

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440074

研究課題名(和文)リアルタイム分泌測定の高スループット化と細胞間相互作用解析法の開発

研究課題名(英文)Development of high-throughput Real-time single-cell secretion assay systems

## 研究代表者

白崎 善隆 (Shirasaki, Yoshitaka)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70469948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では単一細胞レベルでの遺伝子発現の観点から免疫システムの構築・作動原理の解明に迫ることを目指した。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液性因子分泌活性を単一細胞レベルでリアルタイムに定量する方法を利用し、数百～数千個の免疫細胞からの分泌活性を秒～分オーダーの高い時間分解能で測定するシステムを開発した。研究期間内において、我々は導波路型全反射照明装置と導波路基板とした石英スライドガラス上に細胞を個々に収める微細加工凹アレイを構築するチップ構造を確立した。このチップを用いることで2500凹アレイに入れた個々の細胞の分泌活性を1分毎に撮影することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This project focused on developing the techniques for the single-cell secretion dynamics measurement, which will contribute to understanding of the detailed mechanism of immune systems regulation at single-cell resolution. During this project, I succeeded in developing a novel micro-fabricated waveguide chip for wide field total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). This chip has the optical refraction index matching layer on both side of quartz light wave guide slide, and nano-litter well array made by PDMS on top side. Using this chip with the wave-guide illuminator, we measured single-cell cytokine secretion dynamics from hundreds of single-cells every minute for over 2hours.

This optical wave-guide based TIRFM system has great potential for revealing single-cell secretion dynamics and will contribute to develop the measurement technique for analyzing cell-cell interaction via humoral factors.

研究分野：生物物理学

キーワード：1細胞生物学 サイトカイン分泌 全反射顕微鏡 導波路照明

### 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な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。例えば type1 インターフェロンシステムは、ウイルス感染時の確率的な初期 IFN- $\alpha$  分泌誘導を発端に同一細胞集団内においても不均一な様相を呈することでシステムの恒常性を維持することが示唆されている (Rand U *et al.*, *Mol Syst Biol.*, **8**:584 (2012)). これらの既報が示すように、哺乳動物細胞においては、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は、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。一方で、免疫系においてはシステムの異常遷移をもたらす疾病、例えばアレルギーやアトピー性皮膚炎、自己免疫疾患等が知られている。現状では、これらの疾病を誘引する遺伝子の同定が先行しているが、必ずしも単一の遺伝子によって引き起こされるわけではない。このような背景から、免疫学においては、これまで考えられてきた免疫反応の線形的な捉え方を発展させ、細胞間の不均一性を包括した動的なシステムとして免疫反応を理解することが求められている。

### 2. 研究の目的

免疫系の有する高いロバスト性がシステム的にどのように実現されているのかを解明することは、単に基礎生物学としてだけでなく、数多くの免疫系の破綻に由来する疾患の克服のためにも重要な意味を持つ。本研究では単一細胞レベルでの遺伝子発現の観点から免疫システムの構築・作動原理の解明に迫ることを目指す。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液性因子分泌活性を単一細胞レベルでリアルタイムに定量する方法を利用し、数百~数千個の免疫細胞からの分泌活性を秒~分オーダーの高い時間分解能で測定するシステムを開発する。

### 3. 研究の方法

従来の単一細胞レベルのサイトカイン分泌活性の測定は、イムノアッセイに基づくため Bound/Free (B/F) 分離が必須であり、スナップショットの解析しか出来なかった。そこで、図1のように全反射照明による近接場を利用した B/F 分離を必要としない蛍光サンドイッチイムノアッセイを単一細胞レベルで実現する方法を開発し、数十細胞からのサイトカインの分泌を1分毎にイメージングする。さらに、本法は蛍光顕微鏡下で行われるため、

通常のライブセルイメージングと組み合わせることが出来る。

本研究では、さらに上記の検出原理をもとに、

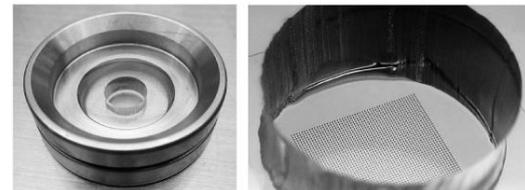
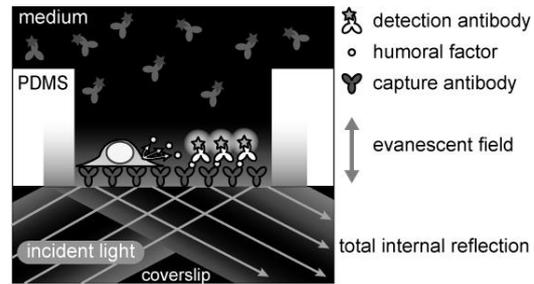


図1：近接場を利用し、B/F 分離なしでイムノアッセイを行う。連続的に分泌量測定が可能。

よりハイスループットな測定が達成されるようにシステムを改良する。

具体的には、これまでの対物レンズを介した全反射照明から図2のような光導路基板を用いた広域全反射照明へと発展させる。

### Scheme of lightguide TIRFM system

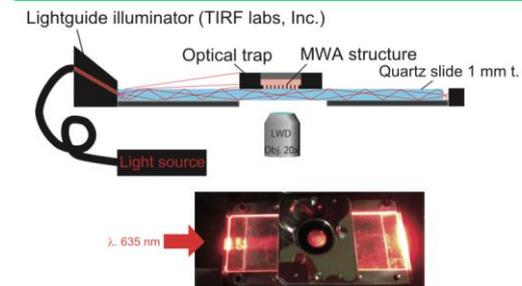


図2：導波路基板を用いた広域全反射照明装置

### 4. 研究成果

(1) 対物レンズ型全反射顕微鏡による数十細胞からの1分毎のサイトカイン分泌の可視化

上記図1で示した全反射チップを用いて、1細胞レベルでのタンパク質分泌を実時間で観察するプラットフォームを確立し(発表論文1)、マウス腹腔マクロファージからのパイロトーシスに伴う IL-1 $\beta$  バーストがカスペーゼ1活性化に引き続き生じることを世界で初めて1細胞レベルでイメージングすることに成功した(図3、発表論文2)

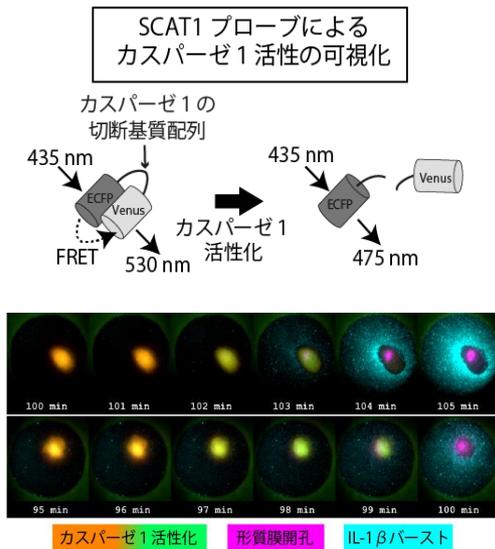


図3：パイロトーシスに伴う IL-1  $\beta$  バーストの可視化

(2) 光導路基板を用いた広域全反射照明を用いた1細胞実時間分泌システムの基礎技術の確立

**TIRF technology** 社 導波路型全反射照明装置を利用した広域全反射照明システムを用いて、石英ガラスを導波路基板とし、水と同等の屈折率を有するアモルファスフルオロポリマーCYTOPをPDMSと導波路のバインダーとして用いることで、励起光の漏れ込みを低減することに成功した。さらにマイクロウェルアレイ部と励起光導入部の間にカーボンブラックを練り込んだPDMSを吸収体として乗せることで、余分な迷光の削減を行った。さらに、裏面からの迷光を削減する工夫を行うことで分泌観察が可能になる程度まで背蛍光を下げることに成功した。

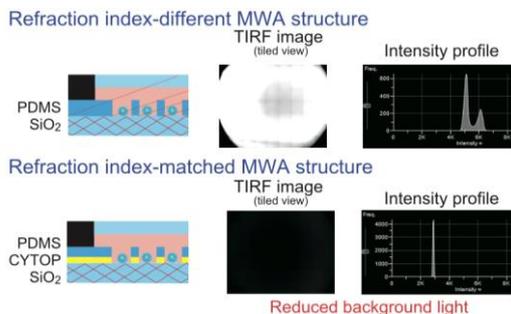


図4：CYTOPによる屈折率マッチング層は漏れ光を減少させる

このシステムを用いて、肥満細胞株 MC/9 からのサイトカイン分泌を可視化したところ、1分間に約 2000 ウェルをスキャンすることが可能となり、数千細胞からの実時間分泌測

定を達成することができた。

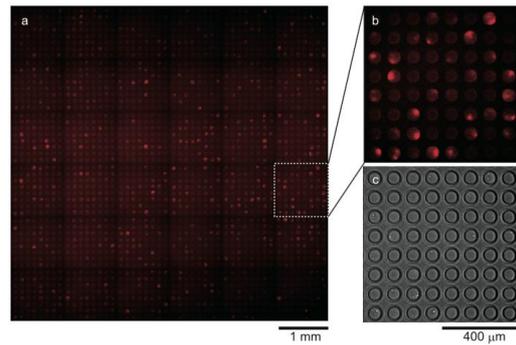


図5：導波路型全反射照明を用いたハイスループットな1細胞分泌実時間イメージング

本研究では、1細胞からの分泌を1分間隔で撮影することに成功し、これまで未知であった IL-1  $\beta$  の分泌機構の一端を明らかにすることができた。さらに、光導路による広域照明装置と1細胞分泌実時間イメージングを組み合わせることに成功し、数千ウェルに確率的に導入した数百細胞からの分泌を1分間隔で撮影することに成功した。

一方で、当初予定していた細胞間コミュニケーションチップの作製までには至らず、今後の課題となった。

#### 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3件)

- ① 白崎善隆, 山岸舞, 小原收, 上村想太郎, "1細胞分泌実時間イメージング法、細胞工学 Vol.34 No.3 2015年3月号 ISBN:4-7809-0164-2, p.304-309, 2015 <http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901641.html> 査読なし
- ② T. Liu, Y. Yamaguchi, Y. Shirasaki, K. Shikada, M. Yamagishi, K. Hoshino, T. Kaisho, K. Takemoto, T. Suzuki, E. Kuranaga, O. Ohara, M. Miura, "Real-time single cell analysis provides direct evidence that digital activation of caspase-1 couples macrophage cell death and IL-1  $\beta$  secretion", Cell Rep., 8 (4), 974-982, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.012. 査読有り
- ③ Y. Shirasaki, M. Yamagishi, N. Suzuki, K. Izawa, A. Nakahara, J. Mizuno, S. Shoji, T. Heike, Y. Harada, R. Nishikomori, O. Ohara, "Real-time single-cell imaging of protein

secretion” , Sci. Rep., 4, 4736, 2014,  
doi: 10.1038/srep04736.、査読有り

[学会発表] (計8件)

- ① Y. Shirasaki et al, Real-time single-cell secretion imaging revealed heterogeneity of cellsecretion, The 53<sup>rd</sup> annual meeting of Biophysical society of Japan, 2015, Sep.13-15, 金沢大学 (石川県金沢市)
- ② Y. Shirasaki et al, High-throughput Single-cell secretion measurement on an optical waveguide chip, The 18<sup>th</sup> microTAS, 2014, Oct. 26-30, Texas (USA)
- ③ 白崎 善隆 他、1細胞分泌実時間測定による IL-1  $\beta$  非古典的分泌機序の解明、第52回日本生物物理学会年会、2014年9月25-27日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ④ Y. Shirasaki et al., Time-resolved live-cell FluoroSpot assay on Total internal reflection fluorescence microscopy, EMBL conference series Microfluidics 2014, July 23-25, Heidelberg (Germany)
- ⑤ 白崎 善隆 他、炎症性細胞死に伴う IL-1  $\beta$  サイトカイン分泌の1細胞イメージング、第23回日本 Cell Death 学会学術集会、2014年7月18-19日、東京医科歯科大学 (東京都文京区)
- ⑥ 白崎 善隆 他、リアルタイム分泌イメージング法を用いたインフラマソーム活性化に伴う IL-1  $\beta$  分泌機序の解析、第66回日本細胞生物学会大会、2014年6月11-13日、奈良県新公会堂、東大寺総合文化センター (奈良県奈良市)
- ⑦ Y. Shirasaki et al, Real-time single-cell imaging of IL-1beta secretion by inflamemases, CSH 2014 meeting on Gene expression & signaling in the immune system, 2014 April 22-26, New York (USA)
- ⑧ Y. Shirasaki et al, Real-time secretion analysis revealed correlation of IL-1beta release and loss of cell membrane integrity, microTAS2013, 2013 Oct. 27-31, Freiburg (Germany)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白崎 善隆 (SHIRASAKI, yoshitaka)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号 : 70469948