

本態性高血圧症における血漿小型細胞外小胞
(small extracellular vesicles)による血圧制御機構の解明

大谷 紘資

Elucidation of the regulatory mechanisms of blood pressure by
plasma small extracellular vesicles in essential hypertension

Kosuke Otani

目次

I. 緒論	1
II. 第一章 ラット血漿 sEV が血圧に及ぼす影響	5
1. 緒言	5
2. 材料及び方法	6
2-1. 動物実験	6
2-2. sEV の単離	6
2-3. sEV の粒度分布	7
2-4. sEV の長期投与と組織の採材	7
2-5. SBP、心拍数と体重の測定	8
2-6. 形態学的解析	8
2-7. 摘出血管の収縮張力測定	8
2-8. 統計学的解析	9
3. 実験結果	10
3-1. 血漿 sEV の粒度分布	10
3-2. 血漿 sEV が SBP、心拍数と体重に及ぼす影響	10
3-3. 血漿 sEV が胸部大動脈の組織構造に及ぼす影響	10
3-4. 血漿 sEV が摘出腸間膜動脈の収縮に及ぼす影響	11
3-5. 血漿 sEV が心臓の重量と組織構造に及ぼす影響	11
4. 考察	21
III. 第二章 最適なラット血漿 sEV 単離方法の探索	24
1. 諸言	24
2. 材料及び方法	25
2-1. 動物実験	25
2-2. sEV の単離	25

2-3. sEV の粒度分布	26
2-4. 血小板の単離	26
2-5. タンパク質発現解析	27
2-6. 電子顕微鏡観察	28
2-7. 統計学的解析	29
3. 実験結果	32
3-1. 3 種類の方法で単離した血漿 sEV の粒度分布	32
3-2. 3 種類の方法で単離した血漿 sEV のタンパク質量とマーカータンパク質発現	32
3-3. 抗凝固薬が血漿 sEV の粒度分布に及ぼす影響	33
3-4. 抗凝固薬が血漿 sEV のタンパク質量とマーカータンパク質発現に及ぼす影響	33
3-5. PEG-UC 法により単離した血漿 sEV の電子顕微鏡観察	34
4. 考察	45
IV. 第三章 血漿 sEV が血管平滑筋細胞の機能に及ぼす影響	48
1. 諸言	48
2. 材料及び方法	49
2-1. 動物実験	49
2-2. sEV の単離	49
2-3. sEV の粒度分布	50
2-4. タンパク質発現解析	50
2-5. ラット胸部大動脈由来 SMC の単離	50
2-6. 細胞遊走能の測定	51
2-7. 細胞増殖能の測定	52

2-8. sEV の取り込み	52
2-9. 統計学的解析	53
3. 実験結果	54
3-1. 血漿 sEV の粒度分布	54
3-2. 血漿 sEV のマーカータンパク質発現	54
3-3. 血漿 sEV が SMC の遊走と増殖能に及ぼす影響	54
3-4. sEV の取り込み	55
4. 考察	62
V. 総括	64
VI. 謝辞	69
VII. 引用文献	70

I . 緒 論

ヒト全身性高血圧症は、全身血圧の上昇を主症状とする進行性の慢性疾患である。米国のガイドラインによると、成人における収縮期血圧 (systolic blood pressure: SBP) が 130 mmHg 以上または拡張期血圧が 80 mm Hg 以上と定義される [97]。全世界で約 11 億人に上る患者 (世界保健機関 2019 年) を擁する全身性高血圧症は、心疾患や脳卒中、腎不全の危険因子となる重大な基礎疾患であることから血圧の低下を目的とした治療が必要となる [27, 28, 58, 60]。全身性高血圧症の一部 (約 10%) は腎動脈の狭窄、原発性アルドステロン症や褐色脂肪種などに続発する二次性高血圧症だが、大部分 (約 90%) は原因不明の本態性高血圧症である。ヒト本態性高血圧症の治療には thiazide 系利尿薬、angiotensin 変換酵素阻害薬、angiotensin II 受容体拮抗薬やカルシウムチャネル阻害薬などが一般的に用いられている。しかし降圧の目標値に達成したのは治療を行った高血圧症患者のおよそ 53% に留まり、降圧薬を 3 つ以上組み合わせた場合でもおよそ 12% の患者で治療反応性が認められない (治療抵抗性) ことが大規模な疫学調査により示されている [42]。そこで新たな治療薬の候補として angiotensin II 受容体 -neprilysin 共阻害薬、可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬やミネラルコルチコイド受容体拮抗薬などが期待されているが [4]、現在まで承認には至っていない。血管緊張性の増大、動脈壁の硬化、免疫系及び脳内血管運動中枢の異常な活性化や renin-angiotensin 系の亢進は全身血圧の上昇を引き起こす [23, 34, 39, 72]。また年齢、性別、食事 (食塩

や脂肪)、喫煙、ストレス、生活習慣や遺伝子変異も高血圧の発症・進展に関与することが示唆されている[16, 23, 75]。しかし、本態性高血圧の発症メカニズムには未だ明らかにされていない部分が多く、その全貌解明が強く待ち望まれている。

小型細胞外小胞 (small extracellular vesicles: sEV) は脂質二重膜で構成され、直径が約 50~150 nm で密度が 1.13~1.19 g/ml の分泌小胞である[61, 88]。sEV は細胞内の後期エンドソーム膜が内部に陥入することで形成され、後期エンドソームと細胞膜の融合により細胞外に放出される。sEV は内部にタンパク質、DNA、mRNA、microRNA (miR)、脂質や代謝産物といった多様な機能性分子を含み、外部の消化酵素からこれらの分子を保護している[6, 20, 94]。細胞外に存在する sEV はエンドサイトーシス (ピノサイトーシスやファゴトーシスなど) により細胞内に取り込まれるか、膜融合を介して内包する分子を細胞内に輸送する。また、sEV 表面のタンパク質は細胞膜上の受容体と結合することで細胞内シグナルを活性化する。よって sEV は、新たな細胞間情報伝達物質として注目されている。実際、血液凝固[44]、幹細胞浸潤[69]や神経伝達[104]などの生理的な機能のみならず、がん[5, 96]、中枢神経障害[15, 33]や免疫系疾患[87]などの病態制御に関与することが近年相次いで報告されており、疾患バイオマーカーやドラッグデリバリーシステムに対する sEV の応用が期待されている。また、心臓前駆細胞や間葉系幹細胞由来の sEV は心筋梗塞後の心機能を改善する[9, 43]。植物アルカロイドのモノクロタリン誘導性肺高血圧症モデルマウスの血漿 sEV は肺動脈狭窄を惹起し右心機能を低下させる[2]。Angiotensin II 誘導性

高血圧症モデルラットの血清 sEV における miR-17-3p 発現は対照群と比較して減少している [64] といった報告がある。このように心血管疾患の病態においても sEV の関与が示唆されている。さらには、高血圧症の基礎疾患である肥満症患者の血漿 sEV 濃度は健常者と比較して増加しており [25]、高脂肪食を給餌した肥満症モデルマウス由来の血漿 sEV はインスリン抵抗性を亢進する [17]。心血管疾患に対して保護的に働くアディポサイトカインの 1 つである adiponectin 量が、肥満及び II 型糖尿病モデル (ob/ob) マウスの血清 sEV において減少する [74]。受動喫煙曝露モデルマウスの肺動脈血管内皮細胞から分泌される sEV は肺動脈平滑筋細胞の収縮を増強する [107] といった報告がある。以上のように、肥満症や糖尿病をはじめとする高血圧症の基礎疾患である生活習慣病の病態においても sEV の関与が示唆されている。しかし、本態性高血圧症における sEV の役割はこれまでほとんど明らかになっておらず、本研究では本態性高血圧の発症・進展にも sEV が関わるとの仮説を立てた。そしてこの仮説を検証するために、本態性高血圧症の病態解明と治療及び診断法の開発に最も一般的に用いられてきた自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rats: SHR) の血漿 sEV が、血圧を制御するかとその機序を検討した。SHR は生後徐々に血圧が上昇し 7 週齢以降に SBP が 130 mmHg を超える高血圧を呈する。SHR の血圧上昇の決定的な原因もヒト本態性高血圧症と同様に未だ明らかではない [24]。本研究の第一章では、SHR とその正常対照系統である Wistar Kyoto rats (WKY) における血圧制御と心臓・血管の機能と構造に血漿 sEV が及ぼす影響を検討した。次に血漿

sEVに含まれる分子群の発現動態や機能を詳細に評価する為には、より収率と純度の高いsEV単離方法の探索が必要であると考えられたため、第二章では正常 Wistar ラット血漿 sEV の単離方法の改善を目的とした基礎的な検討を行った。第一章と第二章の結果を踏まえて、第三章では WKY 及び SHR 血漿 sEV が高血圧の発症・進展に関わる血管平滑筋細胞 (smooth muscle cell: SMC) の機能 (遊走及び増殖能) に及ぼす影響を検討した。

II. 第一章 ラット血漿 sEV が血圧に及ぼす影響

1. 緒言

sEV は様々な分子を内包し、細胞間情報伝達を担う機能性粒子である。モノクロタリン誘導性肺高血圧症モデルマウスの血漿 sEV は、正常マウスにおいて肺動脈狭窄を惹起し右心機能を低下させる [2]。Angiotensin II 誘導性の全身性高血圧症モデルラットにおいて、血清 sEV における miR-17-3p 発現が対照群と比較して減少することが原因で炎症性の *intercellular adhesion molecule-1* と *plasminogen activator inhibitor-1* 発現が亢進し血管内皮障害(高血圧症の初期病変)が誘導される [64]。また肥満症 [17, 25] や糖尿病 [74] をはじめとする高血圧症の基礎疾患となる生活習慣病の病態における sEV の関与が示唆されている。しかしながら、本態性高血圧症における sEV の役割はほとんど明らかにされていない。そこで第一章では、WKY 及び SHR において血漿 sEV が全身血圧を制御するかを検討した。

2. 材料及び方法

2-1. 動物実験

動物の飼育と取り扱いは北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 17-125, 18-016)、北里大学動物実験委員会が規定したガイドラインを遵守して行った。実験には雄性 WKY 及び SHR (4~10 週齢) (Hoshino laboratory animals, Ibaraki, Japan) を使用した。ラットは本学部 5 号館 2 階の小動物飼育室において、固形飼料 (CE-2, CLEA Japan, Tokyo, Japan) を給餌し自由飲水で飼育した。

2-2. sEV の単離

超遠心法(Ultracentrifugation: UC 法)によりラット血漿から sEV を単離した [8, 37, 49]。イソフルラン(3.5%)麻酔下の雄性 WKY 及び SHR (5~10 週齢) から心臓採血により血液を採取した。採取した血液を抗凝固薬の heparin (AY Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) と混合した後(最終濃度 2 U/ml)、マイクロ冷却遠心分離機(model 3740, Kubota, Tokyo, Japan) で遠心分離(1500 x g, 室温, 10 min) し血漿を分離した。血漿は液体窒素中で急速に凍結し、使用まで保存(-80 °C) した。解凍(37 °C, 5 min) した血漿は、SW 55Ti スウィングローターを搭載した Optima XL-80 K 超遠心分離機(Beckman Coulter, Miami, FL, USA) を用いて遠心分離(10000 rpm = 9481 x g, 4 °C, 30 min) し夾雑物を除去した。遠心後の上清を新たな滅菌済みチューブに移し超遠心分離(41600 rpm = 164071 x g, 4 °C, 35 min) した。沈殿を滅菌したリン酸緩衝液(phosphate-

buffered saline: PBS)に懸濁し、再度超遠心分離を行った(41600 rpm = 164071 x g, 4 °C, 35 min)。この沈殿を滅菌 PBS に懸濁し、sEV として腹腔内投与に用いた。

2-3. sEV の粒度分布

sEV の粒度分布は、qNANO Gold (IZON Science, Christchurch, New Zealand)を用いて電気抵抗ナノパルス(tunable resistive pulse sensing: TRPS)法により測定した。ストレッチを 46.5 mm に設定した NP100 ナノポアを qNANO Gold に装着し取り扱い説明書に従って sEV の検出頻度と電気抵抗値を測定し、標準粒子(直径が 110 nm のカルボキシポリスチレン粒子)で校正して粒度分布表を作成した(図 1A)。

2-4. sEV の長期投与と組織の採材

以下に示す 4 つの sEV 投与群に分けた:WKY 血漿 sEV (WsEV)を投与した WKY [W (W)], SHR 血漿 sEV (SsEV)を投与した WKY [W (S)], SsEV を投与した SHR [S (S)], WsEV を投与した SHR [S (W)]。4 群それぞれに sEV を週 1 回、6 週間(5~10 週齢)にわたり腹腔内投与した。血漿を採取した WKY 及び SHR と、sEV を投与した WKY 及び SHR は同じ週齢に合わせた。各週齢において、同じ容量の血漿(5~7 週齢時:約 200 µl, 8~10 週齢時:約 300 µl)から単離した sEV をそれぞれ投与した。投与終了後に urethane (1.5 g/kg, 腹腔内投与) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)深麻酔下で放血による安楽殺を行い、心臓、胸部大動脈と上腸間膜動脈主部を摘出した。心臓は左右の心室と心房に分離して重量を測定した。Tris-buffered saline (TBS)で組織を洗浄後、心臓と大動脈は 4% paraformaldehyde (Wako, Osaka, Japan)で固定(4 °C, 1 晩)した。固定し

た組織を Pathoprep 568 (Wako) に包埋して形態学的解析に使用した。摘出腸間膜動脈は張力測定に用いた。

2-5. SBP、心拍数と体重の測定

7 週間(4~10 週齢)にわたり週 1 回、意識下の SBP と心拍数をテイルカフ法(Softron, Tokyo, Japan)により測定した[63, 92]。体重測定も同様に 7 週間にわたり週 1 回行った。

2-6. 形態学的解析

回転式マイクローム(PR-50, Yamato Kohki, Saitama, Japan)を用いて包埋した大動脈と左心室組織の薄切切片(2 又は 4 μm)を作製した。大動脈の薄切切片は hematoxylin and eosin 染色とコラーゲン量の解析のために picrosirius red 染色を行った。また左心室組織におけるコラーゲン量の解析のために、picrosirius red 染色と azan 染色を行った。染色した組織切片は顕微鏡用デジタルカメラ(DP74, Olympus, Tokyo, Japan)を装着した光学顕微鏡(BX-51, Olympus)で観察・撮影し、cellSens standard ソフトウェア(ver. 1.18, Olympus)により画像を取得した(各サンプル 3 か所)。画像は Image J ソフトウェア(ver. 1.80_112, Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2014)により解析した[38]。大動脈中膜壁厚とコラーゲン発現量及び、左心室血管周囲における線維化の解析では、1 サンプルあたり 3 枚の画像から平均値を算出した。

2-7. 摘出血管の収縮張力測定

ラットを urethan (1.5 mg/kg, 腹腔内投与)で深麻酔し、放血により安

楽殺した。上腸間膜動脈主部を摘出し、直径が約 1 mm、長さが約 2 mm のリング状標本を作製した。標本を正常栄養液[(mM): 136.9 NaCl, 5.4 KCl, 1.5 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 23.8 NaHCO₃, 5.5 glucose, and 0.001 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich)]中に静置した。NaCl を同じ濃度の KCl で置換することにより等張性高濃度 K⁺液(high-K⁺; 72.7 mM KCl)を作製した。収縮張力は張力トランスデューサー(Nihon Kohden, Tokyo, Japan)を用いて等尺性に測定し、PowerLab システム(AD instruments, Dunedin, New Zealand)を用いてデータを取得した。Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}: 100 nM~30 μM) (CAYMAN CHEMICAL, Ann Arbor, MI, USA), noradrenalin (NA: 1 nM-30 μM) (Sigma-Aldrich)または 5-hydroxytryptamine (5-HT: 1 nM-30 μM) (Sigma-Aldrich)を累積投与することにより収縮の濃度反応曲線を求めた。収縮張力は標本の湿重量で補正した(g/mg wet weight) [63, 92]。

2.8. 統計学的解析

データは平均値±標準誤差[means ± standard error of the mean (SEM)]で示した。多群間の検定には、繰り返しのある一元配置分散分析(one-way repeated measures ANOVA)を行い有意差が認められた場合に Bonferroni 法による多重比較を用いた。2 群間の検定には Student の *t*-test を用いた。濃度反応曲線における多群間の検定には、繰り返しのある二元配置分散分析(two-way repeated measures ANOVA)を行い有意差が認められた場合に Bonferroni 法による多重比較を用いた。危険率(*P*)が 5%未満の場合に有意差ありと判断した。

3. 実験結果

3-1. 血漿 sEV の粒度分布

これまでに報告されている sEV の直径は約 50~150 nm である[61, 88]。WKY 及び SHR の血漿 EV は共に 100~150 nm をピークとする粒度分布を示し、sEV であることが確認された(図 1A, n = 5)。また WsEV と SsEV の間で粒子濃度に有意な差は認められなかった(図 1B, n = 5)。

3-2. 血漿 sEV が SBP、心拍数と体重に及ぼす影響

WKY 及び SHR に WsEV 及び SsEV を週 1 回、6 週間にわたり腹腔内投与した。10 週齢時において、W (S)群の SBP が W (W)群と比較して有意に上昇した(図 2A, n = 6, $P < 0.05$)。また 7~10 週齢時において、W (S)群の SBP 上昇値(Δ SBP)は W (W)群と比較して有意に高かった(図 2B, n = 6, $P < 0.05$ at 7- and 9-week-old, $P < 0.01$ at 8- and 10-week-old)。S (S)群と S (W)群の間で SBP に有意な差は認められなかったが(図 2A, n = 6)、8 週齢時において S (W)群の Δ SBP が S (S)群と比較して有意に低かった(図 2B, n = 6, $P < 0.05$)。W (W)群と W (S)群の間、及び S (S)群と S (W)群の間で心拍数と体重に有意な差は認められなかった(図 2C, D, n = 6)。

3-3. 血漿 sEV が胸部大動脈の組織構造に及ぼす影響

血漿 sEV による血圧変化の機序を明らかにするために、血漿 sEV が胸部大動脈の組織構造に及ぼす影響を検討した。S (S)群の中膜壁厚は W (W)群と比較して有意に増加した(図 3A, n = 6, $P < 0.05$)。しかし W (W)群と W (S)群の間、及び S (S)群と S (W)群の間で中膜壁厚に有意な差は認め

られなかった($n = 6$)。次に血漿 sEV が胸部大動脈におけるコラーゲン発現量に及ぼす影響を検討した。これまでの報告と一致して[54]、S (S)群の大動脈におけるコラーゲン発現量は W (W)群と比較して有意に低下した(図 3B, $n = 6$, $P < 0.01$)。また W (S)群の大動脈におけるコラーゲン発現量は W (W)群と比較して有意に低下した($n = 6$, $P < 0.01$)。S (W)群の大動脈におけるコラーゲン発現量は S (S)群と比較して有意に増加した($n = 6$, $P < 0.05$)。

3-4. 血漿 sEV が摘出腸間膜動脈の収縮に及ぼす影響

血漿 sEV が摘出腸間膜動脈における high- K^+ (72.7 mM), $PGF_{2\alpha}$ (100 nM~30 μ M), NA (1 nM~30 μ M)及び 5-HT (1 nM~30 μ M)誘導性収縮に及ぼす影響を検討した。全ての投与群の間で high- K^+ 誘導性の絶対収縮に有意な差は認められなかった(図 4A, $n = 6$)。S (S)群で $PGF_{2\alpha}$ 誘導性収縮が W (W)群と比較して有意に増強した(図 4B, $n = 6$, $P < 0.05$ at 10 μ M, $P < 0.01$ at 30 μ M)。また S (W)群で $PGF_{2\alpha}$ 誘導性収縮が S (S)群と比較して有意に減弱した($n = 6$, $P < 0.05$ at 10 and 30 μ M)。W (W)群と W (S)群の間で有意な差は認められなかった($n = 6$)。全ての投与群の間で NA 誘導性収縮に有意な差は認められなかった(図 4C, $n = 6$)。S (S)群で 5-HT 誘導性収縮が W (W)群と比較して有意に増強した(図 4D, $n = 6$, $P < 0.05$ at 3 μ M, $P < 0.01$ at 10 and 30 μ M)。しかし W (W)群と W (S)群の間、及び S (S)群と S (W)群の間で 5-HT 誘導性収縮に有意な差は認められなかった(図 4D, $n = 6$)。

3-5. 血漿 sEV が心臓の重量と組織構造に及ぼす影響

S (S)群における左心室及び全心室の重量は W (W)群と比較して有意に増加した(Table 1, $n = 6$, $P < 0.01$)。W (S)群における左心室及び全

心室の重量は W (W)群と比較して有意に増加した($n = 6, P < 0.01$)。S (S)群と S (W)群の間で左心室及び全心室の重量に有意な差は認められなかった($n = 6$)。次に組織学的解析により、血漿 sEV が心臓の組織構造に及ぼす影響を検討した。S (S)群の左心室における血管周囲の線維化は W (W)群と比較して有意に亢進した(図 5A, $n = 6, P < 0.01$)。W (S)群の左心室における血管周囲の線維化は W (W)群と比較して有意に亢進した($n = 6, P < 0.05$)。また S (W)群の左心室における血管周囲の線維化は S (S)群と比較して有意に低下した($n = 6, P < 0.05$)。左心室における間質の線維化は、全ての投与群で観察されなかった(図 5B, $n = 6$)。

Table 1. Effects of plasma small extracellular vesicles (sEV) on heart weight in Wistar Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR).

	W (W)	W (S)	S (S)	S (W)
Right ventricle (mg/cm)	8.95 ± 0.44	9.37 ± 0.67	9.34 ± 0.22	9.58 ± 0.40
Left ventricle (mg/cm)	39.98 ± 1.25	42.45 ± 1.02**	50.93 ± 1.12**	51.02 ± 0.65**
Ventricle (mg/cm)	48.92 ± 1.11	51.52 ± 1.61**	60.26 ± 1.09**	60.61 ± 0.96**
Total heart (mg/cm)	53.58 ± 1.20	56.40 ± 1.61	64.01 ± 1.02**	64.42 ± 1.09**

Heart was isolated from WKY and SHR (10-week-old) treated with plasma sEV weekly for 6 weeks and dissected into right and left ventricle. Wet weight was measured (n = 6) and normalized to tail length (mg/cm). W (W): WKY treated with plasma sEV isolated from WKY. W (S): WKY treated with plasma sEV isolated from SHR. S (S): SHR treated with plasma sEV isolated from SHR. S (W): SHR treated with plasma sEV isolated from WKY. ** $P < 0.01$ vs. W (W).

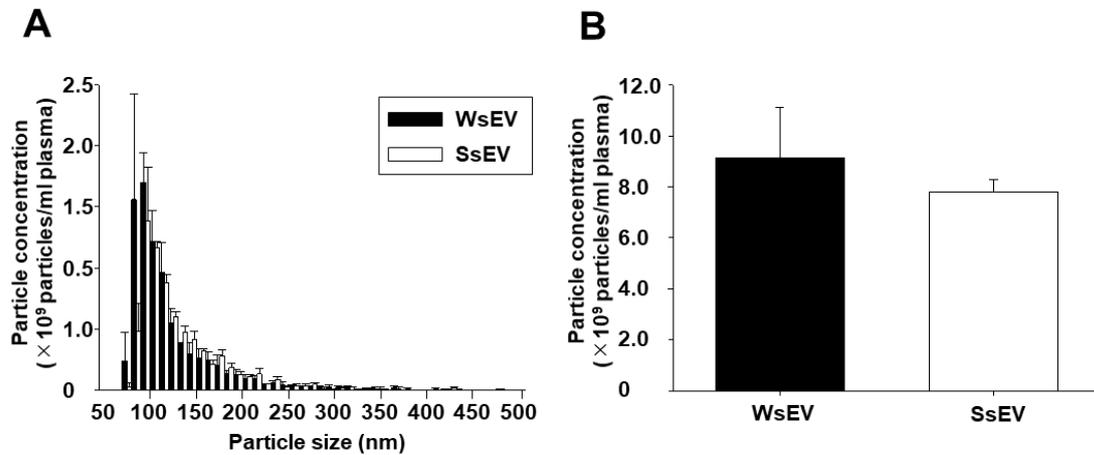


Fig. 1. Size and concentration of plasma small extracellular vesicles (sEV) derived from Wistar Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR).

sEV were obtained from plasma in male WKY and SHR (4~9-week-old) by an ultracentrifugation (UC) method and resuspended in sterilized phosphate-buffered saline. sEV-size distribution and -total concentration were measured by a tunable resistive pulse sensing (TRPS) analyses using a qNANO Gold instrument (n = 5). (A) Bar graph represents the particle-size (nm) distribution for sEV contained in 1 ml plasma. (B) Total concentration of sEV contained in 1 ml plasma was shown. Results were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM).

WsEV: plasma sEV isolated from WKY. SsEV: plasma sEV isolated from SHR.

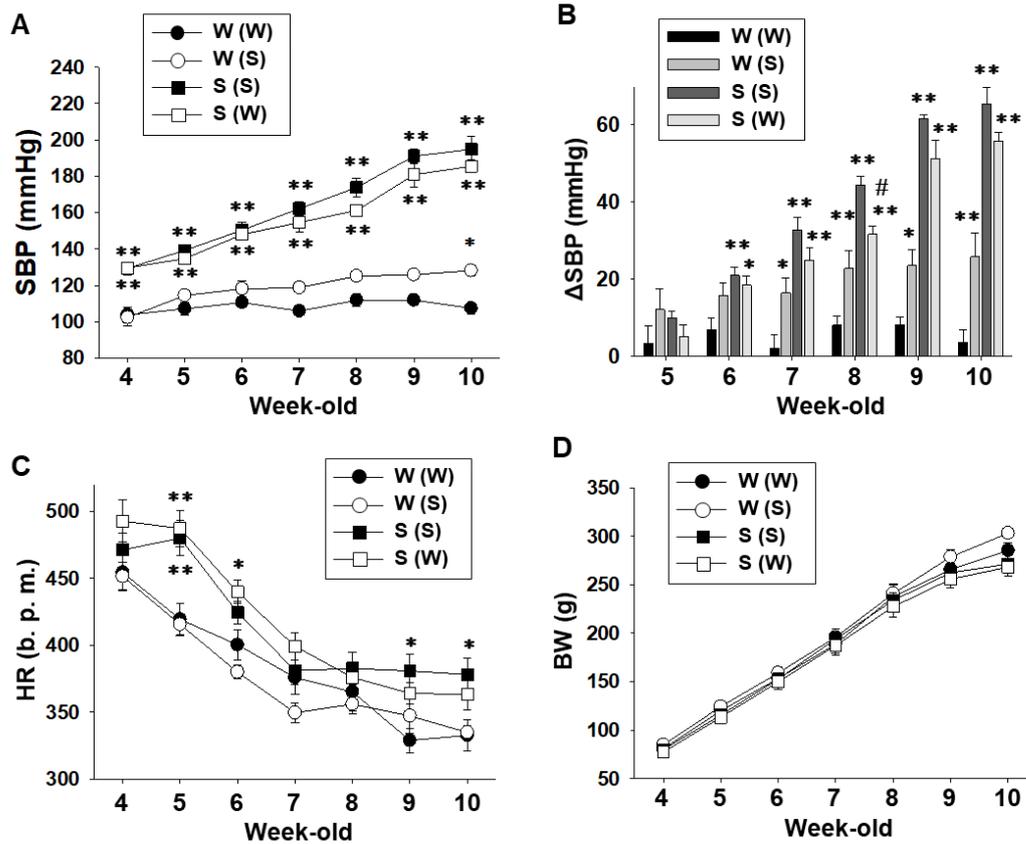


Fig. 2. Effects of plasma sEV on systolic blood pressure (SBP), heart rate (HR), and body weight (BW).

HR and SBP in male WKY and SHR (5~10-week-old) treated with WsEV or SsEV (isolated from 5~10week-old rats, $n = 6$) were measured by a tail-cuff system once a week. sEV were intraperitoneally administered to WKY and SHR weekly for 6 weeks. Results were expressed as means \pm SEM. W (W): WKY treated with WsEV. W (S): WKY treated with SsEV. S (S): SHR treated with SsEV. S (W): SHR treated with WsEV. Δ SBP: change in SBP from each SBP at 4-week-old. b. p. m.: beats per minute.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. W (W); # $P < 0.05$ vs. S (S).

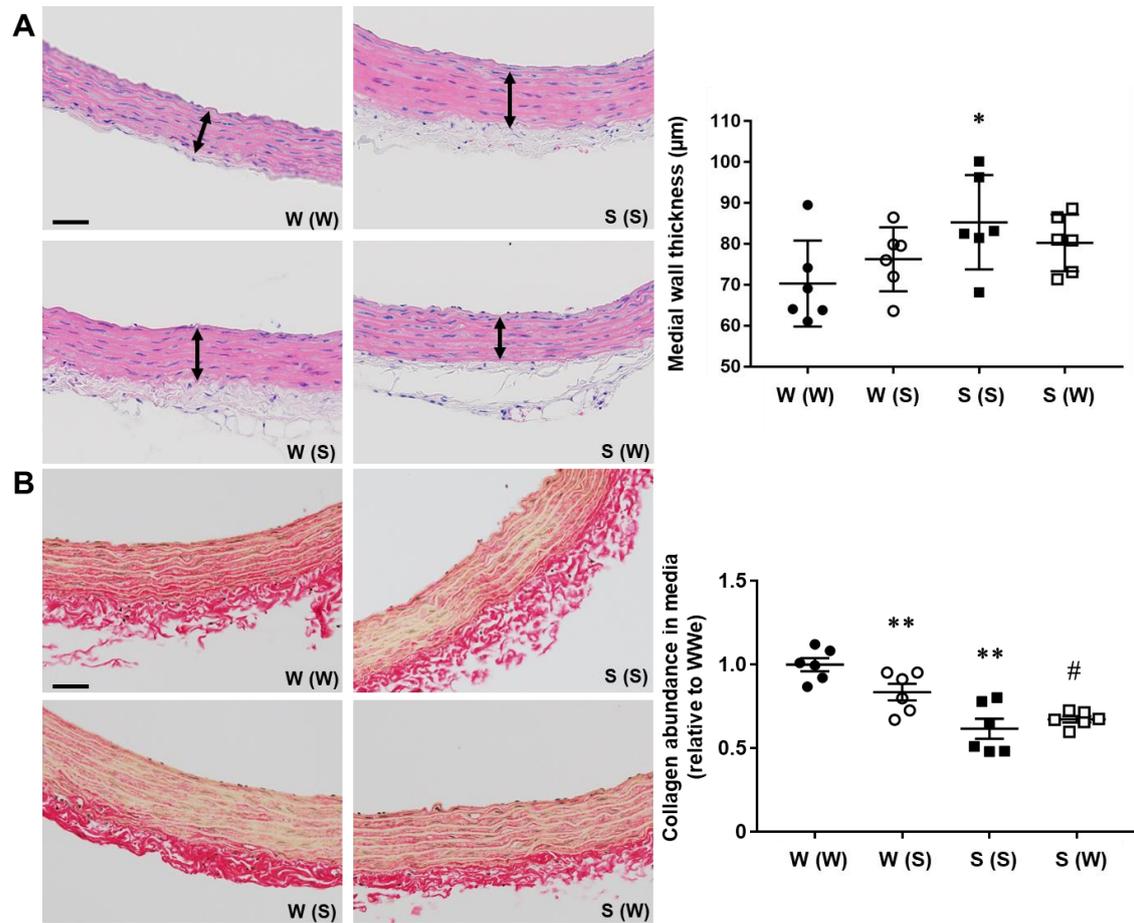


Fig. 3. Effects of plasma sEV on wall thickness and medial collagen abundance of thoracic aorta in WKY and SHR.

(A) Representative hematoxylin and eosin stained sections (4 µm) for thoracic aorta isolated from WKY and SHR (10-week-old) treated with plasma sEV weekly for 6 weeks were shown (n = 6). Medial wall thickness of aorta was calculated and shown as means ± SEM (dot plot graph). (B) Representative picrosirius red stained sections (4 µm) for thoracic aorta from WKY and SHR (10-week-old) treated with plasma sEV weekly for 6 weeks were shown (n = 6). Collagen was stained in red. The intensity of red region was calculated as collagen

abundance, normalized to perimeter of aorta, and shown as means \pm SEM (dot plot graph). Scale bar: 50 μ m.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. W (W); # $P < 0.05$ vs. S (S).

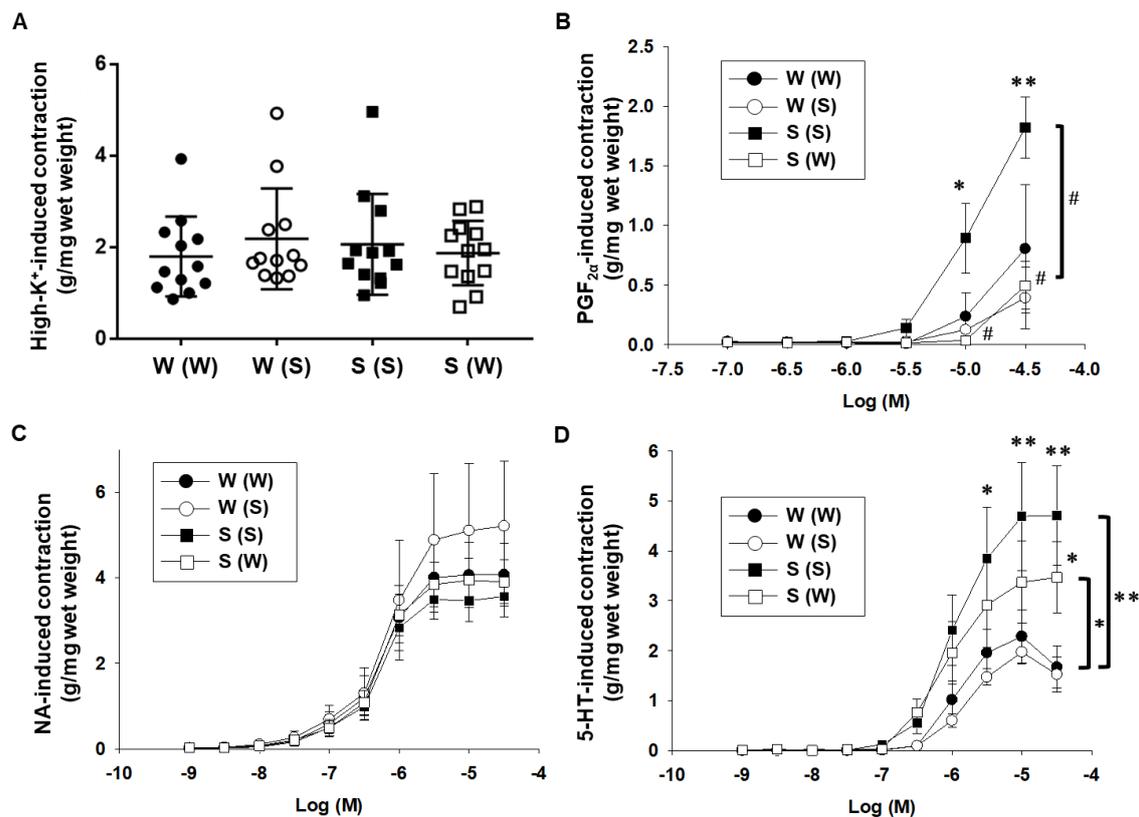


Fig. 4. Effects of plasma sEV on contraction induced by high-K⁺, prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), noradrenalin (NA) or 5-hydroxytryptamine (5-HT) in mesenteric artery from WKY and SHR.

The main branches of superior mesenteric arteries were isolated from WKY and SHR (10-week-old) treated with plasma sEV weekly for 6 weeks (n = 6). PGF_{2α} (100 nM~30 μM), NA (1 nM~30 μM) or 5-HT (1 nM~30 μM) was cumulatively added. Contraction was normalized to arterial wet weight (g/mg) and shown as means ± SEM.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. W (W); # $P < 0.05$ vs. S (S).

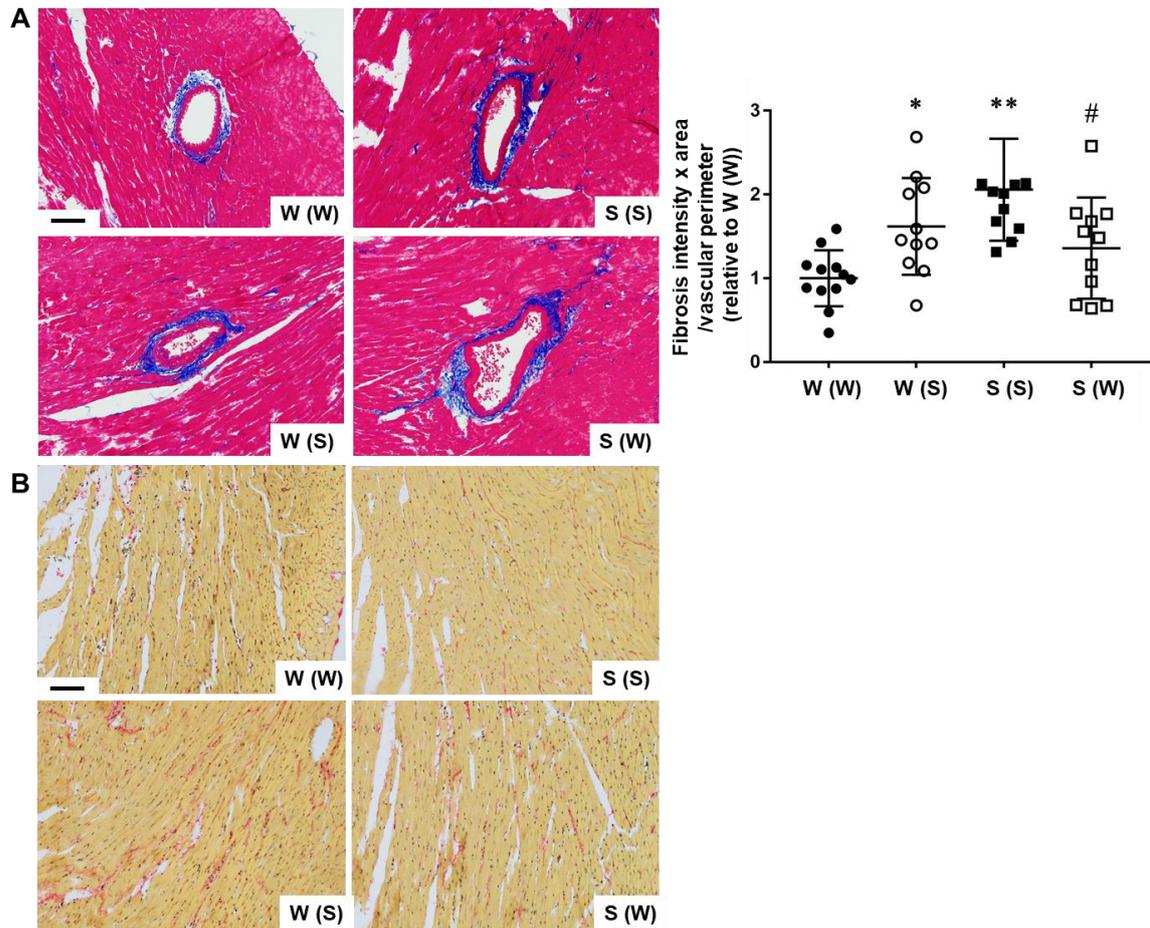


Fig. 5. Effects of plasma sEV on perivascular and interstitial fibrosis in left ventricles from WKY and SHR.

(A) Representative azan stained sections (2 μ m) for left ventricles from WKY and SHR (10-week-old) treated with plasma sEV weekly for 6 weeks were shown (n = 6). Fibrosis region was stained in blue. The intensity of blue areas in perivascular regions of left ventricles was calculated, normalized to perimeter of the vasculature, and shown as means \pm SEM (dot plot graph). (B) Representative picrosirius red stained sections (2 μ m) from WKY and SHR (10-week-old) treated with sEV weekly for 6 weeks were shown (n = 6).

Collagen was stained in red. Scale bar: 100 μm .

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. W (W); # $P < 0.05$ vs. S (S).

4. 考察

第一章では血漿 sEV がラットの全身血圧に及ぼす影響を検討し、以下に示す結果を得た。1) WsEV と SsEV の間で粒度分布と粒子濃度に差は認められなかった。2) SsEV 投与により WKY の SBP が有意に上昇し、WsEV 投与により SHR における SBP の上昇が部分的に抑制された。3) SsEV 投与により WKY における大動脈のコラーゲン発現が有意に低下し、WsEV 投与により SHR における大動脈のコラーゲン発現が有意に増加した。4) WsEV 投与により SHR の摘出腸間膜動脈における $\text{PGF}_{2\alpha}$ 誘導性収縮の増強が抑制された。5) SsEV 投与により WKY における左心室の重量が増加した。6) SsEV 投与により WKY の左心室における血管周囲の線維化が増加し、WsEV 投与により SHR の左心室における血管周囲の線維化が低下した。以上の結果から、WKY 及び SHR の血漿 sEV は血圧を制御し、心血管系の機能と組織構造に影響を及ぼすことが初めて明らかとなった。

sEV の単離には、UC 法、密度勾配遠心法、サイズ排除クロマトグラフィーなど、様々な方法が用いられる[22, 37, 99, 101]。血漿 sEV の濃度は $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{12}$ particles/ml と報告によりばらつきがある[8, 11, 56, 95]。本研究は UC 法で単離した血漿 sEV の濃度は $8.0 \sim 10.0 \times 10^9$ particles/ml であることを示した(図 1B)。sEV の収量はその由来動物種、生体の状態、単離方法や技術により異なるが、本研究と他の報告で sEV 収量に明らかな差は認められなかった。

これまでの報告では、sEV の総タンパク質量を揃えて生体に投与しているものが多い[9, 64, 105]。しかし UC 法で単離した血漿 sEV には血漿中のタンパク質が混入する[50]。そのため本研究では血

漿量(ml)を基準として sEV を投与した。具体的には、1 匹につき総血漿量の約 1/20 から単離した sEV を投与した。また腹腔内投与した sEV は血流を介して多くの臓器に分布するという報告があるため、本研究では sEV を腹腔内投与した[83, 98]。しかし今回投与した sEV 量は血中の sEV 量と比較して十分ではない可能性がある。そのため今後は、より高濃度の sEV を投与することで、血圧に対する濃度依存的な sEV の作用が認められるかを確認する必要がある。

高血圧症において大動脈ではコラーゲンの産生と蓄積が起こる[12, 71]。一方 SHR の大動脈においてはコラーゲン発現量が減少することが報告されており[54]、本研究においても同様の結果が得られた(図 3B)。SHR の大動脈におけるコラーゲン発現量と血圧の関係は不明だが、sEV が直接コラーゲン量に影響を及ぼした可能性も考えられる[55, 64]。

本研究は SHR の摘出腸間膜動脈における $\text{PGF}_{2\alpha}$ 誘導性収縮の増強が WsEV 投与により減弱することを明らかにした(図 4B)。WsEV は high- K^+ 誘導性収縮や他のアゴニスト誘導性収縮には影響を及ぼさなかったことから、WsEV が $\text{PGF}_{2\alpha}$ 受容体(FPR)とその下流シグナルを構成する分子に作用することが示唆される。sEV は miR やタンパク質などの輸送を介して細胞内タンパク質の発現と活性を制御することから[59, 76, 78]、WsEV は SMC において $\text{PGF}_{2\alpha}$ /FPR シグナルを抑制する分子を含む可能性が考えられる。

SHR の心臓では血管周囲と間質の線維化が認められる[13, 21, 102]。本研究においても SHR の左心室において血管周囲で線維化が亢進していた。しかし、間質では線維化が認められなかった(図 5A, B)。この理由として、本研究と以前の報告では実験に使用したラットの週

齡が違ふことが考えられる。高血圧症では transforming growth factor- β (TGF- β)や monocyte chemotactic protein-1 といったサイトカインの産生が亢進し、これにより心臓における線維芽細胞の増殖と線維化が起こる[40, 51]。このことから WKY と SHR において sEV の投与による血圧の変化が線維芽細胞の機能を制御することを介して、左心室における血管周囲の線維化に影響を及ぼした可能性が考えられる。一方、ヒト心臓前駆細胞由来 sEV は血管新生を促進し線維化を減弱することで虚血再灌流障害モデルラットの心不全を改善することが報告されている[1]。したがって WsEV 及び SsEV が心臓の線維化を直接的に制御すること可能性も考えられる。

本研究では血漿 sEV が心血管系に影響を及ぼすことを明らかにしたが、この原因となる血漿 sEV に含まれる分子は明らかにしなかった。最近、次世代シーケンシング技術を用いて、SHR の血漿 sEV における miR の網羅的な解析が行われた[48]。その結果、TGF- β または mitogen-activated protein kinase (MAPK)経路を構成する分子の発現を抑制することで血圧を間接的に制御する miR の存在が示唆された。また SHR の血漿 sEV において miR-206 発現が顕著に減少していた。miR-206 は低酸素飼育ラットの血清中においても発現が減少し[103]、肺動脈 SMC の遊走と増殖能を抑制することが報告されている[35]。一方、本態性高血圧症に関連する sEV に含まれるタンパク質の網羅的な解析は未だ行われていない。

結論として、本章では WsEV 及び SsEV が全身血圧を制御しこれに血管と心臓における機能的及び構造的変化が伴うことを初めて明らかにした[68]。しかしこの詳細な機序は明らかにしなかった。

III. 第二章 最適なラット血漿 sEV 単離方法の探索

1. 諸言

第一章で血漿 sEV がラットの全身血圧を制御することを示したが、その機序は明らかにしなかった。血漿 sEV に含まれる分子の発現や機能を詳細に評価する為には、より収率と純度が高い sEV 単離方法の探索が必要であると考えられた。sEV の単離方法として、第一章で用いた UC 法のほかに、密度勾配遠心法、サイズ排除クロマトグラフィーやアフィニティー精製などが一般的に用いられている[22, 37, 99, 101]。しかしこれらの方法では十分な純度と収量が得られないため、モジュール型デバイスによるサイズ排除クロマトグラフィー[47]やマイクロ流体デバイスによる音響単離法[45, 100]などの新たな sEV 単離方法が近年開発されている。とりわけ polyethylene-glycol (PEG)を用いた沈降法がヒト培養細胞由来 sEV 及び血漿 sEV の単離に有用で簡便であることが報告されている[77]。そこで第二章では、正常 Wistar ラット血漿 sEV の単離に PEG を用いた方法が応用可能であるかの基礎的検討を行った。さらに、ヒト血漿 sEV の性質に抗凝固薬が影響を及ぼすことが示唆されているため[36]、Wistar ラット血漿 sEV に及ぼす抗凝固薬の影響も併せて検討した。

2. 材料及び方法

2-1. 動物実験

動物の飼育と取り扱いは北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 18-010, 19-023)、北里大学動物実験委員会が規定したガイドラインを遵守して行った。実験には、雄性 Wistar ラット(5~10 週齢) (CLEA Japan)を使用した。ラットは本学部 5 号館 2 階の小動物飼育室において、固形飼料(CE-2, CLEA Japan)を給餌し自由飲水で飼育した。Urethan (1.5 mg/kg, 腹腔内投与) (Sigma-Aldrich)深麻酔下で、20G 針(JMS, Hiroshima, Japan)を装着し抗凝固薬の heparin (1000 U/ml)(AY Pharmaceuticals), EDTA (100 mg/ml) (Sigma-Aldrich)または acid citrate dextrose buffer (ACD; 0.23 mg/ml tri-sodium citrate dihydrate, 0.14 mg/ml citric acid, 0.2 mg/ml glucose)で内部をコーティングした 5 ml シリンジ(JMS)を用いて後大静脈から血液を採取した。採取した血液と heparin (最終濃度 1 U/ml), EDTA (最終濃度 1 mg/ml)または ACD (最終濃度 13%)を混和した後、マイクロ冷却遠心分離機(model 3740, Kubota)で遠心分離(1000 x g, 室温, 10 min)し血漿を分離した。血漿は液体窒素中で急速に凍結し、使用まで保存(-80 °C)した。

2-2. sEV の単離

sEV 単離方法の概要は図に示した(図 6)。血漿を解凍(37 °C, 5 min)し、最初に遠心分離(10000 x g, 4 °C, 10 min)により large EV を沈殿させた。この沈殿は large EV としてウエスタンブロッティングによる解析に使用した。上清を 3 等分し、それぞれ UC 法、PEG による沈降の後に UC (PEG-UC 法)または PEG による沈降のみ(PEG 法)の 3 種類の方法による

sEV の単離に用いた。UC 法は以下に示す通りに行った。まず、上清を SW 55Ti スウィングローターを搭載した Optima XL-80 K 超遠心分離機 (Beckman Coulter) を用いて超遠心分離 (41600 rpm = 164071 x g, 4 °C, 35 min) した。沈殿を滅菌 PBS に懸濁し、再度超遠心分離を行った (41600 rpm = 164071 x g, 4 °C, 35 min)。この沈殿を滅菌 PBS に懸濁し、以下の実験に用いた。PEG-UC 法と PEG 法は以前の報告を参考にした [77]。PEG-UC 法では、large EV を除去した上清に 16% w/v PEG (分子量 6000, Wako) と 1 M NaCl を含む PEG 溶液を等量加えて転倒混和 (4 °C, 一晚) した。遠心分離 (2500 x g, 4 °C, 15 min) し、上清を除去した。沈殿を滅菌 PBS で激しく懸濁 (室温, 30 min) し、超遠心分離 (41600 rpm = 164071 x g, 4 °C, 35 min) した。沈殿を滅菌 PBS に懸濁し、以下の実験に用いた。PEG 法では、large EV を除去した上清に PEG 溶液を等量加えて転倒混和 (4 °C, 一晚) した。遠心分離 (2500 x g, 4 °C, 15 min) し、上清を除去した。沈殿を滅菌 PBS で激しく懸濁 (室温, 30 min) し、以下の実験に用いた。

2-3. sEV の粒度分布

sEV の粒度分布は、qNANO Gold (IZON Science) を用いて TRPS 法により測定した。ストレッチを 46.0~47.0 mm に設定した NP150 ナノポアを qNANO Gold に装着した。ナノポアへの sEV の吸着を抑制するために、TRPS Reagent Kit (IZON science) でナノポアをコーティングした。第一章 2-3 に準じ、EV の粒度分布を測定し粒度分布表を作成した (図 7A, 8A)。

2-4. 血小板の単離

Urethan (1.5 mg/kg, 腹腔内投与) (Sigma-Aldrich) 深麻酔下で、後大静脈から血液を採取した。血液の採取には 20G 針を装着し heparin

(1000 U/ml)で内部をコーティングした 5 ml シリンジを用いた。血液凝固を阻害するために、採取した血液と ACD (最終濃度 13%)を混和した。等量の Tyrode 液[0.044 mg/ml NaH₂PO₄, 8 mg/ml NaCl, 0.2 mg/ml KCl, 2.52 mg/ml 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 1 mg/ml NaHCO₃, 0.20 mg/ml MgCl₂·6H₂O, 1 mg/ml glucose]とピペッティングにより混和した後、マイクロ冷却遠心分離機で遠心分離(200 x g, 室温, 10 min)した。上清を回収し、遠心分離(800 x g, 室温, 10 min)した。この沈殿を血小板としてウエスタンブロッティングによる解析に使用した。

2-5. タンパク質発現解析

血漿 sEV、large EV、血漿及び血小板から radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% Triton-X, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% protease inhibitor mixture, and 1% phosphatase inhibitor mixture (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)]を用いてタンパク質を抽出した(4 °C, 10 min)。サンプル中のタンパク質濃度は bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce, Rockford, IL, USA)により定量した。等量のタンパク質(3.5~10 µg)を SDS-PAGE で分離した(7.5~14%, 80~120V, 1.5 h)後、ニトロセルロース膜(Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA)に転写した(400 mh, 1.5 h)。等量のタンパク質が転写されているかを確認するために、転写膜を 0.1% Ponceau-S/5% 酢酸で染色(室温、5 min)し、1% 酢酸(室温、5 min)で 3 回洗浄した。洗浄後、ATTO light capture system (ATTO, Tokyo, Japan)を用いて可視光下で撮影した。CS analyzer 3.0 software (ATTO)を用いて各レーンにおける全てのバンドの強度を測定し、総タンパク質量とした。転写膜を 0.5%ス

キムミルク(Wako)でブロッキング(室温、1 h)した後、一次抗体[0.1% Tween 20 を添加した Tris-buffered saline (TBS-T)で 500 倍希釈]を反応させた(4 °C, 一晚)。転写膜に結合した一次抗体は HRP 標識二次抗体(TBS-T で 10000 倍希釈、室温、1 h)と EZ-ECL system (Biological Industries, Kibbutz Beit-Hesmek, Israel)を用いて可視化した。可視化したバンドは CS analyzer 3.0 software を用いて定量・解析した。以下に示す抗体をウエスタンブロッティングに用いた。抗 CD81 (EXOAB-CD81A-1)及び CD63 ウサギ抗体(EXOAB-CD63A-1, System Biosciences, Palo Alto, CA, USA)。抗 CD9 マウス抗体(#60232, Proteintech, Rosemont, IL, USA)。抗 α -actinin-4 (sc-393495), albumin (sc-271605), integrin α IIb (sc-21773)及び GPVI マウス抗体(sc-390410, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA)。HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ二次抗体(EXOAB-HRP, System Biosciences)及び HRP 標識抗マウス IgG ヒツジ二次抗体(NA931, GE HealthCare, Chicago, IL, USA)。

2-6. 電子顕微鏡観察

PEG-UC 法により単離した血漿 sEV を 2% paraformaldehyde (Wako)で固定した(4 °C, 30 min)。固定した sEV を親水化した Cu グリッドにマウントした(室温, 5 min)。余分な sEV をろ紙で吸い取って除去し、グリッドを蒸留水で洗浄した(2 回, 室温, 5 min)。リンタングステン酸溶液をグリッドにマウントし静置した(室温, 3 min)。余分なリンタングステン酸溶液をろ紙で吸い取って除去し、グリッドを完全に乾燥させた(室温)。加速電圧を 80 kV に設定した透過電子顕微鏡(HT-7650, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)を用いて sEV の観察と撮影を行った。

2-7. 統計学的解析

データは平均値±標準誤差(SEM)で示した。多群間の検定には、Mann-Whitney の U 法を用いて有意差が認められた場合に Kruskal-Wallis 法による多重比較を用いた。2 群間の検定には Mann-Whitney の U 法を用いた。危険率(P)が 5%未満の場合に有意差ありと判断した。

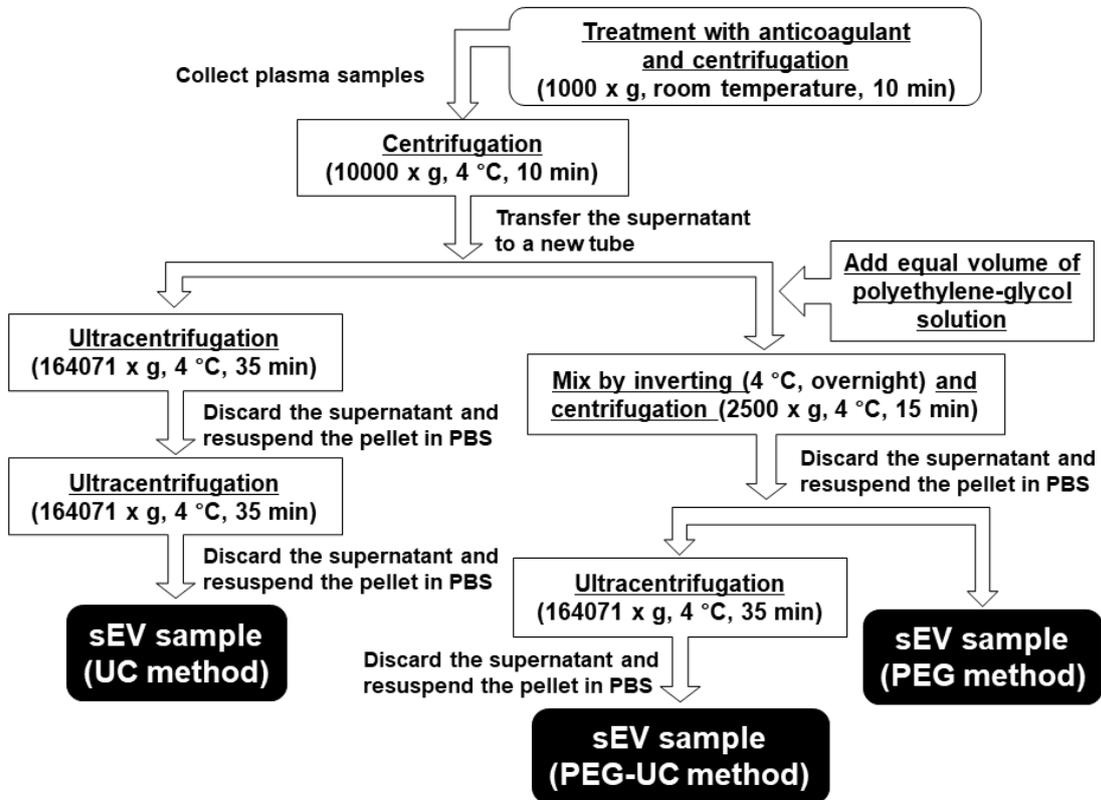


Fig. 6. Scheme of isolation procedures for sEV from rat plasma.

Blood samples were obtained from male Wistar rats (7~9-week-old) via an inferior vena cava under a deep anesthetization with urethane (1.5 g/kg, i. p.). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 1 mg/ml)-anticoagulated blood samples were separated into plasma by centrifugation (1000 × g, room temperature, 10 min). The plasma sample derived from one Wistar rat was divided equally into three isolation method groups including the UC method, precipitation with polyethylene-glycol and ultracentrifugation (PEG-UC) method, or precipitation with polyethylene-glycol (PEG) method after

depletion of large EV by centrifugation (10000 × g, 4 °C, 10 min).

PBS: phosphate-buffered saline.

3. 実験結果

3-1. 3 種類の方法で単離した血漿 sEV の粒度分布

3 種類の方法で単離した EV の粒度分布を比較した。いずれの方法においても、単離した EV は直径 100~150 nm をピークとする粒度分布を示し、sEV であることが確認された(図 7A, n = 4)。粒子濃度は PEG 法で最も高く、UC 法で最も低かった(図 7B, n = 4, $5.43 \pm 1.12 \times 10^{10}$ particles/ml in PEG > $1.63 \pm 0.34 \times 10^{10}$ particles/ml in PEG-UC >> $4.17 \pm 1.12 \times 10^8$ particles/ml in UC)。粒子径の平均値は、PEG-UC 法で UC 法と比較して有意に小さかった(図 7C, n = 4, 118.8 ± 4.8 nm in PEG-UC, $P < 0.05$ vs. 150.8 ± 5.5 nm in UC)。最頻粒子径(最も数の多い粒子の直径)は、UC 法及び PEG-UC 法で PEG 法と比較して有意に小さかった(図 7D, n = 4, 101.0 ± 0.9 nm in UC or 96.5 ± 1.6 nm in PEG-UC, $P < 0.05$ vs. 110.0 ± 0.8 nm in PEG)。直径が 150 nm 以下の粒子濃度の割合は、PEG-UC 法及び PEG 法で UC 法と比較して有意に高かった(図 7E, n = 4, $89.3 \pm 3.6\%$ in PEG-UC or $86.0 \pm 2.3\%$ in PEG, $P < 0.05$ vs. $65.8\% \pm 3.0\%$ in UC)。

3-2. 3 種類の方法で単離した血漿 sEV のタンパク質量とマーカータンパク質発現

次に、単離した sEV におけるタンパク質発現を解析した。血漿 sEV のタンパク質量は、PEG-UC 法で PEG 法と比較して有意に少なく(図 8A, n = 4, 0.28 ± 0.04 mg/ml in PEG-UC, $P < 0.01$ vs. 6.02 ± 0.52 mg/ml in PEG)、UC 法では BCA 法による検出限界以下であった。タンパク質量で補正した血漿 sEV の粒子濃度は、PEG-UC 法で PEG 法と比較して有意に高

かった(図 8B, $n = 4$, $5.88 \pm 2.42 \times 10^{10}$ particles/mg in PEG-UC, $P < 0.05$ vs. $0.91 \pm 0.37 \times 10^{10}$ particles/mg in PEG)。sEV マーカーの CD81 [89] (予想される分子量は~26 kDa)タンパク質は、PEG-UC 法によって単離した sEV で PEG 法と比較して有意に高発現していた(図 8C, $n = 4$, $P < 0.05$)。また、予想される CD81 の分子量より大きい位置(~30 kDa)にもバンドが検出された。sEV マーカーの CD9 [89]タンパク質も、PEG-UC 法によって単離した sEV で PEG 法と比較して有意に高発現していた(図 8D, $n = 4$, $P < 0.05$)。しかし sEV マーカーの CD63 [89] (~40~60 kDa)タンパク質の発現量は、PEG-UC 法によって単離した sEV で PEG 法と比較して有意に低かった(図 8E, $n = 4$, $P < 0.05$)。また、予想される CD63 の分子量より小さい位置(~30 kDa)にもバンドが検出された。Large EV マーカーの α -actinin-4 と血漿 albumin タンパク質発現量は、PEG-UC 法によって単離した sEV で PEG 法と比較して有意に低かった (α -actinin-4: 図 8F, $n = 4$, $P < 0.05$; albumin: 図 8G, $n = 4$, $P < 0.05$)。

3-3. 抗凝固薬が血漿 sEV の粒度分布に及ぼす影響

3 種類の抗凝固薬で処理した血漿から PEG-UC 法により単離した sEV の粒度分布を比較した。どの抗凝固薬でも、単離した sEV は直径 100~150 nm をピークとする粒度分布を示した(図 9A, $n = 4$)。また、全ての抗凝固薬の間で粒子濃度、平均粒子径、最頻粒子径及び直径が 150 nm 以下の粒子の割合に有意な差は認められなかった(図 9B-E, $n = 4$)。

3-4. 抗凝固薬が血漿 sEV のタンパク質量とマーカータンパク質発現に及ぼす影響

ACD で処理した血漿 sEV のタンパク質量は、EDTA 血漿と比較して

有意に高かった(図 10A, $n = 4$, $0.42 \pm 0.03 \text{ mg/ml in ACD}$, $P < 0.05$ vs. $0.29 \pm 0.02 \text{ mg/ml in EDTA}$)。全ての抗凝固薬の間で、タンパク質量で補正した血漿 sEV の粒子濃度に有意な差は認められなかった(図 10B, $n = 4$)。全ての抗凝固薬の間で血漿 sEV における sEV マーカー(CD81, CD9 及び CD63)タンパク質の発現量に有意な差は認められなかった(図 10C-E, $n = 4$)。いずれの抗凝固薬で分離した血漿 sEV においても α -actinin-4 タンパク質はほとんど発現していなかった(図 10F, $n = 4$)。一方、ACD 血漿 sEV における albumin タンパク質の発現量は、heparin 及び EDTA 血漿と比較して有意に低かった(図 10G, $n = 4$, 0.55 ± 0.19 -fold relative to heparin, $P < 0.05$)。また抗凝固薬が血小板の活性化に及ぼす影響を検討したところ、いずれの抗凝固薬で分離した血漿 sEV においても血小板マーカータンパク質の発現は確認されなかった(図 11)。

3-5. PEG-UC 法により単離した血漿 sEV の電子顕微鏡観察

電子顕微鏡による観察により、heparin 血漿から PEG-UC 法で単離した EV は sEV に特徴的な粒子サイズと典型的なキャップ構造を示すことが確認された(図 12)。

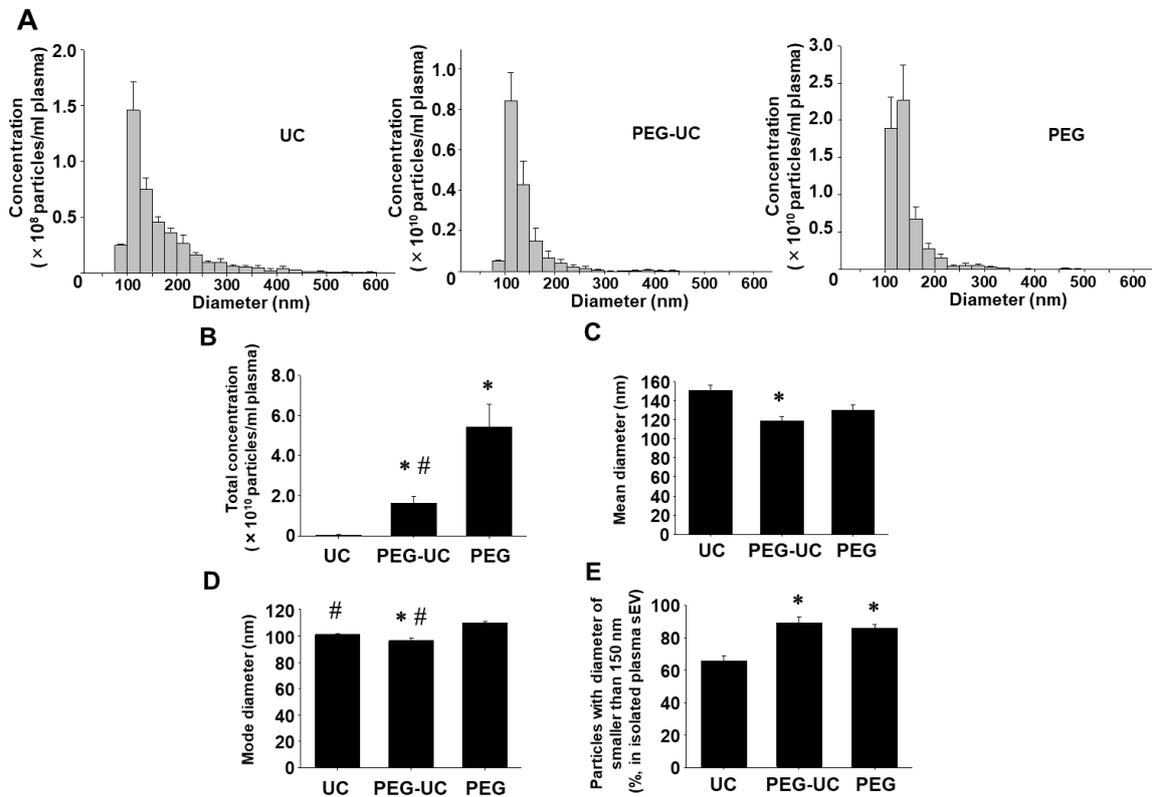


Fig. 7. Concentration and size distribution of plasma sEV isolated by three (UC, PEG-UC or PEG) methods.

sEV were isolated from EDTA (1 mg/ml)-anticoagulated plasma of male Wistar rats (7~9-week-old) by the three methods as described in Fig. 6. Concentration and size distribution of sEV were measured by a TRPS method using a qNANO Gold instrument. (A) Concentration and size distribution of plasma sEV were shown. The concentration was normalized to the starting volume of plasma (particles/ml). (B) Total concentration of plasma sEV was shown (particles/ml). (C, D) Mean and mode (most frequent) diameters of plasma sEV were shown. (E) The percentage of particles with a diameter of smaller than 150 nm in total particles of plasma sEV

was shown. Results were expressed as means \pm SEM in bar graphs (n = 4).

* $P < 0.05$ vs. UC, # $P < 0.05$ vs. PEG.

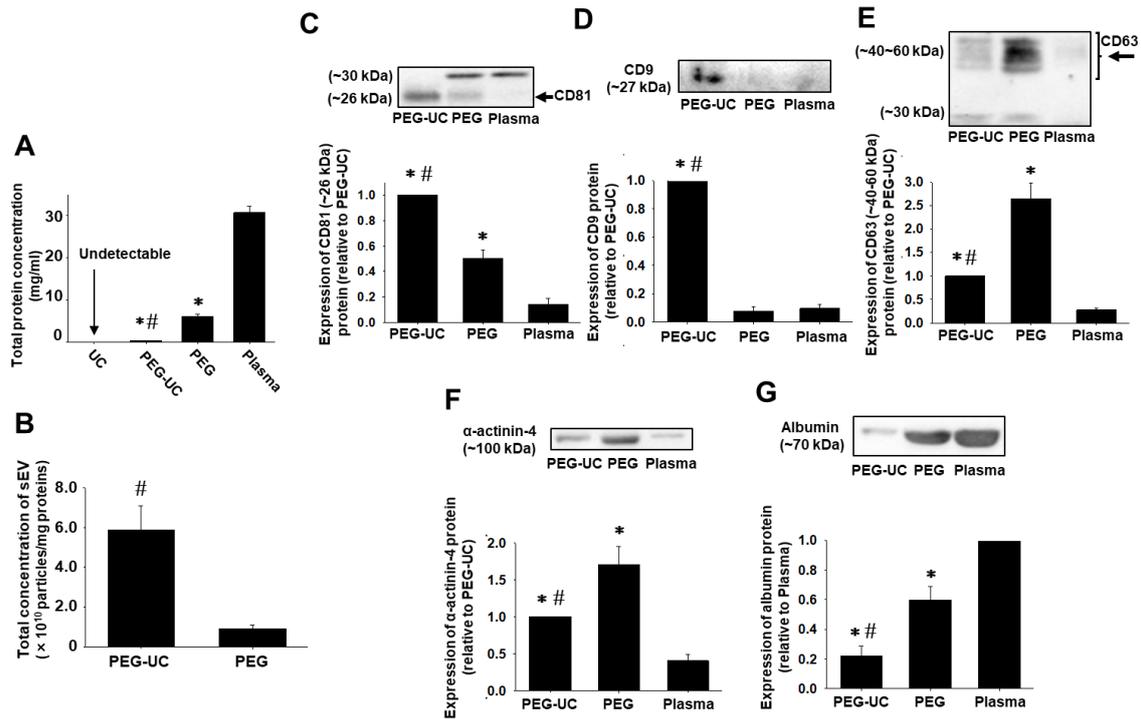


Fig. 8. Total protein concentration and expression of marker proteins for sEV (CD81, CD9, and CD63), large EV (α -actinin-4), or plasma (albumin) in sEV isolated by the different methods as described in Fig. 6.

Total protein was extracted from plasma sEV of male Wistar rats (7~9-week-old) using radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer. (A) The concentration of protein was measured by a bicinchoninic acid (BCA) assay and normalized to the starting volume of plasma (mg/ml). (B) The total concentration of plasma sEV normalized to each protein concentration was shown (particles/mg). (C-G) Expression of marker proteins in plasma sEV was determined by Western blotting using an antibody to CD81, CD9, CD63, α -actinin-4, or albumin. The arrows indicated the bands

for CD81 (C) and CD63 (E) that we measured for quantitative analyses. Data were shown as fold increase relative to the expression level in sEV isolated by the PEG-UC method (C: CD81, D: CD9, E: CD63, F: α -actinin-4) or plasma (G: albumin). Results were expressed as means \pm SEM in bar graphs (n = 4). * $P < 0.05$ vs. plasma, # $P < 0.05$ vs. PEG.

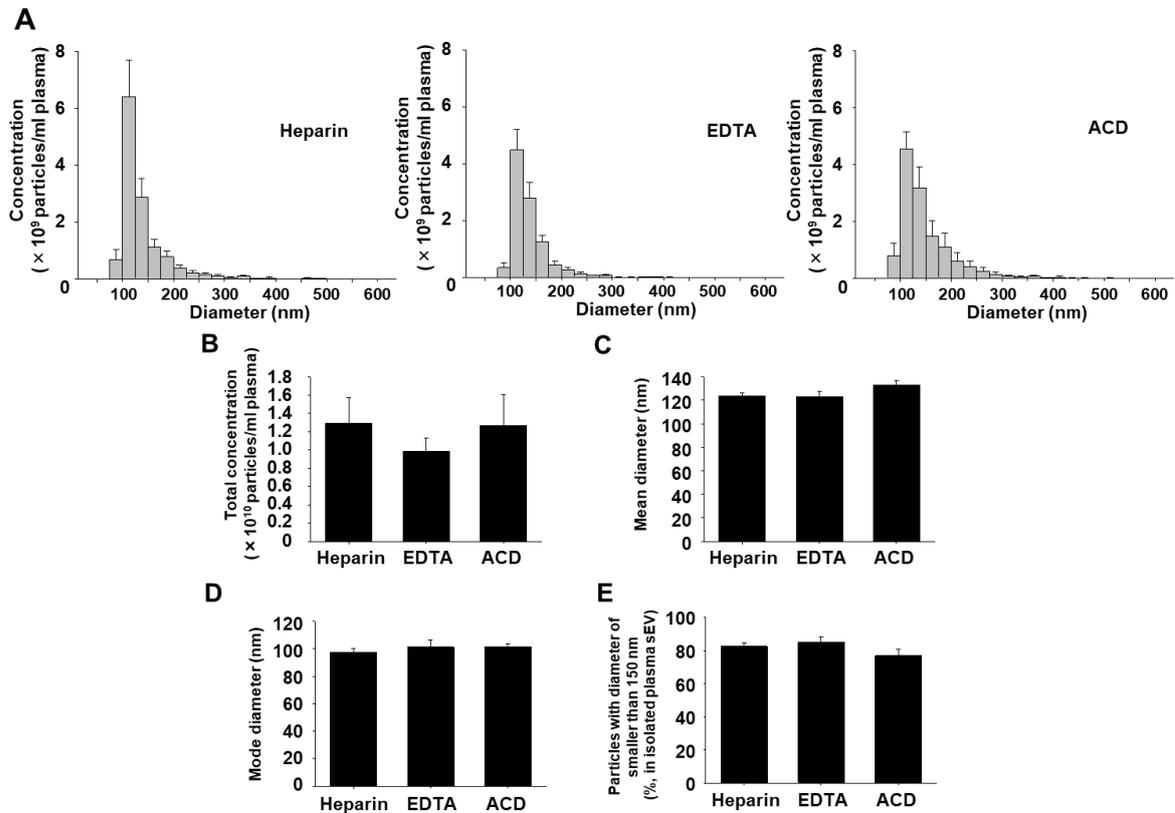


Fig. 9. Effects of anticoagulants on concentration and size distribution of plasma sEV.

sEV were isolated from heparin (1 U/ml)-, EDTA (1 mg/ml)-, or acid citrate dextrose buffer (ACD, 13%)-anticoagulated plasma of Wistar rats (5~10-week-old) by the PEG-UC method. Concentration and size distribution of sEV were measured by a TRPS method using a qNANO Gold instrument. (A) Concentration and size distribution of plasma sEV were shown (particles/ml). The concentration was normalized to the starting volume of plasma. (B) The total concentration of plasma sEV was shown (particles/ml). (C, D) Mean and mode (most frequent) diameters of plasma sEV were shown. (E)

The percentage of particles with a diameter of smaller than 150 nm in total particles of plasma sEV was shown. Results were expressed as means \pm SEM in bar graphs (n = 4).

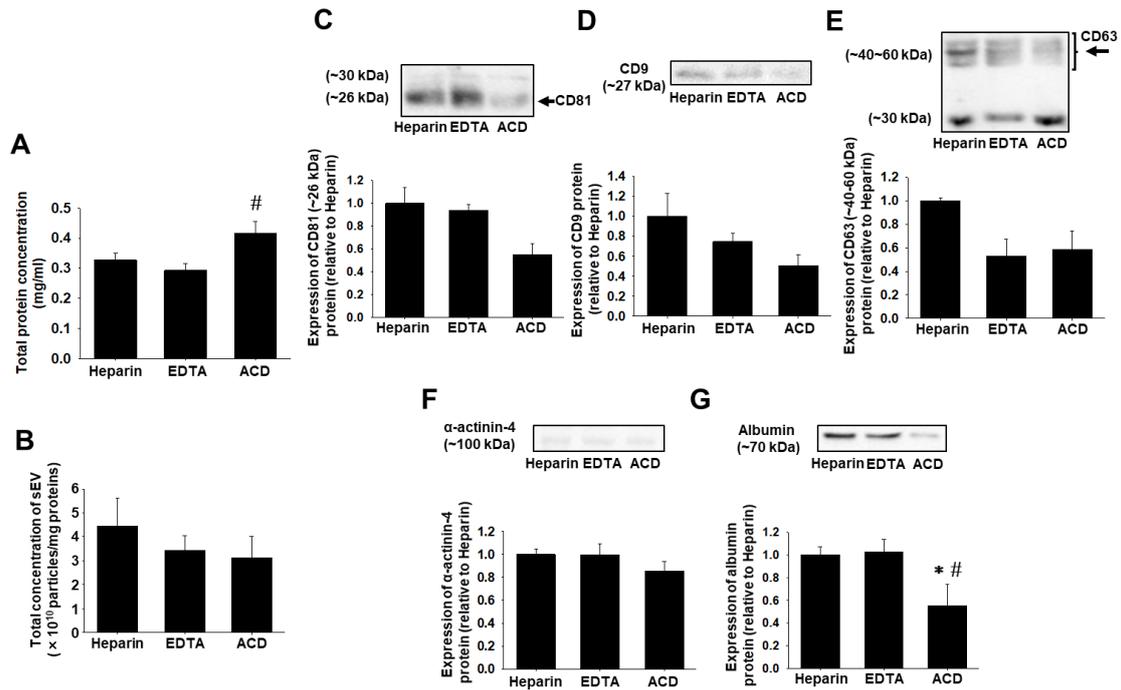


Fig. 10. Effects of anticoagulants on total protein concentration and expression of marker proteins for sEV, large EV, or plasma in sEV.

Total protein was extracted from sEV isolated from heparin (1 U/ml)-, EDTA (1 mg/ml)-, or ACD (13%)-anticoagulated plasma of Wistar rats (5~10-week-old) by the PEG-UC method using RIPA buffer. (A) The concentration of protein was measured by a BCA assay and normalized to the starting volume of plasma (mg/ml). (B) The total concentration of plasma sEV normalized to each protein concentration was shown (particles/mg). (C-G) Expression of marker proteins was determined by Western blotting using an antibody to CD81, CD9, CD63, α -actinin-4, or albumin. The arrows indicated the bands for CD81 (C) and CD63 (E) that we measured for quantitative analyses. Data were shown as fold increase relative

to the expression level in sEV derived from the heparin-anticoagulated plasma. Results were expressed as means \pm SEM in bar graphs (n = 4).

* $P < 0.05$ vs. heparin, # $P < 0.05$ vs. EDTA.

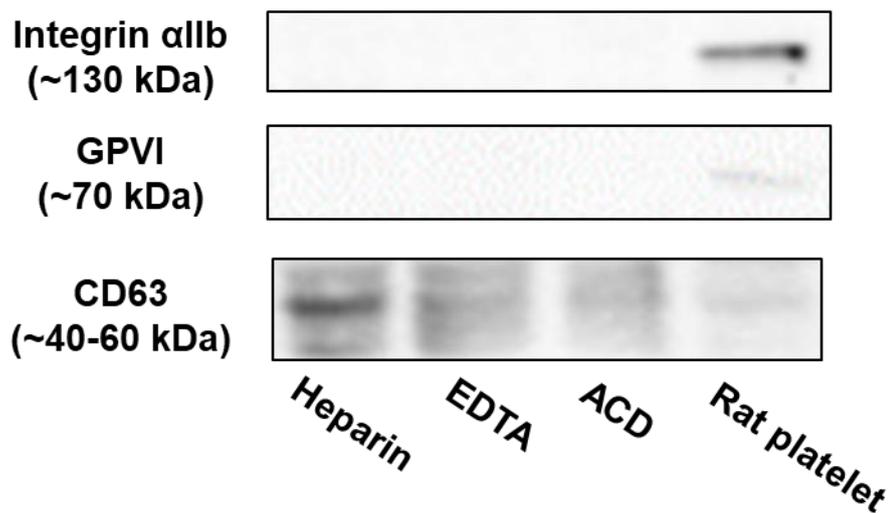


Fig. 11. Expression of marker proteins for platelet (integrin α IIb and GPVI) in sEV from rat plasma.

Total protein was extracted from sEV isolated from heparin (1 U/ml)-, EDTA (1 mg/ml)-, or ACD (13%)-anticoagulated plasma of normal Wistar rats (5~10-week-old) by the PEG-UC method. The expression of protein was determined by Western blotting using an antibody to integrin α IIb and GPVI (a platelet marker), or CD63. Protein extract of Wistar rat platelet was loaded as a positive control for expression of platelet marker proteins. Representative images were shown (n = 4). CD63 blot in this figure was from the same origin as shown in Fig. 10E.

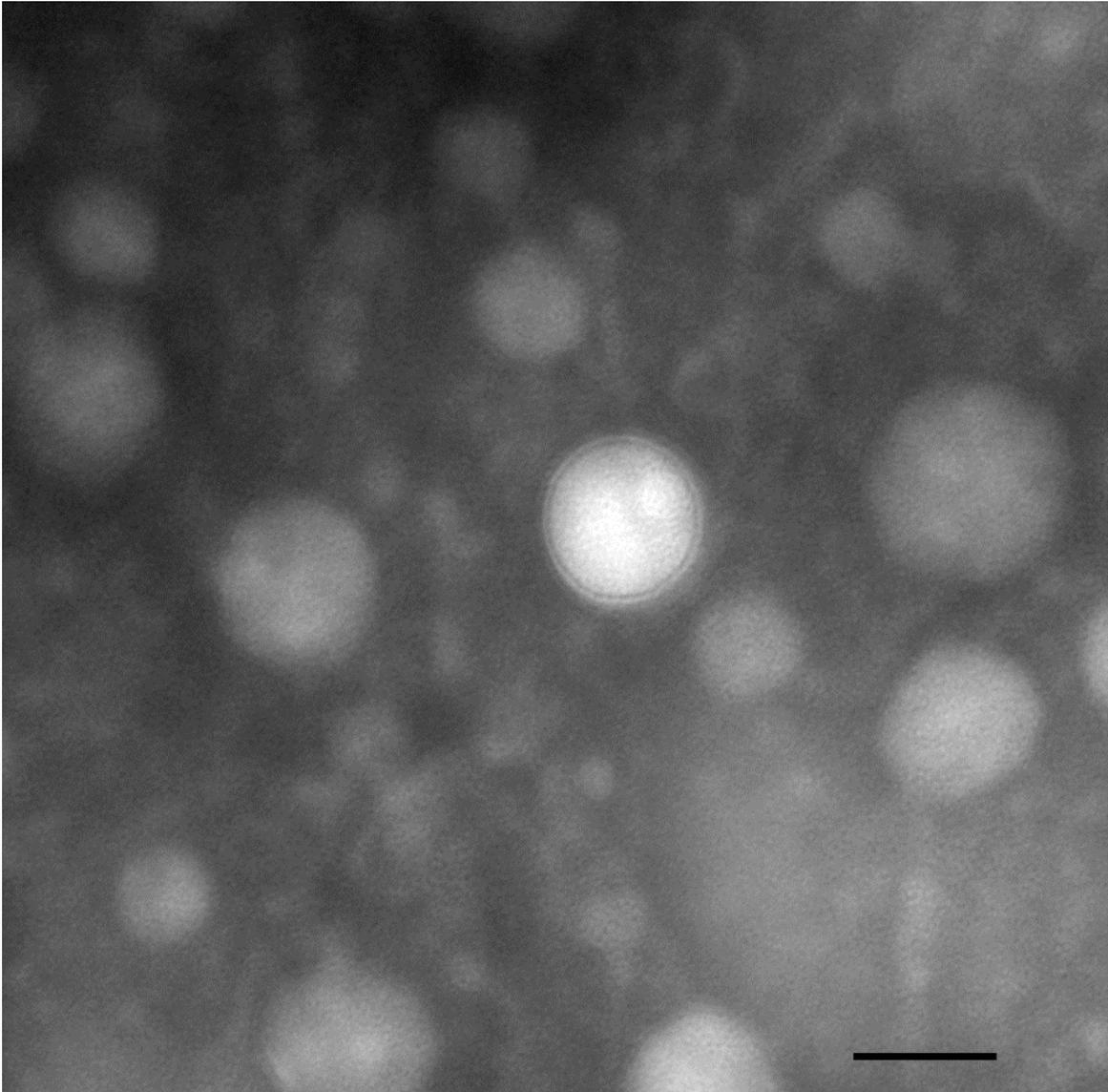


Fig. 12. Microscopic evaluation of sEV by using a transmission electronic microscope (TEM).

sEV isolated from heparin (1 U/ml)-anticoagulated plasma of Wistar rats (6-week-old) by the PEG-UC method were fixed with 2% paraformaldehyde. The fixed sEV were stained with phosphotungstic acid on a carbon-coated copper grid and observed by using TEM (80 kV, $\times 15000$). Scale bar: 100 nm.

4. 考察

第二章では PEG による沈降がラット血漿からの sEV 単離に有用であるかと、抗凝固薬が血漿 sEV の性質に及ぼす影響を検討し、以下に示す結果を得た。1) PEG と超遠心分離を組み合わせた方法(PEG-UC 法)が、収率と純度の点でラット血漿からの sEV 単離に最適であった。2) 抗凝固薬が血漿 sEV に及ぼす影響はほとんど認められなかった。

これまでの報告[77]と一致して、PEG 法で単離した血漿 sEV の粒子濃度は高い一方で、UC 法では極めて低かった(図 7B, PEG > PEG-UC >> UC)。この理由として、超遠心分離により sEV の回収率が低下する[30]ことが考えられる。さらに超遠心分離によって sEV が凝集することも知られており[46]、本研究において UC 法で粒子径の大きな sEV が多かった(図 7A, C, E)のはそのためだと考えられる。一方、夾雑物である large EV のマーカーである α -actinin-4 と血漿 albumin タンパク質の発現量は、PEG-UC 法で PEG 法と比較して有意に低かった(図 8F, G)。このことから、超遠心分離による洗浄が夾雑物の除去と純度の向上という点においては効果的であることが示唆される[52, 77]。

市販の製品の中にはポリマーにより sEV を沈降させて単離するものがあり、PEG 法と同様にポリマーが溶液全体の水溶性を低下させることで sEV を沈降させるという原理に基づいている[77]。そしてこれらの製品においても凝集タンパク質が夾雑物として混入することが報告されている[70, 82]。そのため、超遠心分離による洗浄過程を追加することで夾雑物を除去できる[52]。ラット血漿からの sEV の単離法を探索した本研究においてもこのこと(超遠心分離による夾雑物の除去)が実証されたが、本研究で見出した PEG-UC 法の方が市販製品と比較してコストの面でもより優れていると考えられる。

全ての抗凝固薬の間で血漿 sEV の粒子濃度に有意な差は認められな

かった(図 9B)。一方 EDTA 血漿から単離した sEV の粒子濃度は、他の抗凝固薬と比較して高いことがこれまでに報告されている[36]。しかしこの報告では、凍結融解した sEV の粒子濃度と粒子径を測定している。凍結融解は sEV の粒度分布に影響を及ぼす[19, 53]ため、本研究における結果と異なっていたものと考えられる。また全ての抗凝固薬の間で直径 150 nm 以下の粒子数の割合に有意な差は認められなかった(図 9E)。一方 ACD 血漿の large EV は heparin 血漿と比較して多いことがフローサイトメトリーによる測定で明らかになっている[29, 31, 36]。しかし、これらの報告では sEV は検出されていない。本研究では sEV も検出可能な TRPS 法を用いているため、より正確な sEV の粒度分布を示しているものと考えられる。

ACD 血漿から単離した sEV のタンパク質量は EDTA 血漿と比較して有意に高かったが、血漿 albumin タンパク質の発現量は他の抗凝固薬と比較して有意に低かった(図 10A, G)。このことから、ACD は albumin 以外の血漿タンパク質を凝集させる、または sEV に吸着させる作用を持つことが示唆される。これを支持するように、血漿 albumin の添加により sEV と他の物質の吸着が抑制されるという報告がある[101]。以上から、抗凝固薬が血漿 sEV とタンパク質の結合に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。

CD81, CD9 及び CD63 タンパク質は sEV マーカーとして一般的に広く用いられている[89]。本研究において、血漿 sEV における CD81 と CD9 タンパク質の発現量は PEG-UC 法で PEG 法と比較して有意に高かった(図 8C, D)。一方、CD63 タンパク質の発現量は PEG-UC 法で PEG 法と比較して有意に低かった(図 8E)。この理由として、sEV マーカータンパク質の発現様式は、sEV の由来細胞、生体の病態や単離方法によって変化する[32, 79, 108]ことが影響していると考えられる。また、CD81, CD9 及び CD63 が sEV に搭載される経路はそれぞれ異なることも報告されている[3, 65]。

結論として、本章ではラット血漿から PEG による沈降の後、超遠心分離を行う方法は夾雑物の少ない sEV を高収率で単離できることを初めて明らかにした。また抗凝固薬の影響はほとんど認められなかった[66]。以上の結果は高血圧症のみならず糖尿病や肥満などの疾患モデルラットにおける血中 sEV の役割解明において貢献するものと考えられる。

IV. 第三章 血漿 sEV が血管平滑筋細胞の機能に及ぼす影響

1. 諸言

高血圧発症・進展には、SMCの遊走と増殖による血管壁の構造変化が重要な役割を果たす[14, 91]。SHRの血管外膜線維芽細胞由来sEVやヒト冠動脈疾患患者の血漿sEVはSMCの遊走を促進することが報告されている[62, 90]。Lipopolysaccharide処置により肺動脈内皮細胞から分泌されるsEVはSMCの増殖を促進する[106]。また網羅的な解析により、WKYとSHRの血漿sEVにおけるmiRの発現動態が異なることが報告されている[48]。そこで第三章では、第一章で明らかにした血漿sEVによる血圧制御の機序を探索するために、PEG-UC法によって単離したWsEV及びSsEVがSMCの遊走と増殖能に及ぼす影響を検討した。

2. 材料及び方法

2-1. 動物実験

動物の飼育と取り扱いは北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 18-016, 19-023, 19-027)、北里大学動物実験委員会が規定したガイドラインを遵守して行った。実験には雄性 WKY, SHR (Hoshino Laboratory Animals)及び正常 Wistar ラット(CLEA Japan)を使用した。ラットは本学部 5 号館 2 階の小動物飼育室において、固形飼料(CE-2, CLEA Japan)を給餌し自由飲水で飼育した。

2-2. sEV の単離

WKY 及び SHR (6 週齢)に urethan (1.5 mg/kg) (Sigma-Aldrich)を腹腔内投与し深麻酔した。20G 針(JMS)を装着し heparin (1000 U/ml) (AY Pharmaceuticals)で内部をコーティングした 5 ml シリンジ(JMS)を用いて後大静脈から血液を採取した。採取した血液と heparin (最終濃度 1 U/ml)を混和した後、マイクロ冷却遠心分離機(model 3740, Kubota)で遠心分離(1000 x g, 室温, 10 min)し血漿を分離した。血漿は液体窒素中で急速に凍結し、使用まで保存(-80 °C)した。血漿を解凍(37 °C, 5 min)し、最初に遠心分離(10000 x g, 4 °C, 10 min)により large EV を沈殿させて除去した。その後は第二章 2-2 に準じ、PEG-UC 法により sEV を単離した。

2-3. sEV の粒度分布

第二章 2-3 に準じ、EV の粒度分布を測定し粒度分布表を作成した(図 13A, B)。

2-4. タンパク質発現解析

血漿 sEV におけるタンパク質発現の解析は第二章 2-5 に準じ、ウエスタンブロッティングにより以下に示す抗体を用いて行った。抗 CD63 (EXOAB-CD63A-1)及び CD81 ウサギ抗体 (EXOAB-CD81-1, System Biosciences)。抗 γ -actin マウス抗体 (017-24551, Wako)。抗 albumin マウス抗体 (sc-270165, Santa Cruz)。HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ二次抗体 (EXOAB-HRP, System Biosciences)及び HRP 標識抗マウス IgG ヒツジ抗体 (NA931, GE Healthcare)。

2-5. ラット胸部大動脈由来 SMC の単離

以前に報告された方法[41]を参考に、正常 Wistar ラットの胸部大動脈から酵素法により初代培養ラット大動脈 SMC (rat aortic SMC: RASM)を単離した。ラットは urethan (1.5 g/kg, 腹腔内投与)深麻酔下で放血により安楽殺した。滅菌下で胸部大動脈を摘出した。氷冷した Hank's Balanced Salt Solution (-) (Wako)中で血管周囲の脂肪組織を除去し、長さが 1~2 mm のリング状に血管を切断した。内皮と外膜を除去するために、collagenase (3.5 mg/ml)を含む M199 培地 (Wako)中で反応 (37 °C, 15 min)させた。ピペッティング後、再度 collagenase (3.5 mg/ml)を含む M199 培地中で酵素反応により消化した (37 °C, 30 min)。ピペッティング

により組織を分散させ、遠心分離(200 x g, 5 min, 4 °C)した。上清を除去し、滅菌 TBS で 2 倍希釈した trypsin/1 mM EDTA 溶液(2.5 g/l) (Nacalai Tesque)に沈殿を懸濁し反応(37 °C, 30 min)させた。ピペッティングにより組織を分散させ、trypsin neutralizer solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)と混和し酵素反応を止めた。遠心分離(200 x g, 4 °C, 5 min)し、上清を除去した。沈殿した細胞を 20%ウシ胎児血清(Fetal bovine serum: FBS, Gibco, New York, NY, USA)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Wako)中に懸濁し、35 mm 培養 dish に播種した。以降は 10% FBS を含む DMEM 中で細胞を培養(37 °C, 5% CO₂)し、コンフルエント直前に継代を行った。継代数 4~10 の細胞を以下の実験に用いた。

2-6. 細胞遊走能の測定

Boyden chamber assay により RASM の遊走能を測定した [85, 93]。前処理として、ポリカーボネート膜(Costar, Cambridge, MA, USA)を 2%ゼラチン溶液(Wako)でコーティング(37 °C, 30 min)した。Upper chamber に 5.0 x 10⁴ 個の細胞を播種し、WsEV 及び SsEV (0.1, 0.3, 1.0 x 10⁸ particles/ml)または溶媒の滅菌 PBS (Cont)を 48 時間処置した。ポリカーボネート膜を通過し遊走した RASM を 100% methanol で固定(室温, 15 min)し、蒸留水で 15 倍希釈したギムザ染色液(Nacalai Tesque)で染色(室温, 20 min)した。ポリカーボネート膜を通過しなかった RASM を綿棒で除去した後、CCD カメラ(True Chrome II Plus, TUCSEN, Fujian, China)を装着した位相差顕微鏡(CKX31, Olympus)で遊走した細胞

を観察・撮影した(100倍の視野で1サンプルにつき3箇所)。遊走細胞数を計測し、Contに対する比率を棒グラフで示した。

2-7. 細胞増殖能の測定

Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay kit (Exalpha Biologicals, Shirley, MA, USA)を用いて BrdU 取り込みを測定することにより RASM 増殖能を検討した [85, 93]。4.0 x 10³ 個の細胞を 96-well 培養プレートに播種し、WsEV, SsEV (0.1, 0.3, 1.0 x 10⁸ particles/ml) または滅菌 PBS (Cont) を 48 時間処置した。BrdU は sEV または PBS 存在下で 36 時間処置した。処置後、fixing solution で細胞を固定(室温、30 min)し、wash buffer で 3 回洗浄した。抗 BrdU マウス抗体を反応(室温、30 min)させた後、HRP 標識抗マウス IgG ヤギ抗体(2000 倍希釈、室温、30 min)を反応させた。Tetra-methyl benzidine (TMB) で発色(室温、30 min)させ、stop solution を混和して発色を停止させた。マイクロプレートリーダー(Tristar3 LB941, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)を用いて吸光度(450 nm-560 nm の差)を測定し、Cont に対する比率を棒グラフで示した。

2-8. sEV の取り込み

緑色蛍光色素の PKH67 (Sigma-Aldrich) で標識した WsEV 及び SsEV を処置して、RASM における sEV の取り込みを検討した。WsEV 及び SsEV を PKH67 (4 μM) と反応(室温、3 min)させた後、10%ウシ血清 albumin (Nacalai Tesque) を含む滅菌 PBS を等量加えて反応を停止させた。余分な色素を除去するために、スク

ロース(0.971 M)を底に入れたチューブに sEV-PKH67 溶液を入れて超遠心分離(41600 rpm = 164071 x g, 4 °C, 35 min)した。上清を除去し、沈殿を滅菌 PBS に懸濁した。PKH67 標識 sEV (1.0×10^8 particles/ml)又は PKH67 に反応させた PBS (Cont)を RASM に 2 時間処置した。処置後、4% paraformaldehyde (Wako)で固定(4 °C, 10 min)し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (DAPI, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)で核染色(室温, 10 min)した。顕微鏡用デジタルカメラ(DP74, Olympus)を装着した光学顕微鏡(BX-51, Olympus)で観察・撮影し、cellSens standard ソフトウェア(ver. 1.18, Olympus)により画像を取得した。画像は Image J ソフトウェア(ver. 1.80_112, National Institutes of Health)により解析した。

2-9. 統計学的解析

データは平均値 ± 標準誤差(SEM)で示した。多群間の検定には、繰り返しのある一元配置分散分析(ANOVA)を行い有意差が認められた場合に Bonferroni 法による多重比較を用いた。2 群間の検定には Student の t-test を用いた。危険率(P)が 5%未満の場合に有意差ありと判断した。

3. 実験結果

3-1. 血漿 sEV の粒度分布

これまでに報告されている sEV の直径は約 50~150 nm である [61, 88]。PEG-UC 法により単離した WKY 及び SHR の血漿 EV は共に 100~150 nm をピークとする粒度分布を示し、sEV であることが確認された (図 13A, B, n = 3)。また WsEV と SsEV の間で、粒子濃度、平均粒子径及び直径が 150 nm 以下の粒子濃度の割合に有意な差は認められなかった (図 13C-E, n = 3)。

3-2. 血漿 sEV のマーカータンパク質発現

次に、単離した sEV におけるタンパク質発現を検討した。sEV マーカーの CD63 [89] タンパク質発現は、WsEV と SsEV との間で差が認められなかった (図 14A, n = 3)。一方 sEV マーカーの CD81 タンパク質発現量は、SsEV で WsEV と比較して有意に低かった (図 14B, n = 3, $P < 0.05$)。WsEV 及び SsEV において、large EV マーカーの γ -actin と血漿 albumin タンパク質発現量は、それぞれのポジティブコントロールサンプル (単離 large EV 及び血漿) と比較して有意に低かった (図 14C, D, n = 3, $P < 0.01$)。

3-3. 血漿 sEV が SMC の遊走と増殖能に及ぼす影響

WsEV 及び SsEV が RASM の細胞機能に及ぼす影響を検討した。WsEV ($0.3, 1.0 \times 10^8$ particles/ml, 48 h) 及び SsEV (1.0×10^8 particles/ml, 48 h) 処置は RASM の遊走を有意に促進した (図

15A, $n = 3$, 0.3×10^8 particles/ml WsEV and 1.0×10^8 particle/ml SsEV, $P < 0.05$ vs. Cont; 1.0×10^8 particles/ml WsEV, $P < 0.01$ vs. Cont)。また、WsEV (1.0×10^8 particles/ml, 48 h)及び SsEV (1.0×10^8 particles/ml, 48 h)処置は RASM の増殖を有意に促進した(図 15B, $n = 6$, $P < 0.01$ vs. Cont)。WsEV と SsEV の間で遊走・増殖能に差は認められなかった。

3-4. sEV の取り込み

sEV はファゴサイトーシス、ピノサイトーシスや膜融合により細胞内に取り込まれることで細胞機能を調節している [59, 76, 78]。そこで sEV の取り込みを検討するために、緑色蛍光色素の PKH67 で標識した WsEV と SsEV を RASM に処置した。WsEV (1.0×10^8 particles/ml)と SsEV (1.0×10^8 particles/ml)はいずれも処置 2 時間後に RASM に取り込まれた(図 16, $n = 3$)。WsEV と SsEV の間で取り込み量に有意な差は認められなかった。

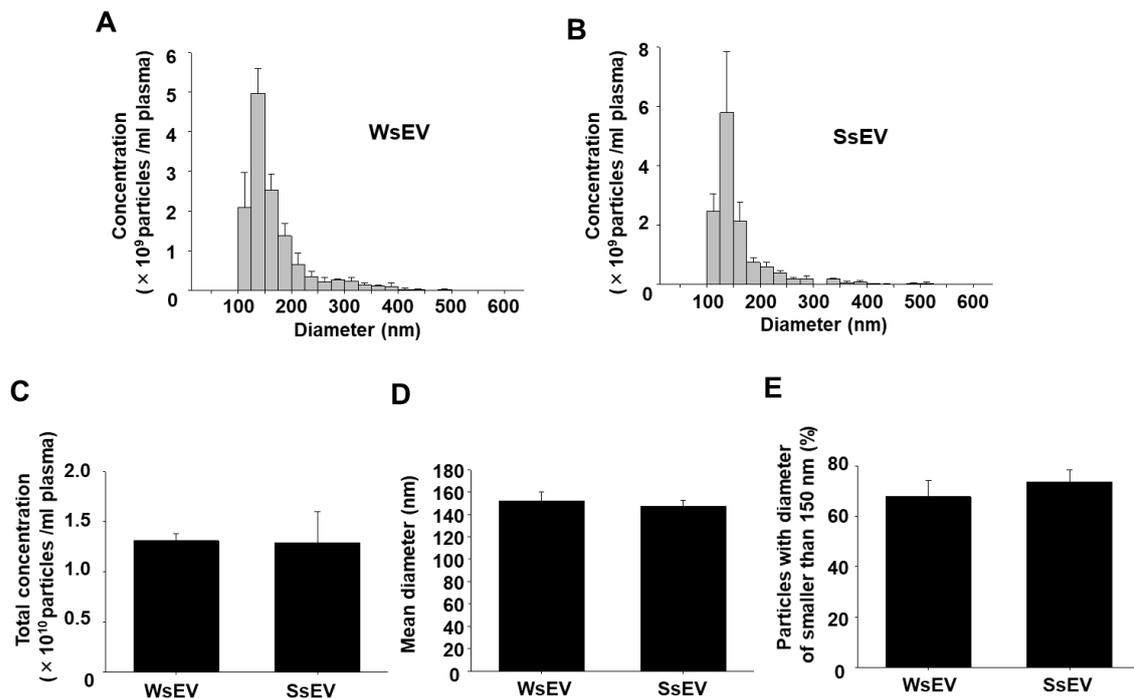


Fig. 13. Concentration and size distribution of sEV in plasma of WKY and SHR.

sEV were isolated from heparin (1 U/ml)-anticoagulated plasma in male WKY (6-week-old) and SHR (6-week-old) by the PEG-UC method. Concentration and size distribution of the isolated sEV were measured by a TRPS method using a qNANO Gold instrument. (A, B) Concentration and size distribution of WsEV (A) and SsEV (B) were shown. (C) Total concentration of WsEV and SsEV was shown (particles/ml). (D) Mean diameter of WsEV and SsEV was shown. (E) The percentage of particles with a diameter of smaller than 150 nm in total particles of WsEV and SsEV was shown. Results were expressed as means \pm SEM in bar graphs (n = 3).

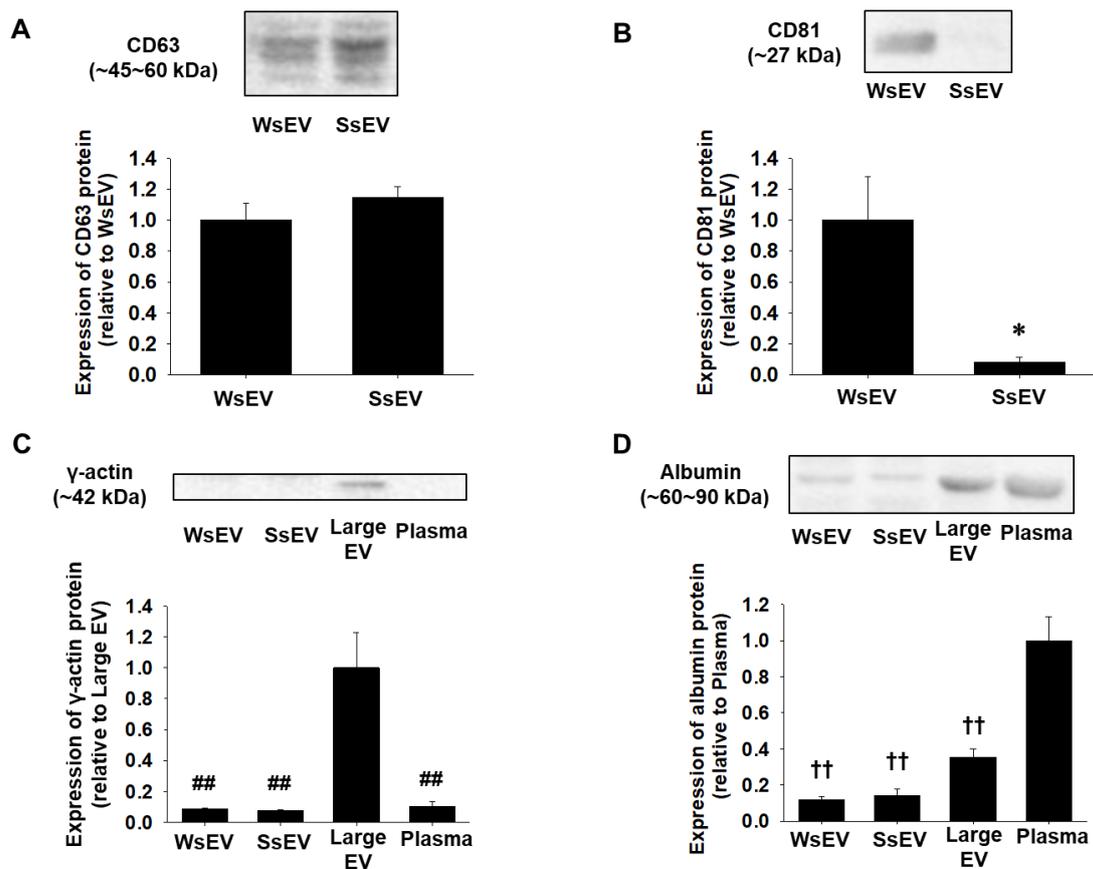


Fig. 14. The expression of marker proteins for sEV (CD63 and CD81), large EV (γ -actin), or plasma (albumin) in WsEV and SsEV.

Total protein was extracted from WsEV and SsEV using RIPA buffer. Expression of marker proteins in plasma sEV was examined by Western blotting using an antibody to CD63, CD81, γ -actin, or albumin. The large EV isolated from plasma of normal male Wistar rat (8-week-old) by centrifugation (10000 x g, 10 min, 4 °C) and the plasma of Wistar rat (8-week-old) were loaded as positive control. Data were shown as fold increase relative to the expression level in WsEV (CD63 and CD81), large EV (γ -actin), or plasma

(albumin). Results were expressed as means \pm SEM in bar graphs (n = 3).

* $P < 0.05$ vs. WsEV, ## $P < 0.01$ vs. Large EV, †† $P < 0.01$ vs. Plasma.

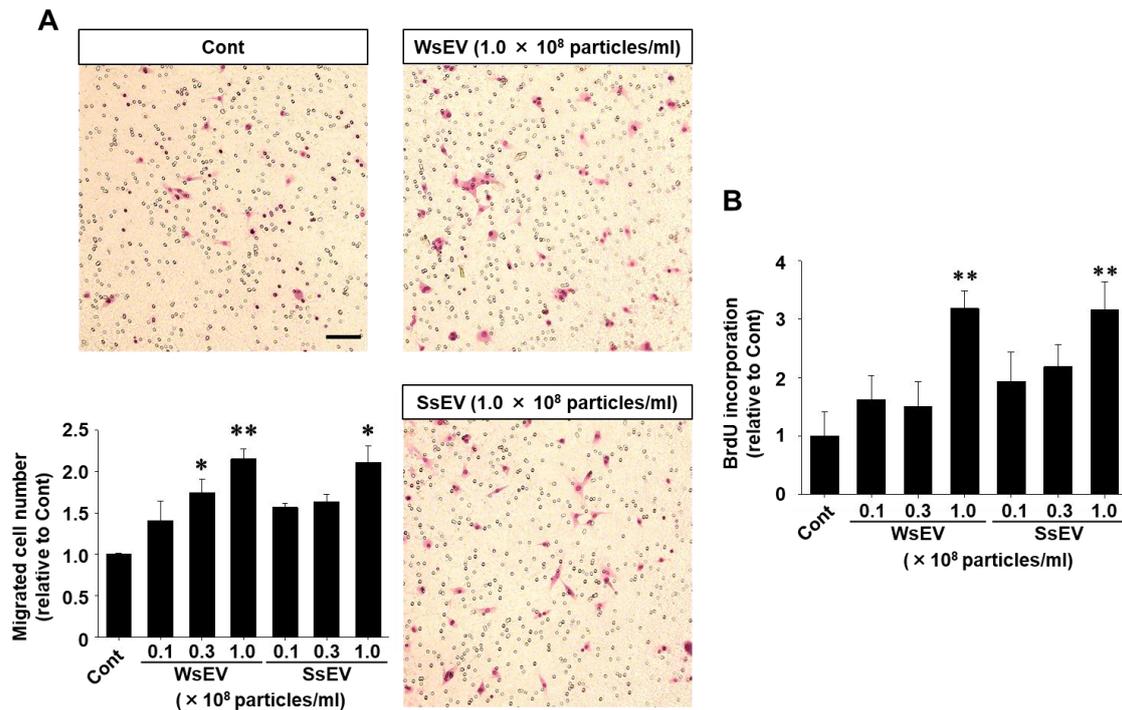


Fig. 15. Effects of WsEV and SsEV on migration and proliferation in vascular smooth muscle cells.

(A) Migration of primary rat aortic smooth muscle cells (RASM) was determined by a boyden chamber assay. RASM were treated for 48 h with WsEV, SsEV (0.1, 0.3 or 1.0 × 10⁸ particles/ml), or PBS, a vehicle (Cont). The migrated RASM which were stained with Giemsa were observed using a phase-contrast microscope. Data were shown as fold increase relative to the migrated cell number in Cont. Results were expressed as means ± SEM (n = 3) in bar graph. Scale bar: 100 μm. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs. Cont. (B) Proliferation of RASM was determined by a bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay. RASM were stimulated for 48 h with WsEV, SsEV (0.1, 0.3 or 1.0 × 10⁸ particles/ml) or PBS (Cont). In the

presence of sEV or PBS, RASM were treated with BrdU for 36 h. Incorporation of BrdU was measured by an immunostaining with an anti-BrdU antibody. Data were shown as fold increase relative to Cont. Results were expressed as means \pm SEM (n = 6) in bar graph. ** $P < 0.01$ vs. Cont.

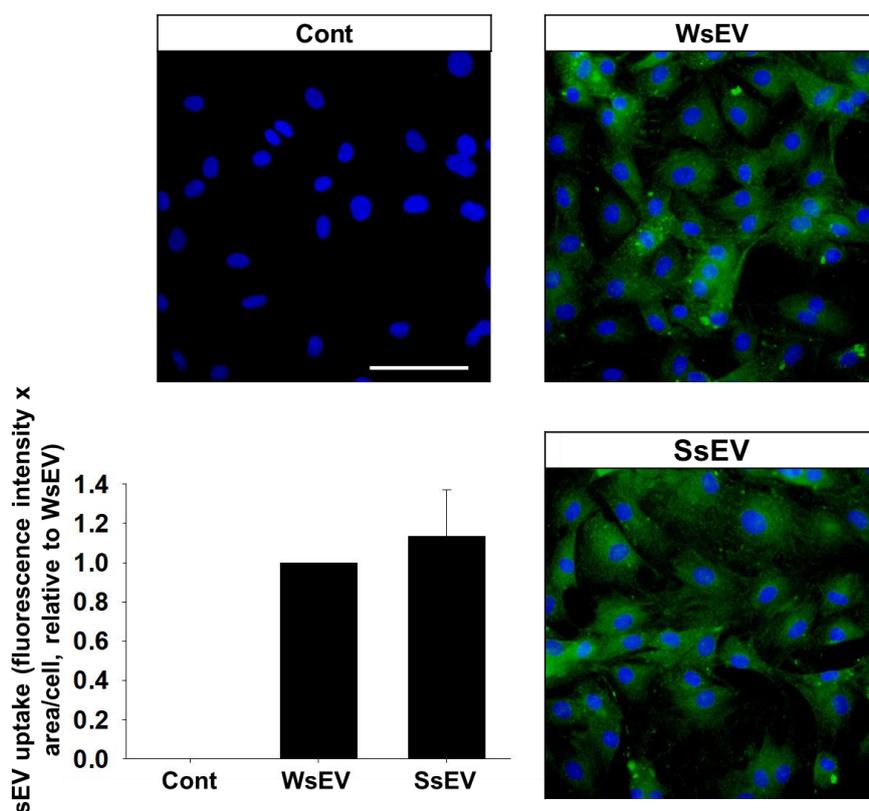


Fig. 16. Uptake of WsEV and SsEV into cells.

RASM were treated with WsEV or SsEV (1.0×10^8 particles/ml, 2 h) which were labeled with PKH67 green fluorescence dye ($4 \mu\text{M}$). For negative control (Cont), RASM were treated with vehicle (PBS) reacted with PKH67 by the same procedure as WsEV and SsEV. After the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, the nuclei were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), which were observed by a fluorescence microscopy. The green fluorescence density (intensity x area) in the cells relative to WsEV was shown as means \pm SEM ($n = 3$) in bar graph. Green: PKH67; Blue: DAPI. Scale bar: 100 μm .

4. 考察

第三章では、WsEV 及び SsEV が SMC の細胞機能(遊走と増殖能)に及ぼす影響を検討し、以下に示す結果を得た。1) WsEV と SsEV との間で粒度分布に差は認められなかったが、SsEV における CD81 タンパク質の発現量が WsEV と比較して低かった。2) WsEV と SsEV はいずれも RASM に取り込まれて、遊走と増殖を同程度促進した。

本研究で単離した WsEV と SsEV の粒子濃度は $1.0\sim 1.5 \times 10^{10}$ particles/ml であった(図 13C)。WKY と SHR の血漿 sEV 濃度はこれまでに報告されていないが、Sprague-Dawley ラット [56, 84, 86], Wistar [8] 及び Fisher 344 [11] ラットの血漿 sEV 濃度は $1.0 \times 10^8\sim 10^{12}$ particles/ml であることが報告されている。このことから、本研究の WsEV 及び SsEV 粒子濃度はこれまでの報告の範囲内であり、適切に sEV の単離が行われたものと判断できる。またこれまでの報告で培養細胞に処置された sEV の濃度は $1.0 \times 10^5\sim 10^9$ particles/ml である [7, 18, 107]。本研究で RASM に処置した WsEV 及び SsEV の濃度は $1.0 \times 10^7\sim 10^8$ particles/ml (図 15, 16)であることから、妥当な処置濃度であると考えられる。

sEV の表面にはテトラスパニン(CD9, CD63, CD81)、主要組織適合抗原複合体やインテグリンなどの様々なタンパク質が発現しており、由来する細胞の種類によって sEV 表面における発現動態が異なる [61, 88]。本研究において CD81 タンパク質の発現量は SsEV で WsEV と比較して有意に低かった(図 14)。このことから、SsEV と WsEV で由来組織又は細胞が異なることが示唆される。また sEV 表面のタンパク質は細胞における取り込み

にも関わる。実際、proteinase K で sEV 表面タンパク質を分解するとヒト卵巣がん細胞における取り込み量が減少することが報告されている [26]。また抗 CD9 及び CD81 抗体共処置は、sEV 処置によって増強される HIV-1 のヒトリンパ芽球腫細胞への感染を抑制する [81]。しかし WsEV と SsEV の間で RASM への取り込み量に差が認められなかったことから (図 16)、CD81 は WsEV 及び SsEV の RASM における取り込みには関与しないことが示唆される。

WsEV と SsEV は RASM の遊走と増殖を促進した (図 15)。また Splague-Dawley ラットの血漿 sEV も細胞遊走を促進する [86] ことが報告されており、血中 sEV は由来動物種に関わらず細胞遊走能を促進することが示唆される。また、WsEV と SsEV は RASM の遊走と増殖を同程度促進した。このことから、WsEV と SsEV の RASM に対する作用は病理的というよりも生理的なものであると考えられる。一方、第一章では SsEV が WKY の SBP を上昇させ、WsEV が SHR の SBP を低下させることを明らかにした。よって WsEV と SsEV は、SMC 以外で全身血圧の調節に関わる他の組織 (中枢神経系、心臓、腎臓や血管内皮) [10, 57, 73, 80] への作用を介して血圧を制御することが示唆される。

結論として、本章では WKY 及び SHR 血漿 sEV が SMC に取り込まれ遊走と増殖を促進することが初めて明らかになった [67]。血漿 sEV が本態性高血圧症の病態を制御するメカニズムを解明するために、今後さらなる検討が必要である。

V. 総括

【背景】

ヒト全身性高血圧症は全身血圧の上昇を主症状とする進行性の慢性疾患であり、心疾患や脳卒中、腎不全などの危険因子となる[27, 28, 58, 60]。年齢、性別、食事や生活習慣といった様々な要因が高血圧の発症・進展に関わるとされる[16, 23, 75]。しかし、高血圧症の約90%は原因不明の本態性高血圧症であり、病態の全貌解明が強く待ち望まれている。

sEVは脂質二重膜で構成され、直径が約50~150 nmで密度が1.13~1.19 g/mlの分泌小胞である[61, 88]。内部にタンパク質、DNA、mRNA、miRといった多様な機能性分子を含むsEVは、細胞内に取り込まれることで内包する分子を輸送するほか、細胞膜上の受容体との結合を介して細胞内シグナルを活性化することから細胞間情報伝達の一端を担うと考えられている[6, 20, 78]。実際、血液凝固[44]、幹細胞浸潤[69]や神経伝達[104]などの生理的な機能のみならず、がん[5, 96]、中枢神経障害[15, 33]や免疫系疾患[87]などの病態制御にも関わる。また近年、肺高血圧症モデルマウスの血漿sEVが正常マウスの右心室を肥大させること[2]やangiotensin II誘導性高血圧症モデルラットの血清sEVのmiRの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[64]が報告されており、心血管疾患においてsEVが何らかの役割を果たすことが示唆されている。しかし、本態性高血圧症におけるsEVの役割はこれまでほとんど明らかになっておらず、本研究では本態性高血圧の発症・進展にもsEVが関わるとの仮説を立てた。そしてこの仮説を検証するために、本態性高血圧症の病態解明と治療及び診断法の開発に最も頻繁に用いられてきたSHRの血漿sEVが血圧を制御するかとその機序を検討した。

【方法および結果】

(第一章)

SHR は生後徐々に血圧が上昇し 7 週齢以降に SBP が 130 mmHg を超える高血圧を呈する。SHR の血圧上昇の決定的な原因もヒト本態性高血圧症と同様に未だ不明である[24]。第一章では、SHR とその正常対照系統である WKY の血圧制御に血漿 sEV が関わるかを検討した。最初に WKY 及び SHR の血漿から UC 法によって EV を単離し粒度分布を測定したところ、共に直径 100~150 nm をピークとする分布を示したことから sEV であることが確認された(図 1)。また、WsEV と SsEV の間で粒子濃度に差は認められなかった。5~10 週齢の WKY と SHR に同週齢のラットから単離した sEV (WsEV 及び SsEV)を週 1 回腹腔内投与(計 6 週間)して SBP を測定した。結果、SsEV 投与により WKY の SBP が有意に上昇し、WsEV 投与により SHR における SBP の上昇が部分的に抑制された(図 2A, B)。また WsEV を投与した SHR の摘出腸間膜動脈における $PGF_{2\alpha}$ 誘導性の収縮が SsEV の投与と比較して有意に減弱した(図 4B)。SsEV を投与した WKY の摘出心室組織の重量と左心室血管周囲の線維化が WsEV の投与と比較して有意に亢進した(表 1, 図 5A)。一方、WsEV を投与した SHR の左心室血管周囲の線維化は SsEV の投与と比較して有意に減弱した。以上の結果から、WsEV 及び SsEV は血圧を制御し、心血管系の機能と組織構造に影響を及ぼすことが初めて明らかとなった[68]。

(第二章)

第一章で血漿 sEV が血圧を制御することを明らかにしたが、その機序は不明のままである。血漿 sEV に含まれる分子の発現動態や機能を詳細に評価する為には、より収率と純度の高い sEV 単離方法の探索が必要であると考えら

れた。UC 法以外にもサイズ排除クロマトグラフィー法や sEV に特異的なタンパク質を標的とする抗体を用いたアフィニティー精製法といった様々な単離方法がある[22, 37, 99, 101]が、とりわけポリマーの一種である PEG を用いた方法はヒト培養細胞由来 sEV 及び血漿 sEV の単離に有用で簡便であることが報告されている[77]。そこで第二章では、正常 Wistar ラット血漿 sEV の単離に PEG を用いた方法が応用できるか基礎的な検討を行った。さらに、ヒト血漿 sEV の性質に抗凝固薬が影響を及ぼすことが示唆されている[36]ため、Wistar ラット血漿 sEV に及ぼす抗凝固薬の影響も併せて検討した。UC 法、PEG-UC 法及び PEG 法の 3 つの方法を比較した(図 6)。結果、sEV の収率は UC 法で極めて低く、PEG 法と比べて PEG-UC 法では低いものの十分であった(PEG 法>PEG-UC 法>>UC 法:図 7B)。sEV の純度は PEG-UC 法が PEG 法と比べて高かった(タンパク質や large EV の夾雑が少なかった)(図 8B-G)。抗凝固薬は、heparin、EDTA、ACD の 3 つを比較した結果、sEV の純度と収率において大きな差は認められなかった(図 9, 10)。以上の結果から、ラット血漿からの sEV の単離において純度と収率の点から PEG-UC 法が最適であることと、抗凝固薬は影響しないことが初めて明らかとなった[66]。

(第三章)

高血圧発症・進展には、SMC の遊走と増殖による血管壁の構造変化が重要な役割を果たす[14, 91]。そこで第三章では、第一章で明らかにした血漿 sEV による血圧制御の機序を探索するために、PEG-UC 法によって単離した WsEV 及び SsEV が SMC の遊走と増殖能に及ぼす影響を検討した。最初に WsEV 及び SsEV の粒度分布を測定したが、濃度と粒子径において差は認められなかった(図 13)。WsEV と SsEV のどちらにおいても、sEV マーカーの CD63 タンパク質は高発現していたが、large EV マーカーの γ -actin

や血漿 albumin タンパク質の発現は極めて低かった(図 14A, C, D)。一方で、sEV マーカーである CD81 タンパク質発現量は SsEV で WsEV と比較して有意に低いという差が認められた(図 14B)。この WsEV 及び SsEV を RASM に処置(48 時間)したところ、共に細胞内に取り込まれて遊走と増殖が溶媒処置と比較して有意に亢進したが、その作用の程度に差は認められなかった(図 15, 16)。以上の結果から、WsEV 及び SsEV は共に生理活性を有するが、第一章で明らかにしたその血圧制御作用に SMC の遊走・増殖能に及ぼす影響は関与しないことが示唆された[67]。

【結論】

本研究は、WKY 及び SHR の血漿 sEV が血圧制御に関わることを初めて明らかにした。またこの機序を詳細に解析するための最適なラット血漿 sEV 単離方法として PEG-UC 法を見出した。この PEG-UC 法で単離した WKY 及び SHR の血漿 sEV は共に SMC の遊走・増殖を同程度亢進した。このことから、血漿 sEV による血圧制御は少なくともその SMC に対する遊走・増殖作用を介したものではないことが示唆された。したがって今後は、血漿 sEV が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)に及ぼす影響や、WsEV と SsEV に含まれるタンパク質を含む分子の網羅的な発現プロファイルを解析する必要がある。これらの研究により、sEV をターゲットとした新たな本態性高血圧症の治療及び診断法の開発に繋がることが期待される(図 17)。

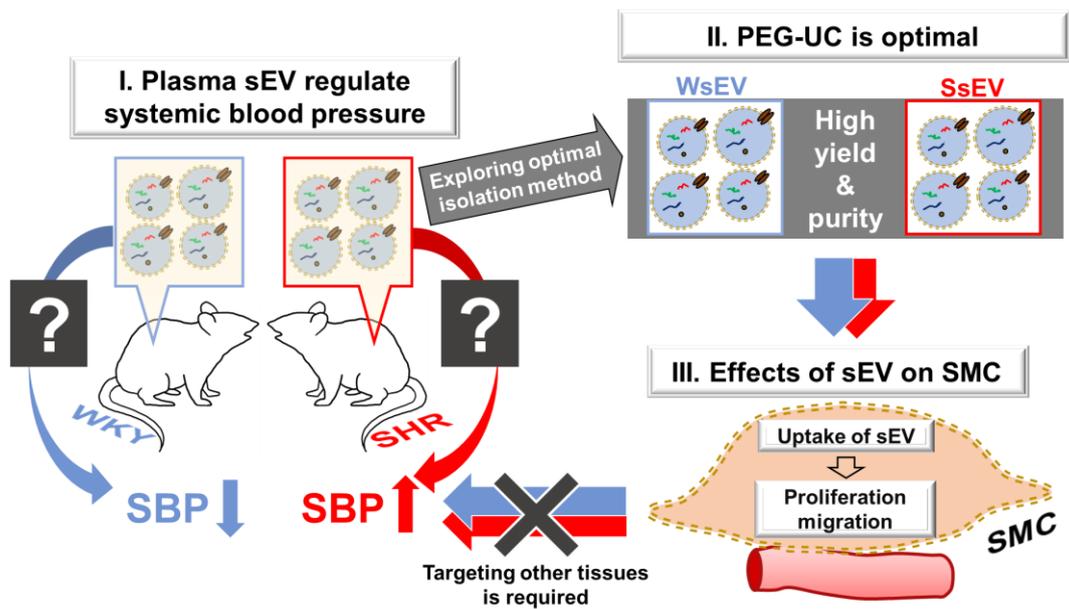


Fig. 17. Summary of the results in this thesis.

It has been for the first time determined that plasma sEV regulate systemic blood pressure in WKY and SHR (I). For the detailed analyses determining the molecules and functions which plasma sEV target, an optimal isolation method of sEV from rat plasma has been developed (PEG-UC method) (II). WsEV and SsEV are internalized and stimulate the migration and proliferation of SMC with a similar potency, suggesting that WsEV and SsEV might regulate blood pressure via the actions on other tissues than vascular SMC (III). Future research includes the effects of sEV on central nervous system, heart, kidney, and vascular endothelium, which potentially contribute to control systemic blood pressure.

VI. 謝辞

本研究を進めるに当たり、計画の段階から博士論文の執筆まで北里大学獣医薬理学研究室・山脇英之教授ならびに岡田宗善准教授には懇切丁寧なご指導を賜りました。ご厚意に深く感謝申し上げます。

北里大学獣医解剖学研究室・杉山真言助教には電子顕微鏡観察について丁重にご教授頂きました。心から感謝を申し上げます。

井本圭亮博士、杉山彰氏、兒玉朋子氏を始め獣医薬理学研究室の皆様には本研究の遂行に助力頂きましたことを御礼申し上げます。

また実験にご協力頂きました愛知県東部家畜保健衛生所・横家舞氏、アニコム損害保険株式会社・松本拳悟氏、コト一動物病院・堀貴子氏に深く御礼申し上げます。

VII. 引用文献

1. Agarwal, U., George, A., Bhutani, S., Ghosh-Choudhary, S., Maxwell, J. T., Brown, M. E., Mehta, Y., Platt, M. O., Liang, Y., Sahoo, S. and Davis, M. E. 2017. Experimental, systems, and computational approaches to understanding the MicroRNA-mediated reparative potential of cardiac progenitor cell-derived exosomes from pediatric patients. *Circ. Res.* **120**: 701–712.
2. Aliotta, J. M., Pereira, M., Wen, S., Dooner, M. S., Del Tatto, M., Papa, E., Goldberg, L. R., Baird, G. L., Ventetuolo, C. E., Quesenberry, P. J. and Klinger, J. R. 2016. Exosomes induce and reverse monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. *Cardiovasc. Res.* **110**: 319–330.
3. Andreu, Z. and Yáñez-Mó, M. 2014. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* **5**: 442.
4. Azizi, M., Rossignol, P. and Hulot, J. S. 2019. Emerging Drug Classes and Their Potential Use in Hypertension. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*. **74**: 1075–1083.
5. Azmi, A. S., Bao, B. and Sarkar, F. H. 2013. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* **32**: 623–642.
6. Bang, C. and Thum, T. 2012. Exosomes: New players in cell-cell communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**: 2060–2064.

7. Bao, H., Chen, Y. X., Huang, K., Zhuang, F., Bao, M., Han, Y., Chen, X. H., Shi, Q., Yao, Q. P. and Qi, Y. X. 2018. Platelet-derived microparticles promote endothelial cell proliferation in hypertension via miR-142-3p. *FASEB J.* **32**: 3912–3923.
8. Baranyai, T., Herczeg, K., Onódi, Z., Voszka, I., Módos, K., Marton, N., Nagy, G., Mäger, I., Wood, M. J., El Andaloussi, S., Pálinkás, Z., Kumar, V., Nagy, P., Kittel, Á., Buzás, E. I., Ferdinandy, P. and Giricz, Z. 2015. Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One.* **10**: 1–13.
9. Barile, L., Lionetti, V., Cervio, E., Matteucci, M., Gherghiceanu, M., Popescu, L. M., Torre, T., Siclari, F., Moccetti, T. and Vassalli, G. 2014. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **103**: 530–541.
10. Basting, T. and Lazartigues, E. 2017. DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Curr. Hypertens. Rep.* **19**: e0145686.
11. Beninson, L. A., Brown, P. N., Loughridge, A. B., Saludes, J. P., Maslanik, T., Hills, A. K., Woodworth, T., Craig, W., Yin, H. and Fleshner, M. 2014. Acute stressor exposure modifies plasma exosome-associated heat shock protein 72 (Hsp72) and microRNA (miR-142-5p and miR-203). *PLoS One.* **9**: e108748.

12. Berillis, P. 2013. The Role of Collagen in the Aorta's Structure. *Open Circ. Vasc. J.* **6**: 1–8.
13. Brilla, C. G., Matsubara, L. and Weber, K. T. 1996. Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats: Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis. *Hypertension.* **28**: 269–275.
14. Brown, I. A. M., Diederich, L., Good, M. E., DeLalio, L. J., Murphy, S. A., Cortese-Krott, M. M., Hall, J. L., Le, T. H. and Isakson, B. E. 2018. Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**: 1969–1985.
15. Candelario, K. M. and Steindler, D. A. 2014. The role of extracellular vesicles in the progression of neurodegenerative disease and cancer. *Trends Mol. Med.* **20**: 368–374.
16. Carretero, O. A. and Oparil, S. 2000. Essential hypertension. Part I: Definition and etiology. *Circulation.* **101**: 329–335.
17. Castaño, C., Kalko, S., Novials, A. and Párrizas, M. 2018. Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**: 12158–12163.
18. Chatterjee, V., Yang, X., Ma, Y., Cha, B., Meegan, J. E., Wu, M. and Yuan, S. Y. 2019. Endothelial microvesicles carrying Src-rich cargo impair adherens junction integrity and cytoskeleton homeostasis. *Cardiovasc. Res.* **7(10)**: e46808.
19. Cheng, Y., Zeng, Q., Han, Q. and Xia, W. 2019. Effect of pH,

- temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. *Protein Cell*. **10(4)**: 295-299.
20. Choi, D. S., Kim, D. K., Kim, Y. K. and Gho, Y. S. 2013. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*. **13**: 1554–1571.
21. Conrad, C. H., Brooks, W. W., Hayes, J. A., Sen, S., Robinson, K. G. and Bing, O. H. L. 1995. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. **91**: 161–170.
22. Coumans, F. A. W., Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E. E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A. F., Lacroix, R., Lee, Y., Van Leeuwen, T. G., Mackman, N., Mäger, I., Nolan, J. P., Van Der Pol, E., Pegtel, D. M., Sahoo, S., Siljander, P. R. M., Sturk, G., De Wever, O. and Nieuwland, R. 2017. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ. Res.* **120**: 1632–1648.
23. Dickson, M. E. and Sigmund, C. D. 2006. Genetic basis of hypertension: Revisiting angiotensinogen. *Hypertension*. **48**: 14–20.
24. Doggrell, S. A. and Brown, L. 1998. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* **39**: 89–105.
25. Eguchi, A., Lazic, M., Armando, A. M., Phillips, S. A., Katebian, R., Maraka, S., Quehenberger, O., Sears, D. D. and

- Feldstein, A. E. 2016. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *J. Mol. Med.* **94**: 1241–1253.
26. Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P. and Costa, J. 2011. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer.* **11**: 108.
27. Ettehad, D., Emdin, C. A., Kiran, A., Anderson, S. G., Callender, T., Emberson, J., Chalmers, J., Rodgers, A. and Rahimi, K. 2016. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: A systematic review and meta-analysis. *Lancet.* **387**: 957–967.
28. Faraco, G. and Iadecola, C. 2013. Hypertension: A harbinger of stroke and dementia. *Hypertension.* **62**: 810–817.
29. Fendl, B., Weiss, R., Fischer, M. B., Spittler, A. and Weber, V. 2016. Characterization of extracellular vesicles in whole blood: Influence of pre-analytical parameters and visualization of vesicle-cell interactions using imaging flow cytometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**: 168–173.
30. Gupta, S., Rawat, S., Arora, V., Kottarath, S. K., Dinda, A. K., Vaishnav, P. K., Nayak, B. and Mohanty, S. 2018. An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **9**: 180.
31. György, B., Pálóczi, K., Kovács, A., Barabás, E., Beko, G., Várnai, K., Pállinger, É., Szabó-Taylor, K., Szabó, T. G.,

- Kiss, A. A., Falus, A. and Buzás, E. I. 2014. Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. *Thromb. Res.* **133**: 285–292.
32. Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., Seremwe, M., Dismuke, W. M., Bieberich, E., Stamer, W. D., Hamrick, M. W. and Liu, Y. 2017. A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PLoS One.* **12**: 1–22.
33. Howitt, J. and Hill, A. F. 2016. Exosomes in the pathology of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* **291**: 26589–26597.
34. Jafri, S. and Ormiston, M. L. 2017. Immune regulation of systemic hypertension, pulmonary arterial hypertension, and preeclampsia: Shared disease mechanisms and translational opportunities. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **313**: R693–R705.
35. Jalali, S., Ramanathan, G. K., Parthasarathy, P. T., Aljubran, S., Galam, L., Yunus, A., Garcia, S., Cox, R. R., Lockey, R. F. and Kolliputi, N. 2012. Mir-206 Regulates Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation and Differentiation. *PLoS One.* **7**: e46808.
36. Jamaly, S., Ramberg, C., Olsen, R., Latysheva, N., Webster, P., Sovershaev, T., Brækkan, S. K. and Hansen, J. B. 2018. Impact of preanalytical conditions on plasma concentration and size distribution of extracellular vesicles using

- Nanoparticle Tracking Analysis. *Sci. Rep.* **8**: 17216.
37. Kalra, H., Adda, C. G., Liem, M., Ang, C. S., Mechler, A., Simpson, R. J., Hulett, M. D. and Mathivanan, S. 2013. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics*. **13**: 3354–3364.
 38. Kazama, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2014. A novel adipocytokine, omentin, inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration through antioxidative mechanism. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **306**: 1714–1719.
 39. Kishi, T. 2013. Regulation of the sympathetic nervous system by nitric oxide and oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla: 2012 Academic Conference Award from the Japanese Society of Hypertension. *Hypertens. Res.* **36**: 845–851.
 40. Kuwahara, F., Kai, H., Tokuda, K., Takeya, M., Takeshita, A., Egashira, K. and Imaizumi, T. 2004. Hypertensive Myocardial Fibrosis and Diastolic Dysfunction: Another Model of Inflammation? *Hypertension*. **43**: 739–745.
 41. Kwartler, C., Zhou, P., Kuang, S.-Q., Duan, X.-Y., Gong, L. and Milewicz, D. 2016. Vascular Smooth Muscle Cell Isolation and Culture from Mouse Aorta. *Bio-Protocol*. **6**: e2045.
 42. De La Sierra, A., Segura, J., Banegas, J. R., Gorostidi, M., De La Cruz, J. J., Armario, P., Oliveras, A. and Ruilope, L. M.

2011. Clinical features of 8295 patients with resistant hypertension classified on the basis of ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension*. **57**: 898–902.
43. Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P. V and Lim, S. K. 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* **4**: 214–222.
44. Lakhter, A. J. and Sims, E. K. 2015. Minireview: Emerging roles for extracellular vesicles in diabetes and related metabolic disorders. *Mol. Endocrinol.* **29**: 1535–1548.
45. Lee, K., Shao, H., Weissleder, R. and Lee, H. 2015. Acoustic purification of extracellular microvesicles. *ACS Nano*. **9**: 2321–2327.
46. Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N. and Brisson, A. R. 2015. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. **4**(1): 29509.
47. Liu, F., Vermesh, O., Mani, V., Ge, T. J., Madsen, S. J., Sabour, A., Hsu, E. C., Gowrishankar, G., Kanada, M., Jokerst, J. V., Sierra, R. G., Chang, E., Lau, K., Sridhar, K., Bermudez, A., Pitteri, S. J., Stoyanova, T., Sinclair, R., Nair, V. S., Gambhir, S. S. and Demirci, U. 2017. The Exosome Total Isolation Chip. *ACS Nano*. **11**: 10712–10723.
48. Liu, X., Yuan, W., Yang, L., Li, J. and Cai, J. 2019. miRNA Profiling of Exosomes from Spontaneous Hypertensive Rats

- Using Next-Generation Sequencing. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **12**: 75–83.
49. Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., Generozov, E. V. and Govorun, V. M. 2015. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci. Rep.* **5**: 17319.
50. Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S. W., Wong, C. S. F., Wiegmans, A. P., Leimgruber, A. and Möller, A. 2015. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles.* **4**: 27031.
51. López, B., González, A., Varo, N., Laviades, C., Querejeta, R. and Díez, J. 2001. Biochemical assessment of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Hypertension.* **38(5)**: 1222-1226.
52. Ludwig, A. K., De Miroschedji, K., Doeppner, T. R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., Durst, S., Jansen, S., Bremer, M., Behrmann, E., Singer, B. B., Jastrow, H., Kuhlmann, J. D., El Magraoui, F., Meyer, H. E., Hermann, D. M., Opalka, B., Raunser, S., Epple, M., Horn, P. A. and Giebel, B. 2018. Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *J. Extracell. Vesicles.* **7**: 1528109.

53. Maroto, R., Zhao, Y., Jamaluddin, M., Popov, V. L., Wang, H., Kalubowilage, M., Zhang, Y., Luisi, J., Sun, H., Culbertson, C. T., Bossmann, S. H., Motamedi, M. and Brasier, A. R. 2017. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *J. Extracell. Vesicles*. **6**: 1359478.
54. Marque, V., Kieffer, P., Atkinson, J. and Lartaud-Idjouadiene, I. 1999. Elastic properties and composition of the aortic wall in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*. **34**: 415–22.
55. Martinez-Pinna, R., de Peredo, A. G., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O. and Martin-Ventura, J. L. 2014. Label-free quantitative proteomic analysis of human plasma-derived microvesicles to find protein signatures of abdominal aortic aneurysms. *Proteomics - Clin. Appl.* **8**: 620–625.
56. Minghua, W., Zhijian, G., Chahua, H., Qiang, L., Minxuan, X., Luqiao, W., Weifang, Z., Peng, L., Biming, Z., Lingling, Y., Zhenzhen, W., Jianqing, X., Huihui, B., Xiaozhong, W. and Xiaoshu, C. 2018. Plasma exosomes induced by remote ischaemic preconditioning attenuate myocardial ischaemia/reperfusion injury by transferring MIR-24 article. *Cell Death Dis.* **9**: 320.
57. Mordi, I., Mordi, N., Delles, C. and Tzemos, N. 2016. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. *J. Hypertens.* **34**: 1464–1472.

58. Mortada, I. 2017. Hyperbilirubinemia, Hypertension, and CKD: the Links. *Curr. Hypertens. Rep.* **19**: 3–7.
59. Mulcahy, L. A., Pink, R. C. and Carter, D. R. F. 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles.* **3**: 1–14.
60. Murray, C. J. L. and Lopez, A. D. 2013. Measuring the global burden of disease. *N. Engl. J. Med.* **369**: 448–457.
61. van Niel, G., D'Angelo, G. and Raposo, G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**: 213–228.
62. Niu, C., Wang, X., Zhao, M., Cai, T., Liu, P., Li, J., Willard, B., Zu, L., Zhou, E., Li, Y., Pan, B., Yang, F. and Zheng, L. 2016. Macrophage foam cell-derived extracellular vesicles promote vascular smooth muscle cell migration and adhesion. *J. Am. Heart Assoc.* **5**: e004099.
63. Okamura, Y., Otani, K., Sekiguchi, A., Kogane, T., Kakuda, C., Sakamoto, Y., Kodama, T., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. Vasculo-protective effect of BMS-309403 is independent of its specific inhibition of fatty acid-binding protein 4. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **469**: 1177–1188.
64. Osada-Oka, M., Shiota, M., Izumi, Y., Nishiyama, M., Tanaka, M., Yamaguchi, T., Sakurai, E., Miura, K. and Iwao, H. 2017. Macrophage-derived exosomes induce inflammatory factors in endothelial cells under hypertensive conditions. *Hypertens. Res.* **40**: 353–360.

65. Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F. and Thery, C. 2010. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **12**: 19–30.
66. Otani, K., Fujioka, Y., Okada, M. and Yamawaki, H. 2019. Optimal isolation method of small extracellular vesicles from rat plasma. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 4780.
67. Otani, K., Yokoya, M., Fujioka, Y., Okada, M. and Yamawaki, H. 2019. Small extracellular vesicles from rat plasma promote migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. **[in press]**
68. Otani, K., Yokoya, M., Kodama, T., Hori, K., Matsumoto, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2018. Plasma exosomes regulate systemic blood pressure in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **503**: 776–783.
69. Park, K. S., Bandeira, E., Shelke, G. V., Lässer, C. and Lötvall, J. 2019. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Res. Ther.* **10**: 1–15.
70. Patel, G. K., Khan, M. A., Zubair, H., Srivastava, S. K., Khushman, M., Singh, S. and Singh, A. P. 2019. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture

- supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci. Rep.* **9**: 5335.
71. Payne, R. A., Wilkinson, I. B. and Webb, D. J. 2010. Arterial stiffness and hypertension: Emerging concepts. *Hypertension*. **55(1)**: 9-14.
 72. Pereira, T., Maldonado, J., Pereira, L. and Conde, J. 2013. Aortic stiffness is an independent predictor of stroke in hypertensive patients. *Arq. Bras. Cardiol.* **100**: 437–443.
 73. Phillips, M. I. and Summers, C. 1998. Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul. Pept.* **78(1-3)**:1-11.
 74. Phoonsawat, W., Aoki-Yoshida, A., Tsuruta, T. and Sonoyama, K. 2014. Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **448**: 261–266.
 75. Poulter, N. R., Prabhakaran, D. and Caulfield, M. 2015. Hypertension. *Lancet.* **386**: 801–812.
 76. Raposo, G. and Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**: 373–383.
 77. Rider, M. A., Hurwitz, S. N. and Meckes, D. G. 2016. ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **6**: 23978.
 78. Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., Nosanchuk, J. D. and Casadevall, A. 2008. Vesicular trans-cell wall Transport in fungi: A mechanism for the delivery of virulence-associated macromolecules? *Lipid Insights.* **2 1**: 27–40.

79. Sandfeld-Paulsen, B., Aggerholm-Pedersen, N., Bæk, R., Jakobsen, K. R., Meldgaard, P., Folkersen, B. H., Rasmussen, T. R., Varming, K., Jørgensen, M. M. and Sorensen, B. S. 2016. Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Mol. Oncol.* **10**: 1595.
80. Seravalle, G. and Grassi, G. 2017. Obesity and hypertension. *Pharmacol. Res.* **122**: 1–7.
81. Sims, B., Farrow, A. L., Williams, S. D., Bansal, A., Krendelchtchikov, A. and Matthews, Q. L. 2018. Tetraspanin blockage reduces exosome-mediated HIV-1 entry. *Arch. Virol.* **163**: 1683–1689.
82. Skottvoll, F. S., Berg, H. E., Bjørseth, K., Lund, K., Roos, N., Bekhradnia, S., Thiede, B., Sandberg, C., Vik-Mo, E. O., Roberg-Larsen, H., Nyström, B., Lundanes, E. and Wilson, S. R. 2019. Ultracentrifugation versus kit exosome isolation: NanoLC-MS and other tools reveal similar performance biomarkers, but also contaminations. *Futur. Sci. OA.* **5**: FSO359.
83. Smyth, T., Kullberg, M., Malik, N., Smith-Jones, P., Graner, M. W. and Anchordoquy, T. J. 2015. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *J. Control. Release.* **199**: 145–155.
84. Sosanya, N. M., Kumar, R., Clifford, J. L., Chavez, R., Dimitrov, G., Srinivasan, S., Gautam, A., Trevino, A. V., Williams, M., Hammamieh, R., Cheppudira, B. P., Christy, R.

- J. and Crimmins, S. L. 2019. Identifying Plasma Derived Extracellular Vesicle (EV) Contained Biomarkers in the Development of Chronic Neuropathic Pain. *J. Pain*. [Epub ahead of print].
85. Sugiyama, A., Hirano, Y., Okada, M. and Yamawaki, H. 2018. Endostatin stimulates proliferation and migration of myofibroblasts isolated from myocardial infarction model rats. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: E741.
86. Takov, K., Yellon, D. M. and Davidson, S. M. 2019. Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential. *J. Extracell. Vesicles.* **8**: 1560809.
87. Tan, L., Wu, H., Liu, Y., Zhao, M., Li, D. and Lu, Q. 2016. Recent advances of exosomes in immune modulation and autoimmune diseases. *Autoimmunity.* **49**: 357–365.
88. Théry, C., Ostrowski, M. and Segura, E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9(8)**: 581-593.
89. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A. C., Bergese, P.,

Bielska, E., Blenkiron, C., Bobis-Wozowicz, S., Boilard, E.,
Boireau, W., Bongiovanni, A., Borràs, F. E., Bosch, S.,
Boulanger, C. M., Breakefield, X., Breglio, A. M., Brennan,
M., Brigstock, D. R., Brisson, A., Broekman, M. L. D.,
Bromberg, J. F., Bryl-Górecka, P., Buch, S., Buck, A. H.,
Burger, D., Busatto, S., Buschmann, D., Bussolati, B., Buzás,
E. I., Byrd, J. B., Camussi, G., Carter, D. R. F., Caruso, S.,
Chamley, L. W., Chang, Y. T., Chaudhuri, A. D., Chen, C.,
Chen, S., Cheng, L., Chin, A. R., Clayton, A., Clerici, S. P.,
Cocks, A., Cocucci, E., Coffey, R. J., Cordeiro-da-Silva, A.,
Couch, Y., Coumans, F. A. W., Coyle, B., Crescitelli, R.,
Criado, M. F., D'Souza-Schorey, C., Das, S., de Candia, P., De
Santana, E. F., De Wever, O., del Portillo, H. A., Demaret, T.,
Deville, S., Devitt, A., Dhondt, B., Di Vizio, D., Dieterich, L.
C., Dolo, V., Dominguez Rubio, A. P., Dominici, M., Dourado,
M. R., Driedonks, T. A. P., Duarte, F. V., Duncan, H. M.,
Eichenberger, R. M., Ekström, K., EL Andaloussi, S., Elie-
Caille, C., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J. M., Fatima, F.,
Fish, J. E., Flores-Bellver, M., Försonits, A., Frelet-Barrand,
A., Fricke, F., Fuhrmann, G., Gabrielsson, S., Gámez-Valero,
A., Gardiner, C., Gärtner, K., Gaudin, R., Gho, Y. S., Giebel,
B., Gilbert, C., Gimona, M., Giusti, I., Goberdhan, D. C. I.,
Görgens, A., Gorski, S. M., Greening, D. W., Gross, J. C.,
Gualerzi, A., Gupta, G. N., Gustafson, D., Handberg, A.,
Haraszti, R. A., Harrison, P., Hegyesi, H., Hendrix, A., Hill,

A. F., Hochberg, F. H., Hoffmann, K. F., Holder, B.,
Holthofer, H., Hosseinkhani, B., Hu, G., Huang, Y., Huber, V.,
Hunt, S., Ibrahim, A. G. E., Ikezu, T., Inal, J. M., Isin, M.,
Ivanova, A., Jackson, H. K., Jacobsen, S., Jay, S. M.,
Jayachandran, M., Jenster, G., Jiang, L., Johnson, S. M.,
Jones, J. C., Jong, A., Jovanovic-Talisman, T., Jung, S.,
Kalluri, R., Kano, S. ichi, Kaur, S., Kawamura, Y., Keller, E.
T., Khamari, D., Khomyakova, E., Khvorova, A., Kierulf, P.,
Kim, K. P., Kislinger, T., Klingeborn, M., Klinke, D. J.,
Kornek, M., Kosanović, M. M., Kovács, Á. F., Krämer-Albers,
E. M., Krasemann, S., Krause, M., Kurochkin, I. V., Kusuma,
G. D., Kuypers, S., Laitinen, S., Langevin, S. M., Languino, L.
R., Lannigan, J., Lässer, C., Laurent, L. C., Lavieu, G.,
Lázaro-Ibáñez, E., Le Lay, S., Lee, M. S., Lee, Y. X. F.,
Lemos, D. S., Lenassi, M., Leszczynska, A., Li, I. T. S., Liao,
K., Libregts, S. F., Ligeti, E., Lim, R., Lim, S. K., Linē, A.,
Linnemannstöns, K., Llorente, A., Lombard, C. A.,
Lorenowicz, M. J., Lörincz, Á. M., Lötvall, J., Lovett, J.,
Lowry, M. C., Loyer, X., Lu, Q., Lukomska, B., Lunavat, T.
R., Maas, S. L. N., Malhi, H., Marcilla, A., Mariani, J.,
Mariscal, J., Martens-Uzunova, E. S., Martin-Jaular, L.,
Martinez, M. C., Martins, V. R., Mathieu, M., Mathivanan, S.,
Maugeri, M., McGinnis, L. K., McVey, M. J., Meckes, D. G.,
Meehan, K. L., Mertens, I., Minciacchi, V. R., Möller, A.,
Møller Jørgensen, M., Morales-Kastresana, A., Morhayim, J.,

Mullier, F., Muraca, M., Musante, L., Mussack, V., Muth, D. C., Myburgh, K. H., Najrana, T., Nawaz, M., Nazarenko, I., Nejsum, P., Neri, C., Neri, T., Nieuwland, R., Nimrichter, L., Nolan, J. P., Nolte-'t Hoen, E. N. M., Noren Hooten, N., O'Driscoll, L., O'Grady, T., O'Loghlen, A., Ochiya, T., Olivier, M., Ortiz, A., Ortiz, L. A., Osteikoetxea, X., Ostegaard, O., Ostrowski, M., Park, J., Pegtel, D. M., Peinado, H., Perut, F., Pfaffl, M. W., Phinney, D. G., Pieters, B. C. H., Pink, R. C., Pisetsky, D. S., Pogge von Strandmann, E., Polakovicova, I., Poon, I. K. H., Powell, B. H., Prada, I., Pulliam, L., Quesenberry, P., Radeghieri, A., Raffai, R. L., Raimondo, S., Rak, J., Ramirez, M. I., Raposo, G., Rayyan, M. S., Regev-Rudzki, N., Ricklefs, F. L., Robbins, P. D., Roberts, D. D., Rodrigues, S. C., Rohde, E., Rome, S., Rouschop, K. M. A., Rughetti, A., Russell, A. E., Saá, P., Sahoo, S., Salas-Huenuleo, E., Sánchez, C., Saugstad, J. A., Saul, M. J., Schiffelers, R. M., Schneider, R., Schøyen, T. H., Scott, A., Shahaj, E., Sharma, S., Shatnyeva, O., Shekari, F., Shelke, G. V., Shetty, A. K., Shiba, K., Siljander, P. R. M., Silva, A. M., Skowronek, A., Snyder, O. L., Soares, R. P., Sódar, B. W., Soekmadji, C., Sotillo, J., Stahl, P. D., Stoorvogel, W., Stott, S. L., Strasser, E. F., Swift, S., Tahara, H., Tewari, M., Timms, K., Tiwari, S., Tixeira, R., Tkach, M., Toh, W. S., Tomasini, R., Torrecilhas, A. C., Tosar, J. P., Toxavidis, V., Urbanelli, L., Vader, P., van Balkom, B. W. M., van der Grein,

- S. G., Van Deun, J., van Herwijnen, M. J. C., Van Keuren-Jensen, K., van Niel, G., van Royen, M. E., van Wijnen, A. J., Vasconcelos, M. H., Vechetti, I. J., Veit, T. D., Vella, L. J., Velot, É., Verweij, F. J., Vestad, B., Viñas, J. L., Visnovitz, T., Vukman, K. V., Wahlgren, J., Watson, D. C., Wauben, M. H. M., Weaver, A., Webber, J. P., Weber, V., Wehman, A. M., Weiss, D. J., Welsh, J. A., Wendt, S., Wheelock, A. M., Wiener, Z., Witte, L., Wolfram, J., Xagorari, A., Xander, P., Xu, J., Yan, X., Yáñez-Mó, M., Yin, H., Yuana, Y., Zappulli, V., Zarubova, J., Žekas, V., Zhang, J. ye, Zhao, Z., Zheng, L., Zheutlin, A. R., Zickler, A. M., Zimmermann, P., Zivkovic, A. M., Zocco, D. and Zuba-Surma, E. K. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles.* **7**: 1535750.
90. Tong, Y., Ye, C., Ren, X. S., Qiu, Y., Zang, Y. H., Xiong, X. Q., Wang, J. J., Chen, Q., Li, Y. H., Kang, Y. M. and Zhu, G. Q. 2018. Exosome-mediated transfer of ACE (angiotensin-converting enzyme) from adventitial fibroblasts of spontaneously hypertensive rats promotes vascular smooth muscle cell migration. *Hypertension.* **72**: 881–888.
91. Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A. and Montezano, A. C. 2018. Vascular smooth muscle contraction in hypertension.

- Cardiovasc. Res.* **114**: 529–539.
92. Usui, T., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2012. Death-associated protein kinase 3 mediates vascular inflammation and development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. **60**: 1031–1039.
93. Usui, T., Sakatsume, T., Nijima, R., Otani, K., Kazama, K., Morita, T., Kameshima, S., Okada, M. and Yamawaki, H. 2014. Death-associated protein kinase 3 mediates vascular structural remodelling via stimulating smooth muscle cell proliferation and migration. *Clin. Sci.* **127**: 539–548.
94. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. and Lötvall, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**: 654–659.
95. Vicencio, J. M., Yellon, D. M., Sivaraman, V., Das, D., Boi-Doku, C., Arjun, S., Zheng, Y., Riquelme, J. A., Kearney, J., Sharma, V., Multhoff, G., Hall, A. R. and Davidson, S. M. 2015. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**: 1525–1536.
96. Weidle, U. H., Birzele, F., Kollmorgen, G. and Rüger, R. 2017. The multiple roles of exosomes in metastasis. *Cancer Genomics and Proteomics*. **14**: 1–15.
97. Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E., Collins, K. J., Dennison Himmelfarb, C., DePalma, S. M., Gidding, S., Jamerson, K. A., Jones, D. W., MacLaughlin, E.

- J., Muntner, P., Ovbiagele, B., Smith, S. C., Spencer, C. C., Stafford, R. S., Taler, S. J., Thomas, R. J., Williams, K. A., Williamson, J. D. and Wright, J. T. 2018. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCN A Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Pr. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**: e127–e248.
98. Wiklander, O. P. B., Nordin, J. Z., O’Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., M??ger, I., Vader, P., Lee, Y., Sork, H., Seow, Y., Heldring, N., Alvarez-Erviti, L., Edvard Smith, C. I., Le Blanc, K., Macchiarini, P., Jungebluth, P., Wood, M. J. A. and El Andaloussi, S. 2015. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles. J. Extracell. Vesicles.* **4**: 1–13.
99. Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-’t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H. and Hochberg, F. 2013. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles.* **2**: 1–25.
100. Wu, M., Ouyang, Y., Wang, Z., Zhang, R., Huang, P. H., Chen, C., Li, H., Li, P., Quinn, D., Dao, M., Suresh, S., Sadovsky,

- Y. and Huang, T. J. 2017. Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 10584–10589.
101. Yamashita, T., Takahashi, Y., Nishikawa, M. and Takakura, Y. 2016. Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **98**: 1–8.
102. Yu, H. C. M., Burrell, L. M., Black, M. J., Wu, L. L., Dilley, R. J., Cooper, M. E. and Johnston, C. I. 1998. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation.* **98**: 2621–2628.
103. Yue, J., Guan, J., Wang, X., Zhang, L., Yang, Z., Ao, Q., Deng, Y., Zhu, P. and Wang, G. 2013. MicroRNA-206 is involved in hypoxia-induced pulmonary hypertension through targeting of the HIF-1 α /Fhl-1 pathway. *Lab. Investig.* **93**: 748–759.
104. Yuyama, K. and Igarashi, Y. 2016. Physiological and pathological roles of exosomes in the nervous system. *Biomol. Concepts.* **7**: 53–68.
105. Zhang, Y., Chopp, M., Meng, Y., Katakowski, M., Xin, H., Mahmood, A. and Xiong, Y. 2015. Effect of exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* **122**: 856–867.
106. Zhao, L., Luo, H., Li, X., Li, T., He, J., Qi, Q., Liu, Y. and

- Yu, Z. 2017. Exosomes Derived from Human Pulmonary Artery Endothelial Cells Shift the Balance between Proliferation and Apoptosis of Smooth Muscle Cells. *Cardiol.* **137**: 43–53.
107. Zhu, L., Xiao, R., Zhang, X., Lang, Y., Liu, F., Yu, Z., Zhang, J., Su, Y., Lu, Y., Wang, T., Luo, S., Wang, J., Liu, M. L., Dupuis, J., Jing, Z. C., Li, T., Xiong, W. and Hu, Q. 2019. Spermine on endothelial extracellular vesicles mediates smoking-induced pulmonary hypertension partially through calcium-sensing receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**: 482–495.
108. Zhu, Y., Wang, Y., Zhao, B., Niu, X., Hu, B., Li, Q., Zhang, J., Ding, J., Chen, Y. and Wang, Y. 2017. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Res. Ther.* **8**: 64.