

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K20103

研究課題名(和文)新規セルデリバリーシステム開発へ向けた運び屋ベクターの作成

研究課題名(英文)The creation of the de novo vector for the newly Cell Delivery System (CDS)

研究代表者

光永 佳奈枝(Mitsunaga, Kanae)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：10398240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筋ジストロフィー症などの全身性難病の治癒を目標とし、治療細胞を全身に運ぶ運び屋(ベクター)を作成するため、効率良い細胞体取得のために培養方法の開発を行なった。

宿主材料であるHM:(ヒラメ、マグロ)BTK:(鰺、鯛、鯉)を主たる材料とし、細胞体分離技術「フリーアミン寄生生物分離法」の開発に成功した。イメージストリームにより細胞体の確認、治療細胞開発のための培養有無、スライス培養法などでミクソゾアを共存培養した。結果、採取するミクソゾア類の回収時の生存率が僅かに向上し、ベクターとして開発するためのミクソゾア類の安定培養法探索に至った。研究の副産物として、SSメッシュ法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、筋ジストロフィー症などの全身性難病の治癒を目標とし、治療細胞を全身に運ぶ運び屋(ベクター)を作成するため、細胞体の分取と培養方法の開発を行なった。治療細胞を本研究で開発する細胞体に寄与させ、全身に治療細胞を運ぶ技術である。宿主材料には、日頃食するさしみ、HM:ヒラメ、マグロ、BTK:鰺、鯛、鯉を利用した。さしみ組織をターゲットとして寄生する細胞体の性質を利用した。

成果として、細胞体分離技術「フリーアミン寄生生物分離法」開発の成功に至り、少なくとも寄生生物の培養が可能であることがわかった。本成果は移植医療の発展とミクソゾア類生態の解明及び養殖業での病害虫被害への応用にも期待できる

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to cure intractable systemic diseases such as ALS, and developed a culture method for efficient cell body acquisition in order to create a carrier (vector) that carries therapeutic cells throughout the body.

Succeeded in developing the cell body separation technology "Free-Amine Isolation Method" using the host materials HM: flatfish and tuna, BTK: bonito, sea bream, and bonito as the main materials. Confirmation and treatment of cell bodies by ImageStream. Mixozoa was co-cultured by the presence or absence of culture for cell development, slice culture method, etc. As a result, the survival rate at the time of recovery of the collected Myxozoa was slightly improved, and a stable culture method for Myxozoa to be developed as a vector. Although the purpose of this study could not be achieved, the initial research concept is a 30-year plan, and it is easy to acquire "Sashimi" to be used as a material, so I will continue to develop cell delivery systems (CDS).

研究分野：生物工学、発生生物学

キーワード：CDS セルデリバリーシステム HM,BTK sashimi ImageStream Myxozoa 共存培養技術

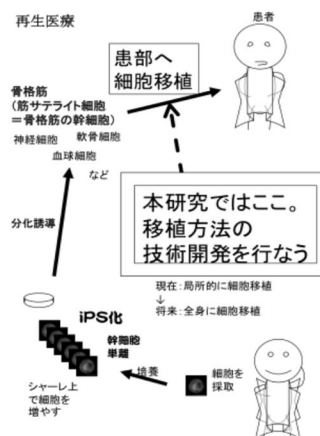
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

セルデリバリーシステム(CDS)は、今迄に無い新しい技術であり、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の細胞版として、体内において、ドラッグではなく、移植に有用な治療細胞を目的の場所まで運ぶ。

現在の移植技術では、針やシートを使い、局所的な移植をする他は無く、全身性疾患の治療を目的とした細部移植は困難となる。そこで、全身に治療用の細胞を配置させ、偽損傷シグナルを発するセルデリバリーシステム(CDS)を開発することができれば、少なくとも寛解の移植医療が推進される。

当初、本研究では筋ジストロフィー症などの全身性難病の治療を目標とし、再生医療において夢の技術とされる治療細胞を全身に運ぶ運び屋(ベクター)を作成するべく、筋肉への遊走性が高く、筋組織に寄与し、構造的に細胞を包接しうるミクソゾア類に着目した。そしてそれを移植細胞と共に全身の筋肉組織に運ぶ運搬体に仕上げていくために CDS ベクターの開発に着手した。本研究の構想は30年計画であり、研究の全概要は右図に示す。



2. 研究の目的

研究の目的は、再生医療において夢の技術とされる 全身へ治療細胞を運ぶことが可能なセルデリバリーシステム(CDS)を開発することである(右図)。本研究の中では開発基盤となる『細胞を目的の場所に運ぶ運び屋(ベクター)』を作る。

市販のさしみを扱い、フリーアミンに結合する細胞体をFACSで単離し、細胞体の形態観察、遊走性の有無、寄生虫の培養法の確立を行なう。

宿主材料としたのは、HM:ヒラメ、マグロ(flounder, tuna: HM,)BTK: 鰺、鯛、鯉 (Yellowtail, sea bream and bonito: BTK) の5種類である。

3. 研究の方法

現在では転移するがん細胞を用いて、ドラッグデリバリーシステムの開発案も出てきているが、本研究の最終目標が、『生体に移植』し、『移植後に運び屋ベクターだけを完全排除または生体への吸収が行われる必要がある』ため、ベクターには同一種ではなく、異種である魚を利用した。魚の中でも、実験を行うための材料として簡単に入手可能で、たとえ寄生虫が混在していても、正常人であれば腸内で排除されることを思案し、日頃食するさしみを利用した。

さしみは日本人を始め、海外でも食され、入手し易く、飼育、養殖の技術も発展していることから、開発が成功したのちには治療技術を安価に提供できる可能性が十分にある。

また全世界で進行中であるパーキンソン疾患の移植医療は、中脳に治療細胞を移植しても一時的な症状の回復が認められるもの、寛解な回復のみで、1年から2年で症状がもどってしまう。細胞が脱落する疾患の場合、繰り返しの移植を行う必要も予測されるため、安価で入手しやすい材料を選択した。

計画では、魚の筋組織(さしみ)に寄生する運び屋ベクター候補を大量に採取し、形態やイメージング解析を通じ、基礎データを取得するとともに、遺伝子構造や機能、筋組織へ寄与する遺伝子の同定を行う。さらにはベクターと治療細胞の結合解析とリンカーの開発を行いベクターの無毒化まで行う予定であった(上図)しかしながら開発への制約があったため、本研究成果ではベクター候補の単離方法と培養技術の探索を重点的に行なった。

実験方法を以下に示す。

- 魚の筋組織に寄生する運び屋ベクターを単離する

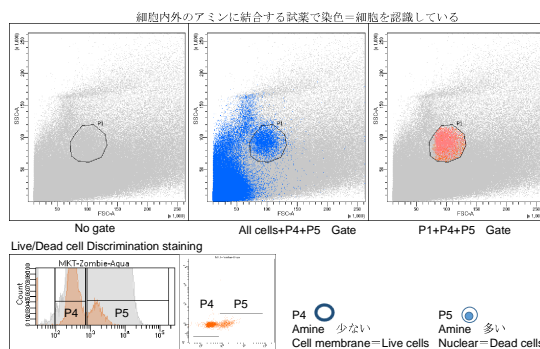


日常に食する外遊性の魚から筋組織に寄与する細胞生物を Accutase またはトリプシン処理によって、ばらばらにする。フローサイトメトリーを使い、アミン結合性の生死判定試薬を用い、分離する。一般に抗体を用いて細胞内の遺伝子発現を FACS 解析するためには、死細胞の分画を除いてゲート(細胞集団を生きた細胞に限定する)をかけなければならない。固定操作が入るため、PI や 7-ADD のように DNA にインターカレントする試薬では、細胞固定後に浸潤性が増す事で死細胞から PI/7-ADD が漏れ出してしまい、正確な生死判定ができない。その際に利用されている蛍光色素として、細胞に存在するフリーアミンに結合する蛍光試薬が用いられる。細胞表面に露出するフリーアミンの量に比べ、細胞内に存在する量は 1000 倍ほど多いため、細胞を固定する前にアミンと蛍光色素を結合させる事によって、生死の判別が可能となる。死に至っても見分けられるという意味でその試薬は Zombie や Ghost という試薬名がつけられているが、不可逆的にフリーアミンと結合するために固定を必要とする細胞には有用な試薬である。

単離した運び屋ベクターは、単離後、形態観察とゲノム抽出、mRNA 抽出を行うほか、凍結を行うとともに培養を行なった。培養は寄生性を失わないためにフィーダーとなるマウスの各組織から採取した初代培養細胞や Stable な培養細胞を用いた。

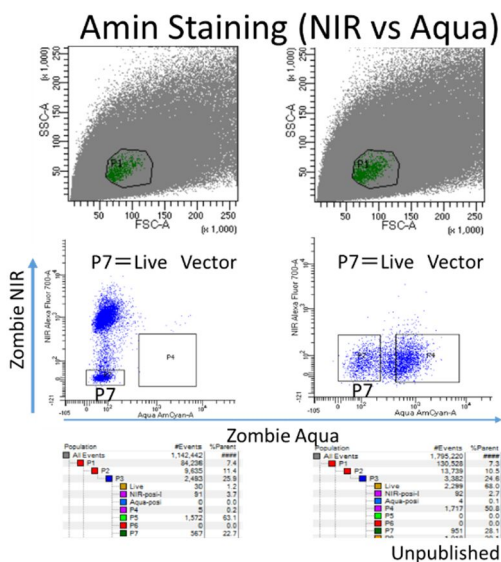
4. 研究成果

魚の血球細胞を単離する目的で、アミン結合性の生死判定試薬を用い FACS 解析を行なった所、偶然コンパクトにゲートをかけられる細胞集団 2 個を発見した(右図: 論文未発表)。その細胞集団は予定の血球細胞ではなく、魚に寄生する虫の細胞体(生細胞と死細胞)であることが分かった。用いた検体はスーパーで購入した刺身であったことから、血抜きをされていて、目的の血球細胞は 0.1% ほどであった。しかし他はすべてフリーアミン試薬で染まらない骨格筋の塊であったがために、偶然にも刺身に寄生するミクソゾア類の寄生虫を FACS 解析できる結果となった。



また染色に使用する Amine 結合する蛍光試薬の検討を行った。市販されているアミン結合の死細胞除去試薬は 7 種類あり (ZombieAqua™, ZombieGreen™, ZombieNIR™, ZombieRed™, ZombieUV™, ZombieViolet™, ZombieYellow™: Biologend co., Ltd.) 結果ミクソゾア類を解析分離、取得単離するために、Aqua が最も適していることが分かった(未発表)、本研究で、さしみ

から寄生虫などの細胞体分離技術「フリーアミン寄生生物分離法」開発に成功した。



以後、ZombieAqua™ にて染色を行ない、細胞体の単離を試みた。結果、ゲートをかけた集団が効率よく分取できていることを確認した。計画内では市販の刺身からミクソゾア類を大量に採取し、解析に必要な数を単離する予定であったが、材料となる刺身をランダムに選んでいたため、採取した候補寄生虫ミクソゾア類の数を採取できなかった。また、魚の筋組織が多い場合、6 時間かけた 1 回の Sorting で 2000 個程度しか採取できず、時間と回数を繰り返してもイメージングをする程度しか Sorting できない。Sorting 後のサンプルを解析せず、凍結保存を行なった際には 2000 個程度では融解した後の状態が悪く、解析には十分ではなかった。

単離した P7 ゲート内の細胞集団を用いて、ゲノム抽出、mRNA 抽出を行なった結果、予測した核酸量 (ug) よりも 10 倍から 100 倍の濃さであったため、採取した細胞集団の再解析を改めて行なった。目的のゲート集団は Sorting できているものの、SSC = 50K 以下にコンタミの集団が取得されていることが明らかとなった。ゲートをかける手法は間違っていないが、ダブレット除去をするゲートで、少なくとも散乱光を Area と Hight の計算値ではなく、実測値を採用する必要性があった。そのため FACS では 1 次 Sorting のみを行ない、ゲノム抽出などへは移行せず、培養を用いた生きたミクソゾア類の維持、解析を行なうこととなった。

単離した P7 ゲートの細胞集団をイメージストリーム(細胞の画像を取得しながらドットに展

開する)にて解析を行なった。結果、ミクソゾア類の細胞のイメージングデータの取得に至った。今後、追加で解析を行ない、統計的データを取得する。今回行なったイメージストリーム解析は Sorting が不可能であるため、将来的に機器の開発が進めばイメージストリーム Sorter(ISS or catch the cell)などで2次 Sorting を行ない、より invincible な細胞集団を獲得する予定である。

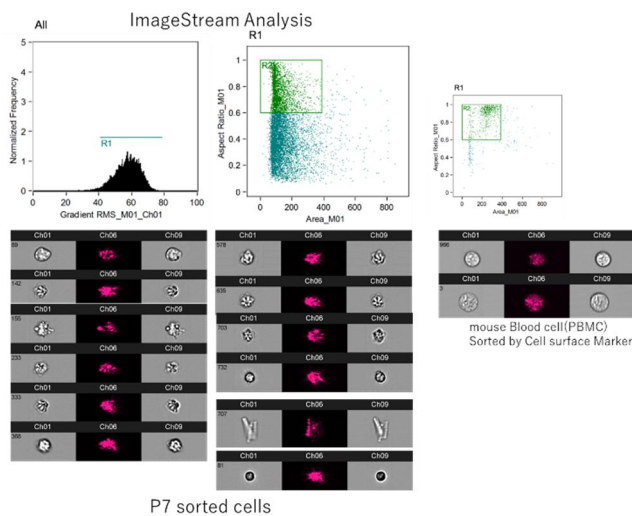
単離した P7 ゲートまたは Accutase などで消化したさしみは凍結した他マウス由来のフィーダー細胞との共存培養に使用した。

凍結は細胞凍結保存液 (バンバン

カー® : Nippon Genetics Co., Ltd.) を用いた。Sorting 後のサンプルを解析せず、凍結保存を行なった。しかし、2000 個程度では融解した後の状態が悪く、解析に使用するには十分ではなかった。魚の筋組織などのコンタミもあり、凍結方法の確立については今後の課題とする。

共存培養において、フィーダーとして用いた組織および細胞は次である。マウスの大腿直筋、精巢、卵巣、腎、肝、脾臓、子宮由来の初代培養細胞と子宮、骨髄由来の間葉系細胞 (細胞の樹立の方法は確立済み) の接着細胞。脾臓、子宮由来の浮遊細胞。結果、アミン系の試薬の添加タイミングにもよるが、採取するミクソゾア類の回収時の生存率が僅かに向上した。

当初の計画から大幅に遅れることとなったが、研究構想は 30 年計画であり、材料に使う「さしみ」の取得は容易であるため、引き続きセルデリバリーシステム (CDS) 開発を続ける。本研究において、細胞体分離技術「フリーアミン寄生生物分離法」開発に成功し、少なくとも魚の寄生虫を共存培養できることが分かった。研究の副産物として、卵巣からさまざまな大きさの細胞を取得する SS メッシュ法を開発することとなった。



mouse Blood cell(PBMC) Sorted by Cell surface Marker

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------