

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20551

研究課題名（和文）細胞質移植マイクロ流体デバイス開発による高収率・細胞機能改変手法の創製

研究課題名（英文）Creation of high yield cell function modification method through the development of cytoplasmic transplantation microfluidic devices

研究代表者

小穴 英廣（Hidehiro, Oana）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：20314172

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：異種細胞同士の1対1電気融合および融合体の再分離によって生じる細胞の機能変化を、細胞非侵襲的に1細胞レベルで経時追跡することが可能なマイクロ流体デバイスを開発した。そして、細胞質ドナー細胞としてJurkat細胞（がん細胞）、細胞質受容細胞として樹状細胞（PMDC05）を用いて細胞質移植実験を行い、引き続き、細胞質を移植した樹状細胞のタイムラプス観察を行った。本デバイスによる細胞質移植の収率は40%強程度であった。一方、細胞質移植後の樹状細胞は、移植後12時間以内に大半の細胞が死んでしまう結果となった。これについて、培養時の細胞密度の低さが生存に影響している事を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、ゲノム改変を伴わない（エピジェネティクス〔後天的ゲノム修飾〕の調整のみによる）細胞機能改変を高収率に達成する手法の創生を目指し、細胞質移植およびタイムラプス観察を1細胞レベルで実施可能なマイクロ流体デバイス開発に取り組んだ。成果としては、開発したデバイスの有用性の確認と、タイムラプス観察を行うときの培養条件設定の指針が得られたことが挙げられる。今後は更に細胞を用いた実験を進めることで、細胞機能改変の最適条件を同定することが期待され、生命科学研究・医療/産業応用を問わず有用な、高収率な細胞機能改変手法へと発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed a microfluidic device capable of non-invasively tracking changes in cell function over time at the single-cell level caused by one-to-one electrofusion between heterologous cells and by re-separation of the fused cells. Then, we performed cytoplasmic transplantation experiments using Jurkat cells (cancer cells) as cytoplasmic donor cells and dendritic cells (PMDC05) as cytoplasmic recipient cells, followed by time-lapse observation of the transplanted dendritic cells.

The yield of cytoplasmic transplantation with this device was about 40% or higher. On the other hand, the majority of dendritic cells after cytoplasmic transplantation died within 12 hours after transplantation. It was indicated that the low cell density in culture affected the survival of the cells.

研究分野：バイオナノテクノロジー

キーワード：マイクロ流体デバイス 樹状細胞 免疫治療 細胞医療

1. 研究開始当初の背景

近年、医療等の分野を中心に、外来遺伝子の混入 (= 汚染) をもたらすことなく、細胞質の混合のみを目的とする細胞融合に対する新しいニーズが出て来ている。これには、たとえば体細胞と ES 細胞 (胚性幹細胞) との融合により ES 細胞の持つ初期化因子を体細胞に移植し体細胞を初期化する試み [M. Tada et al., Curr. Biol. 11, 1553 (2001)] や、生体から採取したがん細胞を樹状細胞と融合し、がん細胞の成分を樹状細胞に移植し、がん抗原を提示した樹状細胞、或いはそれにより刺激されたキラー T 細胞等を細胞ワクチンとして体内に戻して利用する免疫療法 [R.J. Orentas et al., Cell Immunol. 213, 4 (2001)] などが挙げられる。しかしながら、いずれの場合にも、目的の細胞を得る工程で用いられる従来型の細胞融合の技術が、2 種類の細胞 (ES 細胞と体細胞、或いはがん細胞と樹状細胞) を混合した懸濁液の形状で扱うために異種細胞同士の 1 : 1 のペアが形成される確率は 1/2 以下である上、融合体形成の収率自体が非常に低い。更に、有効因子の導入の成否や外来遺伝子による汚染の懸念など、得られた個々の融合細胞の品質保証ができないという問題があり、免疫療法の場合、生体に移植して「効くか効かないか」を判断しているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究においては、外来遺伝子の混合を伴わない細胞質移植を高収率で並列に行えるマイクロ流体デバイスを開発し、これを用いた実験から得られた知見に基づき、高収率な細胞機能改変・高付加価値細胞作製技術の構築に挑戦する。

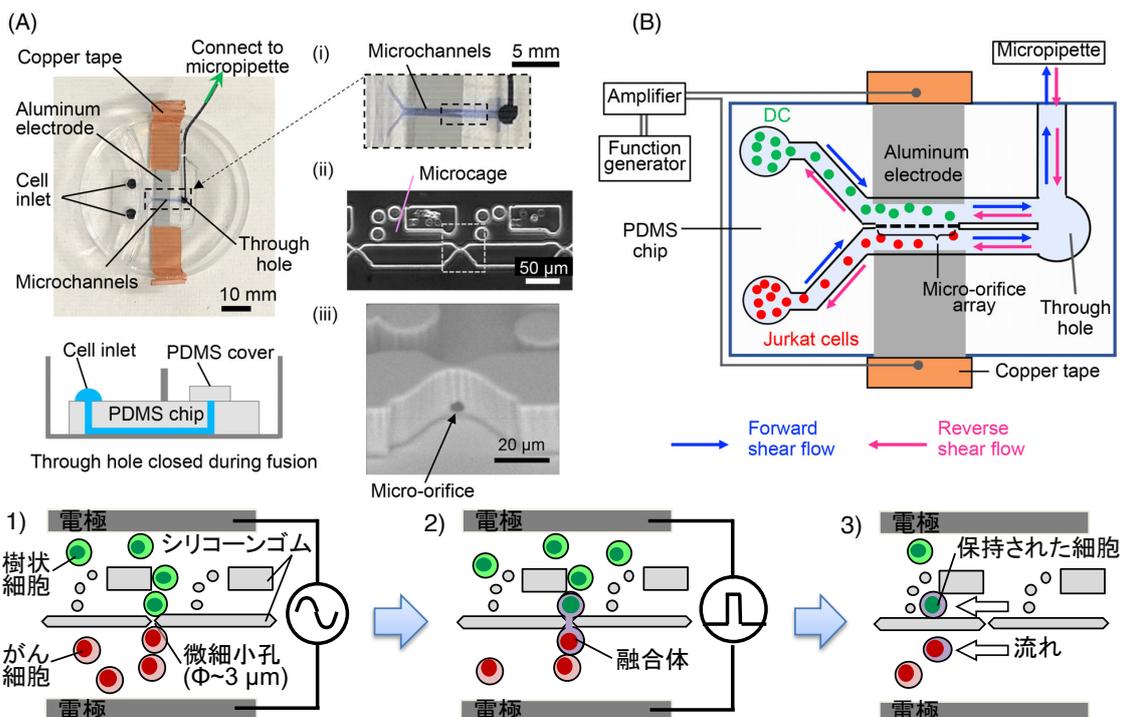
3. 研究の方法

異種細胞同士の 1 対 1 電気融合および融合体の再分離によって生じる細胞の形質変化 (機能変化) を、細胞非侵襲的に 1 細胞レベルで経時追跡することが可能なマイクロ流体デバイスを開発し、細胞融合・再分離・タイムラプス観察を行うための至適パラメータ・条件を同定する。具体的には、マイクロ流体デバイス内で、樹状細胞へのがん細胞細胞質移植過程および移植後の樹状細胞の動態を 1 細胞レベルで観察する事を通じ、樹状細胞が抗原提示能を獲得するのに最適な細胞質移植条件を明らかにし、品質が保証された樹状細胞ワクチンを高収率に作製する手法を構築することを目指す。

4. 研究成果

(1) 細胞質移植及び移植後の細胞のタイムラプス観察デバイス開発

ドナー細胞側からの核ゲノムの移動を伴わない受容細胞への細胞質移植及び移植後の受容細胞のタイムラプス観察を行う事ができるマイクロ流体デバイスを開発した (図 1)。ここでは、



交流電圧を印可し、誘電泳動によって微細小孔を介した異種細胞同士のペアを形成。微細小孔におけるパルス電圧印加による (可逆的膜穿孔による) 細胞融合。流れによる再分離及び細胞質移植細胞の微小空間への保持・経時観察。

図 1: 開発したマイクロ流体デバイスの上面概略図。我々の独自技術である、電界集中による高収率細胞融合において、微細小孔サイズを細胞核よりも小さくすることで、細胞質のみ混合させる。その後、融合体を再分離させ、目的細胞だけを流路視野内に保持し、動態観察を行う。

細胞分離時の流速の速さを調整することで、融合細胞の内の40%強程度の収率で、細胞質移植後の受容細胞をマイクロ流体デバイス内のマイクロケージに留めることができた(図2)。

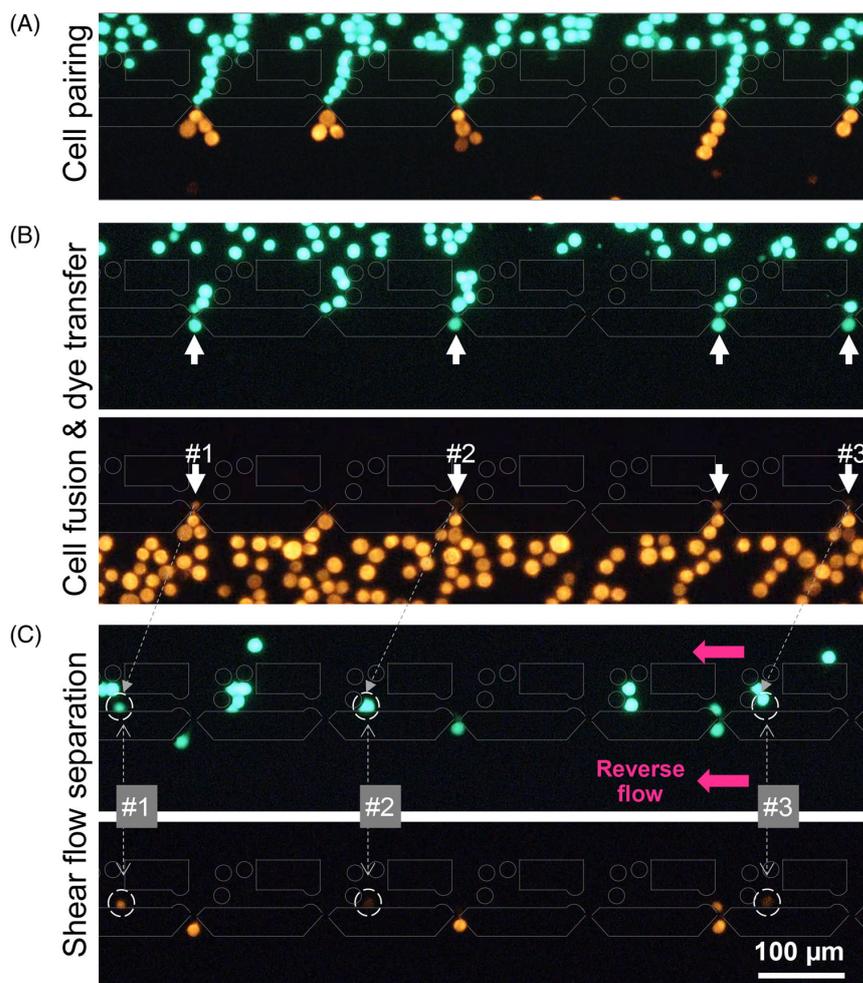


図2:細胞融合から再分離までのスナップショット。(A)各マイクロオリフィス部において細胞質を緑色蛍光色素で染めた樹状細胞と赤色蛍光染色したがん細胞とのペアを形成。(B)細胞融合による細胞質の混合(矢印部の細胞ペア)。(C)流れによって融合体を再分離させ、がん細胞の細胞質を受け取った樹状細胞が、マイクロケージ内に確保される(下側パネル、点線白丸内)。この後、タイムラプス観察を行う。

(2) 細胞質移植後の受容細胞のタイムラプス観察

がん細胞の細胞質を受け取った樹状細胞をマイクロケージ内に確保したのち、マイクロ流路内に培地を灌流させながらタイムラプス観察を行った。順調に生育し、分裂する細胞も観察された(図3)一方、大半の細胞は細胞質移植後12時間以内に死んでしまった。マイクロ流体デバイス内でタイムラプス観察を行う際の細胞密度は、ディッシュ内で通常の培養を行う際と比較して1/10~1/100となっていた。そこで、タイムラプス観察時の細胞密度と生存時間との相関について確認したところ、細胞密度が通常の培養時の細胞密度に近いほど、生存時間の長い細胞が増える傾向があることが確かめられた。現在は、細胞密度を上げて細胞培養する方法と培地にサイトカインを添加する方法の2通りのやり方で、細胞の生存時間を長くする条件の検討を進めている。本研究を進めることで、高収率な細胞質移植を実現するマイクロデバイスを用いた細胞機能改変の最適条件を同定することが期待され、生命科学研究・医療/産業応用を問わず有用な、高収率な細胞機能改変手法構築へと繋がることが期待される。

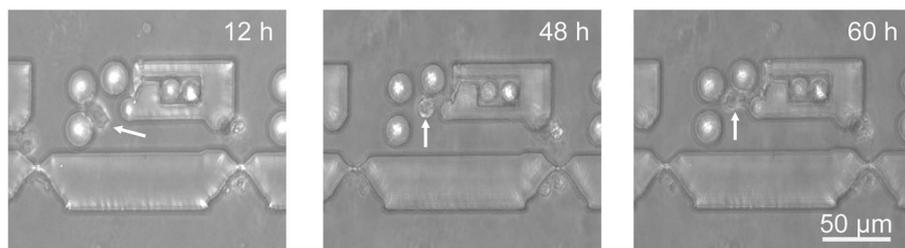


図3:がん細胞の細胞質を受け取った樹状細胞のタイムラプス観察の例。観察対象の樹状細胞(白矢印)は、細胞質移植から約60時間後に細胞分裂した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 K. O. Okeyo, R. Hiyaji, H. Oana	4. 巻 18
2. 論文標題 A single-cell surgery microfluidic device for transplanting tumor cytoplasm into dendritic cells without nuclei mixing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 e2200135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.202200135	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 友竹将太郎, 小穴英廣
2. 発表標題 巨大DNA封入リボソームと細胞との電気融合による遺伝子導入法の開発
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 第43回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小穴英廣、鈴木雄二（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 808
3. 書名 マイクロ・ナノ熱工学の進展	

〔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	オケヨ ケネディオモンディ (Okeyo Kennedy Omondi) (10634652)	京都大学・ウイルス・再生医学科学研究所・講師 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	成田 美和子 (Narita Miwako)	新潟大学・医学部・教授	本研究を遂行するにあたり、白血病性形質細胞様樹状細胞株（PMDC05）をご提供頂くと共に、当該細胞の培養につきまして数々の重要なご助言を頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

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