

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590519

研究課題名（和文） RNA 分解酵素による血液凝固制御

研究課題名（英文） Regulation of blood coagulation by RNase

研究代表者

小山 高敏（KOYAMA TAKATOSHI）

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授

研究者番号：20234916

研究成果の概要（和文）：

細胞外に出た RNA が生体内の新しい凝固促進因子，血管透過性亢進因子であることが確認されている．その作用は膵臓型リボヌクレアーゼ(RNase 1) によって抑制される．血管内における RNase の詳細な発現や機能の解析はこれまで行われてこなかったため，我々は血液と接触する血管内皮細胞，血液細胞，悪性細胞における RNase の発現と機能，及びその調節について解析した．その結果，血管内皮細胞の RNase 1 は病的に放出される細胞外 RNA の作用から血管系を護っていることが示唆された．血球細胞や悪性細胞の RNA/RNase 1 機構も血管や悪性細胞の恒常性の維持に貢献していることが示唆された．

研究成果の概要（英文）：

RNA has been recognized as a novel procoagulatory and permeability-increasing factor and the function of it is counteracted by pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). No detailed characterization of the expression and function of RNase in the vasculature were carried out so far. We aimed to investigate the expression and function of RNases in cells which come in contact with blood such as vascular endothelial cells, blood cells and malignant cells. The results indicate that endothelial RNase 1 may protect the vascular system against extracellular RNA released under pathological conditions. The RNA/RNase 1 in blood cells and malignant cells may play an additive role as a novel biological system contributing to the regulation and maintenance of vascular homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：血液凝固，RNA 分解酵素，血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞傷害や病原体感染に際し放出される RNA が血液や血管内皮細胞と触れることで一連の凝固反応が惹き起こされるという新しい概念を提唱したことに引き続き，RNA 分解酵素 (RNase) とその制御系が血液凝固制御に関与している可能性があると考えた。

2. 研究の目的

細胞傷害や病原体感染に際し放出される RNA が血液や血管内皮細胞と触れることで一連の凝固反応が引き起こされるという新しい概念の裏返しで，RNase による血液凝固制御の可能性を探る。血管内皮細胞と血球細胞を中心とした様々な細胞を用いて RNase とその拮抗物質の産生や発現調節について明らかにしようとする。

生体内の陰性荷電物質，細胞外核酸の RNA により血液凝固活性化が起こり，止血や血栓症が起こるといった概念は新規のもので，今回の，血管内皮細胞や血球から産生される RNase 及びそのインヒビターが精巧にその制御に関わっている可能性，というアイデアは初めてのものである。その成果は，正常の止血ないし病的血栓形成機序の解明に加え，血栓症の病態解析や，予防・治療への応用の可能性が予想される。RNA は血管透過性や癌細胞浸潤の病態にも関与している可能性があるため，血管生物学研究の新展開につながる可能性が期待される。

3. 研究の方法

血管内皮細胞，血球細胞，白血病細胞，骨髄腫細胞を用いて，pancreatic-type ribonuclease (RNase 1)，RNase 5 (angiogenin)，RNase inhibitor (RI) の mRNA やタンパク質の発現を RT-PCR 法，ウエスタンブロット法，免疫染色，RNase 活性測定，で調べた。血管内皮細胞においては，細胞上清に放出される RNase 1 活性の変化も検討した。なお，RNase 5 には血管新生作用があるが，RNase 活性は，その命名と違って，認められない。

4. 研究成果

異なる起源の内皮細胞は，RNase 1，RNase 5 及び RI を mRNA，蛋白質において異なるレベルで発現していた。RNase 5 の発現と放出はすべての種類の血管内皮細胞で類似していた。HUVECs は最も高濃度の活性のある RNase 1 を有し，放出した。RNase 1 は無血

清培地での培養 24 時間後にはほぼ完全に放出されたが，RI の放出は低かった。対照的に，微小血管内皮細胞では RNase 5 が RNase 1 より高いレベルで発現していた。HUVECs の免疫組織化学的観察では，RNase 1 がフォンヴェイブレランド因子と Weibel Palade 体 (WPB) 内に部分的に共存することが示された。それに応じて，HUVECs からの RNase 1 の放出は，フォルボールエステル，トロンビン，血管内皮増殖因子刺激による WPB の脱顆粒により増加した。野生型 RNA 及び人工 RNA であるポリ:IC は RNase 1 の短時間の放出を誘発したが，DNA ではその作用は認められなかった。さらに細胞溶解液と細胞上清の分析により，RNase 1 と RI は mRNA 及び蛋白質のレベルで血液細胞に異なったレベルで発現していることが判った。赤血球や白血病細胞では，RNase 1 の発現は低いようであった。RI はあまねく血液細胞でも血管内皮細胞と同様に発現していた。一方，RNase 活性は HUVECs 細胞株である EAhy926 細胞上清と比べ血球細胞では低かった。無血清培地で培養すると，EAhy926 では上清中の RNase 活性は時間とともに増加するが，白血病細胞では徐々に低下した。

傷害細胞から放出される生体内の RNA により血液凝固活性化が起こり，血栓症が起こるといった概念は新しいものだが，おもに血管内皮細胞から放出される RNase が血管内の恒常性を維持しており，白血球や血小板でも RNase 活性が認められ，内皮細胞を部分的に支援しているものの，赤血球や白血病細胞では RNase が十分に機能していない可能性が示唆された。悪性細胞は細胞傷害性 RNA の作用を通じて腫瘍の維持，進展に関与している可能性がある。

また，多発性骨髄腫の新しい治療薬で免疫調節作用のあるサリドマイドやレナリドマイド，併用薬デキサメサゾン，ドキシソルビシン，ボルテゾミブの血管内皮細胞や単球系細胞，骨髄腫細胞への凝固活性化効果を検討し，血管内皮細胞や単球に対するデキサメサゾンの組織因子発現増強作用，ドキシソルビシンのアポトーシス誘導作用による凝固促進効果を見出し，論文発表した。骨髄腫細胞などの腫瘍細胞による RNA/RNase 発現との関連を探る礎となっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件) すべて査読有

- ① Fischer S, Nishio M, Dadkhahi S, Gansler J, Saffarzadeh M, Shibamiya A, Kral N, Baal N, Koyama T, Deindl E, Preissner KT: Expression and localization of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thromb Haemost* 2011;105(2):345-355.
10.1160/TH10-06-0345
- ② Hoshi A, Matsumoto A, Chung J, Isozumi Y, Koyama T: Activation of coagulation by a thalidomide-based regimen. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011;22(6):532-540.
10.1097/MBC.0b013e328348629d
- ③ Inaba H, Koyama T, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K: Identification and characterization of an adenine to guanine transition within intron 10 of the factor VIII gene as a causative mutation in a patient with mild hemophilia A. *Haemophilia* 2013; 19(1):100-105.
10.1111/j.1365-2516.2012.02906.x
- ④ Isozumi Y, Arai R, Fujimoto K, Koyama T: Activation of coagulation by lenalidomide-based regimens for the treatment of multiple myeloma. *PLoS One* 2013; in press.
10.1371/journal.pone.0064369

[学会発表] (計6件)

- ① 西尾美和子, Fischer S, Preissner KT, 小山高敏: RNA分解酵素 (RNase) による血液凝固制御. 第72回日本血液学会総会. 横浜, 2010年9月.
- ② Isozumi Y, Matsumoto A, Hoshi A,

Chung J, Koyama T: Activation of coagulation by a thalidomide-based regimen. The XXIIIrd Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan, July, 2011.

- ③ Isozumi Y, Matsumoto A, Hoshi A, Koyama T: Activation of coagulation by immunomodulatory therapy-based regimen for multiple myeloma. 第73回日本血液学会総会. 名古屋, 2011年10月.
- ④ Isozumi Y, Fujimoto K, Arai R, Koyama T: Activation of coagulation by lenalidomide-based regimen for multiple myeloma. 第74回日本血液学会総会. 京都, 2012年10月.
- ⑤ Murata A, Fujimoto K, Nishio M, Koyama T: Analysis of the expression of RNase in blood cells related to homeostasis in vascular system. The XXIVth Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, Netherlands, July, 2013.
- ⑥ Arai R, Isozumi Y, Fujimoto K, Koyama T: Activation of coagulation by lenalidomide-based regimens for multiple myeloma. The XXIVth Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam, Netherlands, July, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 高敏 (KOYAMA TAKATOSHI)
東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授
研究者番号: 20234916

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者 ()
研究者番号：