

## 【原著論文】

## 血管内皮細胞におけるストレス応答性miR10bの機能解析

中原 正子<sup>1</sup>、中山 寛尚<sup>1,2</sup><sup>1</sup>広島国際大学 保健医療学部 医療技術学科<sup>2</sup>広島国際大学大学院 医療・福祉科学研究科 医療工学専攻

## 要旨

血管内皮細胞 (endothelial cell, EC) の老化は、脳血管・心血管疾患だけではなく、アルツハイマー病や生活習慣病などの加齢関連疾患にも関与している。本研究では、ECストレスによって上昇するmicroRNA10b (miR10b) に着目し、miR10bがEC機能に対してどのような影響をもたらすのか検討を行った。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) にmiR10bを遺伝子導入したところ、チューブ形成能と細胞増殖能の低下が観察された。さらに、miR10bは細胞間接着因子VE-cadherinの発現抑制および細胞膜局在を阻害することから、miR10bはECの細胞間接着や血管構造の安定化に重要であると考えられる。また、天然植物由来ポリフェノールであるフェルラ酸は、酸化ストレスによるmiR10b誘導を抑制してEC保護作用を示すことを見出した。これらの結果から、ストレス刺激によるECの機能変化の分子機序の一端としてmiR10bが関与していることから、miR10bを標的とした血管老化の評価や血管機能低下の防止・改善法の開発に繋がると考えられる。

キーワード : microRNA10b、血管内皮細胞、VEカドヘリン、フェルラ酸

**Oxidative stress-induced miR10b disrupts endothelial cell function**Masako Nakahara<sup>1</sup>, Hironao Nakayama<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Department of Medical Science and Technology, Hiroshima International University<sup>2</sup> Graduate School of Medical Technology and Health Welfare Sciences, Hiroshima International University

## Abstract

Endothelial cells (ECs) are constantly exposed to environmental stress factors that trigger cellular senescence and apoptosis. The altered EC function is related to the progression of age-related diseases, such as Alzheimer's disease. We have identified that microRNA10b (miR10b) is upregulated in ECs following oxidative stresses, however, the biological function of miR10b in ECs is poorly understood. Overexpression of miR10b in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) decreased EC proliferation and tube formation. Conversely, addition of miR10b inhibitor increased EC proliferative ability. Furthermore, overexpression of miR10b suppressed protein expression of VE-cadherin (VE-cad), an endothelial adhesion molecule, and altered VE-cad localization at adherens junctions. We also found that ferulic acid, a polyphenol derived from natural plants, inhibited the induction of miR10b by oxidative stress stimulation, thereby protecting ECs from apoptosis. These results suggest that miR10b contributes to disruption of VE-cad-based junctions induced by oxidative stress, therefore, targeting miR10b may be a promising biomarker capable of detecting EC dysfunctions.

**Keywords:** microRNA10b, endothelial cell, VE Cadherin, ferulic acid

連絡先 : 中原 正子 0823-70-4584 nakahara@hirokoku-u.ac.jp

## I. 背景

アルツハイマー型認知症 (Alz) の発症機序としてはアミロイドβ (Aβ) の沈着が引き金となり、タウ蛋白質が凝集する神経原線維変化による神経細胞死が一因とされている。一方で、アミロイド仮説に加えて、Alzの病態進展には高血圧症、脂質異常症、糖尿病などを起因として発症する心血管疾患との関連が強く示唆されており、これらの危険因子による血管内皮細胞 (EC) の障害がAlzの病因と密接に関連していることが分かってきた<sup>1)</sup>。すなわち、EC障害は血液脳関門や免疫応答制御の破綻を誘発するため、脳実質におけるAβの排出と代謝を低下させて周辺の神経組織に影響を及ぼすことから、EC機能の破綻こそがAlz病態形成の引き金となっている可能性が考えられている。そこで、Alzの早期発見とその予防には、種々のストレス刺激に対するECの機能変化を的確に評価する手法が必要であるが、医療現場で用いられているEC機能評価法であるFMD 検査 (Flow Mediated Dilation: 血流依存性血管拡張反応検査) やプレスチモグラフィでは、微細なEC機能変化を捉えることは難しく、さらなる開発が求められている<sup>2)</sup>。

これまでに我々は、ストレス暴露によるECの機能変化とその分子メカニズム解析を行ってきた。その過程で、継代培養を繰り返して老化ストレス負荷を与えたECをType I型EC、ヒトES細胞やヒトiPS細胞から作成した分化直後のECをType II型ECと定義して両者の特性の違いを比較検討した<sup>3)</sup>。血中診断マーカーとして注目されているNon-coding RNAに着目して‘解析した結果、Type I型EC (ストレス負荷EC) ではmicroRNA10b (miR10b) を含む数種のmicroRNA (miRNA) 発現が変動していた。興味深いことにmiR10bは小胞体エクソソームに内包されており、分泌されたエクソソ-

ームはType II型EC (低ストレスEC) に取り込まれるとmiR10bを誘導してType I型ECへ変性することが分かった。さらに、このエクソソームが周囲の血管平滑筋細胞に取り込まれると、TGFβ制御分子であるLTBP1 (Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1) を抑制してTGFβシグナルを低下させ、血管平滑筋細胞が過増殖して血管構造を変えることが明らかになった。これらの結果から、ECストレスに応答するエクソソームmiRNA発現量を評価することでType IとII型ECの区別が可能となり、ECの状態・機能変化のみならず適正な血管構造の評価に活用できるのではないかと考えられる。

miRNAは細胞や組織の他に血清、脳脊髄液、涙、尿などの体液から単離できる21-25塩基の1本鎖RNA分子であり、miRNAに相補的な配列を含むmessenger RNA (mRNA) の3'非翻訳領域を標的とすることによって標的遺伝子の転写後にタンパク質発現抑制を引き起こす<sup>4)</sup>。エクソソームに内包されたmiRNAは血清や脳脊髄液中においても安定であり、血液脳関門を通過することから末梢血から検出が可能である。そのためエクソソーム型miRNAは、がんなどの病態マーカーとして注目されており、エクソソームの分離や定量、診断に必要な標準化や治療法の開発など、その研究の進歩は目覚ましい<sup>5)</sup>。しかしながら、我々が見出したエクソソームmiR10bはECに対してどのような影響をもたらすのか、分子メカニズム解析が十分に進んでおらず、EC機能を評価する分子マーカーとして有用かどうか、未だ明らかになっていない。

一方で我々は、PC12細胞 (神経細胞特性をもつラット副腎髄質褐色腫) を用いて過酸化水素H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激 (酸化ストレス) による細胞応答に関する検討を行ってきた。PC12細胞では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激によって脳由来神経栄

養因子 (BDNF) 発現が低下し、その結果、アポトーシスが誘導される。その分子機序の一端としてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激によってmiR10bの発現が誘導され、miR10bがBDNF発現を抑制している可能性を見出した<sup>6)</sup>。これらのデータから、miR10bはストレス刺激によって変動する分子群の発現制御を行っている可能性が想定され、細胞のストレス刺激に対する抵抗性を制御する重要な因子ではないかと考えている。そこで本研究では、ECにおけるmiR10bの発現変動がEC機能に対してどのような影響をもたらすのか明らかにし、ストレス刺激によるEC機能変化を捕捉する分子マーカーとして有用なのか評価を行った。

## II. 方法

### 1、抗体・試薬

Goat polyclonal anti-VE-cadherin antibody (AF-938) はR&D社から、rabbit polyclonal anti-phospho-VE-cadherin (Tyr658) antibody (44-1144G) はThermo Fisher社から、mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody (AC-15) はSigma-Aldrich社から、rabbit monoclonal anti-BDNF antibody (ab108319) はabcam社から、それぞれ購入した。Trans-ferulic acid (FA) と Desferrioxamine (DFO) はSigma-Aldrich社から購入した。miRNA10b活性阻害にはSynthetic Tough Decoy (S-TuD, ジーンデザイン社) を用いた。配列は以下の通り。

Anti-miR10b:

5'-ACCAGAAUACAACCACAAAUUCGGU  
UCUACAGGGUACAAGAUGAUCCUAGCG  
CCGUC -3'

Cont-anti-miR:

5'-ACCAGAAUACAACUAUCGCGAGUAU  
CGACGUCGAGGCCCAAGAUGAUCCUAG  
CGCCGUC -3'

### 2、細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) はLonza社から購入し、専用培地EGM-2およびIWAKIコラーゲンType Iコートディッシュを用いて37°C、5% CO<sub>2</sub>に維持したインキュベーター内で培養した。チューブ形成能評価には、Corning社から購入したMatrigel<sup>®</sup>でコートしたディッシュを用いた。

### 3、レンチウイルスベクターの作成

レンチウイルスベクターはmiR10b配列をコードするcDNAをレンチウイルス発現ベクターに挿入することにより作成した。コントロールレンチウイルスは空ベクターから作成した。レンチウイルスは293T細胞で作成した。本研究における遺伝子組換え実験に関しては、広島国際大学遺伝子組換え実験等安全委員会にて承認済みである (責任者 中原正子 課題番号: 2022 -03)。

### 4、RNA抽出とqRT-PCR法

miRNAを含むtotal RNAはRNeasy micro kit (QIAGEN) を用いて説明書のとおり抽出した。miRNAの逆転写は、TaqMan<sup>™</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher) を用いた。miRNA10bの発現は、TaqMan<sup>™</sup>アッセイを使用し7300 real-time PCR system (Applied Biosystems) で解析した。内部コントロールにはTaqMan<sup>™</sup> microRNA Control Assay (RNU24)、またはmiRNA15aを用いた。

### 5、ウェスタンブロット法

細胞は、sodium dodecyl sulfate (SDS) と還元剤2-Mercaptoethanolを含む細胞溶解液を用いて溶解した後、95°C、5分間ボイルした。各サンプルはポリアクリルアミド電気泳動を行い、ニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare Life science) に転写した。その後、メンブレンは4°Cで一次抗体と一晩反応させた。翌日、二次抗体と反応させて、Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer) によって目的のタンパク質を検出した。

## 6、免疫染色法

HUVECは約9cm<sup>2</sup>カバーガラス上に1 x 10<sup>6</sup> cells播種してインキュベートした。翌日に細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.05% Triton X-100で透過処理し、1%BSAを含むPBS中に各抗体（希釈度 1 : 1000）で4℃で一晩処理した。次に二次抗体と反応させて、核をHoechst 33342 (Thermo Fisher) で染色した。細胞は蛍光顕微鏡（オリンパス）で観察した。

## 7、チューブ形成能評価

Matrigelでコートした48 wellマイクロプレートにHUVECを5 x 10<sup>3</sup> cells/well播種してインキュベートした。翌日に明視野倒立顕微鏡（オリンパス）で観察し、100倍の一視野中に認められるチューブ全長を測定することで定量評価した。

## 8、細胞増殖能評価

miR10bまたはコントロールレンチウイルス粒子を処理したHUVECは、96wellマイクロプレートに細胞数2.5 x 10<sup>3</sup> cells/well播種してインキュベートした。2日目にCell counting kit-8（同仁化学研究所）の試薬WST-8（2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium）を10μLずつ加えてインキュベートし、波長450nmの吸光度を測定した。またanti-miR10bまたはCont-anti-miRを処理したHUVECは、6wellプレートに細胞数1 x 10<sup>4</sup> cells/well播種してインキュベートし、3日目にwell内の細胞数を数えた。

## 9、放射線照射

MBR-1520R-3（日立）を使用し、<sup>60</sup>Co γ線源で、室温にて3日毎に5Gryを1回照射し、2週間培養を続けた。

## 10、統計解析

データは平均値±標準偏差SDで表した。2群の比較はt検定を行った。3群以上の検定は分散分析ANOVAによって解析し、有意な差が認められた場合、ポストホック検定

(Tukey検定)を行った。*p* < 0.05の場合を有意差ありとした。解析にはGraphPad Prism 9 statistical softwareを使用した。

## III. 結果

### 1、ECは酸化ストレスを受けるとmiR10bの発現が上昇する

HUVECに対して種々のストレス刺激を処理して、miR10bの発現量をqRT-PCR法で測定した。100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で刺激した細胞はコントロール（未処理）と比較してmiR10bが約1.5倍増加した（図1A）。また、低酸素刺激として250μM DFOで24時間刺激した細胞は、コントロールと比較してmiR10bが約1.3倍増加した（図1B）。2週間で3日毎に5 Gryの放射線照射した細胞は未照射のコントロールと比較してmiR10bが約5.9倍増加した（図1C）。30 mMグルコース

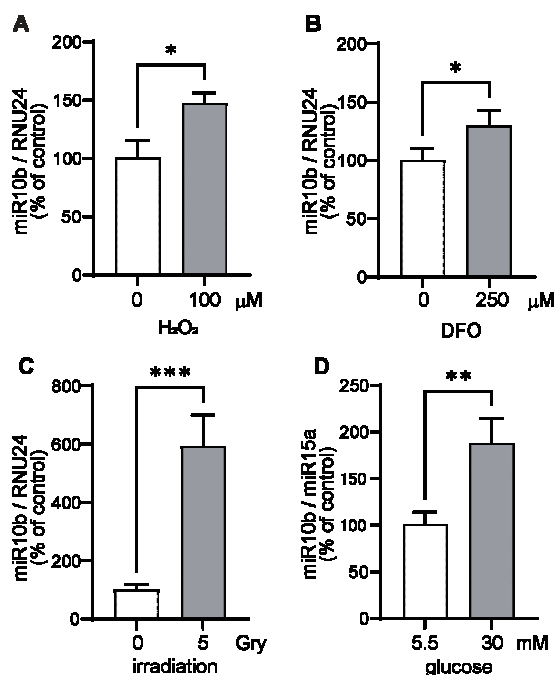


図1：miR10bは様々なストレス条件下でECから発現誘導される

HUVECを用いて様々なストレス条件下におけるmiR10b発現量をqRT-PCR法で解析した。各条件におけるコントロールのmiR10b発現量を100%とした。A: 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激を24時間行った。B: 250 μM DFO刺激を24時間行った。C: 3日毎に5 Gryの放射線照射を2週間行った。D: 高グルコース (30 mM) で24時間培養した。\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 vs. コントロール。

で8日間糖負荷した細胞は5.5 mMの通常培養液で培養した細胞と比較してmiR10bが約1.9倍増加した。なお、糖負荷した細胞は内在性コントロールであるRNU24の増加が認められたため、miRNA15aを用いた (図1D)。

## 2、miR10bはECチューブ形成能および増殖能を抑制する

ECに対するmiR10bの影響を評価するために、作成したmiR10b-レンチウイルスを用いて、miR10bをHUVECに過剰発現させた。感染させたレンチウイルスMOI = 5においてはmiR10bの発現がコントロールのHUVECと比して約6.0倍に上昇していることを確認した (図2A)。さらにmiR10bの

標的遺伝子として報告<sup>7)</sup>のあるBDNF (脳由来神経栄養因子; Brain-derived neurotrophic factor) のタンパク質量をウェスタンブロット法で測定したところ、コントロール (MOI = 0) と比較してMOI依存的に減少していた (図2B)。以上の結果から、miR10b-レンチウイルスによってmiR10bの発現が誘導され機能していることを確認した (図2A,B)。次に、miR10b強制発現条件におけるECのチューブ形成能を確認した。miR10b高発現ECはコントロールと比較し、ECがチューブを形成した総距離が57%となり、チューブ形成能が低下することが明らかとなった (図2C)。また、同様の細胞で細胞増殖能を比べたところ、miR10b高発現ECはコントロールECより増殖能が約50%低下していた (図2D)。逆に、miRNA10b阻害物質であるS-TuD (anti-miR10b) を添加した細胞はコントロール (Cont-anti-miR) と比較して、増殖能が増加していることが明らかになった (図2E)。

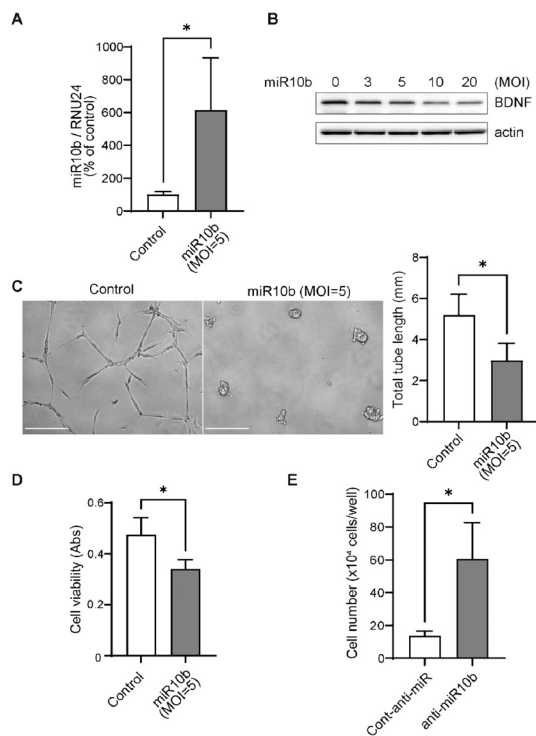


図2：miR10bはECの機能を変化させる

A,B: HUVECにコントロールまたはmiR10b-レンチウイルスを処理した。その後、miR10b発現の定量 (A)、およびBDNF発現 (B) をそれぞれ確認した。C: 一定面積中の全チューブ長を測定し、miR10b過剰発現ECとコントロールECのチューブ形成能を比較した。Scale bars: 100 μm。D: miR10b過剰発現ECとコントロールECの増殖能を細胞増殖アッセイによって評価した。E: 一定面積中におけるmiR10b機能阻害ECとコントロールECの細胞数を計測し、増殖能を評価した。\**p* < 0.05 vs. コントロール。

## 3、miR10bはVE-cad局在および発現量を制御する

miR10b-レンチウイルスをMOI=5でHUVECに導入し、VE Cadherin (VE-cad) の細胞局在を免疫染色法で確認した。コントロールECではVE-cadが細胞間接着部位に局在していたが、miR10b高発現ECでは細胞間接着部位に局在が認められず、核とその近傍にシグナルが観察された (図3A)。次に、ウェスタンブロット法でVE-cadのタンパク質発現量を観察すると、miR10b過剰発現ECではコントロール (MOI = 0) に比して発現が低下していることが明らかとなった (図3B)。さらに、ECの透過性や遊走能に影響を与えるVE-cadのアミノ酸Y658部位 (VE-cad-Y658) のリン酸化について検討した結果、miR10b細胞ではVE-cad-Y658のリン酸化が増加していることが明らかと

なった (図 3 B)。

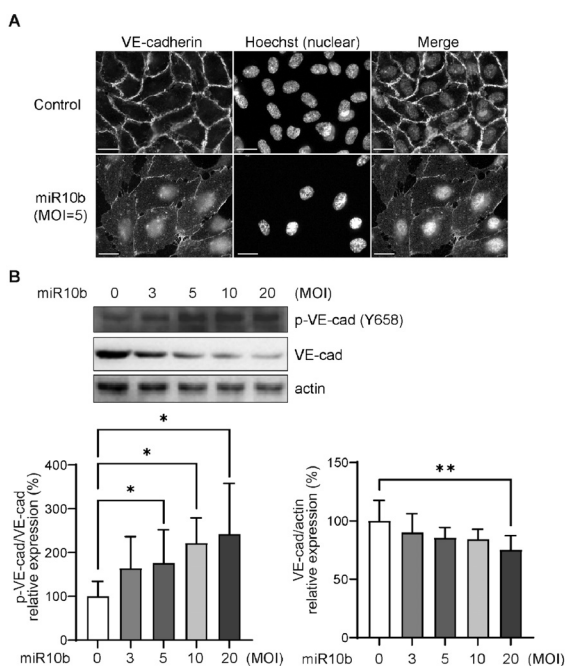


図3: miR10bはVE-cad発現量と局在を制御している

A: miR10b過剰発現ECとコントロールECのVE-cad局在を免疫染色法で確認した。細胞を抗VE-cad抗体で染色し、核をHoechstで標識した。Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ 。B: miR10b過剰発現ECとコントロールECのVE-cad-Y658のリン酸化発現量およびVE-cad発現量をウェスタンブロット法にて確認した。それぞれのバンドの濃さは、Image Jソフトウェアを使用して測定した。\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. コントロール。

#### 4、FAは酸化ストレスからECを保護し、miR10bの発現上昇を防ぐ

これまでに我々は、天然ポリフェノールであるフェルラ酸 (ferulic acid, FA) が miR10bの発現を抑制することを見出しており、その結果、FAが酸化ストレスによるPC12細胞のアポトーシスを減弱させることを報告している<sup>6)</sup>。そこで、HUVECにおけるFAの効果を調べるため、40  $\mu\text{M}$  FAを16時間処理し、500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ で30分間細胞を培養した。 $\text{H}_2\text{O}_2$ 刺激によるアポトーシス細胞は、アネキシンV-FITCによって評価した。 $\text{H}_2\text{O}_2$ 処理により、コントロールと比較してHUVECのアポトーシスが顕著に誘導された。対照的に、FAで細胞を前処理すると、 $\text{H}_2\text{O}_2$ によって誘導されるアポトーシスが有意に低下した (図 4 A)。さらにFAの酸化ス

トレス保護作用にmiR10bが影響しているか調べるため、40  $\mu\text{M}$  FAを24時間処理し、25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ で24時間培養した。miR10bは $\text{H}_2\text{O}_2$ によって発現誘導されるが、FAはその発現上昇を抑制していた (図 4 B)。FAの効果は、低酸素誘導剤であるDFO刺激で誘導されたmiR10bの誘導も抑制することが明らかとなった (図 4 C)。

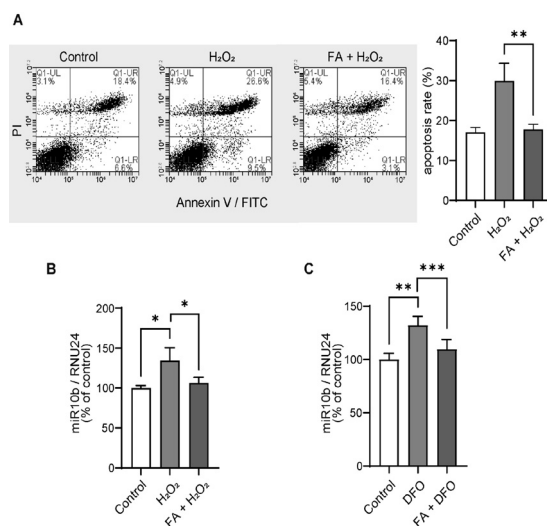


図4: FAはECにおけるmiR10b発現誘導を抑制する

A: 酸化ストレスによるアポトーシスを評価した。FA (40  $\mu\text{M}$ ) で一晩前処理し、その後 $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ) をFAの非存在下または存在下で細胞をさらに30分間培養した。細胞をAnnexin V-FITC/PIで染色し、フローサイトメトリーでアポトーシス細胞を検出した。B,C: FAを24時間処理または未処理の細胞にB:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25  $\mu\text{M}$ )、C: DFO (250  $\mu\text{M}$ ) で刺激し24時間培養した。未処理ECのmiR10bの発現量を100%としてqRT-PCR法で比較した。\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. コントロール。

#### IV. 考察

これまでに我々は、ECの老化・変性に連動して変化する分子の同定と解析を行っており、ECのストレス状態や機能を客観的に評価できる血清マーカーの探索を行ってきた。その過程で、ストレス負荷を与えたType I型ECと、ヒトES細胞やiPS細胞から作成した分化直後のType II型ECの特性の違いを比較検討し、両者を区別するマーカーとしてECストレス応答性エクソソームmiR10bを同定している。本研究では、ECにおけるmiR10bの生理的あるいはストレス

環境時の役割を明らかにするため、miR10bの発現変化によってEC機能にどのような影響をもたらすのか検討を行った。

まずは、HUVECに種々のストレスを負荷して、miR10bの発現変化を検討した。その結果、活性酸素種の一つであるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、低酸素を誘発するDFO、放射線照射、高グルコースなどのストレスをそれぞれ負荷すると、HUVECにおいてmiR10bの発現が上昇することが明らかとなった（図1）。すなわち、miR10bは様々なストレスに応答してECで発現誘導されており、ECに対するストレス状態を鋭敏に捉えることができると考えられる。一方で、本検討ではエクソソーム分離して内包されたmiR10bを測定していないため、今後は培地内に遊離したエクソソームにおける発現解析が必要と考える。

次にmiR10bとEC機能の関係について解析した。miR10b過剰発現ECではチューブ形成能および細胞増殖能が有意に低下していた（図2 C,D）。一方で、S-TuDを用いてmiR10bの機能を阻害すると、細胞増殖能が上昇することから（図2 E）、miR10b発現量とEC機能が逆相関していることが示唆された。これまでに、ラット脳神経細胞<sup>8)</sup> やヤギ顆粒膜細胞<sup>9)</sup> では、miR10bが発現制御する標的遺伝子としてBDNFが報告されている。BDNFはECにおいて増殖シグナルであるAktのリン酸化を引き起こし細胞増殖や血管新生を促進する<sup>10)</sup>。本研究結果から、HUVECにおいてもmiR10bがBDNFのタンパク質発現を低下させることから（図2 B）、miR10bはBDNFの発現抑制を介してチューブ形成能や細胞増殖能の低下を引き起こしたことが推察される。

安定な血管構造を維持するためには、ECによる血管透過性の制御が極めて重要であり、この制御機構の破綻が様々な疾患の発症と密接に関連している。そこで、細胞間接着に重要なVE-cadの局在を観察したとこ

ろ、miR10b過剰発現ECではVE-cadの細胞間接着構造における局在が観察されず、細胞間に多くの間隙が形成されていた（図3 A）。さらに、miR10bはVE-cadタンパク質発現も抑制しており、VE-cadの発現量と局在制御に重要な分子であることが分かった（図3 B）。一方で、VE-cad-Y658のリン酸化は、下流のRho GTPaseであるRac1の活性化に関与しており、ECの細胞間接着の制御や安定化に重要とされている<sup>11)</sup>。miR10b過剰発現ECでは、VE-cad-Y658のリン酸化が亢進していたことから（図3 B）、miR10bはVE-cadを介した細胞接着に関わる下流シグナルの制御にも関与する可能性が明らかとなった。以上の結果から、ECではストレス刺激に応答して上昇したmiR10bによって、EC機能制御に重要な分子であるBDNFやVE-cadの発現や機能・質的变化が誘導され、その結果、EC機能の破綻に繋がっている可能性が示唆された。

これまでに我々は、植物由来天然ポリフェノールであるFAが、酸化ストレスに対する細胞保護作用を有していることを報告している<sup>6)</sup>。FAは米など植物の細胞壁に含まれ、抗炎症作用、抗菌作用、抗がん作用など様々な用途に用いられている。また、FAは他のフェノール酸よりも体内に吸収されやすく、半減期が長いことから認知症予防の非薬物療法その他、化粧品など幅広く使われている<sup>12)</sup>。本研究結果から、FAはECにおいてもストレス刺激（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>やDFO）に対する細胞保護効果を示しており、その分子機序としてFAがmiR10b発現誘導を阻害することが明らかとなった（図4）。すなわち、FAによるmiR10b発現制御法を確立することにより、ストレス刺激によって障害されたECの機能を改善・適正化する手法の開発が可能であると考えられる。そのためには、FAがどのようにmiR10bの発現上昇を抑制しているか、今後さらなる解析が必要である。

以上の結果より、種々のストレス刺激によるEC機能変化の分子機序の一端としてmiR10bが関わっていることが明らかとなった。今後は発展的研究として、Alz病態形成に伴うEC機能変化とmiR10bの発現量の相関を解析することにより、これまで捉えることが困難であったAlzの初期段階におけるEC障害を検知するマーカーの開発に繋がる可能性がある。既存のAlzバイオマーカーは、臨床症状（記憶・行動障害など）に基づいて開発されているため、Alz早期予防の観点からは課題が残る。仮にmiR10bがストレス応答性エクソソームとして分泌されるのであれば、血清マーカーとして簡易的にモニターすることが可能となり、Alzの早期発見と予防対策に極めて有用な検査法開発に繋がると考えられる。

## V. 謝辞

レンチウイルスベクターは愛媛大学 学術支援センターのご協力で作成しました。論文作成にご協力頂いたことに厚く御礼申し上げます。

## VI. 参考文献

- 1) Hayashi S., Sato N., Yamamoto A., *et al.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1909-1915, 2009.
- 2) Le Brocq M., Leslie S. J., Milliken P., *et al.* *Antioxid Redox Signal* 10:1631-1674, 2008.
- 3) Nakahara M., Kobayashi N., Oka M., *et al.* *Int J of Inf Res and Rev* 611:146-150, 2022.
- 4) Lee R. C., Feinbaum R. L., and Ambros V.: *Cell* 75:843-854, 1993.
- 5) Yang D., Zhang W., Zhang H., *et al.* *Theranostics* 10:3684-3707, 2020.
- 6) Nakayama H., Nakahara M., Matsugi E., *et al.* *Molecules* 26:2020.
- 7) Varendi K., Kumar A., H?rma M. A., *et al.* *Cell Mol Life Sci* 71:4443-4456, 2014.
- 8) Wang L., Liu W., Zhang Y., *et al.* *Mol Cell Biochem* 469:41-51, 2020.
- 9) Peng J. Y., An X. P., Fang F., *et al.* *Domest Anim Endocrinol* 54:60-67, 2016.
- 10) Usui T., Naruo A., Okada M., *et al.* *Acta Physiol (Oxf)* 211:385-394, 2014.
- 11) Hatanaka K., Simons M., and Murakami M.: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H162-172, 2011.
- 12) Tee-ngam P., Nunant N., Rattanarat P., *et al.* *Sensors (Basel)* 13:13039-13053, 2013.