

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	星 薬 科 大 学	研究所名等	医 薬 品 化 学 研 究 所	
研 究 課 題	マイクロパーティクルの生体機能解明による 血管病治療と創薬応用 —膜小胞の動的臓器間ネットワーク解明と 薬物送達システムへの応用—		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①マイクロパーティクル ②血管病 ③生体機能			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 林 恒 雄	星薬科大学・薬学部 / 医薬品化学研究所	教 授	研究代表者 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
森 田 博 史	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	教 授	研究立案・論文作成
高 橋 典 子	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	教 授	研究立案・論文作成
東 伸 昭	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	教 授	研究立案・実験・データ整理・論文作成
松 本 貴 之	星薬科大学・薬学部 / 医薬品化学研究所	准 教 授	研究立案・実験・データ整理・論文作成
金 田 利 夫	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	准 教 授	研究立案・実験・データ整理・論文作成
奥 輝 明	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	講 師	研究立案・実験・データ整理・論文作成
田 口 久 美 子	星薬科大学・医薬品化学研究所	講 師	研究立案・実験・データ整理・論文作成

マイクロパーティクルの生体機能解明による血管病治療と創薬応用 —膜小胞の動的臓器間ネットワーク解明と薬物送達システムへの応用—

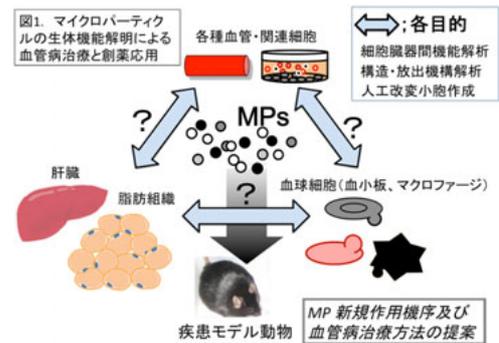
1. 研究の目的

国民病化している糖尿病や脂質異常症等は、様々な臓器の代謝性機能不全の重積によって生じ、その結果生じる血管合併症は、患者の quality of life (QOL) を著しく低下するばかりでなく、医療費の増加の一因ともなっている。特に、糖尿病や脂質異常症から生じる血管病時に、適切な病期・病態の新規治療薬の開発、予防方法の確立、血管障害・臓器機能不全の重症度を把握するバイオマーカーの開発が望まれている。

マイクロパーティクル(microparticle:MP)は、細胞外小胞(Extracellular vesicles: EVs, MP; 0.1~1.0 μm , エクソソーム; 30~100nm)のひとつで、様々な種類の細胞から放出される細胞膜粒子である。特に EVs の中で最も大きい粒子である MP は、大きいもので直径 1.0 μm あり、これは血小板(直径 2.0 μm)の半分程度である。すなわち、MP は新しい血球系細胞とも捉えられ、血小板のような種々の血管病に重要な役割をしている可能性が高い。このように MP は重要な生理機能を有しているが、生体内での放出機能・役割については、その抽出方法、量的問題から、ほとんど明らかにされておらず、MP の生体内における臓器間の機能的役割の解明が急務である。

そこで、MP の生体内の機能について、肝臓、がん細胞、血球系細胞、内皮細胞由来の MP と血管等の各臓器機能に焦点を絞り(図 1)、

- (1) 疾患モデル動物を中心に、MP と各種細胞臓器機能の相関性解析を進め、
- (2) 各種培養細胞を用いた MP の糖鎖構造・内容物解析を中心に、その放出・接着分子機序について臓器間作用を合わせて解明する。
- (3) (1) (2) の実験を統合し、血管疾患モデル動物を使用した MP、小胞の人為的改変、分布制御による各種臓器間の同時機能解析、新規治療予防方法を開発、ターゲットについて情報提供する。



2. 研究の計画

- (1) MP と血管・臓器機能における生体内相関性解析

糖尿病マウスや高血圧ラット、アセトアセチル CoA 遺伝子欠損マウス、p57Kip2 遺伝子(上皮細胞周期抑制因子)欠損マウスから、MP 分取の条件設定の検討、抽出を進め、フローサイトメトリーにより、各々の抗原(脂肪細胞; CD9, CD63 等、血小板; CD42a, CD61 等)を用いて起源細胞、構造異常を検討する。更に、申請者が確立している抽出方法とセルソーター等も用いて、ウエスタンブロット、顕微鏡等を用いて、内容物、糖鎖構造、接着浸潤メカニズムを解明する。

- (2) 培養細胞を用いた MP 放出機構、膜構造、細胞間シグナルの解明

疾患モデル動物由来 MP を用い、血管平滑筋内皮細胞、脂肪細胞、肝細胞、単球、血小板とのタンパク質相互作用、機能解析を検討する。特に、血管内皮細胞において機能的役割をしている NO 合成酵素、Akt、GRK2、MAP-kinase、arrestin などを中心として、免疫沈降-ウエスタンブロット法、二次元電気泳動を用いて明らかにする。また、各種培養細胞によって産生された MP 構造解析、血管内皮細胞表面の糖タンパク質解析、放出機構と細胞間相互作用の検討実験についても、これらの細胞組織などを血管細胞との共培養実験、阻害薬、抗体薬、遺伝子導入等を用いて比較検討する。更に、白血病細胞の分化時に放出される MP とレチノイン酸、レチノイン酸受容体などの核内受容体の関係が報告されており、がん細胞や脂肪細胞の分化増殖研究からも、臓器間の MP の役割として解明する。

3. 研究の成果

(1) 血管病モデルにおける血管機能解析と MP の関係について

- ① MP 誘発物質であるメチルグリオキサール (MGO)、インドキシル硫酸は、PKC を介する UDP 誘発収縮反応や ET-1 誘発収縮反応を増大させ、NO/cGMP シグナルの障害が関与する可能性が示唆された。
- ② 慢性 2 型糖尿病ラットにおける MP に含まれる細胞外核酸誘発収縮反応について検討したところ、OLETF 群において、ATP 誘発収縮反応の増大、UTP 誘発-収縮反応の減弱を認めた。慢性高血圧症ラットにおけるウリジンヌクレオチド誘発収縮反応について検討したところ、SHR 群において WKY 群と比較し、UDP 及び UTP 誘発収縮反応の増大が認められた。
- ③ 酸化ストレス刺激を受けた MP は、Toll-like receptor 4 (TLR4) を介し、炎症を誘発する事が報告されている。そこで、糖尿病ラット、マウスの各部位の血管機能不全における、抗酸化ポリフェノール、TLR4 阻害薬慢性投与の検討を行ったところ、ポリフェノールは大動脈において、TLR4 阻害薬は腸間膜動脈において、内皮機能を改善することを明らかにした。

(2) MP 放出機構、膜構造、細胞間シグナルの解明

- ① ヒト血漿由来 MP が単球・マクロファージ、内皮細胞に与える影響を検討するため、ヒト血漿に含まれる MP の精製を行った。ExoIntact2 Exosome isolation kit 及び exoEASY Maxi kit を用いて MPs の精製を行い、抗 CD9 抗体、抗 CD63 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。精製 MP を種々培養細胞を用いて解析を進めた結果、MP と共培養した MM6-NFκB 細胞を PGN で刺激した後、レポーター解析において、MP と共培養した細胞では応答性が低下していた。
- ② 糖尿病マウス血中において、CD42a 血小板由来 MP の内容物スクリーニングにおいて、血管内皮機能に影響を及ぼす ERK タンパク、G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) タンパク質や酸化リン脂質が多く含まれている事を明らかにした。
- ③ マウス結腸がん細胞株について、糖鎖切断酵素ヘパラーゼ存在下で培養することにより、MP を含む細胞外小胞の分泌量が数倍に上昇することを新たに見出した。更に、非存在下で分泌された通常の細胞外小胞に比べ、CD63 の含有量が非常に高い、粒径が小さい、不安定である、ゼータ電位の負の値が大きい、という特徴を有していることを明らかにした。
- ④ レチノイン酸 (RA) は血管病時の血液凝固障害を改善する作用も有している。そこで、HL60 細胞に RA を処理した時に放出される MP の精製実験を進め、MP の回収に成功した。更に、RA 処置により、経時的に量が上昇する MP 種があること及び、 α -アクチニンの量も経時的に増加していることから、細胞の増殖・分化時、あるいは、細胞死の際に、 α -アクチニンを初めとする MP が放出されていると考えられた。
- ⑤ マウスメラノーマ細胞株 B16F10 において、フォスファチジルセリン結合タンパクを用いて MP を精製し、CD63 の発現により MP の存在を確認した。CD63 の発現を指標に、この放出を増減する天然物/生薬エキスを探したが、現在までに詳細に検討すべき天然物は見つかっていない。
- ⑥ MP の分泌過程を可視化するプローブの作成を行うため、MP のマーカータンパク質として頻用される CD63 の発現ベクターの下流に、蛍光タンパク質の中でも非常に明るいといわれる venus の遺伝子を挿入した融合遺伝子を作製した。これをもとに結腸がん細胞株 colon 26 細胞において、venus の蛍光を発する細胞の構築に成功した。

(3) 血管病モデルにおける MPs 作用機序および血管障害治療薬の検討

糖尿病時の MP 放出増加、質的变化、ERK1/2 活性が内皮機能障害に関係していることが明らかとなったので、その阻害薬を糖尿病マウスに慢性投与し、血管病治療効果の検討を行った。ERK1/2 阻害剤である PD98059 (PD) を *in vivo* 処置した糖尿病動物においては、血管障害が改善された。更にその動物から抽出した MP 中のタンパクを測定したところ、正常動物の MP と同程度の ERK1/2 活性および eNOS 発現を示すと共に、その MP においては、内皮機能障害は認められなかった。以上のことから糖尿病時、MP に含まれる ERK1/2 が血管

内皮障害を惹起させることが示唆され、更に ERK 阻害薬の投与は、糖尿病性血管内皮障害、MP の含有量、質的变化を改善し、糖尿病性血管障害の治療ターゲットとなることを提案した。

4. 研究の反省・考察

以上より、糖尿病、高血圧性血管病と血小板由来 MP は密接に関係し、特に大動脈、腸間膜動脈の内皮細胞機能において顕著作用することが明らかになった。また MP 放出や接着機構として、ヒト血漿由来 MP の抽出精製、ヘパラーゼ、 α -アクチニン等の分子種の同定も進み血管病時やがん細胞との関連性について更に検討を進めている。特に、糖尿病時の血管病において、MP に含まれる ERK1/2 が血管内皮障害を惹起させることを明らかにし、ERK 阻害薬の投与、MP の質的改変は糖尿病性血管障害の治療ターゲットとなることを発表した。本成果は、論文発表 13 報、学会発表 20 回行う事ができ、今後の MP 研究、血管病の新規治療展開に期待できる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Taguchi K, Kaneko N, Okudaira K, Matsumoto T, Kobayashi T. GLP-1 modulates insulin-induced relaxation response through β -arrestin2 regulation in diabetic mice aortas. *Acta Physiol (Oxf)*. 2021;231(3):e13573.
- ② Matsumoto T, Takayanagi K, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Toll-Like Receptor 4 Inhibitor TAK-242 Augments Acetylcholine-Induced Relaxation in Superior Mesenteric Arteries of the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(8):1283-1287.
- ③ Matsumoto T, Kojima M, Takayanagi K, Katome T, Taguchi K, Kobayashi T. Impaired UTP-induced relaxation in the carotid arteries of spontaneously hypertensive rats. *Purinergic Signal*. 2020;16(3):453-461.
- ④ Matsumoto T, Katome T, Kojima M, Takayanagi K, Taguchi K, Kobayashi T. Methylglyoxal augments uridine diphosphate-induced contraction via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat carotid artery. *Eur J Pharmacol*. 2021; 904:174155.
- ⑤ Matsumoto T, Takayanagi K, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Indoxyl sulfate enhances endothelin-1-induced contraction via impairment of NO/cGMP signaling in rat aorta. *Pflugers Arch*. 2021;22. doi: 10.1007/s00424-021-02581-8.
- ⑥ Matsumoto T, Takayanagi K, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Differential Contractile Reactivity to Nucleotides in Femoral Arteries of OLETF and LETO Rats. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(12):1987-1992.
- ⑦ Matsumoto T, Takayanagi K, Katome T, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Extracellular uridine nucleotides-induced contractions were increased in femoral arteries of spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology*. 2021. In press.
- ⑧ Izumisawa T, Wakui N, Kaneko T, Soma M, Imai M, Saito D, Hasegawa H, Horino T, Takahashi N. Increased Vancomycin Clearance in Patients with Solid Malignancies. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(7):1081-1087.
- ⑨ Saito D, Imai M, Yamada C, Takahashi N. Changes in the levels of α -actinin-4 in differentiating human myeloid leukemia cells induced by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2021;1868(6):118968.
- ⑩ Yamasaki M, Hasegawa S, Imai M, Fukui T, Takahashi N. Browning Effect of Brominated Flame Retardant, TBBP-A, on Undifferentiated Adipocytes. *BPB Reports*, 2021; 4 :41-46.
- ⑪ Takahashi N, Saito D, Hasegawa S, Yamasaki M, and Imai M. Vitamin A in health care: Suppression of growth and induction of differentiation in cancer cells by vitamin A and its derivatives and their mechanisms of action. *Pharmacology & Therapeutics*, 2021 in press.
- ⑫ Higashi N. Mast Cell-derived Granular Complex: A Naturally-generated Delivery System with the Aid of Carbohydrates. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology (TIGG)*. 2021; 33(192):E27-E32..
- ⑬ Higashi N. マスト細胞の顆粒複合体：糖鎖の助けによる天然の送達システム *Trends in Glycoscience and Glycotechnology (TIGG)*. 2021; 33(192):J27-E32.

(2) 口頭発表

- ① 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;Diabetic mice-derived microparticles (MPs) induced endothelial dysfunction;第43回日本分子生物学会年会. 2020年, 12月
- ② 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;糖尿病マウスの血小板由来マイクロパーティクルによる血管弛緩反応減弱機構;第62回日本平滑筋学会総会. 2020年, 12月
- ③ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;MPs に着目した糖尿病性血管内皮機能障害に対するERK1/2 阻害剤の効果;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ④ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;GLP-1 は β -arrestin2 を誘導することで糖尿病時のInsulin 誘発血管弛緩反応を改善する;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑤ 松本 貴之、田口 久美子、小林 恒雄;Spontaneously hypertensive rat 頸動脈におけるuridine triphosphate 誘発弛緩反応;第30回日本循環薬理学会 2020年, 11月
- ⑥ 松本 貴之、田口 久美子、小林 恒雄;ラット頸動脈の uridine diphosphate 誘発収縮反応に対する終末糖化産物の増大機序;第62回日本平滑筋学会総会 2020年, 12月
- ⑦ 松本貴之、田口久美子、小林恒雄;ラット摘出胸部大動脈におけるエンドセリン-1 誘発収縮に対するインドキシル硫酸の影響;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑧ 松本貴之、田口 久美子、小林 恒雄;ラット胸部大動脈におけるTRPV4 アゴニスト並びにアデニル酸シクラーゼ活性化薬誘発弛緩反応に対するインドキシル硫酸急性暴露の影響;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑨ 松本貴之、田口久美子、小林恒雄;自然発症高血圧ラット上腸間膜動脈におけるアデニンによる弛緩反応;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑩ 松本貴之、田口久美子、小林恒雄;慢性2型糖尿病ラット大腿動脈における細胞外核酸およびウリジンアデノシンテトラフォスフェート誘発収縮反応;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑪ 松本貴之、田口久美子、小林恒雄;ラット頸動脈、腎動脈、大腿動脈のノルアドレナリン誘発収縮に対するメチルグリオキサール急性暴露の影響;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑫ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;MPs に着目した糖尿病性血管内皮機能障害に対するERK1/2 阻害剤の効果;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑬ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;GLP-1 は b-arrestin2 を誘導することで糖尿病時のInsulin 誘発血管弛緩反応を改善する;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑭ 高橋典子;HL60 細胞分化誘導時の α -アクチニンタンパク質の変化;第93回日本生化学会大会 2020年, 9月
- ⑮ 高橋典子;脳組織におけるケトン体代謝の役割;第31回日本レチノイド研究会学術集会 2020年, 10月
- ⑯ 高橋典子;悪性腫瘍におけるビタミンA の変化と作用;第31回日本レチノイド研究会学術集会 2020年, 10月
- ⑰ 高橋典子;PKA によりリン酸化される RA 処理 HL60 細胞のタンパク質;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑱ 高橋典子;臭化難燃剤 (TBBP-A) が前駆脂肪細胞の脂質-ケトン体代謝経路へ与える影響の検討;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑲ 高橋典子; β -カロテンとその代謝物の作用と疾病予防・治療への応用;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑳ 浜田真美加、山本陽香、高橋勝彦、小林恒雄、中島元夫、入村達郎、東 伸昭;ヘパラーゼは結腸癌細胞によるエクソソーム分泌を調節する;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月

(3) 出版物

なし