

論文の内容の要旨

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)

氏名 佐久間 守仁

細胞に損傷を長期に与えると、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、損傷に合わせて次第に細胞の生きるための活性が徐々に低下していると考えられる。細胞の損傷度は、時々刻々、連続的に変化する。そのため、細胞の活性や死に至る過程をより詳しく理解するためには、損傷度を連続量として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かつ連続量として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。

本論文は、以下の5章より構成される。

第1章では、細胞の損傷度を連続量として計測することの意義を述べ、従来の細胞損傷計測技術の説明と問題点について論じた。これらを踏まえて、本研究では細胞内運動から細胞の損傷を評価する位相差顕微鏡観察法を提案し、本手法を用いた研究の目的と意義について述べた。

第2章では、本実験で使用した細胞の培養方法や、顕微鏡の説明、各種顕微鏡観察のための蛍光染色の条件など、材料や方法について述べた。また、本研究では、赤色光照射によって光活性化する赤色蛍光色素 IR700 を用いて、

がん細胞に損傷を与えた。IR700 は光活性化によって、主に活性酸素を発生することで細胞に損傷を与える。IR700 を細胞内部に取り込ませるために、細胞膜タンパク質の抗体に結合させた IR700-抗体複合体を作製した。この複合体の作製方法について、IR700 を細胞損傷の誘導のために使用した意義とともに本章で述べた。

さらに、細胞内運動を定量的に評価するために、光揺らぎ解析を開発した。光揺らぎ解析は、位相差顕微鏡動画の各ピクセルの光強度揺らぎを定量的に解析する手法である。光揺らぎ解析を用いることで、細胞全体の細胞内運動を統計的に解析することが可能であった。また、位相差顕微鏡動画にバンドパスフィルター処理を施すことで、ハロゲン光源の揺らぎ等を低減することができた。本手法は、位相差顕微鏡動画の撮影速度等に大きく依存するため、これらの影響を評価した。

第3章では、IR700 を細胞に取り込ませ、光照射によって引き起こされるさまざまな現象をとらえた実験結果を述べた。まず、位相差顕微鏡像の光揺らぎ測定によって得られた細胞内運動度が細胞の損傷度を連続量として計測することが可能であるか検討した。IR700 の光活性化による細胞の損傷度を計測するために、IR700 の添加量や、赤色レーザーの照射時間を制御することで、細胞に与える損傷度を調節した。そして、光揺らぎ解析によって、異なる損傷度を与えた細胞の細胞内運動を計測すると、損傷度に依存して細胞内運動が低下する様子を観察することができた。さらに、死なない程度の損傷を与えた細胞の細胞内運動を長期観察するために、マイクロチャンバーを用いて単一細胞の長期観察を行った。その結果、細胞内運動が回復する細胞や、徐々に低下する細胞が観察された。次に、細胞内運動の低下が、細胞損傷を連続量として計測するための指標であることを示すために、IR700 の光活性化が細胞内運動を低下させるメカニズムの解明を行った。IR700 を含むベシクル（リソソーム）が損傷を受けると、細胞質中へ IR700 分子を拡散することが観察された。そして、細胞内の輸送分子であるキネシンに損傷が与えられることを明らかとした。

第4章では、実験方法や実験結果の考察を行った。光揺らぎ解析は、撮影速度や、光揺らぎ値の計算幅に影響を受けた。そのため、ベシクルやミトコンドリアなどの細胞内小器官の運動のシグナルを取得するための最適なパラメータを選択する必要があることを論じた。また、位相差顕微鏡観察の原理について述べ、本研究結果と参照することで、本手法が解析している細胞内運動

が、どの細胞内小器官の運動を反映しているのかについて論じた。

新規治療法である IR700 の損傷誘導のメカニズムについて考察した。IR700 は活性酸素もしくは熱によって細胞に損傷を与えるといわれているが、そのメカニズムは不明点が多かった。本研究では、輸送分子キネシンへの IR700 の活性化を観察し、酸素の除去剤を添加するとキネシンへの損傷が阻害された。そのため、IR700 は熱ではなく、活性酸素を発生することで細胞に損傷を与えていると考えられる。

さらに、細胞内ベシクルの一つであるリソソームの蛍光観察結果から、IR700 の光活性化によってリソソームは損傷を受けていることがわかった。そして、細胞質に拡散した IR700 も観察された。そのため、細胞質中に拡散した IR700 が細胞内小器官に損傷を与えることによって、細胞内運動が低下したと考えられる。IR700 の光活性化によって輸送分子であるキネシンへの損傷が観察されたことから、IR700 の光活性化によって輸送分子が損傷を受け、分子運動が低下したと考えられる。また、過酸化水素による酸化ストレスを与えたときにも、IR700 の光活性化による損傷と同様に細胞内運動の低下が観察されたことから、細胞内運動の低下は酸化ストレスの指標となる可能性について考察した。

最後に、細胞内運動の低下と細胞死の相関性について論じた。本研究では、細胞の損傷度を連続量として計測することで、損傷度が回復する細胞、次第に損傷度が増していく細胞、大きな損傷を受けた細胞を判別することができた。それぞれの損傷度の連続的な変化と、損傷による細胞機能の低下との関連について考察した。

第 5 章では、本研究についての結論と展望を示した。まず、光揺らぎ解析方法のさらなる改善と展望について論じた。そして、光揺らぎ解析により細胞の損傷度を定量評価することへの利点や問題点を挙げ、これらを踏まえ、細胞の損傷度を連続量として計測する一般的な方法としての波及効果が期待できることを論じた。

本研究では、損傷による細胞内運動の低下から、細胞の損傷度を連続量として計測することができた。さらに、細胞の損傷によって細胞内運動が低下するメカニズムを評価した。その結果、損傷による細胞内輸送系やミトコンドリアなどの細胞小器官の損傷を明らかとした。本手法は、非侵襲かつ長期間細胞損傷を定量的に評価することが可能であるため、細胞損傷を計測する一般的な手法として、基礎研究からがん治療の分野における貢献が期待できる。