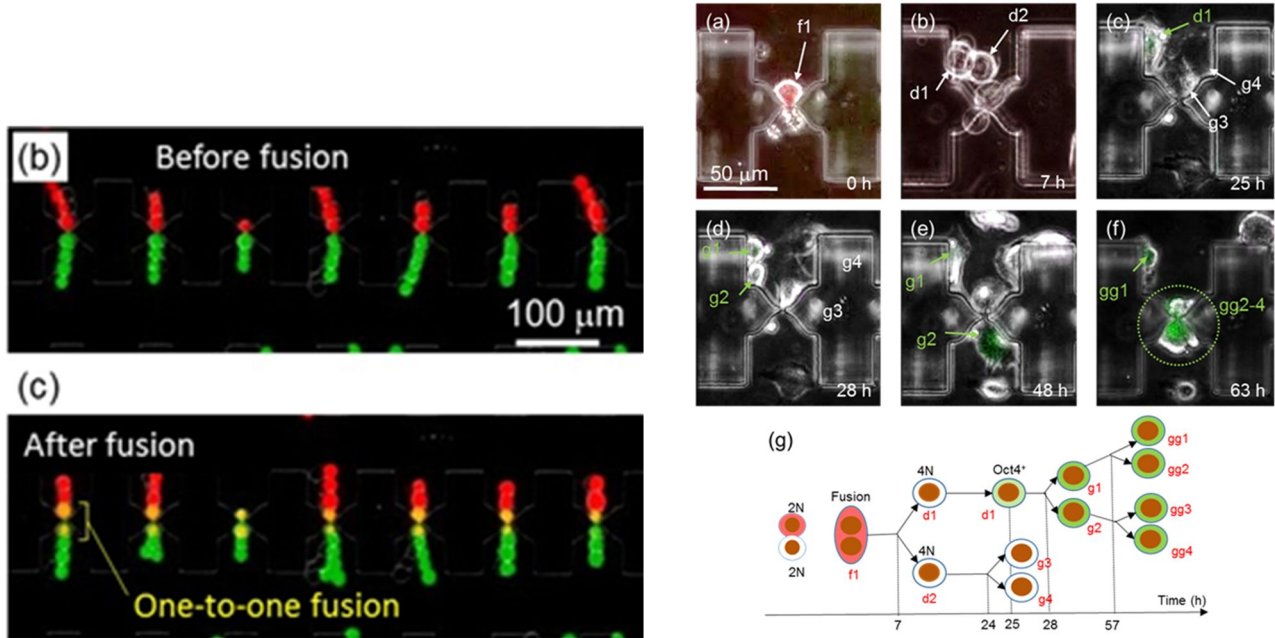


図3-1 1:1細胞融合の蛍光像

図3-2 体細胞初期化の経時観察結果

### (3) 細胞質移植技術の開発：

前章で述べたES細胞と体細胞の融合による体細胞の初期化においては、初期化はヘテロカリオンの分裂の後に生じたので、ES細胞と体細胞の間で遺伝子の混合が生じていると考えるべきであろう。しかしながら、このような細胞初期化の臨床応用には、初期化細胞に余分な遺伝子が混入していないことが要求される。この問題に対する解としては、細胞核より小さいオリフィスを用いて、体細胞とESあるいはiPS細胞を一時的に融合し、後者の細胞質が持つ初期化因子のみを体細胞に導入して細胞初期化を行い、分裂等に伴う遺伝子混合が生じる前に両者の細胞を再分離すれば、純粋に体細胞由来の遺伝子のみを持つ初期化細胞が得られるであろう。この場合、体細胞初期化に十分な量の初期化因子が供給できるかどうかが最大の問題となる。一方、腫瘍細胞と樹状細胞を一時的に融合して、腫瘍細胞の細胞内/細胞表面抗原を樹状細胞に移植し、その後再分離して得られる樹状細胞を細胞ワクチンとして用いる免疫療法のためには、a)腫瘍細胞を用いる、b)操作後の樹状細胞を体内に戻す、の2点より、腫瘍細胞の遺伝子が混入してはならないが、融合操作で移植すべき細胞質の量は微少でよいものと考えられる。

図4-1は細胞融合・再分離に用いたデバイスの模式図である。上下に設けられた一対の電極の間に細胞核の直径より小さい直径(約3μm)を持つマイクロオリフィスのある絶縁体壁がある。壁下側には細胞質ドナーとなる腫瘍細胞(ここではJurkat細胞)、壁上側にはレシピエントとなる樹状細胞を、それぞれ細胞融合用低塩濃度バッファに懸濁して導入した後、電極に交流電圧を印加すると、電気力線はオリフィスに集中するので、近傍の細胞は誘電泳動によりオリフィスに引き寄せられ、トラップされる。さらにパルス電圧を印加す



ると、細胞の接触点で膜破壊が起き、その後修復される過程で細胞膜が結合、ドナーの細胞質がレシピエント細胞に移植される。その後、流路に流れを起こして、流体のシアとオリフィス上下の圧力差のいずれかあるいは両方を用いて融合体から樹状細胞を切り離す。必要となるのはこの樹状細胞であるので、これを回収するためのポケット構造がオリフィス上側に設けられている。

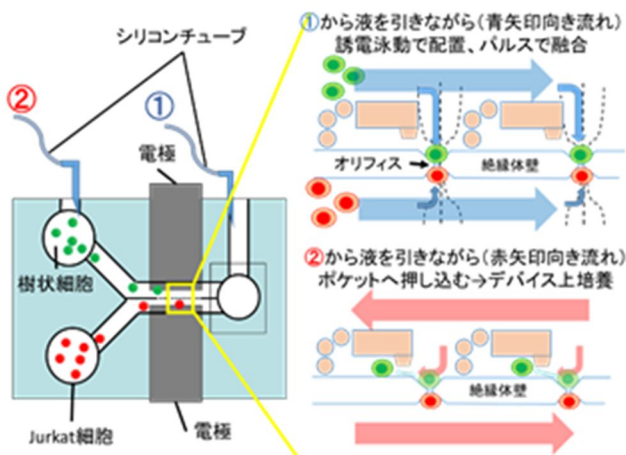


図4-1 細胞質移植とレシピエント細胞の培養

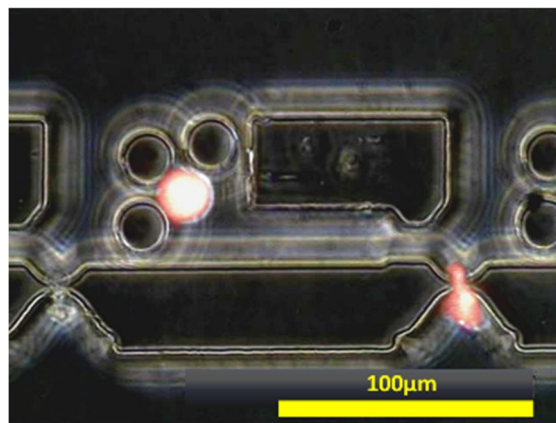


図4-2 融合後のレシピエント細胞の分離

融合したばかりの細胞は、オリフィスを挟んで上下に各々の核を持つ雪だるま状の形状となるが、図4-1に示すような流れを作り、細くなっている融合点（雪だるまの首の部分）から切断し、レシピエントの樹状細胞をポケット部へと取り込んだのが図4-2である。この写真で、細胞はカルセインROで蛍光染色されている。図中左に赤く見えるのがレシピエント（光っていない丸い構造はポケットを形成するピラー構造、図4-1参照）であり、図中オリフィス下側には、ドナーの核が残っているのが観察される。

この後、酸素・栄養が不足とならないよう培地をゆるやかに流しながら培養したところ、培養開始後16時間でレシピエントの樹状細胞は分裂し、その後も分裂を繰り返しながらポケット内で生存した。

細胞の初期化に関しては、入手が容易なiPS細胞を用い、その細胞質を体細胞に移植する技術を(株)日立製作所との共同研究により開発を行った。すなわち、細胞核より小さいオリフィスをはさんで、1) 体細胞とiPS細胞を融合する、2) iPS細胞側から吸引して体細胞の細胞質をiPS細胞に吸い取る、3) 液の流れを用いて「体細胞の細胞質を取り入れたiPS細胞」を取り去る、4) 残されたほとんど核のみとなった体細胞にiPS細胞を融合する、5) 体細胞側から吸引して、iPS細胞の核をオリフィスに残したまま、iPS細胞の細胞質を体細胞に移植する、という手法であり、結果として、（初期化因子を含んでいるであろう）iPS細胞の細胞質の中に細胞質の核を持つ細胞が得られる。ここでiPS細胞は、体細胞の細胞質を吸い取るための犠牲細胞として用いられており、その細胞質も核も融合産物には含まれていない。現在、このようにして得た細胞質交換細胞につき、融合後の生存性や初期化の可能性の解析を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計4件）

Masahiro Okanojo, Kennedy O. Okeyo, Hiroko Hanzawa, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Shizu Takeda, and Masao Washizu: "Nuclear transplantation between allogeneic cells through topological reconnection of plasma membrane in a microfluidic system", *Biomicrofluidics* 査読有 13, 034115 (12 pages) : <https://doi.org/10.1063/1.5098829> (2019)

T. Takahashi, K. O. Okeyo, J. Ueda, K. Yamagata, M. Washizu, H. Oana: "A microfluidic device for isolating intact chromosomes from single mammalian cells and probing their folding stability by controlling solution conditions",

Scientific Reports, 8, Article number: 13684 (10 pages) (2018) DOI 10.1038/s41598-018-31975-5

Kennedy Omondi Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera and Masao Washizu: "Minimization of cell-substrate interaction using suspended microstructured meshes initiates cell sheet formation by self-assembly organization", Biomed. Phys. Eng. Express vol. 2, no.6 (2016) 065019 (14 pages) doi:10.1088/2057-1976/2/6/065019

Shota Sakamoto, Kennedy Okeyo, Satoshi Yamazaki, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu: "Adhesion patterning by a novel air-lock technique enables localization and in-situ real-time imaging of reprogramming events in one-to-one electrofused hybrids", Bio microfluidics 査読有, vol.10, 054122 (13 pages) DOI: 10.1063/1.4965422 (2016)

〔学会発表〕（計 4件）

Masahiro Okanojo, Kennedy O. Okeyo, Hiroko Hanzawa, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Shizu Takeda, Masao Washizu: "Nuclear transplantation between allogeneic cells achieved by fusion-based topological reconnection of the plasma membrane in a microfluidic system", Micro-TAS 2018 査読有, 1425-1427, (Oct., 2018, Kaohsiung, Taiwan)

Kennedy Omondi Okeyo, Kai Yamada, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Masao Washizu: "reconstitution of an epithelial-endothelial bilayer by the micromesh culture technique employing an artificial matrigel basement membrane", Micro-TAS 2018 査読有, 1617-1619, (Oct., 2018, Kaohsiung, Taiwan)

Shota Sakamoto, Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana and Masao Washizu: "Live imaging of somatic nuclear reprogramming using an electrofusion microfluidic device with air-lock patterned adhesion areas for fusant localization", Micro-TAS 2016 査読有, p.371-372, (Oct., 2016, Dublin)

Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu and Hidehiro Oana, "Direct acquisition of genome-wide epigenetic information along intact chromatin fibers on individual chromosomes isolated from single mammalian cells", Micro-TAS 2016 査読有, p.182-183, (Oct., 2016, Dublin)

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：細胞製造装置

発明者：岡野定雅弘・武田志津・オケヨ ケネディ オモンディ・鷲津正夫

権利者：日立製作所・東京大学 種類：特許 PCT/JP2019/3580 出願年：2018 国内外の別：国際

取得状況（該当なし）

〔その他〕ホームページ等 [www.washizu.t.u-tokyo.ac.jp](http://www.washizu.t.u-tokyo.ac.jp)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：オケヨ ケネディ オモンディ

ローマ字氏名：（OKEYO, Kennedy Omondy）

所属研究機関名：京都大学

部局名：ウイルス・再生医科学研究所

職名：講師

研究者番号（8桁）：10634652

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。