

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域
「統合1細胞解析のための革新的技術基盤」
研究課題
「細胞膜レセプタータンパクの1細胞統合
解析技術の開発」

研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年3月

研究代表者：民谷 栄一
(大阪大学産業科学研究所、
特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、細胞が1細胞ずつ配置されたその場でダイナミクスを捉えるナノバイオセンシングとマイクロ流体デバイスを活用した1細胞フェノーム解析技術の創成を目指してきた。特に腫瘍や自己免疫疾患など、個々の病因・病態とその1細胞レベルの機能を、病的細胞への**攻撃能**や**遊走能**、**認識能**の解析と統合的な評価・理解によって治療効果向上への展開を目指してきた。そのため、阪大・工・民谷齋藤グループにおいて、医・高松グループの臨床ニーズをもとに各種1細胞操作機能解析チップの創出と計測デバイスを構築し、モデル細胞や臨床検体を用いた診断応用検討を進め、効果的に開発を行った。さらには高効率安価なペプチドバーコードを用いたレセプタータンパク認識抗体ライブラリの構築も行った。

免疫細胞の攻撃能評価デバイスチップとして、1細胞捕捉とバルブ遮閉分離による密閉が可能なチップを開発し、腫瘍攻撃の際に重要な Granzyme B 活性を指標とする1細胞分泌因子活性評価に成功した。阪大医・高松 G と連携して、健常人並びに肺がん患者の末梢血単核球から、1細胞ごとに GZMB 活性を測定できることを実証した。抗 PD1 抗体治療患者の末梢血単核球では、PD1 抗体が結合した抑制性シグナルが阻害されている細胞において1細胞レベルの産生する GZMB 活性が高いことを認め、治療効果を予測しうることを明らかにした (Thernostics, doi:10.7150/thno.37728)。さらに治療効果等の臨床情報と紐づいた免疫チェックポイント抗体治療患者の治療前後の末梢血検体 10 件を用いて、1細胞 GZMB 活性測定の臨床的意義について POC を行った。その結果、免疫チェックポイント治療 (ニボルマブ) に対するレスポナーは、あらかじめ GZMB 活性が高い、あるいは、治療により GZMB 活性が亢進することが認められ、ノンレスポナーは治療による GZMB 活性の亢進を認めないことが明らかとなった。FACS による population 解析では、予後予測に限界があるのに対して、1細胞チップによる GZMB 活性測定が、免疫チェックポイント治療効果予測に有用であることを示すものである。得られた成果をまとめ、現在、論文投稿中である。現在、測定と解析においてチップ操作に対する経験、時間を要するなど仕様の課題や、1細胞ごとの発現との関連などにも興味を引く点も出てきたことから、1細胞回収および臨床診断応用に向けて、扱いを容易にする更なる改良版を考案した。出願もし、現在、実証実験を進めている。

免疫細胞の認識能評価デバイスチップについて、アレイ状に捕捉した抗原提示細胞 (APC) に T 細胞との細胞対をシングルセルレベルで形成させ、さらに目的の T 細胞 1 細胞を回収しレパトア解析できるよう、独自の開放系流体チップを開発した。これにより、OT-1/OVA(257-264)を指標に特異的相互作用にともなう活性化を捉え (Ca²⁺インジケーター fluo-4)、さらに回収した T 細胞の scRNA-seq 遺伝子発現解析を行い、活性化状態と遺伝子発現間の相関を得ることに成功した。接触時動態と活性化シグナルから T 細胞を 3 群に分類し、持続的なシグナルでは細胞代謝に、短期的なシグナルでは細胞傷害機能に関して遺伝子発現に変動が確認され、個々の T 細胞の動態と免疫機能活性の間に相関性があることが示唆される結果を得ることに成功した。この結果は、1細胞の差違を理解するにあたっては Ca²⁺ flux あるいは scRNA-seq のみの解析だけでなく、動態などを状況や目的に適したパラメータを設定することが重要であることがわかった。また、現在さらに、出現頻度の低い抗原特異 T 細胞を検出するためのデバイスプラットフォームも考案、出願している。現在、その評価を進めている。

一方、京大・植田 G において、**酵母ライブラリによる機能的 Nanobody 取得を実証**し、さらに高感度カラムの開発によって Nanobody に付与したペプチドバーコードのスクリーニング評価も確立した。これにより我々の任意の認識分子取得コンセプトが機能することを確かめた。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要:

腫瘍攻撃の際に重要な Granzyme B 活性を1細胞ごとに評価可能なチップを開発し、NK 細

胞、T細胞などの個々の1細胞ごとにGZMB活性差が生じていることを確かめるとともに、健常人並びに肺がん患者の末梢血単核球から、1細胞ごとにGZMB活性を測定し、細胞傷害活性をタンパクレベルで同定できることを実証した。抗PD1抗体治療患者の末梢血単核球では、PD1抗体が結合した抑制性シグナルが阻害されている細胞において1細胞レベルの産生するGZMB活性が高いことを認め、治療効果を予測しうることを明らかにした(Theragnostics, doi:10.7150/thno.37728)。開発デバイス用いた計測手法が、免疫チェックポイント治療効果予測を実現するツールとなりうるものと期待される。

2.

概要:

T細胞と抗原提示細胞(APC)の相互作用解析と、目的T細胞を回収しレパトア解析できるよう、独自の開放系流体チップを開発した。OT-1/OVA(257-264)を指標に特異的相互作用にともなう活性化を捉え(Ca²⁺インジケータ-fluo-4)、さらに回収したT細胞のscRNA-seq遺伝子発現解析を行い、活性化動態と遺伝子発現との相関性があることが示唆される結果を得ることに成功した。開発した1細胞チップが、1細胞の機能活性を含んだフェノーム解析を実現するツールとなりうるものと期待される。

3.

概要:

細胞表面レセプターを網羅的に解析するために、酵母細胞表面工学技術を適用することで、従来の哺乳類細胞に代わり、従来の抗体生産コストを1/10以下に抑えた安価に抗体生産可能な酵母細胞株を樹立した。また、抗体ライブラリを迅速かつ正確に評価できる新しい方法論として、ペプチドバーコードを利用したバーコードマッチング法を開発した。本技術は、網羅的な抗体セットを準備するために極めて効率の良いシステムとなる可能性がある。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要:

1細胞Granzyme活性評価チップにより、抗PD1抗体治療患者の末梢血単核球では、PD1抗体が結合した抑制性シグナルが阻害されている細胞において1細胞レベルの産生するGZMB活性が高いことを認め、治療効果を予測しうることを明らかにした。将来的に、個人別に細胞機能・状態を評価可能になることで、それに基づいた治療・効果向上への寄与が期待される。

2.

概要:

免疫1細胞(T細胞)の認識能評価デバイスチップについて、特異的相互作用にともなうT細胞の活性化(Ca²⁺flux、動態)と発現遺伝子(代謝と機能化)の間に相関性を得ることに成功した。1細胞解析には単一の解析だけでは不十分で、目的に適したパラメータを設定することが重要であることを示すこともできた。つまり、複数項目を同時計測・解析することが新たな知見を得ることに有効であることを示唆するもので、本研究で開発している1細胞チップが、今後の生物学や診断技術の進展に貢献できるツールとなるものと考えられる。また、樹脂成型メーカーと量産に向けた検討を行っており、金型射出成型においては極めて難しい1細胞捕捉マイクロ構造の試作成型に成功しており、量産化への可能性に目途をつけている。現在、グランザイム活性計測やTCRレパトア解析の市場性調査など事業化を目指した検討を進めている。

3.

概要:

酵母ライブラリによるNanobody抗体取得法は、従来の高コストな抗体取得に比べ、コスト・時

間ともに格段に改善される。そのため、医療・分析・研究と種々の方面への大きな貢献が期待される。

< 代表的な論文 >

1.

概要:

Jonathan C. Briones, Wilfred V. Espulgar, Shohei Koyama, Hiroyuki Yoshikawa, JeongHoon Park, Yujiro Naito, Atsushi Kumanogoh, Eiichi Tamiya*, Hyota Takamatsu, and Masato Saito*, A Microfluidic Platform for Single Cell Fluorometric Granzyme B Profiling, Theranostics 2020; 10(1):123-132. doi:10.7150/thno.37728

腫瘍攻撃の際に重要な Granzyme B 活性を 1 細胞ごとに評価可能なチップを開発し、NK 細胞、T 細胞などの個々の 1 細胞ごとに GZMB 活性差が生じていることを確かめるとともに、健康人並びに肺がん患者の末梢血単核球から、1細胞ごとに GZMB 活性を測定し、細胞傷害活性をタンパクレベルで同定できることを実証した。抗 PD1 抗体治療患者の末梢血単核球では、PD 1 抗体が結合した抑制性シグナルが阻害されている細胞において 1 細胞レベルの産生する GZMB 活性が高いことを認め、治療効果を予測しうることを明らかにした。

2.

概要:

A design and optimization of a high throughput valve based microfluidic device for single cell compartmentalization and analysis, Jonathan Briones, Wilfred Espulgar, Shohei Koyama, Hyota Takamatsu, Eiichi Tamiya & Masato Saito, Scientific Reports 11, Article number: 12995 (2021)

1 細胞捕捉とバルブ遮閉分離による密閉により、1 細胞分泌 Granzyme B の活性評価を可能にしているが、医療診断ニーズに応じて 5000 細胞の捕捉分離と活性評価を行えるようハイスループット化することに成功した。流体・圧力・構造のシミュレーション解析を行い、バルブ構造と駆動圧 (0.04MPa) を導出するとともに、試作したチップにおいて PBMC のグランザイム B 活性評価が可能であることを確かめ、後の臨床検体評価実証へのベースを得ることができた。

3.

概要:

Profiling T cell interaction and activation through microfluidics-assisted serial encounter with APCs, Hiroki Ide, Wilfred Villariza Espulgar, Masato Saito*, Taiki Aoshi, Shohei Koyama, Hyota Takamatsu, Eiichi Tamiya, Sensors and Actuators B: Chemical, 330 (2021) 129306

アレイ状に捕捉した抗原提示細胞 (APC) に T 細胞との細胞対をシングルセルレベルで形成させ、OT-1/OVA(257-264) を指標に特異的相互作用にともなう活性化 (Ca²⁺インジケーター fluo-4) を捉えることに成功するとともに、同一条件下の T 細胞にも活性差が生じることを明らかにした。また、目的の T 細胞 1 細胞を回収しレパトア解析できるよう、独自の開放系流体チップ仕様としており、後の T 細胞の scRNA-seq 遺伝子発現解析を行い、活性化状態と遺伝子発現間の相関評価へのベースとなった。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 民谷グループ

研究代表者: 民谷 栄一 (大阪大学産業科学研究所 特任教授)

研究項目: 免疫 1 細胞フェノーム解析技術の構築

② 齋藤グループ

主たる共同研究者: 齋藤 真人 (大阪大学大学院工学研究科 助教)

研究項目：細胞膜レセプタータンパクの1細胞機能解析マイクロ流体デバイスの構築

③ 植田グループ

主たる共同研究者：植田 充美（京都大学大学院農学研究科 教授）

研究項目：レセプター探索のための抗体タンパク創成に関する研究およびリガンド探索に関する研究

④ 高松グループ

主たる共同研究者：高松 漂太（大阪大学医学部呼吸器・免疫内科学 助教）

研究項目：1細胞計測システムを用いた癌や免疫細胞特性の非侵襲的計測方法の確立

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

各種開発している免疫1細胞解析チップについて、量産性の検討に向け、プラスチック成型メーカーと秘密保持契約を結び、すでに1細胞捕捉マイクロ構造部分の金型射出成型試作を行い、また市場性調査を進めている。

ナノボディについて、機能的ナノボディをハイスループットに樹立するバイオベンチャー(Barcodebody 社)を立ち上げた。既に、化学薬品メーカーと共同研究開発を進めている。また、本庶研とのanti-PD1 ナノボディの樹立など多数の共同研究も進展している。また、京都大学 COI-NEXT 拠点においては、多数のアカデミカ・企業が参画するプロジェクトにおいて、サイトカインを含む多様なターゲットに対するナノボディのスクリーニングが進行中である。