

未来社会創造事業 探索加速型
「共通基盤」領域
終了報告書(探索研究期間)

令和3年度
研究開発終了報告書

令和元年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名：山口 哲志]

[東京大学先端科学技術研究センター・准教授]

[研究開発課題名：細胞資源を活用する細胞間相互作用の精密創成技術]

実施期間：令和元年11月1日～令和4年3月31日

§ 1. 研究実施体制

(1)「東大」グループ(東京大学)

① 研究開発代表者:山口 哲志 (東京大学先端科学技術研究センター、准教授)

② 研究項目

- ・細胞配置技術の開発
- ・細胞間相互作用の評価技術の開発
- ・細胞間相互作用創成技術の開発
- ・免疫細胞とがん細胞との相互作用解析系の構築と画像解析手法の確立

(2)「聖路加」グループ(聖路加国際大学)

① 主たる共同研究者:山平 真也 (聖路加国際大学研究センター、文部科学省卓越研究員)

② 研究項目

- ・細胞間相互作用創成技術の開発
- ・血液サンプル中の免疫細胞と異常細胞との相互作用解析系の構築

§ 2. 研究実施の概要

免疫療法は、大規模な手術や長期の入院を必要とせず、患者の Quality of Life (QOL)を損なわない治療法として期待されている。しかし、これまでの研究では、免疫を亢進する薬剤や治療用の免疫細胞の効果は、細胞集団全体の平均値でしか評価されない。従って、不均一な細胞集団の中で薬剤がどのような性質の細胞に効いているのかの詳細は不明であり、活性の高い免疫細胞を識別して単離することも難しい。そこで、探索研究では、1細胞レベルで細胞間の相互作用を創成し、個々の免疫細胞と疾患細胞との相互作用を網羅的に解析する技術の開発を目的とした。

まず、1細胞レベルの精度で細胞間相互作用を創成する基盤技術の開発を行った。NK細胞や細胞傷害性T細胞のように、疾患細胞と接触して細胞死を誘導する免疫細胞の活性を研究対象とし、異種細胞同士を隣接して並べる技術を開発した(特許出願)。異種細胞を精密に配置するために、我々独自の材料を修飾した細胞固定化表面を用いた(revise中)。また、特定の細胞を選択的に望みの位置に固定化できる新規材料の開発も行った(投稿中)。我々の材料は、細胞自身の接着性を利用しないため、浮遊細胞であるT細胞なども瞬時に固定化できる。従って、幅広い免疫細胞と疾患細胞のペアを、迅速に配置可能であった。

次に、網羅的に大量の細胞間相互作用を解析するために、基板上に隣接する細胞ペアの高密度アレイを作製する技術を開発した。まず、マイクロ流路の底面に細胞固定化材料を修飾し、1本の流路に3000個の細胞ペアを構築する技術を確立した。また、将来的に貴重な細胞検体を扱うために、デッドボリュームを限りなく小さくして細胞を解析できる薄底のマイクロウェルアレイを開発した(論文1)。このマイクロウェルの一つに256個の細胞ペアのアレイを構築する技術を開発し、最大で約10万個の細胞が配置できるデバイスを開発した。この系では、利用可能な細胞懸濁液の体積に応じて、使用するマイクロウェルの数を調整できるため、数マイクロリットルの微量から実験を行うこともできる。

また、配置した細胞を光照射によって生きたまま選択的に取り外す技術も三種類開発した。まず、細胞接着因子を修飾できる反応基を、光分解性リンカーを介して基板表面に提示する技術を開発した。この表面に光を照射すると、非照射領域のみに接着因子が修飾でき、細胞を光配置できた。さらに、配置

した細胞に光を照射すると、選択的に取り外すことができた（論文 2）。また、光溶解性のヒドロゲル上に我々の細胞固定化材料を用いて細胞を配置する技術も開発した（特許出願）。この表面上では、細胞を観察後、回収したい細胞に光を照射することによって細胞の下のヒドロゲルが溶解し、選択的に細胞を取り外すことができた。さらに、特定のマイクロウェルから選択的に細胞を回収する技術も開発した（論文 3）。マイクロウェル内に細胞と光溶解性のヒドロゲルを充填し、光照射を施したウェルからのみ選択的に細胞を回収することに成功した。この方法によって、マイクロウェル内から、特定の表現型が観察された免疫細胞を回収することにも成功しており、顕微鏡イメージを指標にした 1 細胞回収の強力なツールである。今後、この技術は、上記のマイクロウェルを小型化し、1 ウェルに細胞ペアを一つずつ配置して解析した後に、細胞傷害性の有無などの表現型に従って選択的に細胞を単離する際に応用できる。また、最近では、これらの技術に最適な新しい光溶解性ヒドロゲルの開発や（論文 4）、任意の細胞接着表面に細胞を光配置できるケージド細胞の開発にも成功している（論文 5）。このように、これらの技術は、配置した細胞の相互作用を指標にして、目的とする細胞を単離することを可能とし、特徴的な表現型の免疫細胞や疾患細胞の 1 細胞遺伝子解析などの実現に貢献することが期待される。

上記で開発した異種細胞ペアの 1 細胞アレイを構築する技術を用いて、免疫細胞と疾患細胞のペアを基板上に創成し、その相互作用を網羅的に調べる系を構築した。ここで、隣接する細胞間で分子間相互作用が生じていることを確認する簡便な技術も開発した（特許出願、論文 6）。ヒトの血液サンプル由来の NK 細胞を聖路加病院で取得し、この系を用いてヒト白血病細胞株に対する細胞傷害性を 1 細胞レベルで網羅的に解析した。一般的に、血中の NK 細胞の活性を定量するには、このモデル白血病細胞と共培養して、死細胞数を計測する手法が用いられるが、細胞集団の平均値しか分からない。一方、我々の方法では、1 細胞レベルで NK 細胞による細胞の殺傷効果をリアルタイムで追跡することができた。この結果は、本技術によって、血液サンプル内の免疫細胞の活性を 1 細胞レベルで定量化できることを示しており、COVID19 などの重症化に関わる免疫細胞の疲弊度を正確に把握できる診断技術としての応用が期待される。また、NK 細胞の白血病細胞に対する細胞殺傷効果において、細胞間の不均一性も確認しており、アポトーシスとネクローシスを誘導する割合についても萌芽的な定量データを得ることに成功している（論文 revise 中）。これらの結果より、本技術によって、免疫亢進剤の効果や治療用免疫細胞の機能を 1 細胞レベルで評価できる可能性が示され、今後、効果的な薬剤や高機能性細胞の探索を革新するブレークスルーが実現できることが期待される。

（主要な成果）

1. S. Yamahira et al., *Micromachines* 2020, 11, 748.
2. S. Yamaguchi et al., *Micromachines* 2020, 11, 762.
3. S. Yamaguchi et al., *ACS Appl. Bio Mater.* 2020, 3, 5887-5895.
4. S. Yamaguchi et al., *Biomater. Sci.* 2021, 9, 6416-6424.
5. S. Yamaguchi et al., *Chem. Eur. J.* 2022, 28, e202103941
6. S. Yamaguchi et al., *bioRxiv*. DOI: 10.1101/2022.05.09.491123