



Title	免疫活性T細胞の1細胞機能解析デバイスシステム創出
Author(s)	井手, 大輝
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91915
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (井 手 大 輝)	
論文題名	免疫活性T細胞の1細胞機能解析デバイスシステム創出
がん免疫における免疫チェックポイント治療効果の程度、アレルギーなど自己免疫疾患における病状の程度など免疫機能には個人差があることが知られている。免疫機能の個人間の差異として分子レベルの違いが示されており、分子の生産は細胞に由来するため、突き詰めれば1細胞レベルのヘテロさに起因していると考えられている。ゆえに個々の1細胞の計測解析が求められるが、従来の多数の細胞を扱うバルク計測・解析では、平均値としての結果を得るのみで特異な細胞のシグナルが隠れてしまう課題がある。そのため、免疫細胞の新たな知見を得るために、網羅的に1細胞を捉えることが可能な細胞機能解析デバイス技術の創出が強く求められている。本論文では、生体免疫において中心的役割を果たすT細胞を主な解析対象として、病的細胞への攻撃能や遊走能、認識能を統合的に評価・理解するためのデバイス設計および計測手法の確立に取り組んだ。本論文は、以下の5章で構成されている。 第1章では、免疫機能および本研究の解析対象であるT細胞について詳述した。また、研究の背景として従来解析技術の現状に触れ、1細胞解析技術のためのμTAS技術の動向について詳述し、本論文の目的と意義を明らかにした。 第2章では、抗原特異的な免疫応答を惹起するT細胞の検出・解析を目的として、抗原提示細胞（APC）とT細胞の細胞対形成とイメージング解析および特定1細胞の回収アプローチが可能なデバイス開発、さらにはphenomeとgenomeの相関性を明らかにする試みを行った。APCと相互作用するT細胞受容体（TCR）を持つT細胞は10^6個に1個程度であることに起因するTCRレパトア探索手法に課題に対し、細胞間相互作用解析により抗原特異的なT細胞の検出に取り組んだ。モデルとしてOVAタンパクを抗原特異的に認識するTCRを有するOT-1遺伝子改変マウス由来のT細胞を実験に用いた。デバイスは、生体適合性が高く自家蛍光の少ないPDMSを材料に微細加工技術を用いて設計作製した。流路中央部には、特定細胞に対し回収アプローチが可能なϕ 5 mm開口部を設けた。チップ内に捕捉したOVA提示APCにOT-I T細胞を送水ポンプにより細胞対形成させ、T細胞活性化の指標である細胞内Ca^{2+}変動を蛍光測定した。個々のT細胞応答を比較した結果、同じTCRを有する場合でもT細胞活性化において挙動差があることが分かった。また、1細胞毎に網羅的な遺伝子解析を行うsingle-cell RNA-Seq法によりT細胞genome解析を行ったところ、細胞内Ca^{2+}変動・動態(phenome)で形成されたT細胞クラスターと細胞対形成に起因するT細胞免疫活性を示す遺伝子発現の相関性を示唆する結果を得た。これにより、phenomeとgenomeの相関性を明らかにするには、多次元パラメータ解析が必要であることを見出した。 第3章では、開発した計測技術を生体内の細胞へ応用することを目的に、新規デバイス開発を行った。生体内において病原体に対し特異的な免疫応答を示すT細胞は希少であることから、希少な特異細胞を得るためにAPCに対するT細胞のランダムな接触機会を増やす機構を開発した。送液によりチップ底面から離れた位置を移動するT細胞数をなくすため、APC捕捉ウェル面に角度を持たせ、遠心力を利用して斜面に沿ってT細胞を移動させることで細胞対形成を向上させた。デバイス内の細胞すべてに均等に加わる遠心力は大量の細胞を操作可能であり、送水ポンプ使用時と比較して1.49倍の細胞対形成効率を示した。また、計測技術の臨床応用を見据え、企業との共同研究を進め量産可能な射出成型方式によるデバイスチップも作製し、実験に用いた。OVAタンパクを免疫したマウス由来T細胞を用いて、T細胞内Ca^{2+}変動の解析により生体における希少な免疫活性T細胞の検出に成功した。 第4章では、癌細胞攻撃の際に免疫細胞が分泌するGranzyme Bの酵素活性を指標とした1細胞分泌因子活性計測と1細胞遺伝子解析を可能とするデバイスチップを開発した。1細胞捕捉構造とその周囲に液滴分離を行うϕ 100 μm微小堰構造をセットにし、チップを設計作製した。また傾斜状態で遠心させることで1細胞補足する手法も考案した。さらに、親水化パターンニングを施し、油液分離により捕捉・堰構造内のみ500 pLの微小閉鎖空間の形成を可能にした。堰構造内にてNK92細胞を1細胞補足し、Granzyme B活性の蛍光測定により1細胞機能評価が可能であることを示した。 第5章では、本研究の結論と今後の課題についてまとめた。本研究にて開発したデバイスおよび計測技術による免疫細胞の1細胞解析は、免疫システムの作用機序を研究する上での方法論となり、免疫療法に貢献する新手法と結論づけた。また、本研究で開発した手法は、細胞間のレセプター／リガンド結合の探索やその認識能評価、細胞の微量な細胞分泌物の測定など種々の細胞計測にも汎用展開可能であり、学術、医療診断、創薬に貢献できることを示した。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (井 手 大 輝)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	藤田 克昌
	副 査	教授	井上 康志
	副 査	教授	関谷 毅
	副 査	教授	高村 禅 (北陸先端科学技術大学院大学)
論文審査の結果の要旨			
本学位論文は、免疫細胞活性時の動的変化の観察および 1 細胞回収と遺伝子解析に展開可能な微小流体細胞チップを提案し、1 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化計測や運動解析、発現遺伝子解析が T 細胞活性化における表現型と遺伝型の関連性を求めることに有効であること、加えて、個々の免疫細胞の分泌能評価が可能なデバイス開発についてまとめたものである。その成果は以下の通りである。 抗原提示細胞 (APC) と T 細胞の細胞対形成とイメージング解析および特定 1 細胞の回収アプローチが可能なデバイス開発を行っている。任意の細胞に対し回収アプローチが可能な直径 5 mm 開口部をもつデバイス内で、直径 15 μm のウェル構造にて補足した APC に T 細胞を送水ポンプにて接触させ T 細胞-APC 細胞対形成を観察している。T 細胞活性化の指標である細胞内 Ca^{2+} 変動を測定し、個々の T 細胞応答を比較している。その結果、同じ T 細胞受容体 (TCR) でも挙動差があることを明らかにしている。さらに、1 細胞毎に網羅的遺伝子解析を行う single-cell RNA-Seq 法にて個々の T 細胞の発現解析を行い、細胞対形成時の T 細胞の Ca^{2+} 濃度変化と運動性および発現遺伝子とが関連するという示唆を得ている。また、T 細胞活性化における表現型と遺伝型の結び付けには複数要素が必要であることを見出している。 生体内での抗原特異的な免疫応答を示す T 細胞を検出するため、APC と T 細胞のランダムな接触機会を増やす遠心回転型微小流体チップを考案している。諸条件検討により、80 μm 間隔に APC を 1 細胞捕捉する構造を配置し、チップを 30 度傾斜させた状態で遠心させることが有効であることを見出し、チップ構造を最適化することで、送液型に比較して約 1.5 倍の細胞対形成能の向上を実現している。OVA 感作マウスの脾臓由来 T 細胞および開発チップを用いて、APC と接触した T 細胞内 Ca^{2+} 変動を測定解析し、抗原特異的な応答を示す T 細胞を検出している。 免疫細胞の腫瘍細胞攻撃に使われる消化酵素に Granzyme B を指標とした免疫細胞の分泌因子活性を計測・解析する 1 細胞デバイスチップを開発している。1 細胞捕捉構造と直径 100 μm の堰構造を有し、かつ傾斜遠心により 1 細胞捕捉可能なチップを考案している。さらに堰構造内のみに親水化パターンニングを施すことで、油液分離による 500 pL の微小閉空間を形成し、捕捉 1 細胞の分泌因子である Granzyme B の拡散を防ぐことで、活性計測が可能なチップを開発している。NK92 細胞を評価モデルとし、1 細胞捕捉と蛍光標識された基質指示薬を用いて、Granzyme B 活性測定が可能であることを示すとともに、細胞に活性差があることを示している。 以上のように、本学位論文では生体免疫において中心的役割を果たす免疫細胞を対象に、認識能や攻撃能を統合的に評価・理解するための 1 細胞解析デバイスを提案し、その有用性を実証している。提案した細胞機能を評価・解析可能な 1 細胞計測デバイスは、医科学や生化学など分野、および医療応用も期待でき、社会的にも意義高い成果が得られている。これらの結果は、応用物理学、特にバイオセンシングの発展に貢献するところが大きい。よって本論文は、博士学位論文として価値あるものと認める。			