

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)	要約
Type(English)	Outline

# 学位論文要約

物質理工学院 応用化学系

齊藤 彰吾

## 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

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内容を整理した。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炎症反応における代表的な反応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、本研究の目的と位置づけを明らかにした。

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することを目的とした。

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。この細胞膜結合性ペプチド界面上で細胞を培養し、その接着率、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できた。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。この細胞培養基板は、細胞膜成分をもつ構造を強固にとらえることが可能であることが確認され、またこれを利用して得られる細胞質側を露出した細胞底面膜は、将来的に新たなドラッグスクリーニング技術の開発へと展開されることが期待される。

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の形成能を向上させ、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、研究室の先行研究により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の足場タンパク質に結合するペプチドを混合したペプチド混合界面を用い、ミグラソームの捕捉および分画が可能な界面を構築した。

まず、ミグラソーム形成を簡便に観察及び計数するため、遺伝子組換え技術を用いて、ミグラソームマーカーである膜タンパク質テトラスパニン4 (TSPAN4) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質 (TSPAN4-GFP) を発現する細胞株を作製した。これによりミグラソーム形成のライブイメージング観察が可

能となり、これまで報告されていない様々な細胞においても、ペプチド界面上でミグラソーム形成が確認できた。

次に、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うことで、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先行研究によって定義されたミグラソームの3つの特徴を全て満たすことを確認した。これより、この脂質球はミグラソームであることを示した。さらに、細胞膜結合性ペプチドと足場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) を用いて細胞を剥離でき、ミグラソームの分画が可能であることが示された。ミグラソームのみを保持した基板を調製できたことから、今後この技術は、ミグラソームの成分分析やミグラソームと他の細胞との相互作用並びに取り込み機構の解析などに展開できると期待される。

第4章は、生体内の局所で炎症反応を誘導する分子機構の一つである 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、炎症を誘導するサイトカインタンパク質であるインターロイキン6 (IL-6) が、免疫細胞だけでなく非免疫細胞などでも過剰に発現誘導される機構である。本章では、IL-6 アンブの局所的におきる生命現象に着目し、ミグラソームがもつ局所的な細胞間情報伝達における寄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、IL-6 遺伝子の過剰発現が確認された。これらの細胞では、誘導前と比較してミグラソーム形成数に変化はなかった。一方で、IL-6 抗体を用いた免疫染色により、ミグラソームに含まれる 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細胞を播種し、イメージングを行った。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取り込まれる様子が観察され、ミグラソーム内の IL-6 が細胞に取り込まれていることが示唆された。IL-6 アンブ誘導細胞が形成し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、これまで IL-6 アンブは、可溶性サイトカインの細胞外への放出により周辺細胞へ炎症が誘導されるという分子機構を中心に説明されてきたが、本研究により、ミグラソームなどの細胞外小胞を介した炎症誘導機構の存在が初めて示唆された。

本章の結果は、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研究成果であり、今後、より詳細な機能解明が期待される。

第5章は結論として、ペプチド界面による細胞膜やミグラソームの捕捉法の開発やミグラソームの機能解析への利用など、本論文で得られた研究成果を総括した。そして、本研究で示唆されたミグラソームによる IL-6 アンブ誘導機構について、今後どのような研究開発が求められるのかなど、本研究に関わる今後の研究展開についての展望を示した。