

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 マウス白血病細胞の長期 1 細胞計測の確立と抗がん剤応答への応用

( Establishment of long-term single-cell measurement for mouse lymphocytic leukemia cells and its application to anti-cancer drug response )

氏名 清田 晃央

一般に、同一遺伝型の細胞集団内においても、細胞間の遺伝子の発現量、成長の速さや細胞の大きさといった細胞表現型は揺らいでいる。表現型の揺らぎは様々な生命現象に関係していると考えられている。例えば、同一遺伝型の幹細胞集団の分化誘導では、分化誘導しにくい細胞が存在することや、同じ分化誘導シグナルに対して分化方向が違う細胞が含まれることが知られている。また、バクテリア種の抗生物質に対する応答やがん細胞の抗がん剤に対する応答では、同一遺伝型であっても不均一な応答を示すことが知られている。これら同一遺伝型をもつ細胞間での不均一な応答は、細胞表現型の揺らぎが引き起こすと考えられている。また、進化においても表現型の揺らぎが進化速度を加速させるという研究も報告されている。従って、細胞表現型の揺らぎが生命現象に与える役割を明らかにすることは重要であると考えられる。しかし、従来多用されてきた細胞集団を対象とした計測手法を用いて表現型の揺らぎの役割を明らかにすることは難しい。例えば、細胞のタンパク質量を定量する伝統的な Western blotting では、細胞間の揺らぎは平均化されてしまい、揺らぎ

に関する情報は失われてしまう。Flow cytometer による計測では、平均値まわりの揺らぎの情報を得ることができる。しかし、ある一時点での情報となるため、環境変動に対し、表現型分布が 1 細胞レベルのどのような状態変化に基づいて、変動後の定常分布に集団として落ち着いたのかについては Flow cytometer では答えを得ることが出来ない。同一遺伝型の細胞集団の表現型分布がどのように形成されるかについて調べるためには、集団の表現型分布と同時に、1 細胞レベルの表現型を時系列に沿って計測する必要がある。このような細胞計測を実現する手法として、「1 細胞計測」と呼ばれる方法が注目されている。バクテリア種では、マイクロ流体デバイスを用いることにより、安定環境下で長期世代にわたる 1 細胞計測が実現している。これにより、バクテリア種での成長の安定性や、成長に関する非自明な法則性が明らかになっている。また、抗生物質や環境変動に対する応答が計測され、細胞表現型の揺らぎが適応現象に与える影響が明らかになっている。しかし、バクテリア種で実現しているような長期世代にわたる 1 細胞計測は、動物細胞においては行われていない。そこで、本研究では、マウス白血病のモデル細胞である L1210 細胞の長期 1 細胞計測系の構築と抗がん剤応答への応用を目的として研究を行った。

まず、本研究で計測するがん細胞の選定を行った。バクテリア種で行なわれている 1 細胞計測の先行研究を参考に、細胞間での接着が起こらず細胞排出がしやすい細胞としてマウス白血病モデル細胞の L1210 細胞を計測する細胞に選定した。また、1 細胞レベルでの追従をやすくするため、核移行シグナルを利用し Venus による細胞核の標識を行った。

次に、L1210 細胞において長期 1 細胞計測を実現するため、マイクロ流体デバイスの開発及び、マイクロ流体デバイスでがん細胞を観察するための環境条件についての検討を行った。マイクロ流体デバイスの開発は、バクテリア種での長期 1 細胞計測を実現した Mother Machine と呼ばれるマイクロ流体デバイスを基に行った (Figure 1)。また、開発したデバイス内で細胞が生育できる培地の交換効率や pH の条件が構築されているか、蛍光物質である Fluorescein を用いて検討を行った。その結果、顕微鏡用卓上 CO<sub>2</sub> インキュベータと組み合わせることにより、25 分程で完全に培地が交換され、なおかつ培地の pH が 7.56 という細胞培養にとって適した条件が構築できることが明らかになった。

次に、開発したマイクロ流体デバイス及び構築した環境下で、L1210 細胞が安定的に成長できるかを検証するため、実際に 1 細胞計測を行った。その結果、最大 20 世代にわたる 1 細胞系列の追尾計測が実現できた (Figure 2)。マイクロ流体デバイ

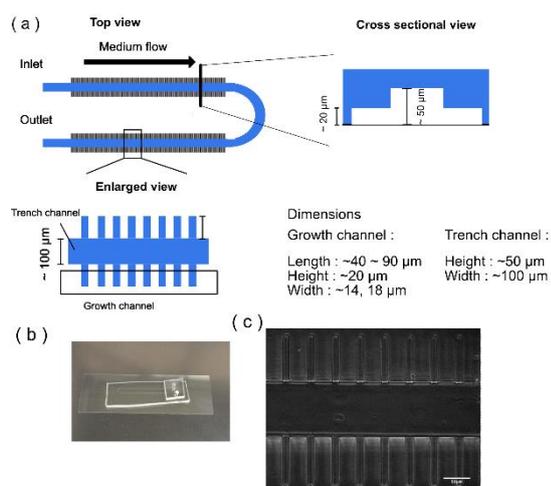


Figure 1 開発したデバイス。(a) デバイスの概略図 (b) デバイスの外観図 (c) デバイスの内部構造

ス内では安定的に平均して  $10.40 \pm 0.04$  hrs をかけて分裂し、また分裂確率及び死亡確率が一定となることを確認した (Figure 3、Figure 4)。デバイス内での平均の世代時間は集団培養下での倍加時間と比べてもほとんど変わらなかった。世代を経ても世代時間が長くなることはなく、デバイス内で安定に成長することが明らかになった。また、計測された世代時間分布を Alpha plot で評価し、世代時間が集団平均の2倍以上長くなる Sub population が存在することが分かった (Figure 5)。また、世代時間に関して細胞系列に沿った解析を行った。計測の終わりまでに死亡する死細胞系列では、死の直前で世代時間が長くなる傾向があることが分かった。また、観察された多数の細胞系列の中には、世代時間が集団分布に従ってランダムに決まっているという仮定のもとでは想定できない、平均世代時間が長い系列が存在した。また、世代時間は世代間に正の相関 (Spearman  $r = 0.6114$ ,  $p < 10^{-10}$ ) があり、L1210 細胞の世代時間は、世代をまたいで引き継がれる細胞内の何らかのメモリの影響を受けている可能性が示唆された (Figure 6)。また、ダイナミクスの自由度を解析する相関次元解析を行った結果、世代時間は高次元または、確率的なダイナミクスとして記述できることが示された (Figure 7)。

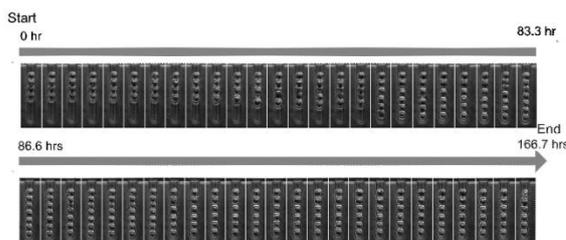


Figure 2 L1210 約170時間にわたる L1210 細胞のタイムラプス観察。細胞はデバイス内部で分裂を繰り返す様子が観察された

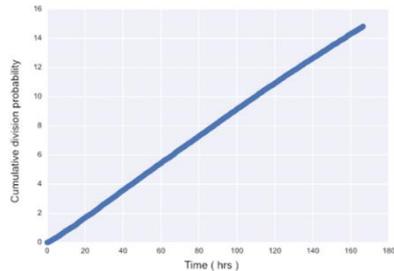


Figure 3 分裂確率の積算と時間の関係。

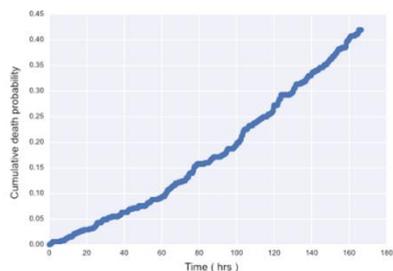


Figure 4 死亡確率の積算と時間の関係。

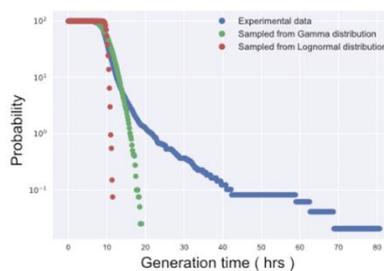


Figure 5 計測された世代時間分布と確率分布からサンプリングされた世代時間の Alpha plot。

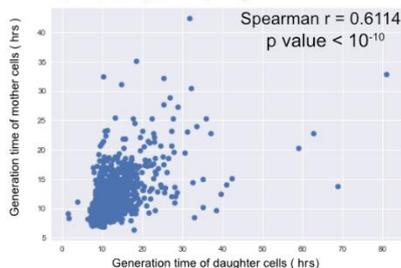


Figure 6 世代間の世代時間の相関 (n = 5493)。

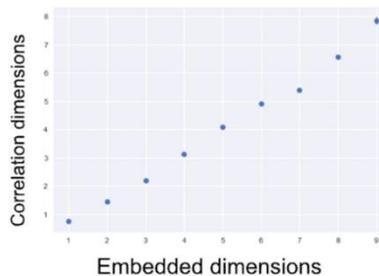


Figure 7 世代時間の埋め込み次元と相関次元の関係。

最後に、今回確立した1細胞計測系が抗がん剤応答へ応用できるか検証した。はじめ、通常の培地を4日間灌流して培養し、その後、抗がん剤である Mitomycin-C を添加した培地を灌流することで、抗がん剤への応答を1細胞レベルで計測した。この計測で得られた結果より、培地を切り替えた後、分裂確率が抑制され、死亡確率が上昇することが明らかになった ( Figure 8 、 Figure 9 )。これより、この1細胞計測系は抗がん剤応答の計測に応用できると結論した。薬剤投与後の、分裂確率が抑制されるまでの時間  $\lambda_{\text{Division}}$  と死亡確率が増加するまでの時間  $\lambda_{\text{Death}}$  は、 $\lambda_{\text{Division}}$  の方が短く、薬剤濃度を高くすると、その差が広がることも示唆された ( Figure 10 )。次に系列に関する結果を用いて、Mitomycin-C を投与する2日前の成長状態と投与後の細胞運命について調べ、細胞の成長状態の履歴がどのような影響を及ぼすか調べた。薬剤投与後の直後では、薬剤投与2日前の分裂頻度が低い細胞は、死亡確率が高い傾向が見られた。一方で、投与日数を経るごとに、分裂頻度が多い細胞の方が多く死んでいき、最終的には分裂頻度が低い細胞の生存確率が高くなることが示された ( Figure 11 )。先行研究において、抗がん剤投与前から抗がん剤の耐性に関連する遺伝子の発現が高い細胞が抗がん剤環境下で適応することが報告されている。今回明らかになった、抗がん剤投与前の成長状態による薬剤環境下での細胞運命の違いも、先行研究で報告されたように耐性に関連する遺伝子の発現状態が関わっている可能性がある。今後、耐性をもたらす遺伝子を明らかにし、その発現状態と細胞の成長状態を1細胞計測する必要がある。

本研究では、浮遊細胞であるマウス白血病モデル細胞の L1210 細胞の長期1細胞計測系を確立できた。しかし、抗がん剤研究では接着細胞においても多く行われている。従って、より多くの抗がん剤研究へ1細胞計測を応用するためには、接着細胞を対象とした1細胞計測系も確立する必要があると考えられる。

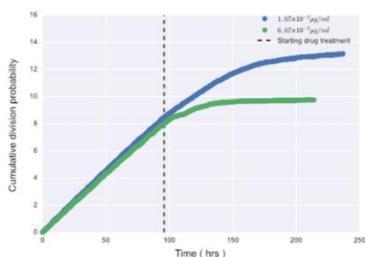


Figure 8 分裂確率の積算と時間の関係.

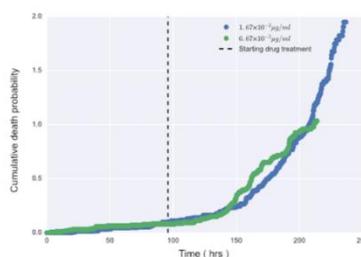


Figure 9 死亡確率の積算と時間の関係.

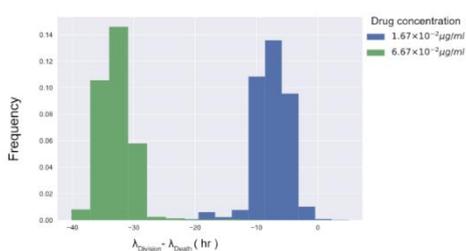


Figure 10  $\lambda_{\text{Division}} - \lambda_{\text{Death}}$  の予測分布からサンプリングされた  $\lambda_{\text{Division}} - \lambda_{\text{Death}}$  の分布.

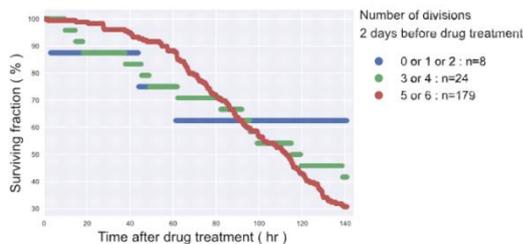


Figure 11 Mitomycin-C ( $1.67 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{m}$ ) の投与2日前の成長状態 (分裂回数) と薬剤投与後からの生存細胞数の時間推移.