

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17878

研究課題名（和文）ADAMTS13の発現調節機構の解明と血栓症の病因との相関

研究課題名（英文）Elucidation of gene expression regulation of ADAMTS13 and correlation with pathogenesis of thrombosis

研究代表者

三島 優一（Mishima, Yuichi）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・客員研究員

研究者番号：90713876

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）：血液凝固反応の初期に起こる血小板血栓形成は、血漿タンパク質VWFとVWF切断酵素ADAMTS13によって調節されている。これまで、ADAMTS13とVWFの遺伝学的・生化学・構造学的解析が行われてきたが、その発現制御の報告は少ない。本研究では、ADAMTS13が産生される肝臓の肝星細胞株を使って、ADAMTS13がどのように制御されているかを調べた。肝星細胞株のADAMTS13は肝臓の線維化に対して効果がある試薬で転写が上昇することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADAMTS13の遺伝子異常や活性阻害抗体の出現は、細血管内で血小板の凝集塊ができる血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）の病因となる。ADAMTS13は血液凝固応答に関して重要な役割を果たすので、その遺伝子発現制御も重要になる。ADAMTS13の遺伝子発現制御が明らかになれば、その遺伝子発現制御にかかわる因子を標的とした治療薬を用いることができるので治療方法の選択肢が広がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：ADAMTS13 is the protease that specifically cleaves vWF, and preventing excessive blood clotting. It is unclear that how expression of ADAMTS13 is regulated. ADAMTS13 is secreted from hepatic stellate cell of liver. Upon liver injury, HSC are activated with the conversion of quiescent HSC to fibrogenic cells. Activated HSC are shown that secretions of ADAMTS13 decrease in blood. IBMX is PDE inhibitor of therapeutic drug candidates for liver fibrogenesis and it increase transcription of ADAMTS13 in Lx2 cells. To investigate whether degradation of cAMP or cGMP by IBMX increases ADAMTS13 transcription, cAMP or cGMP directly were added to Lx2. In consequence, transcription of ADAMTS13 was induced by cAMP. cAMP is a second messenger and promote activation of PKA. Lx2 cells containing IBMX exposed to PKA inhibitor, and subsequently downregulate the transcription of ADAMTS13. These results suggest that the cAMP-PKA signaling pathway regulate ADAMTS13 transcription.

研究分野：血栓止血

キーワード：ADAMTS13 肝星細胞 PDE阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液凝固反応は止血と過剰な凝固反応を起こさないようにするバランスが重要であり、過度に凝固反応が進行すると血管内での病的血栓形成され、脳梗塞など血栓性疾患の要因となる。このような病的血栓を防ぐために生体内では様々な因子が働くことで適度な血栓形成能となるように調節されている。血小板血栓形成能は血小板と血小板の結合を直接仲介する血漿タンパク質 von Willebrand factor (VWF) と、VWF を切断することで過剰な血小板凝集を抑制するメタロプロテアーゼ ADAMTS13 の活性のバランスによって正常に維持されている。

ADAMTS13 の遺伝子異常(先天性)や ADAMTS13 タンパク質に結合する活性阻害抗体の出現(後天性)は、VWF 切断活性を消失させ、細血管内で血小板の凝集塊ができる血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の病因となる (Br. J. Haematol. 144, 742-754, 2009)。また、ADAMTS13 欠損のモデルマウスを用いた研究では ADAMTS13 活性が低下すると脳梗塞の予後が悪化する (Blood 115, 1650-1653, 2010)。これまで生化学的・遺伝学的な研究は ADAMTS13 と血栓症との相関を明らかにしてきた。一方で、血漿中の ADAMTS13 濃度は約 1 µg/ml で主に肝臓から分泌されているが (J. Biochem. 139, 147-154, 2006)、どのように発現調節が行われているかについての報告は少ない。本申請は ADAMTS13 の遺伝子発現調節を調べることで、血栓症の原因解明に加えて、その治療や予防に繋がる新たな知見を得ることができると期待している。

2. 研究の目的

ADAMTS13 は主に肝臓から産生されると報告されており、ADAMTS13 は肝硬変や慢性肝炎を発症すると血中量が減少し、血中で高分子の VWF 多量体が見られるようになる。肝臓の状態が ADAMTS13 の血中量に影響するので、ADAMTS13 の発現調節機構も肝臓の細胞株を用いる。肝臓の細胞株を使ってこれまでよくわかっていなかった ADAMTS13 の量を調節するシグナルを明らかにすることを目的とする。

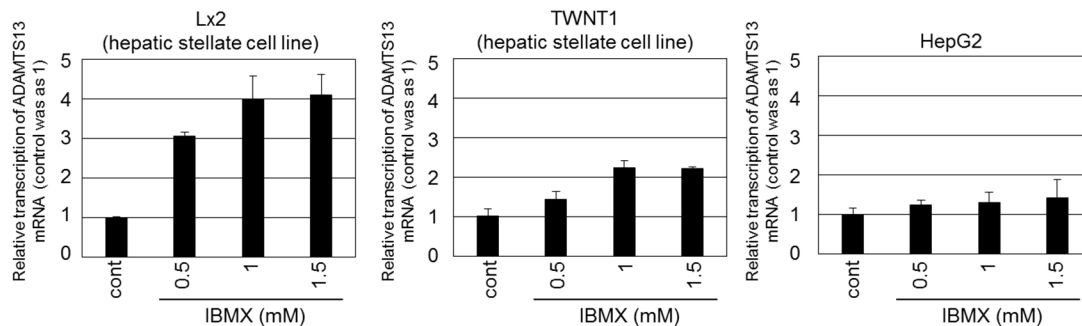
3. 研究の方法

ADAMTS13 の遺伝子発現調節を調べるために最初にどの細胞が本研究の目的に適しているかを検討した。ADAMTS13 の発現が報告されている細胞株や初代培養細胞から RNA を抽出し、mRNA 量をリアルタイム PCR で比較した。最も ADAMTS13 の転写が高い細胞に対して、必要な遺伝子をクローニングして強制発現ベクターに組み込んで強制発現を行うことや治療等に使用される試薬することで ADAMTS13 の転写を変化させる。さらに効果があれば阻害剤を用いて ADAMTS13 が発現するまでにどのような経路をたどるかを調べることで ADAMTS13 がどのような遺伝子発現制御を受けているかを明らかにする。

4. 研究成果

ADAMTS13 の遺伝子発現調節を調べるのに肝臓の肝星細胞株が適しているかを調べるため、肝星細胞株に加えて ADAMTS13 の発現がある細胞と比較した。比較する細胞は、肝星細胞株の Lx2、他の肝星細胞株である TWNT1、肝星細胞以外からは ADAMTS13 の発現が報告されているヒト肝がん細胞株 (HepG2)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト blood brain barrier cell の細胞株 (CMEC/D3) から RNA を抽出した。各細胞から抽出した mRNA をリアルタイム PCR で比較したところ、Lx2 が最も ADAMTS13 が発現していた。

肝臓内の肝星細胞には静止型と活性型の状態があり、一般的に肝臓が損傷を負うと肝星細胞は静止型から活性型に移行し、肝星細胞はコラーゲンを分泌し肝硬変の原因となる。ADAMTS13 は肝硬変によって血中の ADAMTS13 量が減少すると報告されているので (Thromb. Haemost. 99, 1019-1029, 2008)、ADAMTS13 の発現は肝星細胞の状態に影響されることが考えられる。本研究でする Lx2 は活性型に近い性質を示すことが報告されている (Exp Mol Pathol. 91, 664-672, 2011)。本研究でも Lx2 が活性型に近いため ADAMTS13 の発現が低くなっている可能性がある。肝硬変などで肝星細胞が一度活性化すると元の静止型に戻すのは難しいが、これまで肝硬変に対して様々な治療が試みられている。Lx2 の状態を静止型に近づけることで ADAMTS13 が発現するようになり、この時の遺伝子発現制御を調べることで ADAMTS13 の遺伝子発現制御も明らかにできる。肝硬変等で肝星細胞が活性化すると、様々な変化が起こる。活性化した肝星細胞内ではビタミン A が失われ、静止型で発現している PPAR やサイトグロビンの発現量が低下する。Lx2 の場合もビタミン A の低下、PPAR やサイトグロビンの発現低下がみられるので、Lx2 にビタミン A の添加、細胞からクローニングした PPAR やサイトグロビンを強制発現ベクターに組



み込んで強制発現を行ったが、ADAMTS13の発現は上昇しなかった。次に活性型となった肝星細胞に対する治療薬の開発は多数試みられており、その候補の一つに Phosphodiesterase (PDE) 阻害剤である Isobutylmethylxanthine (IBMX) がある。活性型肝星細胞の状態に似ている Lx2 に IBMX を加えて、加えていない Lx2 と比較すると ADAMTS13 mRNA が上昇した (上図)。同様に IBMX は TWNT1 でも ADAMTS13 の転写を弱いながらも促進する (上図)。一方で、HepG2 では、IBMX による ADAMTS13 の転写は促進されなかった (上図)。IBMX は PDE 阻害剤であり、ほぼすべての PDE に対してその活性を抑制する。IBMX の標的である PDE は複数あり、その結果、cAMP と cGMP に対する PDE の活性を抑制する。cAMP と cGMP のどちらか、あるいは両方が ADAMTS13 mRNA の転写を上昇させるかどうかを調べた。cAMP を Lx2 に添加した時のみ、ADAMTS13 mRNA を上昇させた。

cAMP はセカンドメッセンジャーであり、cAMP が protein kinase A (PKA) に結合し、PKA から触媒サブユニットが遊離する。この触媒サブユニットが下流の CREB (cAMP response element binding protein) をリン酸化され、リン酸化された CREB は転写因子として機能する。リン酸化された CREB はこれまでの結果から ADAMTS13 の遺伝子発現調節においては上流にあると考えられる。cAMP が ADAMTS13 の上流で機能しているか調べるため、PKA に対する阻害剤を用いた。PKA に結合する cAMP と競合する RP-8-CPT-cAMP を IBMX 存在下の Lx2 に添加すると、IBMX による ADAMTS13 の転写促進が一部阻害された。ADAMTS13 の遺伝子発現調節において cAMP により PKA を介して CREB が関与していることが示唆された。しかしながら、ADAMTS13 のプロモーター領域を使ってレポーターアッセイを行ったが、IBMX による転写活性は使用したプロモーター領域では見られなかったため、ADAMTS13 の遺伝子発現制御は単純に CREB が直接プロモーター上で働いているわけではないことがわかった。本研究で ADAMTS13 の遺伝子発現制御が明らかになることにより、ADAMTS13 に関連した疾患において治療薬の新たな標的が増え、治療の選択肢が広がる可能性が期待される。

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 Mishima Yuichi, Brueckner Laura, Takahashi Saori, Kawakami Toru, Otani Junji, Shinohara Akira, Takeshita Kohei, Garvilles Ronald Garingalao, Watanabe Mikio, Sakai Norio, Takeshima Hideyuki, Nachtegael Charlotte, Nishiyama Atsuya, Nakanishi Makoto, Arita Kyohei, Nakashima Kinichi, Hojo Hironobu, Suetake Isao	4. 巻 25
2. 論文標題 Enhanced processivity of Dnmt1 by monoubiquitinated histone H3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 22 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12732	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 Kawakami Toru, Mishima Yuichi, Takazawa Masaya, Hojo Hironobu, Suetake Isao	4. 巻 25
2. 論文標題 Chemical synthesis of the ubiquitinated form of histone H3 and its effect on DNA methyltransferase 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	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) 10.1002/psc.3200	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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集会
4. 発表年 2020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
---------	---------