

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21523

研究課題名(和文)物理刺激(乱流)によるタンパク質分泌機構とその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Mechanism of protein secretion by physical stimuli (turbulent) and its physiological significance

研究代表者

西 英一郎 (Nishi, Eiichiro)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：30362528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：圧力、ずり応力、温度などの物理的刺激は、生体内で時間空間的に変化し、様々な恒常性維持に関わっていることが推測される。我々は乱流刺激によりiPS細胞由来巨核球(imMKCL)からナルディライジン(NRDC)分泌が誘導され、NRDCがペプチダーゼ活性依存性に血小板産生を誘導することを明らかにした(Cell 2018)。本研究は、乱流によって誘導される「NRDC分泌」と「血小板産生」の因果関係、ペプチダーゼ活性が寄与する機序を明らかにするため、NRDC欠損imMKCL、巨核球特異的NRDC欠損マウス、ペプチダーゼ不活性型Nrdcノックインマウスの作製を試み、血小板産生などを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内の細胞は、常に温度や圧力などの物理的刺激を受けています。これらの刺激を感知する受容体の発見に対して、2021年にノーベル医学生理学賞が授与されましたが、物理的刺激の生理病理学的役割はまだよくわかっていません。私たちは、物理的刺激のひとつである乱流が、NRDCというタンパク質の分泌を増やし、その結果血小板の産生が増えることを見出しました。本研究は、そのくわしいしくみを明らかにし、ひいては血小板減少症の治療につなげることを目的に行いました。

研究成果の概要(英文)：Physical stimuli such as pressure, shear stress, and temperature are spatiotemporally regulated in vivo and are presumably involved in various homeostasis. We have shown that turbulent induces nardilylin (NRDC) secretion from iPS cell-derived megakaryocytes (imMKCL) and that NRDCs induce platelet production in a peptidase activity-dependent manner (Cell 2018). To clarify the causal relationship between turbulent-induced NRDC secretion and platelet production and the mechanism by which the peptidase activity contributes, we have generated NRDC-deficient imMKCL, megakaryocyte-specific NRDC-deficient mice and peptidase-inactive Nrdc knock-in mice, and examined the process of platelet production.

研究分野：病態医化学 薬理学 内科学

キーワード：ナルディライジン 物理刺激 タンパク質分泌 血小板 ペプチダーゼ

1. 研究開始当初の背景

生体内において、あらゆる細胞は隣接する細胞、細胞外基質、血液を含む細胞外液などから物理的的刺激を受けている。物理的刺激には圧力、張力、せん断(ずり)応力、浸透圧や温度などが含まれ、これらが時間空間的に変化することが生体の恒常性維持、逆に疾患発症にも関わっていることは容易に想像できる。物理的刺激が細胞内に伝達され遺伝子発現調節につながる経路(メカノトランスダクション)はある程度解明されているが、同刺激によって特定のタンパク質分泌が誘導される現象やその分子機構についてはよくわかっていない。最近我々は、乱流(動きが不規則に絶えず変動している乱れた状態の流体)が iPS 細胞由来巨核球(imMKCL)からの血小板産生を促進することを明らかにした。また乱流刺激によりナルディライジン(nardilysin, NRDC)、IGFBP2、MIFなどの分泌が誘導されるが mRNA レベルの変化は伴わないこと、NRDC 分泌は乱流強度に比例して増加し、分泌した NRDC が血小板産生を正に制御していることが明らかになった。NRDC はペプチダーゼ活性を有するが、酵素活性欠損変異体 NRDC (NRDC-E>A)には血小板産生誘導作用を認めなかったことから、NRDC が酵素活性依存性に血小板産生に寄与していることが示唆された(Cell 2018)。NRDC は典型的シグナルペプチドを有さないリーダーレスタンパク質であり、いわゆる unconventional 経路を介して分泌される。応募者は増殖因子 HB-EGF の共役受容体として NRDC を同定(EMBO J, 2001)して以来、本分子が細胞内外で異なる活性を持つ多機能分子であることとともに、細胞種依存性にいくつかの刺激(ホルボールエステル、1刺激など)が NRDC 分泌を誘導することを示してきたが(JBC2006, Nat Commun 2014 など)、巨核球における乱流ほど強く NRDC 分泌が誘導された例はなかった。

2. 研究の目的

本研究においては、1) 乱流によって誘導される「NRDC 分泌」と「血小板産生」という2つの事象の因果関係、2) ペプチダーゼ活性がいかに血小板産生に寄与するのか、を明らかにすることを目的として遂行した。

3. 研究の方法

1) NRDC 欠損 imMKCL の作製および解析: CRISPR-Cas9 システムを用いて NRDC 欠損 imMKCL を作製し、1. 乱流(VerMES bioreactor を用いて発生させる)による血小板産生を対照巨核球と比較。2. NRDC 欠損 imMKCL の培地に NRDC リコンビナントタンパク質を加えて血小板産生を検討。NRDC 添加で血小板産生が誘導されれば、細胞外 NRDC のみで血小板産生が誘導されることの証明となる。血小板産生が誘導できない場合は、細胞内 NRDC あるいは NRDC の細胞内から外への移動(分泌)が必要だと解釈できる。

2) imMKCL 由来リポソームによる検討: 1)-2) で細胞外 NRDC による血小板産生が確認できた場合、imMKCL 由来リポソームに NRDC タンパク質(対照: NRDC-E>A)を添加し、脂質 2 重膜の切断活性を検討。

3) プロテオミクスによる imMKCL 細胞表面基質タンパク質同定: 野生型 imMKCL あるいは NRDC 欠損 imMKCL を、A. NRDC タンパク質、B. NRDC-E>A タンパク質で処理後に、膜タンパク質分画を回収。Terminal amine isotopic labeling of substrates (TAILS)法、C-TAILS 法を用いて、A、B サンプルのタンパク質 N 末、C 末を質量分析で網羅的に解析する(研究協力者 Oded kleifeld: Nat Biotechnol. 2010;28:281-8.)。血小板産生が NRDC 酵素活性に依存したことから、A サンプルのみで切断されているペプチド末端の情報から、細胞表面における NRDC の基質膜タンパク質を同定する。さらに NRDC-E>A タンパク質に付けたタグで免疫沈降して共沈する膜タンパク質を質量分析で同定し、基質候補と重複するものを最優先候補基質とする。

4) 生体での血小板産生における巨核球 NRDC の役割: Pf4-Cre マウスと Nrdc flox/flox マウスを交配し、巨核球特異的 Nrdc 欠損マウス (Pf4-Nrdc-CKO) を作製し、血小板数などを検討する。

5) 生体での血小板産生における NRDC 酵素活性の役割: 酵素活性欠失型 NRDC ノックインマウス (Nrdc E>A KI) を作製し、血小板数などを検討する。

4. 研究成果

1) NRDC 欠損 imMKCL の作製および解析:

2) imMKCL 由来リポソームによる検討：

3) プロテオミクスによる imMKCL 細胞表面基質タンパク質同定：

については、多施設との共同研究を含むため、現段階で未発表データについて言及することはできない。

4) 生体での血小板産生における巨核球 NRDC の役割：巨核球特異的 *Nrdc* 欠損マウス (Pf4-*Nrdc*-CKO) を作製し、解析を行った。予想に反して、Pf4-*Nrdc*-CKO の血小板数は正常であったため、マウス骨髄から巨核球を単離し、NRDC の発現量を mRNA レベルで検討したところ、野生型巨核球と比較して 4 割程度の発現低下に留まっていた。そこで全身性 *Nrdc* 欠損マウスのヘテロマウスと交配し Pf4-*Nrdc*-CKO : *Nrdc*^{+/-} を得て、巨核球における NRDC の発現量を野生型マウスと比較したところ、NRDC 発現量は 1 割程度まで減少していた。抗 NRDC 抗体を用いた組織染色においても、巨核球における NRDC の明らかな発現低下を確認できた。しかしながら、Pf4-*Nrdc*-CKO : *Nrdc*^{+/-} においても末梢血中の血小板数に有意な減少を認めなかった。以上から、巨核球特異的に NRDC をノックアウトしても、static な状況下では、他の細胞から分泌される NRDC による代償機構が働くことで血小板数には問題ないと考察した。現在、血小板産生が亢進する状況(抗 CD41 抗体による血小板除去後の回復過程)での検討を進めている。

5) 生体での血小板産生における NRDC 酵素活性の役割：ジーンターゲット法にて酵素活性欠失型 NRDC ノックインマウス (*Nrdc* E>A KI) のホモ接合体を得ることに成功したが、遺伝背景が C57B6 では生後 2 日以内に全て死亡することが明らかとなった。成体血球系の解析を可能にするため、全身性 NRDC 欠損マウス (*Nrdc*^{-/-}) での経験を生かし、ICR マウスと戻し交配を 6 世代行ったところ、一定数の成体 *Nrdc* E>A KI/KI を得ることに成功した。予備的検討において、明らかな末梢血血小板数の減少は認めていないが、今後さらなる検討を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Li Shu-Yang, Yoshida Yoichi, 他6名, Ohno Mikiko, Nishi Eiichiro, 他16名, Iwadata Yasuo, Hiwasa Takaki	4. 巻 46
2. 論文標題 Association between serum anti-ASXL2 antibody levels and acute ischemic stroke, acute myocardial infarction, diabetes mellitus, chronic kidney disease and digestive organ cancer, and their possible association with atherosclerosis and hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1274-1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijmm.2020.4690	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 Yoshida Yoichi, Zhang Xiao-Meng, 他19名, Nishi Eiichiro, Ohno Mikiko, Takemoto Minoru, Yokote Koutaro, Kitamura Kenichiro, Iwadata Yasuo, Hiwasa Takaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Elevated levels of autoantibodies against DNAJC2 in sera of patients with atherosclerotic diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e04661 ~ e04661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e04661	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 Sumazaki Makoto, Shimada Hideaki, 他15名, Ohno Mikiko, Nishi Eiichiro, 他12名, Zhang Xiao Meng, Wang Hao, Goto Ken ichiro, Hiwasa Takaki	4. 巻 111
2. 論文標題 Serum anti LRPAP1 is a common biomarker for digestive organ cancers and atherosclerotic diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4453 ~ 4464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14652	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 Iwasaki Hirotaka, Ichihara Yoshinori, Morino Katsutaro, Lemecha Mengistu, Sugawara Lucia, Sawano Tatsuya, Miake Junichiro, Sakurai Hidetoshi, Nishi Eiichiro, Maegawa Hiroshi, Imamura Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 MicroRNA-494-3p inhibits formation of fast oxidative muscle fibres by targeting E1A-binding protein p300 in human-induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80742-y	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 Yasuda Daisuke, Hiraoka Yoshinori, Ohno Mikiko, Nishi Kiyoto, Iwasaki Hirotaka, Kita Toru, Nishi Eiichiro, Kume Noriaki	4. 巻 44
2. 論文標題 Deficiency of Nardilysin in the Liver Reduces Serum Cholesterol Levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 363 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00722	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 -

1. 著者名 Hiwasa Takaki, Wang Hao, Goto Ken-ichiro, 他, Ohno Mikiko, Nishi Eiichiro, 他, Iwadate Yasuo	4. 巻 19
2. 論文標題 Serum anti-DIDO1, anti-CPSF2, and anti-FOXJ2 antibodies as predictive risk markers for acute ischemic stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12916-021-02001-9	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 -

1. 著者名 Nishimura Kimihiro, Fujita Yukihiro, Ida Shogo, Yanagimachi Tsuyoshi, Ohashi Natsuko, Nishi Kiyoto, Nishida Atsushi, Iwasaki Yasumasa, Morino Katsutarō, Ugi Satoshi, Nishi Eiichiro, Andoh Akira, Maegawa Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Glycaemia and body weight are regulated by sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) expression via O-GlcNAcylation in the intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101458 ~ 101458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2022.101458	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 -

1. 著者名 Saijo Sayaka, Ohno Mikiko, Iwasaki Hirotaka, Matsuda Shintaro, Nishi Kiyoto, Hiraoka Yoshinori, Ide Natsuki, Kimura Takeshi, Nishi Eiichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Nardilysin in adipocytes regulates UCP1 expression and body temperature homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-07379-x	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Niizuma S, Matsuda S, Iwasaki H, Kimura K, and Nishi E
2. 発表標題 Nardilysin controls cardiac sympathetic innervation patterning through regulation of p75 neurotrophin receptor
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ohno M, Matsuura H., Makiyama T., Nishi K., Iwasaki H., Matsuda S., Kita T., Kimura T., and Nishi E.
2. 発表標題 Metalloprotease nardilysin controls heart rate through the transcriptional regulation of ion channels critical for sinus automaticity
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田真太郎、西清人、大野美紀子、西英一郎
2. 発表標題 Nardilysin in Adipocyte Regulates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Sensitivity
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasukawa D, Miyake T, Tani M, Nishi E
2. 発表標題 Nardilysin in resected tissue may predict a post-operative prognosis of pancreatic cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野美紀子、西 清人、平岡 義範、新妻 晋一郎、岩崎 広高、松田 真太郎、木村 剛、西 英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンはp75NTRの調節を介して心臓交感神経分布パターンを調節する
3. 学会等名 第30回日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Niizuma S, Matsuda S, Iwasaki H, Kimura K, and Nishi E
2. 発表標題 Nardilysin controls cardiac sympathetic innervation patterning through regulation of p75 neurotrophin receptor.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田真太郎、岩崎広高、大野美紀子、西英一郎
2. 発表標題 脂肪細胞のNardilysinは脂肪組織の酸素需要およびインスリン感受性を制御する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野 美紀子, 松浦 博, 牧山 武, 糀谷 泰彦, 西 清人, 岩崎 広高, 松田 真太郎, 木村 剛, 西 英一郎
2. 発表標題 多機能プロテアーゼによる心拍数制御機構
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡義範、古市真唯、鎌田真由子、斉藤沙樹、久米典昭、吉種光、深田吉孝、池田正明、西英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンによる核内受容体ROR/REV-ERB活性調節機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茶谷元晴、茶谷元晴、藤井貴之、藤堂景史、大野美紀子、西清人、平田多佳子、安藤朗、西英一郎
2. 発表標題 TおよびB細胞のナルディライジンによる抗体産生調節機構の解明
3. 学会等名 第26回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西清人、岩崎広高、松田真太郎、松田真太郎、大野美紀子、西英一郎
2. 発表標題 肝細胞のナルディライジンは褐色脂肪組織の熱産生を制御する
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohno M, Matsuura H, Makiyama T, Nishi K, Iwasaki T, Matsuda S, Kita T, Kimura T, and Nishi E.
2. 発表標題 Metalloprotease nardilysin controls heart rate through the transcriptional regulation of ion channels critical for sinus automaticity
3. 学会等名 第31回日本循環薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西 清人、西 英一郎、Rong Tian
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸代謝産物によるピルビン酸代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田真太郎、岩崎広高、西 清人、大野美紀子、西英一郎
2. 発表標題 脂肪細胞のNardilysinは細胞における酸素需要および低酸素誘導因子(HIF1-)シグナルを介してインスリン感受性を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡義範、古市真唯、村瀬満政、久米典昭、吉種光、深田吉孝、池田正明、西英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンによる核内受容体ROR/REV-ERB活性調節機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohno M, Shiomi H, Yano M, Aizawa T, Nakano Y, Yamagami S, Kato M, Ohya M, Chen P-M, Nagao K, Ando K, Kadota K, Yokomatsu T, Inada T, Kurokawa M, Morimoto T, Kimura T, Nishi E
2. 発表標題 Nardilysin is a Potential Biomarker for the Early Diagnosis of Non-St-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome, A Multicenter Prospective Cohort Study, Nardi-ACS Study
3. 学会等名 American Heart Association 's annual Scientific Sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:101名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 598
3. 書名 創薬研究者・アカデミア研究者が知っておくべき最新の免疫学とその応用技術	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許	発明者 西 英一郎 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-129627	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

滋賀医科大学 薬理学講座 ホームページ http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/index.html
--

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
研究協力者	クライフェルド (Kleifeld Oded)	テクニオン イスラエル工科大学・Faculty of Biology・Assistant Professor	

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
---------	---------