

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32633

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15366

研究課題名(和文) 光活性化PEG脂質を用いた血球解析・単離技術の医療応用

研究課題名(英文) Single-cell analysis and isolation of human blood cells on photoactivatable PEG-lipid surfaces for medical applications

研究代表者

山平 真也 (YAMAHIRA, Shinya)

聖路加国際大学・医科学研究センター・卓越研究員

研究者番号：70750652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1細胞単位で生細胞を容易に操作可能な光応答性の接着剤(光活性化PEG脂質)の医療応用として、1細胞操作技術が必要とされている2種類の医療課題に適用した。ヒト血球の1細胞解析では、細胞が1細胞ずつ基盤の目状に配置された1細胞アレイ化がヒト血球でも可能であること、および本技術を適用できる細胞の種類を確認し、迅速・簡便かつ安価に毎分数十万細胞の画像解析が可能であることが確認された。ヒト血球の1細胞分離では、既存の顕微鏡を用いた直感的で簡便かつ迅速な手法により、多数のがん細胞の中から1個のヒトT細胞を単離し、がん細胞などに特異性を有するタンパク質の遺伝子配列の解析が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代の基礎研究や創薬、医療の発展のために、1細胞単位で細胞を詳細に解析・単離する技術の開発が必要とされている。しかし、現状では迅速・簡便かつ安価な1細胞解析・回収手法が無く、1細胞技術を使用できる研究者・医療従事者は限られている。本研究では、光活性化PEG脂質をコートした安価な消耗品を用いる事により、一般的な研究機器のみで迅速・簡便に1細胞単位で解析・回収する技術を実証した。本技術は、ヒト血球に適用でき、医療で必要とされているアプリケーションに利用することが可能であった。したがって、現状ハードルの高い1細胞単位の研究・検査の一般化に、本技術は大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a photo-responsive adhesive (photo-activatable PEG-lipid) which can easily manipulate single living cells was applied to two types of medical application that require single-cell manipulation. For the single-cell analysis of human blood cells, single-cell array, in which cells are arranged one by one in a grid pattern, was developed with human blood cells by using photo-activatable PEG-lipid surface, and the type of cells to which this technology can be applied was inspected. Image-based analysis of 0.1 million cells was complete within a minute on this single cell array in a simple and inexpensive manner. For the single-cell sorting of human blood cells, single human T cell from a large number of cancer cells can be isolated rapidly on the photo-activatable PEG-lipid surface using a conventional microscope in an intuitive and simple manner. And then, the gene sequence of a T cell receptor on the isolated single-cell can be analyzed accurately.

研究分野：機能性材料

キーワード：シングルセル PEG脂質 刺激応答性材料 1細胞分離 1細胞解析 1細胞アレイ T cell receptor

1. 研究開始当初の背景

医療において、ウイルス感染細胞や血中循環がん細胞(CTC)、抗がん活性を有するT細胞など、膨大な数の細胞から数細胞を検出する技術が求められている。しかし現状では、1細胞単位で解析する手法は、熟練の検査技師による時間をかけた血液塗抹標本検査や、高価な1細胞解析機器等となり、誰にでも迅速・簡便かつ安価に1細胞単位で解析できる手法がない。また、1細胞解析の後に、迅速・簡便に望みの細胞を1細胞単位で回収し、さらなる解析や細胞の医療応用を可能とする手段も必要とされている。

2. 研究の目的

光活性化 PEG 脂質(国際特許出願 PCT/JP2016/57852)をコートした表面は、光を照射する前は細胞が捕捉されず、365 nm~405 nm の光照射によって分子内の脂質が2本から1本になると、脂質と細胞膜が相互作用可能となり細胞が捕捉される(Fig. 1 上)。本研究では、光活性化 PEG 脂質を用いた1細胞アレイ技術と1細胞回収技術を社会実装が可能な機器レベルまで発展させ、迅速・簡便かつ安価な1細胞操作技術として、以下の2種類の医療への応用を行うことを目的とした(Fig. 1)。

(1)「1細胞アレイを用いたサイトメガロウイルスの検出」サイトメガロウイルスは日本人の約70%が抗体を保有しており、幼少時期に不顕性感染していることがほとんどだが、思春期以降の初感染や、臓器移植や HIV といった免疫抑制状態ではサイトメガロウイルス感染症となり重篤化することがある。特に妊娠中の母親が初感染すると、流産や新生児の障害が起こることが多い。現在、サイトメガロウイルス感染症の検査は、pp65 抗原を指標に感染細胞を染色し、検査技師による血液塗抹標本の目視検査(血算)によって行われている。この検査では、数万の好中球と、その内の感染細胞数(1細胞以上で陽性)をカウントする必要があるため、検査結果が出るまでに多くの時間と労力がかかる。本研究では、光活性化 PEG 脂質を用いて10万細胞程の好中球の1細胞アレイを作製し、画像解析により迅速に抗 pp65 抗体陽性の感染細胞を検出する手法の開発を目的に研究を行った。

(2)「1細胞単離によるがん細胞特異的な細胞障害性 T 細胞の分離・解析」2018年にノーベル医学生理学賞を受賞したように、がん免疫細胞治療薬・オプジーボが注目を集めており、既に標準治療の一環を占めている。これらの効果を高めるために、がん特異的リンパ球を誘導・増殖しオプジーボと併用する治療が試みられている。しかし、がん特異的リンパ球の採取・増殖には非常に時間がかかる。

そこで、がん細胞特異的リンパ球由来 T 細胞レセプター(TCR)遺伝子改変 T 細胞が期待されている。TCR は α 鎖・ β 鎖ヘテロダイマーで形成されており、その組み合わせによって抗がん活性が発揮される。そこで本研究では、特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞の簡便かつ安価な製造のために、当該技術を用いて T 細胞のシングルセルソーティングを行い、1細胞の T 細胞から α 鎖と β 鎖の両鎖をクローニングすることを目的とした。

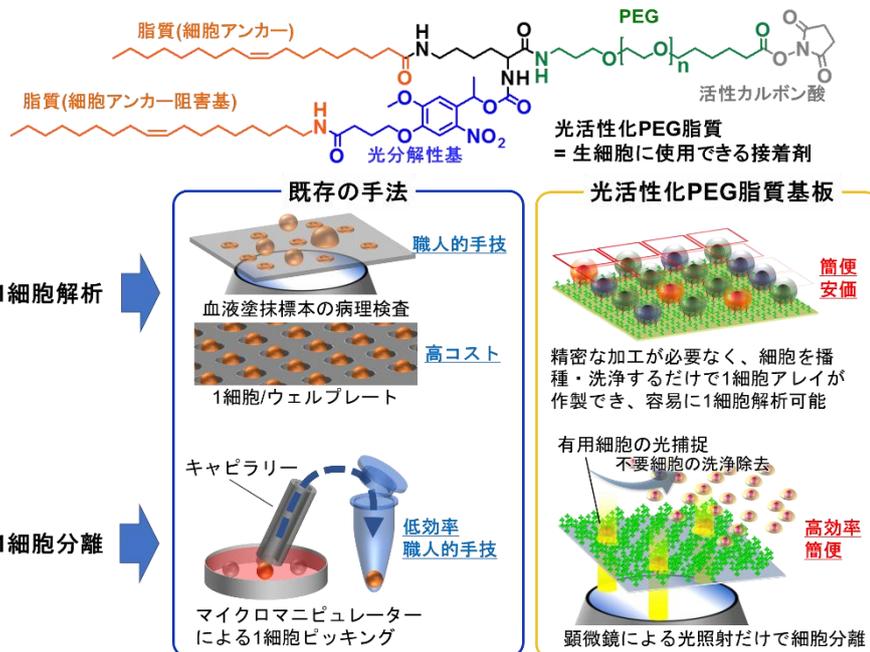


Fig. 1 光活性化 PEG 脂質を用いた安価・高効率・簡便な1細胞操作技術

3. 研究の方法

(1)「1細胞アレイを用いたサイトメガロウイルスの検出」

方法：1細胞アレイは、以下の安価かつ容易な4ステップで作製した。

①スライドガラスを1% Bovine serum albumin (BSA)/PBS 溶液に1晩漬け置きし、洗浄、乾燥を行った。

②BSA コート基板を 100 μ M 光活性化 PEG 脂質/50%DMSO/PBS 溶液中に 6 時間漬け置き、洗浄、乾燥を行った。
 ③細胞の固定化領域となる光透過スポットがアレイ状に描画されたフォトマスクを用いて、コンタクト露光を行った。
 ④③で作製した基板の上に細胞を播種し、15 分程静置した後に捕捉されなかった細胞を洗浄除去することで 1 細胞アレイを作製し(Fig. 2)、顕微鏡観察および顕微鏡画像の画像解析を行った。

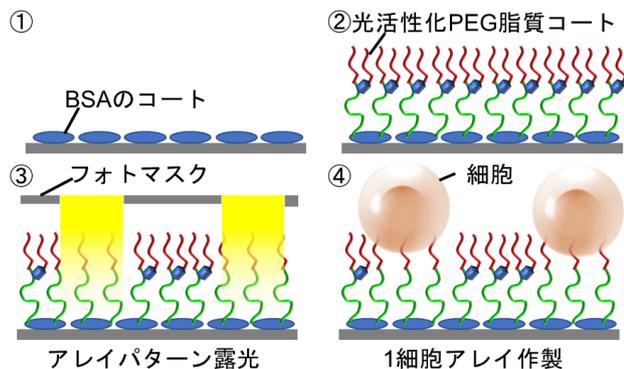


Fig. 2 1 細胞アレイの作製方法

(2) 「1 細胞単離によるがん細胞特異的な細胞障害性 T 細胞の分離・解析」
 方法：以下の 3 ステップにより細胞の単離を行った。

①光活性化 PEG 脂質表面上に目的細胞の含まれる細胞集団を播種した。
 ②目的細胞に対して共焦点レーザー顕微鏡を用いて 405 nm 光のスポットを照射し、目的細胞を基板に捕捉した。
 ③捕捉されていない不要な細胞を洗浄除去することにより、目的細胞を単離した(Fig. 3)。

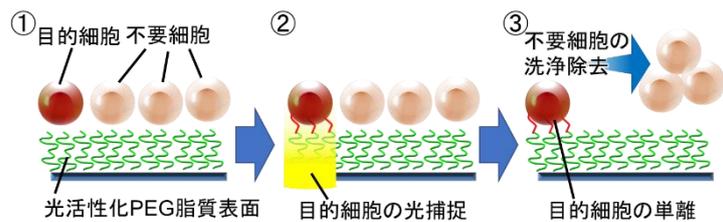


Fig. 3 光活性化 PEG 脂質基板上での 1 細胞単離

4. 研究成果

(1) 「1 細胞アレイを用いたサイトメガロウイルスの検出」

まず、リンパ球や顆粒球を含めた白血球で 1 細胞アレイの作製を行った。EDTA 入り真空採血管により採取したヒト末梢血を遠心し、取得したバフィーコート層を赤血球溶血用の ACK バッファーで処理した後に PBS で洗浄した。抗 CD45 抗体-FITC と抗 CD66b 抗体-APC で処理することで、白血球と好中球を染色し、白血球溶液を調製した。また、直径 6 μ m の円状光透過スポットがスポット中心間距離 20 μ m でアレイ状に描画されたフォトマスクを用いて、光活性化 PEG 脂質基板にコンタクト露光(1.6 J/cm² : 365 nm)することで、1 細胞アレイ用の基板を作製した。白血球溶液を基板に播種し、15 分後に PBS で洗浄したところ、1 細胞アレイの作製が確認された(Fig. 4 上)。顕微鏡観察により、1 視野当たり縦横 50 x 50 = 2500 スポットのアレイ画像が 49 視野得られ、合計で 10 万スポット以上の 1 細胞アレイが作製された。解析を自動化するために、アレイスポットの検出と、各スポットの各種蛍光輝度値の取得プログラムを開発した。1 細胞アレイ画像は細胞位置が規格化されており、強い周期性を含むため、画像の二次元フーリエ変換を用いる事で、迅速なアレイスポットの定義が可能である。具体的には、1 細胞アレイ画像を二次元フーリエ変換し、変換画像上の周期性を示す特徴量(ピクセル)を強調した後に、逆二次元フーリエ変換を行うことで、アレイスポットの定義を行った(Fig. 4 下)。さらに各スポットの輝度値取得のコードを追記することで、30 秒で 122,500 スポットの明視野と 3 色の蛍光像の輝度値を自動的に取得可能であり、FACS のデータと同様にドットプロットを行うことで、迅速に好中球等の計数が可能であった。

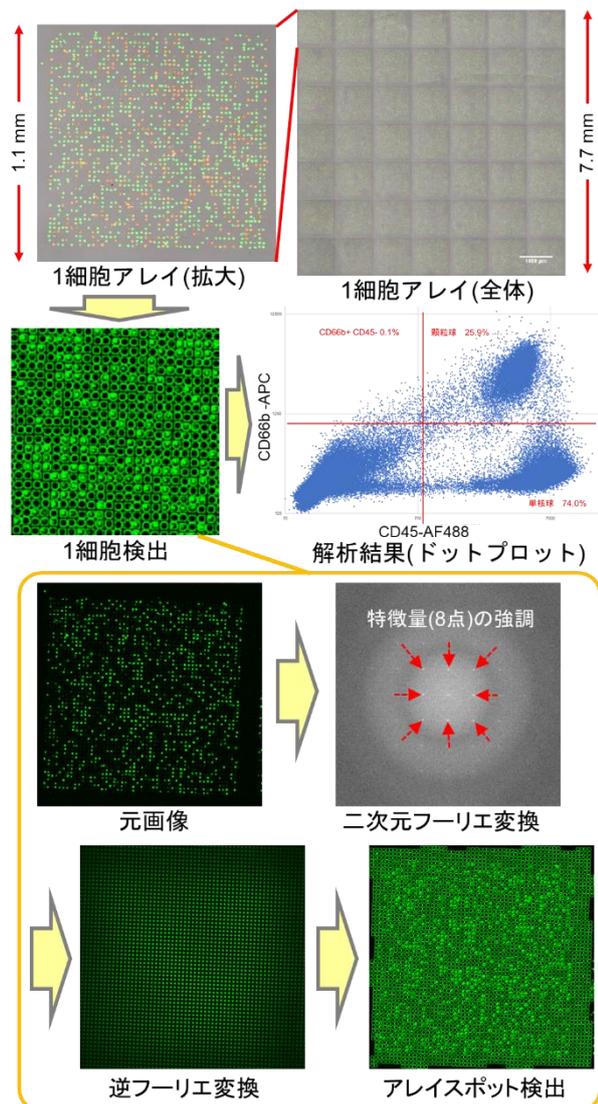


Fig. 4 ヒト血球の 1 細胞アレイ解析

次に、ヒト末梢血より Polymorphprep を用いて顆粒球を分離し、同様の手法により好中球の 1 細胞アレイの作製を行った。リンパ球のアレイ化では、ほぼすべてのスポットに細胞が捕捉された 1 細胞アレイが作製できた。一方、白血球(リンパ球と顆粒球)のアレイ化では、Fig. 4 に示した通り、細胞が捕捉されないスポットが多く確認された。顆粒球のアレイ化を行ったところ、非常に多くのスポットで細胞が捕捉されず、また、基板上に細胞の凝集物が確認されることが多かった。原因を確認したところ、核酸染色剤である Hoechst33342 によって染色される繊維状の物体で細胞が凝集したり (Fig. 5a)、基板上に繊維状の物体が付着していることが確認された (Fig. 5b)。好中球は保存が困難な血球であるが、その原因の一つとして、外部の刺激等により好中球が自身の核酸を放出する免疫応答である好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: NETs) が知られている。本実験で確認された繊維状の物体は、この NETs により放出された核酸と考えられ、核酸による光活性化 PEG 脂質表面の汚染や、アレイ化された好中球の NETs による死滅、さらには放出された核酸によるアレイ化された好中球の剥離といったことが起こり、好中球の 1 細胞アレイ化効率が激減したと考えられた。EDTA や DNase 処理などによる上記問題の解消を試みたが、1 細胞アレイ化効率上昇等の改善は見られなかった。

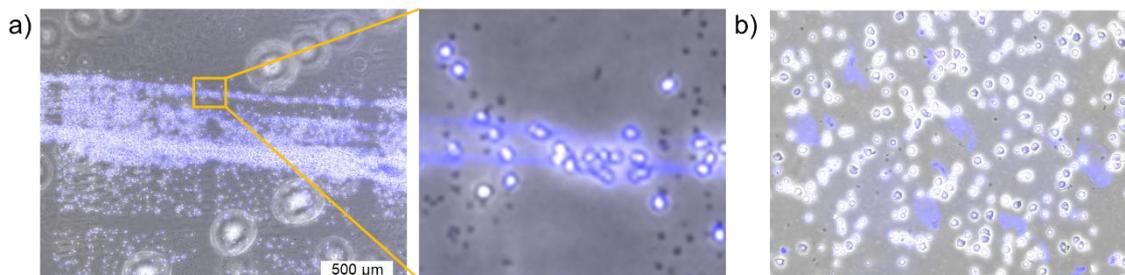


Fig. 5 Neutrophil extracellular traps による好中球からの核酸の放出

本研究では、好中球の 1 細胞アレイ作製が困難であり、サイトメガロウイルスの検出まで進めることができなかったが、白血球の 1 細胞アレイ化が可能であるなど、光活性化 PEG 脂質のヒト血液検体における適用可能範囲を確認できた。したがって、今後の本技術の医療への応用において、アプリケーションの検討に有用な知見を得ることができた。

(2) 「1 細胞単離によるがん細胞特異的な細胞障害性 T 細胞の分離・解析」

まず、ヒト血球細胞を光活性化 PEG 脂質で光分離可能か試みた。Lymphoprep を用いて T 細胞を含む PBMC をヒト末梢血から分離し、カルセイン-AM で染色した PBMC を 10000 細胞につき 1 細胞加えた。このサンプルを、光活性化 PEG 脂質基板に播種し、共焦点レーザー顕微鏡の Bleach Mode を用いて、405 nm レーザーで PBMC (カルセイン-AM) に対して 10 msec の光照射を行った。

4 分後に不要細胞の洗浄除去を行ったところ、基板上に蛍光標識された PBMC が単離されたことが確認された (Fig. 6)。この細胞分離は、事前に詳細かつ複雑な細胞の分離条件を設定しなくてはならない FACS と比較して、直感的な操作により迅速・簡便に細胞を分離することが可能であった。また、既存のキャピラリーを用いた細胞の分離方法などでは、目的外の細胞を採取してしまわない様に、目的細胞とそれ以外の細胞の間には十分な間隔が必要となる。そのため、細胞の播種密度を低くせざるを得ないなど、解析できる細胞数が少なくなる問題があった。一方、本技術では細胞間に間隔は必要ではなく、細胞が物理的に接触している状態でも 1 細胞を単離可能であった。したがって、血中循環がん細胞などの多くの細胞を解析する必要のある、希少な細胞の分離に非常に有用と考えられた。

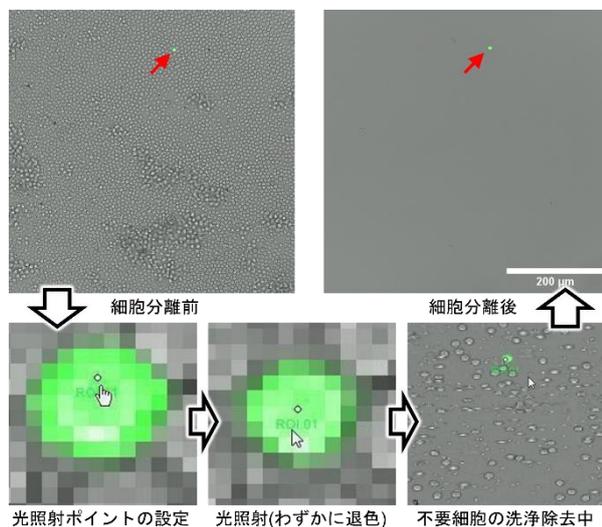


Fig. 6 レーザー照射による 1 細胞単離

次に、実際に T 細胞を分離し、TCR の α 鎖・ β 鎖の遺伝子増幅を行った。本実験では、洗浄操作の行いやすい、浅く角のないウェルを新規の樹脂成型法を用いて開発し、光活性化 PEG 基板とした。まず、ヒト末梢血から RosetteSep Human CD8⁺ T Cell Enrichment Cocktail を用いて CD8⁺ T 細胞を分離し、抗 CD8 抗体-PerCP/Cyanine5.5 で染色を行った。この CD8⁺ T 細胞とがん細胞株の K562 細胞を 1:100 の割合で混合し、光活性化 PEG 脂質基板に播種した。1 個の T 細胞のみに前述と同様の手法で光照射を行い、T 細胞の単離を行った (Fig. 7a)。-80°C で一晩冷凍することで細胞の破碎を行い、TCR の α 鎖・ β 鎖それぞれの mRNA に対し、可変領域として数十種類存在する V 領域のリーダー配列に対応する合計 80 種類のプライマー、および定常領域に対応するプライマーを用いて、2 段階の semi-nested PCR により増幅を行った。アガロースゲル電気泳動に

より確認を行った所、 α 鎖で4ウェル中2ウェル、 β 鎖で4ウェル中3ウェルの増幅が確認された(Fig. 7b)。一方、 β 鎖において、細胞を播種したが捕捉を行わなかったウェルでも増幅が確認され、ウェルへの mRNA の非特異吸着などの原因が考えられた。

増幅した β 鎖の配列の確認を行った。配列の確認方法として、今後のライブラリー化によるスケールアップを考慮し、次世代シーケンシング技術の一つであるナノポアシーケンサーを用いた配列確認を行った。

Oxford Nanopore Technologies 社の MinION MK1C を用いて、シーケンスを行った結果、30 分程度のシーケンシングで 10 万本以上の配列を読むことができ、既知のゲノム配列へのアライメントにより V・D・J 領域の配列の確認が可能であった(Fig. 7c)。従来の FACS(ARIA III, Becton Dickinson 社)を用いた CD8⁺ T 細胞の 1 細胞単離、およびシーケンスの確認を行い、比較したところ、本技術による分離では TCR β 鎖の V 領域の配列が 1 種類(開始地点:7 番染色体 142529461 bp)のみ確認され、1 細胞からの遺伝子増幅がなされたことが確認されたが、FACS による分離では 2 種類の V 領域配列(開始地点:7 番染色体 142380964 bp, 7 番染色体 142593174 bp)が確認され、2 細胞からの遺伝子増幅がなされた可能性が強かった。したがって、分離操作後に実際に分離した細胞を顕微鏡で確認し、数を確認できることも、本技術の既存法に対する優位点であることが示された。

以上のように、免疫細胞療法の開発やレパトア解析などの医療で必要とされている T 細胞の TCR 配列解析において、既存の研究機器を用いて迅速・簡便かつ安価に 1 細胞分離し、1 細胞単位で確実な TCR 配列解析を行うことが可能な技術が構築できた。本技術は、既存の 1 細胞分離技術と比較し、直感的な操作で大量の細胞の中から希少な細胞を単離可能な点や、単離した細胞を顕微鏡上で確認できる点など、多くの有利な点を有することが確認された。今後、本技術は、免疫細胞療法製剤開発などへの応用をしていく予定である。

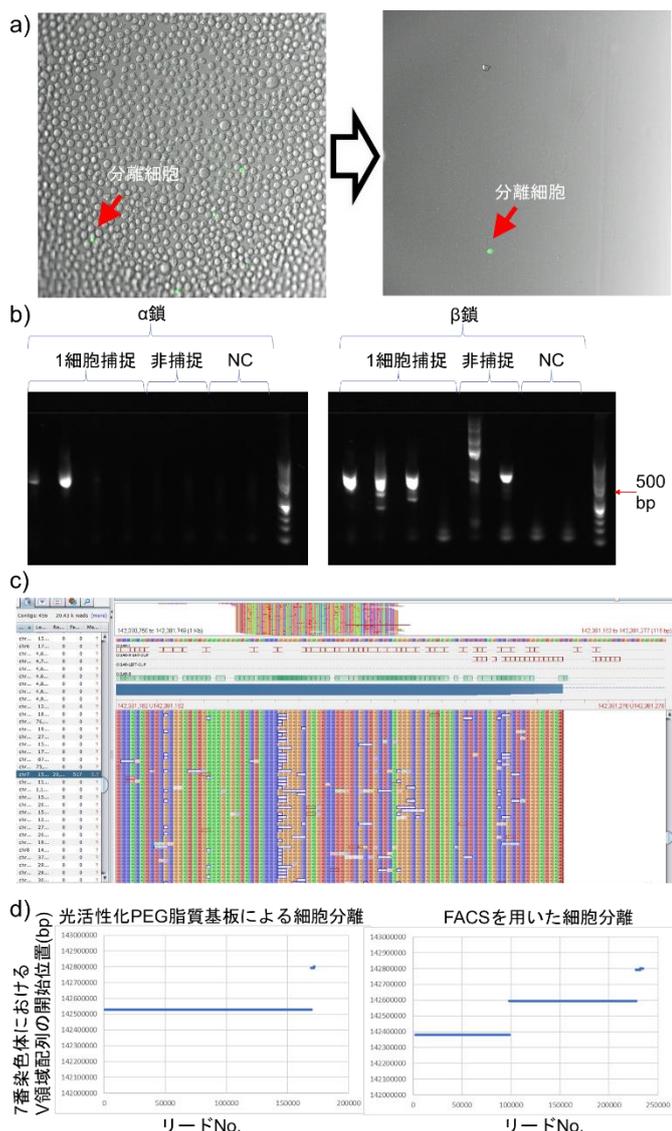


Fig. 7 a)がん細胞群からの希少な CD8⁺T 細胞の単離 b)単離した細胞からの TCR 配列増幅、c)解析ソフトを用いた配列のゲノムへのアライメント、d)本技術、および FACS によって分離した T 細胞の TCR β 鎖 V 領域の開始地点

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamaguchi Satoshi, Takasaki Yumi, Yamahira Shinya, Nagamune Teruyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Photo-Cleavable Peptide-Poly(Ethylene Glycol) Conjugate Surfaces for Light-Guided Control of Cell Adhesion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 762 ~ 762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11080762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamahira Shinya, Heike Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Facile Fabrication of Thin-Bottom Round-Well Plates Using the Deformation of PDMS Molds and Their Application for Single-Cell PCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 748 ~ 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11080748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jarz?bska Natalia Teresa, Yamaguchi Satoshi, Izuta Shin, Kosaka Takahiro, Yamahira Shinya, Nagamune Teruyuki, Okamoto Akimitsu	4. 巻 7
2. 論文標題 Photo-responsive materials with strong cell trapping ability for light-guided manipulation of nonadherent cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 4514 ~ 4518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9bm01200a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山平真也、山口哲志、平家勇司、長棟輝行
2. 発表標題 Photo-activatable poly(ethylene glycol)-lipid surface for single-cell manipulation
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小阪高広、山口哲志、泉田森、山平真也、岡本晃充
2. 発表標題 Photo-reactive surface for the single cell analysis of intercellular communication
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山平真也, 平家勇司
2. 発表標題 鋳型が変形する薄肉樹脂加工法と 1細胞アッセイ用プレートの開発
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会シンポジウム2021
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山平真也, 平家勇司
2. 発表標題 PDMS鋳型の変形を活用した樹脂薄肉成形法の開発と、1細胞PCRへの応用
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第43回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小阪高広、山口哲志、山平真也、岡本晃充
2. 発表標題 Single-cell analysis of immune cell cytotoxicity using a photo-reactive surface
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小阪高広、山口哲志、山平真也、岡本晃充
2. 発表標題 光応答性細胞固定表面を用いた免疫細胞とがん細胞の単一細胞間相互作用観察
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上原 廉二郎・山口 哲志・小阪 高広・山平 真也・岡本 晃充
2. 発表標題 細胞の配置及び回収を志向した光応答性基板の開発
3. 学会等名 日本化学会第100回春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山平真也、山口哲志、長棟輝行	4. 発行年 2021年
2. 出版社 分離技術会	5. 総ページ数 9
3. 書名 光応答性PEG脂質を用いた1細胞精密分離「分離技術」 特集:細胞精密分離技術の最前線	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 免疫細胞の活性を評価する技術	発明者 山口哲志、山平真也、小阪高広、岡本晃充	権利者 聖路加国際大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-190522	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 薄肉成形品の製造方法及びウェルプレート	発明者 山平真也、平家勇司	権利者 聖路加国際大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP 2020/044018	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 薄肉成型品の製造方法	発明者 山平真也、平家勇司	権利者 聖路加国際大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-216608	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------