

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440087

研究課題名(和文) 単一細胞レベルの液性因子分泌リアルタイム測定を用いた細胞間相互作用の直接的解析

研究課題名(英文) Development of direct observation system for cell-to-cell communications via humoral factors based on the single cell real-time secretion assay.

研究代表者

山岸 舞(白崎)(Yamagishi, Mai)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：90332501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、相互作用する個々の細胞間で分泌された液性因子を可視化するプラットフォーム並びに、そのプラットフォーム上でサイトカインを受容して誘導される細胞内での遺伝子発現を *in situ* で検出するシステムを統合して、細胞間相互作用ネットワーク動態の直接的な解析から生体システムを理解することを目指した。細胞間相互作用を維持したまま分泌検出をするプラットフォームはプロトタイプを完成させ、実際に一細胞粒度での分泌検出が可能であることを確認した。また、プラットフォーム上でRNA-FISHを行う系を確立した。さらにmRNA発現や複数種の細胞に対する分泌活性モニタリングに着手した。

研究成果の概要(英文)：In this study, to understand biological systems by directly analyzing cell-to-cell communication network dynamics, I tried to develop the following systems. That is, a platform for visualizing humoral factors secreted from individual cells with interacting each other, and a method that can quantify gene expression in the cells on the platform. I successfully developed a prototype of the platform that allowed to detect secretion with maintaining cell-to-cell communication, and actually confirmed that secretion detection could be achieved at a single cell level. Beside, a system for RNA-FISH on the platform was established. Furthermore, I also launched additional challenges including real-time monitoring of mRNA expression as a visualization method for cell responses, visualization of exosome release from a single cell, and so on.

研究分野：生物物理学

キーワード：一細胞 イメージング 分泌 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

生体が恒常性を維持し健康な状態でいられるのは、複数のロバスタなシステムがこれを支えているからである。例えば免疫システムは、病原体などの非自己から生体を防御し、これを排除して恒常性を維持する。多種の免疫細胞によって担われるシステムであるが、細胞種毎に機能が異なっており、それらが協働するためには、細胞間相互作用による情報のやり取りが不可欠である。免疫細胞の細胞間相互作用にはサイトカインとよばれる一群の可溶性タンパク質の分泌とその受容を介したものが非常に重要であると考えられており、ある特定のサイトカインを与えた場合の細胞毎の異なる応答が詳細に調べられ、これを基に様々な免疫反応を記述してきた。そのような経緯から、「適切な場面で、適切なサイトカインが放出され、適切な免疫細胞種がこれを受容することによって、免疫システムが適切に機能する」こと、つまり、サイトカインの分泌・授受が厳密に制御されていること、が免疫のロバスタ性を与えていると長年信じられてきた。ところが、近年の一細胞計測技術の発展により、同一種類の免疫細胞間であっても、遺伝子発現や機能が非常に不均一であることが明らかになり、それまでの概念が覆される一方で、非常に多様な細胞の集団から、それでもロバスタな応答が生じる分子メカニズムを細胞間相互作用に求める声が高まった。現在様々な理論的・実験的アプローチにより、細胞間相互作用がどのように成立しているか、その動態を探る研究が展開されている。しかしながら特にサイトカインのような可溶性タンパク質の授受による細胞間相互作用を直接観察する方法が無かったため、提案されている相互作用動態は想像の域を出ないのが現状であった。

一方、研究代表者は、研究協力者である白崎善隆博士らとともに、マイクロウェル中の1細胞からのサイトカイン分泌計測をリアルタイムに行う系の開発に成功していた (Shirasaki *et al.*, *Sci. Rep.* 4, 4736 (2014))。この方法は、蛍光イムノアッセイに基づき、全反射による近接場を用いた照明法を利用することで、洗浄過程を必要としないリアルタイム分泌検出を可能にしたものである。

2. 研究の目的

本研究では、相互作用しあう個々の細胞において分泌された液性因子の授受を可視化するプラットフォーム、ならびに、そのプラットフォーム上で一細胞毎の遺伝子発現が定量できるシステムを開発して、細胞間相互作用ネットワーク動態の直接的な解析を行うシステムを実現することを目的とした。これにより、一細胞から一細胞への階層を超えた生命の理解への一助としたいと考えた。

3. 研究の方法

研究代表者らが開発した1細胞分泌リアルタイム計測法を進展させ、細胞間の相互作用を維持したまま分泌計測ができるプラットフォーム、ならびに、分泌されたサイトカインを受容して誘導される細胞内での遺伝子発現を *in situ* で検出するための方法を確立する。

(1) 細胞間相互作用を維持する計測プラットフォームの開発

本研究での基盤技術である1細胞分泌リアルタイム計測法は、マイクロウェル中で培養している細胞から分泌されたサイトカインを、ガラス製ウェル底面上の捕捉抗体で捕捉する。培養液中には蛍光検出抗体が含まれており、捕捉されたサイトカインに結合してサンドイッチ免疫複合体を形成する。溶液中のフリーの蛍光抗体を検出せずに底面に固定された蛍光複合体だけを検出するため、全反射による近接場を用いた照明法を利用し、これにより、細胞外液を交換・洗浄することなくリアルタイムに分泌されたサイトカインを検出している。生きた細胞の分泌活性を経時的に測定できることから、相互作用のモニタリングに最も近い技術と考えた。この技術を適用するにあたり問題がいくつかあった。まず、細胞の遊走や流出を最小限にするためにマイクロウェルアレイ構造を使用して細胞を孤立させているため、そもそも細胞間で相互作用できない状態になっていること、また、細胞の周囲のガラス底面上で分泌を検出しているため、細胞間が密着しているような上皮細胞間などでは分泌を測定することができないこと、である。前者についてはマイクロウェル構造フリーの分泌測定基板を開発すること、後者については細胞を載せる細胞基板と分泌サイトカインを検出する検出基板を分離した方法を開発することで、この問題の解決を試みた。

(2) 任意のタイミングにおける1細胞 *in situ* mRNA 発現量解析法の確立

リアルタイムに相互作用をモニタリングしている間、任意のタイミングにおいて既報で見られているような細胞内部の mRNA 発現量定量結果などを、本測定系でも得られるように設計する。これによって、これまでバルク解析で培われてきた細胞間相互作用に関する知見との比較検討を行うことが可能となる。

4. 研究成果

(1) マイクロウェル構造フリーの分泌基板の開発

細胞間相互作用を維持したままの分泌検出基板として、マイクロウェル構造を持たない基板上でのリアルタイム検出が可能かどうかの検討を行った。マイクロウェル構造は細胞の遊走や流出を限局するだけでなく、分泌されたサイトカインを散逸させない効果も

有していたため、細胞の移動ならびに検出感度に対する懸念があった。そこで、マウス自然リンパ球を用いてマイクロウェル構造フリーでも分泌を検出することができるか検証した。活性化した自然リンパ球は運動性が高く、広範にわたって遊走することが予想されたので、直径2.5 mmの円形領域を8分に1回の頻度でスキャンし続けることで継時的観察を行った。その結果、細胞の運動、ならびに分泌をリアルタイムに検出することができた。

(2) 相互作用モデルの検討

相互作用検出プラットフォームを開発するにあたり、入手・取り扱いが簡便である培養細胞において、液性因子を介した相互作用を行う適当なモデルがないかを検討した。複数のマクロファージ様株化細胞を用い、グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) 刺激時に種々のサイトカインを放出するようになる現象を選び、液性因子を介した相互作用があるかを調べた。それらのうち、RAW 264.7 細胞株においてインターフェロン (IFN) - β の分泌を介した *Cxcl10* 遺伝子の発現誘導が再現性良く観察できる条件を見出した。以降、このモデルを用いてシステム開発を行った。

(3) IFN- β の分泌を介した相互作用の可視化 (スナップショット解析)

上記相互作用モデルにおいて、分泌された IFN- β を介した細胞間の相互作用は、どのくらいの距離の細胞間で起こり、どの程度の細胞数が関与し得るのか、等の情報を得るため、研究代表者らが既に開発していた蛍光イムノスポット/ RNA 蛍光免疫組織染色 (RNA-FISH) ハイブリッドアッセイ法 (論文投稿準備中) を適用した。この方法は、LPS 刺激を与えて4時間の培養の間に分泌されたタンパク質 X をイムノスポットアッセイと同一の原理で培養容器底面に固定し、これを、細胞を洗い流すことなく細胞外液を置換することで蛍光標識し、さらにこの時点において細胞を固定して、*Cxcl10* 遺伝子に対する RNA-FISH を行うというものである。その結果であるが、まず、IFN- β はすべての細胞から分泌されるわけではなく、特に強い分泌を呈するものはごく一部の細胞であった。細胞から分泌された IFN- β は、細胞周辺の数十マイクロメートルのエリア内で強く検出された。一方の *Cxcl10* 遺伝子の発現については、IFN- β を分泌している細胞と、その細胞に隣接する IFN- β 検出エリア内の細胞において *Cxcl10* 遺伝子が高発現している割合が高いことが確認された。隣接していない近傍細胞でも高発現がみられることはあったが、3細胞以上離れる距離での相互作用らしい挙動は確定できなかった。以上のことから、IFN- β を介した細胞間相互作用を蛍光イムノスポット/ RNA-FISH 基板上で示唆することができ、

特に隣接細胞間という限られた範囲において液性因子を介した相互作用が行われていることがわかった。

(4) 細胞基板と検出基板を分離した分泌リアルタイム検出法の開発

相互作用する細胞を生着させて、かつ液性因子分泌の観察ならびに細胞の観察を損なわない細胞基板作製に着手した。まず、細胞基板支持体として多孔質並びに光透過性の高い素材である VECCELL (ベセル株式会社) を選定した。VECELL は3次元培養用に開発された素材であり、24 ウェルプレートに対応したインサート (Preset VECCELL) として市販されている。このインサートの裏面を細胞基板として使い、カバーガラスから作成した検出基板と近接させる方法を検討した。インサートの表面は細胞生着に最適なコーティングがされており、ここに相互作用モデル細胞の RAW 264.7 細胞を播種してその増殖を観察したところ、期待されたように長時間にわたって細胞の活性を失わない状態で観察ができた。一方、細胞基板表面として使用を考えていたインサート裏面にはコーティング処理が施されていないため、ベセル株式会社のご協力のもと、裏面にコーティングを施した特注品を作成していただいた。次に、この基板上の細胞から分泌されたタンパク質を検出するための基板配置の最適化を行った。サイトカインなどの液性因子は溶液中を拡散して希釈されるため、分泌の検出ならびに分泌細胞の特定のためには細胞基板と検出基板をきわめて近接させる必要があった。しかしながら、VECELL は多少の伸縮性を持ち、特に水溶液中では粘性によりたわみを持つため、一定値以上は基板間の距離を縮小させることができなかった。そこで、基板間に陰圧をかけて、基板間距離を最小限に小さくする仕組みを考案し、試作品を作製した。この試作品では基板間距離が数十 μm 程度であった。作製した試作品を用い、RAW264.7 細胞を LPS 刺激した後に、細胞より分泌される IL-6 のリアルタイム検出を試みたところ、これを検出することができ、分泌細胞も同定することができた。

(5) 相互作用モデルのリアルタイムモニタリングの試み

上記の細胞基板挿入型分泌リアルタイム検出のための試作品を用い、相互作用モデルである RAW 264.7 細胞の IFN- β を介した相互作用の実時間可視化を目指した。IFN- β のリアルタイム可視化に必要なサンドイッチ抗体セットの選定を行ったが市販されている抗体が非常に少ない上に条件に適うものは1社からしか販売されておらず、これの親和性が極端に低いため難航している。同時に行う細胞応答の可視化法についても検討した。このモデルにおける細胞間相互作用では、種々の検討から IFN- β を受容した後1時間程度で

Cxcl10 遺伝子が発現する、比較的早い応答であることが分かった。そのため、レポーターシステムなどの応用は行わず、相互作用の結果である *Cxcl10* 遺伝子の mRNA 発現のリアルタイム可視化を行うことを試みた。可視化プローブとして既報のものを候補として検討を行ったが、Echo プローブ (Chem. Asian J., 3, 958-, 2008) についてはシグナル/ノイズ比が非常に小さかったために使用を断念した。RNA アプタマーを遺伝子的に導入して *Cxcl10* 遺伝子の可視化を行う方法に着手し、改良型 Spinach (iSpinach; Nucl. Acids. Res., 44, 2491-, 2016) 等について検証を行っている。期間内では本モデルの相互作用可視化の系を完成させることが出来なかったが引き続き検討を行う機会を得たい。

(5) 細胞基板挿入型分泌リアルタイム検出の応用

相互作用をモニタリングするための細胞基板挿入型分泌リアルタイム検出系であるが、細胞本体と分泌物の捕捉・検出が離れている点を生かし、単一細胞からのエクソソーム放出の可視化について検討を行った。エクソソームを大量に放出することが知られている間葉系ガン細胞由来の培養細胞で、エクソソーム表面に発現している CD63 タンパク質に蛍光標識を融合させた遺伝子を安定的に組み込んだものをモデルとして用いた。CD63 は細胞表面にも多く発現していることが知られており、そのため、細胞自体が強い蛍光を持ち、分泌されたエクソソームの微弱な蛍光を検出する妨げとなっていた。本システムによって細胞体の強い蛍光と識別できる粒子状の蛍光体の出現を確認できた。これがエクソソームであるかどうかさらなる検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 13 件)

山岸 舞, 白崎 善隆, 堀 豊, 鈴木 信勇, 小原 收, 上村 想太郎 「細胞集積度によるパラクラインシグナリングの制御により遺伝子発現の安定性が変化した」 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 25 日~27 日、つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

田中 優実子, 白崎 善隆, 山岸 舞, 宮田 楓, 鈴木 信勇, 小原 收, 茂呂 和世, 上村 想太郎 「実時間選択的回収による免疫細胞の 1 細胞遺伝子発現解析」 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 25 日~27 日、つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

藤波 哲郎, 小口 祐伴, 山岸 舞, 白崎 善隆, 上村 想太郎 「一細胞トランスクリプトーム解析へ向けた、PCR を含ま

ないライブラリー調製」 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 25 日~27 日、つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

宮田 楓, 白崎 善隆, 鈴木 信勇, 加畑 宏樹, 山岸 舞, 小原 收, 福永 興彦, 茂呂 和世, 上村 想太郎 「ヒト免疫応答の 1 細胞実時間イメージングによるアレルギー診断の可能性」 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 25 日~27 日、つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

Yumiko Tanaka, Yoshitaka Shirasaki, Mai Yamagishi, Kaede Miyata, Nobutake Suzuki, Osamu Ohara, Kazuyo Moro, Sotaro Uemura "Novel Compensation method for Gene Expression Fluctuation by Real-time Single cell Selection" CBI 学会 2016 年大会、2016 年 10 月 25 日、タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

山岸 舞, 白崎 善隆, 鈴木 信勇, 山口 良文, 三浦 正幸, 小原 收, 上村 想太郎 「1 細胞実時間イメージングから見た細胞死と IL-1 β 分泌の多様性」 第 25 回日本 Cell Death 学会学術集会、2016 年 9 月 9 日~10 日、きゅりあん (東京都・品川区)

山岸 舞, 白崎 善隆, 鈴木 信勇, 小原 收, 上村 想太郎 「ELISpot/RNA-FISH ハイブリット法を用いた細胞密度依存的遺伝子発現誘導機序の解明」 第 68 回日本細胞生物学会大会 & 第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会合同大会、2016 年 6 月 15 日~17 日、京都テルサ (京都府・京都市)

田中 優実子, 白崎 善隆, 宮田 楓, 山岸 舞, 鈴木 信勇, 小原 收, 茂呂 和世, 上村 想太郎 「選択的 1 細胞回収による NH 細胞の 2 型サイトカイン応答における遺伝子発現解析」 第 68 回日本細胞生物学会大会 & 第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会合同大会、2016 年 6 月 15 日~17 日、京都テルサ (京都府・京都市)

宮田 楓, 白崎 善隆, 鈴木 信勇, 山岸 舞, 小原 收, 茂呂 和世, 上村 想太郎 「NH 細胞による 2 型サイトカイン応答の 1 細胞分泌動態解析」 第 68 回日本細胞生物学会大会 & 第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会合同大会、2016 年 6 月 15 日~17 日、京都テルサ (京都府・京都市)

岡村 美希, 白崎 善隆, 山岸 舞, 鈴木 信勇, 上村 想太郎 「1 細胞分泌実時間イメージングから見た IL-1b 分泌動態の多様性」 第 68 回日本細胞生物学会大会 & 第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会合同大会、2016 年 6 月 15 日~17 日、京都テルサ (京都府・京都市)

白崎 善隆、劉 霆、山口 良文、山岸 舞、鈴木 信勇、三浦 正幸、小原 收、上村 想太郎 「1 細胞分泌実時間イメージングが明らかにした細胞分泌動態の不均一性」 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年 9 月 13 日～15 日、金沢大学（石川県・金沢市）

宮田 楓、白崎 善隆、鈴木 信勇、山岸 舞、上村 想太郎 「1 細胞分泌実時間イメージングの並列測定プラットフォーム」 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年 9 月 13 日～15 日、金沢大学（石川県・金沢市）

Shirasaki, Y., Suzuki, N., Yamagishi, M., Nakahara, A., Shoji, S. and Ohara, O. "High-throughput single-cell secretion measurement on an optical waveguide chip." The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 26-30 Oct 2014, San Antonio (Texas, USA)

〔図書〕(計 1 件)

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』、秀潤社、Vol.34 No.3、(2015) 230 (304-309)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 舞 (MAI YAMAGISHI)
東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員
研究者番号：90332501

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

白崎 善隆 (YOSHITAKA SHIRASAKI)
東京大学・大学院理学系研究科・助教