

博士論文審査報告書

氏名	吉村 友希 (ヨシムラ ユキ)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	博理第96号
学位授与報告番号	甲第288号
学位授与年月日	平成28年9月28日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題目	誘電泳動現象に基づく細胞配列化を利用した細胞融合システムの構築に関する研究
論文審査委員	(主査) 准教授 安川 智之 (副査) 教授 阿部 正明 (副査) 教授 田島 裕之 (副査) 教授 本間 健二 (副査) 准教授 椎木 弘 (大阪府立大学大学院工学研究科)

1. 論文内容の要旨

本論文では、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを高効率に作製することを目的とし、マイクロウェルアレイ電極を用いた正の誘電泳動による異種細胞対の形成と電気パルス法による細胞対の融合を利用して、高効率にハイブリッド細胞を取得する新しい手法の開発を行った。ここでは、抗体医薬として極めて重要な細胞膜受容体に対する抗体の高効率作製を念頭に、細胞融合効率の向上を目指した。免疫化マウスの脾臓中に含まれる細胞膜受容体の膜外ドメインを認識する B 細胞の存在率は 10^{-3} 、現在の一般的な電気パルス融合法の融合効率は 10^{-5} であるため、脾臓中の 1 億個の B 細胞から得られるハイブリドーマはわずか 1 個である。そこで、誘電泳動による細胞配列化技術と電気パルス融合法を組み合わせ、 10^{-5} と極めて低い融合効率を 1.6×10^{-1} に向上させた。

まず、異種細胞の縦方向配列を行うために、幅 $14 \mu\text{m}$ (1 細胞サイズ)、深さ $25 \mu\text{m}$ (2 細胞サイズ) のマイクロウェルアレイ電極 (25 万ウェル) を作製した。一般的な光リソグラフィでは、アスペクト比 1 以上の深いウェルの作製は困難であったが、高さ $25 \mu\text{m}$ のマイクロポールアレイの作製により、その間隙をウェルとして使用できることを見出した。これにより、シングルステップの光リソグラフィで容易にマイクロウェルアレイ電極を作製する手法を開発できた。

下面にマイクロウェルアレイ電極を上面に平板 ITO 電極を用いたマイクロ流路型誘電泳動デバイスを作製し上下電極に交流電圧を印加すると、相対的に強い電場をマイクロウェル内に形成することができる。この方法を用い、分散状態にあるマウスミエローマ細胞を正の誘電泳動により瞬時にウェル内へ導入し細胞アレイを形成することができた。さらに、ウシ血清アルブミンで免疫化したマウスから摘出した脾臓の B 細胞を流路内に導入し正の誘電泳動を用いると、個々のウェル内でミエローマ細胞-B 細胞の異種細胞対を形成でき

た。この際、ウェル内において細胞対は縦方向に配向して配列された。細胞対形成後、上下電極に直流パルス電圧を印加すると、配向した細胞対の細胞接触点に対して平行に電気パルスを印加することが可能となり、高効率で細胞対を融合することができた。極めて迅速（1分以内）で高効率（70%の効率で10万細胞対以上）に細胞へのラベル化を行うことなく細胞対を作製する新規手法に、電気パルス法を組み合わせ、これまで 10^{-5} 程度であった融合効率を 1.6×10^{-1} と1,000倍以上と大幅に向上させることができた。さらに、マイクロウェル内に捕捉した細胞を培養すると、自己増殖できることを示した。この過去に類を見ない高い効率でハイブリッド細胞を形成できることから、これまで取得が困難であったタンパク質の特定部位や小分子に対する抗体を効率的に取得する手法として期待される。

2. 論文審査結果

誘電泳動を用いた微粒子や細胞の迅速な操作技術は、粒子の分離、配列、濃縮、センサ開発に応用されている。本論文では、正の誘電泳動によるマイクロウェルアレイ電極への迅速な細胞配列化法を用いて縦方向に配向した細胞ペアを形成し、電気パルス法を用いたウェル内に形成された細胞ペアの高効率融合法の創成について検討している。この方法を用いて高効率に自己増殖能と抗体産生能を兼ね備えたハイブリドーマを高効率に取得する手法の確立を目指している。以下に、成果をまとめる。(1) 透明導電性材料であるインジウムスズ酸化物 (ITO) 電極上にマイクロポールアレイを作製することにより、幅が1細胞サイズ、深さが2細胞サイズのマイクロウェルアレイ電極(25万ウェル)を形成できた。通常のリソグラフィでは困難であったアスペクト比1以上の深いウェル構造をシングルステップのリソグラフィを用いて形成することができた。このマイクロウェルアレイ電極を下面に、ITO 平板電極を上面に使用したマイクロ流路型の誘電泳動デバイスを作製できた。(2) 作製したデバイスにがん化して永久に自己増幅可能なマウスミエローマ細胞の懸濁液を導入し上下電極に交流電圧を印加すると、ランダムに分散していた細胞は、正の誘電泳動による引力のため瞬時（約1秒）にマイクロウェル内へと捕捉されアレイ化された。さらに、免疫化マウスの脾臓から取り出したB細胞を導入し、再度、正の誘電泳動を用いるとウェル内にB細胞を捕捉することができた。この際、ウェル内では、下側のミエローマ細胞と上側のB細胞が縦方向に配列してペアを形成した。ウェル内に捕捉されたB細胞の約16%が、ウェル内でミエローマ細胞と縦方向に配向したペアを形成した。(3) さらに、上下電極を用いて直流電圧を印加すると、形成された細胞ペアが融合しハイブリッド細胞を得ることができた。縦方向に配向配列した細胞ペアはすべて融合することが示され、この手法によりこれまで 10^{-5} 程度であった融合効率を 1.6×10^{-1} と1,000倍以上と大幅に向上させることができた。さらに、正の誘電泳動によりマイクロウェル内に捕捉した細胞を培養液中で培養すると細胞は自己増殖することが示された。これは、誘電泳動による操作が細胞の自己増殖能に大きな影響を与えないことを示している。以上のように、本論文は、誘電泳動による迅速な細胞操作技術と電気パルス法を積極的に融合深化し、高効率で配向制御された異種細胞のペア形成の開発とその細胞融合の検討を行ったもので、新規なハイブリドーマ作製の基盤を構築した評価できるものである。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成28年7月19日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。