





北里大学大学院獣医学系研究科

博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

2024年2月15日





学位論文題目

加齢および細胞老化による細胞外小胞の変化に着目した心血管疾患の新たな病態機序解明

氏名	藤岡 友星	所属	獣医学専攻	獣医薬理学	
審査委員	主査	北里大学	教 授	佐々木 宣哉	
	副査	北里大学	教 授	久留主 志朗	
	副査	北里大学	准教授	亀島 聡	
	副査	岡山理科大学	講 師	向田 昌司	

審査の結果	<u>合格</u>	最終試験の成績	<u>優</u>
-------	-----------	---------	----------

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨 お よ び 担 当 者





学位申請者	藤岡 友星 (DV20005 獣医薬理学)			
学位論文題目	加齢および細胞老化による細胞外小胞の変化に着目した心血管疾患の新たな病態機序解明			
担当者	主査	北里大学	教授	佐々木 宣哉 
	副査	北里大学	教授	久留主 志朗 
	副査	北里大学	准教授	亀島 聡 
	副査	岡山理科大学	講師	向田 昌司 

成績：優

最終試験の結果の要旨

審査員一同は、論文提出者に対し、2024年2月15日、その論文内容および関連事項について詳細な質疑を行った。その結果、論文提出者は博士（獣医学）の学位を受けるに相応しい学識と能力を有するものと認め、優と判定した。

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	藤岡 友星 (DV20005 獣医薬理学)
学位論文題目	加齢および細胞老化による細胞外小胞の変化に着目した心血管疾患の新たな病態機序解明
担当者	主査 北里大学 教授 佐々木 宣哉  副査 北里大学 教授 久留主 志朗  副査 北里大学 准教授 亀島 聡  副査 岡山理科大学 講師 向田 昌司 

論文審査の要旨

Extracellular vesicles (EV)は、細胞から分泌される脂質二重膜を持つ球状の粒子であり、体液中に広く存在し、細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしている。EVは、生合成・分泌過程とサイズに基づいて、small EV (sEV)と large EV に分類される。本研究の背景には、本態性高血圧の発症及び進展に sEV が関与していることを、著者が所属する研究室の先行研究が明らかにしている。しかし、EV が心血管疾患の発症及び進行にどのように関与しているかは、明らかではなかった。そこで、本博士論文では、EV と加齢、及び細胞老化との関連性に焦点を当て、これらが心血管疾患の発症及び進行にどのように関与しているかを探求した。

第一章では、6週齢および15週齢の Wistar ラットの血漿から sEV および large EV を単離した。6週齢で単離された sEV (6 wk.-sEV) と比較して、15週齢で単離された sEV (15 wk.-sEV) の平均粒子径は有意に増加し、それに相関して 150 nm 以下の粒子の割合が有意に減少した。また、6 wk.-sEV と比較して、15 wk.-sEV では sEV マーカータンパク質の Alix タンパク質の発現が有意に減少した。一方、6 wk.-large EV と 15 wk.-large

EV の間で、平均粒子径および 500 nm 以上の粒子の割合には差が認められなかった。これらの結果から、Wistar ラットの血漿由来 sEV は加齢に伴い、粒子径とマーカータンパク質の発現に変化が見られることが明らかになった。

第二章では、新生仔ラット心線維芽細胞 (neonatal rat cardiac fibroblasts, NRCFs) に DNA 損傷作用を持つ doxorubicin (DOX) を処置し、細胞老化を誘導した後、NRCFs の培養上清から sEV を単離した。NRCFs では、DOX 非投与の sEV を添加した処置により、細胞数が増加する傾向が見られた。一方で、DOX 投与後の sEV を添加した処置では、細胞数に変化は見られず、タンパク質濃度が減少し、オートファジー誘導の指標である LC3-II/LC3-I 比が有意に増加した。さらに、NRCFs ではオートファジー誘導に関わるシグナル因子である AMPK α のリン酸化 (活性化) が増加する傾向が示された。一方、ラットの新生仔心筋細胞 (neonatal rat cardiomyocytes, NRCMs) では、DOX 投与後の sEV を添加しても、上記のパラメーターに影響を与えなかった。これらの結果から、老化誘導された NRCFs において、sEV は AMPK α の活性化を介して、NRCFs 特異的にオートファジーを誘導することが明らかになった。

第三章では、DOX 非投与 NRCFs 培養上清由来 sEV および DOX 投与 NRCFs 培養上清由来 sEV から miRNA を含む総 RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた miRNA の網羅的発現解析を行った。その結果、DOX 非投与 sEV と比較して、DOX 投与 sEV では 14 種類の miRNA の発現が有意に増加し、7 種類の miRNA の発現が有意に減少したことが明らかになった。さらに、データベースを用いた miRNA の標的遺伝子探索を通じて、DOX 投与 sEV で増加した miRNA の中で miR-384-5p、miR-182、および miR-199a-5p に共通する標的遺伝子として *Rheb1* mRNA を見出した。Western blotting により、NRCFs において DOX 投与による RHEBL1 タンパク質の発現減少が確認された。また、合成 miRNA である rno-miR-384 mimic、rno-miR-199a mimic、および rno-miR-182 mimic の共処置、または rno-miR-199a mimic と rno-miR-182 mimic の共処置は、NRCFs

における RHEBL1 の発現を抑制し、LC3-II/LC3-I 比の増加する傾向を示した。以上の結果から、DOX 投与は少なくとも部分的に、内包する miR-384-5p、miR-182、および miR-199a-5p の伝達による RHEBL1 タンパク質発現の減少を介して NRCFs にオートファジーを誘導する可能性が示された。

結論として、本研究は加齢に伴う血漿由来の sEV の粒子径とマーカータンパク質の発現の変化、及び細胞老化の誘導が sEV の複数の miRNA の変化を引き起こし、これが NRCFs のオートファジーを誘発するメカニズムを明らかにした。これは、加齢に関連する心血管疾患の病態機序を解明し、新たな治療法の開発に向けた基礎を築く成果である。今後、sEV の生体内での心血管疾患の病態悪化への関与の詳細が解明されれば、新たな治療戦略の開発に貢献することが期待される。審査員一同は本論文が医学及び獣医学の発展に貢献する新規の知見を含むと評価し、また、著者の研究態度と人間性を高く評価し、博士（獣医学）の学位授与に相応しいと判断した。