

学位論文 要約

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

Elucidation of novel pathological mechanisms of cardiovascular diseases by
focusing on aging- and cellular senescence-induced alteration of
extracellular vesicles

北里大学大学院獣医学系研究科
獣医学専攻 博士課程

藤岡 友星

Yusei Fujioka

指導教授 山脇 英之

細胞外小胞(extracellular vesicles: EV)は細胞から分泌される脂質二重膜性の球状粒子で、全身の間質液と血液、尿、脳脊髄液などの体液中に広く存在する。EVは生合成・分泌過程とサイズ(直径)によって small EV (sEV, exosome)と large EV (microvesicles)に分類される。EVは親細胞(parent cell)由来の多様な分子種を含み、これらを細胞間で伝達することで受け手の細胞(recipient cell)の機能に影響を及ぼす。当研究室は原因が特定できていない高血圧症である本態性高血圧の発症および進展に sEV が関与することを明らかにした。しかしながら、その他の心血管疾患と EV の関係については不明な点が多い。本研究では EV と心血管疾患の重要な危険因子である加齢および細胞老化の関係に着目し検討した。

1. 加齢がラット血漿由来 EV の性質に及ぼす影響

加齢(aging)とは、成人してからの時間経過によって組織および臓器の機能が低下する過程である。加齢によってがんや、糖尿病などの代謝性疾患、心筋梗塞や動脈硬化症などの心血管疾患の発症が増加することから、これらは加齢関連疾患と分類されている。近年、加齢関連疾患の病態発症および進展に EV が関与することが明らかとなりつつある。しかし、加齢による EV の性質の変化に関して詳細は明らかになっていない。そこで第一章では生体レベルの加齢が血漿由来 EV の性質に及ぼす影響を検討した。6 週齢(6 wk.-)および 15 週齢(15 wk.-)の Wistar ラットの血漿から sEV および large EV を単離した。6 wk.-sEV と比較して 15 wk.-sEV の平均粒子径は有意に増加し、150 nm 以下の粒子の割合は有意に減少した。また、6 wk.-sEV と比較して 15 wk.-sEV の sEV マーカーである ALG-2-interacting protein X (Alix)タンパク質発現は有意に減少した。一方で、6 wk.-large EV と 15 wk.-large EV の総粒子数、平均粒子径、500 nm 以上の粒子の割合に差は認められなかった。以上の結果から、Wistar ラット血

漿由来 sEV は加齢に伴い粒子径とマーカータンパク質発現が変化することが初めて明らかとなった。

2. 細胞老化が心線維芽細胞培養上清由来 sEV の機能に及ぼす影響

細胞老化は細胞分裂が不可逆的に停止した状態であり、主に DNA 損傷により誘導される。老化細胞の組織への蓄積は心筋梗塞や心不全、動脈硬化症などの加齢関連疾患の発症および進展に関わるとされている。老化細胞は炎症性サイトカイン等の分泌タンパク質の産生が増加する。この現象は老化関連分泌形質 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) と呼ばれる。近年、SASP において sEV の分泌も増加することが明らかになりつつある。しかし、細胞老化における sEV の役割の詳細は明らかになっていない。心線維芽細胞はラットの心臓を構成する細胞の約 60% を占め、心臓組織の構造維持に関与する。心臓での老化心線維芽細胞の増加は過剰なコラーゲン産生の抑制により心筋梗塞後の慢性創傷治癒時に保護的に働くが、加齢による心臓線維症の際には心破裂リスクを増加することが報告されている。以上より、心線維芽細胞の老化は心臓組織の維持および破綻の双方に関わると考えられるが、その詳細は不明である。第二章では老化した心線維芽細胞における sEV の役割を解明するために、細胞老化を誘導した新生仔ラット心線維芽細胞 (neonatal rat cardiac fibroblasts, NRCFs) 培養上清由来 sEV が心臓構成細胞に及ぼす影響を検討した。NRCFs に doxorubicin (DOX, 10^3 nM, 24 時間) を処置することで細胞老化を誘導した後、NRCFs の培養上清より sEV を単離した。NRCFs において、溶媒 (DOX, 0 nM) 処置 NRCFs 培養上清由来 sEV (D0-EV, 72 時間) 処置により細胞数が増加する傾向を示した。一方、NRCFs において、DOX (10^3 nM) 処置 NRCFs 培養上清由来 sEV (D 10^3 -EV, 72 時間) 処置により細胞数は変化せず、タンパク質濃度が減少する傾向を示した。ま

た、NRCFsにおいて、D10³-EV (72 時間)処置によりオートファジーマーカーである microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-I に対する LC3-II の比(LC3-II/LC3-I)が有意に増加した。更に NRCFs において、D10³-EV (72 時間) 処置により adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) α のリン酸化が増加する傾向を示した。一方で、新生仔心筋細胞において、D10³-EV (72 時間)処置は上記パラメーターに影響を及ぼさなかった。以上の結果から、D10³-EV は AMPK α 活性化を介して NRCFs に特異的にオートファジーを誘導することが初めて明らかとなった(*J. Vet. Med. Sci.* 2023)。

3. 細胞老化が心線維芽細胞培養上清由来 sEV に含まれる microRNA (miRNA)発現に及ぼす影響

第二章において、老化心線維芽細胞培養上清由来 sEV は NRCFs のオートファジーを誘導することを明らかにした。しかし、その詳細な機序は不明である。sEV はタンパク質や DNA、mRNA、miRNA 等の核酸、脂質、代謝産物を含み、これらを細胞間で伝達する。miRNA は non-coding RNA の一種であり、相補的な mRNA に結合することで mRNA の翻訳を抑制する。近年、sEV に内包された miRNA が recipient cell の標的遺伝子のタンパク質発現を減少させることが明らかとなった。そこで第三章では、D10³-EV に内包された miRNA が NRCFs のオートファジーを誘導する原因分子であるという仮説の検証の為に、細胞老化が心線維芽細胞培養上清由来 sEV の miRNA 発現に及ぼす影響を網羅的に検討した。D0-EV および D10³-EV から miRNA を抽出し、次世代シーケンサーによる miRNA-seq 解析を行った。その結果、D0-EV と比較して D10³-EV では 14 種類の miRNA 発現が有意に増加し、7 種類の miRNA 発現が有意に減少することが明らかとなった。さらにデータベースを用いた miRNA の標的遺伝子探

索により、D10³-EV で増加した miRNA の標的遺伝子として遺伝子 *A* を見出した。遺伝子 *A* にコードされているタンパク質 *A* はオートファジーの負の調節因子であり、その発現抑制によりオートファジーが誘導されることが報告されている。Western blotting により NRCFs において、D10³-EV (72 時間)処置によりタンパク質 *A* の発現が減少することを確認した。また、遺伝子 *A* を標的とする miRNA の mimic は NRCFs のタンパク質 *A* の発現を抑制し、LC3-II/LC3-I を増加する傾向を示すことを確認した。以上の結果から、D10³-EV は内包する miRNA の伝達によるタンパク質 *A* の発現減少を介して NRCFs のオートファジーを誘導する可能性が初めて示された。

本研究は加齢および細胞老化によって sEV の性質および内包物が変化し、オートクリン的に働くことで細胞機能を変化させることを初めて明らかにした。今後、加齢および細胞老化における sEV の機能変化の詳細を明らかにすることで、加齢に関連した心血管疾患の真の病態機序の解明と新規治療法開発につながることを期待される。