

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08568

研究課題名(和文) ポリマー粒子3Dstroma細胞培養系を用いたVitro自然抗体産生系の確立

研究課題名(英文) Vitro production of natural antibodies using 3D-culture of stroma cells with polymer particles

研究代表者

江口 寛 (Eguchi, Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：20379267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ポリマー粒子を用いてマウス間質系細胞を3Dに構築し、マウス胎児肝細胞より分化させたB1前駆細胞を16週まで3D構造内に長期維持し、In vitroで分泌される自然抗体IgMを高感度サンドイッチELISA法にて解析しうるシステムを開発した。2Dに比べ3D培養の方が長期に安定して自然抗体IgMを産生していた。マウス間質系細胞にヒト培養細胞を共培養させると、産生される自然抗体IgMは低下した。この系においては、共培養させる細胞を幅広く選択することが可能であり、各種病態下での自然抗体IgMの役割の解析に有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然抗体は、感染の初期防御や輸血・移植のみならず自己免疫疾患、癌、動脈硬化症など幅広い疾患において生体内で重要な役割を担っている。本研究では、ポリマー粒子を用い各種間質系細胞を3Dに構築し、その構造内でB1細胞の前駆細胞を長期間維持培養し、Vitroで長期に自然抗体を産生させることに成功した。本法はVitroの系であるため共培養させる細胞に、癌細胞や異種細胞も含め各種病因に寄与する多くの種類の細胞を選択することが可能であり、幅広い病態下での自然抗体の役割の解析に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Natural IgM plays an important role in the beginning of infection, transfusion, and transplantation, as well as autoimmune diseases, cancers and atherosclerosis. However, because in vitro production of natural IgM has never been successful, analysis of the role of natural IgM was mainly limited in the setting of in vivo. We developed the novel system to establish long-term, up to 16 weeks, 3D-culture of B1 precursors derived from mouse fetal liver cells by use of 3D-culture of mouse stroma cells with polymer particles and to evaluate in vitro secreting natural IgM using high-sensitive sandwich ELISA. Coculture of mouse stromal cells and human cells decreased the production of natural IgM. With a variety of cells involving in pathogenesis of the diseases, as well as cancer cells and/or xenogeneic cells, this system will be useful to analyze the precise role of natural IgM in many diseases, still awaiting the new therapy.

研究分野：移植免疫学

キーワード：3Dストローマ培養 ポリマー粒子 自然抗体 B1細胞 サンドイッチELISA 異種細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然抗体は血中 IgM 抗体の 70%以上を構成し、種を越えて進化的に保存されている重要な免疫系の構成成分である。近年、感染防御の第一線としてウイルスなどの病原体の中和、補体の活性化、抗体依存性細胞性障害に寄与するだけでなく、アポトーシス細胞の除去に参与して局所の炎症反応を抑える作用、自己免疫反応を抑制する作用、正常 B 細胞の分化維持に作用することも明らかとなり、自己免疫疾患の発症抑制、癌の微小転移の抑制、動脈硬化症の抑制など各種病態に広く関与すると考えられるようになった。一方、自然抗体は Innate immunity の構成成分として個体の誕生時にはすでに備わっており、*vitro* で自然抗体を安定して産生させる系が確立されていないこともあり、その発生机序、担当細胞、病態下での機能の詳細な解明には障害が大きく、多くの不明な点が残されていた。

一方、本研究分担者である安田らは特殊な合成ポリマー粒子を開発し、間質系細胞を 3D に培養することにより、その中で造血系幹細胞を長期間安定して培養することに成功していた(安田昌弘他、特許登録番号 5725394、2015 年)。

2. 研究の目的

安田らの開発した合成ポリマー粒子を利用し、*vitro* で長期に安定して自然抗体を産生する系を確立する。次に、*vitro* で産生される IgM は生体内で産生される IgM と比べると極めて微量であるため、IgM の極微量測定方法を確立する。さらに、間質系細胞と共培養させる細胞の存在により、産生される IgM の影響を測定し、各種細胞との共存下での自然抗体産生機能の解明に有用であるか検討を行った。

3. 研究の方法

①マウスで自然抗体 IgM を産生する可能性がある B1 前駆細胞が 2D で誘導される系(マウス胎児肝細胞を 2D 培養された間質系細胞 TSt-4 下に共培養させる)を、合成ポリマー粒子を用いて 3D においても B1 前駆細胞への誘導が可能であるか検討した。B1 前駆細胞への誘導は、抗 IgM 抗体または抗 CD19 抗体でラベル後、confocal microscopy または多重焦点倒立蛍光顕微鏡を用いて確認した。

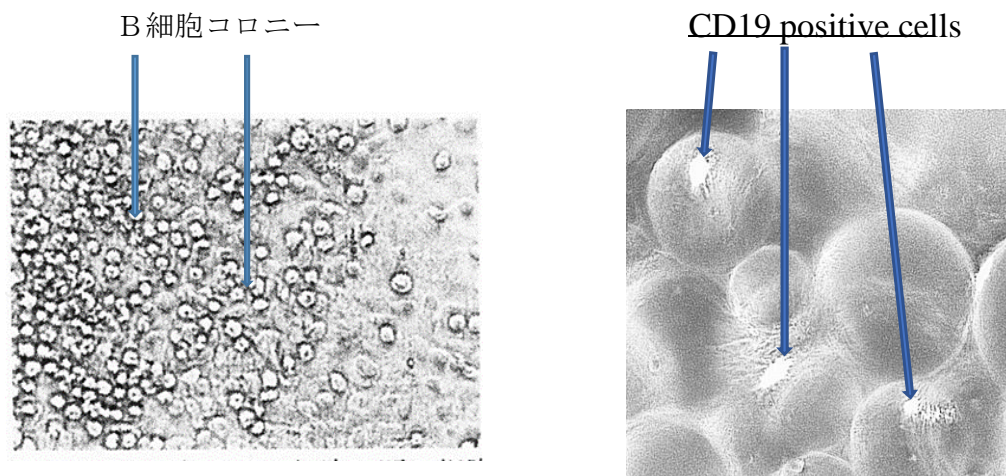
② 3D に構築された培養系が、どれぐらい長期に安定して維持できるか検討した。

③分泌される IgM を測定しうる微量測定法として、高感度 Western blot 法または高感度 Sandwich ELISA 法を開発した。

④間質系細胞に異種細胞を予め共培養させ、異種細胞共存下で B1 細胞を誘導し、産生される IgM を測定することにより、異種細胞共存下での自然抗体産生能を検討した。

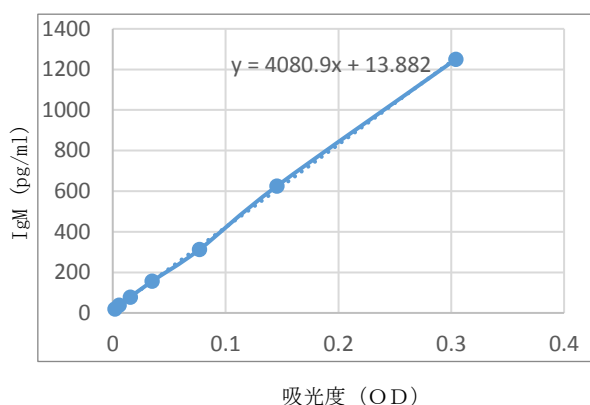
4. 研究成果

①左図に示すように、TSt-4 細胞を 2D で培養し、マウス胎児肝細胞と共培養させると B 細胞コロニーが TSt-4 細胞のシート上に出現した。一方、TSt-4 をポリマー粒子と共培養することにより 3D に構成し、そこにマウス胎児肝細胞を共培養させると、分化した B 1 前駆細胞は TSt-4 細胞の 3D 構築内に内包される形で存在していた。右図は、B 1 前駆細胞を抗 CD19 抗体でラベルし、多重焦点倒立蛍光顕微鏡にて検出したものである。



②通常の培養 Dish を用いて継続培養を行うと、1 週間程度で 3 D 構造の TSt-4 細胞でも底面への付着が始まり、3 週を越えると 3 D 構造が維持できなくなった。そこで低接着表面を有する Dish (EZ-BindShutSP, IWAKI) にて継続培養を試みたところ底面への接着は生じなくなり、TSt-4 の 3 D 構造は最長 16 週まで維持できた。

③Western Blot 法の感度を上げるため、Blocking 溶液、抗原抗体反応促進試薬、一次抗体の調整、検出器の調整等を行った。Blocking 溶液に IS-CD-500W (コスモバイオ)、抗原抗体反応試薬に IS-P-250 (コスモバイオ)、一次抗体に Polyclonal anti-mouse IgM Ab-HRP (Abcam)、検出器にケミイメジャー (LAS4000 mini) を組み合わせることにより、IgM の測定感度は数百 pg/ml まで上昇させることができた。しかし、今回の 3 D 培養の上清中の IgM の検出には不十分であった。そこで、次に Sandwich ELISA 法を用い、感度の増強を試みた。1 次抗体に Monoclonal anti-mouse IgM Ab (BioLegend)、Coating buffer と Assay buffer に BioLegend 社製を使用。バックグラウンドの軽減のため Washing の回数を増やし、サンプルとの incubation time を増強。2 次抗体に polyclonal anti-mouse IgM Ab-HRP (Abcam) を使用。発色液に High sensitivity TMB Substrate (BioLegend) を組み合わせ、発色時間の最大化を行った。結果として IgM の測定感度は数十 pg/ml まで上昇し、今回の 3 D 培養の上清中の IgM の検出に十分な感度を得ることができた (下図)。



上記の検量線を基に、9 週までの 2 D と 3 DB1 前駆細胞培養上清中の自然抗体 IgM を測定したところ、 91.1 ± 42.4 pg/ml と 122.9 ± 65.3 pg/ml にて、3 D 培養の方が有意に ($p < 0.05$) 安定して IgM を産生していることが明らかとなった。

④TSt-4 細胞に予め異種細胞であるヒト AA101 を混合し、同様にポリマー粒子を用いて 3 D 培養を試みたところ、混合状態を維持したまま TSt-4 細胞単独と同様に 3 D 構造を形成させることが可能であることがわかった。そこにマウス胎児肝細胞を共培養させると、TSt-4 細胞単独と同様に B1 前駆細胞に分化し、自然抗体 IgM を産生することがわかった。しかし、AA101 共存下で産生される IgM は TSt-4 単独より低下しており、自然抗体においても negative selection の機序は作用していると考えられた。

以上の結果から、*vitro* で安定して自然抗体 IgM を産生させる系の確立に成功し、この系においては共培養させる細胞が IgM の産生に影響を及ぼしうることが示された。癌細胞を含む各種上皮細胞、自己免疫疾患や動脈硬化症を惹起する担当細胞、また各種の同種異種細胞との共培養が可能であり、各種病態における自然抗体の役割の解明に大いに有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Valderhaug Vibeke Devold, Glomm Wilhelm Robert, Sandru Eugenia Mariana, Yasuda Masahiro, Sandvig Axel, Sandvig Ioanna	4. 巻 6
2. 論文標題 Formation of neural networks with structural and functional features consistent with small-world network topology on surface-grafted polymer particles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 191086 ~ 191086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.191086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Harada Tomonori, Tsuboi Isao, Utsunomiya Mizuki, Yasuda Masahiro, Aizawa Shin	4. 巻 130
2. 論文標題 Kinetics of leukemic cells in 3D culture with stromal cells and with arginine deprivation stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 650 ~ 658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.07.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ohta K, Iwane N, Ogino H, Yasuda M
2. 発表標題 Incorporation of amphiphilic polymer micelle into pores of porous particles and lipase immobilization against polymer micelle
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Utsunomiya M, Fukui S, Aizawa S, Yasuda M
2. 発表標題 Cell cultivation in the presence of grafted polymer particles containing magnetic nanoparticles
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇都宮瑞生、相澤信、荻野博康、安田昌弘
2. 発表標題 磁性ナノ粒子を含むグラフトポリマー粒子を用いた細胞の三次元培養
3. 学会等名 化学工学会姫路大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西崎稜平、安田昌弘
2. 発表標題 高分子量の両親媒性高分子粒子への細胞付着
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukui S, Aizawa S, Ogino H, Yasuda M
2. 発表標題 Development of high-density three-dimensional cell culture system using polymer particle having grafted polymer chain
3. 学会等名 10th Kyoto International Forum for Energy and Environment (KIFEE) Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田昌弘
2. 発表標題 乳化重合・懸濁重合の基礎、粒子径の制御～重合初期から末期までの反応動力学～
3. 学会等名 技術情報協会 講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 安田昌弘他21名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 658
3. 書名 ラジカル重合を中心としたポリマー・微粒子・コーティング材の合成、応用、トラブル対策	

1. 著者名 安田昌弘他71名	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 696
3. 書名 化学プロセスのスケールアップ、連続化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安田 昌弘 (Yasuda Masahiro) (40264808)	大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (24403)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮川 周士 (Miyagawa Syuji)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------