

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23241041

研究課題名(和文) マイクロデバイスを用いた細胞融合に基づく細胞機能制御に関する研究

研究課題名(英文) Modification of cellular function based on cell fusion in microdevices

研究代表者

鷲津 正夫 (WASHIZU, MASAO)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10201162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロオリフィスで作る電界集中を用いた高収率電気細胞融合法を確立した。それを用い、ES細胞と体細胞の融合を行ったところ、融合後5日程度で、付着平坦化/球状化を繰り返す不安定な挙動を示し、1週間程度で、初期化された細胞に特徴的な細胞塊を形成するのが観察された。また、これと同じサンプルではないが、融合産物から初期化を示すレポーターの発現が観察された。同様の装置でB細胞とミエローマ細胞の融合を行ったところ、5%という高い収率でハイブリドーマのコロニーが得られた。これらは、筆者らの電気融合法が細胞初期化や高収率抗体生産へ道を開く物であることを示している。

研究成果の概要(英文)：We have successfully established a novel cell fusion method based on field constriction created by microorifices. Using the method, fusion among ES-cells and tissue cells are performed, which resulted in bistable flat- and dome-like colony, which in 7 days showed typical colony shape of initialized cells. Another sample shown the initialization reporter from the colony. We have also shown the fusion of B cells and myeloma cell, which resulted in the hybridoma colony with the very high yield of 5%. These results show that our high-yield fusion method opens a way for cell initialization, as well as high yield production of mono-clonal antibodies.

研究分野：バイオナノテクノロジー

キーワード：ナノ・マイクロ科学 細胞融合 初期化 再生医療 静電気 ES細胞 微細加工 マイクロ・ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療のための細胞源として、体細胞に4種類程度の遺伝子を導入することにより作製するiPS(induced pluripotent stem)細胞や、体細胞の核を脱核した卵細胞に移植して作製するntES(nuclear transfer embryonic stem)細胞など、人為的に作られた多分化能を持つ細胞が注目されている。これらは、通常、体細胞内には本来存在しない因子を(前者では遺伝子の形で、後者では卵細胞の細胞質を用いることにより)導入して細胞機能の改変(リプログラミング)を行うものであるが、前者は、外来遺伝子を導入するため、がん化等の安全性の問題があり、後者は、細胞核移植という煩雑な操作とその成功率の低さが問題となる。もし、ある細胞の持つ細胞内因子を他細胞に容易に移植する工学的手段があれば、この分野の研究および臨床応用が急速に進歩するであろうことは疑いない。

2. 研究の目的

本研究においては、微細加工技術を用いて作られる細胞核よりも小さい小孔(マイクロオリフィス)をはさんで2種類の細胞を融合させることにより細胞膜を連結し、そのまま培養することにより、この連結部を通して細胞内因子の交換を行い細胞機能の改変を行う方法、および、融合後に一方から吸引して他方の細胞質の移植することにより細胞機能の改変を行う方法の2つにつき、その工学技術を開発するとともに、それを利用した科学的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

電気細胞融合とは、細胞膜が約1Vの電圧により可逆的に破壊されることを利用して2種類の細胞の細胞膜を電気溶接のように融合させ、これらの細胞の持つ形質を併せ持つ雑種細胞を作り出す手法で、従来法では、2種類の細胞の懸濁液の混合物に電圧を印加することにより行われてきたが、どの種類の細胞が何個融合するかわからず、かつ融合が成功するのは1万個に1個程度と非常に収率が低いことが問題になっていた。

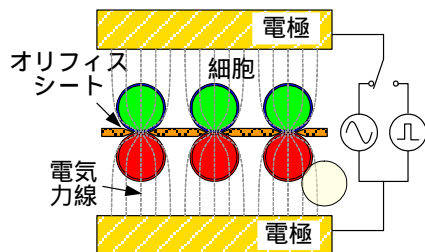


図1 電界集中を用いた電気細胞融合

一方、申請者らは、現在までに、マイクロデバイス内での電界集中を用いた高収率の細胞電気融合の方法論を開発してきた。この手法は、図1に示すように、細胞径より小

さいオリフィス(小孔)を持つ絶縁性のオリフィスシートを挟んで2種類の細胞を電気力(誘電泳動)を用いて対合させ、オリフィスシート両側に置かれた電極にパルス電圧を印加することにより細胞の融合を行うものである。ここでは、マイクロオリフィスは、下記のように電気的な細胞融合を効率的に行う手段であるとともに、核同士融合、即ち遺伝情報の混合を阻害する物理的障壁としても機能する。このような配置においては、図に示すように、電気力線が絶縁物を通過できずオリフィスに集中するため、電極に印加した電圧のほとんどすべてがオリフィス、すなわち2つの細胞の接触点に印加されることになる。従って、細胞の種類・大きさ・配向によらず、細胞の接触点にかかる膜電圧 \approx 電極に印加した電圧となり、制御された電圧を細胞の接触点にのみ印加することができるので、再現性のよい膜破壊を誘導することができ、ひいては非常に高収率(>90%)の融合を実現できる。また、膜電圧が発生するのが細胞の接触点のみであるので、図1の右端に示したように、融合したい細胞以外の第3の細胞が付近に存在したとしても、この細胞には可逆的膜破壊は発生せず、融合には参画しない。すなわち、融合は、本質的に必ず1:1となる。一般に、3個以上の細胞が融合すると、遺伝子の量が過多となるので、融合後の生存率が低くなることが知られているが、本手法はこの面でも高収率性に優れる。さらに、融合細胞は、首をオリフィスにより拘束された雪だるま状の形をとるので、融合した細胞のみをオリフィスシートごと選択的に回収できる。

4. 研究成果

(1) ES細胞との融合による細胞初期化の研究
 分化した体細胞を未分化のES細胞(胚性幹細胞)と融合すると、ES細胞の初期化因子によって体細胞が初期化され未分化状態へ戻るということが知られており、この知見がiPS細胞発見のもととなった。しかし、従来の方法でこの融合を行うと、初期化したい体細胞とES細胞の遺伝子が混合してしまうことになり、再生医療等には利用できない。すなわち、遺伝子を混合せず、細胞質のみを融合する必要がある。これは、図1の融合法で、染色体が通過できないほどオリフィスを小さく作ればよいように思えるが、オリフィスをあまり小さくすると、今度は、オリフィスをはさんで2つの細胞が接触することが困難になり、融合の収率が激減する。

この問題を解決するため、新たに「ナローイングスリット」なる構造を考案した。これは図2に示すように、上で広く、下に行くに従って狭くなっている(narrowing)構造で、上の広いところで融合を行い(図左)、底面に細胞を付着させて培養を行う(図右)と、ここでスリットが狭くなっているので、染色体が通過しづらいというしくみで、高い融合

収率と低い染色体混合率を両立させようとするものである。

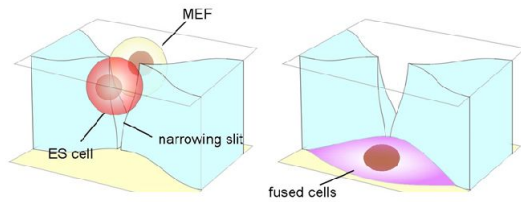


図2 ナローイングスリットの模式図

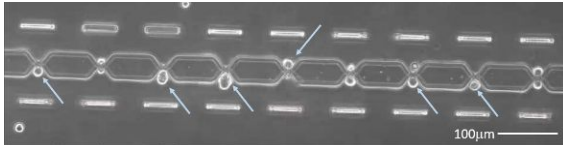


図3 ナローイングスリットによる細胞融合

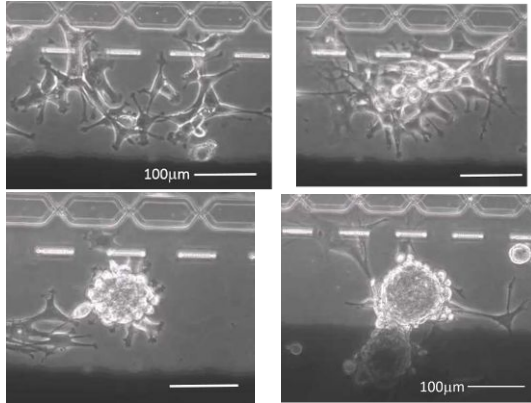


図4 ESとMEF細胞の融合後の挙動
左上：5日後，右上：6日後，
左下：7日後 右下：9日後

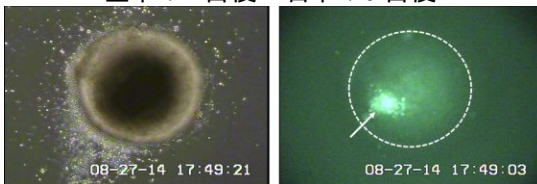


図5 融合により得られたコロニー

このスリットを用いて Oct4-GFP を組み込んだ MEF 細胞と、ES 細胞の融合を行った。もし MEF 細胞が初期化されれば、レポーターである GFP が光るはずである。結果は、ほとんど 100% の収率で融合が行えたものの、やはり多くの細胞は融合後にスリットを通り抜けてしまった(図3)。しかしながら、融合した細胞の中には、数日後に ES 細胞のような形態をとり、一週間後には特徴的なコロニーを形成するに至るものがあった(図4)。また、融合直後からの経緯を追っているわけではないが、融合操作を行った2週間ほど後に、流路下流部に GFP が発現している細胞があった(図5)。これらのことは、細胞融合により MEF 細胞の初期化が生じているらしいことを示唆する。しかしながら、本来の目的の「遺伝子非混合」の細胞融合には至っていない。現在、細胞が接着できる部位をオリフィス周辺にのみ限定するような、チャンネル上の細胞接着性パターンニングの手法を試みている。

(2) 電界集中型細胞融合法による抗体産生細胞の高収率取得

図1の原理を用いて、B細胞とミエローマ細胞を高収率で融合させ、モノクローナル抗体を作製する手法の開発を行った。

モノクローナル抗体は、その特異性や親和性の高さから、ある特定の抗原を検出するための実験用試薬としてだけでなく、がん治療用医薬品、免疫診断薬の中核材料として利用されるなどその応用範囲が急速に拡大している。

モノクローナル抗体を作製するには、まずマウスに抗原を注射する。そうするとマウスのB細胞がその抗原に対する抗体を産生ようになる。しかしながら、B細胞が産生する抗体数には限りがある。そこで、無限に増殖する能力を持つミエローマと抗体を産生するB細胞を融合させることで、抗体を産生しながら無限に増殖できるハイブリドーマを生成する。このハイブリドーマのクローニングを行い、分泌する抗体を収集すればモノクローナル抗体が得られる。

従来の PEG 等を用いる細胞融合法では、融合収率が極めて低く、一説には 10^{-5} 程度とされている。また、どちらの細胞が何個融合するかは予測不能である。一方、われわれの開発した細胞融合法は、必ず 1:1 の融合産物が数十%の収率で得られる。また、融合産物はオリフィスにクランプされた形で得られる。従って、融合したものとしていないもの選別、いわゆるスクリーニングが不要になる。

なるべく大量の細胞を扱えるように、この研究においては、2次元平面上に配列されたオリフィス(オリフィスシート)を用いた。この径 2.5mm のシートには 1枚あたり 2千個のオリフィスがある。まず、水平におかれたオリフィスシートの上面に緑色に蛍光染色したミエローマを誘電泳動により配置し、上下反転して、反対の面に赤色に蛍光染色したB細胞を誘電泳動により配置する。図6はこの配列を示したもので、ミエローマの方は紙面に垂直にパールチェーンを形成しているためあまりはっきりしないが、B細胞の方ははっきりとした格子形状に配列しているが見える。

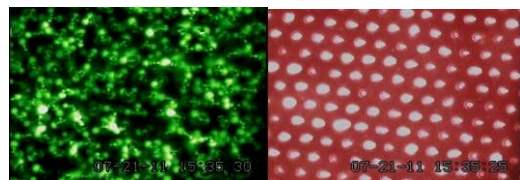


図6 ミエローマ(左)とB細胞(右)の誘電泳動による2次元オリフィス上への配列

この配列された細胞を、オリフィス上の赤い細胞(B細胞)に顕微鏡の焦点を合わせて、緑の蛍光を見ると、オリフィスの向こう側の細胞の持つ緑の蛍光がフォーカスが外れてぼんやりと見える(図7左)。一方、ここに

パルスを印加して融合が生ずると、焦点のあっている B 細胞に、ミエローマ側から緑色の蛍光色素が流入するため、緑色の輪郭がはっきり見えるようになる（図 7 右）。この画面には約 120 個のオリフィスが存在し、そのうち赤丸で書いてある 21 個が融合した。すなわち収率は 18%であった。

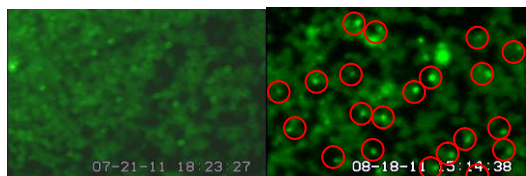


図 7 パルス印加前(左)とパルス印加後(右)

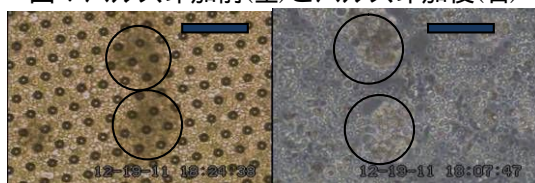


図 8 回収されたコロニー

次に、オリフィスにより固定された雪だるま形状のハイブリドーマを、オリフィスシートごとそと取り去り、別のシャーレに入れて、融合した細胞しか生き残れない HAT 培地中で培養した。その結果、オリフィスシートに張り付いたままのコロニー（図 8 左）や、シートから外れてシャーレ底にあるコロニー（図 8 右）が得られた。数値的には、融合した細胞数 200 対、そのうちコロニーになった数は約 100 で、オリフィス数 2000 から、融合収率は 5%となる。これは、従来の細胞融合からは考えられない高い収率である。

(3)さらなる高収率融合への試み

B 細胞とミエローマの融合に関し、膜の接触をよくするため、a)バッファの濃度を 200mM 程度と高めにとり、b) トリプシン処理により膜表面のタンパクを除去する、の 2 つの処理を加えたところ、図 7 では 18%程度だった融合率を 73%に上げることができた。図 9 がその結果で、左が融合前、右が融合後である。融合後に、ほとんどの三角格子の格子点において、反対側の細胞から流入した蛍光色素により明るく光る明瞭な輪郭の細胞が見える。

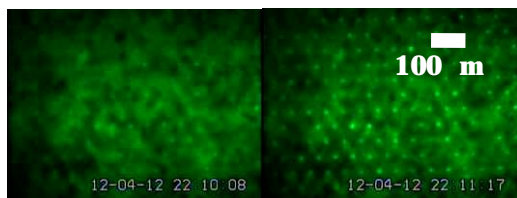


図 9 高収率細胞融合

このような高収率の細胞融合は、リンパ節 1 個からの抗体産生へと道を開くものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 件)

- [1] 黒澤修・オケヨ ケネディ オモンディ・小穴英廣・沖田圭介・小寺秀俊・鷺津正夫:「オンチップエレクトロポレーションを用いた接着細胞核への遺伝子直接送達法の開発」静電気学会誌, Vol.38, No.1, p.28-33 (2014)
- [2] オケヨ ケネディ・西垣内康宏・近藤武宏・黒澤修・小穴英廣・小寺秀俊・鷺津正夫:「電界集中型細胞融合法による抗体産生細胞の高収率取得」静電気学会誌, Vol.38, No.1, p.40-45 (2014)
- [3] Masao Washizu, Boonchai Techaumnat: "Analysis of general multipolar images on dielectric layers for the calculation of DEP force", Journal of Electrostatics 71, 854-861 (2013)
- [4] Yuji Kimura, Yuya Goto, Hidehiro Oana, Masao Washizu: "Optical sequence probing with the homologous recombination protein RecA", Journal of Biotechnology 164, 254-259 (2012)
- [5] M. S. Hung, O. Kurosawa, M. Washizu: "Single DNA molecule denaturation using laser-induced heating", Molecular and Cellular Probes 26 (2012)
- [6] K. Terao, A. Okonogi, A. Fuke, T. Okitsu, T. Suzuki, M. Washizu, H. Kotera: "Localized substance delivery to single cell and 4D imaging of its uptake using a flow channel with a lateral aperture", Microfluidics and Nanofluidics, 12(1), 423-429 (2012)
- [7] Boonchai Techaumnat and Masao Washizu: "Equivalent image charges of a prolate spheroid under an external electric field", Journal of Electrostatics, Vol.69, No.4, p.388-393 (2011)
- [8] Yuji Kimura, Murat Gel, Boonchai Techaumnat, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Masao Washizu: "Dielectrophoresis-assisted massively parallel cell pairing and fusion based on field constriction created by a micro-orifice array sheet", Electrophoresis 2011, 32, 2496-2501 (2011)

〔学会発表〕(計 8 件)

- [1] Masao Washizu: "Biomaniipulation, cell fusion, single-cell surgery", Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology & Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nairobi, Kenya, 2014.09.09, WS1-3, (2014) (invited)
- [2] Masao Washizu: "Electroporation and Electrofusion in Field-Tailored Microstructures", IEEE/EMBC13, Osaka Japan, 2013.07.04, ThE14.5, p.2829-2832 (2013) (invited)

- [3] Masao Washizu: "Electrostatic Bio-Manipulation for the Modification of Cellular Functions", The 7th International Conference on Applied Electrostatics, 2012.09.18, Dalian, China (2012) (invited)
- [4] Masao Washizu: "Bio-nanotechnology for Measurement, Regulation and Modification of Cellular Functions", International Symposium on Innovative Nanobiodevices 2012 (ISIN 2012) 2012.3.21, Nagoya (Plenary)
- [5] Masao Washizu : "Electric field-induced cell-membrane alternation in microfabricated structures and its applications", Singapore-Japan Bioelectronics Workshop, p.23-24, 2011.08.11, Kyoto (2011) (invited)
- [6] K.O. Okeyo, R. Yanaru, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu: "Generation of epithelial cell sheets with defined cell orientation using microstructured mesh sheets as a substrate for cell culture", μ TAS2014, October 26-30, 2014, San Antonio, Texas, p. 1128-1130 (2014)
- [7] K. O. Okeyo, Y. Hayashi, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu: "On-chip electroporation device for direct introduction of plasmids into cell nucleus and observation of cell reprogramming process", μ -TAS 2013, Oct. 27-31 Freiburg, Germany p.113-115 (2013)
- [8] K. O. Okeyo, N. Omasa, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu: "Cell adhesion control initiate cell sheet formation in a medium suspension", μ -TAS 2013, Oct. 27-31 Freiburg, Germany p.1057-1059 (2013)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：細胞培養支持体、細胞培養装置、細胞培養キット、及び細胞シート

発明者：オケヨケネディ・鷲津正夫・小寺秀俊

権利者：国立大学法人東京大学・京都大学

種類：特許

番号：特願 2013-143706

出願年月日：2013.07.09

国内外の別：国内

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鷲津正夫 (WASHIZU, Masao)

東京大学大学院工学系研究科・教授

研究者番号：10201162

(2)研究分担者

小寺秀俊 (KOTERA, Hidetoshi)

京都大学大学院工学研究科・教授

研究者番号：20252471

(3)連携研究者

小穴英廣 (OANA, Hidehiro)

東京大学大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：20314172

ゲル ムラト (GEL, Murat)

東京大学大学院工学系研究科・助教

研究者番号：90456153