

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	増殖因子固定化マイクロ粒子を用いた細胞の局所シグナル伝達機構と化学走化性の研究
Title(English)	
著者(和文)	荒津史裕
Author(English)	Fumihiko Aratsu
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9487号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田川 陽一,丸山 厚,近藤 科江,田口 英樹,森 俊明
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9487号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：生体分子機能工学	専攻	申請学位 (専攻分野)：博士 (工学)
Department of		Academic Degree Requested Doctor of
学籍番号：10D25020		指導教員 (主)：田川 陽一
Student ID Number		Academic Advisor(main)
学生氏名：荒津 史裕		指導教員 (副)：丸山 厚
Student's Name		Academic Advisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は「増殖因子固定化マイクロ粒子を用いた細胞の局所シグナル伝達機構と化学走化性の研究」と題し、以下の 6 章より構成される。

第 1 章「序言」では、本論文の背景および目的を記した。液性因子である増殖因子やサイトカインなどの刺激の空間的不均一性により誘導される細胞の化学走化性について概説し、これまでに試みられてきた増殖因子やサイトカインの空間的な制御方法や、増殖因子の可視化と局所シグナルの解析手法について述べた。また、EGF 刺激により誘導される化学走化性の分子機構やその解析手法についても概説し、本研究のアプローチについて述べた。

第 2 章「光反応性の EGF を用いた EGF 固定化マイクロ粒子の作製」では、細胞に局所的な EGF 刺激を誘起することを目的に、EGF 固定化マイクロ粒子を作製した。粒子に固定化する EGF として、EGF のカルボキシル末端側に光反応性のアジドフェニル基を有する prEGF (photo reactive EGF) を遺伝子工学的手法によって作製し、prEGF を表面にアミノ基を有するマイクロ粒子に対して光反応によって固定化した。

第 3 章「EGF レセプターの局所クラスター制御による EGF レセプターの活性化機構の解析」では、EGF レセプター (EGFR) の高発現細胞株であるヒト扁平上皮癌 (A431) 細胞を用いて、EGF 固定化マイクロ粒子に対する EGFR の活性化量や時間変化を解析した。EGF 固定化マイクロ粒子による局所刺激によって粒子近傍で EGFR が集積したクラスターの形成が確認され、細胞全体への EGFR の活性化が伝搬されることが示唆された。またその活性化量と時間変化は EGF 固定化マイクロ粒子のサイズや数に依存することが分かった。粒子サイズの違いは反応初期に観察される EGFR のクラスターサイズが異なるため細胞全体への刺激の伝搬性を制御できる。また粒子数の違いによって細胞に対する局所 EGF 刺激の時間的変化が制御されることが示唆された。これらのことから、EGF 固定化マイクロ粒子は、細胞の局所シグナル伝達機構の解析ツールとして有用であることが示された。

第 4 章「EGF の局所刺激による細胞の化学走化性評価モデルの構築」では、EGF 固定化マイクロ粒子を用いて化学走化性評価モデルを構築した。通常、液性の EGF 刺激に応答した下流シグナルの活性化は短時間で定常状態に戻る。一方、EGF 固定化マイクロ粒子の場合では、粒子と細胞の接触は断続的に生じ、長期に渡って EGF 刺激が誘導されると期待される。そこで、EGF 固定化マイクロ粒子を用いて空間的に不均一な刺激を誘導し、マウス線維芽 (Swiss 3T3) 細胞の運動性変化を長時間評価した。EGF の局所刺激によって細胞全体の ERK 1/2 の活性化を伴った細胞の自発的な方向維持運動の誘導が確認され、この方向維持運動の誘導は EGF 固定化マイクロ粒子の添加密度に依存することが確認された。そこで、細胞密度や EGF 固定化マイクロ粒子の添加密度を最適化して、細胞の化学走化性評価モデルを構築した。本モデルは、低倍率光学顕微鏡による広い視野で長期に渡って EGF 刺激の空間的不均一性に応答する細胞の走化性挙動の変化を定量評価でき、ウェスタンブロット等の生化学的手法によって細胞内のシグナル伝達も評価できることから、細胞の化学走化性の評価モデルとして有用であると考えられる。

第 5 章「EGF の局所刺激に応答した細胞の自発的な方向維持運動の分子機構の解析」では、第 4 章にて確立した細胞の方向維持運動解析による化学走化性評価モデルを用いて、細胞運動の極性に関与する各シグナル経路を阻害した際の、EGF の局所刺激に対する細胞の走化性挙動の変化を定量解析し、細胞内のシグナル伝達の変化を評価した。EGF の局所刺激による細胞の自発的な方向維持運動の誘導は、細胞骨格制御因子である Rac1, MEK1, ROCK, MLCK の阻害によって特徴が見られ、またそれらの阻害時において細胞骨格のアクチンミオシンの制御に重要な役割を担うミオシン軽鎖のリン酸化の細胞内での局在分布に違いが観察された。このことから、EGF の局所刺激による細胞の自発的な方向維持運動の誘導・維持には、従来報告されていた PI3K シグナル経路は関与せず、Rac1, MEK1, ROCK, MLCK に依存したリン酸化ミオシン調節軽鎖の局在性変化が重要な役割を担うことが示唆された。

第 6 章「総括」においては、本論文で得られた知見をまとめるとともに、今後の展望について述べた。

本研究では、増殖因子固定化マイクロ粒子を作製し、細胞の局所シグナル伝達機構や化学走化性の新たな解析手法を確立した。本手法は、化学走化性における詳細な分子機構の解明を目指した研究への貢献が期待できる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 2 部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 2 copies of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：	生体分子機能工学	専攻
Department of		
学籍番号：	10D25020	
Student ID Number		
学生氏名：	荒津 史裕	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(工学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	田川 陽一	
Academic Advisor(main)		
指導教員 (副)：	丸山 厚	
Academic Advisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Directional cellular migrations as a chemotactic response to spatially inhomogeneous growth factor stimulation play an important role in establishing physiological mechanisms and pathological events in cells. In this study, epidermal growth factor (EGF)-immobilized microbeads were developed by photoreaction, and their local stimulatory effects on the signal transduction and the dynamic chemotactic motility of fibroblasts were evaluated in detail.

Firstly, signal propagation in response to local stimulation of EGF was examined. It was found that the size and number of EGF-immobilized microbeads led to regulate signal propagation in different manners, as the size and number of local EGF receptor (EGFR) cluster were varied with those parameters. Thus, EGF-immobilized microbeads found to be useful to analyze local signal transduction.

Next, local stimulatory effects of EGF-immobilized microbeads on the chemotactic motility of fibroblasts were evaluated. The local stimulation resulted in global activation of ERK 1/2 and directionality of cellular migration. In particular, regulation of the number of EGF-immobilized microbeads influenced not only as the concentration of EGF but also as the time interval of local stimulation. This effective technique allows cellular migration and biochemical analyses that will help elucidate the mechanisms involved in signal transduction by spatially inhomogeneous stimulation of the growth factor.

Finally, the mechanisms of directional cellular migration by spatially inhomogeneous stimulation of EGF were elucidated by signal inhibition tests. The evaluation of chemotactic cellular migration and signal transduction in response to EGF-immobilized microbeads revealed that Rac1, MEK1, ROCK, and MLCK were essential for directionality of cellular migration. In addition, it was found that the distribution of phospho-MLC played a significant role in inducing and maintaining the directional migration.

In conclusion, EGF-immobilized microbeads were developed as a new technique to analyze the local signal transduction and chemotactic cellular migration by spatially inhomogeneous stimulation of EGF. This technique successfully led to elucidate the mechanisms of chemotactic cellular motility. The method proposes a new type of growth factor stimulation *in vitro* system, which would mimic spatiotemporal growth factor stimulation *in vivo*.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 2 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 2 copies of 800 Words (English).