

論文内容要旨 (和文)

平成 16 年度入学 大学院博士後期課程 システム情報工学専攻 生体数理情報学講座

学生番号 04522301

氏 名 小野寿樹



(英文の場合は、その和訳を () を付して併記すること。)

論文題目 静磁界の及ぼす培養細胞の挙動変化と分子生物学的背景

1. はじめに

細胞に及ぼすミリテスラレベルの磁界影響については、統一的理解がまだ得られていない。本研究では厳密な磁界影響を調べるために異なる種類の細胞を用いて、細胞種共通の基本的機能である挙動とそれを制御する細胞内の情報伝達機構への影響を検討した。

2. 方法

標的細胞には、神経芽細胞種 (NG108-15) と線維芽細胞 (3T3 Swiss-Albino) を用いた。培養は FBS 濃度 8 % の DME 培地を適用し、温度 37 °C と CO₂ 濃度 5 % 一定の環境条件下で行った。磁界の曝露には非熱効果のみを検討するために、永久磁石が発生する平均強度 44 mT の静磁界を用いた。曝露時間は、増殖の影響を抑制するため細胞周期 (24 時間) までとした。

まず実験開始前に血清飢餓培養法を適用して細胞周期を G0/G1 期に揃え、静磁界曝露下で接着過程の形態形成を顕微鏡下に目視にて観察し、その変化を惹起する細胞内の情報伝達を以下のように解析した。

まず細胞の接着活性をクリスタルバイオレットと蛍光技術で測定し、接着活性と形態形成を制御しているアクチン線維の形態を染色技術を用いて観察することでその機能を定性的に解析した。さらにアクチン線維の構築状態に影響を及ぼす細胞内ミトコンドリアでの ATP 産生 (代謝活性) をアラマブルーを用いて測定し、その ATP 産生に必要なグルコースの取り込みの解析にフェノール硫酸法を、グルコース輸送を制御しているグルコーストランスポータ (GLUT) タンパクの遺伝子 (*glut*) 発現を RT-PCR 法を用いてそれぞれ測定した。

3. 結果

NG108-15 の場合、培養開始後 24 時間で死細胞数及び生細胞数の大きな変化はなかった。磁界曝露後 8 時間まででは形態変化率と接着活性が抑制され、細胞骨格であるアクチン線維が収縮し、代謝活性

が亢進していた。細胞のグルコース取り込みは曝露開始後 8 時間で亢進し、24 時間では逆に抑制されていた。この細胞で主に発現していると考えられる GLUT1 及び GLUT3 タンパクの遺伝子（それぞれ *glut1* 及び *glut3*）発現は、曝露開始後 8 時間では変化がなく、24 時間ではそれぞれ抑制されていた。

また 3T3-Swiss albino の場合でも、形態形成、接着活性、アクチン線維の構築及び代謝活性は NG108-15 と同様の傾向だった。

4. 考察

細胞が形態を変化させるには、アクチン線維を再構築させて接着分子を活性化させる必要がある。アクチン線維の構築は細胞内の ATP に依存し、その ATP はエネルギー源であるグルコースを細胞外から GLUT を介して細胞内に取り込んでミトコンドリアでの代謝によって産生される。これらの細胞の挙動は細胞周期に依存するため、まず細胞周期を揃えてから NG108-15 と 3T3-Swiss albino を培養してアメーバ状への形態変化を観察した結果、8 時間の静磁界曝露下ではいずれも変化率が抑制された。その際接着活性も抑制され、アクチン線維が収縮し、代謝活性が亢進した。これらは静磁界曝露による代謝活性の亢進が細胞内のエネルギー均衡を崩し、同時にアクチン線維の構築を阻害して収縮させた可能性を示唆している。さらに細胞内の情報伝達の中心的役割を担っているアクチン線維の収縮は、接着分子への情報伝達を阻害し、接着活性を抑制することで最終的に形態変化が抑制されたと考えられる。

次に 24 時間の NG108-15 への静磁界曝露では代謝活性は抑制されると報告されているので、その時間変化の機序を細胞へのグルコース輸送で検討した。細胞のグルコース取り込みは曝露開始後 8 時間で亢進し、24 時間では逆に抑制された。これは代謝活性の増減傾向と矛盾せず、ATP 産生に必要なグルコースを取り込んだことを示唆している。

グルコースの細胞内への取り込みは、主に GLUT タンパクの発現量によって制御されているので、神経芽細胞種に多く発現していると考えられる *glut1* 及び *glut3* の発現を測定した結果、8 時間では変化がなく、24 時間では両者共に抑制されていた。このことは、曝露開始後 8 時間では代謝活性やグルコース取り込み量と相関していないことを示唆しているが、*glut1* 及び *glut3* の一過性の発現亢進が既に終了していた可能性や GLUT1 及び GLUT3 タンパク自体の機能変化の可能性等、種々の要因が考えられる。一方、曝露開始後 24 時間では代謝活性、グルコース取り込み量及び *glut1* 及び *glut3* 発現の変化傾向がよく一致しており、遺伝子レベルで静磁界の影響を受けていたことが示唆された。

これらのことから、静磁界は遺伝子レベルで細胞の挙動を変化させる可能性が示唆された。

論文内容要旨 (英文)

平成 16 年度入学 大学院博士後期課程 システム情報工学専攻 生体数理情報学講座

学生番号 04522301

氏 名 小野寿樹



論文題目

Effects of Static Magnetic Field on the Cell Behavior in Culture, and Molecular Biological Background.

The present study was focused on clarifying the effects of static magnetic field on the cell behavior, the metabolic activity and the mRNA expression of glucose transporters (GLUT1 & GLUT3) of neuroblastoma NG108-15 and 3T3-Swiss albino of embryo fibroblasts. After synchronizing the cell proliferation using medium with low-concentration fetal bovine serum, the static magnetic fields (44 mT) was applied to the cultured cells (30×10^4 cells/mL) for 8 or 24 h. The results showed that the morphology of the cells was changed due to contraction of actin fibers in 8 h exposure of the static magnetic field; the cells adhesion ability was suppressed in both cell types. And the metabolic activity and the glucose uptake of NG108-15 cells were enhanced, while the GLUT1 & GLUT3 mRNA expression showed no change. In 24 h exposure, in contrast, the metabolic activity, the glucose uptake and the GLUT1 & GLUT3 mRNA expression were all suppressed in NG108-15 cells. The results suggest that the behavior change of cells observed during the static magnetic field exposure may not be cell type dependent, and may be attributed to the change in adhesion ability and actin fibers construction due to the modification of metabolic activity. Furthermore, the metabolic activity change of cells may be attributed to the change in glucose uptake caused by, at least in part, modification of GLUT1 & GLUT3 gene expression.

(12pt シングルスペース 300 語程度)

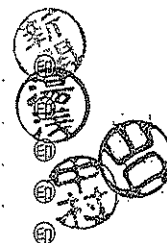
学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成 19 年 2 月 22 日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 新関 久一
副査 湯浅 哲也
副査 山口 峻司
副査 中村 孝夫
副査



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

1. 論文申請者

専攻名 システム情報工学 専攻
氏 名 小野 寿樹

2. 論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

..... 静磁界の及ぼす培養細胞の挙動変化と分子生物学的背景

3. 学位論文公聴会

開催日 平成 19 年 2 月 22 日
場 所 7 号館 307 号室

4. 審査年月日

論文審査 平成 19 年 2 月 8 日 ~ 平成 19 年 2 月 21 日
最終試験 平成 19 年 2 月 22 日 ~ 平成 19 年 2 月 22 日

5. 学位論文の審査及び最終試験の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

(1) 学位論文審査 合格

(2) 最終試験 合格

6. 学位論文の審査結果の要旨 (1,200 字程度)

別紙のとおり

7. 最終試験の結果の要旨

別紙のとおり

別紙

専攻名	システム情報工学専攻	氏名	小野 寿樹
学位論文の審査結果の要旨			
<p>磁界の生体影響を解明するために生命体の基本的モデルである細胞レベルでの研究が行われているが、現象論的報告が多く、その作用機序の解明を目的として高度に検討した例はほとんど見られていない。そこで本論文では、まず磁界の細胞挙動に及ぼす影響を明らかにし、その分子生物学的背景を検討して、細胞内の情報伝達機構への影響を一つの分子生物学的モデルとして初めて構築したものである。その内容は、以下のように6章から構成されている。</p>			
<p>第1章では、これまでの磁界と生体の関わりに基づいた磁界研究の流れを述べ、その中で生じた問題点を指摘するとともにその解決法を提案しながら、本研究の必要性と目的を示している。</p>			
<p>第2章では、本学位論文を理解するために必要な磁界の概念と、これまでに知られている生体に及ぼす影響の概略を述べ、ついで細胞の挙動を制御する細胞小器官とその機能解析のための必要事項や問題点及び留意点をまとめている。</p>			
<p>第3章では、第2章で述べた細胞小器官への磁界影響の解析に適した標的細胞の選定とその培養環境、ならびに非熱的な静磁界曝露の実験条件を示している。ついで厳密な静磁界の影響を検討するために、まず実験開始前に行う細胞周期の同調法及びその確認法を述べ、次に静磁界曝露下での接着過程の形態観察、形態変化を惹起すると考えられる接着活性・アクチン線維群の構築・代謝活性・細胞内へのグルコースの取り込みとその機能を制御するグルコーストランスポートタンパクの遺伝子発現を調べるための解析法をそれぞれ示している。</p>			
<p>第4章では細胞に静磁界を曝露すると、細胞内へのグルコースの取り込みが遺伝子レベルで変化し、それは同時に細胞内ATPの産生を変化させてエネルギー均衡を崩し、アクチン線維群を収縮させてその機能を低下させることで、細胞接着分子の活性を抑制して形態の変化を妨げた結果を示している。</p>			
<p>第5章では第4章で得られた実験結果を統合的に評価し、さらに細胞の挙動を制御する細胞内小器官への静磁界の影響を分子生物学的にも考察して、それに基づき細胞内情報伝達機構への静磁界の影響を一つのモデルとして構築している。</p>			
<p>第6章では展望までを含む結論を述べ、得られた成果を統括して残された問題点を示している。</p>			
<p>本論文は細胞レベルでの磁界影響に関する新知見を多数与えており、磁界の影響に関する生命科学領域の進歩に寄与するところ大であるばかりでなく、将来的には環境問題の理解と改善や、医療・健康分野における磁界の有効利用等の応用研究への発展性も高いと期待される。またその研究成果は、既に著明な査読付学会誌に研究論文3報（内1報は印刷中）を公表しており、社会に向け発信している。これらの結果、本審査委員グループは申請論文が博士論文に値するものであると認め、合格と判定した。</p>			
最終試験の結果の要旨			
<p>学位論文に関する質疑を口頭にて行ったところ、明瞭かつ的確に回答した。この結果、博士として必要とされる専門知識と研究能力を十分に備えているものと判断し、合格と判定した。</p>			