

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770189  
 研究課題名（和文） 単一細胞分泌サイトカインのリアルタイム定量法による免疫システム理解への挑戦  
 研究課題名（英文） Development of real-time secretion analysis of immune single cells  
  
 研究代表者  
 白崎 善隆 (SHIRASAKI YOSHITAKA)  
 独立行政法人理化学研究所・免疫ゲノミクス研究グループ・研究員  
 研究者番号：70469948

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、細胞が分泌するサイトカインを単一細胞の分解能で経時的に測定する技術の開発を行った。開発したシステムは、数千細胞に対して、30分の時間分解能で複数のサイトカイン分泌を同時に測定できた。また、測定細胞数を数十個に制限することで1分の時間分解能で分泌活性と細胞状態の同時測定に成功した。このシステムにより免疫細胞の炎症応答を観測し、サイトカイン分泌応答の細胞間の不均一性や細胞状態との相関を解析した。

## 研究成果の概要（英文）：

We developed a platform for real-time secretion analysis at the single cell resolution. The platform enabled to monitor secretion dynamics of thousand of single cells with 30-min time resolution for over 8 hours. We also demonstrated multi-parametric measurement of secretion dynamics and cellular states with 1-min time resolution. We applied our platform to inflammatory responses of immune cells and observed intercellular and intracellular heterogeneity of cytokine secretion.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：単一細胞解析 イムノアッセイ 分泌測定 マイクロウェル

## 1. 研究開始当初の背景

近年、原核生物である大腸菌や原始的真核生物である酵母において、過渡的に遺伝子発現を誘導することで、タンパク質や mRNA の突発的生成を確認し、それらの分布から遺伝子発現制御が確率的に行われていることが解明された (Juan M. Pedraza, et al., *Science*, 319, 339-343(2008), Long Cai et al., *Nature*, 440, 358-362 (2006))。このような確率的制御は哺乳動物細胞においても成り立

つことであり、例えばウイルス感染に対する NF- $\kappa$ B を介した IFN- $\beta$  の誘導の初期応答は確率的であることが示唆されている (Effie Apostolou and Dimitris Thanos, *Cell*, 134, (1), 14-16(2008))。一方で、NF- $\kappa$ B は定常的な炎症刺激に対しては、IKK を介した負のフィードバックにより周期的な活性を示すとともに、位相の異なるフィードバックを組み込むことで細胞レベルでの不均一性をエネルギーを使って作り出すことも示唆され

ている (Pawel Paszeka et al., PNAS, 107, 11644-11649(2010))。これらの既報が示すように、哺乳動物細胞は遺伝子転写に由来する偶発性や、遺伝子ネットワークに由来する不均一性を有しており、これらの不均一性により細胞集団全体における応答を平均化し、より高次の階層における生命システムの恒常性や堅固性に大きく貢献している可能性が見出される。とくに複雑かつ高等な生命システムである免疫系においては、単一細胞解析で初めて明かされるであろう遺伝子発現分布のばらつきや時間的なゆらぎの計測は、これまで考えられてきた免疫反応の線形関係を動的なシステムとして理解するための基盤情報を提供すると期待される。

## 2. 研究の目的

上記の背景を受け、本申請では免疫系における細胞間ネットワークの担い手であるサイトカインの分泌活性を通して遺伝子発現の様相を単一細胞レベルで観測し、細胞集団における細胞レベルでのゆらぎが細胞集団およびシステムに対してどのような影響を及ぼしているのかを解明することを目指す。この目的達成のために、本研究では、非侵襲的な遺伝子発現時系列解析としてサイトカイン等の分泌量を単一細胞レベルでリアルタイムに定量し、さらに任意の時刻において遺伝子発現担体である mRNA の単一細胞レベルでの網羅的解析を可能とする測定系を開発する。

## 3. 研究の方法

単一細胞からのサイトカイン分泌を分泌する手法として、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) アッセイを細胞培養条件下で行う ELISPOT アッセイが知られている。しかしながら、この方法は定量性に欠けること、および測定後のデータと細胞を対応付けることが難しいなどの欠点がある。近年これらの欠点を補うために微細加工技術を利用した方法が開発された。例えば、Aishun J. らはマイクロウェルアレイ上で蛍光イムノアッセイを行い、抗体を産生した細胞の同定・選択的回収を実現している (Nature Med., 15, 1088-1092 (2009))。また、J.C. Love らはシリコン樹脂上にマイクロウェルアレイを作製し、細胞を播種した後に抗体を固定化したスライドガラスで封入し、分泌たんぱく質をスライドガラス上に捕捉し、剥離後にイムノアッセイを行った (Nature bio. tech., 24, 703-707(2006))。さらに、彼らはウェル内で RT-PCR を行い、mRNA レベルでの遺伝子発現と抗体分泌量の相関を示すことに成功している (Lab Chip, 10, 2334-2337(2010))。これらの方法は多数の細胞に対して分たんぱく質を測定し、さ

らに任意の細胞の遺伝子発現を mRNA やゲノムレベルで解析することができる点で非常に優れている。しかし、これらの方法は捕捉した分泌たんぱく質の量を可視化するために検出抗体を振りかけ、未結合の検出抗体を洗浄する工程が必須である。免疫細胞の遺伝子発現応答を計測するためには、長期間例えば 24 時間かけてサイトカインの分泌量を連続的に測定することが必要となるため、繰り返しの検出抗体の暴露・洗浄の工程は煩雑であり、細胞にも影響を与えかねない。そこで、本手法は前述の手法と同様にマイクロウェルを用いて蛍光イムノアッセイを行うが、ウェル底面において全反射顕微鏡を用いて固層表面 $\sim 100\text{nm}$  近傍のみを近接場で照明し、固層上の捕捉抗体、抗原、蛍光検出抗体からなる免疫複合体のみを光らせることで、余剰の蛍光抗体を洗浄すること無しにサイトカインの定量を可能とする手法を用いた (図 1)。

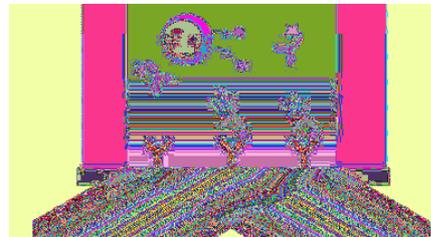


図 1 近接場照明による蛍光免疫複合体の特異的検出法

## 4. 研究成果

### (1) 全反射照明対応マイクロウェルアレイチップ作製法の確立

マイクロウェルは細胞及び分泌たんぱく質の区画化に用いられるが、その材質には微細加工が簡単で可視域の自家蛍光が少ない材質が好ましい。また、材質の屈折率が水よりも高い場合 (例えば SU-8: 屈折率 1.58)、ウェル壁部に入射した励起光が全反射できずに液中に漏れこみ (図 2)、背景光が増加してしまうことから、なるべく水に近い屈折率を有する材質を選択すべきである。

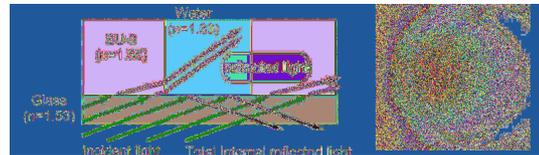


図 2 高屈折率樹脂素材を用いたマイクロウェルアレイチップによる背景光の増加

そこで、本研究では、水とほぼ同じ屈折率であるアモルファスフッ素ポリマー CYTOP (屈折率 1.34, 旭硝子社製) 及び、屈折率が比較的小さいポリジメチルシロキサン (PDMS, 屈折率 1.42) を用いたマイクロウェルアレイチップの作製を行った。

CYTOP はコーティング剤であり、溶媒の蒸

発と共に硬化する。また、感光性ではない。そこで、まずSU-8を用いて柱状の構造を作製し、その上にCYTOPを塗布・硬化させた後にSU-8構造を除去する工程でマイクロウェルアレイチップを作製した(図3)。マイクロウェルは直径30 $\mu\text{m}$ 、深さ40 $\mu\text{m}$ 、中心間距離70 $\mu\text{m}$ 、72x72アレイで設計した。

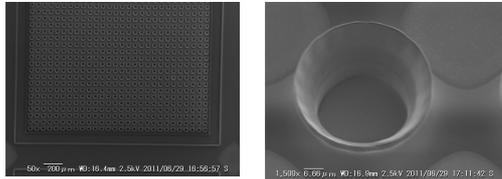


図3 CYTOP マイクロウェルアレイチップ

PDMSを用いたマイクロウェルアレイチップは、厚さ80 $\mu\text{m}$ 、直径50もしくは70 $\mu\text{m}$ の貫通孔を中心間距離100 $\mu\text{m}$ で50x50アレイ形成したPDMSシート(フルイドウェアテクノロジー社製)を用い、カバーガラスに接合することで作製した(図4)。

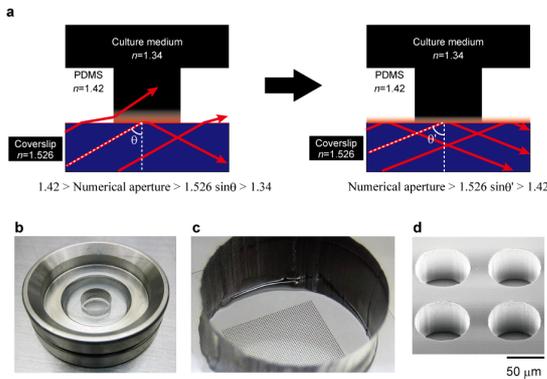


図4 PDMS マイクロウェルアレイチップ

PDMSチップの利点は作製が容易であり、量産性が高いことである。ただし、屈折率が1.42であり、PDMS部分でも励起光を全反射させるためには開口数の高い対物レンズを使用する必要がある点を留意する(図4a)。

#### (2) 株化培養細胞を用いた炎症性サイトカイン分泌の観察

上記で作製したマイクロウェルアレイチップを用いて、まずは遺伝的に均質な培養細胞株からのサイトカイン分泌を測定した。細胞はマウス肥満細胞株MC/9を用いた。MC/9は浮遊性細胞であるが、深さ40 $\mu\text{m}$ のCYTOPマイクロウェルでも遊走することなく、ウェルの中に長時間留まらせることができた。肥満細胞であるMC/9はIgEを介した抗原刺激を受けると脱顆粒し、ヒスタミンなどを一過的に放出するとともに、白血球を誘引する炎症性サイトカインを分泌する。本研究では、IgEシグナル伝達を担うプロテインキナーゼCを直接活性化するホルボールエステル

(PMA)を用いてMC/9を刺激した。観察は半導体レーザーを用いた対物型全反射照明をセットアップした全自動蛍光倒立顕微鏡(ECLIPSE Ti-E、株式会社ニコン)で行った。顕微鏡ステージには細胞培養装置(ONICS、東海ヒット株式会社)を用いた。125ウェルを12分毎に撮影し、107細胞を解析した。図5に示すように細胞は刺激後1時間程度でサイトカインの分泌を開始し、数時間に渡って分泌を継続した。また、分泌後に分裂を行う細胞も確認され、本手法は細胞の活性を損なうことなく、サイトカインの分泌を観察できることが確認された。

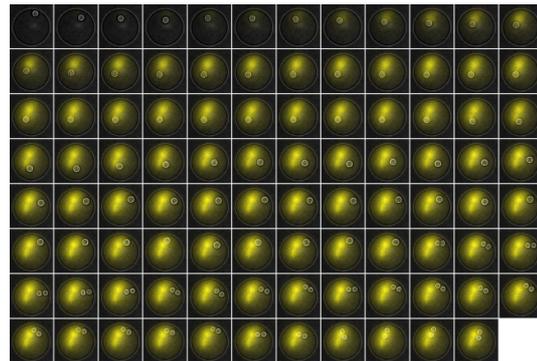


図5 PMA刺激下におけるMC/9細胞の長時間観察

次に、数千個の単一細胞間でのサイトカイン分泌活性の相関を調べるために、MC/9細胞を導入した5,184ウェルを30分毎に観察した。サイトカインはバルク解析において分泌量が多かったMCP-1(Monocyte Chemotactic Protein-1)およびIL-6(Interleukin-6)の2種類を同時に測定した(図6a,b)。PMAは時間0hで添加した。興味深いことに、同一の細胞内においてもMCP-1とIL-6の分泌開始は必ずしも一致していなかった(図6c)。分泌開始タイミングに着目し、細胞間、サイトカイン間の不均一性を評価するために、IL-6のMCP-1に対する分泌開始遅延を指標に細胞毎に比較を行った(図6d)。結果、MCP-1とIL-6の分泌強度は細胞毎に相関している様相が確認された。分泌開始時間に関しては、MCP-1はPMA刺激後すぐに応答しており、細胞間の不均一性が少ないが、IL-6は比較的広い不均一性を持って遅延して応答していることがわかった(図6e)。このサイトカイン種による応答速度及び不均一性の違いの要因を調べるために、同一刺激条件下におけるそれぞれのmRNA発現量の単一細胞解析を行った(図7)。結果、MCP-1は刺激前からほとんどの細胞がmRNAを発現しており、発現量もPMA刺激による増強は見られなかった。一方IL-6はPMA刺激によりmRNAを発現している細胞数の割合およびその平均発現量ともに刺激後2時間をピークに増加していること

がわかった。よって、MCP-1 は PMA 刺激によって翻訳または分泌機構において活性化しているのに対し、IL-6 は転写レベルから活性化しているために、比較的遅く応答し、且つ内在的な不均一性を反映した分泌活性を示していると考えられる。

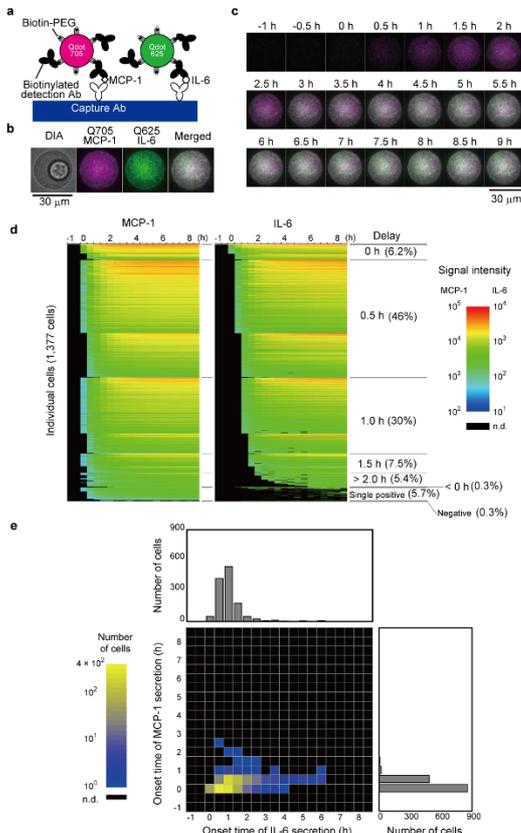


図 6 PMA 刺激 MC/9 細胞の MCP-1・IL-6 分泌応答

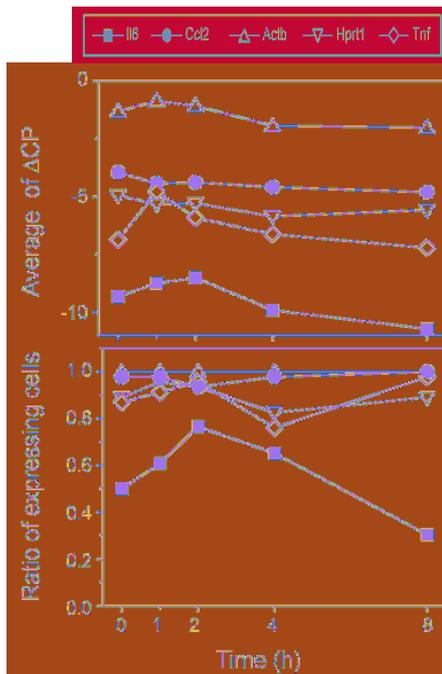


図 7 PMA 刺激 MC/9 細胞の mRNA 発現量単一細胞解析

### (3) 末梢血単球を用いた IL-1 $\beta$ 分泌機構の観察

IL-1 $\beta$  は発熱などの炎症の初期応答に重要な役割を果たす炎症メディエーターである。IL-1 $\beta$  の分泌異常亢進は、クリオピリン関連周期熱症候群 (CAPS) に代表されるような自己炎症疾患を引き起こす。しかしながら、IL-1 ファミリーは他のサイトカインと異なり、細胞質中で発現しており、通常の小胞輸送に必要なペプチド配列を有さない。そのため、どのように細胞質中の IL-1 $\beta$  が細胞外に分泌されるのか未知である。近年、IL-1 $\beta$  の過剰分泌は NLRP3 インフラマソームを介したカスパーゼ 1 の活性化によって制御されていることが示唆されている。NLRP3 インフラマソームは高濃度 ATP 刺激により活性化する。活性化したカスパーゼ 1 は IL-1 $\beta$  前駆体を、成熟 IL-1 $\beta$  に切断すると共に細胞膜に微小孔を形成することが示唆されている。そこで、本研究では磁気細胞分離により精製した末梢血単球を大腸菌由来リポ多糖 (LPS) で一次刺激し、ATP によって 2 次刺激した際の IL-1 $\beta$  分泌を観測した。さらに、細胞膜完全性の有無を指示する生/死細胞染色試薬 Calcein AM と SYTOX の蛍光観察を同時に行った。これらの観察は、繰り返しの条件検討が必要とされたため、量産性が高い PDMS マイクロウェルアレイチップを用いた。まず、LPS 刺激による IL-6 サイトカインの分泌を生/死細胞染色と共に行った (図 8)。IL-6 分泌は刺激後 1 時間で徐々に増加した。分泌が見られた細胞はすべて calcein 陽性 SYTOX 陰性の生細胞であった。

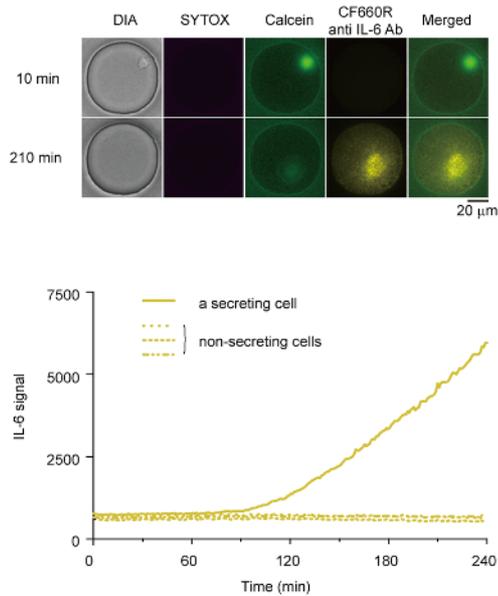


図 8 LPS 刺激単球からの IL-6 分泌

次に ATP 刺激下における単球からの IL-1 $\beta$  分泌を測定した。3 時間 LPS によって 1 次刺激し、calcein 染色した単球をマイクロウェルアレイチップに播種し、40 ウェルを 1 分間毎に観察した(図 9)。時間 0 分において ATP で 10 分間刺激し、calcein、SYTOX、IL-1 $\beta$  のシグナル変化を解析したところ、IL-1 $\beta$  を過剰分泌した細胞は calcein 陰性、SYTOX 陽性の死細胞であった。膜完全性の消失は Calcein シグナルの減少と SYTOX シグナルの増加により確認した。これら二つのシグナルは同時に起きており、平均して SYTOX が 0.2 分の遅延を示した(図 10)。この遅延には SYTOX の流入にかかる時間と DNA に結合するのにかかる時間が反映されていると考えられる。一方、IL-1 $\beta$  の分泌シグナルは、calcein、SYTOX のシグナル変化に対して、平均 2 分の遅延を有し、また、遅延時間の分布は比較的広いことが見出された。これらの事実から、IL-1 $\beta$  の過剰分泌は ATP 刺激下における細胞膜完全性と強い相関を示すが、膜貫通孔の形成以外にも遅延を生じさせる機構が関与していると考えられる。

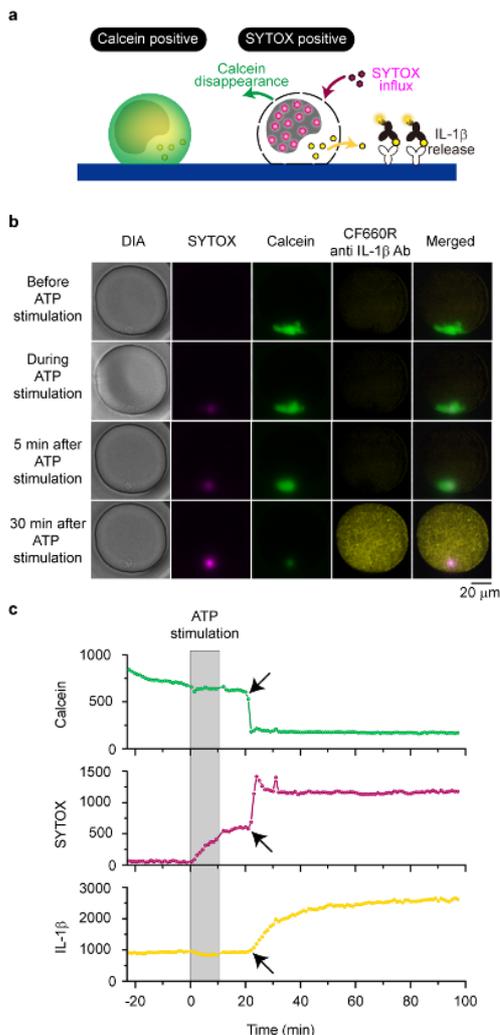


図 9 ATP 刺激下における細胞膜完全性の消失と IL-1 $\beta$  の過剰分泌の測定

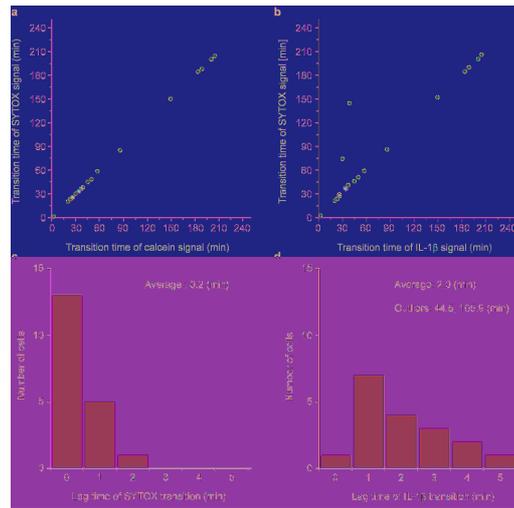


図 10 calcein 消失、SYTOX 流入及び IL-1 $\beta$  過剰分泌の開始時間の相関解析

### (3) 結論

本研究では近接場照明によるリアルタイムのイムノアッセイを用いることで、単一細胞のサイトカイン分泌活性を詳細に測定する解析システムを開発した。

本手法によって、細胞間、サイトカイン種間に存在する分泌活性の不均一性を見出し、その分子メカニズムの一端を調べることに成功した。また、これまで未知であったインターロイキン 1 ファミリーの過剰分泌に関わる分泌メカニズムが細胞膜完全性の損失に強く相関していることを見出した。

本手法は、細胞外に分泌されたたんぱく質を定量するため、細胞に遺伝的な操作を加えること無しに細胞の応答を観測することが可能であり、細胞本来の機能を解析することが可能である。

一方、本研究では個々の細胞から任意のタイミングにおける mRNA 発現量の網羅的解析を達成するには至らなかった。近年の動向としては、次世代シーケンサーを用いた単一細胞遺伝子発現解析が注目されており、定量性・網羅性を兼ね備えた技術開発が期待される。

### 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 5 件)

① Shirasaki Y, Yamagishi M, Shimura N, Hijikata A, Ohara O., “Toward an understanding of immune cell sociology: real-time monitoring of cytokine secretion at the single-cell level”, *IUBMB Life*, 65, 28-34, 2012, DOI:10.1002/iub.1175., 査読有

② Nakahara A., Shirasaki Y., Kawai K., Ohara O., Mazuno J. and Shoji S., "Fabrication of high-aspect-ratio amorphous per-fluorinated polymer structure for total internal reflection fluorescence microscopy", *Microelectronic Engineering*, 88, 1817-1820, 2011, DOI: 10.1016/j.mee.2011.02.117, 査読有

③ Haneoka M., Shirasaki Y., Sugino H., Aoki T., Arakawa T., Ozaki K., Yoon DH., Ishii N., Iizuka R., Shoji S. and Funatsu T., "Microfluidic active sorting of DNA molecules labeled with single quantum dots using flow switching by a hydrogel sol-gel transition", *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL*, 159, 755-758, 2011, DOI: 10.1016/j.snb.2011.06.043, 査読有

④ Shirasaki Y., Nakahara A., Shimura N., Yamagishi M., Mizuno J., Ohara O. and Shoji S., "Single cell real time secretion assay using amorphous fluoropolymer microwell array", *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference (TRANSDUCERS)*, 2011 16th International technical digest, 755-758, 2011, DOI: 10.1109/TRANSDUCERS.2011.5969330, 査読有

⑤ 白崎 善隆, 微細凹版法を用いたタンパク質高分泌株の高効率単一細胞スクリーニング, *ファルマシア*, 47, 1163, 2011, 査読無し

[学会発表] (計7件)

① 白崎 善隆, 単一細胞免疫アッセイによる NLRP3 体細胞モザイクの機能的解析の試み, 第6回日本免疫不全症研究会, 2013年1月26日, 品川インターシティホール, 東京都

② Y. Shirasaki, Measurement of inflammatory cytokine secretion from human monocytes after inframasome activation, *The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 2012年10月28日~11月01日, OKINAWA, JAPAN

③ 山岸 舞, マクロファージ細胞株における LPS 活性化時の遺伝子発現の細胞間ゆらぎに細胞間相互作用が与える影響, 第50回生物物理学会年会, 2012年09月22日~24日, 名古屋大学, 愛知県

④ 白崎 善隆, 炎症時におけるヒト単球サイ

トカイン分泌のライブセルイメージング, 第50回生物物理学会年会, 2012年09月22日~24日, 名古屋大学, 愛知県

⑤ Nakahara A., Single cell real time secretion assay using amorphous fluoropolymer microwell array, *The 16th international conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS' 11)*, 2011年6月6日, Beijing, China

⑥ Shirasaki Y., Single cell analysis of the proinflammatory responses of mast cell by a real time secretion assay, *The 15th international conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences*, 2011年10月4日, Seattle (U.S.A.)

⑦ Haneoka M., Microfluidic active sorting of DNA molecules labeled with single quantum dots using flow switching by a hydrogel sol-gel transition, *The 15th international conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences*, 2011年10月5日, Seattle (U.S.A.)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白崎 善隆 (SHIRASAKI YOSHITAKA)  
独立行政法人理化学研究所・免疫ゲノミクス  
研究グループ・研究員  
研究者番号: 70469948

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者