

# 学位論文

論文題目 がん細胞像の光ゆらぎ解析を用いた細胞損傷度の定量的評価

(Quantitative evaluation of cancer cell damages  
by intensity fluctuation method of cell images)

平成28年12月博士 (理学) 申請

東京大学大学院理学系研究科

物理学専攻

佐久間 守仁

# 目次

<b>Abstract</b> .....	6
<b>第 1 章 序論</b> .....	8
1-1 がん治療における細胞の損傷度を計測する意義 .....	9
1-2 細胞損傷の評価方法とその問題点 .....	10
1-2-1 ミトコンドリアの機能から細胞の損傷の評価する方法とその問題点 ---	10
1-2-2 蛍光観察による細胞の損傷の評価方法とその問題点 .....	12
1-2-3 位相差顕微鏡を用いた細胞の損傷の計測方法と問題点 .....	13
1-3 本研究の目的 .....	15
<b>第 2 章 実験方法</b> .....	17
2-1 実験に使用した細胞株と細胞培養方法 .....	17
2-2 近赤外蛍光色素 IR700 と膜タンパク質抗体の複合体の作製 .....	19
2-3 実験に使用した光学系概要 .....	23
2-4 位相差顕微鏡撮影動画の光ゆらぎ解析による細胞内運動の定量評価 .....	26
2-5 IR700 の光活性化による細胞損傷の誘起 .....	36
2-6 IR700 の光活性化によって損傷した細胞と細胞内小器官の蛍光観察に	

よる評価方法 -----	37
2-7 細胞内の IR700 の光活性化による輸送分子キネシンへの損傷の評価方法 ---	41
<b>第 3 章 実験結果 -----</b>	<b>44</b>
3-1 IR700 抗体複合体の細胞への特異的取り込みの評価 -----	44
3-1-1 IR700 抗体複合体のがん細胞への取り込みと損傷誘導 -----	44
3-1-2 膜タンパク質を介した IR700 複合体の細胞内への特異的取り込み評価 ---	49
3-2 光ゆらぎ解析による細胞内運動の定量評価 -----	52
3-2-1 損傷時の細胞内運動の光ゆらぎ解析による評価 -----	52
3-2-2 IR700 の光活性化による光ゆらぎ値の統計解析 -----	58
3-2-3 細胞内運動と細胞の損傷度の相関性の評価 -----	61
3-3 IR700 分子の光活性化による細胞内小器官の損傷の評価 -----	65
3-3-1 IR700 を含んだ小胞の破裂 -----	65
3-3-2 IR700 を含んだ小胞の種類と同定 -----	68
3-3-3 IR700 の光活性化による輸送分子キネシンの損傷 -----	74
3-3-4 IR700 の光活性化による細胞損傷時のミトコンドリア構造の変化 -----	77
3-3-5 過酸化水素による酸化ストレスによる細胞内運動の変化-----	79
<b>第 4 章 考察 -----</b>	<b>81</b>
4-1 光ゆらぎ値による細胞内運動解析 -----	81
4-2 IR700 の光活性化による損傷誘導のメカニズム -----	83
4-3 IR700 分子の光活性化が誘起する細胞損傷に伴う細胞内運動低下の	

メカニズムの考察	84
<b>第 5 章 結論</b>	<b>88</b>
5-1 光ゆらぎ解析による損傷時の細胞内運動の定量評価	88
5-2 IR700 の光活性化が細胞内運動に与える影響	90
5-3 むすび	91
謝辞	93
参考文献	95

## 目次

2.1	赤色蛍光色素 IR700 による細胞への損傷誘導の概念図 -----	22
2.2	本研究で使用した光学顕微鏡の概要 -----	25
2.3	光ゆらぎ解析による細胞内運動の解析方法 -----	31
2.4	バンドパスフィルター, 位相差顕微鏡動画撮影速度, 光ゆらぎ値計算フレーム間隔が光ゆらぎ解析に与える影響の評価結果 -----	32
2.5	位相差顕微鏡で観察したスクロース溶液中のシリカビーズ -----	35
2.6	輸送分子キネシンへの損傷を評価するためのチャンバー -----	43
3.1	IR700 の光活性化による細胞の形状変化 -----	47
3.2	IR700 分子の非特異的吸着の評価 -----	51
3.3	IR700 の光活性化前後での光ゆらぎ値のヒートマップ -----	55
3.4	損傷による細胞の形状と細胞内運動の変化 -----	57
3.5	損傷前後の細胞の光ゆらぎ値の変化の統計解析 -----	59
3.6	Ethidium homodimer-1 染色による細胞の損傷の評価 -----	62
3.7	IR700 の連続的な光活性化による光ゆらぎ値の分布の変化 -----	64
3.8	IR700 を内包した小胞の蛍光強度の時間変化 -----	67
3.9	細胞内での IR700 とリソソームの共在の評価 -----	70
3.10	pH インジケータを用いた IR700 の光活性化時における細胞内の pH 変化 ---	73
3.11	IR700 の光活性化による輸送分子キネシンの損傷の評価 -----	76
3.12	IR700 の光活性化によるミトコンドリアの損傷評価 -----	78
3.13	過酸化水素の添加による細胞内運動の変化 -----	80

## Abstract

細胞に損傷を長期間与えると、損傷が蓄積するにつれて次第に弱ってくる。そして、弱った細胞の中から最終的には細胞死を起こすものが出現する。これは、損傷の蓄積によって、細胞が生きる機能を維持することができなくなったためだと考えられる。損傷を受けた細胞の死の過程や回復過程をより詳しく理解するためには、細胞の損傷の度合いである損傷度を測定することが重要である。そこで、本研究では、細胞の損傷度を非侵襲で計測する方法を開発し、細胞の損傷を定量的に評価することを目的とした。

本実験では、がん細胞の損傷を計測するために、光ゆらぎ法を開発した。光ゆらぎ法とは、位相差顕微鏡観察動画の各ピクセルの光強度と光ゆらぎによって、細胞内小器官の運動を定量評価するものである。本手法によって、細胞全体の細胞内運動の変化を統計的に解析することができた。細胞に損傷を誘導するために、赤色蛍光色素である IR700 を使用した。細胞に特異的に結合する抗体を結合した IR700 を、赤レーザーを照射することによって光活性化し、細胞に損傷を与えた。赤レーザーの照射時間と IR700 の添加量で、細胞に与える損傷度を制御することが可能であった。そこで異なる損傷度を細胞に与えて、損傷した細胞の細胞内運動を光ゆらぎ解析によって評価した。その結果、与えた損傷が大きいほど、細胞内運動が低下することが明らかとなった。さらに、細胞へ複数回損傷を与えると、次第に細胞内運動が低下することがわかった。損傷による細胞内運動の低下の原因を明らかにするために、IR700 の光活性化が細胞小器官に与える影響を評価し、IR700 の光活性化はリソソームを損傷し、この損傷によって輸送分子やミトコンドリアも損傷を受けることが明らかとなった。以上のように損傷に伴い細胞内運動が低下したことから、光ゆらぎで定量した細胞内運動が細胞の損傷度の指標となる可能性があることがわかった。本手法は、細胞の損傷を長期間非侵襲で計測することができるため、細胞の損傷度を定量的に評価するための強力な解析方法となることが期待される。

## Abstract

Cell damage is increased gradually by long-term damages, and eventually some of the cells are dead by serious damages. The change in cell viability and the process of cell death are an important factor to understand the function of cells. Here, to understand the change in cell viability after cell damages, we developed a new method to quantify continuous changes in cell damage.

We evaluated damage of cancer cell quantitatively by calculating the intensity fluctuation of each pixel in cell images taken by an EMCCD camera under phase contrast microscopy. We succeeded in quantifying the change in motility of cell organelles by using the intensity fluctuation method. Near-infrared fluorescent dye IR700 was used for photo-damaging cells. IR700 labeled with the antibody, which binds specifically to target cells, was endocytosed into cells. Then cell damage was caused by photoactivation of IR700 induced by a red laser irradiation. The degree of cell damage was controlled by adjusting the dose amount of IR700 and the irradiation time of red laser. The motility of cell organelles detected by the intensity fluctuation method decreased gradually with a progression of cell damage. To elucidate the mechanisms of decrease in the organelles motility, the effects of photoactivation of IR700 on cell organelles and motor protein were evaluated. Lysosomes containing IR700 was damaged quickly by photoactivation of IR700 and the contents in lysosomes were diffused out into cytoplasm. The contents in lysosomes cause the dysfunction of transporter kinesin and mitochondria. Therefore, these damages of organelles and motors may be a primary factor for causing the damage of cells..

In summary, we succeeded in quantifying time courses of changes in cell organelles motility. The motility changed at different degrees of cell damage. Furthermore, we could show a gradual decrease in the cell organelles motility in response to a continuous accumulation of cell damage. These results suggested that the cell organelles motility could be a primary indicator of cell viability. Therefore, the proposed method can be a powerful tool to evaluate cell viability.

# 第 1 章 序論

細胞は損傷を受けることで、生きるための機能が低下する。細胞の損傷の度合いが小さければ、損傷によって低下した機能を回復させることで、細胞は生存することができる。しかし、その度合いが大きいと、細胞は回復することができず、最終的に細胞死を起こす。損傷を受けた細胞の機能の回復や細胞死の過程をより詳しく理解するためには、細胞の損傷の度合いである損傷度を測定することが重要である。そこで、本研究では、細胞の損傷度を非侵襲で計測する方法を開発し、細胞の損傷を定量的に評価することを目的とした。

細胞の損傷度を計測することで、なぜ細胞の回復や死の過程を理解することができるのであろうか。例えば、細胞に対して、細胞死を起こさない程度の損傷を、修復が間に合わない間隔で与えたとする。すると、その細胞は、始めは元気に活動しているが、損傷が蓄積するにつれて次第に弱ってくる。そして、最終的には細胞死を起こすと考えられる。これは、損傷に合わせて次第に細胞の生きるための活力、つまり活性が徐々に低下しているのである。つまり、細胞の損傷度を解析することで、細胞の活性を理解できる可能性がある。

細胞の活性を理解することができれば、細胞に損傷を与えたときに、生細胞と死細胞だけではなく、死んではいないが活性の低い細胞、または少し活性が下がった細胞など、より厳密に細胞の状態を判別することが可能である。がん治療においては、このように少し活性が下がった細胞が回復して、増殖を始めることで、2次腫瘍形成の大きな原因となる。そのため、治療後のがん細胞の損傷度を計測することがで



できれば、2次腫瘍形成の原因となる細胞を検知することが可能である。このような実用的な方面においても、細胞の損傷を計測することは重要である。

そこで本研究では、細胞の損傷度を計測する新しい方法を開発し、がん細胞の損傷を評価した。序論では、まず、がん治療における細胞損傷計測の重要性について述べる。そして、損傷を評価するための既存の方法と、その問題点について論じる。最後に、それらを踏まえた上で、本研究の方法の意義と研究目的について述べる。

### 1-1 がん治療における細胞の損傷度を計測する意義

がん治療においては、死なない程度の損傷を受けた細胞が、致命的な存在となる可能性がある」と述べた。これは、がん細胞には、損傷に対する抵抗機能があるためである。がん細胞の治療方法として、放射線照射や光線力学療法などが用いられている。放射線照射では、直接細胞の DNA に作用するだけでなく、酸素を活性化させることで活性酸素を発生させる [Dahan, P 2014]。光線力学療法では、がん細胞に特異的に蛍光色素を取り込ませて、励起光を照射することで活性化させる。そして、蛍光色素の励起エネルギーが酸素に移ることで活性酸素を発生させる [Berg, K 1997]。活性酸素は、細胞内部のタンパク質や、ミトコンドリア等の細胞内小器官、DNA を非特異的に酸化することで、細胞に損傷を与える。細胞には酸化ストレスを軽減する機能が備わっているが、酸化ストレスが増大すると、ATP の低下などの複数の要因で細胞死を起こす。しかし、がん細胞は酸化ストレスを受けると、還元型グルタチオン等の抗酸化物質を増加させることで、活性酸素種を迅速に除去していることが明らかとなった [Drozd, E 2016]。そのため、1回目の治療によって生存した細胞は、酸化スト

レスを誘導する治療に対して抵抗性を示し、増殖を再開してしまう。治療抵抗機能を獲得するがん細胞の発生を防ぐためには、酸化ストレスを繰り返し与えた時に、細胞の損傷度がどのように変化するかを知る必要がある。そのため、細胞の損傷度を計測することができれば、損傷に対する抵抗性を獲得したがん細胞を選別することが可能であり、その機能の解明に繋がると考えられる。

## 1-2 細胞損傷の評価方法とその問題点

前章では、酸化ストレスを受けたがん細胞の損傷度を計測することの重要性について論じた。本章では、既に広く用いられている細胞の損傷を評価する手法を幾つか挙げる。そして、これらの手法が、損傷度の計測に使用が可能であるか、また、新しい手法が必要であるのかについて述べる。

### 1-2-1 ミトコンドリアの機能から細胞の損傷を評価する方法とその問題点

細胞活性を制御する細胞内小器官として、細胞が活動するエネルギーを産生するミトコンドリアがある。細胞損傷によって、ミトコンドリアの機能が低下すると、細胞の活性が低下する。そのため、ミトコンドリアの活性を計測することで、細胞の活性を評価することが可能だと考えられる。そこで、ミトコンドリアの活性を計測する手法について述べ、この手法が細胞の損傷度を計測し得るのかについて論じた。

ミトコンドリアは、細胞内化学反応のエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (ATP) を産生する細胞内小器官である。脂質や糖質、そしてタンパク質は、それぞ

れ脂肪酸，グルコース，アミノ酸などに分解され，最終的にミトコンドリア内部に集まる．そして，クエン酸回路の酸化反応によって NADH 分子などが作られる．NADH 分子によってミトコンドリア内部の電子伝達系で電子が流れることでプロトンが発生する．最終的にプロトンが ATP 合成酵素である  $F_0F_1$ -ATP アーゼを流れることで，アデノシン二リン酸 (ADP) から ATP が合成される．活性が高い細胞であれば，ミトコンドリアにおけるこの一連の反応が正常に進んでおり，増殖等に使用する ATP の合成を行っている．

そこで，ミトコンドリアにおける化学反応に着目して，細胞の活性を評価するための細胞染色試薬が複数開発され市販されている．ミトコンドリアの反応で放出されるプロトンプロトンを利用して，細胞の活性を評価する評価方法として，MTT 試験がある [Berridge, M.V. 1993, 2005]. MTT (Methyl Thiazolyl Tetrazolium, 分子式  $C_{18}H_{16}BrN_5S$ ) は，細胞内に透過し，ミトコンドリアにおいて放出されたプロトンと反応することでホルマザンに構造変化をおこす．MTT 溶液は黄色であるが，ホルマザン溶液は紫色を示す．そのため，細胞活性が高ければ，プロトンの生成が盛んであるため，細胞培養液の色が紫色となる．MTT 試験は，溶液の色で活性を判断することができるため，簡便である．しかし，ホルマザンが析出することで細胞を損傷させてしまうため，経時的に細胞の活性を観察することができない．また，単一細胞レベルでの細胞活性の評価が難しく，多数の細胞のおおまかな活性しか評価することができない．よって，細胞の損傷や活性を計測するためには，感度が十分でないと考えられる．他にも，電子伝達系で発生したプロトンと反応して，蛍光を発するプロトン感受性蛍光色素を用いることで，蛍光強度からミトコンドリアの活性を評価する方法がある．本手法は，細胞毒性が低いため，蛍光色素を添加した後も観察が可能である．し

かし、蛍光観察による活性の評価には、次章にて述べる問題点があるため、使用が制限される。

### 1-2-2 蛍光観察による細胞の損傷の評価方法とその問題点

蛍光色素を用いた蛍光観察は、細胞内小器官を選択的に染色することができるため、細胞の機能を解析するために有用である。細胞活性の評価には、ミトコンドリアで発生するプロトンを検出する蛍光色素が用いられ、細胞損傷や細胞死を評価する蛍光色素として、Annexin V/PI 染色がよく用いられている [Daleke, D. L. 2003, Baski, D 2006]。Annexin Vは、細胞膜に存在するフォスファチジルセリンに特異的に結合する。フォスファチジルセリンは、細胞が損傷を受けると細胞膜の外側に露出する。蛍光色素が結合した Annexin Vを細胞に添加することで、損傷を受けた細胞を蛍光観察によって選別することができる。PI (Propidium Iodide)や Ethidium homodimer-1 (EthD-1)は、細胞膜の損傷を検知する蛍光色素である。細胞膜が正常であれば、PIは細胞膜に透過しないが、細胞膜が損傷すると細胞内に透過する。また、PIは核内のDNAと結合することで輝度が上昇するため、損傷後の輝度の変化から細胞の損傷を評価することが可能である。

Annexin V/PI 染色の問題点としては、非特異的な吸着や取り込みがあることである。フォスファチジルセリンは、正常な細胞では主に細胞の内側に多く分布している。しかし、細胞表面に露出することがあるため、細胞に損傷がなくても Annexin Vによって染色される可能性がある。また、フォスファチジルセリンはアポトーシス時に、リン脂質転位酵素によって能動的に細胞表面に露出するという報告がある

[Daleke, D. L. 2003]. そのため、細胞損傷度によって、急に細胞表面に露出することが起こる可能性がある。PI に関しても、細胞へ添加後に、時間とともに細胞内に取り込まれる色素量が増えている可能性がある。そのため、細胞損傷を厳密に計測することは難しい。

また蛍光観察における問題点として、経時的に細胞の活性を評価することが挙げられる。Annexin V や PI は、繰り返し蛍光観察を行うと蛍光褪色するため、細胞の損傷や活性を長期間評価することはできない。このような問題は、カルシウムインジケーターやプロトン感受性蛍光色素など、Annexin V/PI 染色以外の細胞の活性測定方法に共通した問題である。

### 1-2-3 位相差顕微鏡を用いた細胞の損傷の計測方法と問題点

位相差顕微鏡観察は、非侵襲的に形状や運動性を観察することができる。そのため、細胞の損傷の指標を抽出することができれば、経時的に細胞の損傷を評価することが可能である。

位相差顕微鏡による細胞観察から、我々は日常的に細胞の活性を大まかに評価している。我々が細胞の接着の様子から細胞の損傷を評価するときは、細胞の大きさや形状から感覚的かつ経験的に損傷や活性を判断している。より厳密に形状や運動性から細胞の活性を判断するためには、画像から特徴量を抽出し、細胞活性と結びつけなければならない。

では、細胞が損傷を受けたときは、位相差顕微鏡画像からどのような特徴量が抽出されるのであろうか。例えば、アポトーシスを起こした接着細胞は、徐々に細

胞体が収縮し、ブレブと呼ばれる構造が観察され、核や細胞質の断片化がおこる [Saraste, A. 2000, Coleman. M.L. 2001]. この場合、細胞体の収縮、ブレブ、細かい粒子状の構造の形成が、特徴量としての抽出され、各特徴量が観察されるまでの時間から細胞の損傷度を評価することができる。また、細胞運動が、損傷を与えた後に低下したとすれば、その低下の程度によって、細胞の損傷度を定量評価することができる。

位相差顕微鏡観察では、細胞の形状や運動だけではなく、細胞内のベシクルなどの運動も観察することができる。細胞内では、細胞の機能を維持するために、ベシクルに内包されたタンパク質やタンパク質を分解するリソソーム、ミトコンドリアなどの細胞内小器官などが運ばれている。これらの構造は、細胞の中心体から微小管沿いに細胞周囲へ運動するキネシンや、中心体方向に運動するダイニンによって輸送されている。そのため、損傷前後におけるこれらの細胞内運動の変化から、細胞の損傷を評価することも可能であると考えられる。

位相差顕微鏡観察による形状や運動による細胞の損傷計測の問題点はいくつか考えられる。細胞の形状に関しては、損傷度と形状が一致していない細胞が存在することが問題である。細胞の損傷度は低くても、周囲の細胞との相互作用の影響や、分裂のために細胞体が小さくなっている細胞を、損傷度が高いと判断してしまう可能性がある。また、細胞が伸展を収縮させない程度の損傷度は、検出することができない。細胞運動に関しては、細胞間相互作用有無が、細胞の運動速度や方向に影響を与える可能性がある。また、たまたま直線的に運動しない細胞が、損傷度が高い細胞と判断されることも考えられる。

位相差顕微鏡による細胞の損傷度の計測には、上記のような問題点が含まれ

てしまう。そのため、厳密に細胞の損傷度を評価するためには、細胞損傷の指標を得るための特徴量の数を増やすなどの工夫を行う必要がある。また、上記の問題点を改善することができれば、非侵襲的かつ経時的に細胞の観察を行うことができるため、細胞の損傷度の定量評価に有用であると考えられる。

### 1-3 本研究の目的

これまでの章では、細胞の損傷度を計測することの意義を述べ、種々の細胞損傷の計測方法とその問題点について論じた。位相差顕微鏡による細胞観察は汎用性が高く、無染色で長期観察が可能であることから、細胞の活性の計測に有用である。しかし、細胞の形状や運動性による細胞の損傷の評価は、細胞に損傷を与えた後も形状が同じである可能性や、損傷を与えなくても運動性が低下する細胞があると予想されるため、厳密な細胞活性計測を行うことができないといった問題があった。

それでは、位相差顕微鏡による細胞観察によって、何を計測すれば細胞の損傷度を計測することが可能であろうか。1-2-3 項で述べたように、位相差顕微鏡を用いて細胞の動態を撮影すると、細胞内のベシクルやミトコンドリアといった細胞内小器官の運動を観察することができる。細胞内小器官の運動は、蛍光色素を用いずとも位相差顕微鏡観察によって明瞭に観察することができる。そのため、経時的に長期間の観察が可能である。ベシクルは、細胞の機能を維持するためのタンパク質などが内包されており、細胞内の必要な場所に輸送されている。そのため、細胞が損傷を受けたときにも、修復、もしくは細胞死に関連した因子はベシクルに内包されて輸送されていると考えられる。そのため、損傷によって細胞形状の変化が観察されなくても、

細胞内部の運動に変化があると考えられる。つまり，細胞損傷を細胞内小器官の運動性の変化から評価することができる。これらを踏まえて，本研究では，位相差顕微鏡によって観察した細胞内小器官の運動性を定量的に解析する手法を開発し，運動性の変化から細胞の損傷度を評価した。そして，損傷によって細胞内小器官の運動が変化するメカニズムを探求した。



## 第 2 章 実験方法

### 2-1 実験に使用した細胞株と細胞培養方法

本実験では、脳腫瘍細胞株であるU87MG細胞と脳腫瘍幹細胞株であるBT142細胞、そして、乳がん細胞株であり運動性が高いMDA-MB-231細胞と運動性が低いKPL-4細胞を用いて実験を行った。接着細胞であるU87MG細胞とKPL-4細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Sigma)に10%ウシ胎児血清 (FBS) (GIBCO), 1%L-グルタミン (ナカライテスク), 100 U/mL ペニシリン・ストレプトマイシン (和光純薬工業)を添加した細胞培養培地を用いて、37 °Cかつ5% CO<sub>2</sub>環境下で培養した。継代時は、トリプシン (TrypLE express enzyme (1 ×), ThermoFisher Science) を用いて細胞培養皿から細胞を剥離し、培養用と実験用の細胞培養基板に播種した。接着細胞であるMDA-MB-231細胞は、ライボビッツL-15培地 (ThermoFisher Science)に10%FBS, 1%L-グルタミン, 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した細胞培養培地を用いて、37 °Cかつ0% CO<sub>2</sub>環境下で培養した。細胞培養皿からの剥離方法は、U87MG細胞と同じである。接着細胞は、通常培養時はポリスチレン培養皿 (培養面積が21 cm<sup>2</sup>)に1.0 × 10<sup>5</sup> cellsの細胞数を播種した。3日程培養することで、8割程度培養皿表面を埋めるまで増殖するため、その段階で再び継代を行った。浮遊細胞であるBT142細胞は、神経幹細胞・前駆細胞培養基本培地 (NeuroCult<sup>TM</sup>NS-A basal medium, VERITAS), に10% V/Vの培養用基本因子(NeuroCult<sup>TM</sup>NS-A proliferation medium, VERITAS), 100 ng/mLの

血小板由来成長因子 (PDGF), 20 ng/mLの上皮成長因子 (EGF), 20 ng/mLの繊維芽細胞増殖因子 (FGF), 2 µg/mLヘパラン硫酸ナトリウム (PeproTech Inc.), 100 U/mLのペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培地で, 37°Cかつ5%CO<sub>2</sub>下で培養した.

BT142細胞は浮遊細胞であるため, 電子線照射が行われていない細胞非接着性ポリスチレンフラスコ (培養面積が75 cm<sup>2</sup>) (ThermoFisher Science)を用いて, スフェロイド培養を行った. 細胞培養フラスコに $1.0 \times 10^5$  cellsを播種し, 2週間程培養することでスフェロイドの直径が約400 µmまで成長するため, その段階で継代を行った. 継代時に, スフェロイド中央部分の死細胞を取り除くために, ピペッティングによってBT142細胞のスフェロイドを分離した. BT142細胞の形成するスフェロイドは細胞間接着が緩いため, トリプシンを用いることなく40回程度のピペッティング作業を2回繰り返すことで, 単一細胞まで分離することができる. 単一細胞まで分離した後に, 継代を行った.

実験用の細胞培養皿は, 底面がガラス (カバー厚0.16-0.19 mm)のガラスボトムディッシュ (Matsunami Glass Ind., Ltd.)を使用した. ガラスボトムディッシュは, 直径3.5 cmのポリスチレンディッシュの中央に1 cmのホールが空いており, ディッシュの裏側からカバーガラスが接着されている. そのため, 細胞は直径1 cmのホール領域のみで200 µLの培地量で培養した. 本実験では, カバーガラスが事前にポリ-L-リシンでコーティングされたガラスボトムディッシュを用いた. ポリ-L-リシンは, 正電荷を帯びているポリマーであり, 細胞培養皿にコーティングを行うことで, 細胞接着タンパク質等の基板への接着を促進する. また, 浮遊細胞であるBT142細胞は, ポリ-L-リシンコートを行っていないガラス表面にはほとんど接着を行わなかった. そのた

め、溶液交換時の作業で細胞を吸引してしまう問題があった。ポリ-L-リシンをコートしたガラスボトムディッシュでは、BT142細胞は、伸展は行わないが静電的相互作用で基板の上に固定されており、溶液交換等による吸引を防ぐことができた。実験時は、接着細胞においてはガラスボトムディッシュ上に、より接着を促進するために、コラーゲン溶液を用いてコーティングを施した。コーティングには2%のコラーゲン溶液を使用し、ガラスボトム上に添加後、37°Cで5分インキュベートした。その後、コラーゲン溶液を吸引して37°Cで30分インキュベートを行い、 $1.0 \times 10^4$  cells播種した。そして、U87MG細胞とKPL-4細胞は37°Cかつ5%CO<sub>2</sub>環境下、MDA-MB-231細胞は37°Cかつ0%CO<sub>2</sub>環境下で1日培養してから実験を行った。BT142細胞は、コラーゲン無処理のガラスボトムディッシュに $1.0 \times 10^4$  cells播種し、37°Cかつ5%CO<sub>2</sub>環境下で1日培養してから実験を行った。

## 2-2 近赤外蛍光色素 IR700 と膜タンパク質抗体の複合体の作製

本研究では、細胞に損傷を与えるために、近赤外蛍光色素 IR700 を使用した (Fig.2.1a)。IR700 (分子式  $C_{74}H_{96}N_{12}Na_4O_{27}S_6Si_3$ ) は、近赤外光によって活性化することで、活性酸素や熱を発生し、がん細胞を死滅させる蛍光色素である (Fig2.1b)

[Mitsunaga, M 2011, Nakajima, T 2012, Kishimoto, S 2015, Sato, K 2016]。IR700 は、同じ原理でがん細胞を死滅させる光線力学療法 (PDT) で使用される蛍光色素よりも、より長波長で活性化し、高いモル吸光係数を示す。そのため、正常細胞への光毒性を大きく減らすことができ、かつ近赤外光は生体組織への透過性が高いため、より深部まで

治療を行うことができる。さらに、IR700 自体がこれまでの PDT 試薬より親水性を示しており、かつ NHS 基を介してがん細胞で高発現している膜タンパク質などの抗体に結合することができる。そのため、がん細胞以外の正常細胞には取り込まれにくく、より正常細胞への毒性を低下させることができる。このような、がん細胞への高い標的性、低い副作用、高い殺傷効果から、アメリカ食品医薬品局 (FDA)から認可を受けており、臨床試験が進められている。

その一方で、IR700 の光活性化による細胞損傷のメカニズムは未だ不明点が多い。小林らは、IR700 は光活性化によって発熱して細胞に損傷を与えていると報告している (Fig2.1b)。しかし、実験的に熱が細胞に損傷を与えていることを示す報告は未だなされていない。IR700 のように光活性化によってがん細胞を死滅させる治療方法は、今後より医療の現場で多く使用されると考えられる。そのため、IR700 の不鮮明な細胞損傷メカニズムを明らかにすることは重要である。そこで、IR700 の光活性化による損傷のメカニズムの解明も視野に、IR700 を細胞に損傷を誘導する試薬として使用した。

IR700 を細胞損傷の誘導のために使用することは、本実験目的にも合致している。IR700 は、細胞膜タンパク質に結合させて細胞内へ導入するため、添加量によって細胞への導入量を制御し、細胞への損傷を制御することができる。さらに、赤レーザーの照射時間を制御することで、IR700 の光活性化時間を制御し、損傷を制御することが可能である。本研究目的は、細胞の損傷度を計測することであるため、細胞へ与える損傷を制御可能な IR700 を使用することは、非常に有用である。

本研究では、抗 CD133 抗体、及び抗 EGFR 抗体と IR700 の複合体 (IR700-CD133 と IR700-EGFR) を作製した (Fig.2.1a)。IR700-CD133 複合体は、IR700 (添加重量 11.3  $\mu\text{g}$

を DMSO に溶かし, 終物質質量 5.8 nmol, 終モル濃度 2.5 mol/L とした)と羊由来 rabbit IgG (添加重量 121.8  $\mu$ g を DMSO に溶かし, 終物質質量 0.8 nmol, 終モル濃度 13.3  $\mu$ mol/L とした)を室温で 2 時間混合し, さらに, ウサギ由来抗 CD133 抗体と 2 時間室温で混合することで作製した. また, IR700-EGFR 複合体は, IR700 (添加重量 11.3  $\mu$ g を DMSO に溶かし, 終物質質量 5.8 nmol, 終モル濃度 2.5 mol/L とした)と, マウス由来抗 EGFR 抗体 (添加重量 121.8  $\mu$ g, 終物質質量 0.8 nmol, 終モル濃度 13.3  $\mu$ mol/L in PBS)を 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH: 8.0)中で室温で 2 時間混合することによって作製した. 作製した IR700 複合体は, ガラスボトムディッシュの細胞培養液に添加し, インキュベーター内で 37°Cで静置することで, 細胞内に導入した. 実験時には, 溶液中の IR700 複合体取り除くため, 細胞培養培地で 2 回洗浄した.

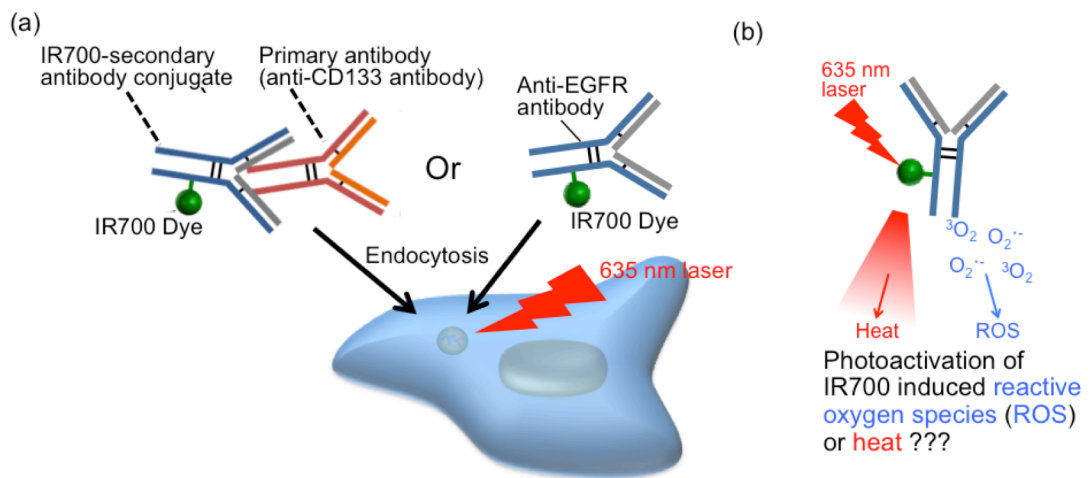


Fig.2.1 赤色蛍光色素 IR700 による細胞への損傷誘導の概念図. a は, IR700 を細胞内に導入し, 損傷を与える方法を示している. IR700 は, CD133 抗体や EGFR 抗体に結合させて, 細胞膜タンパク質を介したエンドサイトーシスで細胞内部に導入した. そして, 635 nm の赤色レーザー照射による IR700 の光活性化によって, 細胞に損傷を与えた. b は, IR700 の光活性化が細胞に損傷を与えるメカニズムを示している. IR700 の光活性化は, 主に活性酸素を発生して細胞に損傷を与えると考えられるが, 熱による損傷の可能性も報告されている.

## 2-3 実験に使用した光学系概要

本研究では、Fig.2.2 の光学系を用いて細胞の観察を行った。

本顕微鏡は、ハロゲン照明を搭載した位相差顕微鏡 (IX-70, オリンパス) である。細胞の長期観察を行うために、温度と CO<sub>2</sub> 濃度を制御するステージトップインキュベーター (東海ヒット) をステージに設置した。実験時には、ガラスボトムディッシュをインキュベーター内に静置して、温度が安定するまで 30 分待った。顕微鏡には、60 倍の位相差対物レンズ (オリンパス, PLAPON 60XOPH), スピニングディスク共焦点ユニット (CSU-10, 横河電機), 3 台の EMCCD カメラ (Andor) が設置されている。蛍光観察用光源として、青レーザー (488 nm, Showa Optronics), 緑レーザー (532 nm, Showa Optronics), 赤レーザー (635 nm, EDMUND OPTICS) を用いた。Fig.2.2 の光学系は、マグネットによって着脱が可能なミラー①によって、落射蛍光顕微鏡光路 (光路①) と共焦点顕微鏡光路 (光路②) に分けた。着脱式ミラー①をはずすことで、3 色のレーザー光を光路①に誘導することができる。光路①において、レーザー光を顕微鏡筐体内部のダイクロイックミラー②で反射して、対物レンズを通して細胞に照射した。細胞の蛍光は、ダイクロイックミラー②を通過後、顕微鏡筐体底部の光路切り替えミラーによって、EMCCD カメラ①へ入射させた。蛍光フィルターを EMCCD カメラ①の直前に設置しており、蛍光波長に合わせて取り替えた。着脱式ミラー①を設置することで、レーザー光をスピニングディスク共焦点ユニットに入射させることが可能である。レーザー光はマイクロレンズアレイを通過することで、集光したマルチビームが形成される。そして、ダイクロイックミラー④を通過後、マルチビームはピンホールアレイを通り、光路切り替えミラーによって対物レンズから細胞へ照射させた。共焦

点頭微鏡観察では、ダイクロイックミラー②は取り外した。細胞からの蛍光は、光路切り替えミラーで反射して共焦点ユニットに再入射させ、ピンホールアレイに通してダイクロイックミラー④で反射させた。ピンホールアレイを通過することで、焦点面以外の蛍光を除去することができるため、画像の S/N 比を向上させることが可能である。反射した蛍光は、蛍光 2 波長を同時に観察する場合は、着脱式ダイクロイックミラー③を取り付けることで蛍光波長を分けて、EMCCD カメラ②と③で観察した。蛍光 1 波長のみを観察する場合は、着脱式ダイクロイックミラー③を取り外すことで、EMCCD カメラ③で観察した。蛍光フィルターを EMCCD カメラ②と③の直前に設置することで、蛍光波長に合わせて取り替えた。



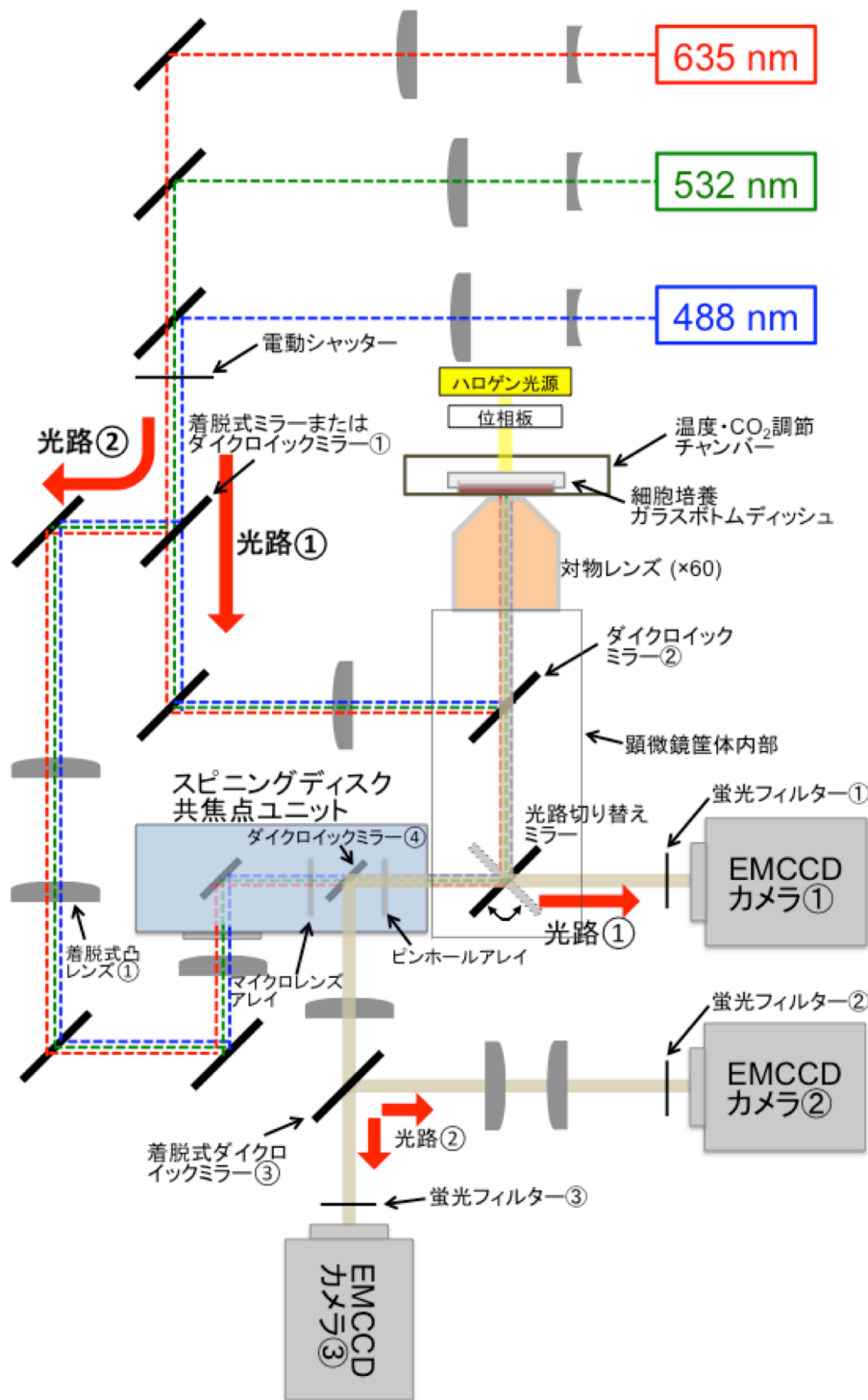


Fig 2.2 本研究で使用した光学顕微鏡の概要. 着脱式ミラー①を切り替えることで, 落射蛍光顕微鏡の光路 (光路①)と, 共焦点顕微鏡の光路 (光路②)に切り替えることが可能である. 落射蛍光顕微鏡観察時は, EMCCD カメラ①を使用し, 共焦点顕微鏡観察時は EMCCD カメラ②, ③を使用した.

## 2-4 位相差顕微鏡撮影動画の光ゆらぎ解析による細胞内運動の定量評価

細胞の損傷度を定量的に評価するために、ベシクルやミトコンドリアといった細胞内小器官の運動を定量的に解析する方法を開発した。細胞の観察は、ハロゲン照明を搭載した位相差顕微鏡 (IX-70、オリンパス光学) (Fig.2.2)を用いた。顕微鏡観察時の環境を通常の細胞培養環境と同様にするため、ステージトップインキュベーターの温度を 37°C となるように設定し、温度が安定するまで 30 分待った。また、U87MG 細胞、BT142 細胞、KPL-4 細胞観察時は、CO<sub>2</sub> 濃度が 5% となるように制御した。MDA-MB-231 細胞は、CO<sub>2</sub> 濃度は 0% で観察を行った。実験時には、温度と CO<sub>2</sub> 濃度が安定するまで、ガラスボトムディッシュをインキュベーター内に静置した。その後、ハロゲン光を用いて細胞の位相差顕微鏡動画を撮影した。上部からハロゲン光を照射し、対物レンズを通った光を顕微鏡筐体下部の光路切り替えミラーで反射させることで、EMCCD カメラ①へ入射させた。本研究では、赤色蛍光色素である IR700 を細胞に添加して実験を行った。IR700 の蛍光最大波長は 680 nm 付近である。そこで、ハロゲン光による IR700 の光活性化を防ぐため、510-550 nm の蛍光フィルターに通して、IR700 が光活性化するのを抑制した。510-550 nm の蛍光フィルターを通したため、EMCCD カメラ①の直前の蛍光フィルター①は取り外した。

本光学系で撮影した U87MG 細胞の位相差顕微鏡画像を、Fig.2.3a 左図に示す。位相差顕微鏡画像から、細胞の核や、ベシクル、そしてラメリポディア等の構造や運動が観察された。特に細胞核周辺はベシクル等細胞内小器官が密集しており、各小器官を個別にトラッキングすることで運動性を評価することは困難であった。そこで、位相差顕微鏡動画の各ピクセル上の強度ゆらぎを解析することで、細胞内小器官

の運動を評価した。Fig.2.3b 上図に、位相差顕微鏡動画の2つのピクセルにおける光強度変化の例を示す。光強度変化を定量的に扱うために、光強度の標準偏差/平均強度 ( $\langle \Delta I \rangle / \langle I \rangle$ ) を30フレーム間隔で算出した。例えば、撮影速度10フレーム/秒で撮影した位相差顕微鏡動画の全600フレームを、30フレーム毎に  $\langle \Delta I \rangle / \langle I \rangle$  を計算したとすると、Fig.2.3b 下図のように20個の点がプロットされる。以降、 $\langle \Delta I \rangle / \langle I \rangle$  値を光ゆらぎ値と呼ぶ。Fig.2.3b 下図の破線はそれぞれのピクセル上の光ゆらぎ値の平均値を示している。この平均値を位相差顕微鏡画像全てのピクセル上で計算し、平均値の大きさをヒートマップ表示することによって、光ゆらぎ値の可視化を行った (Fig.2.3a 右図)。ヒートマップ画像で、赤色で疑似カラー表示を行っている部位は光ゆらぎ値が高い部位であり、黄、緑、青色になるにつれて値が低いことを表している。位相差顕微鏡画像上でベシクル等の細胞小器官が密集している部分は、ヒートマップ上では水色から黄色を示していた。また、核周囲の細胞小器官密集部位の外側は、細胞小器官は観察されず、ヒートマップ上でも青色で表示された。これは、ベシクル等の構造が多く、かつ活発に運動している領域を、光ゆらぎ値のヒートマップ表示によって視覚化することが可能であることを示している。このように、個々のベシクルの運動を追跡することが困難だが、本手法によってベシクルの運動を統計的に解析することができた。

光ゆらぎ解析は、ベシクルや細胞の輪郭で観察される位相差顕微鏡観察に特有なハローと呼ばれる光のくまどりの影響が含まれている。細胞内運動以外の影響を低減させるために、撮影した動画に対して、ImageJのプラグインの一つであるバンドパスフィルター処理を行った。バンドパスフィルターは、任意の空間周波数帯域成分を画像から除去することができるため、ベシクル等の細胞内小器官の構造を鮮明化し、

これらの運動成分をより抽出することができる。そこで、バンドパスフィルター処理を位相差顕微鏡動画に施して、390-1,300 nm の構造に等しい空間周波数成分以外の除去を行った (Fig2.3a 中央図)。バンドパスフィルター処理の効果を検証するために、バンドパスフィルター処理を行う前後の位相差顕微鏡動画において、光ゆらぎ値解析を行い、その値をヒートマップとして Fig.2.4a,b に示した。バンドパスフィルター処理を行うことで、細胞内運動を良く検知することができた。バンドパスフィルター処理の影響をより定量的に論じるために、核周辺のベシクル部位と細胞体の外側の光ゆらぎ値をそれぞれ算出した。Fig.2.4g は、ベシクル部位 (cell)や、細胞体の外側 (background)の 3 カ所の光ゆらぎ値の平均値±標準誤差を示している。1 カ所につき、Fig2.4.a の白枠内 (50 × 50 ピクセル)の光ゆらぎ値を算出した。バンドパスフィルター処理を行ったときの、ベシクルの部位と細胞外の光ゆらぎ値は、それぞれ  $0.057 \pm 0.01$  と  $0.0098 \pm 0.0008$  (平均値±標準誤差) であった。また、バンドパスフィルター処理を行わない場合は、それぞれ  $0.015 \pm 0.003$  と  $0.0035 \pm 0.00037$  であった。バンドパスフィルター処理前後での、細胞体の光ゆらぎ値に対する細胞外の光ゆらぎ値の比 (S/N 比) は、それぞれ  $5.81 \pm 1.17$  と  $4.31 \pm 1.22$  (平均値±標準誤差) であった。このように、バンドパスフィルター処理を行うことによって、より細胞内運動を感度良く検知することができた。

光ゆらぎ値は、位相差顕微鏡動画を元に算出する。よって、カメラの撮影速度や、光ゆらぎ値を計算するフレーム間隔に影響を受けるため、それらの影響を評価した。Fig.2.4a,c,d に、10, 20, 33 フレーム/秒で撮影した位相差顕微鏡動画の光ゆらぎ値のヒートマップを示す。撮影速度が大きくなるにつれて、ベシクルの運動に由来する光ゆらぎ値の値が小さくなり、細胞体以外の部位の光ゆらぎ値が上昇した。そ

ここで、Fig.2.4g と同様の方法で光ゆらぎ値の平均値±標準誤差を算出し、Fig.2.4h に示した。10 フレーム/秒のときは、光ゆらぎ値は  $0.057 \pm 0.010$  であり、細胞外の光ゆらぎ値  $0.009 \pm 0.0008$  より大きな値を示した。しかし、33 フレーム/秒では、ベシクル部位の光ゆらぎ値は  $0.034 \pm 0.008$ 、細胞外は  $0.016 \pm 0.0001$  となった。10、20、33 フレーム/秒のときの S/N 比は、それぞれ  $5.81 \pm 1.17$ 、 $3.28 \pm 1.17$ 、 $2.11 \pm 0.53$  であった。本実験系では、撮影速度が 20 フレーム/秒以上だとハロゲン光源の出力が足りず、10 フレーム/秒と同等の光強度にすることができなかった。そのため、撮影速度の増加によって光強度が低下して、S/N 比が低下したと考えられる。

Fig.2.4a,e,f に、光ゆらぎ値算出時のフレーム間隔が与える影響を示す。光ゆらぎ値算出時のフレーム間隔は、3、10、30 フレームとした。フレーム間隔が低下するにつれて、光ゆらぎ値が大きく低下することが明らかとなった。Fig.2.4g,h の結果と同様に、細胞体と細胞体外の光ゆらぎ値の平均値±標準誤差を Fig.2.4i に示した。細胞体の 30 フレーム間隔のときの光ゆらぎ値に対して、3 フレーム間隔のときに、光ゆらぎ値が 50%以上低下することがわかった。3、10、30 フレームのときのそれぞれの光ゆらぎ値の S/N 比は、 $5.81 \pm 1.17$ 、 $3.95 \pm 0.96$ 、 $1.57 \pm 0.27$  であった。光ゆらぎ値の算出するフレーム間隔が計測に与える影響をより厳密に評価するために、10 フレーム/秒で撮影した、接着細胞 U87MG 細胞と浮遊細胞 BT142 細胞の位相差顕微鏡動画のベシクル部位のパワースペクトル密度 (PSD)を算出した (Fig.2.4j)。0.1 フレーム/秒で 600 フレーム撮影しているため、スペクトル密度の周波数の最大値は、サンプリング速度の半分であることから最大周波数は 5 Hz であり、最小の周波数間隔は、撮影時間 60 秒の逆数である 0.0167 Hz であった。二つの細胞で、0.33 Hz 以下では PSD は急激に低下した (図中の破線が 0.33 Hz)。0.33 Hz 以下の遅い運動は、細胞自身の運

動であると考えられる。30 フレームで光ゆらぎ値を算出した場合、撮影速度が 10 フレーム/秒のため、計算周期は 0.33 Hz となる。そのため、フレーム間隔が 30 フレームの場合、細胞自身の運動は計測値から多くを取り除くことができている。また、10 フレーム間隔では計算周期が 1.0 Hz、フレーム間隔が 3 では 3.3 Hz である。そのため、10 フレームと 3 フレーム間隔のときも、細胞自身の運動を計測値から取り除くことができている。Fig.2.4f のヒートマップでは、特に光ゆらぎ値が高い核周辺の一部の領域の細胞内運動が検出された (Fig.2.4f 白矢印)。つまり、計算周期を高くすることで、細胞内運動の中でも特に速い成分を検出していると考えられる。

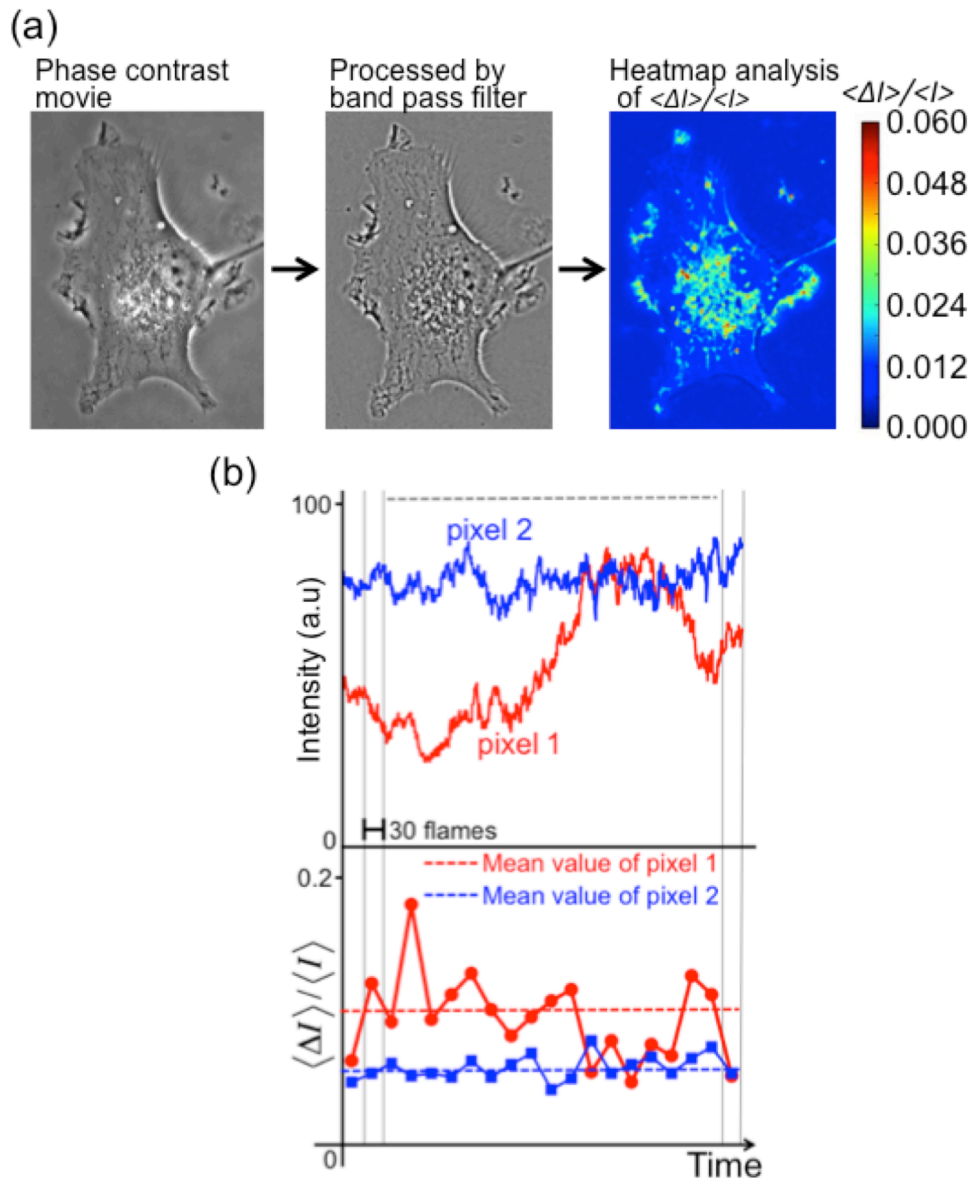


Fig.2.3 光ゆらぎ解析による細胞内運動の解析方法. a は, 光ゆらぎ解析を行う過程を示している. 左図は U87MG 細胞の位相差顕微鏡動画であり, バンドパスフィルター処理を行うことで, ベシクルなどの細胞小器官の光成分を抽出した (中央図). そして, 光ゆらぎ値 ( $\langle \Delta I \rangle / \langle I \rangle$ ) を算出して, 右図のようにヒートマップで表示した. b は, 光ゆらぎ値 ( $\langle \Delta I \rangle / \langle I \rangle$ ) の算出方法の例である. 上図は位相差顕微鏡動画上の 2 つのピクセルにおける光強度変化を表している. 光強度変化を 30 フレーム毎に分割し, それぞれ標準偏差/平均強度 ( $\langle \Delta I \rangle / \langle I \rangle$ ) を計算した (下図). 下図の破線はピクセル 1, 2 の光ゆらぎ値の平均値を表しており, この値を各ピクセル上の光ゆらぎ値とした.

Sakuma, M 2016 の図を改変して使用.

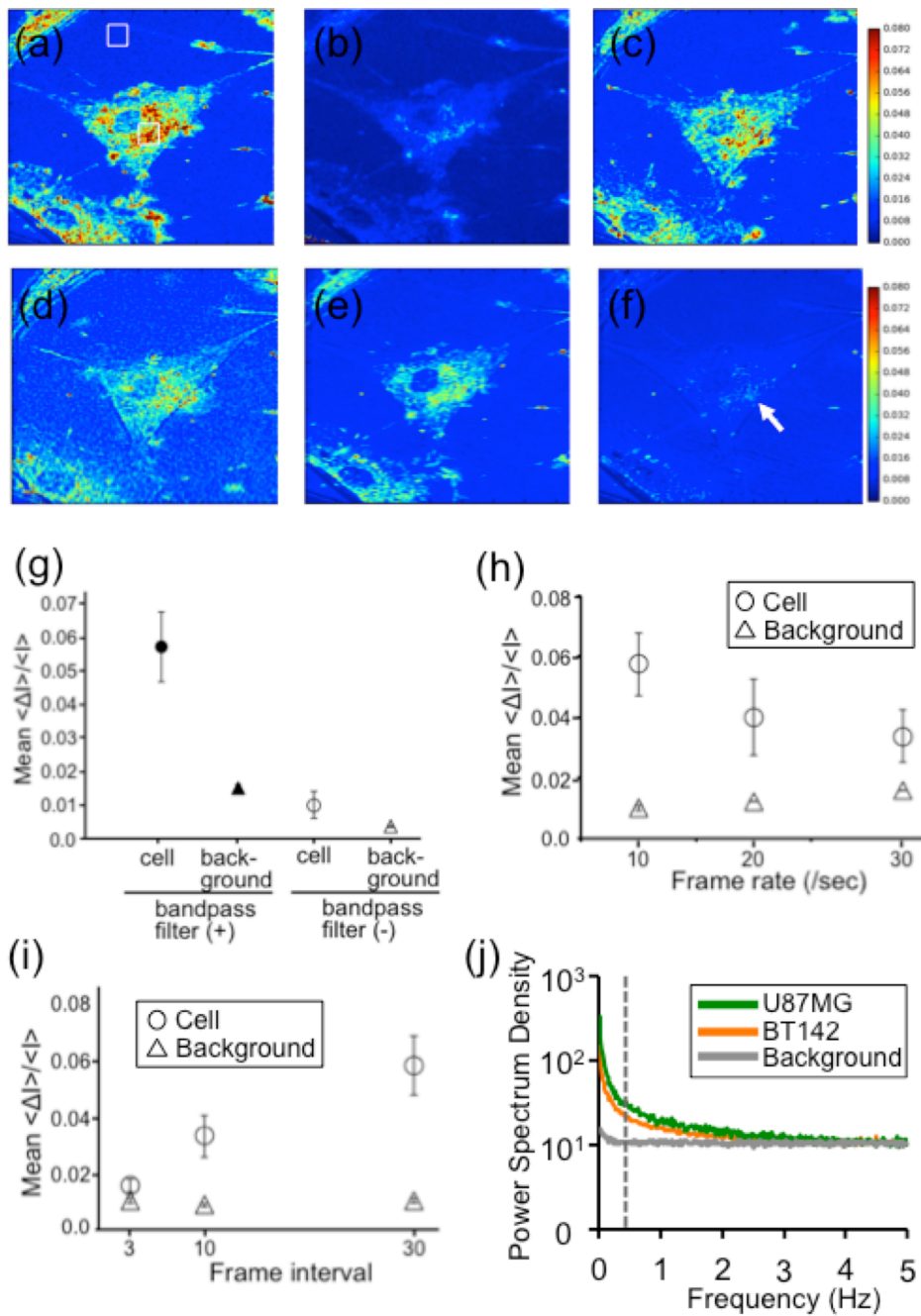


Fig.2.4 バンドパスフィルター処理，位相差顕微鏡動画撮影速度，光ゆらぎ値計算フレーム間隔が光ゆらぎ解析に与える影響の評価結果． a は撮影速度が 10 フレーム/sec で 600 枚撮影した細胞の光ゆらぎ値のヒートマップである． b は a と同じ細胞と同じ撮影条件で，バンドパスフィルター処理をおこなわなかったときの光ゆらぎ値のヒートマップである． c,d はそれぞれ撮影速度が 20, 30 フレーム/sec のときのヒートマップである． e,f は撮影速度が 10 フレーム/sec，光ゆらぎ値の計算間隔を 3, 10 フレームとしたときの光ゆらぎ



値のヒートマップである。g はバンドパスフィルター処理による光ゆらぎ値の変化を示している。a の白枠のように、核を除く細胞体 (Cell) と細胞体のない部分 (Background) の  $50 \times 50$  ピクセル内の光ゆらぎ値の平均値を示している。h, i は撮影速度と光ゆらぎ値の計算間隔に依存した光ゆらぎ値の変化を示している。j は接着細胞 U87MG と浮遊細胞 BT142 の光強度のパワースペクトル密度である。10 フレーム/sec で 600 フレーム撮影した動画の、細胞小器官が密集している領域における  $50 \times 50$  ピクセル内の光強度から PSD を算出した。Background は、細胞体の外側の領域における PSD を示している。j は、Sakuma, M 2016 の図を改変して使用。破線は 0.33 Hz を示している。

光ゆらぎ解析は、1粒子追跡による細胞運動の評価方法とは異なり、位相差顕微鏡動画の各ピクセルの光強度ゆらぎを統計的に解析する手法である。そのため、様々な細胞内小器官の運動由来の光強度ゆらぎを解析していると考えられる。そこで、どの程度の大きさの細胞内小器官の運動を主に解析しているのかを評価するために、粒径の異なるシリカビーズを用いて光強度を測定した。位相差顕微鏡は、光が物質に入射したときの位相のずれを明暗にかえることで細胞を観察している。そのため、シリカビーズと溶媒の屈折率差を、細胞内小器官と細胞質の差と同じにする必要がある。Gardiner や Gardner らの報告によると、細胞質の屈折率は 1.38、ベシクルの屈折率が 1.43 と、屈折率差がおよそ 0.05 程であった [Gardiner, C 2014, Gardner, S 2015]。そこで、45% wt のスクロース溶液中 (屈折率 1.41) でシリカビーズ (屈折率 1.46) を観察することで、細胞質中とベシクルの屈折率差と同じ条件下でシリカビーズの光強度を計測した。Fig.2.5a に、粒径が 0.1, 0.5, 1.0  $\mu\text{m}$  のシリカビーズをスクロース中で観察した画像を示す。粒径が小さくなるにつれて、シリカビーズの像が不鮮明となった。シリカビーズの光強度を定量的に評価するために、各粒径のシリカビーズの平均強度  $\pm$  標準誤差を Fig.2.5b に示した。シリカビーズの光強度は、シリカビーズ (強度 1) とシリカビーズを含まない隣接した領域 (強度 2) の、 $9 \times 9$  ピクセルの平均強度を計測して (Fig.2.5b のインセットを参照)、強度 2 から強度 1 を引くことで算出した。それぞれの粒径で 20 粒子の強度を測定し、その平均値と標準偏差を示している。1  $\mu\text{m}$  のシリカビーズと比較して 0.5  $\mu\text{m}$  は大きく強度が低下しており、0.1  $\mu\text{m}$  では強度は 10000 以下であった。本結果より、光ゆらぎ解析は主に粒径が 0.5  $\mu\text{m}$  以上の細胞内小器官の運動を反映していると考えられる。

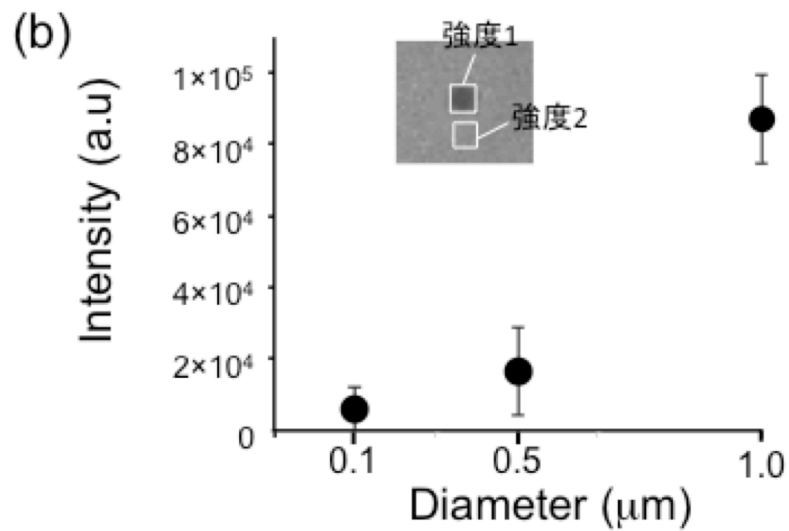
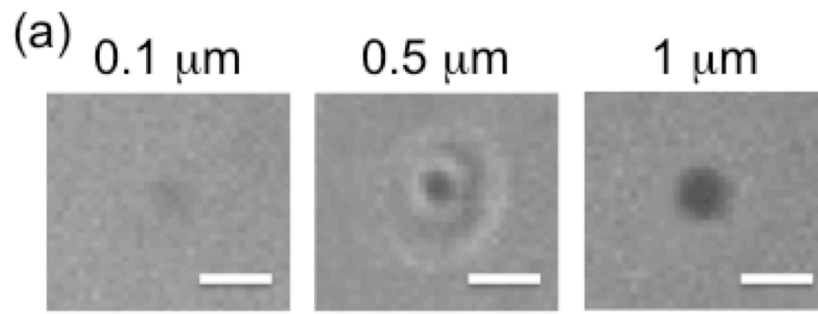


Fig.2.5 位相差顕微鏡で観察したスクロース溶液中のシリカビーズ. aは, 45% wt のスクロース溶液中で観察した, 0.1, 0.5, 1.0  $\mu\text{m}$  のシリカビーズの観察像である. スケールは 10 nm. bは, それぞれの粒径のシリカビーズ 20 個の平均強度を示している. 強度は, インセットの白枠内部の平均強度を算出して, 強度 2 から強度 1 を引いた値をシリカビーズの光強度とした.

## 2-5 IR700 の光活性化による細胞損傷の誘起

IR700-CD133 は、ガラスボトムディッシュ上で培養した細胞に、溶液中での最終濃度が 10 nM と 40 nM となるよう添加した (トータル液量 200  $\mu$ l). 添加後, 37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間静置し, 培地を用いて 2 回洗浄を行った. そして, ガラスボトムディッシュを顕微鏡の温度 CO<sub>2</sub> 調節チャンバー内で, 温度と CO<sub>2</sub> が安定するまで 30 分静置してから IR700 の蛍光観察を行った. IR700-EGFR 複合体を用いた実験では, ガラスボトムディッシュ上で培養した細胞に, 溶液中での最終濃度が 5 nM となるように添加した (トータル液量 200  $\mu$ l). 添加後, 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 1 日静置した. 培地を用いて 2 回洗浄を行った後, IR700-CD133 複合体と同様の条件で, 温度 CO<sub>2</sub> 調節チャンバー内で IR700 の蛍光観察を行った. IR700 の励起最大波長は 680 nm であり, 600-680 nm の波長で励起するため, 635 nm レーザー (18 mW) を用いて蛍光観察と細胞損傷を導入した. IR700 の蛍光観察及び細胞損傷時は, Fig.2.2 の落射蛍光顕微鏡光路 (光路①) を使用し, EMCCD カメラ①を用いて蛍光観察を行った. IR700 の蛍光最大波長は 687 nm であり, 蛍光フィルター①に 690-730 nm 透過蛍光フィルターを設置した. 赤レーザーの照射時間は, 各レーザー光合流後に設置した電動シャッターによって制御した. IR700 は, 赤レーザーを照射することで光活性化して細胞に損傷を与える. そのため, IR700 の蛍光観察と同時に細胞に損傷を誘導した. 本実験系では, IR700 の光活性化による損傷前後の, 細胞の位相差顕微鏡動画を撮影した. そのため, 損傷前の細胞観察時は蛍光フィルター①を取り外し, ハロゲン光を用いて観察を行った. その後, 690-730 nm 透過蛍光フィルターを取り付けて, IR700 の蛍光を観察及び損傷の導入を行った. そして損傷後は, 再び蛍光フィル

ター①を取り外して、ハロゲン光によって細胞観察を行った。

## 2-6 IR700 の光活性化によって損傷した細胞と細胞内小器官の蛍光観察による評価方法

本実験で使用した蛍光色素と、観察条件を本節に記述する。細胞の損傷度の評価のために、Ethidium homodimer-1 (EthD-1) (和光純薬工業)を使用した。EthD-1 は Propidium Iodide (PI)と同様に、生細胞の細胞膜は透過することができないが、損傷によって細胞膜の透過性が上昇した細胞の内部に透過する。また、DNA や RNA に結合することで、蛍光輝度が 40 倍上昇することから、細胞の損傷度を蛍光輝度から評価することができる。EthD-1 は励起最大波長が 528 nm, 蛍光最大波長が 617 nm である。そこで、488 nm レーザー光を用いて、Fig2.2 の落射蛍光顕微鏡光路 (光路①)で観察を行った。蛍光フィルター①に、570-610 nm 蛍光透過フィルターを設置した。IR700 の光活性化によって細胞に損傷を与える前に、ガラスボトムディッシュに最終濃度が 4.65  $\mu$ M となるように EthD-1 を添加した。添加後、635 nm レーザー光を用いて細胞に損傷を導入し、30 分間隔で EthD-1 の蛍光を観察した。溶液中の EthD-1 の蛍光輝度は低く、培地交換を行わなくても蛍光観察が可能であった。

細胞内に取り込まれた IR700 とリソソームの分布を評価するために、LysoTracker Yellow (ThermoFisher Science)を用いた蛍光観察を行った。LysoTracker は、酸性 (pH 5 程度)の細胞内小器官を選択的に染色する、細胞膜透過性の蛍光色素である。LysoTracker を、ガラスボトムディッシュに最終濃度が 50 nM となるように添加して、30 分 37°C でインキュベートした。また、LysoTracker 添加の 30 分前に

IR700-CD133 複合体 40 nM を添加した。その後、細胞培養液で 2 回洗浄し、共焦点顕微鏡光路 (光路②) で EMCCD カメラ②と③を用いて、LysoTracker と IR700 のそれぞれの蛍光観察を行った。細胞内のリソソームや IR700 を内包している細胞小器官は、輸送分子キネシンやダイニンによって輸送されているため、リソソームと IR700 の蛍光分布は時々刻々と変化していた。そこで、リソソームと IR700 の蛍光分布を、時系列を揃えて観察するために、EMCCD カメラ②と③を用いた同期撮影を行った。同期撮影は PowerLab (AD Instruments) を用いて制御し、LabChart を介してシグナルの出力・記録を行った。IR700 と LysoTracker の蛍光を着脱式ダイクロイックミラー③の位置で分離するために、690-1100 nm 反射ダイクロイックミラーを設置した。そのため、IR700 の蛍光は EMCCD カメラ②で撮影し、LysoTracker の蛍光は EMCCD カメラ③でそれぞれ撮影した。IR700 の蛍光観察のために、落射蛍光顕微鏡光路 (光路①) と同様に、蛍光フィルター②に 690-730 nm 蛍光透過フィルターを設置した。LysoTracker は励起最大波長が 465 nm、蛍光最大波長が 535 nm である。そこで、488 nm レーザー光を用いて励起して、573-607 nm 蛍光透過フィルターを蛍光フィルター③に設置した。また、IR700 との同時蛍光観察時に、635 nm レーザー光が EMCCD カメラ③に映り込んでいたため、蛍光フィルター③にさらに 610 nm 長波長カットフィルターを設置した。IR700 と LysoTracker の蛍光観察時は、ダイクロイックミラー②は取り外した。また、損傷前後のリソソームの分布を、共焦点顕微鏡を用いた経時観察で評価した。IR700 との同時観察は行わないため、着脱式ダイクロイックミラー③は取り外して、EMCCD カメラ③を用いて LysoTracker のみ蛍光観察を行った。また、蛍光フィルター③には 573-607 nm 蛍光透過フィルターのみを設置し、610 nm 長波長カットフィルターは取り外した。IR700 による損傷を誘導するため、635 nm レーザー光は落射蛍光

顕微鏡光路 (光路①)で細胞に照射した。撮影手順は、まず光路②にて LysoTracker の蛍光観察を行い、光路①に切り替えて 635 nm レーザー光を細胞に照射した。その後、再び光路を②に切り替えて、LysoTracker の蛍光観察を行った。

リソソームの損傷をリアルタイム観察によって評価するために、pH インジケータ (pHrodo Green AM, ThermoFisher Science)を使用した。pH インジケータは細胞透過性の蛍光色素であり、細胞内の pH が低い酸性の細胞内小器官を蛍光染色する。pH インジケータは、pH が低いほど高い蛍光強度を示す。そのため、リソソーム等の酸性細胞小器官は pH インジケータで染色されることで、高い輝度を示す。pH インジケータの蛍光退色は LysoTracker と比較して遅く、リアルタイム観察が可能であった。pH インジケータは、最終濃度が 2.5  $\mu\text{M}$  (トータル液量 200  $\mu\text{l}$ )となるようにガラスボトムディッシュで培養している細胞に添加して、30 分 37°C でインキュベートした。その後、細胞培養液で 2 回洗浄し、蛍光観察を行なった。pH インジケータは、最大励起波長が 509 nm、最大蛍光波長が 533 nm であるため、488 nm レーザー光を用いて励起した。pH インジケータの蛍光観察は、Fig.2.2 の共焦点顕微鏡光路 (光路②)を使用した。635 nm レーザー光で IR700 を光活性化させつつ、共焦点顕微鏡を用いて pH インジケータの蛍光を観察するため、着脱式ダイクロイックミラー①に 570 nm 長波長カットフィルターを設置した。よって、488 nm レーザー光は共焦点ユニットに照射し、635 nm レーザー光は光路①によって細胞へ照射した。pH インジケータは、着脱式ダイクロイックミラー③を取り外して、EMCCD カメラ③で観察した。蛍光フィルター③には、500-550 nm 蛍光透過フィルターを設置し、また 635 nm レーザー光の映り込みを除去するために、570 nm 長波長カットフィルターも取り付けた。635 nm レーザー光を細胞に照射するために、本観察ではダイクロイック

ミラー②を取り付けた状態で共焦点顕微鏡観察を行った。そのため、pH インジケータの蛍光輝度が低下した。そこで、着脱式凸レンズ① (f300)を取り付けることによってレーザー光を集光して、pH インジケータの蛍光輝度を増加させた。pH インジケータのリアルタイム観察時は、EMCCD カメラ②の撮影と同時に、488 nm レーザー光と 635 nm レーザー光を細胞に照射し、60 秒間撮影速度 10 フレーム/秒で pH インジケータの蛍光を観察した。635 nm レーザーは、撮影開始してから 30 秒間照射した。

細胞膜に結合する蛍光色素 PKH26 (最大励起波長 551 nm, 最大蛍光波長 567 nm, SIGMA-ALDRICH), ミトコンドリアを蛍光染色する CellROX (最大励起波長 545 nm, 最大蛍光波長 565 nm, ThermoFisher Science), 微小管の蛍光修飾に使用したローダミン (最大励起波長 550 nm, 最大蛍光波長 570 nm, ThermoFisher Science)は、全て落射蛍光顕微鏡光路 (光路①)で観察した。蛍光フィルター①には、573-607 nm 蛍光透過フィルターを設置した。PKH26 は、ガラスボトムディッシュへ細胞を播種する前の、細胞懸濁液 ( $1 \times 10^5$  cells)を用いて染色を行なった。培地中の細胞懸濁液を 10 倍量以上の PBS で 1 回洗浄し、遠心後上清を吸引した。PKH26 染色専用緩衝液を用いて 1 回細胞を洗浄し、再び遠心によって細胞を沈殿させて、上清を吸引した。その後、最終濃度が 20 nM (トータル液量 500  $\mu$ l)となるように遠心チューブ内に PKH26 を添加し、5 分室温でインキュベートした。そして、5 倍量以上の細胞培養培地によって PKH26 の不活化と洗浄を 1 回行い、遠心後上清を吸引し、細胞培養培地を添加して細胞を懸濁させた。ガラスボトムディッシュに  $1 \times 10^4$  cells を播種し、1 日 37°C でインキュベートしてから、PKH26 の蛍光観察を行なった。CellROX は、最終濃度が 2.5  $\mu$ M (トータル液量 200  $\mu$ l)となるようにガラスボトムディッシュで培養している



細胞に添加して、30分 37°Cでインキュベートした。その後、細胞培養液で2回洗浄し、蛍光観察に使用した。

## 2-7 細胞内の IR700 の光活性化による輸送分子キネシンへの損傷の評価方法

細胞内で光活性化した IR700 分子が、輸送分子キネシンに与える影響を評価するために、モティリティアッセイ系を構築した。モティリティアッセイ系とは、輸送分子の機能を *in vitro* で評価するための実験系である。モティリティアッセイ系の概要図を Fig.2.5 に示す。二枚の形状の異なるカバーガラス (18×18 と 24×32 mm, 厚さ 0.12-0.17 mm, 松浪硝子工業)を両面テープ (30 μm, 日東電工)で貼り合わせたチャンバー内へタンパク質を順番に流し込むことで、ガラス表面へタンパク質を固定した。全てのタンパク質溶液は、モティリティ緩衝液 (MB 溶液)で希釈し、使用した。MB 溶液の組成は、50 mM 1,4-ピペラジジンビス(エタンスルホン酸) (PIPES), 50 mM K-アセテート, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA)であった。また、MB 溶液に最終濃度が 10 μM となるように微小管脱重合剤タキソールを加えた溶液を、MB(+)溶液とし、タキソールが入っていないものを MB(-)溶液とした。キネシンは、大腸菌にマウス由来の 2 量体キネシンを発現させて、精製したものを使用した。キネシンは微小管結合部位である head と neck を持ち、ベシクルが結合する tail を除去した。このキネシンが、運動活性をもつことを確認した。また、キネシンの N 末から 490 アミノ酸の位置にビオチンとヒスタグを挿入した。微小管は、蛍光色素であるローダミンで標識されたものを使用し、モティリティアッセイで使用する前に 30 分 37°Cでチューブリンを重合することで作製した。微小管重合後は、脱重合を阻害す

るために溶液中での最終濃度が  $89 \mu\text{M}$  となるようにタキソールを添加した。ガラス表面へのタンパク質の固定は、まず、ビオチン-BSA ( $1 \text{ mg/mL}$ )を  $2 \mu\text{L}$  を添加し、2分後に  $10 \mu\text{L}$  の MB 溶液で洗浄した。同様の手順で、 $2.4 \text{ mM}$  の IR700 を  $2 \mu\text{L}$ 、 $2 \text{ mg/mL}$  のストレプト・アビジンを  $2 \mu\text{L}$ 、 $0.5 \text{ mg/mL}$  のカゼインを  $2 \mu\text{L}$ 、 $70 \mu\text{g/mL}$  のキネシンを  $2 \mu\text{L}$ 、ローダミン修飾微小管を  $2 \mu\text{L}$  を添加した。各溶液の添加後の反応時間は、IR700 添加時は 10 分で、他のタンパク質では 2 分とした。反応後は、微小管添加前は  $10 \mu\text{L}$  の MB(-)溶液でチャンバーを洗浄して、添加後は  $10 \mu\text{L}$  の MB(+)溶液で洗浄した。微小管添加して洗浄を行ってから、蛍光観察を行った。

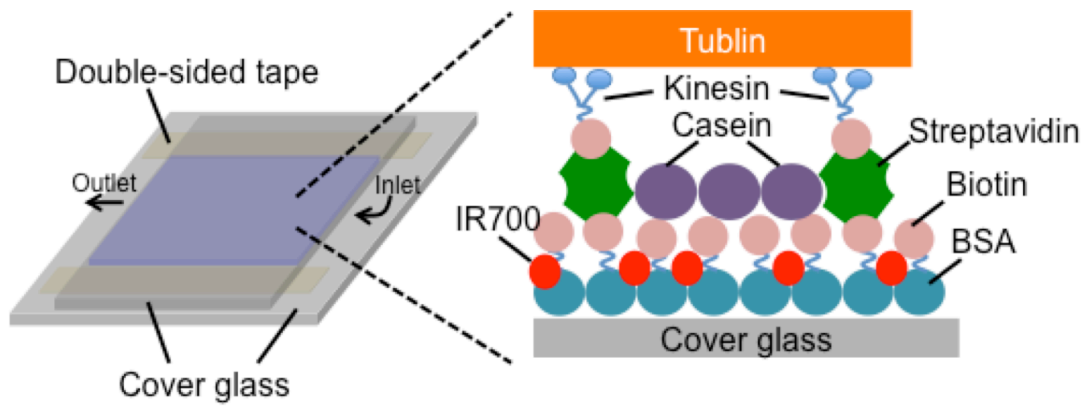


Fig.2.6 輸送分子キネシンへの損傷を評価するためのチャンバー

## 第 3 章 実験結果

### 3-1 IR700 抗体複合体の細胞への特異的取り込みの評価

IR700 分子は、*N*-Hydroxysuccinimide (NHS)基を有しているため、抗体に結合させることができる。そのため、抗体の種類を変えることで様々な細胞の膜タンパク質に特異的に結合させて、細胞内に取り込ませることが可能である。また、IR700-抗体複合体の添加量と赤レーザー照射時間によって、細胞に与える損傷度を制御することが可能である。本研究では、悪性度の高い脳腫瘍細胞株 (U87MG 細胞と BT142 細胞)と乳がん細胞株 (MDA-MB-231 細胞, KPL-4 細胞)に IR700 を導入した。そして、IR700 分子の添加量と赤レーザー照射時間を制御することで、与える損傷を制御した。脳腫瘍細胞には、主に膜タンパク質である CD133 に結合する抗 CD133 抗体、乳がん細胞には上皮成長因子受容体 (EGFR)に結合する抗 EGFR 抗体と IR700 分子の複合体を添加することで、それぞれの細胞に特異的に結合させて、細胞内へ取り込ませた。本節では、これらの複合体が、細胞への非特異的吸着によって取り込まれていないことを示す。さらに、IR700 複合体の添加量と赤レーザー照射時間によって細胞への損傷度を制御することができるのかを評価する。

#### 3-1-1 IR700 抗体複合体のがん細胞への取り込みと損傷誘起

本研究では、細胞に与える損傷度を定量評価するために、蛍光色素 IR700 を

細胞に導入し、赤レーザー照射によって活性化させることで細胞に損傷を与えた。

IR700 を細胞内に導入するために、IR700 と抗 CD133 抗体の複合体(IR700-CD133)を作製した。IR700-CD133 を二種類の脳腫瘍細胞 (接着細胞 U87MG, 浮遊細胞 BT142)に 40 nM 添加し、1 時間 37°C でインキュベートした。赤レーザー(635 nm)を用いて IR700 の蛍光観察を行なったところ、細胞内部に IR700 由来の蛍光を確認した (Fig.3.1b, e)。接着細胞である U87MG 細胞において、IR700 の蛍光は細胞核の周辺に多く分布していた。また、赤レーザーを 30 秒間細胞に照射することによって、U87MG 細胞のフィロポディアやラメリポディアが消失し、細胞全体が収縮する様子が観察された (Fig.3.1c)。BT142 細胞は浮遊細胞であるため、赤レーザー照射前にはフィロポディアやラメリポディアはほとんど観察されなかった (Fig.3.1d)。しかし、赤レーザー照射後に、細胞膜から丸い突出部分が連続的に形成された (Fig.3.1f 白矢印)。これは、ブレビングと呼ばれる細胞運動であり、損傷を受けた細胞で多く観察される細胞運動の一つである。赤レーザー照射によって、二種の細胞で観察された細胞運動は、損傷した細胞の特徴と一致していた。そのため、本実験で作製した IR700-CD133 は細胞に結合し、細胞内部に取り込まれ、赤レーザーを照射することによって細胞に損傷を与えることが可能であることがわかった。

U87MG 細胞において観察された IR700 の光活性化による細胞運動の変化が、他の細胞種でも観察されるか評価した。そこで、IR700 と抗 EGFR 抗体の複合体を作製し、接着細胞である U87MG 細胞と、乳がんの細胞株 (MDA-MB-231 と KPL-4)に添加した。IR700-CD133 抗体と同様に、U87MG 細胞、MDA-MB-231 細胞、KPL-4 細胞内部の核周辺に IR700 の輝点を確認した (Fig.3.1h,k,n)。さらに、赤レーザーを 10 秒照射することによって、細胞の収縮とラメリポディア・フィロポディアの消失が観察

された (Fig.3.1i,l,o). これらの結果から, IR700 による損傷によって, 接着細胞ではラメリポディア・フィロポディアの消失と細胞の収縮が共通して観察されることがわかった.

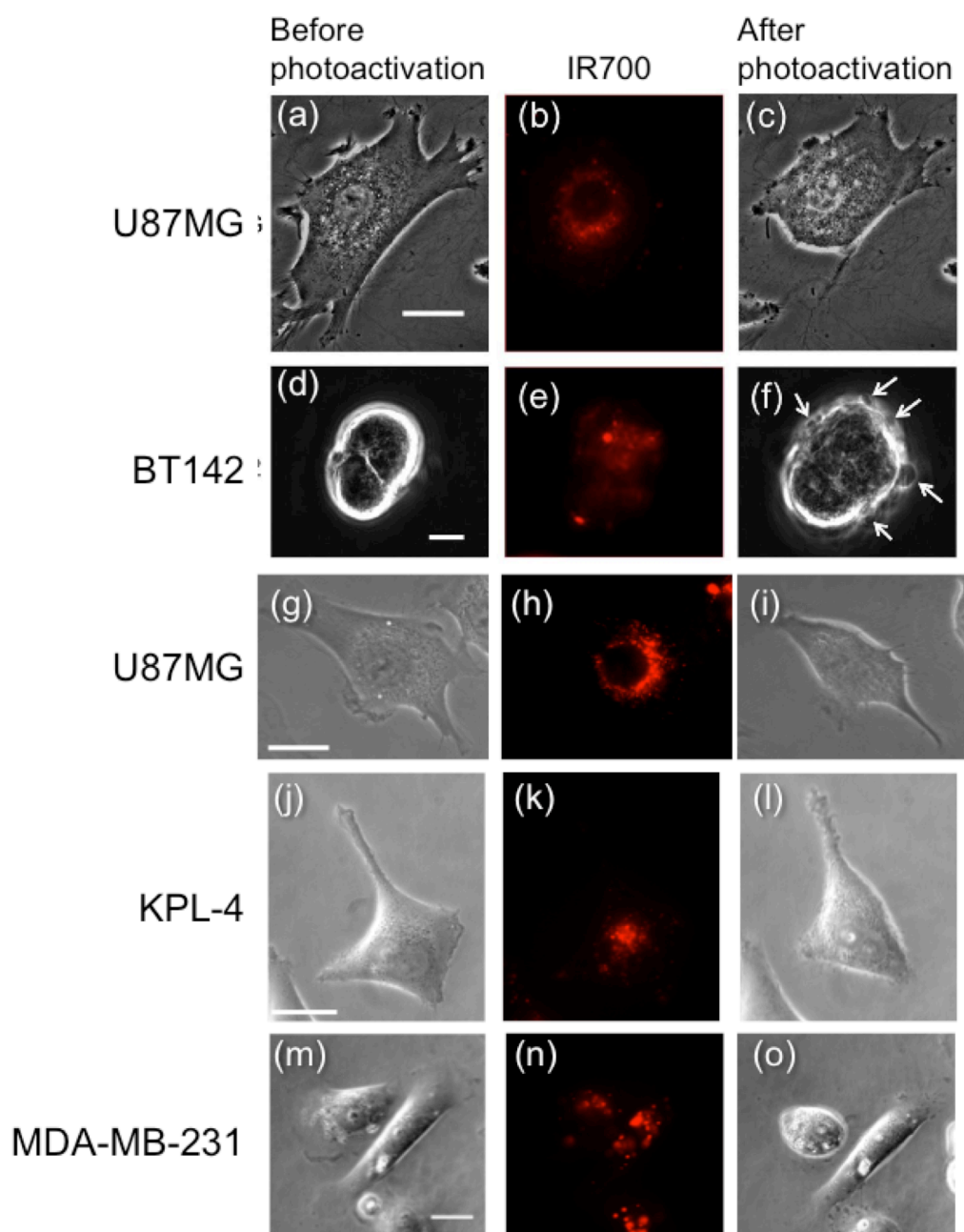


Fig.3.1 IR700 の光活性化による, U87MG 細胞, BT142 細胞, KPL-4 細胞, MDA-MB-231 細胞の形状変化. a-f は, IR700-CD133 を 40 nM 添加し, g-o は IR700-EGFR を 5 nM 添加した. 左列は, IR700 の光活性化前の位相差顕微鏡像であり, 右列は光活性化後の画像である. c, f は IR700 分子を光活性化させてから 2 分後の画像であり, i, l, o は 10 分後の画像である. 中央列は, IR700 の蛍光像である. スケールバーは, U87MG 細胞の a は 10  $\mu\text{m}$ , g は 20  $\mu\text{m}$ . BT142 細胞は 10  $\mu\text{m}$ , KPL-4 細胞と MDA-MB-231 細胞は 20  $\mu\text{m}$ .

a-f は, Sakuma, M 2016 の図を使用.



### 3-1-2 膜タンパク質を介した IR700 複合体の細胞内への特異的取り込み評価

脳腫瘍細胞と乳がん細胞に、EGFR、CD133 抗体と IR700 の複合体をそれぞれ添加することで、細胞内部に IR700 の蛍光を観察することができた。しかし、細胞膜タンパク質を介したエンドサイトーシスではなく、IR700 が非特異的に細胞に吸着して細胞内に取り込まれている可能性がある。そこで、作製した IR700 複合体が、細胞膜タンパク質に結合することでエンドサイトーシスによって取り込まれているのかを確認した。まず、IR700 分子のみを細胞に添加したときの、細胞内部への取り込みについて評価した。IR700 分子は、タンパク質等のアミノ基と反応性が高い NHS 基を持つため、細胞や基板にコートした細胞接着タンパク質に非特異的に結合する。そこで、IR700 分子を 100 mM の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液中で、37°C で 3 時間インキュベートすることで NHS 基を不活化した。そして、40 nM の NHS 基不活化 IR700 分子を U87MG 細胞に添加し、1 時間 37°C でインキュベートした。赤レーザーを用いて蛍光観察を行なったところ、NHS 不活化 IR700 を添加した U87MG 細胞内部には、IR700 の輝点を観察することはできなかった (Fig.3.2b)。そのため、抗体に結合していない IR700 分子の非特異的な細胞への取り込みはほとんど起こらないと考えられる。

次に、抗体に結合した IR700 分子が、非特異的に細胞に吸着して細胞内部に取り込まれるかどうかを確認した。まず、U87MG 細胞や BT142 細胞と同じ脳細胞であるが、CD133 を細胞膜に発現していない Cath.a differentiated (CAD)細胞に IR700-CD133 を添加し、赤レーザーを用いて蛍光観察を行なった。その結果、CAD 細胞内部に IR700 由来の蛍光は観察されなかった (Fig.3.2c)。さらに、U87MG 細胞と CD133 受容体を発現していない KPL-4 細胞の共培養下で CD133-IR700 を添加するこ

とで、U87MG 細胞のみに特異的に IR700 を導入することができるかを評価した。まず、二つの細胞種を識別するために、KPL-4 細胞は共培養前に、橙色蛍光色素 PKH26 を用いて蛍光染色を行なった。その後、KPL-4 細胞と U87MG 細胞を同じガラスボトムディッシュ上に播種した。二種の細胞の共培養下で CD133-IR700 を 40 nM 添加して、37°C で 1 時間インキュベートした。共培養下の細胞の位相差顕微鏡画像と蛍光画像を Fig. 3.2d-f に示した。形状から二種類の細胞の識別は難しいが、緑色レーザー (523 nm) を照射することによって、左側の細胞のみに PKH26 の蛍光が観察された (Fig. 3.2d,e)。また、赤レーザーを照射すると、右側の細胞にのみ IR700 由来の蛍光が観察された (Fig. 3.2f)。PKH26 の輝度が観察されたことから、左側の細胞は KPL-4 細胞であると考えられる。左側の細胞には IR700 の蛍光が観察されず、さらに IR700 と PKH26 の両方の蛍光が観察された細胞はいないため、右側の細胞は U87MG 細胞だと考えられる。よって、IR700-CD133 は U87MG 細胞の CD133 のみに結合して細胞内部に取り込まれており、非特異的吸着による細胞内部への取り込みはほとんどないことを示している。

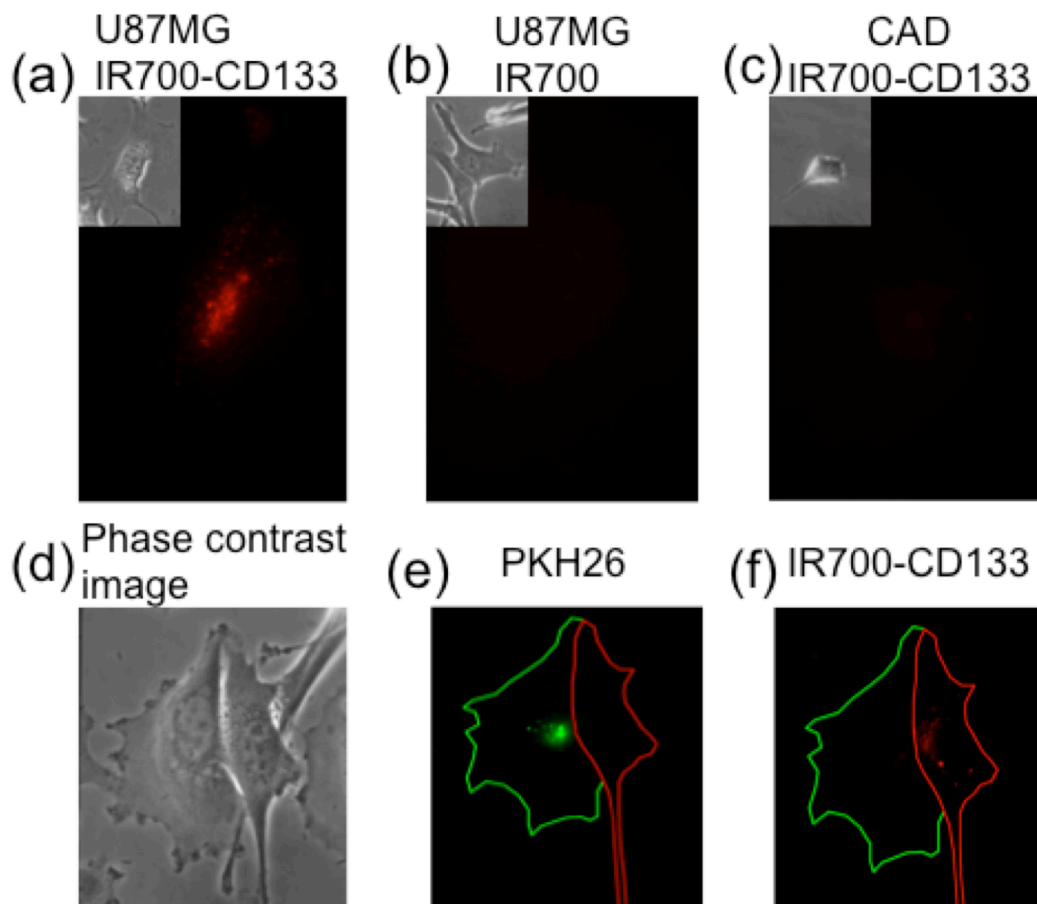


Fig.3.2 IR700分子の非特異的吸着の評価. a, bはU87MG細胞にIR700-CD133複合体と, NSH基を不活化したIR700分子を添加したときの蛍光観察像である. cはマウスの神経細胞であるCath.a-differentiated (CAD)細胞へ40 nMのIR700-CD133複合体を添加したときの蛍光観察画像である. d-fは, U87MG細胞とKPL-4細胞を共培養したときの, 位相差顕微鏡画像と蛍光画像である. e, fは, dの細胞に対して, それぞれ青レーザーと赤レーザーを照射したときの蛍光像である. e, fの緑と赤線は, それぞれの細胞の輪郭を表している. Sakuma, M 2016の図を改変して使用.

### 3-2 光ゆらぎ解析による細胞内運動の定量評価

第 3-1 節では, IR700-CD133 と IR700-EGFR を特異的に細胞内に導入し, 赤レーザーを照射することによって, 細胞に損傷を与えることができることを示した. 細胞に大きな損傷が与えられたときには, 細胞の形状が大きく変化することから, 細胞への損傷を確認することができた. しかし, 赤レーザー照射時間を短くすると, 形状からは損傷が判断することが難しかった. このように, 形状から判断することができない細胞の損傷を検出するために, 本研究では細胞内運動の変化に着目し, 細胞内運動を解析する光ゆらぎ法を開発した. 本章では, 光ゆらぎ法によって損傷時の細胞内運動の変化を計測して, 細胞内運動が細胞損傷の指標になり得るかを評価した.

#### 3-2-1 損傷時の細胞内運動の光ゆらぎ解析による評価

細胞内部の顆粒 (ベシクル) やミトコンドリアは, 輸送分子キネシンやダイニンによって細胞内部を輸送されたり, ブラウン運動を行っている. この細胞内運動は, 位相差顕微鏡によって観察することができ, 特に細胞核の周囲で活発であった. そして, IR700 を光活性化することによって, これらの細胞内運動が低下する様子が観察された. そこで, 位相差顕微鏡によって撮影した動画から, 光活性化前後の細胞内運動の変化を解析した.

ベシクルなどの細胞内運動を評価するために, 位相差顕微鏡動画の各ピクセル上の強度変化を, 光ゆらぎ値によって定量的に解析する方法を開発した (第 2-4 節参照). この光ゆらぎ法によって, 損傷前の細胞の光ゆらぎ値を計測して, ヒートマ

ップで Fig3.3b,e,h,k に示した. 接着細胞である U87MG 細胞, MDA-MB-231 細胞, KPL-4 細胞では, 損傷前は細胞核周辺部位の光ゆらぎ値が特に大きいことがわかった. 位相差顕微鏡像から, 細胞核周辺部位はベシクルなどの細胞内小器官の密度が高く, 運動も活発であることが観察された. 光ゆらぎ値の高い部分と細胞内小器官密集部位が一致していることから, 光ゆらぎ解析によって細胞内運動を可視化することが可能であることが示された. 光ゆらぎ解析では, 細胞内運動の活発な部分に加えて, 細胞の縁に形成されたラメリポディアやフィロポディアの運動も同時に検出することが可能である (Fig. 3.3b, 白矢印). 浮遊細胞である BT142 細胞について光ゆらぎ解析を行った結果を, Fig. 3.3k に示す. BT142 細胞においては, 細胞の縁周辺における強度ゆらぎが大きいことがわかった. これは, BT142 細胞の細胞質の半分以上は核が占めているため, 細胞内運動が観察される領域が縁周辺に限られているためだと考えられる. また, BT142 細胞は浮遊細胞であり, 10-15  $\mu\text{m}$  程の高さがあるため, 細胞膜付近に光のくまどり (ハロー) が観察された. 細胞が運動すると, ハローの位置や強度が変化するため, この付近に高い光ゆらぎ値が観察された (Fig. 3.4k, 白矢印).

次に, 光ゆらぎ解析によって, 損傷後の細胞内運動変化を, ヒートマップによって評価した. Fig. 3.3c,f,i に, 接着細胞である U87MG, KPL-4, MDA-MB-231 細胞の, 損傷後の光ゆらぎ値のヒートマップを示す. U87MG 細胞と BT142 細胞に, 40 nM の IR700-CD133 を添加し, 30 秒赤レーザーを照射した. また, MDA-MB-231 細胞と KPL-4 細胞には, 5 nM の IR700-EGFR を添加し, 10 秒赤レーザーを照射した. 損傷によって, 細胞核周辺の細胞内運動に由来する光ゆらぎが, 損傷前と比較して大きく低下した. 浮遊細胞である BT142 においては, 損傷後の細胞内運動の上昇が観察された (Fig. 3.3l). また, 1 秒赤レーザーを照射したときの, U87MG 細胞の形状変化

と細胞内運動のヒートマップを Fig.3.4 に示した. 1 秒照射してから 1 分後では, ほとんど細胞の形状は変化しなかった. しかし, ヒートマップ上の特に矢印が指し示す領域において, 光ゆらぎ値の低下が観察された. これらの結果は, 細胞形状からは判断ができない細胞の損傷を, 光ゆらぎ値によって解析した細胞内運動の低下から評価が可能であることを示唆している.

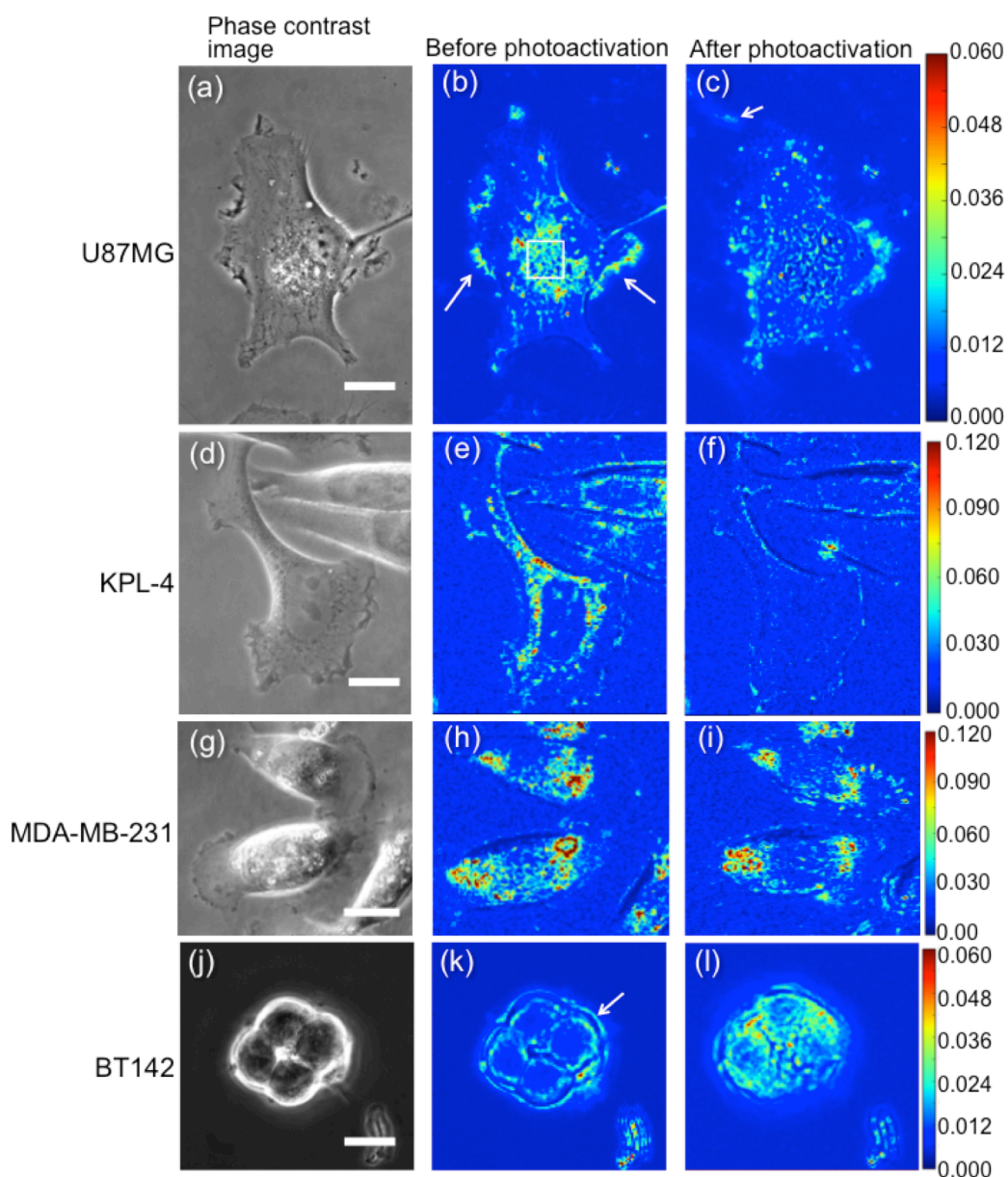
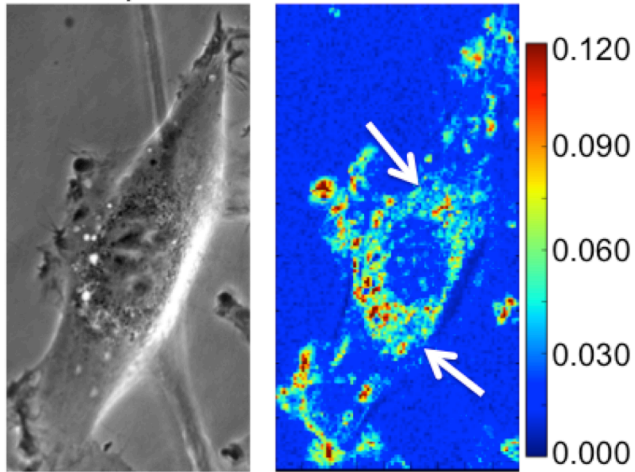


Fig.3.3 IR700 の光活性前後での、光ゆらぎ値のヒートマップ。a,d,g,j は、損傷前の U87MG 細胞、KPL-4 細胞、MDA-MB-231 細胞、BT142 細胞の位相差顕微鏡画像を示しており、b,e,h,k はそれぞれに対応した光ゆらぎ値をヒートマップで表示した。U87MG 細胞と BT142 細胞に、40 nM の IR700-CD133 を添加し、30 秒赤レーザーを照射した。また、MDA-MB-231 細胞と KPL-4 細胞には、5 nM の IR700-EGFR を添加し、10 秒赤レーザーを照射した。c,l は、IR700 分子の光活性後 10 分後のヒートマップであり、f,i は 1 分後のヒートマップである。U87MG 細胞と BT142 細胞は、0.1 フレーム/秒で 600 枚撮影し、MDA-MB-231 と KPL-4 細胞は、0.05 フレーム/秒で 300 枚撮影した。U87MG 細胞と BT142 細胞には 40 nM の IR700-CD133 複合体を添加し、KPL-4 細胞

と MDA-MB-231 細胞には 5 nM を添加した。スケールバーは、U87MG 細胞は 15  $\mu\text{m}$ , KPL-4 細胞, MDA-MB-231 細胞, BT142 細胞は 10  $\mu\text{m}$  である。Sakuma, M 2016 の図を改変して使用。



(a) Before photoactivation



(b) 1 min after photoactivation

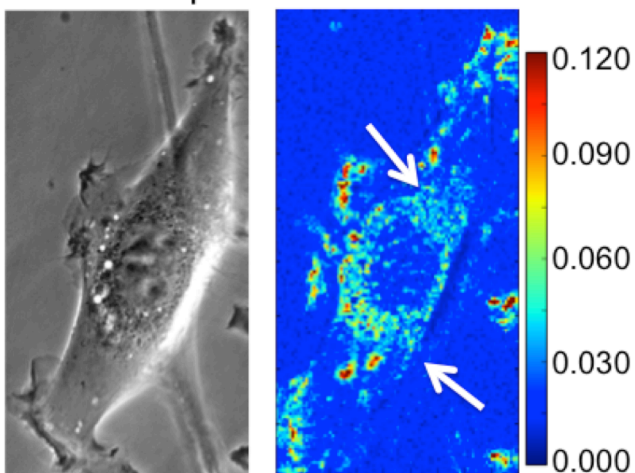


Fig.3.4 損傷による細胞の形状と細胞内運動の変化. 5 nM の IR700-EGFR を添加した U87MG 細胞へ, 1 秒赤レーザーを照射したときの, 細胞の形状と光ゆらぎ値のヒートマップである. a と b は, それぞれ赤レーザー照射前後の位相差顕微鏡像と光ゆらぎ値のヒートマップを示している. 白矢印は, 赤レーザー照射によって特に光ゆらぎ値が低下した領域を指し示している.

### 3-2-2 IR700 の光活性化による光ゆらぎ値の変化の統計解析

Fig. 3.3, 3.4 で視覚化した細胞内運動の変化を定量的に評価するために, Fig. 3.3 に示すように, 細胞内小器官密集部位の白枠内 ( $25 \times 25$  ピクセル)の光ゆらぎ値をヒストグラムとして表した. Fig. 3.5 は, U87MG 細胞と KPL-4 細胞のそれぞれ 8 細胞の損傷前後の光ゆらぎ値のヒストグラムを表している. 細胞には 5 nM の IR700 を添加し, 赤レーザーを 1, 10 秒照射した. 赤レーザーを照射することによって, 二つの細胞において光ゆらぎ値の分布は光ゆらぎ値が低い方向へシフトし, さらに照射時間が長いほど大きくシフトした. Fig. 3.5a-d の破線は, ヒストグラムの平均値を示しており, さらにグラフ内に平均値 $\pm$ 標準誤差を示した. 平均値は, 赤レーザー照射時間が長くなるほど大きく低下し, 10 秒照射したときは損傷前よりも 50%程細胞内運動が低下した. さらに, U87MG 細胞に赤レーザーを 0.25, 0.5, 1.0, 10 秒照射したときの光ゆらぎ値を Fig.3.5e に示した. 赤レーザーを 0.25 秒照射したときは, 損傷前後の光ゆらぎ値の変化に有意な差は表れなかった. しかし, 0.5 秒以上照射したときは, 有意に光ゆらぎ値が低下し, 照射時間が長くなるにつれて光ゆらぎ値が低下した. 0.5, 1, 10 秒照射したときに, 光ゆらぎ値はそれぞれ  $0.005 \pm 0.001$ ,  $0.010 \pm 0.001$ ,  $0.026 \pm 0.001$  (平均値 $\pm$ 標準誤差)低下した. このように, 赤レーザーの照射時間に依存して細胞内運動が低下することを, 光ゆらぎ解析によって評価することができた.

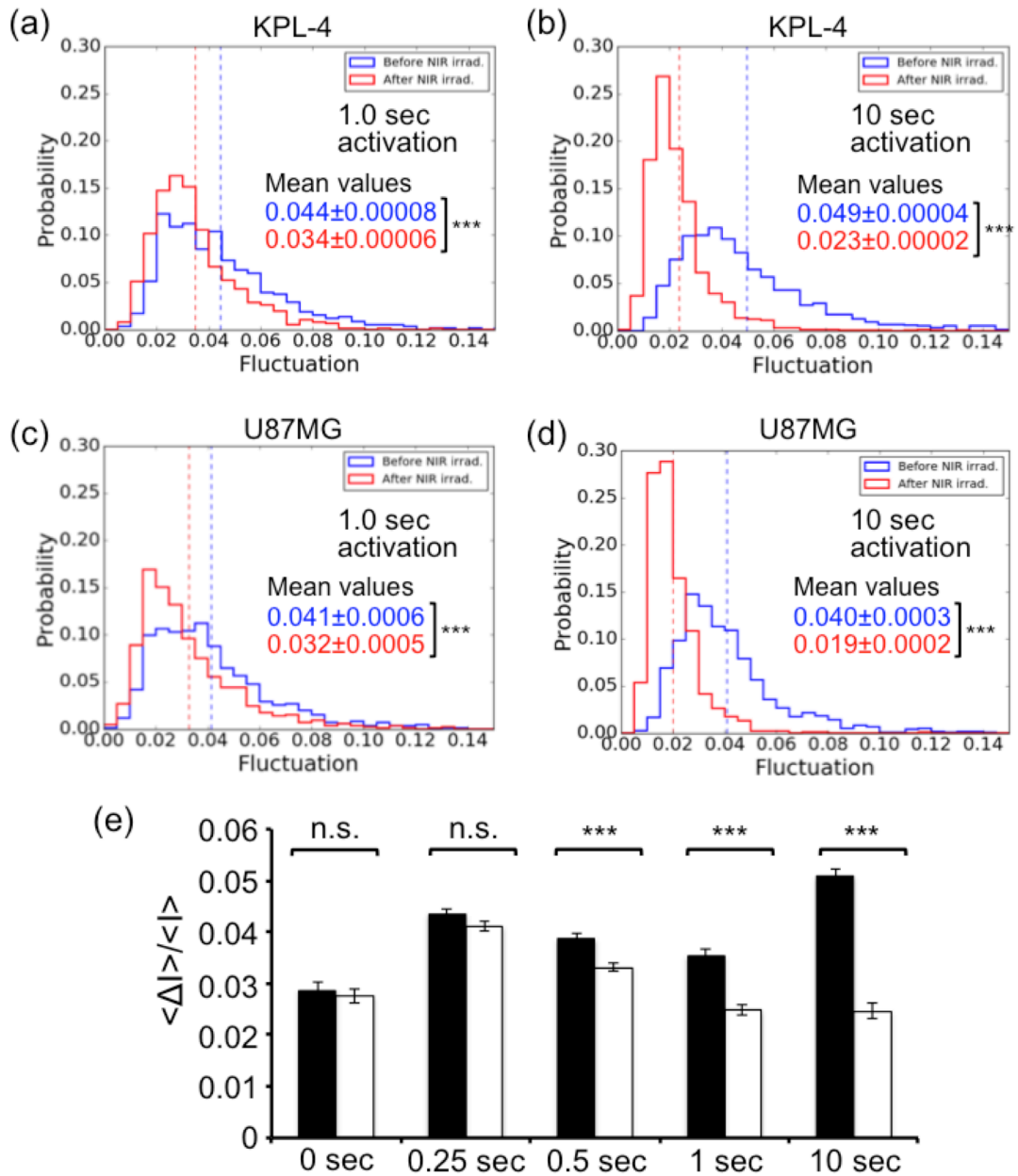


Fig.3.5 損傷前後の細胞の光ゆらぎ値の変化の統計解析. a-d は, KPL-4 細胞と U87MG 細胞に赤レーザーを 1, 10 秒照射したときの光ゆらぎ値の変化のヒストグラムを示している. ゆらぎ細胞核周辺の, ベシクルが密集している部位 (Fig.3.3b の白枠内,  $40 \times 40$  ピクセル)内部の光ゆらぎ値を, それぞれ 8 細胞ずつ算出して, 加算した値をヒストグラムで表示した. IR700-EGFR 複合体は, 5 nM 添加した. ヒストグラムの青と赤の破線は, それぞれ損傷前後のヒストグラムの平均値を示しており, 平均値  $\pm$  標準誤差をグラフ中に青と赤字で示した. e は, U87MG 細胞に赤レーザーを各条件で照射した前後の光

ゆらぎ値を示した。光ゆらぎ値は、それぞれ 8 細胞の光ゆらぎ値の平均値±標準誤差を示している。 \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , n.s. not significant

### 3-2-3 細胞内運動と細胞の損傷度の相関性の評価

損傷時の細胞の光ゆらぎ解析より，Fig.3.5e で示したように細胞内運動は赤レーザー照射時間に依存して低下した．これは，IR700 の光活性化時間によって細胞の損傷度が異なり，それが細胞内運動の変化として表れている可能性を示唆している．そこで，まず細胞内運動の低下が細胞損傷の指標となることを示すために，Fig.3.5e のそれぞれの細胞の Ethidium homodimer-1 (EthD-1) を用いた蛍光染色を行った．EthD-1 は，損傷を受けた細胞の膜を透過し，細胞の核を特異的に染める蛍光色素である．大きく損傷を受けた細胞は，Fig. 3.6a のように EthD-1 によって細胞核が染色された．そこで，Fig. 3.5e で計測した U87MG 細胞に対して EthD-1 を添加し，60 分後の細胞核の輝度を Fig.3.5b,c に示した．黒棒は損傷前，白棒は損傷後の蛍光強度を示している．照射時間が 1 秒以下のときは，EthD-1 によって細胞核はほとんど染色されなかった (Fig.3.5b)．1 秒照射時には，光退色によって EthD-1 の輝度が低下した．10 秒照射したときは，EthD-1 の輝度は 50 倍以上上昇した (Fig.3.5c)．さらに，10 秒照射したときは，全ての細胞は Fig.3.6a (白矢印)の位相差顕微鏡像のように，細胞体の膨らみや，ブルブと呼ばれるに球状の突起が観察された．よって，10 秒照射したときの細胞は，多くがネクロシスを起こしていると考えられる．1 秒以下の照射では，ネクロシスを起こした細胞の特徴は観察されず，EthD-1 で核が染色されなかったため，細胞は生きていると考えられる．これらの結果より，Fig.3.5e の赤レーザーを 10 秒照射した細胞はネクロシスを起こしており，さらに細胞内運動も大きく低下していることから，細胞内運動の低下は細胞の損傷度と相関性があると考えられる．

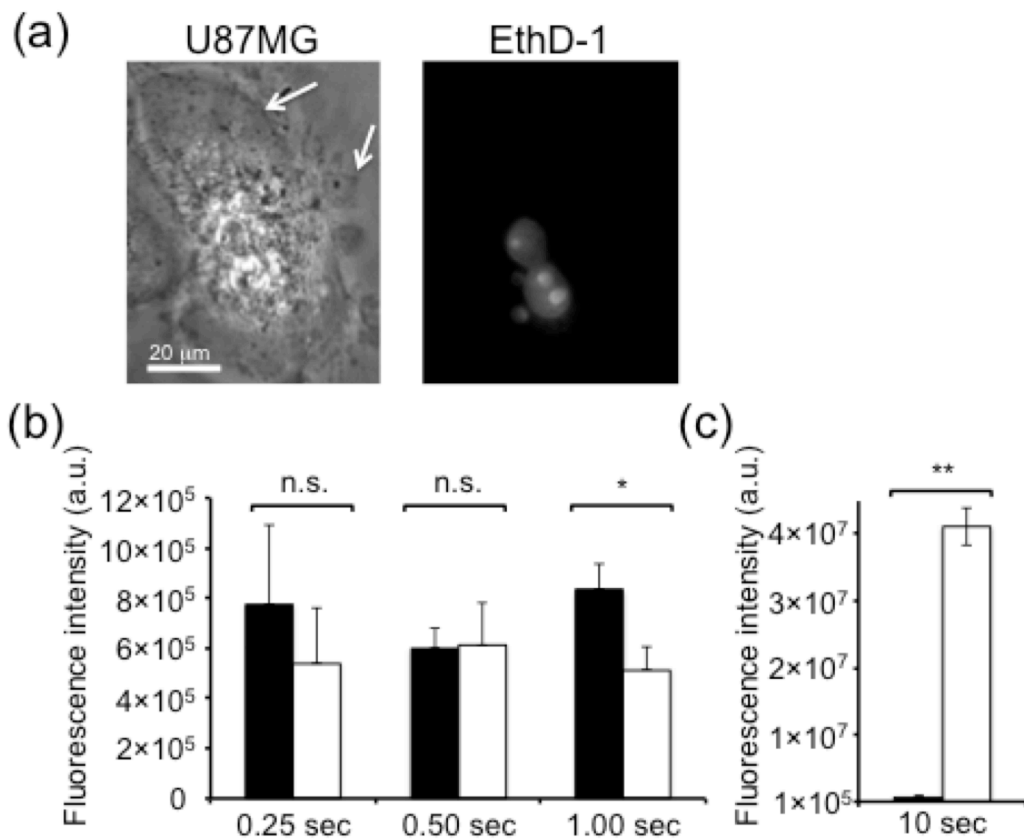


Fig.3.6 Ethidium homodimer-1 染色による細胞の損傷の評価. IR700 の光活性化によって損傷した IR700-EGFR 複合体を U87 細胞へ 5 nM 添加し, 赤色レーザーを 0.25, 0.50, 1, 10 秒照射することで細胞に損傷を与えた. IR700 の光活性化前に EthD-1 を細胞に添加し, 赤色レーザー照射によって細胞に損傷を与えてから 1 時間後に EthD-1 の蛍光観察を行った. a は, EthD-1 によって染色された, 損傷を受けた細胞の位相差像と細胞核の蛍光像である. b,c は, 損傷前後の EthD-1 によって染色した細胞核の蛍光強度 ± 標準誤差を示している. 黒棒は損傷前, 白棒は損傷後の蛍光強度である. b は赤レーザーを 0.25, 0.5, 1 秒照射し, c は 10 秒照射した. \* p < 0.01, \*\* p < 0.001, \*\*\* p < 0.0001, n.s. not significant Sakuma, M 2016 の図を改変して使用.

EthD-1 染色では、1 秒以下の赤レーザーを照射した細胞の損傷を検知することができなかった (Fig.3.6b). 光ゆらぎ解析では、赤レーザーを 0.5 秒、1 秒照射したときにも細胞内運動が有意に低下し、さらに 1 秒照射したときの方が大きく細胞内運動が低下したことを検知した (Fig.3.5e). そのため、光ゆらぎ解析は、EthD-1 染色では判断できない細胞の損傷度を計測している可能性がある。また、連続的に細胞に損傷を与えた時に、蓄積される損傷を検出することが可能だと考えた。そこで、KPL-4 細胞に対して赤レーザーを 30 分間隔で 1 秒ずつ全 4 回照射したときの細胞内運動の変化を評価した (Fig.3.7). レーザー照射を行う毎に、徐々に細胞内運動が低下していく様子が観察された。これより、IR700 の光活性化によって細胞に段階的に損傷を与えることで、それに応じて低下していく細胞内運動を、光ゆらぎ解析によって計測することができた。

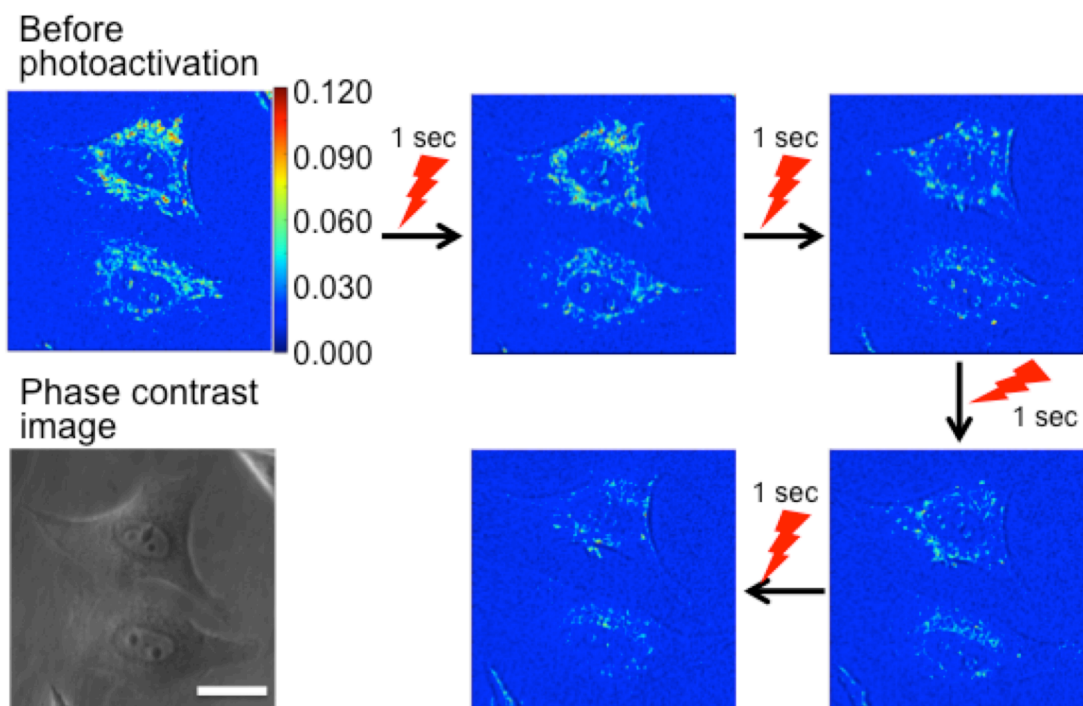


Fig3.7 IR700 の連続的な光活性化による光ゆらぎ値の分布の変化. KPL-4 細胞に 5 nM の IR700-EGFR 複合体を添加し, 赤色レーザーを 30 分間隔で 1 秒ずつ照射した. スケールバーは 25  $\mu\text{m}$ .



### 3-3 IR700 分子の光活性化による細胞小器官の損傷の評価

3-2 節の結果から，IR700 分子の光活性化による細胞の損傷を，細胞内小器官の運動の変化から定量的に評価することが可能であることがわかった．細胞内運動の低下が細胞損傷の指標となることを示すためには，IR700 分子の光活性化によってなぜ細胞内運動が低下するのかを評価しなければならない．そのために，IR700 の光活性化が細胞内小器官に与える影響を評価した．

#### 3-3-1 IR700 を含んだ小胞の損傷

IR700 の蛍光観察時に，小胞内の IR700 蛍光強度が短時間に大きく低下する様子が観察された．Fig. 3.8a に，5 nM の IR700 を添加し赤レーザーを 10 秒照射したときの MDA-MB-231 細胞の IR700 の蛍光観察像を示す．白枠内部の拡大図において，IR700 の輝点の強度が 0.3 秒間で大きく低下していた．さらに，輝点の強度が大きく低下した 5 つの IR700 の輝点強度の時間変化を Fig. 3.8b に示す．IR700 の輝点強度は，赤レーザーを照射することでゆっくりと低下し，0.2-0.4 秒間で大きく低下した．また，Fig.3.8c のように，特に IR700 の強度が高い蛍光輝点を観察すると，輝点周囲に蛍光が拡散する様子が観察された (Fig.3.8c 右図)．そこで，この輝点とその周囲の蛍光強度 (20×20 ピクセル) を計測した (Fig.3.8d)．黒線は輝点の強度変化，カラー線は輝点の周囲の強度変化，そして，グレー線は輝点と周囲を含む枠内の強度変化を表している (インセットを参照)．IR700 の輝点強度の低下が 0.4 から 0.8 秒間で観察され，同じタイミングで輝点周辺の強度が上昇していた．グレー線で示した，輝点と周囲を

含む枠内の蛍光強度は、ほとんど強度変化が観察されなかった。これは、IR700の輝点強度の低下は、IR700の蛍光退色ではなく、輝点から細胞質中へIR700が拡散しているためだと考えられる。よって、IR700の光活性化はIR700を含む細胞内小器官に損傷を与えており、さらに光活性化状態のIR700分子が細胞質中に拡散していることがわかった。

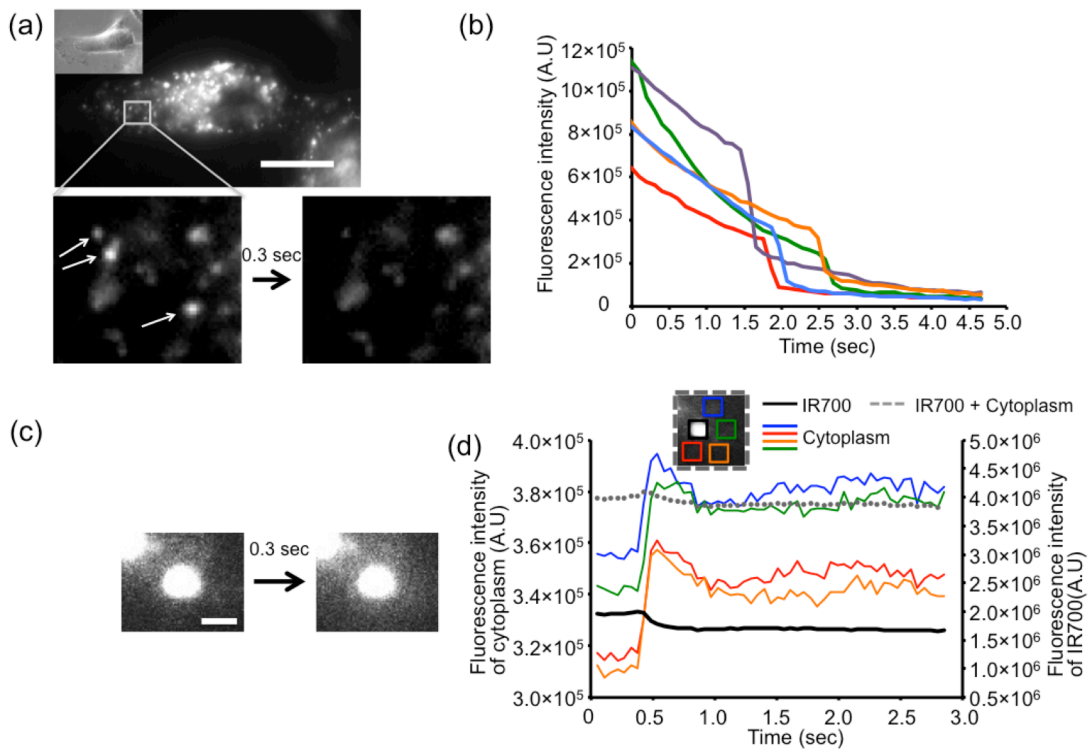


Fig.3.8 IR700 を内包した小胞の蛍光強度の時間変化. a の上図は, 5 nM の IR700-EGFR 複合体を添加したときの IR700 の蛍光画像である. 下図は, 白枠内の拡大図の時間変化を示している. b は, IR700 の 5 つの輝点強度の時間変化を示している. c は, IR700 の輝点からの IR700 分子の拡散を示している. また, d はこのときの IR700 の輝点強度 (黒線), 輝点周囲の細胞質の 4 つのカラーの枠内の強度 (カラー線), IR700 の輝点と細胞質を含む領域 (75×75 ピクセル)の強度 (グレー破線)の時間変化を示している. 第 1 軸は細胞質の強度変化 (カラー線), 第 2 軸は IR700 と, IR700 と細胞質の強度変化 (黒, グレー破線)の軸を示している. スケールバーは, a は 15  $\mu\text{m}$ , c は 2  $\mu\text{m}$ .

### 3-3-2 IR700 を含んだ小胞の種類同定

IR700 を含んだ小胞の損傷が観察されたので、IR700 がどの細胞内小器官に内包されているのかを蛍光観察によって評価した。Fig. 3.1b,e,h,k,n の結果から、細胞内部に導入した IR700 分子は、細胞の核周辺に特に多く集まっていることがわかった。そのため、IR700-抗体複合体は、膜タンパク質を介したエンドサイトーシスによって細胞内部に取り込まれ、細胞核周辺に分布する細胞内消化器官であるリソソームなどに輸送されていると考えられる。そこで、リソソームと IR700 分子の分布を共焦点顕微鏡を用いて観察した。接着細胞である U87MG 細胞と浮遊細胞である BT142 細胞に、それぞれ 40 nM の IR700 を添加して、1 時間 37°C でインキュベートした。リソソームは、50 nM の LysoTracker を添加することで蛍光染色した。Fig.3.9a-f に、IR700 とリソソームの蛍光観察画像を示す。IR700 とリソソームの輝点は細胞全体で観察されたが、特に多くの輝点が細胞核周辺に分布していた。IR700 とリソソームの蛍光画像を重ね合わせると、IR700 とリソソームの蛍光輝点の多くが重なったため、IR700 は添加してから 1 時間後には多くがリソソームに内包されていることがわかった (Fig.3.9c,f)。さらに、リソソームの蛍光分布が IR700 の光活性化によってどのように変化するかを、損傷前後でリソソームを経時的に観察することによって評価した。Fig.3.9g,h に、U87MG 細胞と BT142 細胞のリソソームの損傷前後の分布を示す。細胞への損傷は、40 nM の IR700 を添加し赤レーザーを 30 秒照射することで導入した。赤レーザー照射後に、二つの細胞において部分的なリソソームの蛍光輝点の消失が観察された。IR700 を添加していない細胞に赤レーザーを 30 秒照射すると、若干の蛍光退色はあるがリソソームの蛍光の消失は観察されなかった。本結果は、リソソーム内

部の IR700 が光活性によってリソソームに損傷を与えている可能性を示唆している.

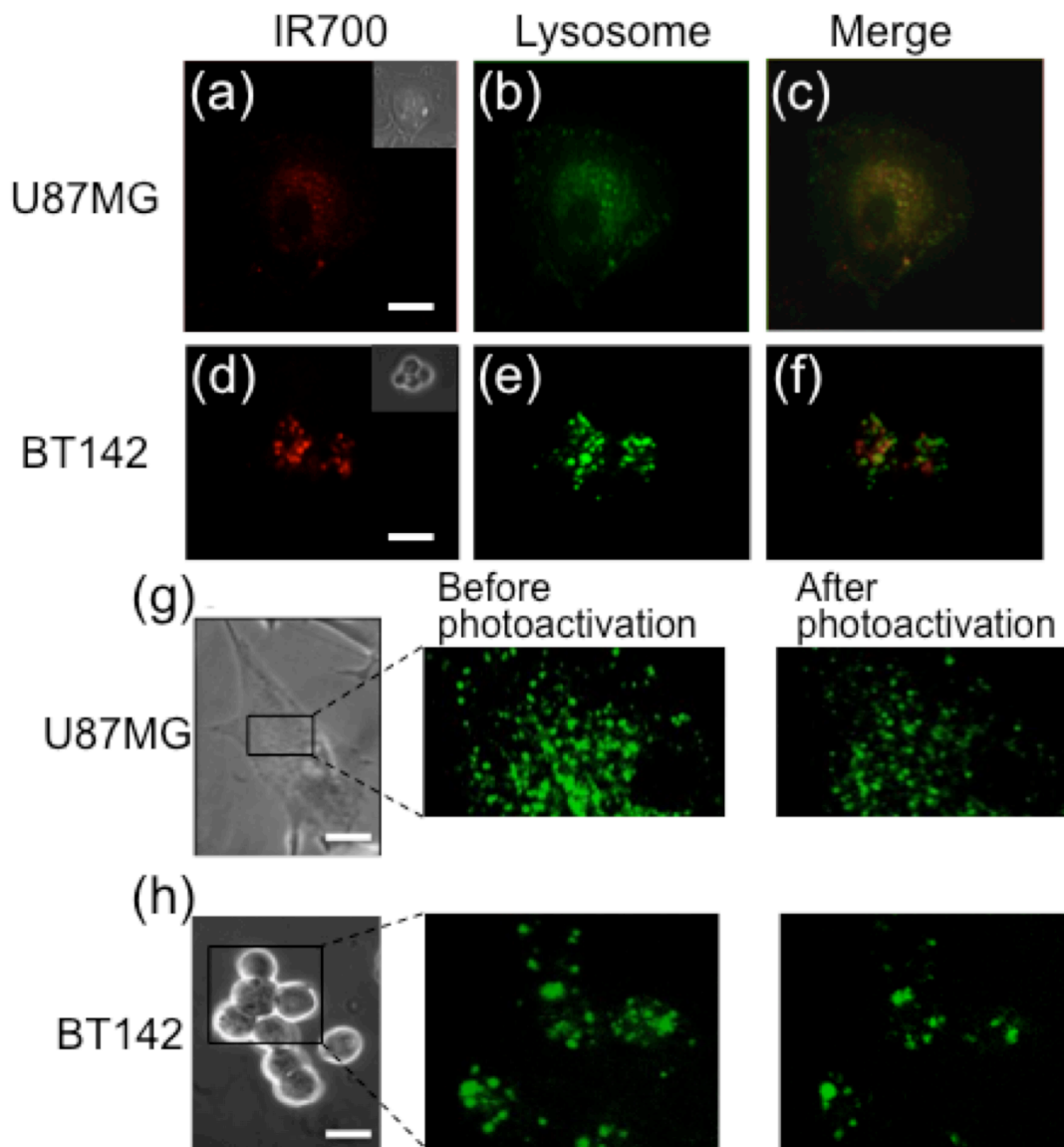


Fig.3.9 細胞内での IR700 とリソソームの共在の評価. a, b と d, e はそれぞれ IR700 と LysoTracker で蛍光染色したリソソームの蛍光観察像であり, それぞれ重ね合わせた画像が c と d である. また, g, h は IR700 の光活性前後のリソソームの蛍光画像である. 40 nM の IR700-CD133 複合体を細胞に添加し, 30 秒赤色レーザーを照射した. スケール 10  $\mu\text{m}$ .

Sakuma, M 2016 の図を使用.

赤レーザー照射後, IR700 を含む細胞内小器官の損傷は短時間(数秒~十数秒)で進行することがわかった (Fig.3.8). 損傷前後でのリソソームの経時観察からもリソソームの損傷が示唆されている (Fig.3.9g,h). しかし, IR700 を内包している細胞小器官の多くがリソソームであるならば, リソソームの急速な損傷も観察されるはずである. そこで, IR700 光活性時のリソソームのリアルタイム観察を行った. LysoTracker Yellow は蛍光退色が早く, リアルタイム計測に使用できなかったため, pH インジケータを用いてリソソームのリアルタイム観察を行った. pH インジケータは, 酸性下では高い蛍光強度を示すことから, リソソーム等の構造を判別することができる. Fig.3.10a,c は, U87MG 細胞の pH インジケータで染色した蛍光像である. 細胞核周辺のリソソーム等が分布する領域において, 特に高い蛍光強度が観察された. また, IR700 と pH インジケータが高い蛍光強度を示す領域はおおよそ一致していることから, pH インジケータは IR700 を含むリソソームを蛍光染色していることがわかった. そこで, 赤レーザー照射時の pH インジケータの蛍光輝度変化のリアルタイム計測を行った. Fig.3.10a-d に, IR700 に赤レーザーを 30 秒照射したときの, pH インジケータの輝度変化を示す. Fig.3.10a,b は IR700 を添加したときの照射前後の蛍光像であり, Fig.3.10c,d は IR700 を添加していないときの蛍光像である. 赤レーザー照射後には, IR700 を添加していない細胞と比較して添加した細胞ではより蛍光強度が低下していた. これらの結果より, リソソームの損傷を蛍光強度の変化から評価することが可能だと考えた. pH インジケータの蛍光強度の時間変化を Fig.3.10e に示した. グラフは, 8 細胞の細胞核周辺の蛍光強度が高い部分 30 か所の 30×30 ピクセル内の蛍光強度の平均値±標準誤差を示している (Fig.3.10a 黒枠). 縦軸は, IR700 を添加していない細胞の蛍光強度に対する, IR700 を添加した細胞の蛍光強度の相対

値を示している。赤レーザーを照射してから 15 秒までは、pH インジケータの蛍光強度の低下は観察されず、15 秒後から蛍光強度が徐々に低下した。グラフの縦軸は pH インジケータの退色に対する相対値であるため、15 秒までは IR700 の光活性化によって pH が低く(酸性)になっており、15 秒以降は pH が徐々に高く(塩基性)なっていることを表している。つまり、IR700 の光活性化によって、15 秒までにリソソームが損傷し、内部物質が流失することによる pH の低下が観察されたと考えられる。これらの結果から、IR700 を含む細胞小器官は主にリソソームであり、IR700 の光活性化によるリソソームは短時間で進行していることが明らかとなった。



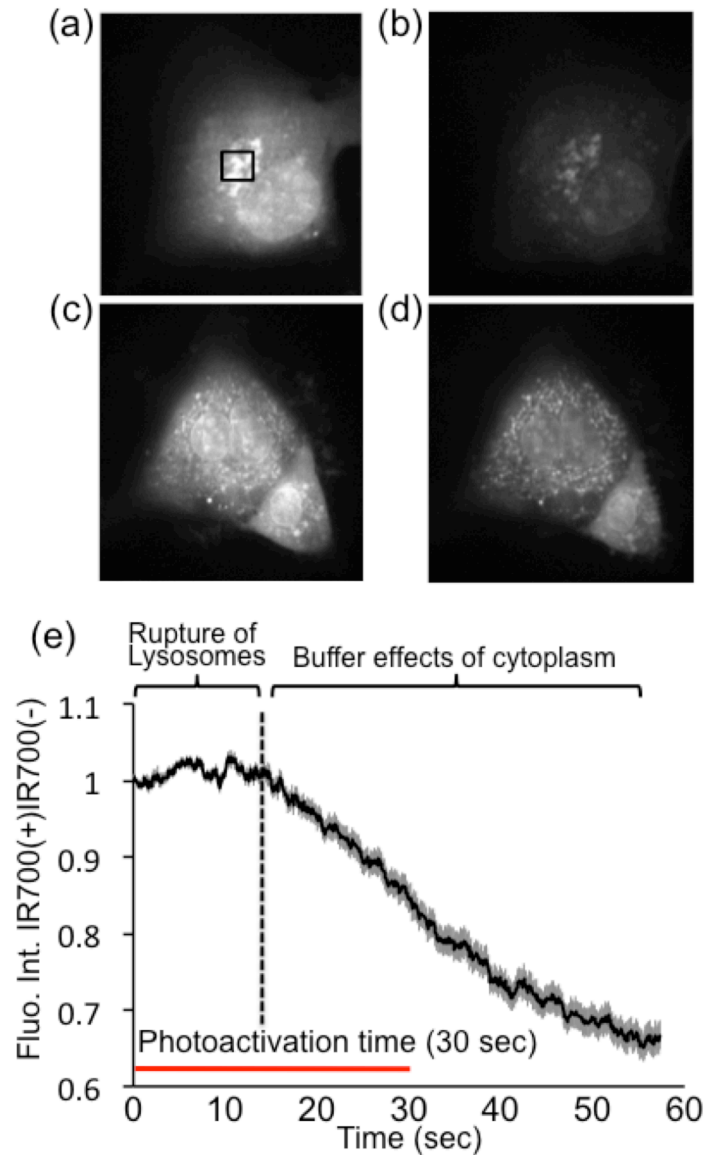


Fig.3.10 pHインジケータを用いたIR700の光活性時における細胞内のpH変化. a,b,c,dは、それぞれIR700の光活性前後のpHインジケータの蛍光を示している. a,bでは、40 nMのIR700-CD133複合体を添加し、赤色レーザーを30秒照射した. c,dは、IR700-CD133複合体を添加せず、赤色レーザーを30秒照射した. eは、光活性時の細胞内のpHインジケータの蛍光強度の時間変化を示している. aに示したように、黒い枠内(30×30ピクセル)の平均蛍光強度を、8細胞から合計30箇所を計測して、その平均値の時間変化を示した. y軸は、IR700-CD133複合体を添加していない細胞の蛍光強度に対する、複合体を添加した細胞の蛍光強度の相対値を示している. 0-30秒間、赤色レーザーを照射した. Sakuma, M 2016の図を改変して使用.

### 3-3-3 IR700 による輸送分子キネシンの損傷

3-3-2 項の結果より, IR700 の活性化によって IR700 を内包しているリソソームが損傷を受けていることが明らかとなった. そして, リソソームの損傷によって細胞質中への IR700 分子の拡散が観察された. したがって, IR700 の光活性化による細胞内小器官の運動の低下は, リソソームの損傷によって光活性化した IR700 分子が細胞質中に拡散し, リソソーム周囲の細胞小器官へ損傷を与えているためだと考えられる. リソソームは, Fig.3.9 で示したように, 主に細胞核周辺に分布している. リソソームは中心体近傍に集積することが知られている [Dunster, K 2002]. リソソームの輸送はダイニンやキネシンによって制御されており, そのため, 中心体近傍にこれらの輸送分子も分布している [Cardoso, C 2009, Tan, S 2011]. 次章でも示すが, ミトコンドリアも細胞核周辺に存在した. よって, リソソームの損傷によって拡散した IR700 は, これらの構造に損傷を与えていると考えられる. 特に, 本研究では, IR700 の損傷によって細胞内運動の低下が観察されたため, キネシン等の輸送分子が損傷を受けた可能性がある. そこで, IR700 の光活性化が輸送分子キネシンに与える影響を評価した.

IR700 の光活性化によるキネシンへの影響の評価は, Fig.2.6 に示すモティリティアッセイ系を用いて評価した. 基板底面に NHS 基を介して IR700 を固定し, アビジン・ビオチン結合を介してキネシンを固定した. キネシン固定後に微小管を添加することで, 微小管とキネシンを結合させた. Fig.3.11a 左図に, 微小管をキネシンに結合させたときの蛍光観察画像を示す. 微小管はローダミンで蛍光標識しているため, 基板上で細長い紐上の構造として観察される. IR700 の光活性化によるキネシンと微小管の結合への影響を評価するため, Fig.3.11a 左図の白円の部分に 5 mW の赤レ

レーザーを照射した。レーザーを照射して 5 秒後に、白丸内部において微小管が基板上から脱着する様子が観察された (Fig.3.11a 右図)。また、赤レーザーを照射しないで微小管の蛍光観察のための緑色レーザーのみ照射すると、キネシンと微小管の結合は 30 秒間維持されていた (Fig.3.11b)。したがって、キネシンと微小管の結合は、赤レーザー照射による IR700 の光活性化が引き起こしていると考えられる。また、溶液中に酸素の除去剤であるグルコース、カタラーゼ、グルコースオキシターゼ (GCO) を添加すると、赤レーザーを 30 秒間照射しても基板上にキネシンが結合している様子が観察された (Fig.3.11c)。そのため、IR700 は光活性化によって活性酸素を放出することで、キネシンもしくは微小管に損傷を与えていると考えられる。さらに、キネシンの損傷による微小管の結合の阻害を明らかとするために、キネシン固定後に 5 mW の赤レーザーを 60 秒照射した基板に対して微小管が固定されるのかを評価した。その結果、赤レーザー照射部位では固定された微小管を観察することができず、同じ基板でレーザー照射部位外では基板に固定された微小管が観察された (Fig.3.11d)。これらの結果から、基板に固定されたキネシンが IR700 の光活性化によって損傷を受けることで、微小管との結合が阻害されることがわかった。

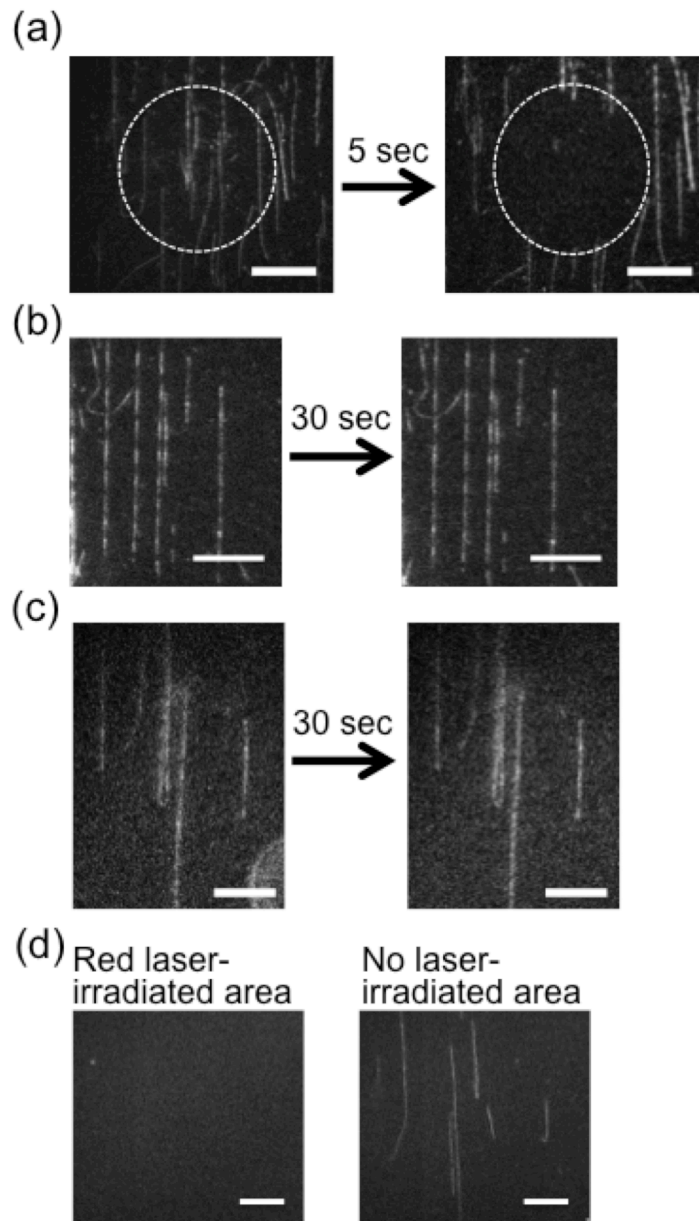


Fig.3.11 IR700の光活性化による輸送分子キネシンの損傷の評価. aは白丸内部に赤色レーザーを照射したときの、微小管の蛍光像の変化を示している. bは、赤色レーザーを照射せずに微小管を観察したときの蛍光像であり、cはグルコース、カタラーゼ、グルコースオキシターゼを添加して、赤色レーザーを照射したときの微小管の蛍光像の変化を示している. dは、赤色レーザーを照射した基板へ、微小管を添加したときの蛍光観察像である. 左図は赤色レーザー照射部位の蛍光像であり、右図は照射をしていない部位の蛍光像である. スケールバー a 20  $\mu\text{m}$ , b-d 10  $\mu\text{m}$ .

### 3-3-4 IR700 の光活性化による細胞損傷時のミトコンドリア構造の変化

細胞質中に拡散した IR700 の光活性化は、輸送分子であるキネシンに限らず様々な細胞小器官に損傷を与えていると考えられる。細胞内で細胞の活動源である ATP を合成しているミトコンドリアは、キネシン等輸送分子に輸送されており、細胞内の核付近で多く観察される。そのため、IR700 の光活性化によってミトコンドリアが損傷している可能性がある。そこで、CellROX を用いて細胞内部のミトコンドリアを蛍光染色して、IR700 光活性化時のミトコンドリアの蛍光の変化を観察した。

Fig.3.12a,b は、損傷前の U87MG 細胞の位相差顕微鏡画像とミトコンドリアの蛍光像である。ミトコンドリアの多くが細胞核周辺に分布しており、白い枠内の拡大図より、ミトコンドリアは白矢印が指し示すような細長い構造として観察された (Fig.3.12c 左図)。この細胞に 10 秒間赤レーザーを照射することによって、Fig.3.12c の右図のようにミトコンドリアの構造の消失が観察された。また、赤レーザー照射時のミトコンドリアのリアルタイム観察を行うと、ミトコンドリアから蛍光が拡散する様子が観察された。この現象は、IR700 を添加していない細胞へ赤レーザーを照射したときには、観察されなかった。一方、IR700 分子の蛍光像を示した Fig.3.1b,e,h,k,n には、ミトコンドリアに特徴的な細長い構造体が観察されなかったことから、IR700 は細胞内でミトコンドリアに結合していないと考えられる。これらの結果より、IR700 の光活性化によって、リソソームの破裂に伴い拡散した IR700 によって、ミトコンドリアも損傷を受けていることが示唆された。

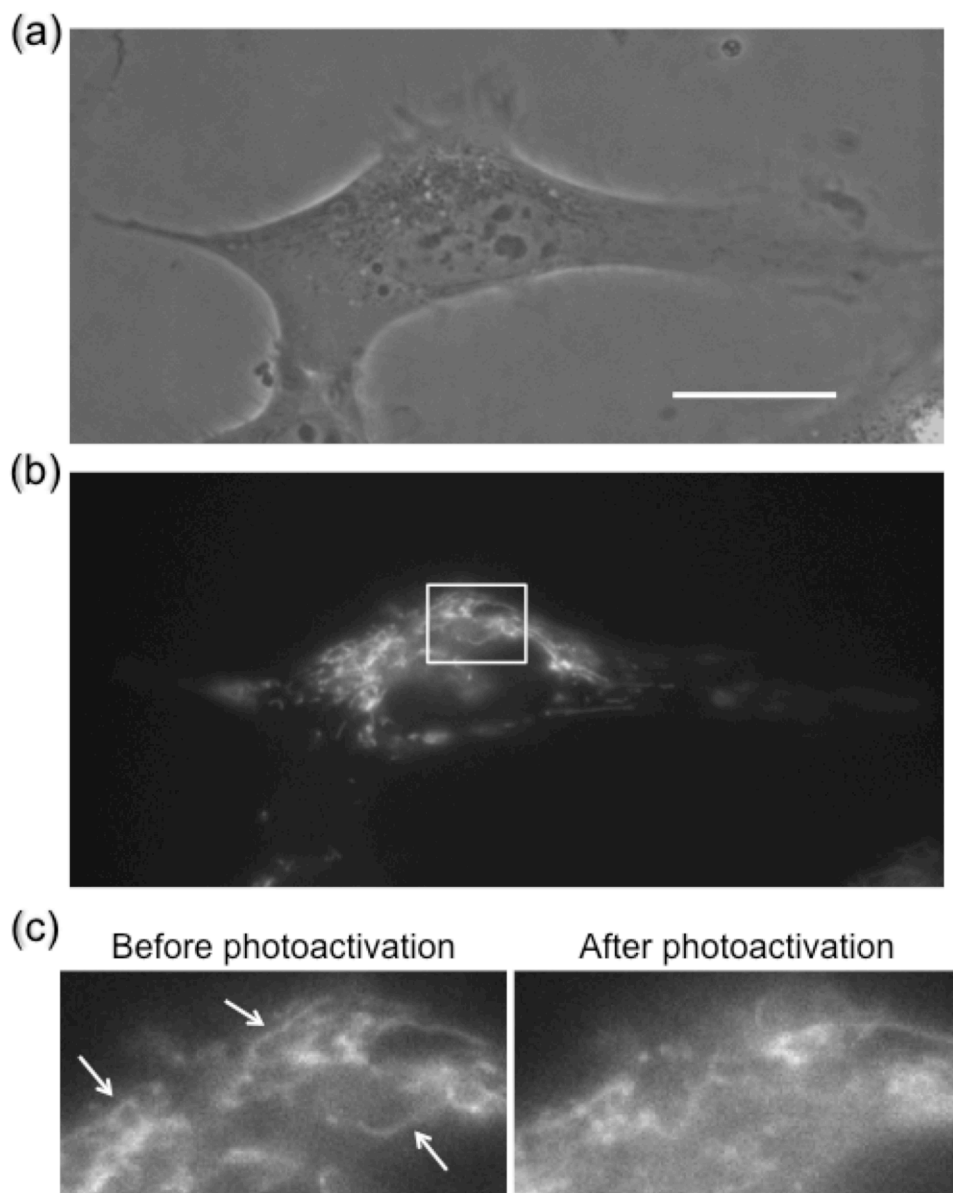


Fig.3.12 IR700の光活性化によるミトコンドリアの損傷評価. aはU87MG細胞の位相差顕微鏡画像を示している. bはaの細胞のミトコンドリアの蛍光像である. cは, bの白枠内部を拡大図である. cの左図は光活性化前のミトコンドリアの蛍光像であり, 右図は10秒赤色レーザーを照射した後の蛍光像である. 5 nMのIR700-EGFR複合体を添加した. スケールバーは40  $\mu\text{m}$ .

### 3-3-5 過酸化水素による酸化ストレスによる細胞内運動の変化

3-3-3 項のキネシンの損傷実験結果より、酸素除去剤である GCO 存在下では IR700 の光活性化によるキネシンの損傷は観察されなかった。そのため、IR700 は光活性化によって活性酸素を発生して、細胞内小器官に損傷を与えていると考えられる。これは、損傷による細胞内運動の低下は、IR700 分子の光活性化に限らず、一般的に酸化ストレスと総称される細胞損傷の指標となる可能性を示唆している。そこで、過酸化水素を添加することで、細胞に酸化ストレスを与えたときの細胞の細胞内運動の変化を光ゆらぎ値から評価した。Fig.3.13 に、KPL-4 細胞に過酸化水素を添加したときの細胞内運動の変化を示す。過酸化水素は、最終濃度が 0.1 mM となるように細胞に添加して、添加してから経時的に細胞の位相差顕微鏡動画を撮影した。Fig.3.13a,b は、それぞれ過酸化水素添加前と添加後 120 分後の KPL-4 細胞の位相差顕微鏡画像である。過酸化水素の添加によって、KPL-4 細胞の細胞体は徐々に収縮した。Fig.3.13c,d,e は、それぞれ過酸化水素添加前、添加後 10 分、120 分の光ゆらぎ値のヒートマップである。過酸化水素水添加前は、細胞核周辺の運動が活発であった。過酸化水素を添加して 10 分後には細胞内運動は低下しており、120 分後には大きく細胞内運動が減少した。過酸化水素による酸化ストレスによって、IR700 の光活性化と同様に細胞内運動が低下していることから、細胞内運動の低下は酸化ストレスによる細胞損傷の指標となることが明らかとなった。

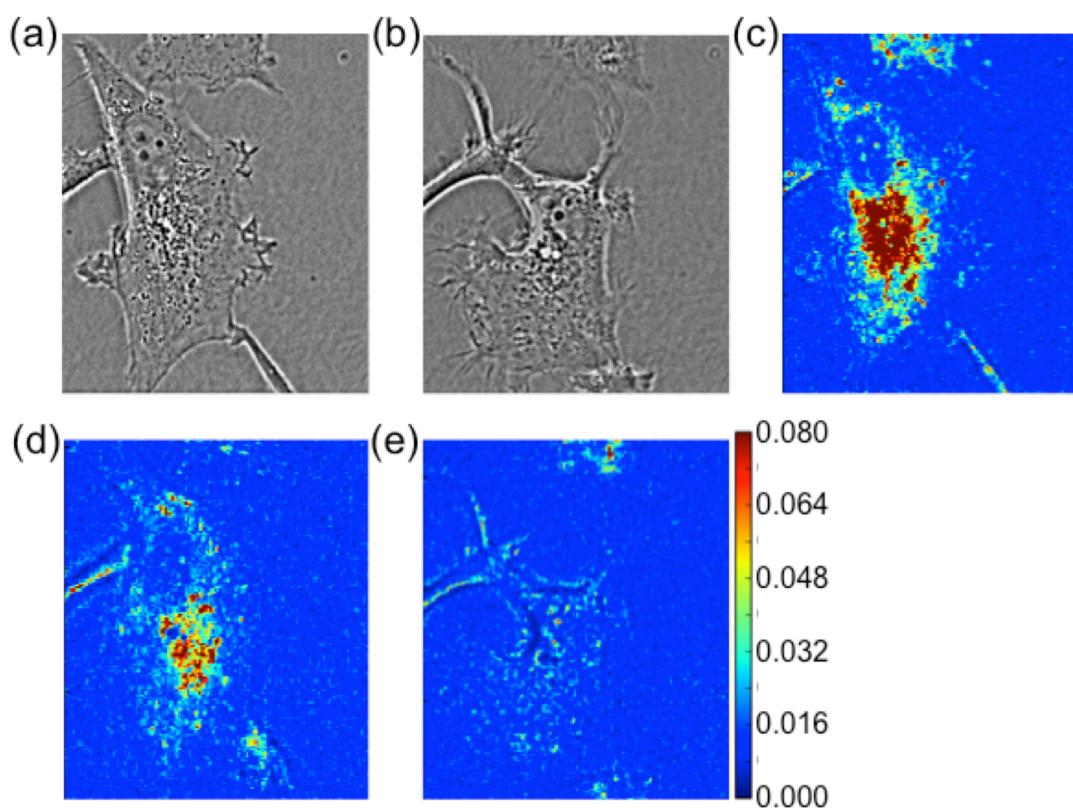


Fig.3.13 過酸化水素の添加による細胞内運動の変化. a,b は, 過酸化水素添加前と添加後 120 分後の KPL-4 細胞の位相差顕微鏡画像である. 過酸化水素水は, 溶液中での最終濃度が 0.1 mM となるように添加した. c,d,e はそれぞれ過酸化水素水添加前, 添加後 10 分, 120 分の細胞の光ゆらぎ値のヒートマップを示している.



## 第 4 章 考察

### 4-1 光ゆらぎ値による細胞内運動解析

本研究では、位相差顕微鏡画像から細胞内小器官の運動を定量的に評価する方法を開発した。Fig.3.1a のように、核周辺のベシクル等細胞小器官が多く密集している部分では、1 粒子追跡によって網羅的に運動を解析するのは難しい。本手法は、各ピクセル上の輝度変化から強度ゆらぎを解析するため、細胞全体における細胞小器官の運動を統計的に解析することが可能であった。また、位相差顕微鏡動画を撮影後に光ゆらぎ値を計算するため、細胞の計測の時間分解能に原理的には制限がない。しかし、撮影速度が増加すると信号強度が低下するため、相対的にノイズが大きくなり、細胞内運動の光ゆらぎ値が計測しづらくなった (Fig.2.4h)。また、光ゆらぎ値を計算するときの計算間隔によっては、細胞内小器官の運動を感度よく計測することができないことがわかった。計算間隔が長いと、細胞自身の運動の成分が光ゆらぎ値に含まれてしまった (Fig.2.4j,  $<0.33$  Hz の領域)。また、計算間隔が短すぎると、細胞小器官の運動の中でも速い成分しか検知することができなかった。そのため、Fig.2.4j のように、パワースペクトル密度を計算した上で、最適な計算間隔を検討する必要があった。

位相差顕微鏡では、細胞内部に光が入射して散乱された光と、直進した光の強め合いで物体のコントラストをつけている。そのため、位相差顕微鏡の光ゆらぎは、

リソソームやエンドソーム等のベシクル運動だけではなく、ミトコンドリアや小胞体などの細胞小器官の運動に由来した光ゆらぎを含んでいる可能性がある。そこで、光ゆらぎ解析によって、どの細胞内小器官の運動を主に解析しているのかについて論じる。位相差顕微鏡画像において核周辺に観察されるベシクルは、蛍光観察の結果より後期エンドソームやリソソームであると考えられる (Fig.3.9)。後期エンドソームやリソソームの粒径はおよそ 250-1000 nm であることが明らかとされている [Huotari, J 2011]。本実験では、位相差顕微鏡観察の光源であるハロゲン光を、510–550 nm の蛍光フィルターに通した。後期エンドソームやリソソームは、観察光の波長の 1/10 以上であるため、エンドソームやリソソームに光が入射することでミー散乱が起きていると考えられる。クラスリンと結合した小胞体の大きさは 50-100 nm、ミトコンドリアはチューブ状であるときとブランチすることで形状が大きく変わるが、nm から  $\mu\text{m}$  の大きさを持つことが知られている [Voeltz, G 2002, Rafeiski, S 2013]。そのため、小胞体やミトコンドリアによる散乱も、光ゆらぎ解析の計測に含まれていると考えられる。ミー散乱は、粒子の粒径に依存して散乱強度が大きく変化する [Gardiner, C 2014]。そこで、粒径の異なるシリカビーズをスクロース溶液中で観察することで、粒径が散乱強度に与える影響を評価した。スクロース溶液の濃度を調節することによって、シリカビーズとスクロース溶液の屈折率差を、細胞質と細胞内ベシクルの屈折率差を同程度に調節した。これによって、より細胞質内に近い環境下で、シリカビーズの粒径が散乱強度に与える影響を評価した。その結果、100 nm のシリカ粒子の散乱強度は非常に低く、ほとんど観察することができなかった。そのため、光ゆらぎ解析は、主に数百 nm 以上のエンドソームやリソソーム、そしてミトコンドリアの運動を評価していると考えられる。

## 4-2 IR700 の光活性化による損傷誘導のメカニズム

本章では、新規治療法である赤色蛍光色素 IR700 による細胞への損傷誘導のメカニズムに関して論じる。

IR700 分子は、高い殺傷効果と低い副作用のため、がん治療への利用が期待されている。また、IR700 を結合させる抗体を標的に合わせて自由に変えることができるため、応用の幅が広い。近年、小林らはこの利点を活かすことで、制御性 T 細胞を標的としたがん治療が効果的であると示した研究結果を報告した [Sato, K 2016]。がん細胞が誘導した制御性 T 細胞 (Treg 細胞) を IR700 で選択的に死滅させると、数分後にはがん細胞が除去されることが明らかされた。Treg 細胞は、がん細胞によって免疫反応を抑制するように性質を変えられた細胞である。Treg 細胞によって、がん細胞への免疫反応が抑制されているが、IR700 によって Treg 細胞を取り除くと、正常な免疫反応が働くことからがん細胞が除去されている。さらに、血流にのって免疫細胞が全身に拡散するため、転移したがん細胞をも除去することが可能である。このような高い治療効果から、今後同様のメカニズムでがん細胞を除去する治療が普及していくと考えられる。

IR700 分子を用いた臨床が進められている中で、細胞への損傷のメカニズムは不明な点が多い。小林らは、IR700 分子の光活性化による細胞損傷は、IR700 分子周囲の温度が急速に上昇し、水が膨張することで発生する圧力波だと考えている [Mitsunaga, M 2011]。小林らは、活性酸素の除去剤であるアジ化ナトリウムを、IR700 分子を添加した細胞の培地に加えたときの光活性化による死細胞数を評価した。その結

果、アジ化ナトリウムを 50 mM 添加しても 10%程 IR700 の光活性による損傷で細胞死を起こした細胞が存在した。これより、活性酸素種による細胞への損傷はマイナーな効果であると結論づけていた。しかし、溶液中に添加したアジ化ナトリウムの濃度を増やすことで死細胞数が減少していることから、50 mM では不十分な濃度なだけであり、活性酸素による細胞損傷の可能性を除去しきれていない。本研究では、高濃度の活性酸素除去剤による細胞への影響を考慮して、細胞外で細胞内輸送系であるキネシンと微小管を再構築して、IR700 による損傷の影響を評価した。その結果、IR700 の光活性化によって、キネシンが損傷を受けたために微小管が基板から脱着する様子が観察された (Fig.3.11)。また、この系で酸素の除去剤を添加すると、光活性化による微小管の脱着は観察されなかった。活性酸素は、蛍光色素が励起光で励起して、そのエネルギーが酸素に移動することで発生する。酸素除去剤を添加することによって酸素が除去されているため、エネルギーが流れ込む酸素が存在しない。そのため、活性酸素が発生せず、キネシンへの損傷が誘導されなかったと考えられる。よって、IR700 の光活性化は活性酸素を発生させて、それが主に細胞内小器官へ損傷を与えていると考えられる。

#### 4-3 IR700 の光活性化が誘起する細胞損傷に伴う細胞内運動低下のメカニズムの考察

本研究では、IR700 の光活性化による損傷で変化する細胞内運動から、細胞の損傷度を評価した。LysoTracker Yellow や pH インジケータを用いたリソソームなどの酸性小器官の蛍光観察の結果から、IR700 の光活性化はリソソームの損傷を誘起

していることが明らかとなった。特に、pH インジケータを用いたリアルタイム観察によって、リソソームの損傷が急速に進む様子が観察された (Fig.3.10)。さらに、IR700 の輝点観察より、細胞質中への IR700 分子の拡散が観察された (Fig.3.8)。拡散した IR700 分子が細胞質中において光活性化している場合、あらゆる細胞小器官への損傷が考えられる。特に、IR700 の光活性化によって細胞内運動の低下が観察されていることから、輸送分子であるキネシンへの損傷を評価した。キネシンへの損傷については、4-2 節で考察した。

本研究では、リソソームから拡散した IR700 がキネシンやミトコンドリアなどのタンパク質や細胞内小器官に与える影響を実験的に証明した。しかし、IR700 の光活性化によって IR700 がリソソーム中から細胞質に拡散しているということは、リソソームの内容物も細胞質中に拡散していると考えられる。これは、pH インジケータを用いたリアルタイム観察によって、リソソーム内部のプロトンが放出されることで pH インジケータの強度が上昇していることから示唆された (Fig.3.10)。リソソームは細胞内の不要なタンパク質を分解する場であり、リソソームの内のタンパク質分解酵素が細胞質中に拡散すると、周囲の細胞内小器官に損傷を与えている可能性がある。リソソーム内部のタンパク質消化酵素として、システインプロテアーゼであるカテプシン類がある [Repnik, U 2012]。カテプシンは細胞質中に拡散すると、リソソーム周囲のタンパク質に直接作用している可能性がある。また、リソソーム内部で IR700 の光活性化によって活性酸素が発生すると、リソソーム膜内の脂質の不飽和結合が酸化されることで、過酸化脂質が発生している可能性も考えられる。過酸化脂質は、IR700 の光活性化によって生じたヒドロキシラジカルが、脂質から水素を奪うことで発生する。水素がなくなった脂質は脂質ラジカルとなり、酸素と反応すること

で脂質ペルオキシラジカルとなり、他の脂質と反応して水素を奪うことで脂質ヒドロペルオキシド (過酸化脂質)となる。このとき、水素がなくなった脂質は脂質ラジカルとなり、同様の反応が連鎖的に進行する。さらに、過酸化脂質はスーパーオキシドアニオンを発生するため、細胞にさらなる酸化反応を誘導するため、連鎖的に細胞内小器官に損傷を与える。過酸化脂質はグルタチオンペルオキシダーゼによって無害な脂質アルコールとなるが、細胞が活性酸素を除去する能力を超えた酸化ストレスを受けると、過酸化脂質による酸化ストレスは進行する [Sevanian A 1983, Ayala, A 2014]。リソソームの破壊によるこれらの細胞内小器官への損傷は、IR700の光活性化と同様に非特異的にであり、細胞内輸送系に損傷を与えている可能性は大いに考えられる。

IR700の光活性化によって発生する活性酸素がリソソームを損傷し、それによって消化酵素や過酸化リン脂質による酸化ストレスが細胞内の運動を低下させている原因として考えられた。そうであれば、IR700の光活性化以外の方法で酸化ストレスを与えたときにも、細胞内運動は低下すると予想した。そこで、過酸化水素を添加することで細胞に酸化ストレスを与え、そのときの細胞の細胞内運動の変化を観察した。その結果、過酸化水素を添加して10分後には細胞内運動が低下しており、時間とともに徐々に細胞内運動が低下していく様子が観察された (Fig.3.13)。過酸化水素による酸化ストレスによって、リソソーム膜の構造が損傷を受け、流出したカテプシンや酸化ストレスの影響で細胞死が誘導されたという研究報告がある [Repnik, U 2012]。

これより、本研究で観察された細胞内小器官の運動の低下は、IR700の光活性化による活性酸素と、リソソームの開裂の二つの異なる経路で引き起こされていると考えられる。どちらの経路も活性酸素種が細胞内小器官へ損傷を与えることから、

細胞内運動の低下は酸化ストレスの指標となる可能性がある.

## 第 5 章 結論

本研究では、細胞損傷の新しい指標として細胞内小器官の運動性を提案し、細胞の損傷を定量評価することを実験目的とした。そして、細胞内運動を計測するために、光ゆらぎ解析法を開発した。光ゆらぎ解析によって、細胞全体の細胞内運動を統計的に解析することができた。また、光ゆらぎ解析によって検出した IR700 の光活性化による損傷時の細胞内運動の変化から、細胞の損傷度を定量的に評価することに成功した。

さらに、細胞内運動の低下が、なぜ IR700 の光活性化による細胞損傷によって引き起こされるのかを解明するために、光活性化後の細胞内小器官の損傷を評価した。その結果、IR700 の光活性化によって、まずリソソームが損傷を受け、続いて輸送分子であるキネシンやミトコンドリアが損傷を受けることを明らかとした。そして、これらの損傷が細胞内運動の低下を引き起こしたために、細胞の損傷度の指標として光ゆらぎ解析によって評価できたと考えた。本章では、これらの結果をまとめ、さらに本研究が導く結論と展望を示す。

### 5-1 光ゆらぎ解析による細胞内運動の定量評価

細胞の損傷度を計測するために、光ゆらぎ解析法を開発した。本節では、本手法の利点と問題点について述べ、そして改善点と展望について論じる。

光ゆらぎ解析法は、位相差顕微鏡動画のピクセルの強度変化から細胞内運動



を定量的に解析する方法である。本手法は、計測の時間分解能に制限がなく、計測に一般的な位相差顕微鏡を用いるため、汎用性が高い。また、細胞全体の細胞内運動を光ゆらぎ値によって統計的に解析することができるため、細胞内運動の変化を定量的かつ視覚的に評価することが可能である。Fig.3.5e の結果より、赤レーザーの照射時間を長くすると、より細胞内運動が低下することを明らかとした。これは、赤レーザーの照射時間が長くなることで、より細胞の損傷が増大しているためだと考えられる。赤レーザーの照射時間に依存した細胞の損傷度の変化を、EthD-1 を用いた細胞の核染色によって検出できるか検討した(Fig.3.6)。EthD-1 染色では、10 秒赤レーザーを照射したときのように、ネクロシスを起こした細胞を検出することができた。しかし、ネクロシスを起こしていない細胞はほとんど染色することができず、細胞の損傷度を細胞内運動のように感度良く検出することはできなかつた。また、光ゆらぎ解析では、Fig.3.4 で示したように、損傷前後で形状がほとんど変化していない細胞の損傷を、細胞内運動から検出可能であることも示された。これらの結果から、本光ゆらぎ解析は従来の蛍光染色法や細胞形状よりも、細胞の損傷度を感度良く検出することが可能であることを明らかとした。

本計測の注意点として、ベシクル由来の光ゆらぎ成分を位相差顕微鏡動画から抽出する必要がある。本手法は、1 粒子追跡によって細胞内運動を評価するのではなく、各ピクセルの光強度から解析する方法である。そのため、各ピクセルの光強度には、細胞自体の運動が含まれている。細胞自体の運動は、光強度ゆらぎのパワースペクトル密度解析によって検出が可能であった。そのため、光ゆらぎ値を解析するフレーム幅を調節することで、細胞自体の運動の光ゆらぎ成分を除去することが可能である。

また、ベシクルなどの粒子の淵にはハローとよばれる明るいくまどりが観察された。位相差顕微鏡観察の元画像の光ゆらぎ値にはハロー由来の成分も含まれているが、位相差顕微鏡動画をバンドパスフィルター処理することでその影響を低減することが可能であった。しかし、全てのベシクルのハローや、高さのある構造を観察したときに生じる強いハローを除去することはできなかった。さらにハローの影響を低減するためには、アポディゼーション位相差顕微鏡を使用するなど、光学系の改良が必要だと考えられる [Otaki, T 2000].

ハローを減少することができれば、500 nm 以下の細胞内小器官の運動をより鮮明に観察することが可能だと考えられる。そのため、より厳密な細胞内運動の解析が可能となり、さらにスフェロイドなどの高さがある細胞構造の解析にも使用することができるため、応用の幅が広がることが予想される。光ゆらぎ解析によって、多くの細胞種・細胞構造の損傷度を評価することができれば、細胞の基礎研究からがん治療において一般的に使用される手法となることが期待できる。

## 5-2 光ゆらぎ解析による損傷時の細胞内運動の評価

光ゆらぎ解析法を用いて、細胞の損傷度を計測した。本節では、本手法によって明らかとなった現象と不明点についてまとめ、さらなる研究によって明らかとすべき点について述べる。

細胞内運動の低下の原因として、IR700 の光活性化による複数の細胞内小器官の損傷を明らかとした。IR700 の光活性化は、まず、IR700 を内包しているリソソームを損傷させ、リソソーム内部から拡散した IR700 によって、周囲の輸送分子キネ

シン等に損傷を与えていることを示した。そして、輸送分子が損傷を受けたため、細胞内運動が低下したと考えた。しかし、4章の考察で論じたように、リソソーム損傷自体も様々な細胞内小器官へ損傷を与えると考えられる。カテプシン等のリソソーム内のタンパク質分解酵素による損傷を除けば、細胞質中に拡散した IR700 とリソソームの開裂による損傷は、どちらも主に活性酸素種による酸化ストレスによって細胞に損傷を与えると考えられる。そのため、細胞内運動の低下は、酸化ストレスの指標となる可能性がある。

より細胞内運動の低下の原因を特定するためには、IR700 の光活性化や過酸化水素など、細胞内小器官を非特異的に損傷する方法では難しい。そのため、特定の細胞小器官の機能を破綻、もしくは阻害することで、細胞内運動の低下の原因を探し出す必要がある。IR700 の光活性化はミトコンドリア損傷を誘導した。そこで、ミトコンドリアのみを選択的に破壊・阻害したときの細胞内運動を光ゆらぎ解析で評価することによって、ミトコンドリアが細胞内運動へ与える影響をより厳密に評価することができると考えられる。また、特定の細胞内小器官の運動を損傷・阻害したときの細胞内運動を網羅的に解析することができれば、あらゆる細胞損傷の指標となり得るため、基礎研究からがん治療の分野においても重要であると考えられる。

### 5-3 むすび

位相差顕微鏡を用いた細胞観察は、1950年代から Barer らによるアメーバ様細胞の観察から現代に至るまで、細胞を扱う分野では一般的に行われてきた [Barer, R 2954]。Barer らの論文の画像では、細胞内部のベシクル構造をはっきり観

察することができた。そのため、当時から細胞内部のベシクルなどの細胞内小器官の運動を観察していたと推察される。そして、細胞内部の運動に興味を持った科学者達によって、細胞内部で物質を輸送している輸送分子や、細胞骨格についての研究が行われ、近年までに細胞内動態の多くのことが明らかとされてきた。現代の細胞研究のほとんどが、細胞の特定の分子を蛍光染色することによって観察されている。位相差顕微鏡による細胞内分子運動の観察は、それらの研究の走りではあるが、核などの構造を除くと特異的に細胞小器官を観察することが困難である。そのため、位相差顕微鏡を用いて新しい現象を発見することが少なくなっている。しかし、蛍光観察における光毒性の問題から、がん治療や医療分野において、非侵襲かつ簡便な細胞観察方法として位相差顕微鏡の使用が再考されている。本研究で開発した光ゆらぎ解析のように、イメージプロセッシング技術と位相差顕微鏡観察を組み合わせることによって、細胞活性などの細胞の状態を表すパラメーターを定量的に解析し得る可能性がある。古きから新しきを知るという言葉があるように、本手法が既存の技術を組み合わせることで新しい細胞の指標を発見するための考え方の助けとなり、かつ細胞生物学、がん治療、再生医療といった広い研究分野において貢献されることを切に願う。

## 謝辞

本論文に関しては、東京大学大学院理学系研究科の、樋口秀男 教授のご指導の下、筆者が東京大学大学院理学系研究科在籍中に行った研究をまとめたものである。本研究を遂行するにあたり、一貫して直接の懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、樋口秀男教授に厚く御礼申し上げます。異なる研究分野の身であった私を研究室に受け入れてくださり、生物物理の考え方の御指導を頂きまして、大変感謝致しております。

また、東京大学大学院理学系研究科の、茅 元司 助教には、本研究への御指導のみならず、様々な研究の話を伺わせて頂き、さらに研究の視野を広げる貴重な機会を多くいただきました。研究以外でも、いろいろなお話をしていただき、研究が困難に直面したときにも、心強く研究を進めることができました。本当にありがとうございました。

東京大学大学院理学系研究科の、喜多 清 研究員には、樋口研究室には、細胞の蛍光染色やマウスの扱い方等、多くの実験手技を御指導頂き、御礼申し上げます。実験の議論に付き合っただけの結果、研究成果を残すことができましたこと、深く御礼申し上げます。

東京大学大学院理学系研究科の、西川 香里 技師には、DNA の増幅やウェスタンブロットティング等、分子生物学的手法を数多く教えていただきましたことに、感謝申し上げます。不慣れな私に丁寧に手技をお教えいただき、有益な御助言を頂いたことに、深く感謝を申し上げます。

東京大学大学院工学系研究科の、田端 和仁 講師には、マイクロチャンバーを用いた細胞の観察に関して、多くのアドバイスと条件検討をして頂きまして、感謝申し上げます。作製して頂いたデバイスによって、私の実験の幅を大きく広げることができましたこと、改めて感謝申し上げます。

東京大学大学院理学系研究科の、近藤 雄一 さんには、微小管やキネシンを用いたモティリティアッセイの実験で、大変お世話になりました。実験面以外でも、同大学出身者として、日々の研究室生活において大変心強く、励まされたことに感謝申し上げます。

また、樋口研究室の方々には、研究面及び研究室生活において、多々お世話になりました。研究室生活で、多くの恩恵を与えて頂きましたことに、心から感謝申し上げます。

## 参考文献

- Ayala A, Muñoz M F, Argüelles S 2014 Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 1–31
- Bao S, Wu Q, McLendon R E, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland A B, Dewhirst M W, Bigner D D and Rich J N 2006 Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response *Nature* **444** 756–60
- Barer R and Joseph S 1954 Refractometry of Living Cells: Part 1 Basic Principles *Q. J. Microsc. Sci.* **95** 399–423
- Baski D, Popovi S, Risti P, et al. 2006 Analysis of Cycloheximide-induced Apoptosis in Human Leukocytes: Fluorescence Microscopy Using Annexin V/Propidium Iodide versus Acridin Orange/Ethidium Bromide *Cell Biol Int.* **30** 924–932.
- Berridge M V and Tan A S 1993 Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction *Arch Biochem. Biophys.* **303** 474–82
- Cardoso C M P, Groth-Pedersen L, Høyer-Hansen M, Kirkegaard T, Corcelle E, Andersen J S, Jäättelä M and Nylandsted J 2009 Depletion of Kinesin 5B Affects Lysosomal Distribution and Stability and Induces Peri-nuclear Accumulation of Autophagosomes in Cancer Cells *PLoS One* **4** 1–11

- Coleman M L, Sahai E a, Yeo M, Bosch M, Dewar A and Olson M F 2001 Membrane Blebbing during Apoptosis Results from Caspase-mediated Activation of ROCK I *Nature cell biology* **3** 339–45
- Dahan P, Gala J M, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, Lubrano V and Toulas C 2014 Ionizing Radiations Sustain Glioblastoma Cell Dedifferentiation to a Stem-like Phenotype through Survivin : Possible Involvement in Radioresistance *Cell Death Dis.* **5** e1543-15
- Daleke D L 2003 Regulation of Transbilayer Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry *J Lipid Res.* **44** 233–242
- Drozd E, Krzysztoń-Russjan J, Marczewska J, Drozd J, Bubko I, Bielak M, Lubelska K, Wiktorska K, Chilmonczyk Z, Anuszevska E and Gruber-Bzura B 2016 Up-regulation of Glutathione-related Genes, Enzyme Activities and Transport Proteins in Human Cervical Cancer Cells treated with Doxorubicin *Biomed. Pharmacother.* **83** 397–406
- Dunster K, Toh B H and Sentry J W 2002 Early Endosomes, Late Endosomes, and Lysosomes Display Distinct Partitioning Strategies of Inheritance with Similarities to Golgi-derived Membranes *Eur. J. Cell Biol.* **81** 117–24
- Gardiner C, Shaw M, Hole P, Smith J, Tannetta D, Redman C W and Sargent I L 2014 Measurement of Refractive Index by Nanoparticle Tracking Analysis Reveals Heterogeneity in Extracellular Vesicles *J. Extracell. vesicles* **3** 253-61
- Gardner S J, White N, Albon J, Knupp C, Kamma-Lorger C S and Meek K M 2015 Measuring the Refractive Index of Bovine Corneal Stromal Cells Using Quantitative Phase Imaging *Biophys. J.* **109** 1592–9



- Huotari J and Helenius A 2011 Endosome Maturation *EMBO J.* **30** 3481–500
- Joerger A C, Fersht A R, Perry M E, Grochola L F, Zeron-medina J, Lane D, Levine A and Lu X 2010 p53-based Cancer Therapy *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2** 1–24
- Kishimoto S, Bernardo M, Saito K, Koyasu S, Mitchell J B, Choyke P L and Krishna M C 2015 Evaluation of Oxygen Dependence on in vitro and in vivo Cytotoxicity of Photoimmunotherapy Using IR700-antibody Conjugates *Free Radic. Biol. Med.* **85** 24–32
- Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum L T, Choyke P L and Kobayashi H 2011 Cancer Cell-selective in vivo Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting Specific Membrane Molecules *Nat. Med.* **17** 1685–91
- Nakajima T, Sano K, Mitsunaga M, Choyke P L and Kobayashi H 2012 Real-time Monitoring of in vivo Acute Necrotic Cancer Cell Death Induced by Near Infrared Photoimmunotherapy Using Fluorescence Lifetime Imaging *Cancer Res.* **72** 4622–8
- Nieman M T, Prudoff R S, Johnson K R and Wheelock M J 1999 N-cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of Their E-cadherin Expression *J. Cell Biol.* **147** 631–43
- Osswald M *et al.* 2015 Brain Tumour Cells Interconnect to a Functional and Resistant Network *Nature* **528** 93–8
- Otaki T 2000 Artifact Halo Reduction in Phase Contrast Microscopy Using Apodization *Opt. Rev.* **7** 119–22
- Punt C J A, *et al.* 2013 Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view *BMC Biol.* **11** 71
- Repnik U, Stoka V, Turk V and Turk B 2012 Lysosomes and Lysosomal Cathepsins in Cell

Death *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824** 22-33

- Sakuma M, Kita S and Higuchi H 2016 Quantitative Evaluation of Malignant Gliomas Damage Induced by Photoactivation of IR700 dye *Sci. Technol. Adv. Mater.* **17** 473-482
- Saraste A and Pulkki K 2000 Morphologic and Biochemical Hallmarks of Apoptosis *Cardiovasc. Res.* **45** 528–37
- Sato K, Sato N, Xu B, Nakamura Y, Nagaya T, Choyke P L, Hasegawa Y and Kobayashi H 2016 Spatially Selective Depletion of Tumor-associated Regulatory T Cells with Near-infrared Photoimmunotherapy *Sci. Transl. Med.* **8** 352ra110–352ra110
- Sevanian A, Mvakkassah Kelly S F, Mon- testruque S 1983 Cholesterol Autoxidation in Phospholipid Membrane Bilayers *Arch. Biochem. Biophys.* **223**, 441-452
- Tabassum D P and Polyak K 2015 Tumorigenesis: It Takes a Village *Nature Reviews Cancer* **15** 473–83
- Tait S W and Green D R 2008 Mitochondria and Cell Death: Outer Membrane Permeabilization and Beyond *Nat Rev Mol Cell Biol* **11** 621–32
- Tan S C, Scherer J and Vallee R B 2011 Recruitment of Dynein to Late Endosomes and Lysosomes through Light Intermediate Chains. *Mol. Biol. Cell* **22** 467–77
- Toulany M, Dittmann K, Krüger M, Baumann M and Rodemann H P 2005 Radioresistance of K-Ras Mutated Human Tumor Cells is Mediated through EGFR-dependent Activation of PI3K-AKT Pathway *Radiother. Oncol.* **76** 143–50
- Voeltz G K, Rolls M M and Rapoport T A 2002 Structural Organization of the Endoplasmic Reticulum *EMBO Rep.* **3** 944–50
- Wilson C Y and Tolias P 2016 Recent Advances in Cancer Drug Discovery Targeting RAS

*Drug Discovery Today* **00** 10–4