

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08829

研究課題名(和文)好中球SiglecへのVWFとADAMTS13の結合を介したNETs形成調節機構

研究課題名(英文)Regulation of NETs formation by VWF and ADAMTS13 binding to neutrophil Siglecs

研究代表者

秋山 正志 (AKIYAMA, Masashi)

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：30298179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトSiglec全15種をそれぞれHEK293細胞に発現させADAMTS13、von Willebrand factor (VWF)のエンドサイトーシスを調べたところ、ADAMTS13とVWFはSiglec-5/14に加えて、新たにADAMTS13はSiglec-9によって、VWFはSiglec-6/9によってもエンドサイトーシスされることを見出した。Siglec-5/14によるADAMTS13のエンドサイトーシスはシアル酸との結合が阻害されるR119A変異体でも起こり、シアル酸非依存的であると考えられた。エンドサイトーシスにはN末端のV-setドメインが必要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに同定されたSiglecリガンドは主に白血球膜上に存在し、各種白血球におけるシス・トランスシグナル伝達に関与すると考えられてきた。その中でSiglec-5/14は例外的にVWFや血液凝固第8因子、ADAMTS13といった血栓形成に関わる細胞内遊離タンパク質が同定されている。これらのSiglec取り込み機構の詳細はこれまで不明だったが、V-setドメインが重要であることを示した。好中球に高発現しているSiglec-5/14がリガンドとの相互作用を介して免疫血栓形成に影響することが報告されている。新たに同定されたりガンドが免疫血栓形成への影響の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have expressed all 15 human Siglecs on HEK293 cells, respectively and examined endocytosis of ADAMTS13 and von Willebrand factor (VWF). We found that Siglec-5/9/14 and Siglec-5/6/9/14-expressing cells endocytosed ADAMTS13 and VWF, respectively. Endocytosis of ADAMTS13 was sialic acids (SA)-independent because ADAMTS13 was endocytosed by Siglec-5/14 R119A mutants-expressing cells in which binding to SA was inhibited. Exchange of extracellular domains of Siglec-14 with those of Siglec-3 showed that N-terminal V-set domain of was required for endocytosis of ADAMTS13. We also found that plasminogen was endocytosed by some Siglec-expressing cells.

研究分野：血栓止血学

キーワード：Siglec ADAMTS13 VWF

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ADAMTS13は肝星細胞で産生され血中に分泌されるメタロプロテアーゼで、同定されている唯一の基質は von Willebrand factor (VWF) である。超巨大 VWF マルチマーには血小板が接着能が高く血小板を活性化し血栓形成を促進する。そのため ADAMTS13 による VWF の切断は適度な血栓能の維持に重要で、ADAMTS13 活性の先天性(遺伝的)もしくは中和抗体出現による後天的(免疫原性)の欠失は国指定の難病である重篤な血栓症である血栓性血小板減少性紫斑病の病因となる。ADAMTS13 の血漿中濃度はおよそ 1  $\mu\text{g/mL}$  (5 nM) で、半減期は2 - 3日とされている。近年 ADAMTS13 のクリアランスにマクロファージに発現するスカベンジャー受容体の CD163 が関与していることが報告された。我々は VWF と同様に、ADAMTS13 のクリアランスにも複数の受容体が関与している可能性を考えた。VWF および VWF と血中で複合体を形成している凝固第8因子のクリアランスは Siglec-5 の関与が報告されている。Siglec は血球上に存在するシアル酸受容体として同定された一回膜貫通型タンパク質で、ヒトでは 15 遺伝子 (Siglec-1~16、13 は欠番) からなるファミリーを形成している(図1)。細胞内領域に ITIM と呼ばれるモチーフを持つ免疫機能抑制型 Siglec とアダプタータンパク質との結合を介して免疫機能を活性化する Siglec が存在する(図1)。Siglec のリガンドも白血球膜上に発現し、Siglec とリガンドの結合は白血球の免疫機能を調節すると考えられている。遊離タンパク質である VWF と凝固第8因子がリガンドの Siglec-5/14 は例外といえる。我々は複数の Siglec を細胞上に発現させ ADAMTS13 の細胞内への取り込みを調べた結果、Siglec-5 および Siglec-14 が ADAMTS13 を取り込むことを見出した。

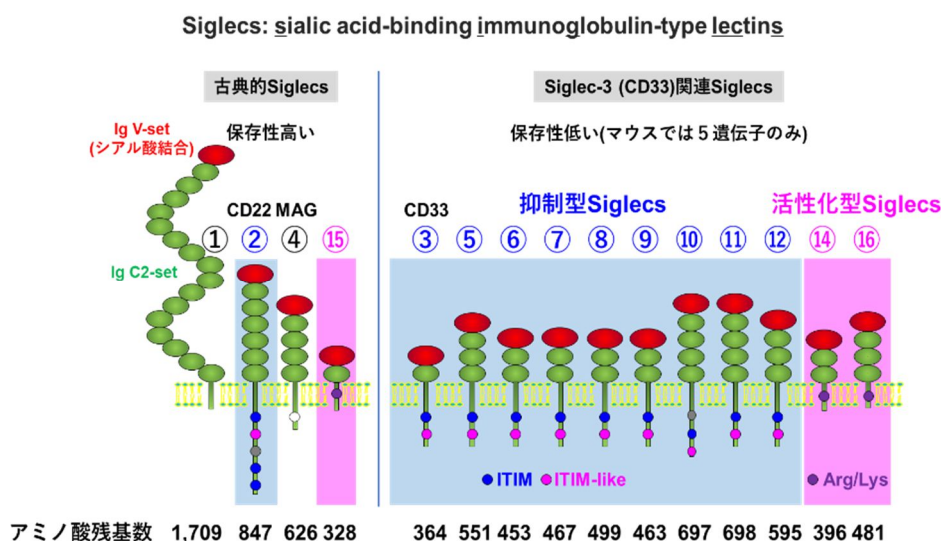


図1. ヒト Siglec ファミリー

### 2. 研究の目的

ヒトの 15 種すべての Siglec の発現細胞における、三種の遊離血栓形成関与タンパク質、ADAMTS13、VWF、プラスミノゲン (PLG) のエンドサイトーシスを調べた。Siglec-5/14 による ADAMTS13 のエンドサイトーシスのシアル酸依存性、エンドサイトーシスに必要なドメインの同定を試みた。

### 3. 研究の方法

ヒト白血球もしくは白血球株 THP-1 および HL-60 mRNA から Siglec 遺伝子の全長 cDNA を RT-PCR により増幅し、IRES を介して EGF と共発現するベクターに挿入した。発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションして一過性発現により Siglec と EGFP を共発現させた。細胞の培養培地を無血清培地に交換後、蛍光標識した VWF、ADAMTS13 の N 末端側メタロプロテアーゼからスペーサードメインまでの領域 (MDTCS)、PLG をそれぞれ加え、37°C で1時間培養後固定し、EGFP 陽性の Siglec 発現細胞における細胞内取り込みを蛍光顕微鏡で観察した。また、N末端側に HA タグを付加した Siglec-5/14 の発現ベクターをもとに、様々な変異体の発現プラスミドを作成し、上記と同様の手法で変異体発現細胞内への ADAMTS13 の取り込みへの変異の影響を調べた。

### 4. 研究成果

(1) 15 遺伝子からなるヒトのすべての Siglec の発現細胞における ADAMTS13 MDTCS、VWF、PLG の取り込みを調べた(図2)。緑が EGFP 陽性 Siglec 発現細胞を、赤が細胞内に取り込まれた MDTCS、VWF、PLG をそれぞれ示す。ADAMTS13 および VWF は Siglec-5/14 に加えて、Siglec-9 および Siglec-6/9 発現細胞にもそれぞれ取り込まれることが分かった。また、PLG も Siglec-5/6/9/14 発現細胞に取り込まれることが分かった。PLG の取り込みは Siglec-14 発現細胞で顕著に高かった。



Siglec-14 遺伝子上流には PLG 遺伝子領域周辺以外で唯一血中 PLG 量に影響を及ぼす SNP がゲノムワイド関連解析により複数同定されており、PLG のクリアランスへの Siglec-14 の関与が推測された。

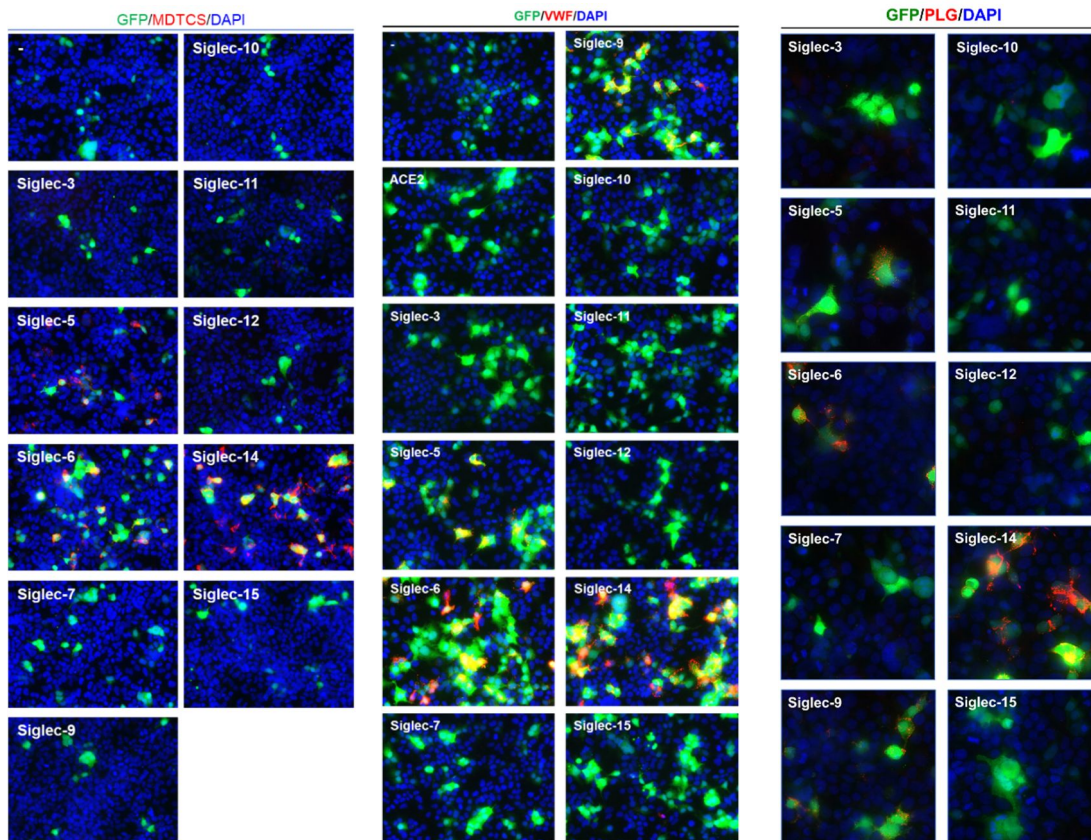


図2. 各 Siglec 発現細胞 (緑色) における MDTCS、VWF、PLG の取り込み (赤) (スペースの都合上一部 Siglec を省略した)

(2) Siglec-5/14 による ADAMTS13 MDTCS の取り込みにおけるシアル酸依存性を調べるためにシアル酸への結合に必須である N 末端側 V-set ドメイン内の Arg119 に変異を導入 (R119A) して、シアル酸との結合が阻害された Siglec-5/14 変異体の発現細胞での MDTCS の取り込みを調べたところ、野生型と同様に取り込まれた。このことから、ADAMTS13 は細胞外 HSP70 などと同様にシアル酸非依存的に Siglec-5/14 に結合し細胞内に取り込まれると推測された。また、Siglec-5 は細胞内領域に存在する 2 つのモチーフ ITIM および ITIM-like 内のチロシン残基のリン酸化を介して SHP-1 および SHP-2 を動員し、免疫反応を抑制する。そこで ITIM 内の Tyr520 および ITIM-like 内の Tyr544 を置換した Siglec-5 変異体 (Y520A, Y520F および Y544A, Y544F) また、二重変異体 (Y520A/Y544A および Y520F/Y544F) を作成して発現させ、蛍光 ADAMTS13 の細胞内への取り込みを観察した。その結果、Y544A および Y544F 変異体では野生型同様の細胞内での蛍光が、Y520A、Y520F、Y520A/Y544A および Y520F/Y544F 変異体では野生型に比べ著しく高い蛍光が観察された (図3)。

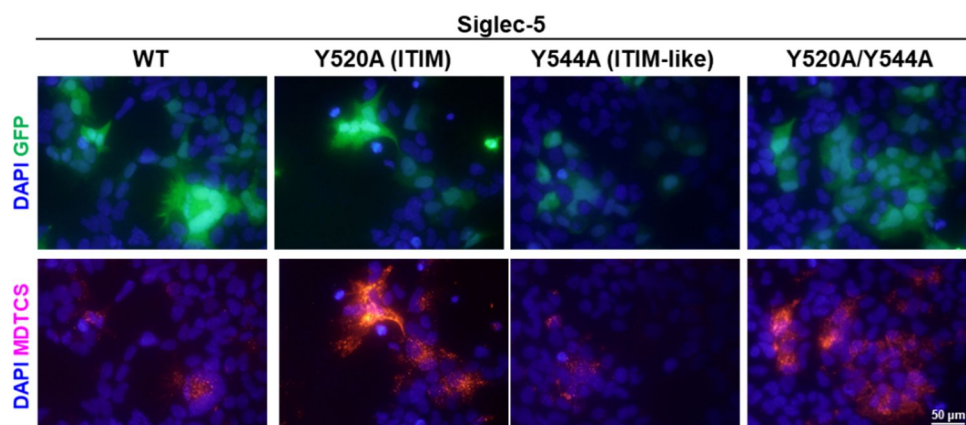


図3. Siglec-5 の ITIM および ITIM-like の 2 つのモチーフの Tyr 残基の変異の取り込みへの影響

(3) Siglec-14 による ADAMTS13 MDTCS 取り込みに必要なドメインを明らかにするために、Siglec-14 の N 末端側の V-set ドメインとそれに続く C2-set ドメインの片方もしくは両方を Siglec-3 の相同ドメインと置換した変異体を HEK293 細胞に発現させて、MDTCS の取り込みを上記の方法で調べたところ、V-set ドメインもしくは V-set と C2-set ドメイン両方を Siglec-3 のものに置換した変異体では取り込みが見られなかった一方、C2-set ドメインのみを Siglec-3 のものに置換した変異体では取り込まれた(図4)。この結果から、Siglec-14 の MDTCS の取り込みには V-set ドメインが必要であることが示された。

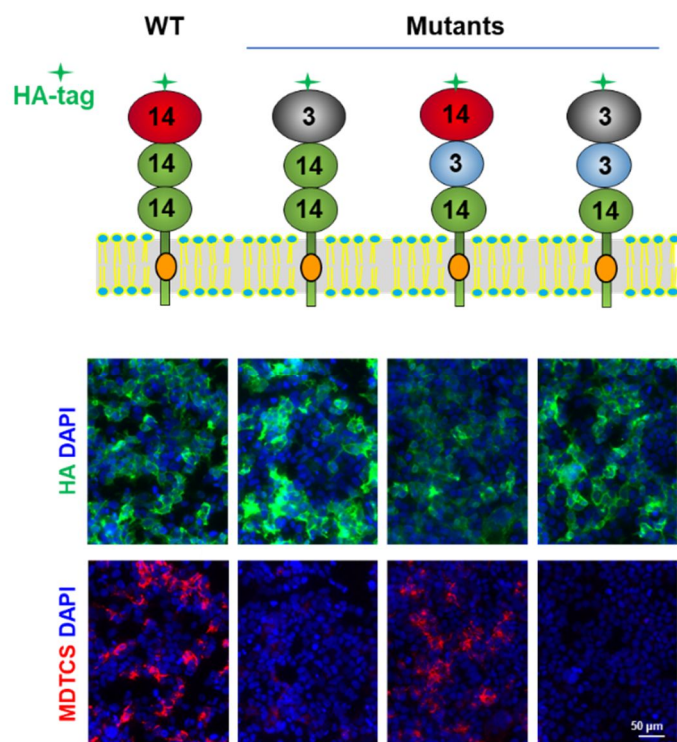


図4 . Siglec-14 の N 末端側 V-set ドメインと C2-set ドメインの Siglec-3 相同ドメイン交換変異体発現細胞 (緑) における MDTCS の取り込み (赤)

(4) さらに、V-set ドメイン全体もしくは V-set ドメインの N 末端側欠失変異体発現細胞においても MDTCS は取り込まれなかったことから、V-set ドメインの N 末端側が MDTCS の取り込みに必要であることが分かった。そこで V-set ドメインの N 末端側の様々なループ領域や溝に対応する残基の変異体を作成して取り込みを観察したが、いずれの変異体にも取り込まれ、領域を絞り込むことはできなかった(図5)。この結果から別の領域もしくは複数の領域を介して MDTCS の取り込みが媒介される可能性が示唆された。

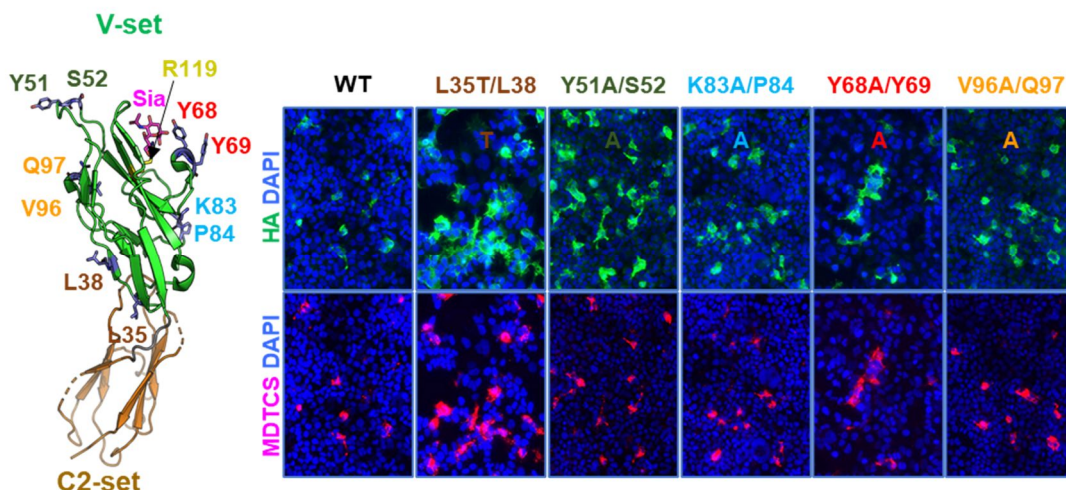


図5 . Siglec-14 の V-set ドメイン内の様々な変異体の発現細胞 (緑) における MDTCS の取り込み (赤)

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ono Shiro, Matsui Hideto, Noda Masashi, Kasuda Shogo, Yada Noritaka, Yoshimoto Kiyomi, Akiyama Masashi, Miyata Toshiyuki, Sugimoto Mitsuhiro, Nishio Kenji	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional regulation of von Willebrand factor ameliorates acute ischemia-reperfusion kidney injury in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51013-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 秋山正志、小亀浩市	4. 巻 9(3)
2. 論文標題 ADAMTS13 の構造変化と機能発現	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis Medicine	6. 最初と最後の頁 12-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋山正志、樋口（江浦）由佳、小亀浩市
2. 発表標題 新規ADAMTS13クリアランス受容体SIGLEC5およびSIGLEC14の機能解析
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三島優一、秋山正志、小亀浩市
2. 発表標題 肝星細胞におけるADAMTS13の遺伝子発現調節
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋山正志、樋口（江浦）由佳、小亀浩市
2. 発表標題 ADAMTS13クリアランス受容体としてのSIGLEC5の同定と機能解析
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

1. 発表者名 武田壮一、秋山正志、荒木聡彦、小亀浩市、James Pearson
2. 発表標題 シェディング酵素ADAMファミリープロテアーゼの成熟化とプロドメインによる活性制御の構造基盤
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

1. 発表者名 秋山正志、樋口（江浦）由佳、小亀浩市
2. 発表標題 新規ADAMTS13クリアランス受容体SIGLEC5およびSIGLEC14の機能解析
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三島優一、秋山正志、小亀浩市
2. 発表標題 肝星細胞におけるADAMTS13の遺伝子発現調節
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋山正志、小亀浩市
2. 発表標題 ADAMTS13およびVWFのエンドサイトーシスに関わるSiglecsの機能解析
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teena Bhakuni, Masashi Akiyama, Koichi Kokame
2. 発表標題 Protein S attenuates high glucose-induced damage in blood-brain barrier endothelial cells.
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/etiology/akiyama.html">http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/etiology/akiyama.html</a>
---

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
研究分担者	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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------