



Title	Multiplexed measurement of cell type-specific calcium kinetics using high-content image analysis combined with targeted gene disruption
Author(s)	田端, 智香
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92036
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	田端 智香
論文題名 Title	Multiplexed measurement of cell type-specific calcium kinetics using high-content image analysis combined with targeted gene disruption (ハイコンテンツイメージ解析とゲノム編集を組み合わせた細胞種特異的なカルシウム動態解析)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 心筋細胞の収縮は細胞質カルシウムイオン (Ca^{2+}) の動態によって制御される。循環器分野において、心筋細胞のCa^{2+}動態を測定・解析することは疾患メカニズムの解明や薬効評価など様々な場面で不可欠となる。従来のCa^{2+}指示薬を用いた細胞質Ca^{2+}測定法は、大別して多数の細胞のシグナルをwellごとなどで一塊に測定する方法、および、細胞を単層に播種し、細胞一つ一つにROIを設定して測定する方法の2つである。しかし、前者では個々の細胞の情報が欠落する、後者では多数の細胞のデータを得るために労力がかかり、測定者による細胞の選択バイアスがかかるなどの欠点が存在する。本研究では、多検体で個々の心筋細胞の細胞質Ca^{2+}動態を同時に解析できる系の構築を目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 我々は、ハイコンテンツイメージングサイトメーターであるIn cell analyzer 6000を用いて、多数の細胞の蛍光画像を一括で撮影し、個々の細胞のアイデンティティを維持したまま蛍光強度や面積など様々なパラメーターを測定できる解析系を構築した。 まず、96wellプレートに心筋細胞を播種し、Ca^{2+}蛍光指示薬であるFluo-4を投与し、生細胞のCa^{2+}蛍光色素の蛍光度を測定したのち、固定した細胞を任意のターゲットで免疫染色してもう一度撮影した。次に、生細胞画像と免疫染色画像を組み合わせ核を検出し、核膜から一定の距離を囲んだエリアの単位面積あたりの蛍光強度の変化を測定し、蛍光強度のピーク値や、蛍光強度の半減期などのパラメーターを計算した。1回のセッションあたり、数百個程度の細胞のデータを取得し、最後に必要に応じて免疫染色のプロファイルに沿って細胞を分類し、データの比較を行った。 本方法の検証のため、マウスの心房・心室筋細胞を混合状態で播種し、細胞質Ca^{2+}の半減期差異を検出できることを確認した。次に、Cas9ノックインマウス心筋細胞に、<i>Atp2a2</i>を標的とする特異的ガイドRNAをトランスフェクションして同遺伝子をノックアウトした。<i>Atp2a2</i>ノックアウト細胞では細胞質Ca^{2+}の半減期が延長することを確認し、混合培養条件下の心筋細胞で、シングルセルレベルの細胞質Ca^{2+}動態を正確に測定できることを証明した。 最後に、<i>Pkd1</i>のフレームシフト変異による心筋症発症のメカニズムの解明のため、<i>Pkd1</i>を標的とする特異的ガイドRNA作成し、上述と同様の方法で細胞質Ca^{2+}動態を測定した。その結果、<i>Pkd1</i>ノックアウト細胞では、細胞質Ca^{2+}濃度のピーク値が有意に減少することを明らかにした。 〔総括(Conclusion)〕 ハイコンテンツイメージングにゲノム編集を組み合わせた解析は、多検体における心筋細胞の動的・静的情報をバイアスなく迅速に取得可能であり、心筋症遺伝子変異の病原性評価に有用であると考えられる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)			田郷 智香
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	坂田 泰史
	副 査	大阪大学教授	望 月 香 樹
	副 査	大阪大学教授	濱 阪 善 隆

論文審査の結果の要旨

本研究は、ハイコンテントイメージングと遺伝子編集を用いて、多数の心筋細胞の細胞質カルシウムイオン(Ca²⁺)の動態を、バイアスなくシングルセルレベルに一括で測定する新規の方法を提案したものである。

イメージングサイトメーターを用いて、Ca²⁺蛍光指示薬を投与した生細胞画像と、固定細胞の免疫細胞画像を組み合わせ、細胞の核周囲の蛍光強度変化を一括で算出し、免疫染色の結果で細胞を分類してCa²⁺動態を比較した。

本方法を用いて、心筋症原因遺伝子である*Pkd1*のフレームシフト変異がCa²⁺動態に与える影響を検討した。*Pkd1*ノックアウト細胞では、細胞質Ca²⁺のピーク濃度が減少することを明らかにした。

上記の研究結果から、本方法は、心筋症発症のメカニズム解明など、様々な場面での細胞質Ca²⁺動態測定に有用なツールとなると期待される。

以上の理由から、本論文は学位授与に値すると考えられる。