



Title	集束超音波による培養細胞の選択的核力学刺激および長時間スペクトル画像解析システムの開発
Author(s)	藤原, 夏実
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105430
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (藤 原 夏 実)

論文題名	集束超音波による培養細胞の選択的核力学刺激および長時間スペクトル画像解析システムの開発
------	---

論文内容の要旨

細胞核は細胞内外から様々な力を受けており、それに応じて核の力学特性や細胞機能を調節している。核が感知した力を生化学的シグナルに変換し、機能に反映するメカニズムを解明することを目指す研究分野は、核のメカノバイオロジーと呼ばれる。核が感知した力に対する細胞応答を調査するためには、核のみに直接的な力を力学刺激として印加し、高解像度な形態観察により細胞の状態や機能を長期的に評価することが求められる。また、この実験過程は、常に細胞本来の培養状態を維持可能な非侵襲的手法によって行う必要があり、これらを実現する技術の確立は核のメカノバイオロジーの発展に大きく寄与する。

しかし、選択的核力学刺激の印加においては、非侵襲性や核選択性を同時に満たす力学刺激法が存在せず、細胞の長時間観察において主に用いられる光学観察は、露光時間の制約により信号対雑音比とフレームレートが制限されるという問題がある。

一方、集束超音波は生体への侵襲性が低く、細胞に対して局所的に振動応力を与えることが可能で、細胞の音響特性分布によって細胞を観察することが可能である。つまり、上記の課題を全て解決することができる現状では唯一の手法である。そこで本論文の目的は、培養環境下において集束超音波技術により、長時間(≥24 時間)にわたって非侵襲に、単一細胞核に対する選択的力学刺激印加と超音波スペクトル画像解析による細胞の高解像観察を行うことが可能な超音波システムを開発し、実装することである。本論文第1章では、上記の研究背景と目的を述べた。

第2章では、超音波システムの構築について述べた。続いて、第3-5章では選択的核力学刺激印加への適用について述べ、第6,7章では高解像観察への適用について述べた。以下に各章の内容を具体的に示す。

第3章では、集束超音波により核に作用する周期的外力に対する力学応答の理論的背景を述べた。これを基に第4章では、音響放射力顕微鏡として局所的に音響放射力を核部分に発生させ、核を~1 Hzで周期的に変形させる力学刺激法を提案した。また、力学刺激と同時に核の粘弾性変化を計測し、刺激の影響を調査した。これにより、1 Hzの選択的な核力学刺激は、遺伝子発現を調節し、核の力学特性維持を誘導することを発見した。第5章では、核の共振現象を利用した力学刺激法を提案した。核の共振周波数を特定するため、細胞の超音波吸収における周波数依存性を調査し、核は100-150 MHzの超音波を選択的に吸収することを発見した。さらに、この吸収は核の共振由来し、この吸収帯の超音波を細胞に照射することで、核のみを選択的に力学刺激印加を行うことができる可能性を示した。

第6章では、培養細胞の超音波画像を深層学習により超解像化する技術を提案し、入力超音波画像から光学画像に匹敵する分解能の画像を生成した。3つの異なる周波数の超音波スペクトル画像から構成されたRGB画像と対応する光学画像を、独自に構築した畳み込みニューラルネットワークに学習させた。核の共振現象を利用し、高周波数(~180 MHz)のスペクトル画像にあえて低周波数(~80 MHz)の画像を組み合わせることで、核と細胞形状を捉えた光学画像に匹敵する超解像化に成功した。第7章では、培養細胞コロニーのスペクトル画像取得により、コロニーの断面形状を計測する解析法を提案する。計測した断面形状から、コロニーの大きさが直径~300 μmを超えるとドーム型になり、その後はこの形状を維持することを発見し、これは各培養段階における細胞の増殖能と遊走能のバランスによって説明可能であることを見出した。

以上のように、本論文では培養細胞に対して集束超音波を適用する独自のシステムを開発し、核のメカノバイオロジー研究における課題であった非侵襲性と核選択性を同時に満たし、且つ、刺激の強さを制御可能である力学刺激法を実現した。従来の実験に加えて本研究における提案を活用したさらなる実験を実施することは、メカノバイオロジー分野において新たな知見をもたらし、学術的発展に貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (藤 原 夏 実)			
論文審査担当者	(職) 氏 名		
	主 査	教授	荻 博次
	副 査	教授	佐野 泰久
	副 査	教授	森川 良忠
	副 査	教授	桑原 裕司
	副 査	教授	渡部 平司
	副 査	教授	有馬 健太
	副 査	教授	大参 宏昌
	副 査	教授	山村 和也
	副 査	教授	紀ノ岡 正博

論文審査の結果の要旨

細胞核は、様々な内・外力に応じて細胞の力学的性質や機能を調節しており、そのメカニズムを探索し、応用展開を目指す核のメカノバイオロジー分野が近年注目を集めている。しかし、現存の手法においては、核への力学刺激の付与は侵襲性が高く、あるいは、細胞全体にわたる巨視的刺激であるため、核本来の感受性を探索することが困難であった。つまり、生きた細胞に対して、長時間にわたって非侵襲かつ選択的に核刺激を行い、かつ、その力学的性質を評価する手法は存在しなかった。

そこで、申請者は非侵襲手法である超音波を生きた細胞核に集束させ、非接触核刺激および核の力学的性質の評価手法を可能とする集束超音波法を世界で初めて開発することに成功した。音響放射力顕微鏡を開発し、生きた細胞の1つの核に対する力学刺激および粘弾性計測を可能とするシステムを構築し、培養状態で1つの核のみに刺激を与えた際の応答を、同一の細胞に対して調べることを可能とした。また、集束させる超音波の周波数を100MHz程度にまで上昇させ、核の力学共振現象を利用した刺激法を提案している。これにより、これまでは困難であったnsオーダーの短時間の緩和現象を有する化学反応を励起することを可能とした。さらに、開発した集束超音波顕微鏡システムにより、独自に構築した深層学習法を用いて、培養細胞に対して非侵襲において24時間を超える長時間の高解像画像の取得、および、3次元形状の取得を実施することに成功している。

特に注目すべき成果は、十分な刺激を行なったとしても、核の力学的性質に大きな変化が観測されなかったことである。しかし、遺伝子解析の結果、様々なタンパク質が力学刺激に応答して発現し、核の力学的性質を維持していることを突き止めている。これまでの研究においては、侵襲性の高い手法によって核への力学刺激が実施され、その結果、核の力学的性質に大きな変化が観測された研究報告が多かった。しかし、細胞が生きた状態で、核のみへの力学刺激を実施して、同一細胞においてその後の力学的性質を正確に調べて研究は存在せず、申請者が初めてこれを実施することに成功した。細胞は、多種多様な力学刺激を常に付与される可能性があるが、それに対応して遺伝子レベルで応答し、力学的恒常性を保っていることを明らかにしている。

以上のように、申請者の開発したシステムは極めて新規性・独創性が高く、核のメカノバイオロジー研究における課題であった非侵襲性と核選択性を完全に解決しており、また得られた成果は、メカノバイオロジー分野において新たな知見をもたらすことが期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。