

## 論文審査の要旨及び担当者

報告番号	(甲) 乙 第	号	氏 名	橋 本 寿 之
論文審査担当者				
	主 査	内科学	福 田 恵 一	
	生理学	岡 野 栄 之	発生・分化生物学	須 田 年 生
	先端医科学	佐 谷 秀 行		
学力確認担当者：			審査委員長：岡野 栄之	
			試問日：平成26年 7月29日	
( 論 文 審 査 の 要 旨 )				
論文題名：Time-lapse imaging of cell cycle dynamics during development in living cardiomyocyte (タイムラプスイメージングを利用した心筋細胞の細胞周期動態解析)				
<p>古典的な細胞周期の解析法では細胞の固定を必要とするため、細胞周期を時間的な断片において観察するだけに限られていた。新規イメージング技術Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) は蛍光タンパク質と細胞周期依存性のユビキチン-プロテアソーム系の活性を利用し、細胞周期をリアルタイムに観察することを可能にした。本研究では心筋細胞の動的な細胞周期解析を行うために、Fucciを用いてマウス心臓におけるex vivoライブイメージング法のシステムを構築し、これを利用して心筋細胞の細胞周期動態解析の研究を行った。</p> <p>審査ではまず、本研究で用いた古典的な細胞周期解析法について質問がされた。古典的な細胞周期解析法としては、増殖マーカーPCNAやphospho-Histone H3の蛍光免疫染色及び増殖中の細胞にチミジンアナログであるEdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を取り込ませてDNAの複製を検出する方法を選択したと回答された。次に、EdUおよびBrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) の使い分けについて質問がなされた。EdUはBrdUと異なり、抗原抗体反応及びDNA変性を必要とせず、アジドとアルキンの間の銅触媒共有結合の反応により発色する。そのためEdUの方が検出感度は高く、検出処理の工程が少ないため、本研究ではEdUを選択したと回答された。続いて、成獣の終末分化した心筋細胞におけるFucciの解析について質問がなされた。成獣の心臓においては、S/G<sub>2</sub>/M期に相当する、Fucci Greenを発色する心筋細胞はほとんど観察されなかったが、心筋梗塞を作製した病的モデルマウスにおいてはFucci Greenを発色する心筋細胞の割合が増加することが観察された。これらの心筋細胞においてはcyclin A、cyclin B、cyclin D等の細胞周期進行に関わる遺伝子のmRNAが有意に上昇していたが、Fucci Greenの分解を担うユビキチンリガー複合体APC/C-Cdh1の発現量や活性についての解析はされておらず、追求すべき点であると回答された。最後に、今後この研究結果の発展性について質問がなされた。本研究により心臓のタイムラプスイメージングが可能となったため、心筋細胞周期と細胞遊走の関連性についての観察を検討している。また、S/G<sub>2</sub>/M期心筋細胞を分別し解析することにより、心筋細胞の増殖因子の同定に利用できる可能性があるかと回答された。</p> <p>以上のように、本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、マウス心臓におけるex vivoライブイメージング法のシステムを確立し、心筋細胞の細胞周期動態解析を可能とした点において有意義な研究であると評価された。</p>				