

免疫治療に向けた電界集中型細胞融合による細胞質移植技術の開発

Development of techniques for cytoplasmic transfer without nuclei mixing for immunotherapy using one-to-one electrofusion

板垣 雄太郎 指導教員 鷲津 正夫 教授

Yutaro ITAGAKI (Professor Masao WASHIZU)

Keywords : microfluidic device, immunotherapy, one-to-one electrofusion, cytoplasm, enucleation

1. 序論

近年、癌の先進治療法の一つである免疫治療がその低侵襲性や、副作用の少なさ、転移癌や進行癌の治療可能性から注目されている[1]。癌の免疫治療では、体内の免疫系に指令を出す役割を担う「樹状細胞」を患者の体外で培養し、癌のペプチド(癌細胞を特定する固有のタンパク)を取り込ませてから体内に戻す。癌のペプチドを取得した樹状細胞を体内に戻すと、免疫系の細胞である CD8⁺T 細胞(キラーT細胞)が活性化され、活性化したキラーT細胞は同じペプチドを持つ癌細胞を殺傷する能力を得る。この働きを用いて癌の治療を行うものが免疫治療である。

体外で樹状細胞に癌細胞のペプチドを取り込ませる方法として、これまでに同定された癌抗原に対しては人工的に作製したペプチドを直接樹状細胞に振りかける方法がある[2]。しかし、癌が多様化していることもあり、全ての癌に対応できるペプチドを作製することは技術的に難しく、コスト的にも高い。そのため、より簡単な方法として、樹状細胞を癌細胞と「融合」させる方法がある。従来は、PEG(ポリエチレングリコール)による融合法が使われてきた。しかし、この方法では、隣り合う細胞同士がランダムに融合してしまうため、樹状細胞と癌細胞が1対1で融合したペアの生成効率が極めて低い。さらに、融合時に癌細胞の核(遺伝情報が含まれる)も樹状細胞内に取り込まれてしまう。そのため、融合後の樹状細胞は体内に戻したときに癌化するリスクが存在し、現状では動物実験や *in vitro* での臨床試験でしか行われていない[3]。

そこで本研究では、治療対象となる癌細胞の核の混入を防ぎながらその細胞質のみを樹状細胞に移植させる技術を開発し、融合によってペプチドを獲得した樹状細胞を免疫治療に使用する場合、核の混合による癌化のリスクを低減させ、より安全性の高い免疫治療法を確立させることが目的である。

2. 実験方法

癌細胞の核が混入することなく細胞質のみを効率よく樹状細胞に移植するため、細胞核よりも小さいオリフィスを介して癌細胞と樹状細胞を1対1に電気融合させた後、癌細胞のみを選択的に除去する方法を開発した。

この方法を実現させるため、微細加工技術を用いて Fig. 1 に示す PDMS (Polydimethylsiloxane) 製のマイクロ流体デバイスを作製した。シャーレ上の電極間に2本のマイクロ流路があり、2本の流路を隔てる壁には一定間隔で直径 2 μm (細胞核が通り抜けれない大きさ) のオリフィスを設けた。それぞれの流路をソルビトールバッファ (150

mM) で満たした後、入口1から樹状細胞を、入口2からは癌細胞を導入した。尚、本実験では樹状細胞として Leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC05) を使用し、癌細胞として Jurkat 細胞を使用した。

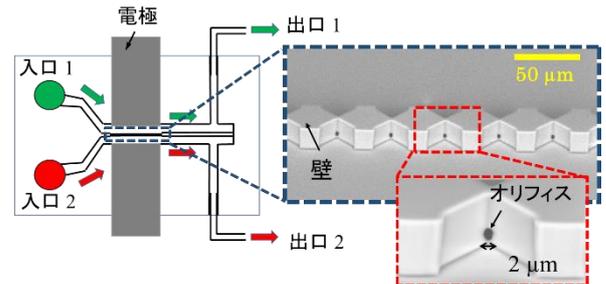


Fig. 1 Structure of PDMS microfluidic device.

次に、Fig. 2(a) に示すように、電極間に交流電圧(4 V~8 V, 1 MHz)を印加し、誘電泳動力によりそれぞれの流路に導入した細胞を電界集中の生じるオリフィスへ誘導した。オリフィスを介して1対1の細胞ペアを作ることができたら、Fig. 2(b) に示すようにパルス電圧(>3 V, 100 μs)を印加した。電界の集中するオリフィス部でのみ生じる可逆的な膜破壊を利用して、樹状細胞と Jurkat 細胞を1対1で融合させた。この時、オリフィスの直径が 2 μm であることから細胞質のみ混合し、細胞核がオリフィスを通り抜けることを防ぐことができた。融合後、Fig. 2(c) のように Jurkat 細胞の流路にのみ瞬時に流れを起こすことで、Jurkat 細胞を核ごと引きちぎり、Jurkat 細胞の細胞質のみを得た樹状細胞を再分離した。

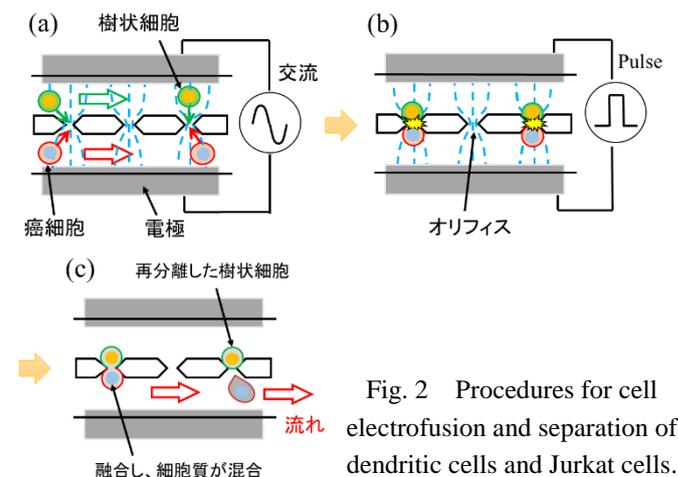


Fig. 2 Procedures for cell electrofusion and separation of dendritic cells and Jurkat cells.

3. 実験結果及び考察

3.1. 樹状細胞と Jurkat 細胞の1対1細胞融合実験

Fig. 3(a) は、2本の流路に樹状細胞と Jurkat 細胞を導入した様子を示している。Fig. 3(b) と Fig. 3(c) から、Calcein-AM で緑色に染色した樹状細胞が壁より上側の流

路にのみ存在し、Calcein red orange-AM で赤色に染色した Jurkat 細胞が壁より下側の流路にのみ存在していることが分かる。交流電圧(6 V, 1 MHz)による誘電泳動で、オリフィスを介して樹状細胞と Jurkat 細胞が対を形成した後、パルス電圧(11 V, 100 μ s)を印加した。Fig. 3(d) の矢印が示すように、パルス電圧をかけた瞬間にオリフィスに接する樹状細胞のみが新たに赤く蛍光するようになった。これはオリフィスに接する細胞のみが 1 対 1 で融合し、赤く蛍光する Jurkat 細胞の細胞質が樹状細胞内に取りこまれたことを意味する。融合効率は約 70%~85%であった。Fig. 4 は Fig. 3 の中の 2 ペアを拡大したもので、Fig. 4(a) に示すように、融合を行っても Hoechst33342 で染色した樹状細胞の核と Jurkat 細胞の核はオリフィスを通り抜けず、それぞれの細胞内に残っていた。Fig. 4(b) や Fig. 4(c) に示すように、融合後、樹状細胞と Jurkat 細胞の細胞質はオリフィスを介して繋がり、細胞質が混合したことが分かる。

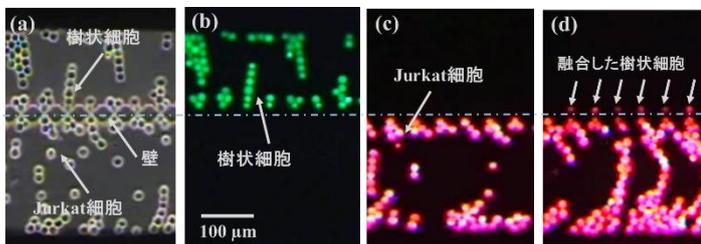


Fig. 3 Cell alignment at micro-orifices by DEP and the result of one-to-one electrofusion.

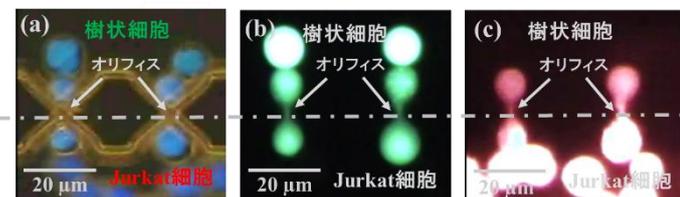


Fig. 4 Result of one-to-one electrofusion and separation by shear flow application.

3.2. 流体による融合細胞からの Jurkat 細胞核除去実験

Fig. 5(a) に示す流路で樹状細胞と Jurkat 細胞を 1 対 1 融合させた後、Jurkat 細胞側の流路にのみ流れを起こしたところ Jurkat 細胞の核を引きちぎることができた。しかし、流れを起こしてから引きちぎるまでに 5 秒以上時間がかかり、その間圧力差によって樹状細胞の細胞質が引きちぎられる Jurkat 細胞内に流れ込んでしまった。Fig. 5(a)の流路で再分離した樹状細胞を Fig. 6(b) に示すが、オリフィスに残った樹状細胞は核のみで存在しており、細胞質は失われていた。この結果を受け、流れで素早く分離を行う必要があると考え、Jurkat 細胞が流れの影響を受けやすいように Fig. 5(b)のように流路形状を変更した。Fig. 5(b) に示すデバイスで融合した 2 対の融合ペアを Fig. 7(a) に示す。この流路を用いると、流れを起こしてから 1 秒かからずに Jurkat 細胞を引きちぎることに成功した。Fig. 7(b) で示すように再分離した樹状細胞内には核が残っており、さらに、Fig. 8 に示すように、再分離した樹状細胞は緑色だけではなく赤色にも蛍光することから Jurkat 細胞の細胞質も含んでいることが分かった。

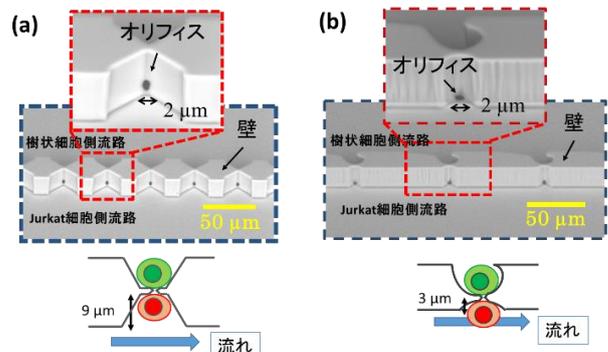


Fig. 5 Redesign of microfluidic device for quick separation.

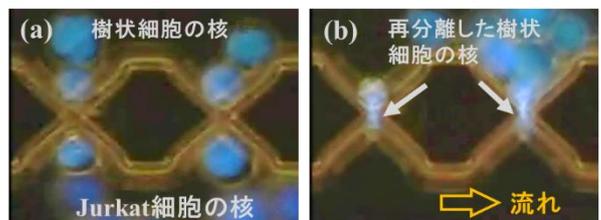


Fig. 6 Result of separation using 1st generation device.

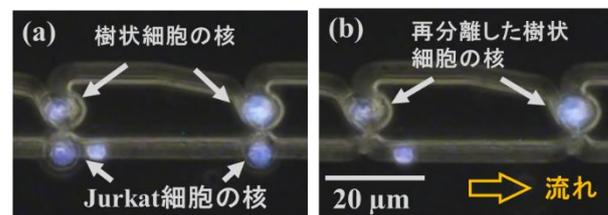


Fig. 7 Result of separation using 2nd generation device.

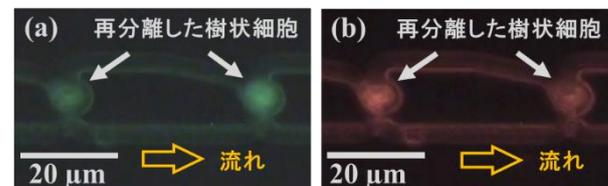


Fig. 8 Cell cytoplasm remain on orifice after separation using 2nd generation device.

4. 結論

樹状細胞と Jurkat 細胞の高効率 1 対 1 電気融合に成功し、その融合効率は最大で約 85%であった。また、融合の際に細胞核はオリフィスを通り抜けることなく、それぞれの細胞内に存在した。

樹状細胞再分離用に流路を設計したところ、瞬時に Jurkat 細胞を引きちぎることに成功した。再分離した樹状細胞には Jurkat 細胞の細胞質も含まれており、これは Jurkat 細胞の核を混入することなく細胞質のみを移植することに成功したことを示す。従って、本研究で開発した手法で得られる樹状細胞は、癌の核を含んでおらず、従来の PEG 融合法で得られるものと比較して免疫治療に使用した際における癌化のリスクが小さいと考えられる。

参考文献

- [1] Karolina Palucka, Jacques Banchereau "Cancer immunotherapy via dendritic cells", Nature Reviews Cancer 12, (2012), pp.265-277.
- [2] Hiroya Kobayashi, Esteban Celis, "Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells", Current Opinion in Immunology volume 20 issue 2, (2008), pp.221-227.
- [3] Yasuhiro Tanaka, "Dendritic cells-based cancer vaccine -Cancer immunotherapy with tumor/dendritic cell fusions-", 耳鼻免疫アレルギー 30(1), (2012), pp.1-7.