

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16545

研究課題名(和文)血小板由来マイクロパーティクルの質的・量的な変動の生理的意義の解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of the physiological significance of platelet-derived microparticles

研究代表者

安藤 祐介 (Yusuke, Ando)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：10805881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、種々の病態バイオマーカーとして期待されている循環血中の細胞外小胞(Extracellular Vesicles: EVs)の質的・量的な変動の生理的意義の解明を目的としており、病態形成時のマクロファージの形質変化に着目した。その結果、血中EVsは、血液を介して全身のマクロファージの形質変化を誘導しており、種々の病態形成に起因するEVsに含まれるmiRNAカーゴ等の変化が、マクロファージの感染防御を規定することが示唆された。また、その血中EVsの変化は、EVsの産生源である血小板の質的・量的変動に影響されることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体恒常性の維持に重要な役割を担うマクロファージの形質変化を通して、EVsの評価ならびにEVs含有miRNA中の病態マーカーの探索を行なった。本研究で得られた知見は、NASHのみならずマクロファージの異常に起因する多くの病態形成の理解に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the physiological significance of qualitative and quantitative fluctuations of extracellular vesicles (EVs) in circulating blood, which are expected as biomarkers for various pathological conditions, and focused on the changes in the phenotype of macrophages. The results suggested that blood EVs induce phenotypic changes in macrophages via blood, and changes in miRNA cargo of EVs, which caused by the formation of various pathological conditions, regulate macrophage infection protection. In addition, it was considered that the changes in blood EVs were affected by the qualitative and quantitative fluctuations of platelets, which are the sources of EVs.

研究分野：免疫学

キーワード：マクロファージ 血小板 細胞外小胞 エクソソーム NASH 血液 miRNA EVs

### 1. 研究開始当初の背景

血液凝固や血栓形成過程において中心的な役割を果たす血小板の機能異常は、凝固系への影響のみならず、心筋梗塞や脳梗塞の病因となる動脈硬化病変の形成などを引き起こす。また、血小板は免疫細胞とも密接に関連しており、病原体の構造を識別する Toll 様受容体を用いた感染防御や、免疫細胞の遊走や活性化に関与する。このように、血小板は多彩な機能を示す細胞であることから、血小板の異常や活性化の程度、数の増減などの血小板動態は、血液を介して全身の細胞・組織に影響を与えると考えられる (Fig. 1)。

近年、病態のバイオマーカーとして期待されている循環血中の細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) の大部分は、血小板由来マイクロパーティクル (PMP) であることが明らかにされている (Clin. Chem., 59: 1166-1174, 2013)。また、PMP の量的な変動は血小板動態と関連性があり、心筋梗塞や脳梗塞、糖尿病などでは、血小板の活性化に伴い血中の PMP が増加する。つまり、血小板由来マイクロパーティクル (PMP) を含む循環血中 EVs の質的・量的な変動は、病態形成と密接な関連性があり、『EVs の質的・量的な変動』の生理的意義を見出すことは、多くの疾病の予防・治療の両面において重要である。しかしながら、種々の病態における EVs 変動の生理的意義については未だ不明な点が多い。

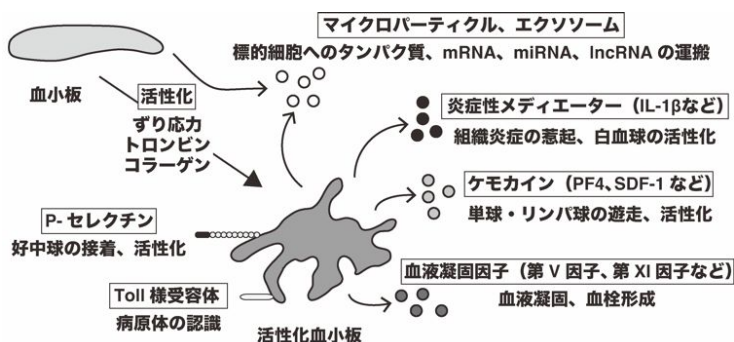


Fig. 1 生体内における血小板の役割

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、『EVs の質的・量的な変動』によるマクロファージ機能修飾メカニズムを解明することで、EVs 変動の生理的意義を明らかにし、新規病態バイオマーカーとしての利用基盤を構築することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) EVs の調製

本研究では、マウス血漿ならびにトロンピンで刺激した血小板の放出物より EVs を精製し、各実験に用いた。心採血により得られた雌性 BALB/c マウス (7 週齢) の ACD 加血より、定法に従い血漿ならびに精製血小板を調製した。得られた血漿は、0.8 μm フィルター処理を行なった後に exoEasy (QIAGEN) ならびに VIVASPIN (Cytiva) を用いて Plasma EVs を含む画分を得た (4 mL の血漿より PBS に置換した最終量 150 μL として調製)。また、精製血小板は、1 × 10<sup>9</sup> cells/mL に調製後、0.5 U/mL トロンピン存在下にて 37°C、15 分間の刺激を行い、その上清より同様の方法にて PMP を精製した。

#### (2) 骨髄由来マクロファージ (Bone marrow-derived macrophages: BMDMs) の調製

本研究では、EVs のマクロファージに対する影響を解析するため、EVs 非存在下にて BMDMs の誘導を行なった。雌性 BALB/c マウス (7 週齢) の骨髄細胞を、20 ng/mL マウス M-CSF 存在下にて AIM V Medium を用いて 6 日間培養した。その後、24 時間の M-CSF starvation を行いたものを BMDMs とした。得られた同マクロファージは、フローサイトメトリーにて 99% 以上が CD11b<sup>+</sup>、F4/80<sup>+</sup>であることを確認し、また、FBS 存在下にて誘導を行なった BMDMs と同様に、LPS 等の刺激に対して正常に応答することを確認した。

#### (3) 非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) モデルマウスの作製

コリン欠乏メチオニン低減高脂肪食である CDAHFD (A06071302; choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet) (RESEARCH DIETS) を用いて、雌性 BALB/c マウス (6 週齢) を 6 週間自由給餌にて飼育した。また、コントロールマウスとして、A06071314 を自由給餌したものを作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) EVs のマクロファージ機能への影響

BALB/c マウスの血漿より調製した Plasma EVs を含む画分をナノサイト解析に供した結果、50 nm から 450 nm にかけての粒子径分布が得られ (Fig. 2A)、平均粒子径は 162 ± 3.6 nm (Fig.

2B) 総粒子濃度は  $1.76 \pm 0.07 \times 10^{10}$  particles/mL であった (Fig. 2C)。また、走査電子顕微鏡 (SEM) 解析において、エクソソームおよびマイクロパーティクルに相当するサイズの粒子 (それぞれ 30~150 nm および 100~1,000 nm) が観察された (Fig. 2D)。

次に、EVs のマクロファージ機能への影響の解析を目的に、Plasma EVs 存在化にて BMDMs を 24 時間培養後、Clariom S マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行なった。その結果、コントロール BMDMs と比較して、EVs-BMDMs において 2 倍以上もしくは 2 倍以下に発現が変動した遺伝子として、発現増加遺伝子 70 個ならびに発現減少遺伝子 214 個を得た (Fig. 3)。

さらに、見出した同発現変動遺伝子を用いて、エンリッチメント解析 (GO 解析ならびに Pathway 解析) を行ったところ、いずれの解析結果についても感染防御に関わる経路 X がエンリッチされていた (未掲載データ)。そこで、EVs-BMDMs を刺激 A を用いて刺激し、ELISA、RT-qPCR およびウエスタンブロットを用いて、経路 X の変化を検討したところ、コントロール BMDMs に比較して、EVs-BMDMs では有意に経路 X に変化が認められ、その最終産物である分子 B および C の産生量が劇的に増加することを見出した。一方で、血中 EVs の多くは血小板由来であることが広く知られているが、刺激 A による分子 B および C の産生量の著増は、本研究の対象としている EVs のみならず、PMP によっても同様に認められた (未掲載データ)。

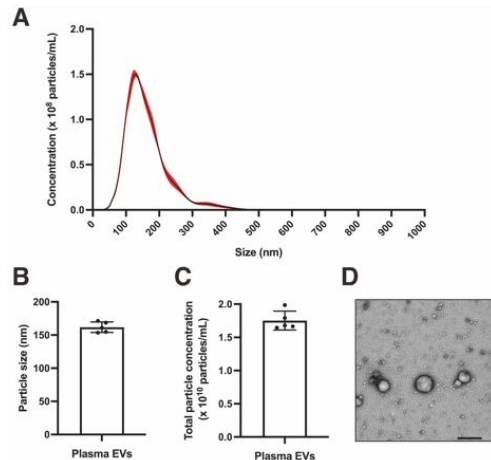


Fig. 2 Plasma EVs の解析

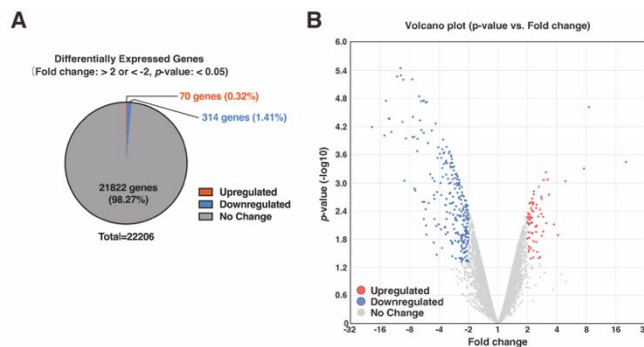


Fig. 3 Plasma EVs のマクロファージへの影響

## (2) NASH モデルマウスにおける Plasma EVs の miRNA カーゴの変化

生体内のマクロファージは、組織や臓器特異的な分布を示し、取り巻く微小環境により性質や形態が大きく異なることが知られている。生体内における血中 EVs との恒常的な相互作用が推定されるマクロファージとして、脾臓や肝臓に局在するマクロファージが挙げられる。本研究では、肝臓に局在するマクロファージであるクッパー細胞を想定し、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 発症時における血中 EVs の変化と、それに伴うマクロファージの形質変化に焦点を当てた。

CDAHFD を摂取させることで作製した NASH モデルマウスでは、CDAHFD 摂取 1 週目より肝重量の顕著な増加 (Fig. 4A, 4B, 4C) ならびに肝障害マーカー AST、ALT の値の有意な上昇が認められ (Fig. 4D, 4E) 肝線維化関連遺伝子の発現も有意に増加していたことから (未掲載データ) CDAHFD 摂取 6 週目のマウスを NASH モデルマウスとして各実験に用いた。

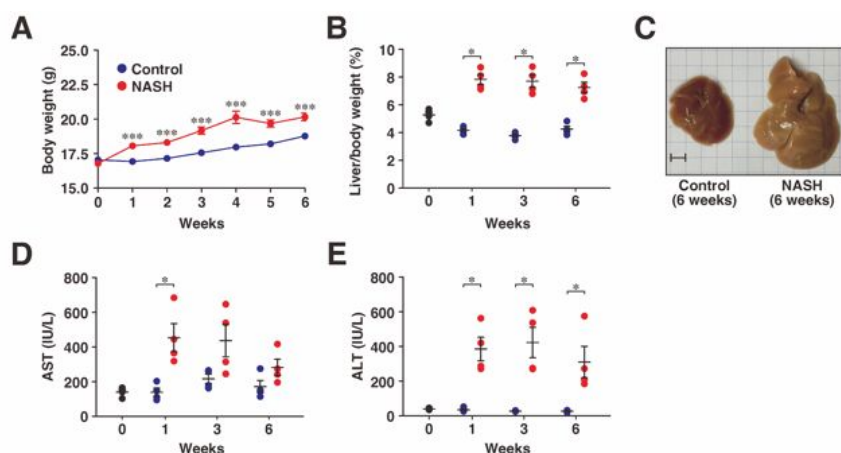


Fig. 4 NASH モデルマウスの解析



まず、作製した NASH モデルマウス由来 Plasma EVs を精製後、ヒト miRNA との相同性が認められる保存性が高い miRNA について、TaqMan Advanced miRNA Human Serum/Plasma ( Thermo Fisher Scientific ) を用いて miRNA カーゴの網羅的比較解析を行なった。その結果、コントロールマウス由来 Plasma EVs と比較して、NASH モデルマウス由来 Plasma EVs では、23 個の miRNA が 10 倍以上の発現増加を示し、また、8 個の miRNA が 10 倍以上の発現減少を示した ( Fig. 5 )。このうちのいくつかは、ヒトおよびマウスの NAFLD/NASH との関連が既に報告されていたが、その残りの多くは、新規に NASH との関連を見出した miRNA であった。本研究では、CDAHFD 摂取 6 週後の時点にて解析を行なったが、今後、経時的な miRNA の発現変動を追うことで、NASH 病態バイオマーカーとしての利用基盤の構築に資すると考えられる。

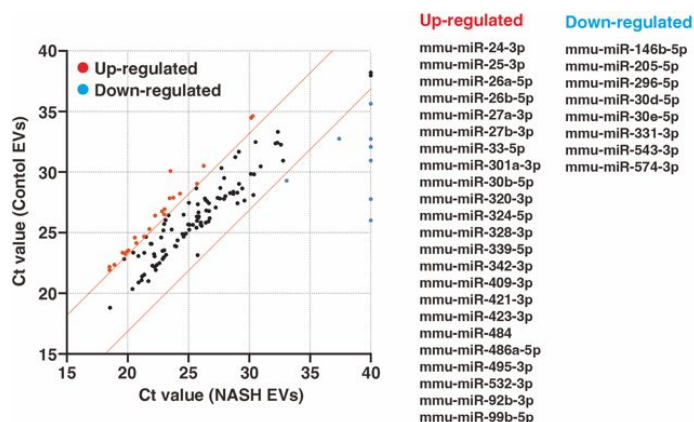


Fig. 5 NASH モデルマウス由来 Plasma EVs の miRNA カーゴの解析

(3) NASH モデルマウスにおける Plasma EVs の質的变化がマクロファージに与える影響

NASH モデルマウス由来 Plasma EVs 存在下にて BMDMs を 24 時間培養後、Clariom S マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行なった。その結果、コントロールマウス由来 Plasma EVs 存在下にて培養した BMDMs と比較して、NASH モデルマウス由来 Plasma EVs 存在下にて培養した BMDMs では、65 個の遺伝子が 2 倍以上に増加し、31 個の遺伝子が 2 倍以下に減少していた ( Fig. 6A )。そこで次に、NASH モデルマウスにおいて認められる miRNA カーゴの変化 ( Fig. 5 ) を用いて、miRNA-mRNA 相互作用の解析を進めたところ、NASH 形成時のマクロファージでは、Plasma EVs に含まれる複数の miRNA の発現減少が遺伝子 Y の発現抑制を引き起こしていることが示唆された ( Fig. 6B )。

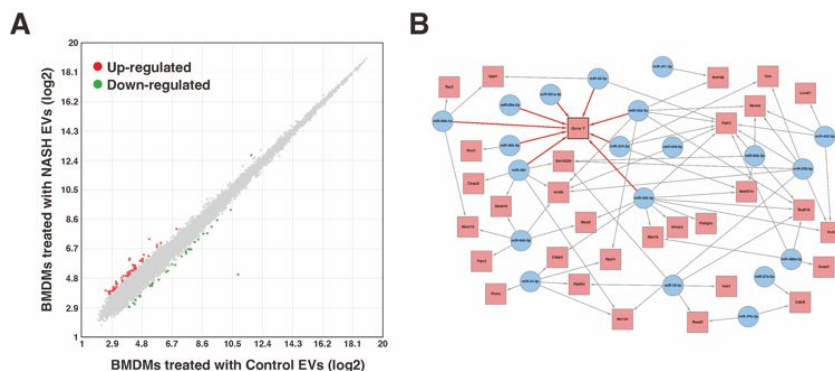


Fig. 6 NASH モデルマウスにおける miRNA-mRNA 相互作用の解析

以上の結果より、血中 EVs は、血液を介して全身のマクロファージの形質変化を誘導しており、種々の病態形成に起因する EVs に含まれる miRNA カーゴ等の変化が、マクロファージの感染防御を規定することが示唆された。また、その血中 EVs の変化は、EVs の産生源である血小板の質的・動的変動に影響されることが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chiba Yoshihiko, Ueda Chihiro, Kohno Naoko, Yamashita Michio, Miyakawa Yui, Ando Yusuke, Suto Wataru, Hirabayashi Takahiro, Takenoya Fumiko, Takasaki Ichiro, Kamei Junzo, Sakai Hiroyasu, Shioda Seiji	4. 巻 319
2. 論文標題 Attenuation of relaxing response induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in bronchial smooth muscle of experimental asthma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology	6. 最初と最後の頁 L786 ~ L793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00315.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chiba Yoshihiko, Ando Yusuke, Fujii Shigeki, Miyakawa Yui, Suto Wataru, Kamei Junzo, Sakai Hiroyasu, Hanazaki Motohiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Downregulation of miR-140-3p Is a Cause of Upregulation of RhoA Protein in Bronchial Smooth Muscle of Murine Experimental Asthma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 138 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2020-0292LE	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Ando	4. 巻 62
2. 論文標題 Analysis of mechanisms for suppression of macrophage inflammatory responses by platelets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The proceedings of Hoshi University	6. 最初と最後の頁 25 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安藤 祐介	4. 巻 56
2. 論文標題 セマフォリン7Aは血小板CD42bを介して虚血再灌流障害を悪化させる	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1044 ~ 1044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.11_1044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ando Yusuke, Sato Fumiaki, Fukunaga Hazuki, Iwasaki Yusuke, Chiba Yoshihiko, Tebakari Masahiko, Daigo Yuki, Kawashima Junichi, Kamei Junzo	4. 巻 16
2. 論文標題 Placental extract suppresses differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to mature adipocytes via accelerated activation of p38 MAPK during the early phase of adipogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrition & Metabolism	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12986-019-0361-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安藤 祐介、金子 豊、長谷川 晋也、築地 信、渡辺 知恵、奥 輝明
2. 発表標題 免疫細胞特異的アクチン結合タンパク質Coronin-1の発現制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会(名古屋)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井ノ山綾香、松本昭博、加藤諒、安藤祐介、渡辺知恵、村上正裕
2. 発表標題 オリゴ乳酸ナノ粒子の抗腫瘍効果のin vitroにおける評価
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会(広島)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子豊、安藤祐介、安藤祐介、人見祐基、築地信、奥輝明、辻勉
2. 発表標題 マウス血小板におけるCoronin 1のリン酸化の解析
3. 学会等名 第20回 Pharmaco-Hematologyシンポジウム(東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤祐介, 奥輝明, 千葉義彦, 辻勉, 亀井淳三
2. 発表標題 血小板によるマクロファージの機能調節機構の解析
3. 学会等名 第20回 Pharmaco-Hematologyシンポジウム(東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥輝明, 栗坂知里, 安藤祐介, 人見祐基, 築地信, 伊藤佐生智, 辻勉
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌Staphylococcal superantigen like protein 5(SSL5)の宿主免疫系に与える影響
3. 学会等名 第20回 Pharmaco-Hematologyシンポジウム(東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川結衣, 安藤祐介, 藤井茂基, 須藤航, 亀井淳三, 酒井寛泰, 花崎元彦, 千葉義彦
2. 発表標題 喘息時の気管支平滑筋におけるmiR-140-3pを介するRhoA発現調節機構の変化
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会総会(愛知)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 茂基, 安藤 祐介, 宮川 結衣, 奥 輝明, 亀井 淳三, 酒井 寛泰, 花崎 元彦, 千葉 義彦
2. 発表標題 気道過敏性時の気管支平滑筋RhoA発現増加におけるnon-coding RNAsの関与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大井 夏奈子, 安藤 祐介, 宮川 結衣, 山下 道生, 奥 輝明, 竹ノ谷 文子, 酒井 寛泰, 亀井 淳三, 千葉 義彦
2. 発表標題 気道過敏性時の気管支平滑筋細胞の形質変化におけるIL-13の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉永 百合香, 安藤 祐介, 山下 道生, 竹ノ谷 文子, 酒井 寛泰, 亀井 淳三, 花崎 元彦, 千葉 義彦
2. 発表標題 マウス気管支平滑筋組織における抗原あるいはinterleukin-13刺激時の遺伝子発現変動の比較
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田島 楓, 安藤 祐介, 岡部 夏海, 稲葉 健二郎, 相良 篤信, 堀内 正子, 湯本 哲郎, 里 史明
2. 発表標題 COL8A1は浸潤性乳がん細胞の運動能を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村 麻友, 安藤 祐介, 山下 道生, 増山 佑真, 上田 千裕, 神野 奈緒子, 平林 敬浩, 竹ノ谷 文子, 酒井 寛泰, 亀井 淳三, 塩田 清二, 千葉 義彦
2. 発表標題 喘息モデルマウスにおけるPACAP誘発気管支平滑筋弛緩反応減弱をもたらす因子の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(京都)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 奥 輝明, 安藤 祐介, 人見 祐基, 築地 信, 亀井 淳三, 林 克彦, 菊池 裕, 工藤 由起子, 伊豆津 健一, 辻 勉
2. 発表標題 ヒト由来細胞を利用した新規発熱性物質試験法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤 祐介, 里 史明, 小田原 えり, 岩崎 雄介, 千葉 義彦, 川島 順市, 手計 雅彦, 大郷 由貴, 下山 潔, 亀井 淳三
2. 発表標題 脂肪細胞分化におけるプラセンタエキスの影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増山 佑真, 安藤 祐介, 山下 道生, 野村 麻友, 上田 千裕, 神野 奈緒子, 平林 敬浩, 竹ノ谷 文子, 酒井 寛泰, 亀井 淳三, 塩田 清二, 千葉 義彦
2. 発表標題 喘息モデルマウスの気道局所におけるPACAP含量の変化
3. 学会等名 日本薬学会第140年会(京都)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------