T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	リン光寿命を利用した共焦点顕微鏡下での細胞内酸素濃度イメージング
Title(English)	
著者(和文)	黒川宏美
Author(English)	Hiromi Kurokawa
出典(和文)	学位:博士（工学）, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9990号, 授与年月日:2015年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:蒲池 利章,中村　聡,廣田　順二,朝倉　則行,近藤　科江,大谷 弘之
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9990号, Conferred date:2015/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

（論文博士）

論　文　要　旨（和文2000字程度）

（Summary）

報告番号	乙 第　　号	氏　名	黒川　宏美

（ 要　旨 ）

【緒言】

酸素は好気呼吸を行う生物にとって非常に重要な分子であり、これまでに様々な酸素濃度測定法が研究、開発されてきた。当研究室では、１細胞内の酸素濃度に着目し、これまでにリン光寿命を用いた、共焦点顕微鏡下での細胞内酸素濃度イメージングを行ってきた。その結果、１細胞内には酸素濃度分布があることが明らかとなった。また、白金ポルフィリンを内包したポリスチレンビーズを調製し、細胞内外の酸素濃度イメージングの同時測定を行ってきた。

本研究では、二次元および三次元培養した細胞内の酸素濃度イメージングにおけるリン光寿命測定の有用性について検討した。さらに、リン光寿命を用いた三次元的な酸素濃度イメージングを行った。また、細胞内低酸素領域の由来を明らかとするとともに、外部刺激に応じた細胞内酸素濃度の動的変化について検討した。

【結果と考察】

細胞内酸素濃度イメージングにおけるリン光寿命および強度測定の比較

二次元培養細胞および三次元培養細胞内の酸素濃度イメージングを行い、細胞内の酸素濃度測定におけるリン光寿命および強度測定の比較を行った。二次元培養細胞内の酸素濃度イメージングの結果、リン光寿命を利用した場合、低酸素領域のイメージングのみならず、**0–20%**の酸素濃度に対応した細胞内酸素濃度イメージングが可能であることがわかった。また、リン光寿命を用いた三次元培養細胞の酸素濃度イメージングの結果、リン光寿命を利用した場合は**spheroid**中心部が辺縁部に比べ低酸素状態であることがわかった。これは**spheroid**内への酸素は、辺縁部からの拡散により供給され、内部で消費されるためであるといえる。一方、リン光強度を用いた場合、リン光性色素の濃度分布による影響を受けるため、正しく酸素濃度分布をイメージングできなかった。リン光と蛍光を同時に観察する時に得られる発光強度を用いた場合（通常の蛍光顕微鏡観察で得られる像）では、自家蛍光の影響により見かけの発光強度の酸素濃度依存性が小さく、測定が困難であった。これらのことから、二次元および三次元培養細胞の酸素濃度測定にリン光寿命を用いる有用性が示された。また、リン光寿命を用いることで、**spheroid**内の三次元的な酸素濃度イメージングが可能であることが示された。

細胞内酸素濃度分布とミトコンドリア局在の関係性の検討

細胞内小器官の中でも酸素消費量が高いミトコンドリアに着目し、1細胞内の酸素濃度分布とミトコンドリアの関係性を検討した。ミトコンドリア染色色素とリン光性化合物の二重染色を行ったところ、

細胞の種類に関係なく、細胞内の低酸素領域にミトコンドリアが存在していることが明らかとなった。さらに、ミトコンドリア内の電子伝達複合体阻害剤を添加することにより、細胞内の酸素濃度は全体的に増加した。これらのことから、細胞内の低酸素領域はミトコンドリアの電子伝達に伴う酸素消費により形成されることが明らかとなった。さらに、**Colon26**の細胞核はミトコンドリア近傍より低酸素状態であることがわかった。細胞核の周囲はミトコンドリアが比較的集積しており、ミトコンドリアの酸素消費により細胞核も低酸素になると同時に、細胞核の内部に存在する酸素を基質とする酵素の働きによりさらに低酸素になっているものと思われる。この細胞核内の低酸素状態もアンチマイシン**A**添加により解消され、他の細胞内と同様に酸素濃度が増加した。

グルコース刺激によるマウス膵β細胞株**MIN6**の細胞内酸素濃度変化

マウス膵β細胞株**MIN6**へのグルコース添加に伴う経時的な細胞内酸素濃度変化について検討した。グルコース不含バッファーでプレインキュベートした**MIN6**細胞は、高濃度グルコース刺激により、細胞内の酸素消費が**10**分以内に高まり、細胞内の酸素濃度が低下することがわかった。この変化は、刺激**30**分後まで続き、グルコース刺激により細胞内が低酸素状態になることが示された。このとき、**MIN6**の周囲の培地中の酸素濃度も低下したことから、静置培養している**MIN6**ではグルコース刺激により周囲の酸素濃度に影響を与えるほど、酸素を消費することが明らかとなった。これまで、閉鎖系での細胞培養液の酸素消費量を測定することで、間接的に細胞内の酸素消費が高まることが報告されていた。本システムを利用することで、酸素および二酸化炭素の気流下での細胞内酸素濃度変化が直接測定できた。また、より生理的な環境下においても、グルコース刺激により細胞内は低酸素状態になることが示された。高濃度グルコースで**MIN6**を培養後、低濃度グルコースで培養すると細胞内が通常の酸素状態になることが明らかとなり、**MIN6**ではグルコース濃度に応じた可逆的な細胞内酸素濃度変化が起こることがわかった。さらに、高濃度グルコース刺激により、細胞内は徐々に低酸素状態になるが、低濃度グルコースに置換すると、細胞内の酸素濃度は速やかに増加することがわかった。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).
注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).