

位相シフトレーザー顕微鏡を用いた 移植用細胞品質の非侵襲的評価に関する研究

学位論文内容の要旨

細胞の増殖・分化に関する基礎研究が盛んに行われ、免疫拒絶反応のない自己の細胞を用いて組織を形成し、体内に移植することで欠損部や損傷部を修復する再生医療が注目されている。しかし、再生医療の普及や産業化のための品質管理に必要な細胞品質評価方法に関する研究は遅れているのが現状である。現在行われている細胞の品質評価方法には、動物への移植、表面抗原に対する免疫染色、遺伝子発現定量などの方法があるが、これらは全て侵襲的検査である。しかし、再生医療の大部分を占める自家細胞システムでは細胞を侵襲したり破壊したりできないため、品質評価のために非侵襲的な検査方法が必要である。従って、非侵襲的かつ短時間で行える細胞の品質評価法の開発が必要と考えられた。

細胞品質の非侵襲的評価の手段として、細胞の顕微鏡観察がある。しかし、通常用いられる倒立型位相差顕微鏡では、細胞のほぼ平面的形状しか得られない。ここで、新規に開発された位相シフトレーザー顕微鏡 (PLM) は、測定対象物を透過したレーザー光と透過せずに進んだレーザー光との間の位相差を定量し、非侵襲的に細胞の立体形状に関連する細胞特性を検出することができる。従って、PLM を用いて非侵襲的に細胞の立体形状を解析することにより、再生医療における移植用細胞を非侵襲的に品質評価することが可能となり、より高度な診断につながると期待できた。

本論文では PLM を用いて、品質評価の観点から移植用細胞の増殖速度や腫瘍細胞の有無を非侵襲的に推定する方法について検討をすることを目的とした。本論文は 6 章から構成されており、それぞれの概要を以下に示した。

第 1 章では、本研究の背景と目的を明らかにした。

第 2 章では、PLM を用いて測定した細胞の位相差から非侵襲的に細胞周期を推定する方法を提案し、G0/G1 期、S 期および G2/M 期の同調培養により各細胞周期の割合を意図的に変化させた場合を含めて、BrdU および DAPI を用いた免疫化学染色および PI を

用いたフローサイトメーターを用いて、細胞の位相差と細胞周期との関係について検討した。その結果、G2/M 期の位相差は G0/G1 期の位相差に比べて顕著に大きく、位相差の値によって MSC の G0/G1 期と G2/M 期とを非侵襲的に識別することができると考えられた。

第 3 章では、第 2 章による結果をふまえて、3 人の異なるドナー由来の MSC および 3 種類の FGF2 添加濃度を用いた培養を行い、PLM による位相差測定を行い、MSC の増殖速度と位相差との関係について検討した。その結果、平均世代時間と位相差の平均値との間には明確な負の相関が認められた。このことから、PLM により位相差を測定することで非侵襲的に平均世代時間を予測できると考えられた。

第 4 章では、ガン細胞は正常細胞よりも細胞骨格の密度が低いことから、PLM を用いた位相差測定によってガン細胞を正常細胞から識別できるのではないかと考えた。そこで、PLM を用いて正常ヒト前立腺上皮細胞 (PREC) およびヒト前立腺ガン細胞株 (PC-3)、ヒト凍結肝細胞および 4 種類の肝ガン細胞株 (Hep3B、HLF、Huh-7 および PLC) の位相差測定を行った。その結果、いずれの組み合わせにおいてもガン細胞の位相差は正常細胞の位相差よりも有意に小さいことが明らかとなった。このことから、位相差測定により正常細胞とガン細胞を非侵襲的に識別できる可能性が考えられた。

第 5 章では、正常細胞集団においてガン細胞が生じた場合、多数の正常細胞から少数のガン細胞を識別することが重要であると考え、第 4 章で位相差の有意な差が認められた PREC 細胞と PC-3 細胞を 3 通りの割合で混合し、PLM による位相差測定からガン細胞である PC-3 細胞の混合割合を推定できるかどうか検討した。その結果、PC-3 細胞の割合が 43.3、14.0 および 10.6% の各培養において、各々 100 個の細胞について PLM を用いて測定した位相差の分布から PC-3 細胞の割合がそれぞれ 49.8、8.0 および 2.5% と計算された。このことから、PLM によって測定した位相差の値からガン細胞の混入を非侵襲的に推定することは可能であると考えられた。

第 6 章では、総括として本研究をまとめた。

本研究では、PLM による非侵襲的な細胞の位相差定量によって、移植用細胞の重要な品質評価項目である増殖速度およびガン細胞混在を非侵襲的に推定できることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 木 睦

副 査 教 授 棟 方 正 信

副 査 教 授 田 口 精 一

学 位 論 文 題 名

位相シフトレーザー顕微鏡を用いた 移植用細胞品質の非侵襲的評価に関する研究

細胞の増殖・分化に関する基礎研究が盛んに行われ、免疫拒絶反応のない自己の細胞を用いて組織を形成し、体内に移植することで欠損部や損傷部を修復する再生医療が注目されている。しかし、再生医療の普及や産業化のための品質管理に必要な細胞品質評価方法に関する研究は遅れているのが現状である。現在行われている細胞の品質評価方法には、動物への移植、表面抗原に対する免疫染色、遺伝子発現定量などの方法があるが、これらは全て侵襲的検査である。しかし、再生医療の大部分を占める自家細胞システムでは細胞を侵襲したり破壊したりできないため、品質評価のために非侵襲的な検査方法が必要である。従って、非侵襲的かつ短時間で行える細胞の品質評価法の開発が必要と考えられた。

細胞品質の非侵襲的評価の手段として、細胞の顕微鏡観察がある。しかし、通常用いられる倒立型位相差顕微鏡では、細胞のほぼ平面的形状しか得られない。ここで、新規に開発された位相シフトレーザー顕微鏡 (PLM) は、測定対象物を透過したレーザー光と透過せずに進んだレーザー光との間の位相差を定量し、非侵襲的に細胞の立体形状に関連する細胞特性を検出することができる。従って、PLM を用いて非侵襲的に細胞の立体形状を解析することにより、再生医療における移植用細胞を非侵襲的に品質評価することが可能となり、より高度な診断につながると期待できた。

本論文では PLM を用いて、品質評価の観点から移植用細胞の増殖速度や腫瘍細胞の有無を非侵襲的に推定する方法について検討をすることを目的とした。本論文は 6 章から構成されており、それぞれの概要を以下に示した。

第 1 章では、本研究の背景と目的を明らかにした。

第 2 章では、PLM を用いて測定した細胞の位相差から非侵襲的に細胞周期を推定する方法を提案し、G0/G1 期、S 期および G2/M 期の同調培養により各細胞周期の割合を意図的に変化させた場合を含めて、BrdU および DAPI を用いた免疫化学染色および PI を用いたフローサイトメーターを用いて、細胞の位相差と細胞周期との関係について検討した。その結果、G2/M 期の位相差は G0/G1 期の位相差に比べて顕著に大きく、位相差の値によって MSC の G0/G1 期と G2/M 期とを非侵襲的に識別することができると考えられた。

第 3 章では、第 2 章による結果をふまえて、3 人の異なるドナー由来の MSC および 3 種類の FGF2 添加濃度を用いた培養を行い、PLM による位相差測定を行い、MSC の増殖速度と位相差との関係

について検討した。その結果、平均世代時間と位相差の平均値との間には明確な負の相関が認められた。このことから、PLM により位相差を測定することで非侵襲的に平均世代時間を予測できると考えられた。

第 4 章では、ガン細胞は正常細胞よりも細胞骨格の密度が低いことから、PLM を用いた位相差測定によってガン細胞を正常細胞から識別できるのではないかと考えた。そこで、PLM を用いて正常ヒト前立腺上皮細胞 (PREC) およびヒト前立腺ガン細胞株 (PC-3)、ヒト凍結肝細胞および 4 種類の肝ガン細胞株 (Hep3B、HLF、Huh-7 および PLC) の位相差測定を行った。その結果、いずれの組み合わせにおいてもガン細胞の位相差は正常細胞の位相差よりも有意に小さいことが明らかとなった。このことから、位相差測定により正常細胞とガン細胞を非侵襲的に識別できる可能性が考えられた。

第 5 章では、正常細胞集団においてガン細胞が生じた場合、多数の正常細胞から少数のガン細胞を識別することが重要であると考え、第 4 章で位相差の有意な差が認められた PREC 細胞と PC-3 細胞を 3 通りの割合で混合し、PLM による位相差測定からガン細胞である PC-3 細胞の混合割合を推定できるかどうか検討した。その結果、PC-3 細胞の割合が 43.3、14.0 および 10.6% の各培養において、各々 100 個の細胞について PLM を用いて測定した位相差の分布から PC-3 細胞の割合がそれぞれ 49.8、8.0 および 2.5% と計算された。このことから、PLM によって測定した位相差の値からガン細胞の混入を非侵襲的に推定することは可能であると考えられた。

これを要するに、PLM による非侵襲的な細胞の位相差定量によって、移植用細胞の重要な品質評価項目である増殖速度およびガン細胞混在を非侵襲的に推定できることを明らかにしたものであり、動物細胞培養工学および再生医療工学に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。