



Title	細胞外小胞の産生を制御する活性天然物の探索とその制御機構の解明
Author(s)	林, 健宇
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105571
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (林 健 宇)

論文題名

細胞外小胞の産生を制御する活性天然物の探索とその制御機構の解明

論文内容の要旨

細胞外小胞 (Extracellular vesicle, EV) は、細胞から分泌される膜構造を持つ小胞であり、核酸やタンパク質などの情報伝達分子を内包し、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている。特に幹細胞由来EVは、炎症抑制、組織修復促進、細胞老化の抑制など、多様な生理活性を示すことが報告されており、美容医療分野ではアンチエイジング医薬部外品としての応用が進められている。一方で、EVに内包される分子とその生理機能との関連は十分に解明されておらず、製品としての機能を担保する品質管理指標や分析評価系の確立が困難であるなど、産業利用には多くの課題が残されている。このような背景から、低分子化合物を利用して皮膚または皮膚関連組織の幹細胞からのEV産生量を増加させることは、これらの課題を回避しつつアンチエイジング効果を示させる有効な手段と考えられる。そこで著者は、皮膚機能の制御に関与する脂肪由来間葉系幹細胞 (ADMSC) を対象に、EV産生を促進する活性天然物の探索を実施した。さらに、見出した化合物についてアンチエイジング素材としての有用性を検証するとともに、その作用機序の解明および標的分子の同定を行った。

探索研究の一次評価には、EVマーカータンパク質であるCD63をルシフェラーゼ融合タンパク質として発現するヒト大腸がん細胞HT29を用い、培養上清中のルシフェラーゼ活性を指標として活性化合物の探索を行った。二次評価では、ヒトADMSCを用い、化合物処理によって実際にEV産生量が増加するか否かをELISA法により検証した。その結果、オレアナン型トリテルペンサポニンであるLucyoside H(1)、Chikusetsusaponin IVa(2)、IV(3)およびV(4)が、細胞毒性を示さない濃度でヒトADMSCからのEV産生を促進することを見出した。また、化合物1-4とそのアグリコンであるOleanolic acid(5)との比較から、本活性の発現には配糖体構造が必須であり、3位に単糖、かつウロン酸であることが活性に正の影響をもたらす知見を得た。

次に、オレアナン型トリテルペンサポニンのアンチエイジング素材としての有用性を、化合物2を用いて検証した。具体的には、化合物2で処理したADMSCの培養上清から分離したEV含有画分が、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) のコラーゲン産生、エラスチン産生、ならびにMMP-1の発現に与える影響を、化合物未処理群由来のEV含有画分と比較した。その結果、化合物2で処理したADMSCの培養上清から分離したEV含有画分は、NHDFのコラーゲンおよびエラスチン産生を有意に増加させ、MMP-1の発現を抑制することが明らかとなった。以上の結果より、オレアナン型トリテルペンサポニンはアンチエイジング素材として有用であることが示された。

そこで、オレアナン型トリテルペンサポニンの作用機序について解析を行った。まず、フローサイトメトリー解析の結果から、化合物2で処理したADMSC由来のEV粒子数は未処理群と比較して増加し、EV粒子あたりのテトラスパンニン (CD63およびCD81) の発現量に変化はないことを明らかにした。次に、EV生合成機構またはその前駆体 (MVB) の分解機構に対する化合物2の影響を調査した。その結果、化合物2処理によってTSG101、CHMP4B、Flotillin 1といったEV生合成因子の発現量に変化は認められなかった。一方で、細胞内CD63量の増加が確認され、さらにオートファジー活性の指標であるAutophagic fluxは、化合物2処理によって低下することが明らかとなった。これらの結果から、化合物2はオートファジー活性を抑制することによりMVBの分解を低下させ、その結果としてEV産生量を増加させることが明らかとなった。さらに、活性化合物がサポニンであることから、その標的分子が細胞膜表面に存在するか、あるいは細胞内に存在するのかを、化合物3の膜透過性を評価することで調査した。ADMSCに化合物3を添加し、経時的に細胞破砕物を調製後、それに含有される化合物3を定量した。その結果、化合物3の検出量が時間依存的に増加することが観測された。この結果から、オレアナン型トリテルペンサポニンの一部は細胞内へ移行する可能性があり、標的分子解析においては細胞内分子も考慮する必要があることが明らかとなった。

そこで次に、オレアナン型トリテルペンサポニンのEV産生促進作用に関与する責任分子の同定を目的として、光親和性ラベリング法により解析を行った。すなわち、構造中にアルキンと光親和性基ジアジリンとを有する化合物3の光親和性プローブを設計、合成した。次に、これとADMSCの細胞破砕液を混合後、紫外線照射によって標的分子と共有結合させ、プローブにクリック反応でストレプトアビジンビーズに固定化したビオチンリンカーを導入した。そして、

磁気沈降によって得られたストレプトアビジンビーズに含まれるタンパク質をSDS-PAGE後に銀染色で観察した。その結果、標的分子候補のタンパク質のバンドを見出すことに成功した。

本研究は、オレアナン型トリテルペンサポニンが、脂肪由来間葉系幹細胞（ADMSC）のEV産生を促進する新規アンチエイジング素材として有用であることを初めて明らかにしただけではなく、その作用機序がオートファジー抑制を介したEV前駆体の分解低下に起因することも明らかにしている。これらの知見は未解明な点の多いEV研究領域やEVに関連する創薬を含む薬学研究に広く貢献するものである。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (林 健 宇)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	荒井 雅吉
	副 査	教授	小 比 賀 聡
	副 査	招へい教授	藤田 郁尚

論文審査の結果の要旨

細胞外小胞 (Extracellular vesicle, EV) は、細胞から分泌される膜構造を有する小胞であり、核酸やタンパク質などの情報伝達分子を内包し、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている。特に幹細胞由来EVは、炎症抑制、組織修復促進、細胞老化の抑制など多様な生理活性を示すことが報告されており、美容医療分野ではアンチエイジング医薬部外品としての応用が進められている。しかしながら、EVに内包される分子とその生理機能との関連は未だ十分に解明されておらず、製品としての機能を担保する品質管理指標や分析評価系の確立が困難であるなど、産業利用には多くの課題が残されている。このことから、低分子化合物を利用して皮膚または皮膚関連組織の幹細胞からのEV産生量を増加させることは、これらの課題を回避しつつアンチエイジング効果を付与する有効な手段になり得ると考えられる。このような背景のもと、林 健 宇 氏は、皮膚機能の制御に関与するヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (ADMSC) を対象として、EV産生を促進する活性天然物の探索を実施した。さらに、見出した化合物についてアンチエイジング素材としての有用性を検証するとともに、その作用機序の解明および標的分子の同定を目的として研究を展開した。

具体的には、オレアナン型トリテルペンサポニンであるLucyoside H (1)、Chikusetsusaponin IVa (2)、IV (3) およびV (4) が、細胞毒性を示さない濃度においてヒトADMSCからのEV産生を促進することを見出した。さらに、化合物 1-4とそのアグリコンであるOleanolic acid (5) との比較検討から、本活性の発現には配糖体構造が必須であり、3位に単糖、かつウロン酸を有することが活性に正の影響を与えるという構造活性相関に関する重要な知見を得た。続いて、オレアナン型トリテルペンサポニンのアンチエイジング素材としての有用性を評価したところ、化合物2で処理したADMSCの培養上清から分離したEV含有画分が、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) におけるコラーゲンおよびエラスチン産生を有意に増加させるとともに、MMP-1の発現を抑制することを明らかにした。さらに本研究では、オレアナン型トリテルペンサポニンの作用機序について詳細な解析を行った。まず、フローサイトメトリー解析の結果から、化合物2で処理したADMSC由来EVの粒子数は未処理群と比較して増加していた一方、EV粒子あたりのテトラスパニン (CD63 およびCD81) の発現量には変化がないことを示した。また、細胞内CD63量の増加が確認され、加えてオートファジー活性の指標であるAutophagic fluxが化合物2処理によって低下することが明らかとなった。これらの結果は、化合物2がオートファジー活性を抑制することで多胞体 (MVB) の分解を抑え、その結果としてEV産生量を増加させることを示唆するものである。さらに、EV産生促進作用に関与する責任分子の同定を目的として、光親和性ラベリング法を用いた解析を実施した。すなわち、構造中にアルキン基および光親和性基ジアジリンを導入した化合物3由来の光親和性プローブを用いて、これをADMSC細胞破碎液と混合した後、紫外線照射により標的分子と共有結合させた。続いてクリック反応を用いてストレプトアビジンビーズに固定化したビオチンリンカーを導入し、標的分子の捕捉を試みた。そして、標的分子候補として40 kDaおよび60 kDaのタンパク質を見出した。以上の結果より、本研究は、オレアナン型トリテルペンサポニンが脂肪由来間葉系幹細胞 (ADMSC) のEV産生を促進する新規アンチエイジング素材として有用であることを初めて明らかにしたのみならず、その作用機序がオートファジー抑制を介したEV前駆体の分解低下に起因することを示した点において学術的意義が高い。

以上、本研究はEV研究領域の理解を深化させるとともに、EV関連創薬を含む薬学研究の発展に寄与する重要な成果を示したことにより、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。