

氏名	高根沢 聡 太
学位の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	甲理第162号(文部科学省への報告番号甲第560号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2015年3月17日
学位論文題目	<b>A Raman Spectroscopic and Chemometric Study of the Cellular State Changes during Cell Differentiation</b>
論文審査委員	(主査) 教授 尾崎 幸洋 (副査) 教授 山口 宏 教授 佐藤 英俊 佐甲 靖志(理化学研究所主任研究員)

同一環境・同一遺伝子の細胞集団においても、個々の細胞では分化・増殖・細胞死といった運命は異なる。そのような運命の違いは細胞の遺伝子・タンパク質などの組成の違いを反映している。細胞の内部の化学組成を検出する方法として、質量分析やDNAマイクロアレイを用いて遺伝子・タンパク質・代謝産物を網羅的に解析する方法があるが、細胞集団の情報を扱い、破壊的であるため単一細胞を追跡することは出来ない。蛍光標識を用いる細胞状態の検出法はこれまでも広く用いられているが、多種・多数の分子情報を同時に捉えることは出来ず、また事前に特定の重要な分子に関する知識が必要となる。それらに対して相補的な方法として、非破壊で多次元の分子の情報を同時に検出できるラマン分光法がある。ラマン分光法はこれまでも、癌と非癌細胞の識別、幹細胞と幹細胞から分化した心筋細胞の識別、組織における癌・非癌の識別など様々な細胞・組織の識別の研究などに用いられている。これらの先行研究はラマン分光法が、分化・増殖過程における細胞状態およびそのダイナミクスを検出できるという可能性を示唆する。本研究の目的は、細胞運命の決定、特に分化・増殖過程における細胞集団・単一細胞の化学組成変化をラマン分光法を用いて追跡する事である。

## 論文内容の要旨

本論文は4章からなる。第一章は乳癌由来培養細胞MCF-7の細胞集団における細胞状態の変動をラマン分光法を用いて調べることが可能かどうかについて研究した結果について述べている。

Heregulin (HRG) 刺激下におけるMCF-7の分化ダイナミクスを12日間にわたりラマン分光法を用いて追跡した。ラマンスペクトルには、タンパク質、核酸、脂質、チトクロムcなどのラマンバンドが観測され、バンドの帰属を基に化学組成変化を追跡した結果、細胞の分化過程は単調な化学組成変化ではないことが分かった。単調でない分化過程の化学組成変化は主成分分析によって視覚化した。主成分1および2において、12日間の分化過程で細胞集団の化学組成の分布が循環するパターンを、主成分3では分布が振動するパターンを検出した。さらに主成分空間において未分化(0日目)と分化(12日目)を分布が異なることを明確に識別できることを見出した。しかしながら、中間的な状態(刺激後1日目と3日目)や未分化(0日目)と刺激後6日目を主成分空間では区別することが出来なかった。より高次の成分も含めて解析することで、その問題を解決するためにSoft independent modeling of class analogy (SIMCA)を用いてラマンおよび自家

蛍光のスペクトルを解析した。その結果、主成分空間で区別できなかった中間的な状態や未分化（0日目）と刺激後6日目も含めて明確に区別し、細胞集団の化学組成変化を視覚化することに成功した。

第二章は、第一章の結果を受け、単一のMCF-7細胞の初期の分化・増殖ダイナミクスをラマン分光法で研究した結果について報告している。HRGおよびEpidermal growth factor (EGF)で、それぞれ分化・増殖を誘導した細胞を刺激直後の2時間、1日経過した後の2時間についてラマン分光法で追跡した。それぞれ単一細胞の化学組成変化を視覚化するために主成分分析を用いた。分化過程では、タンパク質・脂質などの代謝産物の濃度が増加することに対応して、主成分1および2の成分が時間と共に増加する様子を捉えた。増殖過程でも同様に主成分1および2の成分が増加するが、分化過程と比べて小さい変化であった。また、単一細胞の化学組成が主成分平面の制限された領域で変化していることが分かった。さらに、細胞集団の化学組成の分布形状から、分布が複数の成分からなることが予想された。より詳しく細胞の化学組成のダイナミクスを調べるため、主成分平面における細胞集団の化学組成の分布をガウス混合モデルを用いてクラスタリングし、単一細胞の化学組成変化との比較から細胞化学状態を主成分平面に定義した。細胞化学状態の時開発展を追跡することで以下のようなことが観察された。分化過程では、方向性をもつ化学組成変化し、可逆・非可逆な状態変化を検出した。一方、増殖過程では、化学組成が均一化されるようなダイナミクスが検出された。さらに、分化過程では、成長因子の刺激によって化学組成変動が大きくなり、一方で、増殖過程ではそのような傾向は観察されなかった。以上のようにこの章では、ラマン分光法によって単一細胞および細胞集団における初期の分化・増殖過程のダイナミクスを検出し視覚化した。

第三章は、ラット食道に生じた良性腫瘍の部分をラマン分光法と一般化二次元相関分光法によって検出した結果に関するものである。N-nitro-methylbutylamine (NMBA)によってラット食道に良性腫瘍を誘導し、良性腫瘍部を含むラット食道のラインプロファイルラマンスペクトルを自作のラマン分光器で計測した。良性腫瘍部と正常部の微かな化学組成の違いを検出するため、一般化二次元相関分光法による解析を行った。その結果、異時相関図内の $1660\text{cm}^{-1}$ のアミドIモードの領域において4つの異時相関ピークからなる十字状のパターンが観察された。シミュレーションスペクトルを用いた一般化二次元相関分光法による解析結果から、異時相関スペクトルの十字状パターンはアミドIモードのバンド幅の変化によることが分かった。良性腫瘍部には正常部と比べ、 $1660\text{cm}^{-1}$ のアミドIモードのバンドがシャープな形状を有する化学成分が存在することが示された。この章では、一般化二次元相関分光法とラマン分光法を組み合わせることで、食道の良性腫瘍と正常組織の化学組成の微かな違いを異時相関スペクトルの特徴的なパターンによって識別できることを示した。

第四章は、過酸化水素刺激によって誘導されたヒト皮膚モデルの色素沈着をラマン分光法で研究した結果について述べている。過酸化水素刺激はUV照射の代替として用いた。黒人、アジア人、白人のスキントイプを模したヒト皮膚三次元モデルに対し、過酸化水素刺激で、色素沈着を誘導し、その過程をラマン分光法で調べた。それぞれのスキントイプをEumelaninのバンド( $1380, 1580\text{cm}^{-1}$ )およびオフセット値の違いによって識別した。さらに、過酸化水素刺激による白人モデルではタンパク質に由来するバンド強度の急峻な現象を刺激4日目で捉えた、一方で黒人モデルではそのような変化は観察されず、アジア人モデルでは両者と中間的な変化となっていた。通常皮膚モデルの色素沈着は10-14日で検出される。この4日目の急峻な変化は恐らく過酸化水素刺激によって起きている色素沈着を早期に捉えている。この章では、ラマン分光法によって異なるスキントイプにおける過酸化水素刺激に対する応答の違いを検出した。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、ラマン分光法-ケモメトリクス法による細胞分化過程の細胞状態変動の研究に関するものである。

### 【研究の新規性・独創性】

従来の細胞のラマン分光研究では、2、3の状態（未分化・分化、癌・非癌、3種類の細胞など）を識別・判別するといった研究が主であった。いくつかの研究においては単一細胞の細胞プロセス（アポトーシス過程、増殖過程）をラマンイメージングで追跡している研究はあるものの、単一細胞または数個の細胞のみの変化に着目している。それらの研究と比較して、本研究では識別・判別に加え単一細胞・細胞集団の細胞プロセスを追跡している。そこでは、これまで議論されていなかった細胞プロセスの中間的な化学組成および単一細胞レベルでの化学組成変化のふるまいを明らかにしている。また、細胞の分子を網羅的に調べる質量分析やDNAマイクロアレイによる方法は今のところ破壊的であり、蛍光標識による遺伝子・たんぱく質などの分子マーカーを用いる手法は特定分子のみの情報を扱うという問題がある。そこで、本論文ではそれらと相補的な方法であるラマン分光法を用いて細胞の化学組成変化のモニタリングを試みた。ラマン分光法を用いて非破壊で単一細胞の多次元の化学情報を計測し、主成分分析とSoft independent modeling of class analogy (SIMCA)による解析、主成分分析とガウス混合モデルによる解析によって、細胞集団（第一章）・単一細胞（第二章）の化学組成変化を細胞間分布を含めて検出・視覚化できた。提案したラマン-ケモメトリクス法は、従来の網羅的な手法や蛍光標識を行う手法の中間的な視点で細胞分化過程における化学組成と分化に伴う組成変化を検出している。

### 【本論文の重要な結論】

単一細胞の化学組成と細胞プロセスに伴う組成変化を検出することで得られた知見から、分化のメカニズムを探索するための新たな技術の一つとしてラマン分光法を提案できた。これは、従来用いられている網羅的であるが破壊的な手法（質量分析やDNAマイクロアレイなど）に対し相補的な視点による。さらに、第二章では、化学組成と化学組成変化の解析結果から、「細胞の化学状態」を定義し、分化・増殖因子の刺激前後における個々の細胞のふるまいを捉えた。この方法を発展させていくことで個々の細胞運命決定を予測するための技術となる可能性を示した。今後、ラマン分光法で得られた細胞の化学組成変化と従来の生物学的な手法で得られる知見とを比較することで、個々の細胞における細胞運命決定のメカニズムを明らかにする可能性を示した。将来、ラマン分光法と生物学的手法を組み合わせた方法によって細胞運命を予測する技術が確立できることを予期させる。

本論文の内容はすでにBiophysical Journal、Journal of Spectroscopy、Applied Physics Expressに3編の論文として公表されている。また1編の論文がBiophysical Journalに投稿中となっている。さらに著者は国際会議で本論文の内容を口頭で4件、ポスターで6件発表している。国内の会議で口頭で8件、ポスターで10件発表している。

審査委員は本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容と用いた技法について十分な理解とともに関連する分野についても学識を有し、また将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つことを確認することが出来た。以上のことより、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を授与されるに足る十分な資格を有するものと判定する。