

に含まれる miRNA 発現プロファイルが対照群と比較して変化していることが報告され、これらを受けて本態性高血圧の発症・進展にも sEV が関わるとの仮説の下、研究が開始された。

第 1 章はラット血漿 sEV が血圧におよぼす影響を調べたもので、成果として本研究の中で最も重要と判断される知見を得た。研究には本態性高血圧症モデル動物の自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rat: SHR) とその正常対照系統の Wistar Kyoto rat (WKY) (5~10 週齢) を使用した。同週齢の SHR と WKY の血漿から調製した sEV を、それぞれ WKY と SHR に交差させて投与し、血圧への影響について検討した。SHR 血漿 sEV、あるいは WKY 血漿 sEV を週 1 回腹腔内投与 (計 6 週間) すると、SHR 血漿 sEV 投与により WKY の収縮期血圧は有意に上昇し、WKY 血漿 sEV 投与により SHR における収縮期血圧の上昇は有意に抑制された。さらに摘出腸間膜動脈の収縮実験において、SHR から摘出した腸間膜動脈標本の PGF2 α 誘導性収縮は SHR 血漿 sEV と比較して WKY 血漿 sEV の投与により有意に減弱した。WKY の摘出心室組織の重量と左心室血管周囲の線維化は、SHR 血漿 sEV 投与により WKY 血漿 sEV 投与群と比較して有意に亢進した。さらに、WKY 血漿 sEV を投与した SHR 左心室血管周囲の線維化は SHR 血漿 sEV 投与群と比較して有意に減弱するという組織学的知見も得た。以上の結果は、WKY および SHR の血漿 sEV は異なる機能的性状を有し、心血管系の機能と組織構造をそれぞれ正常化、あるいは増悪化することを示唆する、病態生理学的意義の極めて高い知見と判断される。

続く第 2 章では血漿 sEV の性状を明らかにする試みとして、より収率と純度の高い sEV 単離方法の開発を手掛けた。ヒトサンプルでの先行研究により、polyethylene-glycol (PEG) を用いた方法が細胞および血漿由来 sEV の単離に有用であり、また血漿 sEV の性質に抗凝固薬が影響をおよぼすことが示唆

されていることから、PEG を用いた正常 Wistar ラット血漿 sEV の単離方法の確立と抗凝固薬の影響について検討している。sEV の収率は通常の超遠心法 (UC 法) で極めて低かったが、PEG 法と比べて PEG-UC 法では低いものの、その後の解析には十分な収率であった。さらに、sEV の純度は PEG-UC 法が PEG 法に比べて高く、タンパク質や大型 EV の夾雑が少なかった。一方、調べた 3 つの抗凝固薬 (heparin、EDTA および acid citrate dextrose buffer) は、いずれも sEV の純度と収率に対して影響しなかった。これらの検討から、ラット血漿からの sEV の単離では純度と収率の点から PEG-UC 法が最適であり、抗凝固薬は影響しないと結論づけている。

最後の第 3 章では第 1 章で示された血漿 sEV の心血管系への影響の一端を明らかにする目的で、高血圧発症・進展に重要とされる血管平滑筋細胞の増殖と遊走に対する検討が *in vitro* で行われた。第 2 章で最適化された UC-PEG 法で調製した WKY と SHR 血漿 sEV の粒子濃度と粒度分布に差は認められない一方、sEV マーカーの CD81 タンパク質発現量が SHR 血漿 sEV では WKY 血漿 sEV に比べ有意に低かった。WKY あるいは SHR 血漿 sEV をラット血管平滑筋細胞に処置 (48 時間) すると、共に細胞内に取り込まれて増殖と遊走能が溶媒処置と比較して有意に亢進したが、その作用に差はなかったとしている。以上の結果は、sEV が血管平滑筋細胞に確実に作用していることを示したが、血圧や心臓結合組織におよぼした WKY 及び SHR 血漿 sEV の作用の差異を説明するには至らなかった。

以上のように本研究は、本態性高血圧症のモデル動物である SHR と正常対照の WKY ラットを比較検討しながら、それぞれの血漿 sEV が血圧を増悪化、あるいは正常化することを示し、血圧制御に強く関わっていることを初めて明らかにした。またラット血漿 sEV の至適単離方法として PEG-UC 法を見出した。ラット血漿 sEV による血圧制御には、その血管平滑筋細胞の増殖・遊

走能におよぼす影響は関与しないことを明らかにした。論文中にも述べているように、血漿 sEV の作用点として血圧制御に関わる他の細胞や臓器(血管内皮細胞や中枢神経系、心臓、腎臓)におよぼす影響を今後詳細に検討する必要があるとしている。獣医領域においてはほとんど見られない疾患であるが、ヒト臨床において極めて医学的意義の高い本態性高血圧症の病態解明において、ラットというモデル動物ではあるものの sEV の関与を実証した第 1 章の成果は特筆に値するものである。第 2, 3 章の成果は、sEV 自身の性状や作用機序の解明には充分には至らなかったが、一定の成果が得られたものと判断される。

本博士論文を構成する各章は、すでに以下の原著論文として筆頭著者にて発表されている。

第 1 章 : Otani K et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;503:776-783.

第 2 章 : Otani K et al. *Int J Mol Sci* 2019;20:E4780.

第 3 章 : Otani K et al. *J Vet Med Sci* (2020, in press).

さらに同氏は学会においては、国内外ですでに 12 報の発表を行っている。2017 年 4 月～2020 年 3 月は、日本学術振興会特別研究員 (DC1・農学) として採用された。これらの業績は、同氏が論文作成能力、並びに研究プレゼンテーション能力を十分に有していることの証しであると判断される。

以上の総合的観点から、基礎獣医学における十分な研究業績と研究遂行能力、並びに学力を十分に有していると判断され、博士 (獣医学) を授与するに相当すると審査員一同で判断した。