

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09588

研究課題名(和文) 肺血管内皮細胞の内皮間葉系転換におけるエクソソームの役割

研究課題名(英文) Contribution of exosome to the progression of endothelial mesenchymal transition in pulmonary arterial hypertension

研究代表者

長岡 鉄太郎 (Nagaoka, Tetsutaro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70407295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TGF β ・TNF α ・IL-1 β 刺激によってEndMTを誘導したヒト肺血管内皮細胞(HPMVEC)や、各種増殖因子刺激によって増殖誘導されたヒト肺血管平滑筋細胞(HPASMC)の培養液から超遠心法を用いてエクソソームを回収した。回収されたエクソソームは、同種細胞間では各細胞の機能変化に影響しなかったが、それぞれと異なる細胞に投与したところ、HPASMC由来のエクソソームが正常HPMVECの遊走能を亢進した。以上より、肺動脈性肺高血圧症の肥厚したHPASMCが、エクソソームを介してHPMVEC由来の血管内膜病変進展を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の治療の進歩によって肺動脈性肺高血圧症(PAH)の予後は改善しているが、治療抵抗例では肺移植も必要となる重篤な疾患である。PAHの主病態は肺動脈の異常収縮とリモデリングであるが、現在臨床使用可能なPAH治療薬は全て血管拡張薬であり、抗リモデリング効果を有する治療薬の開発が待たれている。PAHの血管リモデリング進展機構については、多くの基礎研究結果が報告されているが、未だ明らかでない点も多い。本研究の結果は、エクソソームが異種細胞間の情報伝達において重要な役割を果たすことを示唆しており、エクソソームが抗リモデリング効果を有する新規治療戦略の標的となりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Objective of this study was to assess the role of exosome on the development of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension (PAH). We extracted the exosome both from endothelial mesenchymal transition (EndMT) induced human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMVEC) and proliferated human pulmonary smooth muscle cells (HPASMC) by multiple growth factors. Exosomes from stimulated HPMVEC and HPASMC had no effect among each allogenic cells. While exosome from EndMT induced HPMVEC did not cause proliferation of HPASMC, exosome from proliferated HPASMC promoted the migration of control HPMVEC. These results suggest that exosome play a role to the cell-cell interaction between HPMVEC and HPASMC and contribute to the development of PAH specific proliferative intimal lesion of pulmonary arteries.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 血管リモデリング エクソソーム 血管内皮細胞 血管内皮間葉転換 血管平滑筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (**Pulmonary arterial hypertension : PAH**) は、肺動脈の異常収縮と血管内腔を閉塞する増殖性病変により発症・進行し、進行例は未だ肺移植が必要となる予後不良の疾患である。**PAH** の病初期には、血管内皮細胞の機能障害により異常収縮が惹起され、引き続いて **Plexiform lesion** を代表とする血管内膜の増殖性変化が進行すると考えられる。しかし、発症初期には特異的な症状もなく、早期診断が困難である点も問題となっている。**PAH** の増殖性血管内膜病変を形成する細胞の免疫組織学的検索を行ったところ、血管内皮細胞と間葉系細胞の両方の特徴を有することが報告された (**Tuder RM, et al. Am J Pathol. 1994**)。これは、病態の進行に伴い **PAH** の血管内皮細胞の形態や特性が間葉系細胞様に変化した可能性を示している。この疾患特異的な増殖性血管病変の発生・進展機構は明らかにされていないが、近年になり血管内皮間葉系細胞転換 (**Endothelial mesenchymal transition : EndMT**) の関与が示唆されてきた。

EndMT 進展の代表的な刺激因子として **TGF β** の関与が報告されている。血管内皮マーカーである **VE-cadherin** 陽性のマウス血管内皮細胞が、**TGF β 1** 刺激によって **α SMA** や **Type-I Collagen** などの間葉系マーカー陽性の細胞へ形質変化することが示された (**Li Z, et al. Arthritis Rheum. 2011**)。この形質変化は **Snail-1** の過剰発現を伴い、**siRNA** によって **Snail-1** を **knockdown** した細胞においては、**TGF β 1** による **α SMA** の発現が有意に抑制されたことから、**Snail** が **EndMT** 進展の重要なシグナルであることが示唆された。さらに、**TGF β** 刺激下の血管内皮細胞において、**PDGF** シグナルに対するチロシンキナーゼ阻害薬である **imatinib** が **Snail-1** の発現低下を伴って **EndMT** の進展を抑制した。他にも、**Slug**、**Sip-1** や **Twist** を介した **EndMT** 進展機構が報告されているが、詳細については未だに不明な点も多い。

現在 **PAH** の治療薬として用いられる薬剤は、すべてが異常な血管収縮を標的とした血管拡張薬である。前述の **imatinib** は、抗リモデリング効果を有する新規 **PAH** 治療薬として期待されたが、主に副作用の点から臨床適応を得るに至らなかったため、血管リモデリングを標的とした治療薬はないのが現状である。但し、**PAH** の病態進行に血管内皮の異常増殖が大きく関与していることは間違いなく、内膜病変への関与が示唆される **EndMT** のメカニズムをさらに詳細に検証することが急務と考える。そこで、我々は **EndMT** の進展におけるエクソソームの関与に注目した。

細胞外小胞顆粒のひとつであるエクソソームは、生体を構成する数多くの細胞内で形成されて細胞外へ分泌される。エクソソームの小胞内には **microRNA**、**mRNA** や各種タンパク質が含まれており、これらの情報伝達物質がエクソソームを介して細胞から細胞へ移送されることにより、生体の恒常性維持のみならず、様々な疾患の病態進展において重要な役割を果たしていることが知られてきた。細胞内の **microRNA** については、多くの報告によって遺伝子やたんぱく質の発現の制御によって様々な疾患の病態の進行に関わっていることが明らかにされている。**PAH** においても、一部の細胞内 **microRNA** (**miR-204**、**miR-210**、**miR-20** など) が血管平滑筋細胞の収縮やリモデリングを制御することが報告されており (**B-Vasku J, et al. J Am Soc Hypertens. 2015**)、新規の治療標的として期待されている。一方で、細胞外に分泌される **microRNA** は、エクソソーム内に包埋されて安定した状態で同種・異種細胞間の情報伝達に用いられる。例えば、悪性腫瘍を有する患者では、健常者と比較してエクソソーム内 **microRNA** のプロファイルが異なることも報告されており、悪性腫瘍の早期診断のバイオマーカーとして注目を集めている。心血管系においても、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞、心筋細胞などがエクソソームを分泌することが明らかにされ、心血管系の恒常性維持から疾患進展まで、様々な場面において重要な役割を果たしていることが示唆されている (**Das S, et al. Cardiovasc Pathol. 2015**)。特に常に血液と接触のある血管内皮細胞は、エクソソームを介した様々な情報伝達の場になっていることが予想される。エクソソームを介した異常な細胞間情報伝達によって、プラーク形成や血管平滑筋リモデリングを含めた、血管内皮細胞から血管平滑筋細胞に及ぶ動脈硬化性病変が進行すると考えられる。しかしながら、**PAH** の血管内膜増殖性病変進展におけるエクソソーム内の各種 **microRNA** やタンパク質の役割については、未だ明らかでない。

2. 研究の目的

我々は、**PAH** の血管病変進展への関与が強く示唆される肺血管内皮細胞の **EndMT** や血管平滑筋の増殖におけるエクソソームの役割を、**in vitro** ~ **in vivo** ~ **human** で検証することを目的として以下の実験を計画した。実験の概要は以下の通りである。

in vitro の検証

我々は、**TGF β 6**・**TNF α** ・**IL-1 β** の刺激によってヒト肺末梢血管内皮細胞 (**Human pulmonary microvascular endothelial cell : HPMVEC**) に間葉系転換を誘導する **Assay** 系を既に確立している。この系を用いて、培養液中のエクソソームを回収し、**EndMT** の有無による各種 **microRNA** やタンパク質のプロファイルの違いを検証する。さらに、**PDGF** などを用いて増殖刺激をしたヒト肺動脈血管平滑筋細胞 (**Human pulmonary arterial smooth muscle cells : HPASMC**) の培養液から回収したエクソソームを用いて、エクソソームを介した異種細胞間の情報伝達についても検証する。

in vivo の検証

我々の施設では、**VEGF** レセプター拮抗薬 (**Sugen5416**) + 慢性低酸素曝露により作成する

PAH 類似した肺血管病変を有する肺高血圧ラットモデル (Su/Hx PAH rat) の使用が可能である。同 PAH ラット体液中のエクソソームを回収し、エクソソーム内の各種 **microRNA** やタンパク質のプロファイルを解析する。

Su/Hx PAH rat および Human PAH の肺血管内皮細胞を用いた検証

我々は **FACS** を用いて肺組織から血管内皮細胞を分離回収する手法を確立している。この手法を用いて、Su/Hx PAH rat やヒト PAH 患者の肺組織から選別した血管内皮細胞を培養し、培養液中のエクソソーム内の各種 **microRNA** やタンパク質のプロファイルを解析する。

3. 研究の方法

上記の“研究の目的”で当初の実験計画の概要を記載したが、期間内に施行できた実験の方法のみ以下に記す。

TGFβ・TNFα・IL-1β を用いた HPMVEC に対する EndMT 誘導

HPMVEC を 5%Exosome-Depleted FBS・TGF-β2 (5ng/ml)、TNF-α (2ng/ml)、IL-1β (4ng/ml) を添加した EGM™-2MV BulletKit™ でインキュベートし、48 時間後に培養上清を回収した。血管内皮マーカーとして von Willebrand factor・CD31、間葉系マーカーとして Fibronectin、type1 collagen を用いて、ウェスタンブロットによって EndMT の誘導を確認した。また、EndMT を誘導するシグナルを検証するため、End-MT に関連する転写因子である Twist-1 の発現も確認した。

PDGF・FGF・EGF・IGF を用いた HPASMC に対する増殖誘導

HPASMC を 0.1%Exosome-Depleted FBS、PDGF-BB (30ng/ml) を添加した SmBM™ でインキュベートし、48 時間後に培養上清を回収した。細胞増殖は CCK-8 assay、BrdU assay、IncuCyte imaging assay などを用いて確認した。さらに、増殖刺激の下流シグナルにあたるリン酸化 ERK/AKT のタンパク発現をウェスタンブロットによって検証した。

HPMVEC・HPASMC 培養液からのエクソソームの回収

各細胞の培地に使用される FBS には牛由来のエクソソームが含まれるため、回収 24-48 時間前に通常の培地から無血清培地に交換後に培養液を回収し、回収したサンプルを 2000g で 10 分間遠心して死細胞を除いたあと、0.2 μm のフィルターで濾過した。サンプルをシングローターにセットし、3500rpm、70 分で超遠心を実施（およそ 200000g の遠心加速度）してエクソソームを分離した。採取した分離液内を用いて、まず Nanosight によってエクソソームに合致するサイズの細胞外顆粒の存在を確認し、次に採取した細胞外顆粒がエクソソームであることを確認するために、エクソソーム膜タンパク (CD63・CD9) の発現をウェスタンブロットで検証し、micro BCA protein assay によってタンパク濃度を測定した。

同種細胞間のエクソソームを介した機能変化の解析

前述の方法で EndMT 誘導した HPMVEC と増殖誘導した HPASMC からエクソソームを回収し、それぞれ刺激なしの同種細胞の培養液にエクソソームを加えて、エクソソームを介した各細胞の EndMT 誘導および増殖誘導を確認した。さらに Nintedanib を加えた細胞培養液から回収したエクソソームによる細胞機能への影響も併せて検証した。

異種細胞間のエクソソームを介した機能変化の解析

エクソソームを介した異種細胞間の情報伝達を評価するために、EndMT 誘導した HPMVEC と増殖誘導した HPASMC からエクソソームを回収し、それぞれのエクソソームを異なるコントロール細胞の培養液に加えて、細胞機能の変化を検証した。HPMVEC については、遊走能 (wound healing assay) を確認し、HPASMC については細胞増殖 (IncuCyte imaging assay) を用いて、各細胞の機能評価を行った。同様に、Nintedanib を加えた細胞培養液から回収したエクソソームによる細胞機能への影響も併せて検証した。

HPMVEC および HPASMC から回収したエクソソームのマウスへの投与実験

EndMT 誘導した HPMVEC と増殖誘導した HPASMC から回収したエクソソームを、それぞれ別個のマウスの尾静脈から 3 日間投与 (25μg/day) 後に 2 週間経過の後に肺組織を摘出し、HPMVEC 由来と HPASMC 由来のエクソソームが、肺動脈のリモデリングに与える変化の相違を検証した。

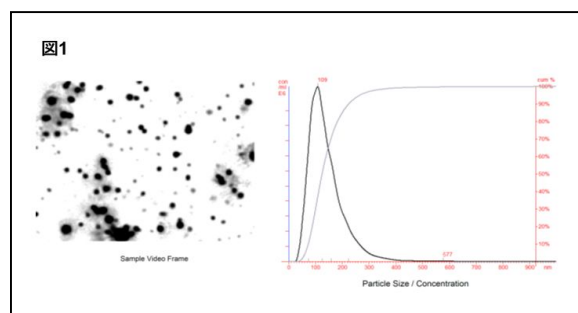
4. 研究成果

HPMVEC を用いた EndMT の誘導

各種サイトカイン刺激によって、HPMVEC の内皮系マーカーである vWF と CD31 のタンパク発現は減少し、間葉系マーカーである Fibronectin と Collagen-1 のタンパク発現は増加した。EndMT を起こした HPMVEC では EndMT 関連転写因子である Twist-1 タンパクの発現が増加していた。

HPASMC を用いた増殖誘導

CCK-8 assay では、前述の各種増殖因子刺激によって、HPASMC の細胞増殖は亢進した。HPASMC 刺激群の BrdU 発現も亢進してい



た。リン酸化 **ERK/AKT** のタンパク発現は、増殖刺激後の **HPASMC** で有意に増加していた。**HPMVEC・HPASMC** 培養液からのエクソソームの回収

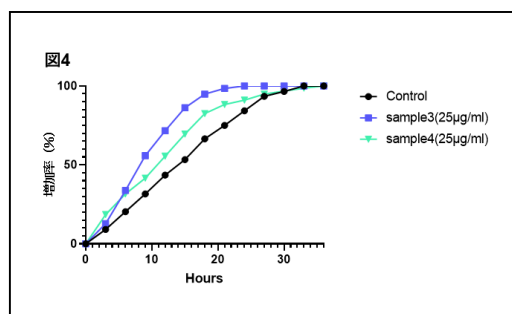
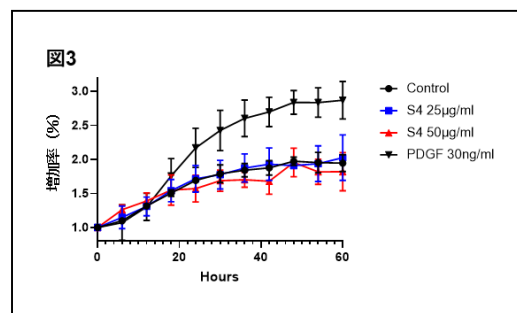
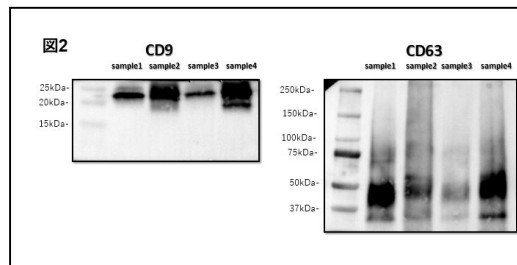
前述の超遠心法によって回収した分離液を **Nanosight** で確認したところ、エクソソームとして矛盾しない大きさの細胞外顆粒の採取が確認した(図1)。分離したサンプル中のエクソソーム膜タンパク (**CD9・CD63**) の発現は亢進しており(図2)、回収した細胞外顆粒がエクソソームであることが確認できた。

同種細胞間のエクソソームを介した細胞機能変化

EndMT 誘導した **HPMVEC** から回収したエクソソームを、コントロール **HPMVEC** 培養液に加えて **EndMT** 誘導の有無を検証した。追加するエクソソームを $5\mu\text{g}$ から $50\mu\text{g}$ まで漸増して検証を行ったが、明らかな **EndMT** の誘導はみられなかった。同様に各種増殖因子刺激後の **HPASMC** から回収したエクソソームをコントロール **HPASMC** に投与($5\mu\text{g}$ から $50\mu\text{g}$ まで漸増)したが、増殖能の亢進は認めなかった。以上より、同種細胞間の情報伝達においては、エクソソームの関与は少ないことが示唆された。

異種細胞間のエクソソームを介した細胞機能変化

まず、**EndMT** 誘導した **HPMVEC** から回収したエクソソームを、 $5\mu\text{g}$ から $50\mu\text{g}$ まで漸増してコントロール **HPASMC** 培養液に加えたが、**HPASMC** の細胞増殖は亢進しなかった(図3)。次に、増殖刺激をした **HPASMC** から回収したエクソソームを、 $5\mu\text{g}$ から $25\mu\text{g}$ まで漸増して同様にコントロール **HPMVEC** 培養液に投与したところ、遊走能の有意な亢進を認めた(図4)。



以上の結果から、**HPMVEC** 由来のエクソソームは血管平滑筋の肥厚の進展には影響を与えない一方で、**HPASMC** 由来のエクソソームが血管内皮細胞の増殖性血管病変の進展に関与する可能性が示唆された

HPMVEC および HPASMC から回収したエクソソームのマウスへの投与実験

前述のように **EndMT** 誘導した **HPMVEC** と増殖誘導した **HPASMC** から回収したそれぞれのエクソソームを、マウス (**C57BL/6**) の尾静脈からそれぞれ別個の個体に静脈投与($25\mu\text{g}/\text{day}$)して、血管リモデリングに与える影響を確認した。本来

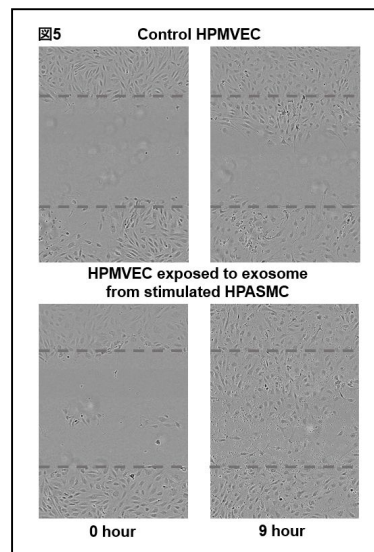
は複数回のエクソソーム投与後に病理学的な検証を行う予定であったが、必要量のエクソソーム回収に予想以上の時間と費用が必要であったため、1回のみ静脈投与し2週間後に肺動脈の病理を検証した。刺激した **HPASMC** 由来のエクソソームの投与によってマウスの血管内膜病変が進展することが期待されたが、今回の検証では、**HPMVEC** および **HPASMC** から回収したエクソソームの両投与群においても、コントロールマウスと比較して、血管リモデリングの進展は認められなかった。

まとめ・今後の実験計画

今回の実験結果で興味深い点は、エクソソームは全ての細胞間の情報伝達に関与しているのではなく、一部の細胞間のみでエクソソームを介したリモデリングの進展が生じている可能性が指摘された点である。より詳細なメカニズムを検証するために、近日中に以下の実験を行うべく準備中である。

各種刺激後の **HPMVEC** および **HPASMC** 由来のエクソソームには、同種・異種のコントロール細胞に与える機能的変化が異なることが明らかになった。その相違の原因を検証するため、マイクロアレイを用いて、刺激 (+/-) の各種細胞から回収したエクソソームや刺激 (+) の **HPMVEC** と **HPASMC** から回収したエクソソーム内の **microRNA** の発現を比較検証する。

今回の施行した **in vivo** の検証では、コントロールマウスに投与するエクソソームの量が不足していた可能性が残されるため、十分量のエクソソームを回収後に再度投与実験を施行予定である。



5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

Nintedanib は肺高血圧症治療薬になり得るか？- **in vivo, in vitro** における検討-
堤 建男、長岡鉄太郎、鈴木宜史、吉田隆司、栗山祥子、高橋史行、守尾嘉晃、高橋和久
第 57 回日本呼吸器学会総会 2017 年 4 月 23 日 東京

Chronic treatment of nintedanib ameliorates the development of pulmonary hypertension in rat model.

Takeo Tsutsumi, Tetsutaro Nagaoka, Yoshifumi Suzuki, Takashi Yoshida, Sachiko Kuriyama, Yoshiteru Morio, Kazuhisa Takahashi

American thoracic society international conference. 21/May/2017. Washington DC. USA

Effect of nintedanib in experimental pulmonary hypertension depends on the condition of pulmonary arterial endothelial cell.

Takashi Yoshida, Tetsutaro Nagaoka, Takeo Tsutsumi, Yoshifumi Suzuki, Sachiko Kuriyama, Kazuhisa Takahashi

American thoracic society international conference. 21/May/2018. San Diego. USA.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：守尾 嘉晃

ローマ字氏名：**Morio, Yoshiteru**

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：**30365663**

研究分担者氏名：高橋 史行

ローマ字氏名：**Takahashi, Fumiyuki**

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：**70327823**

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。