

論文審査の結果の要旨

氏名 佐久間 守仁

がん細胞は損傷をくぐりぬけ存続すると、損傷抵抗機能を獲得し増殖するため、さらに治療が困難となることが知られている。損傷抵抗機能を獲得したがん細胞の発生を防ぐためには、がん細胞の損傷度を計測することで、薬剤がどの程度がん細胞に損傷を与えることができるのかを評価する必要がある。また、細胞の損傷度は、時間の経過に伴い、損傷の回復や進行によって変化する。そのため、長期間かつ単一細胞レベルで細胞の損傷度を評価する計測手法が必要である。

蛍光顕微鏡を用いた細胞の損傷度の評価は、蛍光色素が褪色するため、長期間細胞の損傷度を評価することが難しい。そこで、本研究では、位相差顕微鏡観察に着目し、細胞内運動を計測する光ゆらぎ法と組み合わせることで、長期間非侵襲でがん細胞の損傷を評価する新しい方法を開発した。

光ゆらぎ法は、位相差顕微鏡動画の各ピクセルの光強度と光ゆらぎから光ゆらぎ値を算出し、細胞内運動を解析する手法であり、細胞核周辺の細胞内小器官の密集部位など、1粒子追跡による運動解析が難しい部位を含めて、細胞全体の運動を統計的に解析することを可能とした。位相差顕微鏡は、ハロゲン光源を用いて観察を行うため、観察による細胞への光毒性はほとんどないと考えられる。さらに、蛍光顕微鏡観察のように蛍光染色を行わず、無染色で計測を行うため、褪色の問題も生じない。そのため、光ゆらぎ法では、細胞の損傷を、長期間非侵襲で計測できるという利点がある。

本研究では、がん細胞に損傷を与えて、損傷時の細胞小器官の運動を、光ゆらぎ法によって評価した。がん細胞に損傷を与えるために、近赤外蛍光色素で

ある IR700 を使用した。IR700 は、赤レーザーを照射することによって光活性化し、主に活性酸素を介した酸化ストレスにより細胞に損傷を与える。IR700 を細胞膜タンパク質の抗体に結合させて、がん細胞に添加することで、細胞内部に特異的に導入した。IR700 の添加量と赤レーザー照射時間を変化させることによって、細胞に与える損傷の度合いを制御し、そのときの細胞内運動への影響を光ゆらぎ法によって評価した。

赤レーザー照射前後で、細胞内運動を光ゆらぎ法によって計測すると、赤レーザー照射後に細胞内運動が低下することがわかった。細胞内運動の低下は、赤レーザー照射後 1 分以内に起こっており、損傷による細胞形状の変化よりも早い段階で検出された。また、赤レーザー照射時間を長くすると、より細胞内運動が低下していくことを光ゆらぎ法によって評価することができた。赤レーザー照射時間を十分長くして、細胞にネクローシスを誘導したときに、特に大きく細胞内運動が低下した。そのため、細胞内運動の低下は細胞の損傷度と相関があることがわかった。さらに、蛍光顕微鏡を用いた従来の細胞損傷の評価方法と比較しても、光ゆらぎ法はより感度良く細胞の損傷を評価することが可能であった。

本研究では次に、損傷による細胞内運動の低下のメカニズムを明らかにするために、IR700 の光活性化が細胞内小器官に与える影響を評価した。IR700 は、細胞内に取り込まれて、細胞核の周辺に多く分布していた。細胞核周辺には、細胞内の不要なタンパク質を分解するリソソーム等の細胞小器官が分布していることが明らかとされている。そこで、リソソームと IR700 の細胞内での分布を、蛍光顕微鏡観察によって評価したところ、多くが一致していた。そのため、細胞に取り込まれた IR700 は、リソソームに輸送されていることがわかった。さらに、IR700 の光活性化時の、リソソームのリアルタイム観察によって、リソソームが破壊されていることがわかった。IR700 の輝点のリアルタイム観察では、

IR700 が細胞質中に拡散していく様子が観察されたことから、IR700 はリソソームを破壊し、細胞質中へ拡散していると考えられる。

細胞質中に拡散した IR700 によって、周囲の細胞内小器官が損傷を受け、それが細胞内運動の低下を引き起こしている可能性が考えられた。細胞内運動は、輸送関連分子であるキネシンや微小管等によって行われている。そこで、IR700 の光活性化がキネシンや微小管に与える影響を評価した。その結果、IR700 の光活性化によって、キネシンと微小管の両方が損傷を受けることがわかった。これより、IR700 の光活性化によって輸送分子が損傷を受けることが、細胞内運動が低下していることの一因であることが示唆された。

以上のように、本研究では、光ゆらぎ法によって、細胞内運動を感度良く、かつ非侵襲で計測することに成功した。また、損傷によって、細胞内の輸送分子が損傷を受けるため、細胞内運動が低下することを明らかとした。本手法は、細胞観察に一般的に使用されている位相差顕微鏡を用いて解析を行うため、基礎研究や医療現場において、広く使用される方法となることが期待できる。また、長期間の観察も可能であることから、損傷を受けた細胞の機能の変化を解明するための重要なツールとして、大きな貢献をなすと期待される。

この論文は、喜多清氏、近藤雄一氏、樋口秀男教授との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったもので、提出者の寄与が十分であると認められる。従って審査員一同は同提出者に博士（理学）の学位を授与出来ると判断する。