

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	細胞外小胞ミグラソームを捕捉するペプチド界面の開発と小胞による炎症反応の誘導
Title(English)	
著者(和文)	齊藤彰吾
Author(English)	Shogo Saito
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12419号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:大河内 美奈,多湖 輝興,芹澤 武,松本 秀行,田中 祐圭
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12419号, Conferred date:2023/3/26, 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

系・コース： Department of, Graduate major in	応用化学 応用化学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学) Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名： Student's Name	齊藤 彰吾		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main) 大河内 美奈
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は「細胞外小胞ミグラソームを捕捉するペプチド界面の開発と小胞による炎症反応の誘導」と題し、全5章で構成されている。

第1章は、緒論として、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を担う細胞外小胞の機能や特性、種類について既往の知見を述べ、本研究で着目する細胞外小胞ミグラソームについて現在までに報告された研究報告を整理した。また、これら細胞外小胞の解析に向けた技術として、エクソソームを捕捉する材料や技術に関する既往の知見をまとめた。さらに、細胞間コミュニケーションと密接に関与する生体における炎症反応の経路ならびに細胞外小胞の関与を示唆する報告について説明し、本研究の目的と意義を明らかにした。

第2章では、基板と接着する特徴をもつミグラソームが細胞膜成分に富むことに着目し、ミグラソームを捕捉するために細胞膜に強く結合する細胞培養界面を構築する。本章では、細胞膜への高い結合性を有する細胞培養界面を構築した上で、細胞破碎時に細胞質側が露出した底面膜を細胞培養基板上に保持する技術を開発した。一般に細胞の足場ペプチドとしては、細胞表面にある足場タンパク質に結合するリガンド配列が使われる。一方で本研究では、細胞膜を培養基板に強く結合させるために、膜タンパク質ではなく細胞膜と相互作用する分子を培養界面に用いることを試みた。細胞膜結合性ペプチド界面上で細胞を培養し、接着率や生存率を調べた結果、毒性は低く、細胞培養が可能であることが示された。また、細胞膜結合性ペプチド界面上に接着した細胞を浸透圧ショックにより破碎することで、細胞質側が露出した細胞底面膜を培養基板上に保持させることが示された。さらに、この細胞膜結合性ペプチドの短鎖化ライブラリーを用いたキャラクタリゼーションを実施し、細胞膜への結合に重要な配列を抽出した。この短鎖化したペプチドにおいても、細胞を浸透圧ショックにより破碎することで、細胞底面膜が基板上に保持できることを示した。

第3章では、ペプチド界面を利用することでミグラソーム形成能を向上させ、さらに細胞を剥離することでミグラソームのみを分画する手法を開発した。本章では、細胞膜結合性ペプチド界面上に観察された脂質球について、多角的に検証することでミグラソームであることを確認し、細胞膜結合性ペプチドや細胞接着タンパク質に結合するペプチドを用い、ミグラソームの捕捉および分画が可能な機能性界面を構築した。まず、ペプチド界面上で観察されていた脂質球を電子顕微鏡および細胞質染色後の蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、先行研究によって定義されたミグラソームの特徴である、リトラクションファイバー上に形成される、多胞体構造をもつ、細胞質を含有するという点を満たすことを確認した。さらに、細胞膜結合性ペプチドと細胞接着タンパク質結合ペプチドを混合したペプチド界面を作製することで、キレート剤である Ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate (EDTA) を用いて細胞のみが剥離され、ミグラソームの分画が可能となることが示された。

第4章は、生体内における炎症反応を誘導する分子機構の一つであるインターロイキン6 (IL-6)アンブに着目し、その反応におけるミグラソームの機能を評価した。IL-6 アンブは、炎症を誘導するタンパク質(炎症性サイトカイン)である IL-6 が、局所的に過剰に発現誘導される機構である。これに着目し、ミグラソームがもつ近接する細胞、すなわち局所的な細胞間情報伝達における関与を明らかにすることを目的とした。TSPAN4-GFP が導入されたグリオーマ細胞に対して薬剤添加することで IL-6 アンブを誘導したところ、これらの細胞が生成したミグラソーム内の IL-6 量が上昇していることが観察された。さらに、ペプチド界面を用いて、IL-6 アンブ誘導細胞が形成したミグラソームを基板上に分画し、これに対して新たに IL-6 アンブ誘導のかかっていない通常の細胞を播種し、イメージングを行った。その結果、ペプチド界面上に捕捉されたミグラソームが、新たに播種された細胞により取り込まれる様子が観察された。またミグラソームを取り込んだ細胞において、細胞内の IL-6 発現量が上昇することを示した。これらの結果から、ミグラソームが IL-6 アンブを介した局所的な炎症誘導に関わる可能性が示唆された。

第5章は結論とし、本論文の内容を総括し、ペプチド界面による細胞底面膜やミグラソーム捕捉技術を開発し、この技術のミグラソーム機能解析への応用についてまとめた。本研究により開発された、ミグラソームのみを保持した基板を構築技術は、ミグラソームの成分分析や、他の細胞内への取り込み機構の解析などに展開できると期待される。また、本研究で得られた成果は、ミグラソームの機能解析におけるペプチド界面の有用性を示すとともに、IL-6 アンブのような自己免疫疾患に関わる分子機構の解明の一助となるものである。

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 1 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 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	応用化学 応用化学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	齊藤 彰吾		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	大河内 美奈	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

This paper proposes the technique of peptide interface design and fabrication for mammalian cell culture toward functional analyses of migrasome. Migrasome is a newly discovered extracellular vesicle that forms on retraction fibers after migrating of cells. Due to some technical issues including the effective and pure migrasome isolation, their detail functions are still unclear. In this thesis, a functional peptide interface was developed to capture and isolate migrasomes. Using the developed peptide interfaces, the relationship between migrasomes and cellular inflammation is also investigated.

This thesis consists of 5 chapters. Chapter 1 is the introduction. This chapter describes the information on extracellular vesicles for cell-to-cell communication tools and the knowledge of migrasomes in previous research. Based on the information, the purpose and significance of this paper are clarified.

In Chapter 2, prior to the peptide interface development for the capture of migrasomes, the peptides with the property of strong membrane binding for cell culture were screened out. Using the screened peptide interface, the cell membrane attaching to the interface remained even after osmotic shock for cell disruption, while their cytosol and nucleus are spread in the medium. This interface has the potential for effective capture of migrasomes and for new drug screening technique development.

Chapter 3 describes a method for improving the migrasome formation and fractionation of migrasomes using peptide interface. By the addition of a functional peptide with cell adhesion protein binding property to the previously screened peptide interface, only migrasomes have remained on the peptide interface when the cells with migrasomes were treated by a chelate solution for disrupting the interaction between the supplemented peptide and cell membrane protein.

Chapter 4 shows the functional analysis of migrasomes for the inflammatory reaction using a peptide interface. One of the expected functions of migrasomes is a tool to communicate with neighboring cells. In this chapter, we focus on the IL-6 amplifier of local inflammatory response. Migrasomes released by cells that induced IL-6 amplifier were obtained by using a peptide interface. When these migrasomes were added to different cells, the induction of IL-6 amplifiers in these recipient cells was confirmed. This result suggests that migrasomes are related to the inflammatory response.

In chapter 5, the results obtained in this thesis were summarized, and the future aspects related to this research is discussed.

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 1 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 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).