

審査の結果の要旨

氏名 岩吉俊輔

本論文は、「引張刺激に応答した細胞の形態変化のメカニズムに関する研究」と題し、本文9章からなる。

血管内皮細胞は生体内において、血流による剪断応力や拍動による引張刺激に応答して応答して、細胞機能や血管組織の調節やリモデリングを行っている。そのため、この血管内皮細胞の力学的刺激に応答するメカニズムを解明することは、動脈硬化症などの疾患の治療法や予防法の開発や、力学的刺激負荷を利用した組織構築による再生医療の実現などに貢献できると期待されている。

血管内皮細胞の力学的刺激への応答の一つに、周期的引張刺激に応答した、引張方向と垂直への配向がある。従来はこのメカニズムに関する研究は、固定した細胞や、細胞を可溶化することにより行われてきたが、この方法では、形態変化の過程が分からない、個々の細胞での細胞内シグナルの変化が分からないといった問題点があった。これらの問題点の解決策として挙げられるのが、リアルタイムイメージングである。

本論文は、引張刺激負荷への細胞応答のリアルタイムイメージングシステムを構築することにより、周期的引張刺激に応答した血管内皮細胞の形態変化のメカニズムを探ったものである。

第1章「緒言」では、研究の背景として細胞の力学的刺激に応答した形態変化に関する先行研究や Green Fluorescent Protein (GFP) を使ったリアルタイムイメージング手法、本研究における目的を述べた。

第2章「実験方法」では、血管内皮細胞の細胞培養法や本論文で開発した細胞引張刺激負荷装置の解説を行った。

以下、第3章から第7章では、本研究の目的を実現するために行った実験テーマごとにまとめられてある。

第3章「周期的引張刺激に応答した細胞形態変化の連続観察」では、周期的

引張刺激を負荷しながら細胞を連続的に観察可能なシステムを構築した。これを用いて 2 時間、周期的引張刺激を細胞に負荷し、個々の細胞の形態変化の解析を行ったところ、引張刺激負荷前の形態に依存して、形態変化のプロセスが異なることが分かった。また、周期的引張刺激に応答した形態変化には細胞の伸長のみでなく、収縮が重要な役割を担っていることが示唆された。

第 4 章「蛍光タンパク質を用いた細胞骨格と細胞接着のリアルタイムイメージング」では、形態変化のより詳細なメカニズムを解析するために、細胞骨格と細胞接着を単一細胞レベルでリアルタイムイメージング可能なシステムを、引張負荷装置と Green Fluorescent Protein (GFP) イメージング技術を組み合わせることで構築した。これを用いて細胞に周期的引張刺激を負荷し、アクチン細胞骨格と細胞接着の同時観察を行ったところ、アクチンストレスファイバーは、崩壊、再構築、収縮、伸長、移動と様々なパターンのリモデリングを生じながら、細胞形態を変化させていることが分かった。

第 5 章「周期的引張刺激に応答した形態変化に關与する細胞内シグナル」では、周期的引張刺激に応答した形態変化における細胞内シグナルを探るために、種々の阻害剤を用いて細胞内シグナルを阻害した血管内皮細胞に周期的引張刺激を負荷し、その形態変化を位相差顕微鏡や蛍光顕微鏡によって観察した。その結果、Rho kinase や 2 型ミオシンのリン酸化がこの形態変化に關与していることがわかった。

第 6 章「FRET による細胞内シグナルのリアルタイム測定」では、第 4 章 GFP を用いたリアルタイムイメージングの応用として、Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) による細胞内シグナルのリアルタイム測定システムを構築した。FRET のプローブとして、細胞骨格や細胞接着のリモデリングに關与している Src チロシンキナーゼ活性を測定する Src Reporter を用いた。薬剤刺激への応答を計測したところ、EGF、VEGF に応答して Src チロシンキナーゼの活性の上昇が確認された。次に、周期的引張刺激を負荷したところ、単一細胞においても Src チロシンキナーゼ活性が上昇するという結果を得た。この結果は過去の報告による細胞群での測定結果と一致している。また、この Src チロシンキナーゼの上昇は、Src の特異的阻害剤である PP1 を用いることでブロックされた。

第 7 章「カルシウムイオン濃度と一酸化窒素産生量の同時測定」では、周期的引張刺激に應答した、血管弛緩を引き起こす一酸化窒素 (NO) の産生量の変化と、それを制御しているカルシウムイオン濃度の変化を、カルシウムイオン蛍光指示薬 Fura-2 と一酸化窒素指示薬 DAF-2 を用いて同時に測定した。この結果から、引張刺激下でのリアルタイムイメージングを実現することは、形態変化のメカニズム解析のみでなく、血管内皮細胞やその他の細胞の生理的機能について研究する上で有用なツールとなり得ることがわかった。

第 8 章「総括」では，第 3 章から第 7 章の実験結果を組み合わせて得られる考察や，実験システムの今後の可能性などについて述べた．

そして最後に第 9 章「結言」として本博士論文の成果を述べた．

以上のように，本論文では引張刺激下のリアルタイムイメージングシステムを構築し，細胞の形態変化のメカニズムを探ったが，それらは，工学的な意義が大きく，細胞の力学的刺激に応答するメカニズムの解明に重要な貢献をなすものと考えられる．

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる．