

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08445

研究課題名(和文)多機能プロテアーゼによる血小板産生機構と急性冠症候群における意義

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism by which NRDC, a multifunctional protease, regulates platelet production and its significance as a diagnostic marker for ACS in the hyperacute phase.

研究代表者

大野 美紀子 (Mikiko, Ohno)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10583198

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)：ナルディライジン(NRDC)は、様々な機能を有する多機能プロテアーゼであり、急性冠症候群(ACS)の超急性期で血液中に分泌される。血小板は、骨髄において成熟巨核球の細胞質がちぎれる血小板シェディングにより産生される。最近、培養装置で発生させた乱流刺激により、NRDCが成熟巨核球より分泌され血小板シェディングを正に調節すること、酵素活性が必要であることが示された。本研究では、NRDCによる血小板産生機構およびその酵素活性の意義、ACSにおける血小板とNRDCの役割を解明することを目的とし、遺伝子改変マウスを主体とした基礎研究およびNRDCのACS診断バイオマーカーとしての前向き臨床研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ACSの本態はプラーク破裂を契機とする血栓形成にあり、血小板が重要な役割を有する。ACS発症時の血小板数増加が多くの臨床論文で示されたがその機序は明らかではなかった。NRDCは血小板産生促進因子であることから、ACSにおける血小板増加が、NRDC分泌亢進(血清濃度上昇)を介して生じている可能性が示唆された。乱流刺激によって巨核球からNRDCが分泌される機構やACSで分泌が亢進する意義を明らかにすることで、NRDCのホルモン様作用について解明できる可能性がある。これらの機序を明らかにすることで、抗NRDC抗体や酵素活性を抑制する小分子化合物などの新規治療法の開発につながる可能性がある。

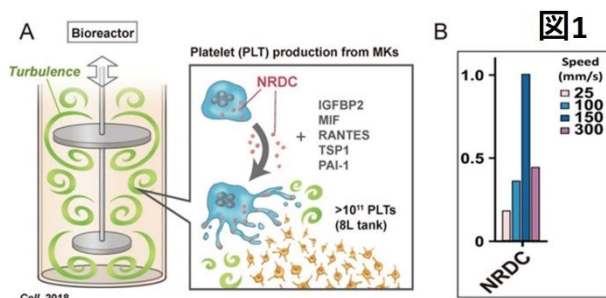
研究成果の概要(英文)：Nardilysin (NRDC) is a multifunctional protease that is secreted during the very early phase of acute coronary syndromes (ACS). Platelets, essential components in thrombus formation, are generated through platelet shedding, involving the release of cytoplasm from mature megakaryocytes in the bone marrow. Recent findings indicate that NRDC secretion from mature megakaryocytes is stimulated by turbulence, positively influencing platelet shedding. Moreover, the enzymatic activity of NRDC is important for the platelet shedding. In this study, we aimed to investigate the mechanisms underlying platelet production mediated by NRDC, elucidate the significance of its enzymatic activity, and explore the role of platelets and secreted NRDC in ACS. Through comprehensive research employing genetically engineered mice, we conducted basic investigations, alongside prospective clinical studies assessing NRDC as a potential diagnostic biomarker for ACS.

研究分野：循環器内科

キーワード：急性冠症候群 血小板 多機能プロテアーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

血小板は、成熟巨核球の細胞質がちぎれて放出されるというユニークな形式で産生される。この血小板産生の最終段階を血小板シェディングとよぶが、その分子機序は未だ十分解明されていない。我々は、京都大学 iPS 細胞研究所 江藤浩之博士との共同研究により、乱流刺激がヒト iPS 細胞由来巨核球 (imMKCL) からの血小板産生効率を大幅に高めること、その過程においてナルディライジン (N-Arginine Dibasic Convertase: NRDC) が重要な働きを持つことを明らかにした (Nakamura et al. *Cell* 2018)。NRDC は imMKCL に高度に発現しており、乱流刺激により核から細胞膜へと移行し、乱流強度依存性に培養上清中に分泌されることが示された (図1)。また、imMKCL の培地中に NRDC タンパク質を加えると血小板産生が増加したことから、乱流刺激による血小板産生増加の一部は NRDC 分泌に依存することが示唆された。酵素活性欠失型変異 NRDC (NRDC E>A) を加えても血小板産生は増加しなかったことから、NRDC が細胞外で酵素活性依存性に血小板シェディングに寄与していることが示唆された。



急性冠症候群 (Acute coronary syndrome: ACS) の本態は、冠動脈の動脈硬化性プラーク破裂を契機とする血栓形成にあり、血小板が重要な役割を有することが明らかである。また、ACS において血小板数の増加はその予後不良因子の一つであることが知られている。さらに、抗血小板薬が ACS の二次予防に有効であること、ステント血栓症の予防に必須であることも、血小板の重要性を示す強固なエビデンスである。我々は、ACS の超早期診断マーカーとして血清 NRDC 値が

有用であることを報告したが (Ohno, Chen et al. *IJC* 2017)、その意義や血小板数との関連については不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、

- (1) 生体での血小板産生における NRDC の役割
- (2) 血小板産生における NRDC の酵素活性の役割
- (3) ACS における血小板と NRDC の役割

の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 生体での血小板産生における NRDC の役割；

-1: 巨核球特異的 *Nrdc* 欠損マウス (Pf4-*Nrdc*-KO) の解析: 野生型及び Pf4-*Nrdc*-KO の末梢血を採取し、血小板数を測定した。次に、血小板を除去する刺激 (LPS あるいは抗 CD41 抗体を腹腔内投与) を行い、投与後 24 時間 ~ 96 時間まで経時的に血小板数を測定した。さらにこれらの骨髓を採取し、組織学的解析を行った。

-2: 巨核球特異的 *Nrdc* 欠損マウス (Pf4-*Nrdc*-KO) と全身性 *Nrdc* ヘテロ欠損マウス (*Nrdc*+/-) の交配による解析:

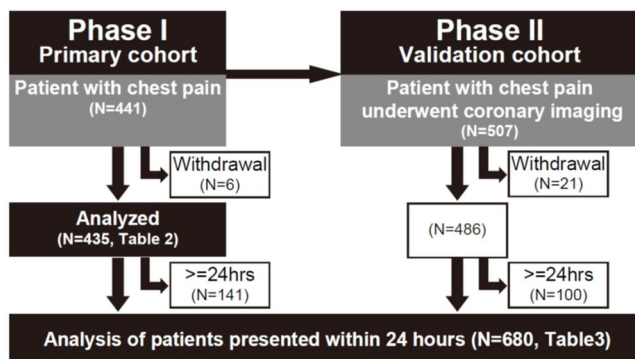
-1 で明らかな表現型を認めなかったことから、骨髓巨核球における NRDC 発現量をさらに低下させるために全身性 *Nrdc* ヘテロ欠損マウス (*Nrdc*+/-) との交配を行い解析した。

#### NRDC の酵素活性の血小板産生における役割；

NRDC の酵素活性中心の一アミノ酸を変異させてノックインした、酵素活性欠失型 *Nrdc* ノックインマウス (*Nrdc*E>A KI/KI) の作製と解析を行った。

#### ACS における血小板と分泌 NRDC の役割；

Nardi-ACS study サブ解析: 救急外来を受診した胸痛患者における NRDC の ACS 診断能の評価を行うため、「急性冠症候群におけるナルディライジン Nardilysin の診断バイオマーカーとしての有用性の検討」と題した多施設前向きコホート研究 (Prospective evaluation of Nardilysin for the early detection of patients with Acute coronary syndrome: Nardi-ACS study, 倫理委員会承認番号 R0653, UMIN000024577) を施行した (左図)。サブ解析として血清 NRDC 値と血小板数の相関性や、発症 30 日後の予後 (心事故発生率: MACE) との相関性を検討した。



#### 4. 研究成果

##### 生体での血小板産生における NRDC の役割；

-1：巨核球特異的 Nrdc 欠損マウス (Pf4-KO, Pf4 Cre+/-::Nrdc flox/flox) の血小板数は野生型と比較して有意な差を認めなかった。さらにこれらのマウスに LPS や抗 CD41 抗体を腹腔内投与し、血小板除去後の回復過程を投与後 24 時間~96 時間まで経時的に解析したが、野生型と比較して血小板数に変化を認めなかった。骨髓由来巨核球を単離し、NRDC の mRNA 発現レベルを確認したところ、野生型と比較して半分程度の減少にとどまった。また、骨髓における組織学的解析では、巨核球の数や形態に変化を認めず、抗 NRDC 抗体による免疫染色法において、巨核球に発現する NRDC の減少程度は野生型と比較しわずかであった。以上より、Pf4 プロモーター-Cre リコンビナーゼによる血小板での NRDC の欠損程度は半分までにとどまっており、この系での血小板特異的な NRDC の効果を評価することは困難であると判断した。

-2： -1 の結果を受けて、NRDC の全身性ヘテロ欠損マウス (Nrdc+/-) と巨核球特異的 Nrdc 欠損マウス (Pf4-KO, Pf4 Cre+/-::Nrdc flox/flox) を交配し、Pf4 Cre+/-::Nrdc flox/flox::Nrdc+/- の解析を行うこととした。全身性 NRDC 欠損マウスは不妊であるため用いることが出来なかった。Pf4 Cre+/-::Nrdc flox/flox::Nrdc+/- では、骨髓巨核球における mRNA レベルでの NRDC 発現量は、野生型の 1 割程度までノックアウトできたが、定常状態での血小板数に有意な差を認めなかった。一方、平均血小板容積 (MPV) は増加していた。以上より、生体内における血小板の産生には、NRDC の機能を代償する機構が存在すると考えられた。

##### NRDC の酵素活性の血小板産生における役割；

NRDC 酵素活性による血小板産生機構を明らかにするため、Nrdc E>A KI/KI の解析を行った。Nrdc E>A KI/KI は遺伝子背景が C57Bl6 の場合、生後 2 日齢で全て死亡することが明らかとなった。胎生期にはメンデルの法則に則って存在するが、生後早期には死亡していた。死亡理由は複数推察されるが、少なくとも血小板減少による出血などの所見は認められなかった。そこで、遺伝的背景を ICR に 6 世代バッククロスすることで、成体 Nrdc E>A KI/KI を得ることができた。現在のところ、生体 Nrdc E>A KI/KI (ICR) は、これまでに我々が報告してきた、全身性 NRDC 欠損マウスに類似した表現型を呈している。バッククロスに時間を要したため、血球系の解析は未着手であるが、今後各種負荷試験を行い、血小板産生に変化がないか解析予定である。

##### ACS における血小板と分泌 NRDC の役割；

ACS における血小板と分泌 NRDC の役割について、ACS 症例における血清 NRDC 値の多施設前向きコホート研究 (Nardi-ACS study) の解析を行った。先行論文と同様、NRDC が ACS 発症超早期の診断に有用であることを明らかにした。また、高感度トロポニン I (hsTnI) と併用することで、hsTnI 陰性の ACS 症例の検出が可能であった。本研究の着眼点である、血小板数と ACS 発症に正の相関が認められるかどうかを検討したが、ACS において来院時血小板数が増加している症例が少なく、統計学的有意差が出るところまでの結果は得られなかった。また、ACS 発症 30 日後の新規心事故発生率 (MACE) は、追跡調査が可能であった 881 例中、34 例 (3.4%) で認められた。MACE の有無と血清 NRDC 値との関係性を見ると、MACE 有りの症例で有意に血清 NRDC 値が高値を示した。一方、血小板数と発症 30 日後の予後との相関性については明らかではなかった。Nardi-ACS study の結果については、現在論文投稿中 (under review) である。

また今後、分泌 NRDC の役割を明らかにするため、動物実験系においても検討予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saijo S, Ohno M, Iwasaki H, Matsuda S, Nishi K, Hiraoka Y, Ide N, Kimura T, Nishi E.	4. 巻 3449
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 7379
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 -
1. 著者名 Yasuda D, Hiraoka Y, Ohno M, Nishi K, Iwasaki H, Kita T, Nishi E, Kume N.	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 Biol Pharm Bull.	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 T, Ohno M, Nishi E, ...Iwadata Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Serum anti-DID01, 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 Med.	6. 最初と最後の頁 131
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 Sumazaki M, Machida T, Kamitsukasa I, Mori M, Sugimoto K, Uzawa A, Kuwabara S, Kobayashi Y, Ohno M, Nishi E, Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K, Takizawa H, Kashiwado K, Shin H, Kishimoto T, Matsushita K, Kobayashi S, Nakamura R, Shinmen N, Kuroda H, Zhang XM, Wang H, Goto KI, Hiwasa T.	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. Epub 2020 Oct 4.	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 Li SY, Yoshida Y, Kobayashi E, Adachi A, Hirono S, Matsutani T, Mine S, Machida T, Ohno M, Nishi E, Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K, Kitamura K, Sumazaki M, Ito M, Shimada H, Takizawa H, Kashiwado K, Tomiyoshi G, Shinmen N, Nakamura R, Kuroda H, Zhang XM, Wang H, Goto K, Iwadate Y, Hiwasa T.	4. 巻 4
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. Epub 2020 Jul 29	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 Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Niizuma S, Matsuda S, Iwasaki H, Kimura K, and Nishi E	4. 巻 34
2. 論文標題 Nardilysin controls cardiac sympathetic innervation patterning through regulation of p75 neurotrophin receptor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 11624-11640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202000604R	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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西 清人, 岩崎 広高, 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 日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野美紀子, 松浦博, 牧山武, 糺谷泰彦, 西清人, 松田真太郎, 木村剛, 西英一郎
2. 発表標題 NRDCはイオンチャンネルの転写調節を介して洞の自動性を調節する
3. 学会等名 日本循環薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Mikiko Ohno, Hiroki Shiomi, Mariko Yano, Takanori Aizawa, Yukiko Nakano, Shintaro Yamagami, Masashi Kato, Masanobu Ohya, Po-Min Chen, Kazuya Nagao, Kenji Ando, Kazushige Kadota, Takafumi Yokomatsu, Inada Tsukasa, Masato Kurokawa, Takeshi Morimoto, Takeshi Kimura and Eiichiro Nishi
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, Scientific sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021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	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 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 大野美紀子
2. 発表標題 トピックス：心筋症2 たこつば症候群を再考する
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀医科大学薬理学講座 <a href="http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/index.html">http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/index.html</a> 滋賀医科大学薬理学講座 <a href="http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/index.html">http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/index.html</a> 滋賀医科大学ホームページ「最新研究の紹介」 <a href="https://www.shiga-med.ac.jp/research-and-collaboration/priority-projects-and-research-results/latest-research-papers#20200727">https://www.shiga-med.ac.jp/research-and-collaboration/priority-projects-and-research-results/latest-research-papers#20200727</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	西 英一郎  (Eiichiro Nishi)  (30362528)	滋賀医科大学・医学部・教授    (14202)	

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