

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01726

研究課題名(和文) バイオアクティブペプチド界面を利用したミグラソームの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of migrasomes using bioactive peptide interfaces

研究代表者

大河内 美奈 (Okochi, Mina)

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：70313301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞がその移動の軌跡を示すかのようにリトラクションファイバーに形成する大きさ1 μm 程度の生体膜小胞であるミグラソームに着目し、その形成機構および周囲の細胞との情報伝達に関する解析を行った。ミグラソーム形成機構における細胞膜張力の関与について検討するため、低浸透圧ストレスにより細胞膜張力を増加させたところ、短時間ではあるがリトラクションファイバーにミグラソーム様小胞の形成が確認された。また、細胞に炎症反応を誘導し、その細胞が形成したミグラソームを分画して新たに細胞に播種することで、ミグラソームを介した情報伝達が可能であると明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞遊走は、細胞の基礎的な特性であるが、近年になるまで細胞移動後に表出されるリトラクションファイバーやミグラソームに関する報告はなかった。本研究では、ミグラソームの形成機構および周囲の細胞との情報伝達に関する解析を目的とし、細胞への浸透圧ストレスや炎症誘導を行い、解析を進めた。細胞外小胞は、様々な細胞プロセスや疾患の進展にも関与することから注目されているが、ミグラソームは、サイズが大きく細胞接着面に形成される特性から、近場の細胞との情報伝達に大きく寄与するものと期待される。細胞外小胞は、様々な細胞プロセスや疾患の制御にも貢献する可能性があり、学術的にも社会的にも意義がある知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Migrasomes are extracellular vesicles that form on the retraction fibers of migrating cells. In this study, we observed the formation of migrasome-like vesicles enriched in tetraspanin 4 and containing cytoplasmic components in response to hypoosmotic stress. When migrating cells were subjected to hypoosmotic stress, vesicles with a size distribution of 0.5 to 2 μm formed on the retraction fibers, and vanished in a few minutes. These results indicate the increase in cell membrane tension by cell migration induced the formation of migrasomes. Migrasomes were also found to contribute to intercellular communication and propagation of inflammatory responses, shedding light on their role in mediating cytokine signaling.

研究分野：生物機能工学

キーワード：細胞外小胞 ミグラソーム 細胞遊走 低浸透圧ストレス サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体は、多様な細胞から構成されており、各々の細胞が近接または遠隔の細胞と情報伝達することで、生命としての機能を維持している。細胞間情報伝達に關与する分子機構は複数報告されているが、近年、エクソソームと呼ばれる分泌小胞が、血液、唾液、尿などからも見出され、様々な疾患と關連する情報を有することから診断・治療の面から注目されている。エクソソームに代表される細胞外小胞は、細胞から直接、培養液中に放出されるのに対し、本研究で着目するミグラソーム(migrasome)は、細胞遊走(migration)に伴って培養面上にその移動の軌跡を示すかのようにリトラクションファイバーの交点などに形成される(Ma *et al.* Cell Res. 25:24-38, 2015) という特徴をもつ。また、電子顕微鏡観察より、小胞内に複数の小さな小胞を内包するザクロ様の構造を有することも明らかになった。さらに、ミグラソームが形成する際には、膜4回貫通型の膜タンパク質であるテトラスパニン4がミグラソーム膜にコレステロールと共に集合し、マイクロドメインを形成することが示唆された(Huang *et al.* Nat. Cell Biol. 21:991, 2019)。ミグラソーム膜が壊れて中身が出てくることはミグラサイトーシス(migracytosis)と呼ばれ、細胞間情報伝達物質である Cxcl2 の供給源としてゼブラフィッシュの原腸胚形成の調節に寄与することが示唆された(Jiang *et al.*, Nat. Cell Biol. 21:966, 2019)。このような背景から、ミグラソームは細胞間の情報伝達に寄与することが期待される。しかし、ミグラソームに関する研究報告は非常に乏しく、その形成機構や細胞間情報伝達における機能解明に向けて、更なる解析が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞がその移動の軌跡を示すかのようにリトラクションファイバーの交点などに形成する大きさ 1 μm 程度の生体膜小胞(ミグラソーム)に着目し、その形成機構および周囲の細胞との情報伝達に関する解析を目的とした。

当研究グループでは、ミグラソームを安定的に捕捉できる生体膜親和性のペプチド界面の構築について取り組み、ペプチド修飾基板上での細胞培養によるミグラソームの形成、EDTA 溶液による細胞剥離(ミグラソーム等の接着成分は保持)、ミグラソーム回収に関する方法を確立してきた(Saito *et al.*, Mater. Sci. Eng. C. 131:112495, 2021)。そこで、生体膜親和性ペプチドの修飾基板を解析プラットフォームとして使用することで、(1)ミグラソームの形成機構、(2)ミグラソームの回収と細胞導入による応答の解析、(3)ミグラソームを介した細胞間情報伝達に関する解析を行うこととした。

3. 研究の方法

ミグラソーム形成機構の解析には、ヒト脳神経膠芽腫(H4)細胞を用いた。リトラクションファイバーおよび形成されるミグラソームを観察するため、これらに豊富に含まれるテトラスパニン4(TSPAN4)に緑色蛍光タンパク質(superfolder GFP)とリボソームスキップ配列(T2A)を挟んで mCherry を連結したプラスミドを作製し、H4 細胞に導入した。これらの細胞をフィブロネクチン修飾した 96 well ガラス基板に播種し、一晚培養した。低浸透圧ストレスは、培地と等量の滅菌水(100 μL)を培地に添加により行い、その際のリトラクションファイバーの形状変化および細胞質の蛍光強度を蛍光顕微鏡にて数秒毎に撮影し、解析した。

アミノ基修飾基板上に、インテグリンリガンドである RGDS ペプチドと細胞膜結合ペプチドを混合してペプチド修飾基板を作製した。混合ペプチド修飾基板上で細胞を培養後、インテグリンを介した細胞接着を阻害する 10 mM EDTA を含む PBS に 30 分間浸漬することで細胞を剥離し、基板上にミグラソームを分画した。混合ペプチド修飾基板上に、H4 細胞を播種し、一晚培養した。その後、IL-6 などの炎症性サイトカインを添加することで IL-6 アンプによる炎症誘導を行った。これらの細胞が分泌したミグラソームをペプチド修飾基板上に分画し、新たに非誘導細胞を播種して培養することで、ミグラソームを介した炎症誘導について評価した。

4. 研究成果

まず、ミグラソーム形成機構における細胞膜張力の関与について検討した。ミグラソームの形

成場となるリトラクションファイバーは細胞移動に伴い、接着面に取り残されるように表出され、ミグラソーム形成にはリトラクションファイバーにかかる細胞膜張力が関与する可能性が示唆されている。そこで、低浸透圧ストレスにより細胞膜張力を増加させた際のリトラクションファイバーに小胞形成などがみられるか観察した。蛍光顕微鏡観察下において、培地と等量の滅菌水を滴下することで低浸透圧ストレスを与えたところ、直径 0.5-2.0 μm の TSPAN4 が局在するミグラソームと類似した小胞が一時的に多数形成される様子がみられた（図 1）。また、形成されたミグラソーム様小胞に細胞質成分が移動する様子が観察された他、小胞にコレステロールが局在することが観察された。一方、リボタンパク質欠損血清を含む培地で培養した細胞においては、ミグラソーム様小胞の形成数は有意に減少した。これより、低浸透圧ストレスによる小胞形成においてもミグラソームと同様に、TSPAN4 およびコレステロールが関与することが示された。生細胞に細胞遊走非依存的に膜張力をかけることでリトラクションファイバー上に小胞形成がみられたことから、ミグラソーム形成には細胞移動に伴い生じる膜張力が関与しており、小胞形成メカニズムの一端を示すことができた。

次に、ミグラソームを介した細胞間情報伝達について検討するため、細胞への炎症誘導を行った。ペプチド修飾基板上で H4 細胞の培養を行い、IL-6 アンプによる局所的な炎症反応を誘導した。炎症誘導後、EDTA 処理による細胞剥離を行った後に、ミグラソームが捕捉された基板に炎症非誘導細胞を播種した。細胞の IL-6 発現量を解析した結果、基板上的ミグラソームを介して新たに播種した細胞においても IL-6 発現量の上昇が確認された。ミグラソームを介した細胞への IL-6 アンプは、超遠心により分離したミグラソームを接着細胞に添加した際にも確認された他、異種細胞においても確認された。以上のことから、IL-6 アンプ誘導細胞が形成したミグラソームを介した情報伝達が可能であることが示唆された。従来、サイトカインは細胞から産生される液性因子として分泌されて情報伝達に寄与するとされてきたが、ミグラソームを介した情報伝達経路も存在することが示唆された。

本研究では、細胞が遊走后にリトラクションファイバー上に形成する小胞ミグラソームの形成過程および機能解析を行い、細胞接着面のミグラソームを介した細胞間情報伝達に関する新たな知見が得られた。ミグラソームは、細胞接着面に形成され、比較的サイズも大きいことから近場の細胞間情報伝達において大きな役割を果たすことが期待される。

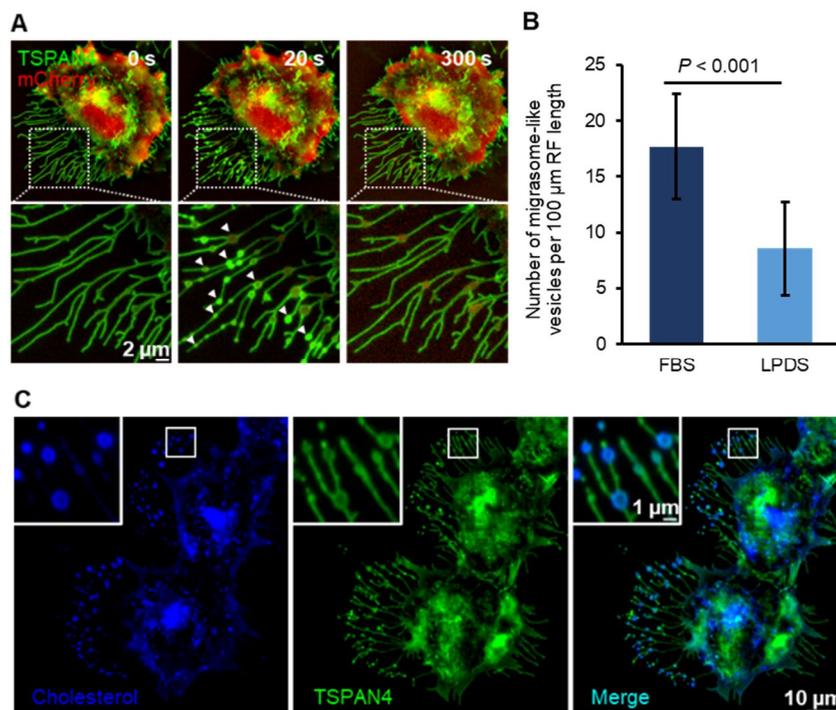


図 1 低浸透圧ストレスによるミグラソーム様小胞の形成。
 A. H4/TSPAN4-sfGFP/mCherry 細胞に低浸透圧ストレスを誘導した後、各経過時間での蛍光顕微鏡画像を撮影した（緑色: TSPAN4-sfGFP, 赤色: mCherry (細胞質))。
 B. コレステロール量が異なる培地で培養した細胞を用いて低浸透圧ストレスにより形成されるミグラソーム様小胞の形成数を比較した（10% FBS, 10% LPDS 含有培地）。
 C. ミグラソーム様小胞の filipin 染色によるコレステロール局在性評価。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suwatthanarak Thanawat, Ito Kazuma, Tanaka Masayoshi, Sugiura Kei, Hoshino Ayuko, Miyamoto Yoshitaka, Miyado Kenji, Okochi Mina	4. 巻 146
2. 論文標題 A peptide binding to the tetraspanin CD9 reduces cancer metastasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomaterials Advances	6. 最初と最後の頁 213283 ~ 213283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioadv.2023.213283	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suwatthanarak Thanawat, Usuba Kei, Kuroha Kotomi, Tanaka Masayoshi, Okochi Mina	4. 巻 13
2. 論文標題 Screening of EWI-2-Derived Peptides for Targeting Tetraspanin CD81 and Their Effect on Cancer Cell Migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 510 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13030510	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rungreungthanapol Tharatorn, Homma Chishu, Akagi Ken-ichi, Tanaka Masayoshi, Kikuchi Jun, Tomizawa Hideyuki, Sugizaki Yoshiaki, Isobayashi Atsunobu, Hayamizu Yuhei, Okochi Mina	4. 巻 95
2. 論文標題 Volatile Organic Compound Detection by Graphene Field-Effect Transistors Functionalized with Fly Olfactory Receptor Mimetic Peptides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4556 ~ 4563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c00052	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Kazuki, Chida Shunsuke, Suwatthanarak Thanawat, Iida Mikiko, Zhang Min, Fukuyama Mao, Maeki Masatoshi, Ishida Akihiko, Tani Hirofumi, Yasui Takao, Baba Yoshinobu, Hibara Akihiko, Okochi Mina, Tokeshi Manabu	4. 巻 22
2. 論文標題 Non-competitive fluorescence polarization immunosensing for CD9 detection using a peptide as a tracer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 2971 ~ 2977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2lc00224h	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Woo Hyunjeong, Kang Seung Hyun, Kwon Yejin, Choi Yonghyun, Kim Jiwon, Ha Don-Hyung, Tanaka Masayoshi, Okochi Mina, Kim Jin Su, Kim Han Koo, Choi Jonghoon	4. 巻 12
2. 論文標題 Sensitive and specific capture of polystyrene and polypropylene microplastics using engineered peptide biosensors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 7680 ~ 7688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA08701K	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Shogo, Tanaka Masayoshi, Tatematsu Soichiro, Okochi Mina	4. 巻 131
2. 論文標題 Peptide-modified substrate enhances cell migration and migrasome formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 112495 ~ 112495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2021.112495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Masayoshi, Ueno Yu, Miyake Takahiro, Sakuma Takahiro, Okochi Mina	4. 巻 133
2. 論文標題 Enrichment of membrane curvature-sensing proteins from Escherichia coli using spherical supported lipid bilayers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 98 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.10.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Choi Yonghyun, Kim Jiwon, Chae Jayoung, Hong Joohye, Park Jongjun, Jeong Eunseo, Kim Hayoung, Tanaka Masayoshi, Okochi Mina, Choi Jonghoon	4. 巻 342
2. 論文標題 Surface glycan targeting for cancer nano-immunotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 321 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2022.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計28件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 大河内美奈
2. 発表標題 シングル細胞解析支援技術の開発
3. 学会等名 JASISトピックスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大河内美奈
2. 発表標題 テトラスパニンCD9機能制御ペプチドの開発によるがんの浸潤・転移抑制
3. 学会等名 第10回 DSANJ Digital Bio Conference 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤彰吾、田中裕圭、大河内美奈
2. 発表標題 グラフェン結合ペプチドを用いた細胞外小胞ミグラソーム捕捉場の構築
3. 学会等名 2022電気化学秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猿渡翔、ルンルヤンタナポンタラトン、本間千柊、田中祐圭、富沢英之、杉崎吉昭、磯林厚伸、早水祐平、大河内美奈
2. 発表標題 ペプチド修飾グラフェンFETによる超高感度スカトール検出
3. 学会等名 2022電気化学秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猿渡翔、ルンルヤンタナボン タラトン、本間千柊、田中祐圭、富澤英之、杉崎吉昭、磯林厚伸、早水裕平、大河内美奈
2. 発表標題 スカトール結合性ペプチドの探索による匂い分子の特異的GFET検出
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤彰吾、立松宗一郎、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 グラフェン上に細胞質側の細胞膜を露出させるペプチド界面の設計
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tharatorn Rungreungthanapol、本間千柊、田中祐圭、杉崎吉昭、富澤英之、磯林 厚伸、早水裕平、大河内美奈
2. 発表標題 Investigation of olfactory mimetic peptide functionalized graphene field effect transistor for sensitive and selective limonene sensing
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大河内 美奈
2. 発表標題 ペプチドとナノ材料を利用したバイオアクティブ細胞界面の構築
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桐木友花、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 ペプチドによる金粒子のバイオナノミネラリゼーションと触媒活性評価
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡莉央那、齊藤彰吾、桐木友花、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 がん細胞の光温熱療法に向けた三角金ナノプレート合成ペプチドの探索
3. 学会等名 第11回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川晃生、齊藤彰吾、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 炎症誘導細胞が遊走後に形成するミグラソームの解析
3. 学会等名 第11回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大河内美奈、Suwatthanasarak Thanawat、伊藤和真、黒羽ことみ、田中祐圭
2. 発表標題 テトラスパニンCD9結合性ペプチドによるエクソソームの形成制御
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山澤奈穂、梅井美和子、渡邊健一、中村慶己、田中祐圭、早水裕平、大河内美奈
2. 発表標題 単層二硫化モリブデンを用いた破骨細胞の活性イメージング
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 師岡真佑、上野佑、三宅貴大、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 人工曲面生体膜材料を用いた大腸菌由来の生体膜曲率認識タンパク質の探索
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大河内美奈、黒羽ことみ、スワタナラク タナワット、田中祐圭
2. 発表標題 CD9結合ペプチドを用いたがん細胞の運動性制御
3. 学会等名 電気化学会第90回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡莉央那、齊藤彰吾、桐木友花、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 ペプチドアレイを用いた三角金ナノプレート粒子を合成するペプチドの探索
3. 学会等名 電気化学会第90回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名	Rungreungthanapol Tharatorn、本間 千柊、田中 祐圭、杉崎 吉昭、磯林 厚伸、早水 裕平、大河内 美奈
2. 発表標題	Olfactory receptor derived peptide-based graphene field effect transistor sensor for highly sensitive limonene detection
3. 学会等名	電気化学会第89回大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	桐木 友花、田中 祐圭、大河内 美奈
2. 発表標題	ミネラルゼーションペプチドにより合成された金ナノ粒子の触媒活性
3. 学会等名	電気化学会第89回大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	稲垣 理紗、田中 祐圭、大河内 美奈
2. 発表標題	アレルギー症状の層別化診断を目指した脱顆粒反応検出に基づくIgEエピトープ解析
3. 学会等名	化学工学会第87年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	薄場 圭、スワッターラット タナワット、田中 祐圭、大河内 美奈
2. 発表標題	がん細胞遊走阻害に向けたEWI-2由来テトラスパニンCD81結合性ペプチドの探索
3. 学会等名	化学工学会第87年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 齊藤彰吾、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 機能性ペプチドを用いた細胞外小胞ミグラソーム捕捉場の構築
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大河内美奈
2. 発表標題 Peptide array-based functional peptide probe screening for microsystem analysis
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shogo Saito, Soichiro Tatematsu, Masayoshi Tanaka, Mina Okochi
2. 発表標題 Cell culture interface constructed on graphene by peptides
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Thanawat Suwattharak, Masayoshi Tanaka, Mina Okochi
2. 発表標題 Inhibition of cancer-cell migration by CD9-binding peptide
3. 学会等名 Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tharatorn Rungreungthanapol, Chishu Homma, Masayoshi Tanaka, Yoshiaki Sugizaki, Atsunobu Isobayashi, Yuhei Hayamizu, Mina Okochi
2. 発表標題 Limonene detection by insect olfactory-mimetic peptide coupled graphene field effect transistor
3. 学会等名 Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大河内美奈
2. 発表標題 Peptide functionalized biodevices for biomedical applications
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大河内美奈
2. 発表標題 ペプチドアレイを利用した分子標識プローブの設計
3. 学会等名 IGMリエゾンラボ炎症シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. Sekido, S. Hattori, M.Tanaka, A. Arima, M. Tsutsui, M. Taniguchi, T. Washio, M. Okochi
2. 発表標題 Selective bacterial detection using solid-state pore sensor device
3. 学会等名 31st Anniversary World Congress on Biosensors (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	田中 祐主 (Tanaka Masayoshi) (60533958)	東京工業大学・物質理工学院・准教授 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------