

博士論文（要約）

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)

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、細胞の大きさといった細胞表現型は揺らいでいる¹⁻⁶。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、同一遺伝型を持つ幹細胞集団の中であっても、分化誘導しにくい細胞が存在することや、同じ分化誘導条件を課しても分化先の細胞運命が違うということが知られている⁷。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生死応答を生じることが知られている⁸⁻¹¹。これら同一遺伝型の細胞間に見られる環境変化に対する不均一な応答は、細胞表現型の揺らぎが引き起こすと考えられている¹²⁻¹⁸。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^{19,20}。したがって、細胞表現型の揺らぎが様々な生命現象で果たす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、従来生物実験でよく利用されてきた細胞集団の平均的性質を調べる計測手法では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、多数の細胞集団をすりつぶし、その中に含まれているタンパク質を検出する。この方法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。一方、平均値まわりの揺らぎの情報を得る計測として、Flow cytometer による計測がある^{21,22}。Flow cytometer は細胞一つ一つにレーザー光を当て、その散乱光や蛍光から、細胞サイズの分布や、蛍光分布の情報を高速に得ることができる装置である。しかし、Flow cytometer で得られる情報は、或る一時点の集団内分布の情報のみとなる。そのため、環境変動に対し、どのような表現型にあった細胞が、どのように1細胞レベルで状態変化を変化させ、環境変動後の新たな分布を構成するに至ったかについては、Flow cytometer では答えを得ることができない。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²³⁻⁴⁵。1細胞計測は、集団中の細胞一つ一つの状態変化を計測できるので、Flow cytometer で得られる分布の情報に加えて、Flow cytometer では得ることができない、分裂間隔時間分布や、成長速度分布、集団内の細胞齢（＝直前の分裂からの経過時間）、遺伝子発現量の自己相関等の1細胞レベルの状態の時間変化に関する統計量を計測することができる⁴⁶。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⁴⁷⁻⁵⁰。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^{12,14}。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しやすいするため、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。L1210 細胞の長期 1 細胞計測を実現するため、大腸菌や分裂酵母の長期 1 細胞計測を実現した Mother Machine を基にマイクロ流体デバイスを作製した⁵⁰。また、Growth channel の長さを $\sim 90\ \mu\text{m}$ 、幅を $\sim 14\ \mu\text{m}$ にすることにより、安定的に1細胞計測ができることが示された。Fluorescein の蛍光強度と pH の関係を利用して、デバイス内を流れる RPMI-1640 培地の pH を計測した。その結果、シリンジポンプの送液レートを変えても pH は大きく変化しないものの、送液レートが 2 ml/hrs 以上になるとがん細胞の至適 pH の上限である 7.6 を超える可能性が明らかになった。したがって、送液レートは 2 ml/hrs 以下に抑えることが望ましい。また、送液レートが 1 ml/hrs のときの培地の交換効率を Fluorescein が洗い流される時間スケールから調べた結果、25 分程度でデバイス内の培地が完全に入れ替わることが明らかになった。至適環境下での L1210 細胞の倍加時間が約 10 時間であり、この培地交換に要する時間は倍加時間のわずか 5 % に相当する。また、通常のフラスコでの培養では、培地の交換は 2 日に一回の頻度であり、その頻度でも安定した培養環境が保たれている。これらより、培地の交換が 25 分程度で実現し、また 5 % CO₂ 濃度の環境中にデバイスを置くことで RPMI-1640 培地を用いても pH が 7.6 以下になることは、デバイス中の環境が L1210 細胞の成長に適した条件を満たしていると考えた。この環境条件を用いて、次項以降の L1210 細胞の 1 細胞計測を行った。

次に、前項において開発したマイクロ流体デバイス及び定めた送液条件のもと、L1210 細胞がデバイス内で安定成長し、長期に渡る1細胞計測が可能かどうか検証した。約1週間に渡り、L1210 細胞の1細胞計測を行った。その結果、最大20世代に渡って 1 細胞レベルでの増殖の様子を計測できた (Figure 1)。タイムラプス画像から、Growth channel 内でL1210 細胞が分裂を繰り返す様子を確認することができた。また、それぞれの Growth channel の L1210 細胞系列の各世代の平均世代時間を調べたところ、世代を経るごとに世代時間が長くなるという現象は見られなかった。一方で、世代が13以上となると世代時間が短くなることも確認された。ほとんどの細胞系列では、1週間の計測期間のあいだに13世代まで到達することができるが、それを超える細胞系列は世代を経るごとに少なくなっている。このことは、世代時間が集団の平均より短い細胞系列が存在していることを示唆する。また、

世代時間、分裂イベントの時刻、死亡イベントの時刻を調べ、解析を行った。平均の世代時間は 10.40 ± 0.04 (S. E.) hrs となった。この値は、野生株を集団でフラスコを用いて CO_2 インキュベーター内で培養した時の倍加時間 (10.90 hrs) とほぼ同程度であった。また、分裂イベントの発生確率及び死亡イベントの発生確率の積算を、計測時間に対してプロットしたところ、時間に対して線形に増加していることがわかった。このことは、分裂イベント、死亡イベントが計測時間によらず一定の確率で発生していることを示している。また、積算プロットから分裂率及び死亡率を求め、細胞を4日間培養したとき生細胞と死細胞の割合を概算した。単位時間当たりの分裂率が、 $9.0 \times 10^{-2} \text{ hrs}^{-1}$ より1日 (24 hrs) あたりの分裂率は2.2になる。また、単位時間当たりの死亡率が $2.5 \times 10^{-3} \text{ hrs}^{-1}$ より1日 (24 hrs) 当たりの死亡率は0.06となり、1日あたり全細胞数の 6.0 % が死亡する。したがって正味の分裂率は2.1となる。これを用いて1000細胞を培養すると考えると、培養してから24時間後の全体の細胞の数は 3.1×10^3 細胞になり、そのうち死細胞の数は60個になる。結果培養4日目では生細胞の割合が全細胞の99 % 以上を占めることが予測された。実際の培養においても、4日間培養したときの全細胞に対する生細胞の割合は95 % で予測値の方が生細胞の割合が高いが、殆ど変わらないと結論した。これらの結果より、L1210 細胞はデバイス内で安定的に、また集団培養しているときと同じような状態で成長していると結論した。

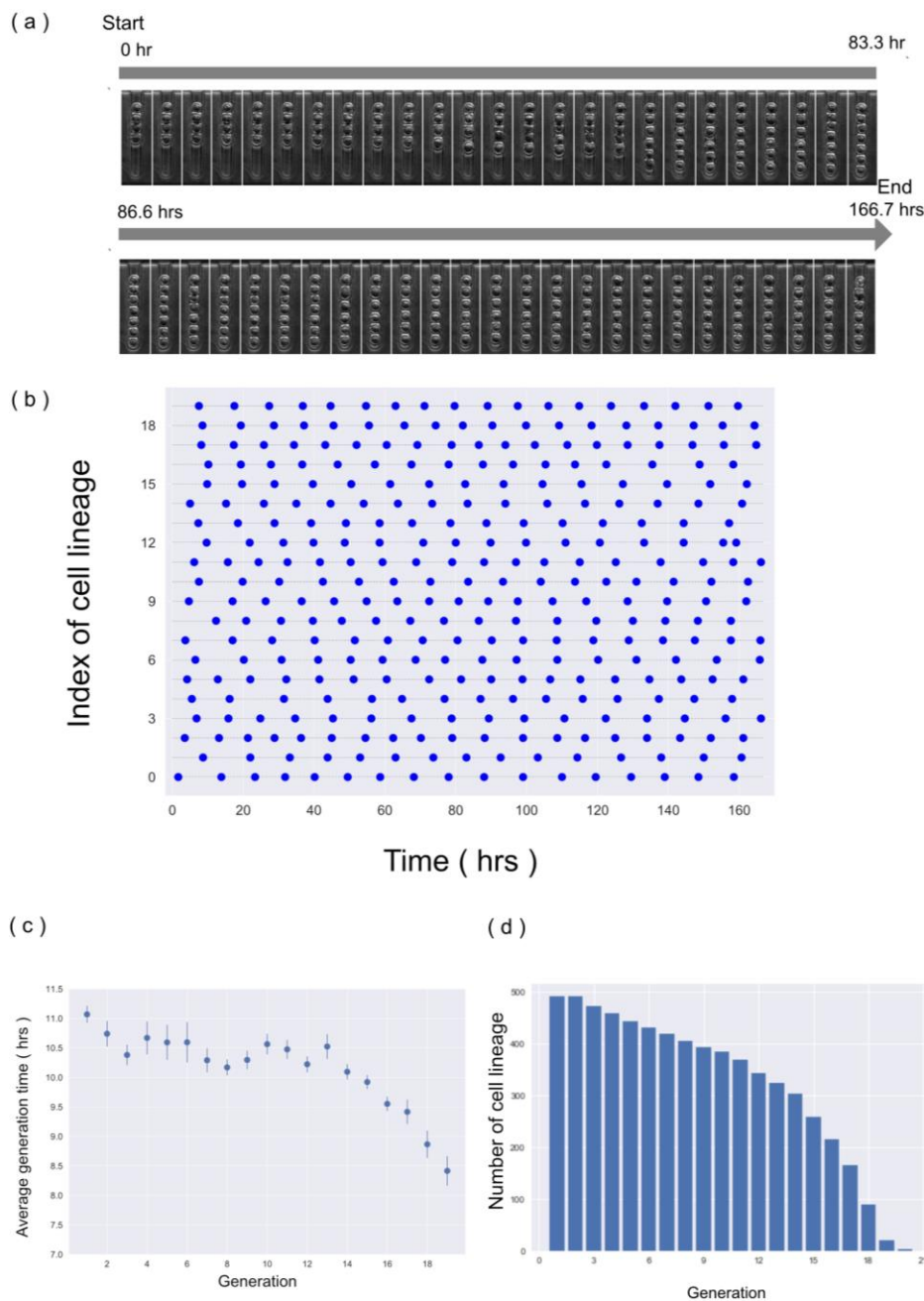


Figure 1 細胞の1細胞計測. (a) あるひとつの Growth channel での約170時間にわたる L1210 細胞のタイムラプス観察. 細胞は分裂を繰り返し、余分な細胞は Growth channel から排出される様子が観察された. (b) ランダムに抽出された Growth channel 内での分裂した時刻のプロット. 点は分裂イベントを表し、破線は異なる Growth channel を表す. それぞれの Growth channel 内で細胞は分裂を繰り返した. (c) 各世代におけるそれぞれの平均の世代時間 エラーバーは標準誤差を表す. (d) 世代とその世代まで到達する細胞系列の本数

計測された世代時間分布、およびそれと平均と分散が同じである Gamma 分布 と Lognormal 分布からサンプリングされた世代時間分布に対して Alpha plot を比較した。Gamma 分布や Lognormal 分布は世代時間分布のフィッティングによく使われる分布である。これらの分布からサンプリングされたデータの Alpha plot と比べ、計測された世代時間分布は長く裾を引いていることが分かる。このことは、集団中に世代時間が長い Sub-population が含まれていることを示している。

次に細胞系列ごとの世代時間に関して調べた。細胞死の判定基準に基づくと、観察した全492細胞系列のうち、151細胞系列は、1週間の計測の終了までに死亡してしまった。死んだ系列に限って世代時間 ($n=1106$) を評価すると、その平均は 10.52 ± 0.09 (S. E.) hrs となったが、死の直前の世代時間を除いて、死んだ系列の世代時間 ($n=955$) を評価すると、その平均は 10.09 ± 0.07 (S. E.) hrs となり、平均世代時間が短くなった。このことは、死の直前の分裂において全体の平均世代時間より世代時間が伸びることを示している。

また、死細胞系列の中には世代時間の系列平均が、全体の世代時間の平均 (10.40 hrs) よりも2倍以上大きくなる細胞系列が、死細胞系列の中には5 % ($=8/151$) 含まれていた。また、計測の終わりまで生存している生細胞系列の中に、全体の世代時間の平均よりも2倍以上大きくなる細胞系列が2.6 % ($=9/341$) 含まれることが分かった。このことは、系列上の平均世代時間が長いからといって必ず死亡するわけではないことを示している。また、もし各世代の世代時間がの集団全体の分布に従いランダムに決まっており、細胞死が上記の発生率で一定で起こると考えると、世代時間の系列平均が、集団平均に比べて2倍以上長くなる系列が観察される確率は、死細胞系列で0.63 % 、生細胞系列で0.04 % になると考えられる。したがって、実際に観察された頻度より低くなる。世代時間の世代に関する相関係数を求めたところ、Spearman の相関係数は 0.6114 となり、正の相関が認められた。この世代時間の正の相関により、系列上の平均世代時間が細胞全体の平均世代時間より2倍以上長くなる細胞系列が、予測される頻度より高い頻度で存在している可能性がある。世代時間が短い系列においても同様のことが考えられる。このことから、L1210 細胞の世代時間は、細胞内で世代をまたいで引き継がれる何らかのメモリの影響を受けている可能性が示唆される。また、それは1世代で消えるものではなく、数世代先まで残ることも示唆された。

また、相関次元について埋め込み次元 m を1~9の範囲で変えて調べたところ、埋め込み次元を増やしても相関次元が収束しないことが明らかになった。少なくともこのことは、世代時間のダイナミクスに関して、少数のパラメータで決定されるものではなく、高次元の力学系もしくは確率的なプロセスで支配されていることを示唆している。先行研究では本研究で得られた結果と異なり、世代間で世代時間に相関

は無く、世代時間の相関次元も低次元で収束すると報告されている⁵¹。その結果から、先行研究では、世代時間のダイナミクスは少数のパラメータの決定論的な記述で表すことができるとし、そのモデルとして Kicked cell cycle model が示された。このモデルは、サーカディアンリズムに駆動され世代時間が決まるようなモデルである。つまり、実験データの相関次元が収束すれば、Kicked cell cycle model によって、本研究で観察された世代時間の変動の性質も説明できる可能性がある。しかし、先行研究とは異なり本研究で得られた相関次元解析では、相関次元が収束しないことから Kicked cell cycle model は本研究で明らかになった世代時間のダイナミクスに合致しないことが分かる。本研究では、先行研究とは違うマイクロ流体デバイスを用いて計測を行っており、計測環境の違いが得られた結果の違いの原因となっている可能性がある。また、一方で、計測に用いた培地が影響を与えている可能性がある。先行研究では、CO₂ に依存せずに pH が安定する培地を用いて計測を行っている。一方で、本研究では CO₂ に依存する培地を用いている。この培地の違いが異なる結果を生み出している可能性がある。実際、肝細胞ではあるが、培養に用いる培地の違いが、細胞の形態やサイトカインの産生効率といった細胞形質に大きな影響を与えるという報告がある⁵²。先行研究及び本研究で用いた細胞株は血球系の細胞ではあるが、L1210 細胞も培地の違いを受け、細胞内の状態が変化し、世代時間の変動を支配するダイナミクスの特性に違いが生じている可能性がある。

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。前項で行った RPMI-1640 培地での1細胞計測の結果と、RPMI-1640 培地から RPMI-1640 培地に Mitomycin-C を添加した培地に切り換えたときの結果を比べると、Mitomycin-C を添加した培地に切り換えることにより分裂率が低下し、死亡率が上昇する様子が観察できた。この結果より、本研究で確立した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。

抗がん剤応答を1細胞レベルで計測することにより、分裂率及び死亡率をそれぞれ評価することができる。実際、この研究では分裂率及び死亡率の時間変化を直接計測し、その結果から、抗がん剤が分裂率や死亡率に影響を及ぼし始めるまでにかかる時間を推定した。その結果、Mitomycin-C が分裂率と死亡率に影響を及ぼし始めるまでにかかる時間には差があり、分裂率の方が先に影響を受けることが示された。また、薬剤濃度を高くするとより早く分裂率が影響を受け、低下することが示された。

Mitomycin-C は DNA の複製を阻害し apoptosis を誘発することにより抗腫瘍効果を示す。Mitomycin-C の作用機序から考えると、薬剤濃度を高くすることはより多くの細胞の成長をより早く停止させ、その結果死亡率が上がると考えられる。したがって、本研究で得られた結果は、既知の作用機序とも整合していると考えられる。

次に細胞系列に関する計測より、Mitomycin-C を投与する前の成長状態と投与後の細胞生死運命の関係について解析を行い、細胞の投与前の成長状態がどのような影響を及ぼすかを調べた。 1.67×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ 及び 6.67×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ とも、薬剤投与初期には、分裂頻度が高い細胞の方が高い生存率を示す傾向にあった。しかし、時間が経つにつれて、次第に投与前の分裂頻度が少なかった細胞の生存率の方が高くなる傾向が示された。Mitomycin-C 投与初期で見られる分裂頻度が低い細胞の方が死亡率が高い傾向は、前項での計測より示されたように、もともと薬剤が無い状態でも、細胞死が起こる直前の世代では世代時間が長くなる傾向があることを反映している可能性がある。一方で、同様に前項で示されたように必ずしも世代時間が長い細胞が死ぬわけではない事もあり、投与後の後期で生き残っている分裂頻度が低い細胞たちは世代時間が長くとも生き残る細胞系列である可能性がある。近年、メラノーマ細胞の非遺伝的な抗がん剤への適応において、薬剤投与前に抗がん剤耐性に関わる遺伝子が強く発現している細胞が、薬剤投与後に適応することが報告されている⁵³。今回の研究で明らかになった、薬剤投与前の成長状態と投与後の細胞生死運命の相関についても、その先行研究と同様に Mitomycin-C の耐性に関わる遺伝子の発現状態と成長状態が関係することにより引き起こされた可能性がある。特に遺伝子の異常発現は成長に大きく影響を与えることが示されていることから、分裂頻度が低い細胞では何らかの遺伝子が過剰発現している可能性がある^{54,55}。したがって、Mitomycin-C への耐性に関わりがある遺伝子の発現状態と成長状態を同時に計測することができれば、今回の成長状態に依存した細胞生死運命について、更に詳細に明らかにできる可能性がある。

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、抗がん剤研究の多くは接着性の細胞を対象に行われている。したがって、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、接着性の細胞においても今後1細胞計測系を確立する必要があると考えられる。一方で、今回初めてがん細胞において長期に渡る1細胞計測を実現できた。その結果、細胞成長や環境変動に対する適応現象の解析において、1細胞レベルでの細胞系列に沿った細胞形質の定量情報を計測し、その情報との関連を探ることが可能となった。これまで、単細胞微生物を対象とした1細胞計測により、細胞成長や適応現象に関する定量的な結果が報告されている⁴⁷⁻⁴⁹。物理学や化学では、定量的な測定に基づき、個別系に依存しない統一的な法則を数多く見つけることに成功している。今後、がん細胞においても1細胞系を用いて得られる定量的なデータと、バクテリア等で得られている定量的なデータとの比較から、細胞種を超えた共通する成長や適応現象に関する法則を見つけることができるようになると考えている。

1. Levine, J. H., Lin, Y. & Elowitz, M. B. Functional roles of pulsing in genetic circuits. *Science* **342**, 1193–200 (2013).
2. Gausing, K. Ribosomal protein in E. coli: rate of synthesis and pool size at different growth rates. *Mol. Gen. Genet.* **129**, 61–75 (1974).
3. Roeder, I. & Radtke, F. Stem cell biology meets systems biology. *Development* **136**, 3525–30 (2009).
4. Rosenfeld, N., Young, J. W., Alon, U., Swain, P. S. & Elowitz, M. B. Gene regulation at the single-cell level. *Science* **307**, 1962–5 (2005).
5. Walling, M. a & Shepard, J. R. E. Cellular heterogeneity and live cell arrays. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 4049–76 (2011).
6. Balázsi, G., van Oudenaarden, A. & Collins, J. J. Cellular decision making and biological noise: from microbes to mammals. *Cell* **144**, 910–25 (2011).
7. Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K. & Niwa, H. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* **135**, 909–918 (2008).
8. Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230–4 (2007).
9. Kalmar, T. *et al.* Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol.* **7**, e1000149 (2009).
10. Lu, R. *et al.* Systems-level dynamic analyses of fate change in murine embryonic stem cells. *Nature* **462**, 358–62 (2009).
11. Kobayashi, T. *et al.* The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev.* **23**, 1870–5 (2009).
12. Wakamoto, Y. *et al.* Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science* **339**, 91–5 (2013).
13. Mathiesen, R. R. *et al.* Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival. *Breast Cancer Res.* **14**, R117 (2012).
14. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**, 1622–5 (2004).
15. Bigger, J. Treatment of staphylococcal infections with Penicillin by intermittent. *The Lancet* **244**, 497–500 (1944).

16. Kondo, T., Setoguchi, T. & Taga, T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 781–6 (2004).
17. Lewis, K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 357–72 (2010).
18. Sharma, S. V *et al.* A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* **141**, 69–80 (2010).
19. Tsuru, S. *et al.* Noisy cell growth rate leads to fluctuating protein concentration in bacteria. *Phys. Biol.* **6**, 36015 (2009).
20. Kaneko, K. & Furusawa, C. An evolutionary relationship between genetic variation and phenotypic fluctuation. *J Theor Biol* **240**, 78–86 (2006).
21. Crissman, H. a & Steinkamp, J. a. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J. Cell Biol.* **59**, 766–71 (1973).
22. Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M. & Hegemann, J. H. Yeast Functional Analysis Reports Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression and Subcellular Localization in Budding Yeast. **12**, 773–786 (1996).
23. Longo, D. & Hasty, J. Dynamics of single-cell gene expression. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 64 (2006).
24. Grünberger, A., Wiechert, W. & Kohlheyer, D. Single-cell microfluidics: Opportunity for bioprocess development. *Curr. Opin. Biotechnol.* **29**, 15–23 (2014).
25. Dittrich, P. S. & Manz, A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 210–8 (2006).
26. Zare, R. N. & Kim, S. Microfluidic platforms for single-cell analysis. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **12**, 187–201 (2010).
27. Ortega, F. *et al.* Using an adherent cell culture of the mouse subependymal zone to study the behavior of adult neural stem cells on a single-cell level. *Nat. Protoc.* **6**, 1847–59 (2011).
28. Egilmez, N. K. & Jazwinski, S. M. Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **171**, 37–42 (1989).
29. Stewart, E. J., Madden, R., Paul, G. & Taddei, F. Aging and death in an

organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol.* **3**, e45 (2005).

30. Kortmann, H., Blank, L. M. & Schmid, A. Single cell analysis reveals unexpected growth phenotype of *S. cerevisiae*. *Cytometry. A* **75**, 130–9 (2009).
31. Xie, Z. *et al.* Molecular phenotyping of aging in single yeast cells using a novel microfluidic device. *Aging Cell* **11**, 599–606 (2012).
32. Coelho, M. *et al.* Fission yeast does not age under favorable conditions, but does so after stress. *Curr. Biol.* **23**, 1844–52 (2013).
33. Ricicova, M. *et al.* Dissecting genealogy and cell cycle as sources of cell-to-cell variability in MAPK signaling using high-throughput lineage tracking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11403–8 (2013).
34. Wlodkowic, D., Faley, S., Zagnoni, M., Wikswo, J. P. & Cooper, J. M. Microfluidic single-cell array cytometry for the analysis of tumor apoptosis. *Anal. Chem.* **81**, 5517–23 (2009).
35. Rowat, A. C., Bird, J. C., Agresti, J. J., Rando, O. J. & Weitz, D. a. Tracking lineages of single cells in lines using a microfluidic device. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18149–54 (2009).
36. Schroeder, T. Long-term single-cell imaging of mammalian stem cells. *Nat. Methods* **8**, S30–5 (2011).
37. Grünberger, A. *et al.* A disposable picolitre bioreactor for cultivation and investigation of industrially relevant bacteria on the single cell level. *Lab Chip* **12**, 2060–8 (2012).
38. Moffitt, J. R., Lee, J. B. & Cluzel, P. The single-cell chemostat: an agarose-based, microfluidic device for high-throughput, single-cell studies of bacteria and bacterial communities. *Lab Chip* **12**, 1487–94 (2012).
39. Gilbert, P. M. *et al.* A single cell bioengineering approach to elucidate mechanisms of adult stem cell self-renewal. *Integr. Biol. (Camb)*. **4**, 360–7 (2012).
40. Rocco, M. *et al.* Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development* **140**, 459–70 (2013).
41. Calder, A. *et al.* Lengthened G1 phase indicates differentiation status in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **22**, 279–95 (2013).

42. Godin, M. *et al.* Using buoyant mass to measure the growth of single cells. *Nat. Methods* **7**, 387–90 (2010).
43. Ferrezuelo, F. *et al.* The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation. *Nat. Commun.* **3**, 1012 (2012).
44. Young, J. W. *et al.* Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy. *Nat. Protoc.* **7**, 80–8 (2012).
45. Tang, F. *et al.* Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell* **6**, 468–78 (2010).
46. 若本祐一 & 橋本幹弘. 細胞培養装置、細胞培養長期観察装置、細胞長期培養方法、および細胞培養長期観察方法 日本国特許第5 2 3 1 6 8 4号 PCT/JP2012/068005. (2AD).
47. Hashimoto, M. *et al.* Noise-driven growth rate gain in clonal cellular populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 3251–3256 (2016).
48. Nakaoka, H. & Wakamoto, Y. Aging, mortality, and the fast growth trade-off of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS Biol.* **15**, 1–29 (2017).
49. Taheri-Araghi, S. *et al.* Cell-size control and homeostasis in bacteria. *Curr. Biol.* **25**, 385–391 (2015).
50. Wang, P. *et al.* Robust growth of *Escherichia coli*. *Current biology : CB* **20**, 1099–103 (Elsevier Ltd, 2010).
51. Sandler, O. *et al.* Lineage correlations of single cell division time as a probe of cell-cycle dynamics. *Nature* **519**, 468–471 (2015).
52. Aldo, P. B., Craveiro, V., Guller, S. & Mor, G. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am. J. Reprod. Immunol.* **70**, 80–86 (2013).
53. Shaffer, S. M. *et al.* Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* **546**, 431–435 (2017).
54. Dong, H. *et al.* Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction . These include : Gratuitous Overexpression of Genes in *Escherichia coli* Leads to Growth Inhibition and Ribosome Destruction. *J. Bacteriol.* **177**, 1497–1504 (1995).
55. Mischak, H. *et al.* Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage

dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* **268**, 6090–6096 (1993).