

別紙様式 2

学位論文要旨

所属専攻 理学 専攻

氏 名 岡田 咲耶

論文題名

HeLa 細胞由来の大型膜ベシクルの構造とヒト培養細胞との相互作用に関する研究

要 旨

細胞膜で仕切られた直径が 5-20 μm の球状の構造体「大型膜ベシクル」をヒト子宮頸がん細胞株 HeLa から調製して構造と生細胞との相互作用を解析した。その結果、小型の細胞外ベシクルであるエクソソームやマイクロベシクル、あるいは人工脂質膜リポソームとは異なるヒト細胞由来の大型膜ベシクルの属性や細胞適合性が明らかになり、細胞機能操作や保健医療への応用につながる成果を得た。

本論文は第 1 章から第 7 章で構成される。

第 1 章 諸言

全ての細胞は共通の構成要素として「細胞膜」を有する。細胞膜の研究は、細胞から単離した膜成分の直接的な生化学的分析や、生体膜モデルである人工脂質膜リポソームを用いた分析により進められているものの、細胞膜から形成される膜ベシクル（膜小胞）の構造と機能は不明な点が多い。1976 年に Scott により、生細胞の細胞膜の状態を正確に反映する直径 5-20 μm の giant plasma membrane vesicles (GPMVs) が発見され (*Scott et al. Science 1976*)、脂質ラフト仮説に基づいて脂質二重層膜の不均一性や界面活性剤などの薬剤に対する細胞膜の耐性、膜表層のタンパク質の挙動の研究に活用されてきた。しかし、その内部構造や細胞との相互作用に関する解析はほとんどなかった。

第 2 章 HeLa 細胞由来の大型膜ベシクルの調製

Scott による GPMVs の調製法に改変を加え HeLa 細胞に適用したところ、 1.0×10^7 (10-cm dish) の HeLa 細胞から $9 \times 10^6 / \text{ml}$ の大型膜ベシクルを生産できるようになり、

Scott 法の約 200 倍の生産効率を得た。また調製過程をタイムラプス解析した結果、膜表面の変化に「膜ブレップ化」と「膜ベシクル化」の 2 段階があることが明らかになった。

第 3 章 大型膜ベシクルの構成成分と構造

HeLa 細胞から調製した大型膜ベシクル画分を Percoll 密度勾配により精製し、タンパク質分析を行った結果、HeLa 細胞の細胞質中に豊富に存在している可溶性タンパク質が多種類含まれることが明らかになった。一方、RNA 分析からは、25 nucleotide (nt) から 6000 nt に及ぶ様々な長さの RNA が大型膜ベシクル内に存在することが明らかになった。さらに、電子顕微鏡を用いた微細構造の観察やタンパク質、RNA、脂質、糖鎖に特異的な蛍光染色剤による可視化実験を実施し、HeLa 細胞由来の大型膜ベシクルの基本構造を推定した。

第 4 章 大型膜ベシクルと培養細胞の相互作用

対数増殖期の HeLa 細胞を含む培養液に calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM) もしくは propidium iodide (PI) で内容物を蛍光標識した大型膜ベシクルを添加して、大型膜ベシクルと生細胞の相互作用を解析した結果、標準的な培養条件では大型膜ベシクルの細胞毒性は極めて低いことが明らかとなった。また、受容細胞の表層膜を糖鎖分解酵素 α -2,3,6,8 neuraminidase で前処理したところ、calcein-AM や PI の蛍光シグナルの細胞内取り込みが促進された。なお、HeLa 以外の細胞株 8 種を用いたところ、糖鎖の状態が異なる細胞株に対して大型膜ベシクルの内容物の取り込み効率が異なることも明らかになった。これらの結果から、細胞表層の糖鎖状態が、大型膜ベシクルと細胞との相互作用に重要であることが示唆された。

第 5 章 大型膜ベシクルを用いた薬剤送達

抗がん剤 doxorubicin と免疫活性化剤 curcumin を HeLa 細胞由来の大型膜ベシクルと混合したところ、大型膜ベシクル内部にこれらの薬剤が取り込まれ、長時間にわたって内部に維持されることが明らかになった。これらの薬剤を含む大型膜ベシクルを α -2,3,6,8 neuraminidase 処理した HeLa 細胞やマクロファージ由来の J774-1 細胞と共培養したところ、doxorubicin を含む大型膜ベシクルではアポトーシスが誘導され、curcumin を含む大型膜ベシクルではリポ多糖に対する抗炎症作用の亢進が観察された。これらの結果は、ドラッグデリバリーにおける薬剤輸送担体として大型膜ベシクルを活用できる可能性を示すと考えられた。

第 6 章 大型膜ベシクルと細胞の相互作用時に観察される膜形体の変化

HeLa 細胞由来の大型膜ベシクルと培養細胞の相互作用を観察する中で、ベシクル膜および受容細胞の表層膜の形体変化について観察した。その結果、表層膜のチューブ化や融

合を観察した。これらの観察結果は、大型膜ベシクルと細胞との相互作用の分子機序を明らかにする手掛かりになると考えられた。

第7章 総括

本論文では、1976年に Scott が報告した GPMVs 調製法を改良して、細胞由来の大型膜ベシクルの研究を発展させ、その構造と生細胞との相互作用に関する新たな知見を蓄積した。HeLa 細胞由来の大型膜ベシクルがタンパク質や RNA、さらには外部から導入された薬剤を保持する能力があることを示し、ヒト培養細胞との共培養実験を行い、糖鎖状態の変化に応じて大型膜ベシクルの内容物が細胞内部に移行することも明らかにした。特に、 α 2-3,6,8 neuraminidase 処理による相互作用の変化は、シアル酸を含む糖鎖構造が大型膜ベシクルの取り込みに関与することを示している。本論文の研究成果は、エキソソームといった小型の細胞外ベシクルやリポソームなどの膜ベシクルに加え、細胞由来の大型膜ベシクルを基礎バイオロジーおよび保健医療の研究分野で活用できる可能性を示している。