

抗原特異的 T 細胞検出のための一細胞レベル細胞間相互作用解析デバイスの開発 Microfluidics of single-cell level analysis for antigen-specific T cell detection

阪大院工¹, 産総研・阪大先端フォトバイオ², 阪大微研³, 阪大院医⁴, 早大ナノライフ創新研⁵,
早大院先進理工⁶, 産総研-早大 CBBDOIL⁷, 阪大産研⁸

○井手 大輝^{1,2}, 齋藤 真人^{1,2}, 青枝 大貴³, 高松漂太⁴, Wilfred Villariza Espulgar¹,
細川 正人⁵, 松永 浩子⁵, 鈴木 直子⁵, 有川 浩司⁵, 竹山 春子^{5,6,7}, 民谷 栄一^{2,8}

Graduate School of Engineering, Osaka Univ.¹, AIST-Osaka Univ. PhotoBIO-OIL², Research Institute for Microbial
Disease, Osaka Univ.³, Graduate School of Medicine, Osaka Univ.⁴, Research organization for Nano and Life
Innovation, Waseda Univ.⁵, Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda Univ.⁶, CBBDOIL,
AIST-Waseda Univ.⁷ and The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.⁸

°Hiroki Ide^{1,2}, Masato Saito^{1,2}, Taiki Aoshi³, Hyota Takamatsu⁴, Wilfred Villariza Espulgar¹, Masahito Hosokawa⁵,
Hiroko Matsunaga⁵, Naoko Suzuki⁵, Koji Arikawa⁵, Haruko Takeyama^{5,6,7} and Eiichi Tamiya^{2,8}.

E-mail: saito.masato@ap.eng.osaka-u.ac.jp

ウイルスやがん細胞などから生体を守る免疫応答の開始には、抗原提示細胞 (APC) が提示する
疾病の情報である抗原を T 細胞受容体 (TCR) により特異的に認識する必要がある。TCR は、あらゆる
抗原に対応するために各々で異なっており [1]、免疫応答を惹起する抗原特異的 T 細胞の検出に
は一細胞レベルでの解析が不可欠であるが、そのような解析手法は未だ確立されていない。そこ
で本研究では、流路中央部に $\phi 5\text{mm}$ 開口部を有する、アレイ状に配置した $\phi 15\ \mu\text{m}$ 、深さ $15\ \mu\text{m}$ の
マイクロウェルと高さ $25\ \mu\text{m}$ の堰を組み合わせた構造にて T 細胞/APC の細胞対をシングルセル
レベルで形成させるマイクロ流体デバイスを独自開発した [2]。作製したデバイスを用いて、APC
との相互作用に伴う T 細胞 Ca^{2+} 濃度変化測定と T 細胞遺伝子発現との相関性の紐づけを試みた。
フォトリソグラフィ技術によりデバイスを設計製作し、スライドガラス上に生体適合性が高く自
家蛍光の少ない PDMS を材料にデバイスを作製した。アレイ状に配置した微細構造に APC を一細胞
補足し、T 細胞を灌流させ APC に接触させることで T 細胞と APC の相互作用を促した。実験には、
モデル系として遺伝子改変マウス及び野生型マウス由来の T 細胞、APC を用いた。T 細胞が APC に
接触した時点で相互作用が開始したと仮定し、 Ca^{2+} インジケータである Fluo4-AM により T 細胞
 Ca^{2+} 変化を経時的に蛍光測定した。得られた蛍光強度を正規化し、T 細胞 Ca^{2+} 濃度の時間変化を
指標に T 細胞活性を評価した。特異ペアの T 細胞では持続的に高い蛍光強度が測定された一方、
非特異ペアでは細胞同士の接触後に一時的な蛍光強度ピークが測定された。T 細胞 Ca^{2+} シグナル
測定から 3 時間インキュベート後、マイクロマニピュレーターを用いてデバイスより一細胞毎に
回収し、シングルセル RNA-Seq により発現遺伝子を解析した。R/Bioconductor パッケージの edgeR
により特異/非特異ペア間で発現変動遺伝子 (DEG) を検出解析したところ、TCR による抗原認識
下流の免疫応答遺伝子群が確認された。また、統計的処理により持続的/短期的 Ca^{2+} シグナル活
性 T 細胞の二群に分類し、DEG 解析を行った。持続的 Ca^{2+} 活性 T 細胞では、細胞代謝に関連する
遺伝子発現が確認された一方、短期的 Ca^{2+} 活性 T 細胞では、即時的な細胞傷害機能の遺伝子が発
現していた。以上より、APC との相互作用に伴う T 細胞 Ca^{2+} 濃度変化と、T 細胞の免疫機能活性
との相関性を紐づけることが可能であることが示唆された。

[1] Tonegawa, S., *Nature*, **302**(5909), 575-581, 1983.

[2] Hiroki, I., *Sensors and Actuators B*, **330**, 129306, 2021