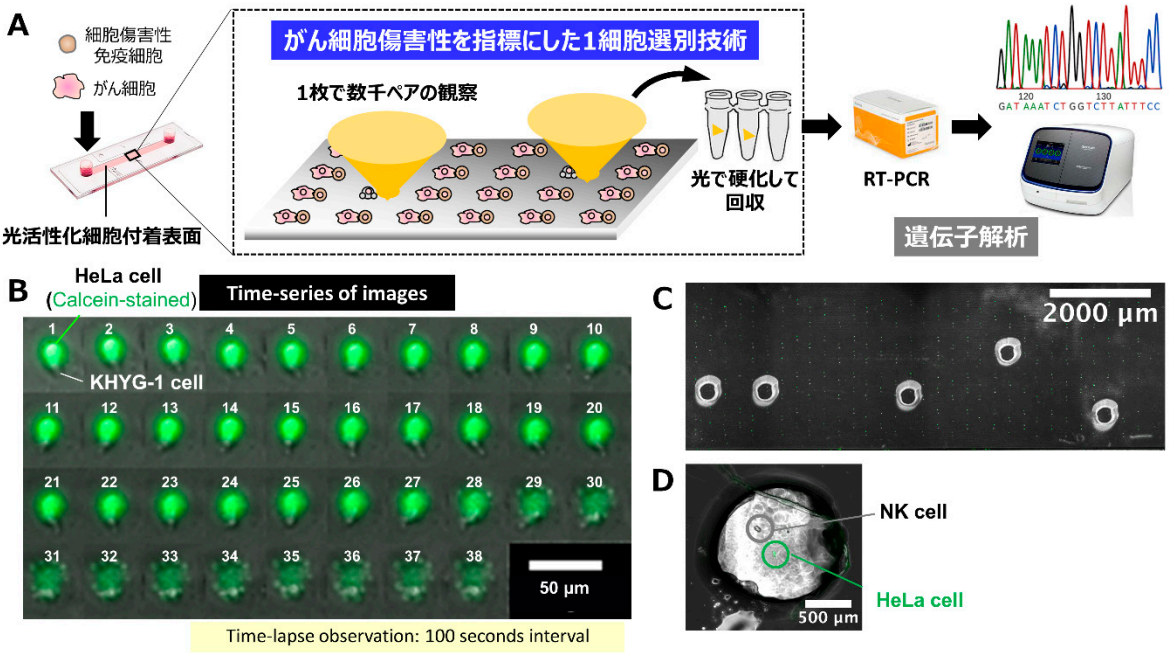
72　細胞傷害性を指標した1細胞選別技術の開発	山口　哲志

【目的】免疫システムを利用してがんを殺傷する「がん免疫療法」は、次世代のがん治療法として期待されている。近年、一般的ながん抗原を認識する受容体を発現させた遺伝子改変 T 細胞が、がん細胞を選択的に認識して殺傷できる治療用細胞として実用化されている。しかし、患者ごとに治療効果が異なり、治癒率は低いのが現状である。そこで、患者ごとに個別に最適な治療用細胞を用意する必要があるが、がん細胞傷害性の高い治療用細胞を探索する時間とコストが大きな問題となっている。そこで、本研究では、細胞傷害性の免疫細胞とがん細胞の相互作用を大規模に 1 細胞観察した後、がん細胞傷害性の高い免疫細胞を迅速簡便に選別し、その遺伝子発現を 1 細胞解析する技術を開発することを目的とした研究を行った。

【方法】ガラス基板にビトロネクチンをコーティングした後、我々が開発した独自の光活性化型細胞付着剤（光活性化 PEG 脂質）を修飾した。マスクレス露光装置を用いて、基板表面に 1 細胞サイズの光を照射した後、ヒトのナチュラルキラー（NK）細胞株である KHYG-1 細胞を播種し、1 つずつ並べた。次に、同様の方法で、ヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞を KHYG-1 細胞の隣に配置した後､培養環境下で顕微鏡観察を行った。HeLa 細胞は予め Calcein-AM で蛍光染色しておき、KHYG-1 細胞との相互作用によって細胞傷害を受け、蛍光を失う様子を観察した。さらに、顕微鏡観察後、流路内に光応答性のゲル化剤を導入し、回収したい細胞のみに光を照射してゲルで固めてピンセットで回収した（図 A)。

【結果】がん細胞傷害性の大規模 1 細胞解析のモデル実験として、マイクロ流路の底面基板に上記の方法で KHYG-1 細胞と HeLa 細胞のペアを数千個並べ、蛍光顕微鏡で両者の相互作用を観察した。その結果、KHYG-1 細胞が HeLa 細胞を殺傷する様子を観察することができた（図 B)。観察後、観察結果を指標にして選別した細胞ペアに対して、対物レンズを通してくさび型の光を照射し、細胞ペアを一つだけゲルで固める条件の検討を行った。光の波長や強度といった照射条件、ゲル化剤の種類や濃度、細胞を配置する際の間隔などを最適化したところ、ピンセットで回収するのに十分なサイズのゲルで固めることに成功し（図 C)、選択的に回収することができた（図 D)。現在、この方法で回収した細胞の遺伝子配列を解読する実験を進めている。

免疫細胞によるがん細胞傷害性を指標に細胞を選択的に回収するワークフローと実験結果



72. 細胞傷害性を指標した 1 細胞選別技術の開発

山口　哲志

大阪大学 産業科学研究所 第三研究部門

Key words：1 細胞解析，がん免疫，光応答性材料，細胞間相互作用，時系列顕微鏡画像

緒　言

近年、第四のがん治療法として、「がん免疫療法」に注目が集まっている。がん免疫において、免疫細胞によるがん細胞の識別や攻撃には、接触による細胞間相互作用が鍵を握る。近年、がん細胞を認識する受容体を有する細胞傷害性 T 細胞（TCR-T 細胞）やがん抗原キメラ受容体（CAR）を有する CAR-T 細胞といった遺伝子改変 T 細胞が、がん細胞のみを選択的に認識して殺傷できる治療用細胞として期待され、実用化されている。しかし、このようながん免疫療法は、患者ごとに治療効果が大きく異なり、治癒率は極めて低いのが現状である。そこで、患者ごとに個別に治療用細胞を用意する必要があるが、がん細胞傷害性のある治療用細胞を探索する時間とコストが大きな問題となっている。

これまで、免疫細胞のがん細胞傷害性は、それぞれの細胞集団を混ぜて共培養し、殺傷されたがん細胞数を定量することによって評価されてきた。従って、腫瘍組織に浸潤する免疫細胞（TIL）などの中からがん細胞傷害性を示す T 細胞受容体（TCR）の配列を決定するには、限界希釈法によって単離した各免疫細胞の TCR の遺伝子を解読し、その遺伝子を新鮮な T 細胞に遺伝子導入した上で、細胞傷害性を評価できる数までそのクローンを増殖させて解析する必要があった。そのため、二か月でせいぜい 100 個程度のクローンしか調べることができないのが現状である。ここで、TIL に含まれるがん細胞傷害性のある T 細胞の割合は 0.1%程度であり、理論上、1,000 個以上のクローンを調べないと確実に取得することはできない。がんは進行性の病気であり、数か月かけて治療用細胞を調製している間に重篤化して手遅れになってしまう。ここで、もしも、数千個の T 細胞のがん細胞傷害性を 1 細胞レベルで網羅的に調べ、その遺伝子を解析することが出来れば、数日で患者ごとのテーラーメイドな治療用細胞を確実に取得することが可能となる。

そこで、本研究では、免疫細胞とがん細胞の相互作用を大規模に 1 細胞観察し、がん細胞傷害性を指標に免疫細胞を選別する技術を開発する。我々は、これまでに、任意の細胞の付着を光制御できる光応答性細胞付着表面を開発してきた [1, 2]。近年、光照射位置にのみ任意の細胞を付着できる光活性化表面を開発し、がん細胞と 免疫細胞とを一つずつ隣接して光配置することによって、がん細胞傷害性を 1 細胞解析することに成功している [3, 4]。本研究では、このような技術を用い、光配置した細胞ペアの中からがん細胞傷害性のある治療用免疫細胞を探索後、1 細胞レベルで選択的に回収して 1 細胞遺伝子解析を行うワークフローの開発を目的とした研究を行う（図 1）。

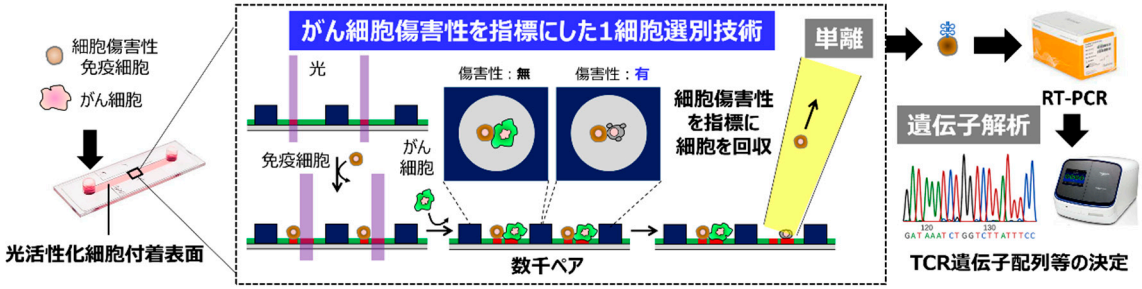


図 1. 本研究で開発するワークフローの概念図
マイクロ流路底面に光配置したがん細胞と免疫細胞の相互作用を観察後、細胞傷害性を指標に細胞を回収して遺伝子解析に供する。

方　法

1. 細胞傷害性免疫細胞とがん細胞の調製

細胞傷害性を 1 細胞解析するためのモデル免疫細胞として、ヒトナチュラルキラー（NK）細胞株である KHYG-1 細胞を用いた。また、がん細胞としては、ヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞を用いた。KHYG-1 細胞は、医薬基盤・健康・栄養研究所の JCRB バンクから、HeLa 細胞は、理化学研究所のバイオリソースセンターから購入した。KHYG-1 細胞は、RPMI1640 培地（20% FBS、1% p/s、5,000 unit/ml human IL2）中で培養し、実験に用いた。HeLa 細胞は、DMEM 培地（10% FBS、1% p/s）中で培養した後、Calcein-AM で染色して実験に用いた。

2. 384 ウェルを用いた細胞間相互作用解析系の構築

底面の厚さが 12～30 μm 程度の薄底の 384 ウェルプレートを、ポリカーボネートシートに PDMS で作った鋳型を用いてプレス加工することにより調製した［5］。このプレートにビトロネクチン（VTN-N）水溶液を入れ、終夜静置することでウェル内をコーティングした。このウェルをリン酸緩衝液（PBS）と 50%DMSO 水溶液で洗浄後、光活性化 PEG 脂質の 50% DMSO 水溶液を加え、遮光下 37℃条件で 1 時間静置し、VTN-N コート表面に修飾した。ウェルの間隔に合わせて微細孔（直径 10～12 μm）を空けたフォトマスクをウェルプレートの下に配置し、下方から水銀ランプを用いて 360 nm の円形スポット光を 1.6 J/cm^{2}照射した。このウェルに、KHYG-1 細胞を PBS に懸濁させた細胞懸濁液（3×10^7 cells/mL）を入れ、室温で 10 分間静置し、KHYG-1 細胞を光照射位置に付着させた。PBS でウェル表面を洗浄し、付着しなかった細胞を洗浄除去した。次に、治具を用いてフォトマスクを約 10～20 μm 横にずらし、上記と同じ方法でスポット光（直径 14～18 μm）を照射させ、ウェル内の KHYG-1 細胞の横に光を照射した。HeLa 細胞懸濁液（1×10^7 cells/mL）をウェルに入れ、HeLa 細胞を KHYG-1 細胞の横に付着させた。その後、ただちに、KHYG-1 細胞の培養培地に培地交換をし、37℃、5% CO_2条件下で培養できる恒温槽付きの蛍光顕微鏡のステージにウェルプレートを設置した。蛍光顕微鏡のタイルスキャンモードを用いて、各ウェルの中を一定の時間間隔で 2～3 時間経時観察した。

3. マイクロ流路を用いた細胞間相互作用解析系の構築

ガラス基材を、VTN-N 水溶液に終夜浸漬させてコーティングした。このガラス基材と流路を貼り合わせてマイクロ流路を調製した。その際に、ネジ式の脱着可能な治具を 3D プリンターで作製し、治具で挟んで貼り合わせて、マイクロ流路を解体できるようにした。このマイクロ流路の中に、384 ウェルの底面修飾の際に用いた溶液を順次送液し、流路底面に光活性化 PEG 脂質を修飾した。このマイクロ流路の上方から、マスクレス露光装置を用いて、360 nm のスポット光（直径 10～12 μm）を底面に数千個自動照射した。上記と同様に、KHYG-1 細胞の PBS 懸濁液を流路内に導入し、室温で 10 分間静置することで付着させた。PBS を流路内に送液し、付着

しなかった細胞を洗浄除去した。次に、治具を用いてマイクロ流路を約 10〜20μm 横にずらし、上記と同じ方法でスポット光（直径 14〜18μm）を照射させることにより、KHYG-1 細胞の横に光を照射し、HeLa 細胞懸濁液を導入して、HeLa 細胞を KHYG-1 細胞の横に付着させた。その後、ただちに KHYG-1 細胞の培養培地に培地交換をし、上記と同様に経時観察した。

4. マイクロ流路中から細胞を選択的に回収する技術の開発

共同研究者である東京農工大学の吉野知子教授の開発した技術を改良して、マイクロ流路中から特定の細胞ペアをヒドロゲルで固めて選択的に回収する技術を開発した。KHYG-1 細胞と HeLa 細胞との相互作用を観察後、光硬化ゲルのモノマーである poly（ethylene glycol）diacrylate（PEGDA）と光活性型重合開始剤（omnirad 1173 または omnirad 2959）との混合溶液をマイクロ流路内に導入する。回収したい細胞を蛍光顕微鏡の視野の中央に配置し、対物レンズを 10 倍ないし 20 倍にして、顕微鏡の水銀ランプで 360 nm の光を照射した。その際に、光のサイズを調製するために、ピンホールを顕微鏡に入れることも試した。また、別の光照射方法として、共焦点レーザー顕微鏡を用い、40 倍の対物レンズを用いて 405 nm のレーザー光を照射した。光照射後、治具を脱着してマイクロ流路を解体し、流路底面に調製されたヒドロゲルをピンセットでつまんでガラスボトムディッシュに回収した。回収したゲルを蛍光顕微鏡で観察した。

結果および考察

1. 384 ウェルプレートを用いた細胞間相互作用解析系の検討

当初の研究計画通り、384 ウェルプレートの各ウェルに KHYG-1 細胞と HeLa 細胞とを光配置し、その相互作用の観察を試みた。しかし、1 対 1 の相互作用を観察できる効率が極めて悪く、1 枚のプレートで 1 つか 2 つのペアしか観察できなかった。そこで、384 ウェルプレートを用いた解析系の開発は中止することにした。

2. マイクロ流路を用いた細胞間相互作用解析系の構築

前項のとおり、384 ウェルプレートを用いた系では効率が悪いため、実験系の再設計を行った。384 ウェルプレートを採用していた最大の理由は、相互作用の観察後に、細胞の選択的な回収をピペットマンで確実に行えることであった。1 回の実験で扱えることができる細胞ペアの数を増やすために、384 ウェルプレートよりも細かく細胞を配置すると、ピペットマンでは一つひとつを選別できなくなる。そこで、より高集積した細胞ペアのアレイから細胞を分取するために、別の細胞回収方法が必要である。ここで、我々は、東京農工大学の吉野教授の開発した Gell-based cell manipulation（GCM）法に着目した［6］。GCM 法では、細胞が数 100μm 間隔で並べられた 1 細胞アレイ上で回収したい細胞だけにくさび型の光を照射して、細胞をミリメートルサイズのゲルで包埋する。包埋された細胞は、ピンセットでゲルごと回収され、遺伝子解析に供することができる。GCM 法では、細胞アレイが搭載されているスライドガラスの上に、数 100μm 程度の厚さのスペーサーを介して、もう一枚のガラス板を載せ、二枚のガラス板の間の空間に光硬化性のゲル材料を充填する。その結果、くさび型の光を単一細胞に照射した際に、二枚のガラス板の間に、スペーサーの厚さと同じ高さで直径が数 100μm 程度のサイズのゲルが形成される。そこで、高さが数 100μm 程度のマイクロ流路の中に細胞ペアを高集積して、細胞間相互作用を観察後、GCM 法を用いれば、数千個の細胞ペアを観察・解析した後に、その中から選択的に、細胞を回収することが可能であると考えた（図 2）。

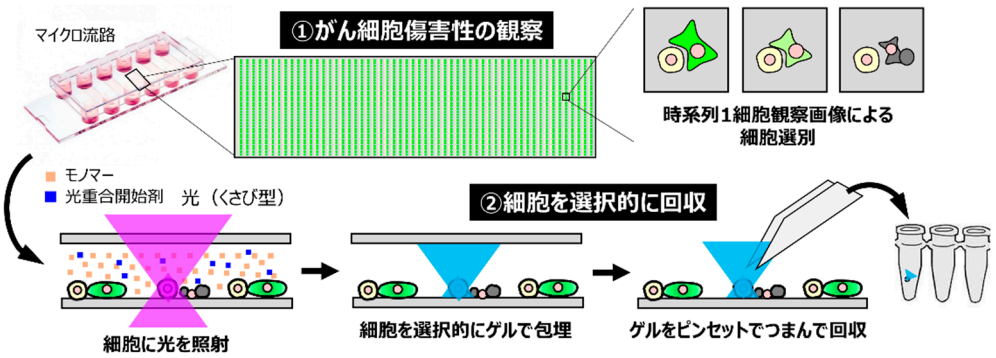


図 2.　マイクロ流路を用いて細胞間相互作用を解析する実験系の概念図
時系列画像で観察されたがん細胞傷害性に応じ、GCM 法で選択的に細胞を回収。

そこで、まず、マイクロ流路内に NK 細胞株である KHYG-1 細胞とがん細胞株である HeLa 細胞とを並べて、その相互作用を観察した。100 秒間隔で撮像した時系列画像を確認したところ、KHYG-1 細胞との接触によって、HeLa 細胞の緑色蛍光が低下する様子が観察された（図 3）。これは、KHYG-1 細胞の lytic hit によって HeLa 細胞の細胞膜が損傷を受け、細胞内部の蛍光色素が漏洩したためと考えられる。また、蛍光が低下し始める前後（図 3、27～28 枚目）から、HeLa 細胞の膜に無数の突起（ブレブ）が観察された。これは、アポトーシスが誘導された場合に見られる典型的な形態変化である。これより、KHYG-1 細胞による HeLa 細胞への細胞死誘導が観察されたと考察される。これまで、我々は、ヒトの全血由来の NK 細胞が、白血病細胞株である K562 細胞を殺傷する様子を 1 細胞観察することに成功してきた［3，4］。今回報告するこの結果は、がん細胞傷害性の 1 細胞観察の二例目であるが、我々の実験系で NK 細胞の培養細胞株を用いた最初の例であり、また、がんの多くを占める接着性の上皮系がん細胞を殺傷する様子を 1 細胞観察した最初の例でもある。この成果により、我々の技術は、適用範囲が広く、幅広い種類のがん細胞に対するがん免疫の解析に応用可能であることが示唆された。

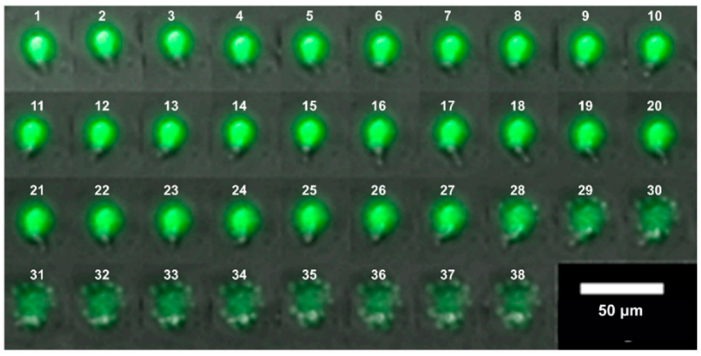


図 3.　KHYG-1 細胞と HeLa 細胞との相互作用の時系列 1 細胞蛍光顕微鏡観察画像
無染色の KHYG-1 細胞と Calcein-AM で緑色蛍光染色を施した HeLa 細胞を隣接させた。
数字は、時系列画像の順番を表し、約 100 秒間隔で撮像された（スケールバー：50 μm）。

次に、観察後に、光硬化性ゲルのモノマーと光重合開始剤との混合液体を導入した際の細胞の流失について調べた。吉野教授らの方法では、溶媒を用いずに PEGDA の原液に重合開始剤水溶液を少量添加したものを使って、瞬時に光硬化する条件を確立している。従って、細胞回収のためにこの粘度の高い材料液体を流路に導入した際、基板に付着させている浮遊性の免疫細胞が、基板から脱着して流される可能性が考えられた。そこで、材料液体を導入した前後での残存細胞率を計測したところ、96%の細胞が残存し、細胞は流失しないことが確認された。

続いて、観察下で選択的に単一細胞ペアに光照射を行い、単一の細胞ペアだけを包埋しつつピンセットでつま

めるサイズのゲルを生成するための条件検討を行った。まず、蛍光顕微鏡を用い、搭載されている水銀ランプの 360 nm（±5 nm）の波長域の光を用い、光の照射条件（照射時間や強度）を最適化したが、隣接する多くの細胞ペアも一緒に固めてしまうほどの大きなゲル（直径数 mm）しか生成できなかった。細胞ペアの間隔を広げることも可能であったが、解析できる細胞ペアの数が大きく減るため、他の方法を検討した。

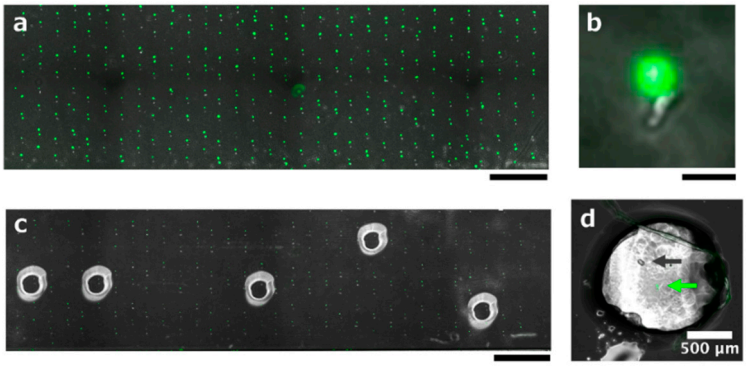


図 4. 細胞間相互作用の観察後に細胞ペアを選択的に回収した際の蛍光顕微鏡像

図 3 と同様にして KHYG-1 細胞と HeLa 細胞との相互作用を観察し、GCM 法で回収。

a）細胞ペアを光配置した後の画像（スケールバー：1 mm）。

b）KHYG-1 細胞と HeLa 細胞との相互作用時の拡大画像（スケールバー：20 μm）。

c）光照射によってゲルで包埋した後の画像（スケールバー：1 mm）。

d）回収したゲルの画像（スケールバー：0.5 mm）。黒矢印：KHYG-1、緑矢印：HeLa。

次に、共焦点レーザー顕微鏡を用い、搭載されているダイオードレーザーの 405 nm の光を 40 倍の対物レンズを通して照射した。当初、吉野教授の報告に従い、UV 硬化型の光重合開始剤である omnirad 2959 を使用していたが、最大吸収波長（330 nm）とレーザー波長の差が大きく、大きなゲルを生成することは出来なかった。そこで、より広い波長域で重合を開始する omnirad 1173 に変更したところ、数秒の光照射で直径が 0.5～1 mm 程度のピンセットでつまめる適切なサイズのゲルを生成できることが分かった。また、開口数の大きな対物レンズを使用していることより、細胞が並んでいる底面でのゲルの直径は数 100 μm 程度に抑えられた。この条件で細胞を回収するために、細胞ペアを配置する間隔（500 μm）とパターンを変更し、隣接する細胞ペアを巻き込まずに、ピンセットでつまめるサイズのゲルを生成し、細胞を選択的に回収する条件を確立した。この条件で実験を行ったところ、KHYG-1 細胞と HeLa 細胞との相互作用を観察した後（図 4a、b）、そのがん細胞傷害性に基づいて細胞ペアを選び、選択的に光を照射してゲル化し（図 4c）、ピンセットで細胞ペアを回収することに成功した（図 4d）。

以上のように、当初の研究計画とは異なる方法で、がん細胞傷害性の観察後に、細胞を選択的に回収する方法を確立した。現在、この手法を用いて回収した細胞の遺伝子解析実験を実施している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門の吉野知子教授、京都大学大学院生命科学研究科松田道行研究室の山平真也特定講師（現 大阪大学産業科学研究所山口哲志研究室助教）、大阪大学産業科学研究所ナノ加工室の榊原昇一技官である。

文　献

1) Yamaguchi S, Yamahira S, Kikuchi K, Sumaru K, Kanamori T, Nagamune T. Photocontrollable dynamic micropatterning of non-adherent mammalian cells using a photocleavable poly(ethylene glycol) lipid. Angew. Chem. Int. Ed. 2012 Jan 2;51(1):128-31. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22105916 DOI: 10.1002/anie.201106106.

2) Izuta S, Yamaguchi S, Kosaka T, Okamoto A. Reversible and photoresponsive immobilization of nonadherent cells by spiropyran-conjugated PEG–lipids. ACS Appl. Bio Mater. 2019 Jan 22;2(1):33-38. Epub 2019 Jan 7. PMID: 35016328 DOI: 10.1021/acsabm.8b00656.

3) Yamahira S, Misawa R, Kosaka T, Tan M, Izuta S, Yamashita H, Heike Y, Okamoto A, Nagamune T, Yamaguchi S. Photoactivatable materials for versatile single-cell patterning based on the photocaging of cell-anchoring moieties through lipid self-assembly. J Am. Chem. Soc. 2022 Jul 27;144(29):13154-13162. Epub 2022 Jun 29. PMID: 35767880 DOI: 10.1021/jacs.2c02949.

4) Kosaka T, Yamaguchi S, Izuta S, Yamahira S, Shibasaki Y, Tateno H, Okamoto A. Bioorthogonal photoreactive surfaces for single-cell analysis of intercellular communications. J Am. Chem. Soc. 2022 Oct 5;144(39):17980-17988. Epub 2022 Sep 20. PMID: 36126284 DOI: 10.1021/jacs.2c07321.

5) Yamahira S, Heike Y. Facile fabrication of thin-bottom round-well plates using the deformation of PDMS molds and their application for single-gell PCR. Micromachines (Basel) 2020 Jul 31;11(8):748. PMID: 32751967 DOI: 10.3390/mi11080748.

6) Yoshino T, Tanaka T, Nakamura S, Negishi R, Hosokawa M, Matsunaga, T. Manipulation of a single circulating tumor cell using visualization of hydrogel encapsulation toward single-cell whole-genome amplification. Anal. Chem. 2016 Jul 19;88(14):7230-7. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27299849 DOi: 10.1021/acs.analchem.6b01475.