

清田晃央氏の博士論文「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)」は、白血球系がん細胞 L1210 の長期 1 細胞計測を実現するマイクロ流体デバイスの開発と、それを用いた定常環境下での成長揺らぎ、および抗がん剤応答の 1 細胞レベルでの不均一性に関する研究結果を報告するものである。

大腸菌や分裂酵母などの単細胞微生物を対象とした長期 1 細胞計測は既に実現されており、これらの細胞種における成長法則やストレス応答の 1 細胞レベルでのダイナミクスの詳細が明らかになっている。しかし、実験者によって細胞周囲の環境を安定に制御し、さらに増殖によって増えた細胞を適切に排除しながら、数十世代にわたって 1 細胞長期計測を行うことは、動物細胞を対象としては実現していない。また、このような計測技術がないことから、細胞成長状態の履歴依存性や成長法則、ストレス応答の不均一性の詳細を細胞系列上の状態変化を直接計測することによって明らかにすることも実現していない。本論文は、これらの問題の解決を目指したものである。

本論文は 6 章、全 80 ページからなる。まず、第 1 章では、上記の研究背景として、長期 1 細胞計測の重要性、および過去の関連研究について説明がなされるとともに、上記の全体の研究目的が述べられている。

第 2 章では、動物細胞の長期 1 細胞計測に適した細胞種の選定について述べられている。安定な増殖可能条件での長期 1 細胞計測を実現するには、一部の細胞が適切に観察系から排除される必要があり、非接着性細胞である L1210 細胞を計測対象とすることの実験上の有利性が説明されている。また、細胞形状の不定性に起因する細胞識別の困難を解決するため、核移行シグナルを付与した蛍光タンパク質を用いて細胞核を蛍光標識した L1210 の安定発現株の構築についても述べられている。

第 3 章では、L1210 細胞の長期 1 細胞計測を実現するマイクロ流体デバイスの構築について述べられている。これまで単細胞微生物の長期 1 細胞計測で多用されている **Mother machine** と呼ばれるデバイスを参考にした L1210 細胞の計測に適したデバイスの設計、および細胞観察のためのマイクロチャンネルの形状についての条件検討の結果について述べられている。また、二酸化炭素濃度依存的に pH が変化する培養液をデバイス内に流した際、細胞の増殖にとって適切な pH 条件が実現する送液レートについても検討がなされている。結果として、L1210 細胞の長期計測の実現に適切なデバイス形状および送液条件を決定している。

第 4 章では、第 3 章によって確立されたマイクロ流体デバイス、および送液条件を利用し

て、実際に L1210 細胞の計測を行い、1 週間（約 20 世代）以上にわたる長期計測を実現したことが述べられている。分裂率、および低頻度で発生する突然死の発生率が計測の期間中ほぼ一定に保たれることから、定常的な成長条件がマイクロ流体デバイス内で実現していることが示されている。また、各細胞の世代時間のばらつきに関する統計的な解析の結果についても述べられている。世代時間の分布は非常に裾の長い非対称な分布になっていること、さらに世代時間の世代間相関が 0.6 程度の正相関をもつことが示され、1 細胞レベルの世代時間が世代をまたいだ遺伝性を持つことが明らかにされている。さらに、L1210 細胞の世代時間の変動が少数パラメーターの決定論的ダイナミクスによって支配されているとする先行研究の見解を検証するため、得られた世代時間のデータに対し相関次元解析を行っている。その結果、観察されたダイナミクスは高次元の決定論的ダイナミクス、もしくは確率的なダイナミクスであることが示され、従来仮説を覆す解析結果を示している。

第 5 章では、抗がん剤 Mitomycin-C 投与に対する L1210 細胞の 1 細胞レベルの応答の解析について述べられている。第 3 章で構築されたマイクロ流体デバイスを用いた計測により、抗がん剤投与に反応して、L1210 細胞の分裂率の低下、死亡率の増加が確認され、このデバイスを用いて抗がん剤応答の計測が可能であることが示されている。さらに、抗がん剤投与によって分裂率の低下が起こるまでに要する時間に比べ、死亡率の増加が起きるまでに要する時間は長く、その差が、抗がん剤濃度が高いほど大きくなることが示されている。さらに、抗がん剤投与前の成長状態と、投与後の生存率の関係を調べることで、投与前に分裂頻度が低かった細胞系列は、長期間生き残ることが明らかにされている。この結果は、抗がん剤投与前の各細胞系列の成長状態の差が、抗がん剤投与に対する生存率に影響を与えることを示す結果である。

第 6 章では、以上の内容をまとめるとともに、全体の考察および将来展望が述べられている。

以上、清田晃央氏の論文は、動物細胞の長期 1 細胞計測を実現する新たな計測技術を確立するとともに、それを用いた計測により L1210 細胞の成長揺らぎ、および抗がん剤応答に関する重要な新知見を提供することに成功している。これらの結果は、L1210 細胞の成長揺らぎに関する新しい法則の発見、細胞表現型の長期メモリの役割、さらには様々な抗がん剤投与に対する応答特性の解明に向けた重要な第一歩を記していると考えられる。本研究は、若本祐一、および中岡秀憲氏との共同研究であるが、本論文で述べられている内容は、論文提出者が全て主体となって行ったものであり、その寄与は十分であると考えられる。

よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。