

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文審査報告書

## 論文題目

Microscopic Thermometry  
and  
Temperature Effects on Cellular Functions

申請者

Hideki	ITOH
伊藤	秀城

物理学及应用物理学専攻 実験生物物理学研究

2016年3月

動物、とくに恒温動物は、体温を維持するために、常に熱を発生している。骨格筋は力発生装置であり、運動に必須の臓器だが、同時に熱発生装置でもある。運動するためには力学的な仕事をする必要があり、そのために化学的エネルギーを消費する結果、必然的に熱が発生する。さらに筋組織内では、生体にとってのエネルギー通貨であるアデノシン三リン酸（ATP）がミトコンドリアで合成されるが、その際に熱が産生される。このような基礎代謝は、運動性の臓器でなくても、あらゆる細胞で行われ、熱が産生されている。脳組織はその活動に応じて熱を産生し、脳組織の部位ごとの温度も異なることが知られており、長年に亘って生理学的な研究が行われてきた。

では、組織を構成する細胞レベルでの熱産生はどのようなになっているだろうか。熱産生の時空間的なダイナミクスはどのようなものか。細胞内の温度分布は一様だろうか。時間的な変動はどのようなものだろうか。そして、それらは、その細胞の機能発現と何らかのかかわりを持っているだろうか。近年、新規の顕微解析法による1細胞レベルでの熱産生のマイクロ計測が盛んに行われるようになった。それと同時に、マイクロな熱パルスを与えることによる細胞機能の応答性の研究も進んでいる。特に注目されるのは、特定の細胞内小器官（オルガネラ）に特異的に結合するナノ温度計が開発され、細胞機能の発現に伴うミトコンドリアなどの熱発生（温度上昇）が蛍光イメージングされていることである。本研究は、これらの先行研究を土台として、蛍光強度や蛍光寿命の温度特性を顕微解析することで、1細胞レベルでの温度分布や、化学刺激に対する発熱反応、それにレーザー光を用いた熱パルスに対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答性などを、蛍光性の温度感受性シートや、同グループによって開発された細胞内小器官に特異的に結合する蛍光色素などを用いて細胞温度を顕微計測し、1細胞熱力学の発展に寄与することを目指したものである。

第1章は本研究の序論である。本研究の目的が、細胞機能への温度の効果、とくに熱パルスの作用を1細胞レベルで調べることと、機能発現に伴う細胞温度の微小な変化を顕微鏡下でイメージングし、新しい現象を発見するという、細胞生物物理学における新領域の開拓にあることが述べられている。

第2章では、光学顕微鏡下での温度計測に関する新しい方法が述べられている。近年、1細胞レベルや細胞内における温度分布を顕微計測するための様々な技術が開発されているが、2次元の温度分布を一度に画像化する方法は報告されていなかった。そこで申請者は、温度感受性の蛍光シートを開発した。蛍光シートは、カバーガラスの表面に蛍光物質を混ぜた高分子ポリマーを、スピンコートしたものである。Europium (III) thenoyltrifluoro-acetate trihydrate (Eu-TTA) と rhodamine B (RB) の2種類が蛍光物質として検討された。Eu-TTA シートが  $25^{\circ}\text{C}$  基準で  $-2.8\% / ^{\circ}\text{C}$  の感受性を示したのに対して、RB シートは  $-1.8\% / ^{\circ}\text{C}$  と、感受性が低かった。そこで本研究では Eu-TTA シートを

用いることにした。一方、1455 nm の近赤外レーザー光を対物レンズで絞りと、水に吸収させることで顕微鏡下に点熱源を形成した。この手法によって、2次元的な同心円状の温度分布が形成されることを Eu-TTA シートの蛍光イメージングによって確認した。この手法は、レーザー光を短時間照射することで、熱パルス法として活用された。

さらに、蛍光物質濃度（蛍光強度）などに依存しない蛍光温度計測法として、蛍光寿命測定法（FLIM）を採用した。用いた蛍光物質 ER thermo yellow は（筋）小胞体（Sarco/endoplasmic reticulum：SR/ER）に局在し、蛍光寿命は2つの成分からなり、HeLa 細胞中では、蛍光強度で重み付けした平均蛍光寿命は、25℃で 2.50 ns、37℃で 2.28 ns であった。この平均蛍光寿命の温度依存性は 23℃と 40℃の間で線形性を示し、その傾きは -26 ps/°C であった。この温度特性は C2C12 の筋芽細胞（myoblast）と筋管細胞（myotube）においてもほぼ同様であった。また、細胞質内の温度分布をイメージングするために、蛍光性タンパク質 mCherry を筋管細胞の細胞質内に発現させて、蛍光寿命の温度特性を調べたところ、24℃と 40℃の間で -14 ps/°C が得られた。これらの結果は、第3章の研究に応用された。

第3章では、特定の細胞内小器官近傍の温度変化に着目した。まず、HeLa 細胞をイオノマイシン（Ca<sup>2+</sup>イオノフォア）処理すると温度上昇がみられるという先行研究の結果を、ER thermo yellow によって調べ、温度上昇が 0.93 ± 0.68°C（平均±標準偏差）であることを確認した。次に、骨格筋細胞の温度変化を取り上げた。骨格筋においては震え熱発生が良く知られているが、近年、骨格筋における非震え熱発生が熱源として機能し、その原因が SR/ER に存在する Ca<sup>2+</sup>ポンプ SERCA の Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性にあると報告された。そこで、骨格筋細胞にある SR 近傍での温度変化を直接検出することが試みられた。申請者は C2C12 筋芽（培養）細胞と、それを分化させた筋管細胞を対象に、カフェイン処理によって誘導される Ca<sup>2+</sup>放出に伴う熱発生の有無を調べた。まず、筋管細胞において、ER thermo yellow の蛍光寿命は有意に短くなり、1.6 ± 0.6°C の温度上昇が捉えられた。そこで、SERCA の阻害剤であるタプシガルギンを作用させたところ、熱発生は抑制された。従って、カフェイン処理によってリアノジン受容体（RyR）を介して SR から Ca<sup>2+</sup>が放出されることにより、細胞質内と SR 内との Ca<sup>2+</sup>濃度のアンバランスに伴う SERCA の活性化が、熱産生を促すものと推論された。一方、筋芽細胞においては、SR の発達が未成熟のために、カフェイン処理による Ca<sup>2+</sup>放出と、それに伴う細胞温度の上昇が見られなかった。また、筋管細胞についてカフェイン処理による細胞質の温度上昇が調べられたが、有意な変化は見られなかった。以上の結果は、筋管細胞における温度上昇は、SR に局所的であることを示している。

第4章では、正常なヒト肺の繊維芽細胞である WI-38 細胞に熱パルスを作

用し、その  $\text{Ca}^{2+}$  濃度応答性を、 $\text{Ca}^{2+}$  インジケータ (fluo-4) を用いてイメージングした。第一に、短い熱パルス (2 s) の細胞応答性を調べたところ、熱パルスを切ったときに  $\text{Ca}^{2+}$ -burst が発生した。これは、HeLa 細胞における先行研究結果に合致した。この  $\text{Ca}^{2+}$ -burst については、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は関与せず、細胞内の小胞体に存在する SERCA と  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルのイノシトール三リン酸受容体 ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) が関与していることが明らかとなった。第二に、熱パルスの時間を長くすると (150 s)、短い熱パルスするときと同様に、熱パルスを切った時に  $\text{Ca}^{2+}$ -burst が発生したが、burst がピークに達するまでの時間が短かった。さらに、熱パルスの途中でも  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇がみられ、それに続く減衰振動が発生した。第三に、細胞の培養温度の影響 ( $25^\circ\text{C}$  と  $37^\circ\text{C}$ ) を、様々な大きさの熱パルス ( $\Delta T$ :  $0^\circ\text{C}$  から約  $15^\circ\text{C}$ ) の作用について調べたところ、 $\text{Ca}^{2+}$ -burst の大きさは培養温度によらず  $\Delta T$  が大きくなるほど増大したが、 $\Delta T$  感受性は培養温度が高い方が高かった。ところが、最終温度 (= 培養温度 +  $\Delta T$ ) で比較すると、 $25^\circ\text{C}$  の方が  $37^\circ\text{C}$  よりも、温度感受性が高かった。つまり、 $\text{Ca}^{2+}$ -burst の温度感受性は、最終温度ではなく、 $\Delta T$  によって決まっていることが分かった。これらの成果をもとに、申請者は熱パルスに対する  $\text{Ca}^{2+}$ -burst 発生 の仕組みに関するモデルを提案している。

第 5 章では本研究の成果を一つ一つ丁寧にまとめた上で、その成果の生理学的意味が述べられ、さらに、温度感受性シートの改良や、細胞温度計測と熱パルス法の応用、そして温度 (熱パルス) による細胞機能の制御などについての将来展望が述べられている。

以上のように、申請者は単一細胞の温度分布を計測する顕微鏡技術を開発し、温度変化と細胞機能との関係を明らかにした。WI-38 細胞への熱パルスに対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答性や、筋管細胞における熱発生を細胞小器官レベルで明らかにし、それらが、SERCA と  $\text{IP}_3\text{R}$  (や  $\text{RyR}$ ) の温度特性や、細胞質と ER 内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度のバランスの崩れによって生じることを明らかにした。一方、細胞内熱産生に伴う約  $1^\circ\text{C}$  の温度上昇は先行研究と同程度だったが、このような大きな温度上昇が細胞のエネルギー代謝量をもとに説明しうるのか、現在、世界的に議論が起こっている。本研究は、細胞内での熱発生が細胞内小器官という局所で起こっており、細胞内の温度分布は一様ではないことを示したものであり、1 細胞熱力学の進展に貢献するものとして、高く評価される。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。

2016 年 2 月

審査員	主査	早稲田大学教授	理学博士 (名古屋大学)	石渡信一
		早稲田大学教授	博士 (学術) (東京大学)	高野光則
		東京大学教授	博士 (理学) (早稲田大学)	船津高志

石渡信一 高野光則 船津高志