

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者	黒川 宏美	
論文審査員	氏 名	職 名	氏 名	職 名
	主査 蒲池 利章	准教授	近藤 科江	教 授
	中村 聡	教 授	大谷 弘之	准教授
	廣田 順二	准教授		
	朝倉 則行	講 師		

本論文は「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」と題し、5章より構成されている。

第1章「緒論」では、酸素センシング法に関するこれまでの研究について概説し、本研究の目的と意義について述べている。

第2章「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」では、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ている。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を明らかにしている。また、リン光寿命を用いた三次元培養細胞塊(spheroid)の酸素濃度イメージングを行い、spheroid中心部が辺縁部に比べ低酸素状態であることを、可視化により明らかにしている。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いことを示している。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、自家蛍光による影響を受けることを明らかにしている。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を示している。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を示している。

第3章「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」では、1細胞内酸素濃度分布とミトコンドリアの関係性を検討している。ミトコンドリア染色色素とリン光性色素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を明らかにしている。電子伝達複合体阻害剤アンチマイシンA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を示している。さらに、マウス直腸癌由来細胞株Colon26の細胞核はミトコンドリアより低酸素状態であることを明らかにしている。細胞核の周囲はミトコンドリアが集積しており、ミトコンドリアの酸素消費により細胞核が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考察している。

第4章「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」では、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ている。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を明らかにしている。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を示している。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培地中の酸素濃度に影響を与えるほど、酸素を消費することを明らかにしている。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、間接的に細胞内酸素消費が高まることが報告されている。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ることを示している。グルコース濃度の異なる刺激を用いた実験により、プレインキュベート時とグルコース刺激の濃度差が大きいほど、細胞内が低酸素状態になることを示している。さらに、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を明らかにしている。

第5章「総括」では、本研究の結果を総括し、今後の展望について述べている。

これを要するに、本論文では共焦点顕微鏡下での細胞内酸素イメージングにリン光寿命を用いる有用性が示され、細胞内の低酸素領域とミトコンドリアの関係性や、高濃度グルコースによるMIN6の酸素消費速度の亢進を明らかにしている。このように本手法を用いることで、生体内における酸素代謝が細胞に与える影響を解明できることが期待されることから、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって本論文は、博士(工学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。