

学位論文要旨

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

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

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

大谷 紘資

Kosuke Otani

指導教授 山脇 英之

小型細胞外小胞 (small extracellular vesicles: sEV または exosomes) は脂質二重膜で構成される分泌小胞の一種である。その直径は約 50~150 nm で、タンパク質や mRNA, microRNA (miR), DNA などの機能性分子を含む。エンドサイトーシスまたは膜融合を介して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。実際、血液凝固や幹細胞浸潤、神経伝達などの生理的な機能のみならず、がんや中枢神経系障害、心血管疾患などの病態制御に sEV が関与することが近年報告されている。

ヒト全身性高血圧症は心疾患や脳卒中、腎不全などの危険因子となる重篤な疾患であるが、その約 90% は原因不明の本態性高血圧症である。本態性高血圧症の病態解明と治療・診断法の開発にはモデル動物として自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rats: SHR) が一般的に用いられている。SHR における高血圧発症・進展に対する決定的な原因は未だ不明である。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や angiotensin II 誘導性高血圧症モデルラットの血清 sEV の miR 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ていることから、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。この仮説を検証する為に本研究は、ラットの血漿 sEV が血圧を制御するかとその機序を検討した。

第一章 ラット血漿 sEV が血圧に及ぼす影響

SHR は生後徐々に血圧が上昇し 7 週齢以降に収縮期血圧が 130 mmHg を超える高血圧を呈する。第一章では、SHR とその正常対照系統である Wistar Kyoto rats (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 の血漿から超遠心法 (Ultracentrifugation: UC 法) によって EV を単離し粒子径を測定したところ、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。5~10 週齢の WKY と SHR に同週齢のラットから単離した sEV を週 1 回腹腔内投与 (計 6 週間) して血圧を測定した。結果、SHR 血漿 sEV 投与により WKY の収縮期血圧が有意に上昇し、WKY 血漿 sEV 投与により SHR における収縮期血圧の上昇が有意に抑制された。また WKY 血漿 sEV を投与した SHR の摘出腸間膜動脈における prostaglandin F_{2α} 誘導性の収縮が SHR 血漿 sEV の投与と比較して有意に減弱した。SHR 血漿 sEV 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 WKY 血漿 sEV の投与と比較して有意に亢進した。一方、WKY 血漿 sEV を投与した SHR の左心室血管周囲の線維化は SHR 血漿 sEV の投与と比較して有意に減弱した。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 (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2018)。

第二章 最適なラット血漿 sEV 単離方法の探索

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、その機序は不明であった。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。超遠心法以外にも様々な単離方法が存在するが、とりわけポリマーの一種である polyethylene-glycol (PEG)を用いた方法はヒト細胞及び血漿由来 sEV の単離に有用であることが報告されている。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、Wistar ラット血漿 sEV に及ぼす抗凝固薬の影響も検討した。UC 法、PEG による沈降後に超遠心法 (PEG-UC 法) 及び PEG による沈降のみ (PEG 法) の 3 つの方法を比較した。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。sEV の純度は PEG-UC 法が PEG 法と比べて高かった (タンパク質や大型 EV の夾雑が少なかった)。抗凝固薬は、heparin、ethylenediaminetetraacetic acid 及び acid citrate dextrose buffer の 3 つを比較した結果、sEV の純度と収率において差は認められなかった。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 (*Int. J. Mol. Sci.*, 2019)。

第三章 血漿 sEV が血管平滑筋細胞の機能に及ぼす影響

高血圧発症・進展には、血管平滑筋細胞の増殖と遊走による血管壁の構造変化が重要な役割を果たす。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 WKY 及び SHR 血漿 sEV

が血管平滑筋細胞の増殖と遊走能に及ぼす影響を検討した。最初に WKY と SHR 血漿 sEV の粒子濃度と粒度分布を検討したが、差は認められなかった。一方、sEV マーカーの CD81 タンパク質発現量が SHR 血漿 sEV で WKY 血漿 sEV と比較して有意に低かった。この WKY 及び SHR 血漿 sEV をラット血管平滑筋細胞に処置(48 時間)したところ、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。以上の結果から、WKY 及び SHR 血漿 sEV による血圧制御に血管平滑筋細胞の増殖・遊走能に及ぼす影響は関与しないことが示唆された(*J. Vet. Med. Sci.*, in press)。

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。そして、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・遊走能に及ぼす影響は関与しないことを明らかにした。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)に及ぼす影響を詳細に検討する必要がある。これらの研究により、sEV をターゲットとした新たな高血圧症の治療・診断法の開発が期待される。