

令和 3 年 10 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05552

研究課題名(和文) 栓球細胞の放出する細胞外小胞が係わる止血制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of hemostasis control mechanism involving extracellular vesicles released by amphibian thrombocytes

研究代表者

杉本 健吉 (Sugimoto, Kenkichi)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：20240765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類以外の脊椎動物は、哺乳類にはない栓球細胞をもちますが、その特性の多くは不明でした。今回、栓球細胞が血小板と同じ分子(CD41)を発現する直径100nm程の細胞外小胞(EVs)を産生している事を明らかにしました。このCD41陽性EVsは様々な種類のマイクロRNAを含んでおり、これらCD41陽性EVsは内皮細胞や貪食細胞に取り込まれ、血管新生遺伝子の発現に関わっていました。栓球細胞の産生するCD41陽性EVsは、損傷した血管を修復する内皮細胞の増殖を支持するマイクロRNA運搬体として機能していたのです。これは、哺乳類の血小板にもあるマイクロRNAが血管修復にかかわる可能性を示唆するものです。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海外を含めてこれまで両生類栓球細胞株は樹立されていませんでした。今回、栓球細胞株を樹立することにより初めて、栓球細胞がCD41陽性細胞外小胞を産生すること、この中のマイクロRNAを特定すること、またこのマイクロRNAが内皮細胞の増殖制御に関わるといった機能を明らかにすることが出来ました。マイクロRNAのデータを比較すると、哺乳類血小板にも同じようなマイクロRNAが存在するため、これらのマイクロRNAは進化的に保存されてきた生理機能制御に関わる重要なマイクロRNAである事が判ります。これは我々ヒトを含めた哺乳類血小板がもつマイクロRNAを、血管新生制御に利用出来る可能性を示唆するものです。

研究成果の概要(英文)：Many detailed characteristics of thrombocytes remain unclear. Here, we report the finding that thrombocytes produce integrin alpha IIb (CD41)-positive extracellular vesicles (EVs), which include microRNAs (miRs). FCM analysis revealed the expression of CD41+ on the surface of EVs. Nanotracking analysis demonstrated that these CD41+ EVs were approximately 100 nm in diameter. Microarray analysis revealed that the CD41+ EVs contain many kinds of miRs. These CD41+ EVs were phagocytosed by endothelial cells and macrophages. qPCR analysis revealed that many angiogenesis-related genes were upregulated in CD41+ EV-treated endothelial cells. These results indicated that thrombocytes produced CD41+ EVs, including miRs, that were received by endothelial cells to induce the expression of angiogenesis-related genes. These results indicated that the CD41+ EVs produced from thrombocytes act as signaling molecules to repair damaged blood vessels.

研究分野：細胞生物学, 分子生物学, 血液学

キーワード：栓球細胞 細胞外小胞 CD41 マイクロRNA 血管内皮細胞 マイクロアレイ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の血液中に存在する血小板(Platelets)は、巨核球細胞(Megakaryocytes)が産生する細胞成分である。これに対して哺乳類以外の脊椎動物の血液中には血小板は存在せず、代わりに栓球細胞(thrombocyte)が存在することが知られているが、この細胞の性状は詳しく判っていない。CD41(インテグリン $\alpha$ IIb)は哺乳類の巨核球系細胞特異的な細胞表面分子で血小板表面にも発現している。一方、近年多くの細胞が細胞外小胞(Extracellular vesicles; EVs)を産生、分泌する事が判ってきており、この中にはタンパク質、mRNAそしてmicroRNA(miRs)と呼ばれる短いRNA鎖が含まれることが判ってきており、血小板中にも多くのmiRsが含まれていることが報告されている。申請者は、アマガエルの長期骨髄培養から、これまで報告されていないユニークな栓球細胞株(FUHEN細胞)を樹立し(Sugimoto, 2015)、この細胞が微粒子を産生していることを見つけた。そこでこの細胞を使って、この細胞が産生する微粒子の性状を解明することを目指した。

### 2. 研究の目的

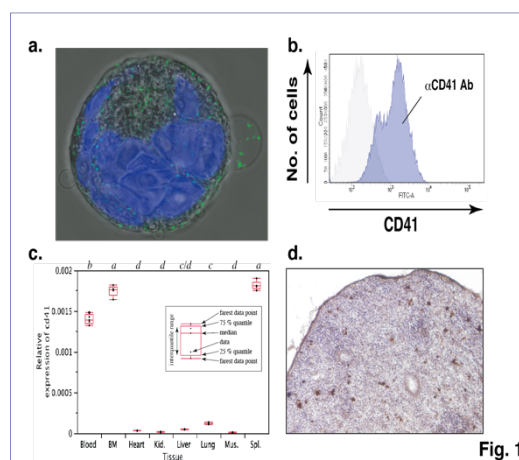
1) 栓球細胞が産生する粒子が、CD41を発現する細胞外微粒子(EVs)であるかを解明すると共に、他の両生類でも共通にCD41分子を発現するEVsを産生しているかを明らかにし、共通性を見いだす。2) このEVsの中にマイクロRNAが存在するかを明らかにする。3) このmiRsを含むEVsがシグナルのキャリアーであるかを確認する。

### 3. 研究の方法

1) アマガエルインテグリン $\alpha$ IIb(CD41)遺伝子の完全長をクローニングし(Accession No. LC027976)、ペプチド配列に基づいてペプチド抗体を作製した。同様にゼノパスのCD41分子に対するペプチド抗体を作製し、実験に用いた。これらの抗体は適宜FITCで蛍光標識して共焦点顕微鏡観察やFCM(フローサイトメトリー)解析に用いた。2) EVは、超遠心法により精製し、適宜PS(ホスファチジルセリン)が結合したマグネットビーズ等を用いて解析した。3) 電子顕微鏡による細胞、及び粒子の写真撮影、ナノトラッキングシステムによる微粒子のサイズ解析、EV中のマイクロRNAの解析は、専門業者に依頼した。4) EV刺激した細胞に於ける遺伝子発現解析はqPCRにより行った。5) マイクロRNA過剰発現内皮細胞の作製は、pmR-ZsGreen1ベクターを用いてFACSによりクローニングにより行い、細胞増殖測定試薬を用いて増殖を測定した。

### 4. 研究成果

1) 両生類栓球細胞におけるCD41の発現解析(Fig. 1)。FUHEN細胞に於けるCD41分子は細胞全体にCD41分子が発現していた(a)。FCMで解析すると、ほぼすべての細胞がCD41を発現しており(b)、カエル組織では、骨髄および脾臓に於ける発現が高く、これらの組織が栓球細胞の造血組織であることが判る(c)。脾臓に於けるCD41陽性細胞を免疫染色で検出すると、全体にCD41陽性細胞(茶色)が存在することが判った(d)。



2) 栓球細胞からの CD41 陽性細胞外小胞の産生(Fig. 2)。FUHEN 細胞から超遠心法により精製した細胞外小胞(EVs)を抗 CD41 抗体で染色すると、この EVs は CD41 陽性を示した (a)。電子顕微鏡で観察すると、この粒子は直径 100nm 程度の球状を示した (b)。FUHEN 細胞を電子顕微鏡で観察すると、細胞内に多くの顆粒が認められた(c)。ナノトラッキング法でこの微粒子を解析すると、直径は  $105 \pm 6.6$  nm との結果を得た(d)。一方、アフリカツメガエル(ゼノパス)の体の各組織に於ける *cd41* の発現を qPCR により解析すると、ゼノパスでは脾臓に顕著に高い発現が認められたが、アマガエルと比較して骨髄では発現が認められなかった。この違いはカエルの種類の違いによるものと考えられた(e)。ゼノパスの末梢血中には CD41 陽性細胞 (茶色に染色されている) が存在する(f)。さらにゼノパスの脾臓細胞の培養上清から、超遠心法により微粒子を精製し FCM で解析すると、この粒子は CD41 陽性を示した(g)。これらのことから、両生類共通に CD41 陽性 EVs を産生していることが判明した。尚、鳥類でも CD41 陽性 EVs を産生していることが FCM 解析により明らかとなった (當銘/杉本, 分子生物学会発表 2020)。

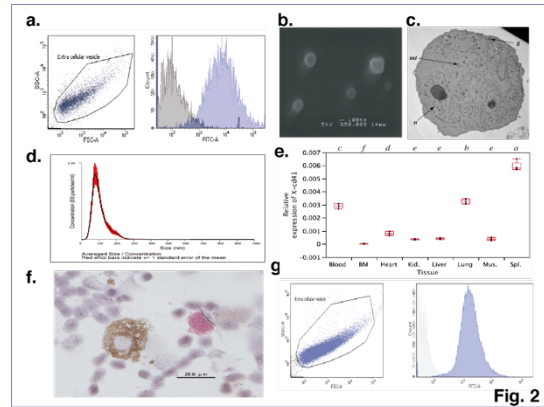


Fig. 2

3) CD41 陽性細胞外小胞による遺伝子発現制御(Fig. 3)。栓球細胞から調整した EVs のマイクロ RNA 解析を行うと、様々なマイクロ RNA を含む事が判明した。(Data 量が多いため示さず)。次に EVs を蛍光色素 (赤色) で標識しアマガエルの腹腔に入れ、そこから調整した細胞を観察すると、腹腔の貪食細胞に取り込まれていることが判った(a)。そこでマウスの血管内皮細胞株(F-2)(b)、マクロファージ細胞株(Raw264.7)(c)の培養に EVs を加え、抗 CD41 抗体で染色すると、EVs はこれらの細胞に取り込まれていることが判った (緑色が CD41 を青色は細胞核を示す)。この EV を内皮細胞株およびマクロファージ細胞株に与え、血管新生に関する幾つかの遺伝子発現を qPCR で解析すると内皮細胞において、*Plau*, *Vegf-A*, *Ccl2*, *Thbs-1* などのリガンドや *Vegf-r1*, *Acrv1* などのレセプターの発現が高進していることが判った(d)。

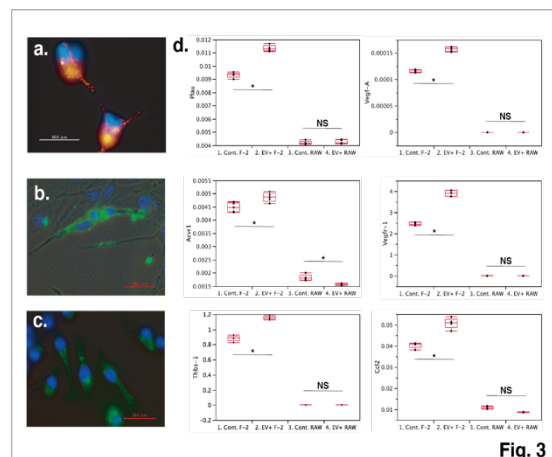


Fig. 3

4) miR による内皮細胞の増殖制御(Fig. 4)。

EVs 中で顕著に発現が高い幾つかの miRs を選び、F-2 細胞で過剰発現させたクローンを作製し、これらの増殖を調べた(a)。グラフ下の写真は、それぞれのクローンを示す。miR-149-3p, miR-2137, miR-5126 は増殖を促進し、miR-191-5p, miR-7045-3p は増殖を抑制した。これらのことから栓球細胞の産生する CD41 陽性 EVs は様々な miRs を含み、内皮細胞の遺伝子発現を制御するキャリアーとして機能していることが判った。詳細な各 miR の解析は今後の課題である。

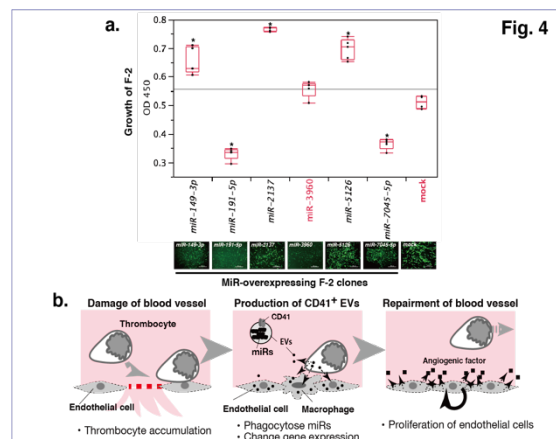


Fig. 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 當銘香也乃, 杉本健吉
2. 発表標題 ニワトリ栓球細胞が産生する細胞外微粒子はマイクロRNAのキャリアーとして機能する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（オンライン）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本健吉, 當銘香也乃
2. 発表標題 両生類栓球細胞が産生するCD41陽性はマイクロRNAを内包する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（オンライン）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 當銘香也乃, 杉本健吉
2. 発表標題 ニワトリ胚発生過程における栓球細胞の発生
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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