

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07401

研究課題名(和文)血管内皮細胞における血栓形成促進因子VWFの極性的分泌機構に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the mechanism of polarized secretion of the hemostatic factor VWF in vascular endothelial cells.

研究代表者

山崎 泰男 (Yamazaki, Yasuo)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：30308621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血液は平時には流動性を保ちつつ、血管の損傷時には直ちに凝固しうる。すなわち流動性と凝固能という一見対照的な特性を併せ持つことで、合理的な全身循環系を形成している。血管内皮細胞は血管の内腔を覆う一群の細胞である。止血因子von Willebrand因子は血管内皮細胞で産生される。合成されたVWFは、止血に備えるため血管内皮細胞内に適切に貯蔵される必要がある。本研究課題では、血管内皮細胞におけるvon Willebrand因子の貯蔵機構を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、細胞内の微小酸性環境を形成する因子が、その貯蔵に寄与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

止血因子von Willebrand因子は止血反応に不可欠である。何らかの原因でvon Willebrand因子が機能しなくなると、von Willebrand病と呼ばれる血液凝固異常症を発症する。本研究の成果は、von Willebrand因子そのものが正常でも、その貯蔵機構に異常が生じるとvon Willebrand病になる可能性があることを示している。本研究課題により、これまで原因が不明であったvon Willebrand病の原因究明に貢献できる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Hemostasis is essential to maintain the functional blood circulation; blood is required to clot in response to vascular damage to stop bleeding. Vascular endothelial cells are thin-layered cells covering luminal surface of the blood vessel. von Willebrand factor, a hemostatic protein, is produced in endothelial cells. It forms large homomeric multimers that are stored in specialized organelles called Weibel-Palade bodies. In this supported project, we studied a mechanism how the maturation and storage of von Willebrand factor is regulated in vascular endothelial cells. We found that a factor producing a local acidic environment contributes for the storage of von Willebrand factor in Weibel-Palade bodies.

研究分野：血栓止血学

キーワード：オルガネラ形成 微小酸性環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液は、平時にはその流動性を維持しつつ、血管の損傷時などには即時に凝固しうる。すなわち血液循環系は、流動性と止血能という対極的な特性を併せ持つことで、合理的な循環機能を形成している。血管内皮細胞は血管の内腔を覆う単層の細胞群である。止血タンパク質 von Willebrand 因子 (VWF) は血管内皮細胞で産生される (図 1)。VWF は 2,313 残基の一本鎖タンパク質として小胞体で合成されると、直ちに C 末端領域をジスルフィド結合で架橋したダイマーへと変換され、ゴルジ体へと輸送される。ゴルジ体では、次いで N 末端領域のジスルフィド結合の架橋によって巨大なマルチマーへと変換される。VWF マルチマーは、Weibel-Palade 小体 (WPB) と呼ばれる単膜のオルガネラに、準結晶性の構造体 (VWF tubule と呼ばれる) として高密度に貯蔵される。ヒスタミンなどの分泌刺激によって、貯蔵された VWF マルチマーが血中へと放出されると、VWF strings と呼ばれるマルチマー鎖が互いに絡み合った超構造体を形成する。VWF strings は血小板を局所に粘着することで止血する。このように複合的な合成・貯蔵プロセスを経ることで、VWF は止血タンパク質として成熟する。

2. 研究の目的

WPB はゴルジ体から生じるオルガネラであり、生理的には血管内皮細胞にのみ含まれる。VWF は複合的なプロセスを経て WPB に貯蔵される。VWF のマルチマー化および tubule 化には酸性環境が必要であることが *in vitro* の再構成実験で示されているが、細胞内で反応に適した酸性環境が形成されるメカニズムは全く不明である。VWF マルチマーは高分子ほど止血能が高い。すなわち VWF の成熟化および貯蔵プロセスは、VWF の止血機能に不可欠である。本研究課題は VWF の成熟化および貯蔵機構を明らかにするため、特に酸性環境の形成機構に注目し研究を行った。

3. 研究の方法

本研究課題では、VWF 分子のマルチマーへの成熟化および WPB の形成能を指標として、血管内皮細胞の有する止血機能の形成機構について研究した。VWF マルチマーは、SDS-アガロースゲル電気泳動により、そのサイズおよび構成について定量的に解析した。WPB の形成能は、臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC の蛍光免疫染色を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。得られた画像は解析ソフトを用いて定量的に解析し評価した。

4. 研究成果

(1) 臍帯静脈内皮細胞 HUVEC における WPB の形成

本研究には臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用いた。できるだけ生理的な条件下で実験を行うために、はじめに WPB の形成能を指標に培養条件の検討を行った。血管内皮細胞は、細胞間に細胞接着を形成することで、血液を血管外の環境から隔離している。培養細胞を用いた蛍光免疫染色では、個々の細胞を観察しやすくするために一般的に細胞密度は高くしない。そのような条件で WPB を観察すると (抗 VWF 抗体による免疫染色)、個々の細胞間で VWF の発現量は異なり、WPB の形成が観察されない細胞も散見された。一方、フィブロネクチンコート上で HUVEC を 5-7 日間培養すると、細胞は単層の敷石状になる。この条件では細胞間には細胞接着マーカー (ZO-1, VE-Cadherin, PECAM1) が認められ、全ての細胞に WPB の形成が観察された。WPB の形成には後者の条件が適していると考え、以降の実験は当該の条件で行った。

(2) 臍帯静脈内皮細胞 HUVEC への遺伝子導入

血管内皮細胞は遺伝子導入の難しい細胞であることから、遺伝子導入方法について検討した。培養条件の場合と同様に、細胞接着マーカーおよび WPB の形成能を指標として、導入試薬の影響を評価した。その結果、試みた全てのリポフェクション試薬およびエレクトロポレーションは、HUVEC の細胞接着を著しく阻害し、WPB の形成能にも影響を与えることが判明した。そこで、より細胞への影響が少ないと予想される組換えレンチウイルスによる遺伝子導入を試みた。組換えレンチウイルスによる EGFP の発現は、非発現細胞と比較して細胞接着マーカーおよび WPB の形成に影響を与えなかった。したがって以降の遺伝子導入には組換えレンチウイルス発現系を用いた。

(3) WPB 内腔の酸性環境の機能的な重要性

WPB 内腔は pH 5.4 とリソソームに次いで酸性度が高い。WPB に貯蔵されている VWF マルチマーは血液中への分泌の過程で、大きな pH 変化 (5.4 → 7.4) に暴露される (図 1)。この pH 変化により高密度にパッケージングされた VWF マルチマーは細胞上に VWF strings を形成し、血小板を粘着する。WPB の酸性環境の機能的な重要性を調べるため、HUVEC を塩化アンモニウムで処理した後、ヒスタミン刺激に

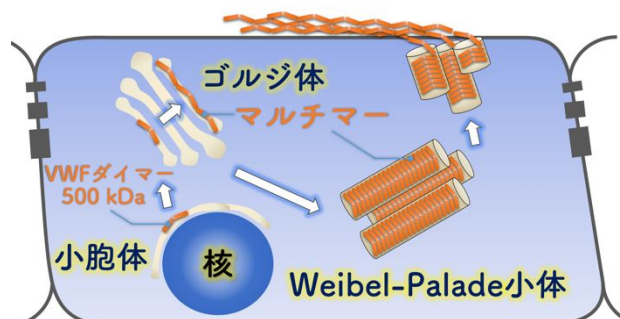


図 1. VWF の合成と分泌

よって VWF 分泌を惹起した。塩化アンモニウムは中性域においては分子形を保つことで脂質膜を通過しうるが、酸性環境に至るとイオン化によりアンモニウムイオンを生じ酸性環境を中和化する。コントロールの HUVEC をヒスタミン処理すると、細胞表面には VWF strings の形成が明瞭に観察される。一方、塩化アンモニウムで前処理した細胞では VWF マルチマーの分泌は未処理の HUVEC と同程度に起こるものの、形成される VWF strings は貧弱であった。すなわち WPB 内腔の酸性環境は適正な VWF strings の形成に不可欠であると考えられた。

(4) プロトンポンプ Vascular H⁺-ATPase は WPB の酸性環境の形成因子である

それでは WPB の酸性環境はどのように形成・維持されているのであろうか？プロトンポンプの一つ Vascular H⁺-ATPase (V-ATPase) は、リソソームなどの酸性オルガネラ膜に局在し、プロトンをも細胞内に汲み入れることで、その酸性環境を形成している。そこで V-ATPase の化学阻害剤 Bafilomycin A1 および Concanamycin A のヒスタミンによる VWF strings の形成に対する影響を調べた。その結果、いずれの V-ATPase 阻害剤で前処理した場合も、VWF マルチマーの分泌量には影響はほとんど見られなかったが、形成される VWF strings は貧弱であった。すなわち塩化アンモニウム処理と同様の影響が見られたことから、V-ATPase は WPB の酸性環境を形成する因子であると考えられた。

(5) VWF の恒常分泌に対する V-ATPase の関与

ヒスタミン刺激などによる誘導的な分泌に加えて、VWF マルチマーは WPB およびゴルジ体から、低レベルではあるが恒常的に分泌される(図1)。これにより血液中の VWF マルチマー量を維持して、即時の止血に備えていると考えられている。そこで V-ATPase が VWF の恒常的な分泌にも関与しているかについて調べた。未処理の細胞から分泌される VWF マルチマーは、ヒスタミン刺激により分泌されるマルチマーに比べて分泌量は少なく、マルチマーサイズも小さい。Bafilomycin A1 および Concanamycin A で前処理すると、単位時間あたりの分泌量は未処理の場合と変わらないものの、分泌される VWF のマルチマー構成には明瞭な違いが見られた。V-ATPase を阻害すると、HUVEC からは VWF ダイマーが選択的に分泌された。塩化アンモニウム前処理によっても同様の現象が見られたことから、V-ATPase によって形成される酸性環境が VWF のマルチマー化に寄与していると考えられた。V-ATPase の阻害によって生じる VWF ダイマーの選択的な分泌は Brefeldin A 処理によって消失した。したがってその分泌は WPB からではなく、ゴルジ体から生じていると考えられた。これらの結果から、V-ATPase はゴルジ体付近にも存在し、VWF のマルチマー化に寄与していると考えられた。

(6) HUVEC における V-ATPase の細胞内分布

V-ATPase は、少なくとも 13 種の異なるサブユニットから構成されるタンパク質複合体である。HUVEC における V-ATPase の細胞内分布について調べる目的で、EGFP タグを付加した各サブユニットを強制発現した。その結果、V0a サブユニットのアイソフォームに興味深い局在が観察された。V0a サブユニットには遺伝子の異なるアイソフォームが存在する。そのうち V0a1 は細胞辺縁部に存在する WPB に局在していたが、核近傍の WPB には局在が観察されなかった。一方、V0a2 は核近傍の WPB にのみ局在が観察された。WPB はゴルジ体から生じるオルガネラで、その成熟化に伴い細胞辺縁部に輸送されることを考えると、V0a2 はゴルジ体で新たに生じた WPB に局在し、V0a1 は成熟した WPB に局在していると考えられた。実際に、超解像顕微鏡で V0a2 の詳細な局在を調べると、トランスゴルジ網から出芽していると考えられる WPB に明瞭な局在していた(図2)。ライブセルイメージングにより、ゴルジ体近傍を観察すると、V0a2 はゴルジ体から出芽する新たに形成された WPB に局在していた。

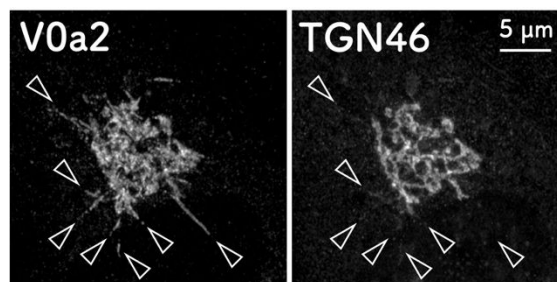


図2. V0a2 はトランスゴルジ網から出芽する新生 WPB に局在する

< 引用文献 >

- Nightingale T, Cutler D, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013, 11, 192–201.
- Mourik M, Eikenboom J., Hämostaseologie, 2017, 37, 13–24
- Zhou YF, Eng ET, Nishida N, Lu C, Walz T, Springer TA, EMBO Journal, 2011, 30, 4098–4111.
- Dang LT, Purvis AR, Huang RH, Westfield LA, Sadler JE, Journal of Biological Chemistry, 2011, 286, 25763–25769.
- Huang RH, Wang Y, Roth R, Purvis AR, Heuser JE, Egelman EH, Sadler JE, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105, 482–487.
- Collins MP, Forgac M, BBA – Biomembranes, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 山崎 泰男	4. 巻 89
2. 論文標題 トランスサイトーシスによるWinglessシグナルの活性化と膜型ユビキチンリガーゼGodzillaによる制御	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 735 ~ 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山崎 泰男	4. 巻 28
2. 論文標題 細胞膜リン脂質のスクランブルと血液凝固	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本血栓止血学会誌	6. 最初と最後の頁 421 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.28.421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎泰男
2. 発表標題 von Willebrand因子の分泌におけるエンドソームの関与
3. 学会等名 第40回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎泰男
2. 発表標題 プロトンポンプV-ATPaseはvon Willebrand因子の細胞内貯蔵オルガネラであるWeibel-Palade小体に局在する
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	小亀 浩市 (Kokame Koichi) (40270730)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	