



TITLE:

Extracellular vesicles synchronize cellular phenotypes of differentiating cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Minakawa, Tomohiro

CITATION:

Minakawa, Tomohiro. Extracellular vesicles synchronize cellular phenotypes of differentiating cells. 京都大学, 2022, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2022-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13479>

RIGHT:

京都大学	博士 (医 学)	氏名	皆 川 朋 皓
論文題目	Extracellular vesicles synchronize cellular phenotypes of differentiating cells (細胞外小胞が分化中の細胞同士の形質を同調させる)		
(論文内容の要旨)			
<p>胚の発生は非常に緻密に調整されたプロセスである。正常な組織を形成するためには、個々の細胞が協調して分化しなければならない。発生過程におけるシグナル伝達経路や遺伝子制御機構については数多くの研究が行われている一方、個々の細胞が周囲の細胞とどのように同調して分化するのかはほとんどわかっていない。</p> <p>以前の研究で、ドキシサイクリン非存在下 (Dox-) においてプロテインキナーゼ A (PKA) が構成的に活性化されるマウス胚性幹細胞 (ESC) 株、PKA-ESC を作製した。Dox-条件下で PKA を活性化すると、三胚葉分化、特に中胚葉細胞の出現が早期化される。このシステムは、他の細胞株に依存せず、PKA-ESC のみで細胞分化速度を操作することが可能である。</p> <p>本研究では、PKA-ESC と、分化速度が野生型と変わらないコントロール ESC 株 (Control-ESC) のキメラ凝集培養を行った。この実験系では、Dox-によって PKA-ESC のみが特異的に分化を促進することから、胚発生に似た 3 次元条件下で、2 つの ESC 集団の間で意図的に異なる分化速度を生じさせることが可能となる。</p> <p>単独培養の場合、非活性化 PKA-ESC (Dox+) および Control-ESC では分化誘導 3.5 日時点で中胚葉マーカー Flk1 陽性率が全体の 10%未満であったが、活性化 PKA-ESC (Dox-) の Flk1 陽性率は 40%以上であった。キメラ凝集培養において、Dox-条件では、分化誘導 2.5 日目から PKA-ESC 中に Flk1 陽性細胞の出現が誘発され、3.5-4.5 日目には約 40% に達した。PKA-ESC の早期分化に追従するかのようになり、Control-ESC 集団にも Flk1 陽性細胞が出現し始め、分化誘導 3.5 日目までに PKA-ESC 集団の Flk1 陽性細胞の割合に追いついた。これを細胞形質同調と名付けた。</p> <p>次に、細胞形質同調における細胞外小胞 (Extracellular Vesicle, EV) の関連性を調べるため、キメラ凝集培養中に EV 分泌阻害剤である manumycin A を添加した。manumycin A 添加により、分化誘導 3.5 日目において Dox-条件下にあるキメラ凝集体のうち Control-ESC 集団のみで Flk1 陽性細胞の出現が特異的かつ有意に減少した。次に、PKA-ESC から分泌された EV の影響を解析するために、非活性化 PKA-ESC (Dox+)、活性化 PKA-ESC (Dox-) の分化培養上清を回収し、超遠心分離によってそれぞれ EV (Dox+)、EV (Dox-) を単離した。Control-ESC に EV (Dox-) を添加すると、EV 無添加または EV (Dox+) よりもはるかに高い割合の Flk1 陽性細胞が誘導された。EV (Dox-) を胎生 3.5 日マウス胚に添加し ex vivo 培養を行ったところ、典型的な自発的拍動を伴う心筋細胞が観察された (85 胚中 11 胚)。</p>			

<p>EV (Dox+) と EV (Dox-) に含まれる miRNA の発現プロファイルを RNA-seq で比較し、EV (Dox-) に含まれる miR-132 が細胞形質同調を担う情報伝達分子の 1 つとして同定された。さらに、EV (Dox-) により受け手細胞に送達された miR-132 が標的となる Spry1、Rasa1 の阻害を介して下流の PKA シグナルを活性化し、結果的に PKA-ESC に形質を近づけることが示唆された。PLGA (ポリ乳酸・グリコール酸共重合体) を用いて、miR-132 を含む PLGA ナノ粒子を作製し、胎生 3.5 日マウス胚に添加すると、EV (Dox-) 添加時と同様に拍動する心筋細胞が観察され、EV 機能の模倣に成功した。</p> <p>以上のように本研究は、EV を介した細胞間コミュニケーションによって、分化の過程で近接する細胞同士の形質が同調するという新たな生物学的現象を示した。</p>
(論文審査の結果の要旨)
<p>発生過程において細胞は協調的に分化する必要がある。しかし、個々の細胞が周囲の細胞とどのようにして分化の方向性と進行度合いを同調させて分化を進めるかは不明である。</p> <p>本研究では、活性化型プロテインキナーゼ A (PKA) を薬剤制御性に発現し、分化速度を速めることができるマウス胚性幹細胞 (ESC) 株である PKA-ESC と、分化速度が野生型と同様である対照 ESC のキメラ凝集培養を行ったところ、分化誘導 3.5 日目には対照 ESC の中胚葉マーカー Flk1 陽性率が通常より早期に高まり、分化速度が速い PKA-ESC と同レベルまで到達した。この現象は細胞形質同調と名付けられた。細胞外小胞 (Extracellular Vesicle, EV) の分泌阻害剤によって本同調作用が阻害された。PKA-ESC の分化培養上清由来の EV を対照 ESC に添加したところ、強力な中胚葉誘導効果が認められた。PKA-ESC 由来 EV をマウス胚に添加し ex vivo 培養を行ったところ拍動心筋細胞の誘導が確認された。以上より、細胞形質同調が EV を介して行われることが示された。PKA-ESC 由来 EV に含まれる分子から、miR-132 が細胞形質同調を担う情報伝達分子の 1 つとして同定された。miR-132 を含む人工的なナノ粒子を作製し、胎生 3.5 日マウス胚に添加すると、EV 添加時と同様に拍動する心筋細胞が観察され、EV 機能の模倣に成功した。</p>
<p>以上の研究は、細胞外小胞を介した新しい細胞制御機構を発見し、新たな生命機能の解明や治療法開発等医学・生物学に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 4 年 1 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。</p>