

氏名	谷 夢希		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	理学		
学位授与番号	博甲第	6396	号
学位授与の日付	2021年 3月 25日		
学位授与の要件	自然科学研究科 地球生命物質科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Development of Rapid Collection and Analytical Methods for Exosomes (エクソソームの迅速捕集・分析法の開発)		
論文審査委員	教授 金田 隆	教授 鈴木 孝義	准教授 武安 伸幸
学位論文内容の要旨			
<p>エクソソームは、ほとんどの細胞から分泌される直径 50-150 nm 程度の細胞外小胞の一つである。表面には親細胞由来の脂質やタンパク質を、内部には miRNA や mRNA, DNA を含んでおり、これらの情報を他の細胞に伝えることで細胞間コミュニケーションの役割を担っている。そのため、近年、エクソソームに関する多くの研究が行われているが、単離や成分分析には多くの困難がある。これらの問題を解決するために、抗原抗体反応に基づくエクソソーム膜タンパク質の超微量分析法、並びに光が生ずる物理的な力(光圧)を利用して、短時間かつ高効率にエクソソームを単離捕集する方法を開発した。まず、キャピラリー電気泳動-レーザー励起蛍光検出法(CE-LIF)を利用し、エクソソームに発現する膜タンパク質 CD63 の定量に初めて成功した。エクソソームと CD63 蛍光抗体をあらかじめ反応させた後、遠心分離によって未反応の蛍光抗体を抽出し、その濃度を CE-LIF により測定した。一定の抗体量に対してエクソソームを増加させると、未反応の抗体に由来するシグナルは比例的に減少し、その傾きからエクソソームの表面に発現する CD63 量の定量に成功した。一方、光圧を用いた培地からのエクソソーム単離のために、まず、金ナノ粒子の添加が光圧による小胞捕集の効率を高めることに着目し、この機構の解明に取り組んだ。その結果、金ナノ粒子と小胞が疎水性相互作用と静電相互作用により結合し、小胞に働く光圧が増強することを明らかとした。加えて、得られた結果から小胞に結合する金ナノ粒子の数を推定するモデルを提案した。このモデルから、小胞の表面電荷と対になるように金ナノ粒子の表面電荷を制御し、濃度を最適化することで、小胞の捕集効率をさらに高めることができることを示した。この結果をエクソソームの捕集へと適用し、培地からエクソソームを捕集できるシステムを開発した。エクソソームは負電荷を持つため、正電荷の金ナノ粒子と、正電荷に修飾したキャピラリーを培地に加え、光圧で捕集した。捕集したエクソソームを開発した CD63 の定量法により測定し、150 倍のエクソソーム濃縮に成功した。さらに、エクソソーム表面上に過剰発現する膜タンパク質 CD81 の抗体を修飾した正電荷金ナノ粒子を合成して用い、250 倍のエクソソーム濃縮に成功した。</p> <p>開発したエクソソーム捕集法は、光圧を用いた非侵襲かつ非破壊的な方法であり、かつ従来法に比較して極めて迅速である。したがって、エクソソームをバイオマーカーとして利用する際のエクソソーム単離法として有望である。また、開発したエクソソーム膜タンパク質の計測法は、世界で初めてエクソソーム膜上のタンパク質の定量に成功したものである。これらの捕集法、計測法を組み合わせた方法はエクソソームをバイオマーカーとするがん診断法への応用が期待できる。</p>			

論文審査結果の要旨

本論文では、抗原抗体反応に基づくエクソソーム膜タンパク質の超微量分析法、並びに光圧を利用する迅速かつ高効率なエクソソーム捕集法を開発している。エクソソーム膜タンパク質の超微量分析法の研究では、キャピラリー電気泳動-レーザー励起蛍光検出法（CE-LIF）を利用し、従来困難であった膜タンパク質のひとつ、CD63の定量に初めて成功した。エクソソームと抗CD63蛍光抗体を反応させ、未反応の蛍光抗体を抽出後、その濃度をCE-LIFにより測定した。一定の抗体量に対してエクソソームの添加量を増加させると、未反応蛍光抗体の量はエクソソーム量に比例して減少することを発見した。エクソソームの添加量と蛍光抗体の減少量の関係から、エクソソーム表面に発現するCD63の定量を実現した。一方、光圧を用いたエクソソーム捕集法の研究では、金ナノ粒子を添加することで小胞に働く光圧が指数関数的に増大することを明らかにした。金ナノ粒子による光圧の増強効果は、小胞と金ナノ粒子の静電相互作用と疎水性相互作用に起因することを実験とモデルによって実証した。この結果に基づき、金ナノ粒子を用いるエクソソームの光圧捕集・分析法を開発した。細胞培養培地からエクソソームを捕集するために、キャピラリーを用いたフロー捕集システムを構築した。エクソソーム表面は負電荷に帯電していることから、正電荷の金ナノ粒子と内壁を正電荷に修飾したキャピラリーがエクソソーム捕集に適していることを示した。正電荷のキャピラリー内に、正電荷の金ナノ粒子を添加した細胞培養培地を流し、レーザー光をON/OFFさせることで、迅速かつ簡便にエクソソームを捕集、回収する方法を開発した。回収したエクソソーム量をCE-LIFによって測定し、わずか30分程度の捕集でエクソソームを150倍濃縮できることを明らかにした。さらに、エクソソームマーカーである膜タンパク質CD81の抗体を修飾した正電荷金ナノ粒子を用いることで、250倍のエクソソーム濃縮に成功した。

本論文で得られた成果は、エクソソーム研究の発展において重要な知見を与えるとともに、今後の応用が期待されるため、社会的な貢献も大きい。論文発表を総合的に評価した結果、本論文は博士後期課程学位論文に値するものと認定する。