

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450407

研究課題名(和文) 血小板，血管平滑筋および内皮細胞におけるMARCKSの役割と病的血栓形成への関与

研究課題名(英文) Roles of MARCKS in platelets, smooth muscle and endothelial cells in haemostasis and thrombosis

研究代表者

白石 光也 (SHIRAIISHI, Mitsuya)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：20383656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞、平滑筋細胞および血小板における、未だその詳細が明らかとなっていないMARCKSタンパク質の役割を検討した。血管内皮細胞において、MARCKSタンパク質は細胞増殖、細胞運動、一酸化窒素産生などその重要な機能に関わることを明らかにした。また、糖尿病およびメチル水銀中毒モデル動物における異常にも関与している可能性が示された。また、MARCKSタンパク質は平滑筋細胞および血小板にも発現しており、これらの細胞における役割が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We studied the role of MARCKS protein in endothelial cells, smooth muscle cells, and platelets. In endothelial cells, MARCKS protein was involved in cell proliferation, cell migration, and nitric oxide production. Furthermore, participation of MARCKS in abnormal cell functions of diabetes or methylmercury intoxication model animals was suggested. In addition, MARCKS was expressed in smooth muscle cells and platelets, and the role of MARCKS in these cells was indicated.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：MARCKS 血管内皮細胞 血管平滑筋細胞 血小板

1. 研究開始当初の背景

高脂血症や糖尿病、高血圧症などの生活習慣病は病的血栓形成の要因であり、心筋梗塞や脳梗塞などの致死的原因となる。ヒトにおいて病的血栓による疾患は、ガンに匹敵する死因でもあり、より詳細な発生メカニズムの解明が求められている。また、ネコにおける大動脈血栓症など、伴侶動物においても病的血栓形成を原因とする重篤な病態が様々な疾患に関与していることが明らかとなっている。生活習慣病では、生理的な止血機構や血管機能調節に深く関わる血小板や血管平滑筋および内皮細胞においてその機能や制御機構に異常が認められ、この細胞機能の破綻が病的血栓の形成の原因と考えられている。

Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)は、アクチンやリン脂質との結合を介して神経細胞の成長や分化に関わる重要な細胞内タンパク質として知られている。近年、止血や血栓形成に寄与する血小板や血管平滑筋および内皮細胞において、MARCKSがその細胞機能の制御に寄与している可能性が示唆され注目を集めている。しかし、このMARCKSを介した機能制御に関する詳細なメカニズムには不明な点も多く、特に血小板や血管平滑筋および内皮細胞の機能異常を原因とした病的血栓形成における病態生理学的な役割についての研究は全く不十分である。

2. 研究の目的

止血および血栓形成に関わる血小板、血管平滑筋および内皮細胞の機能制御におけるMARCKSの役割、および疾患モデル動物におけるMARCKSの変化とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

培養細胞株を用いた細胞実験では、EA.hy926細胞(ヒト血管内皮由来細胞株)、A10細胞(ラット平滑筋由来細胞株)およびSH-SY5Y細胞(ヒト神経芽細胞腫由来細胞株)を用いた。また、ストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルラット・マウスおよびメチル水銀中毒モデルラットを作製し、摘出血管および単離血小板を用い機能解析を行った。各試料を用い、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法、RNA干渉法を用いたMARCKSノックダウン法、また野生型/変異型MARCKSの強制発現法、マトリゲルを用いたチューブ形成アッセイ、一酸化窒素(NO)アッセイによるNO産生量の測定、カルパイン活性化の測定、血管収縮測定などにより、MARCKSの変化と細胞・組織機能との関連を解析した。

4. 研究成果

生理的および病態生理学的な止血機構において中心的役割を果たしている血管内皮細胞におけるMARCKSの関与と役割を明らかにする目的で、ヒト血管内皮細胞由来の細胞株であるEA.hy926細胞を用いた検討を行った。マトリゲルを用いた血管新生アッセイおよび一酸化窒素(NO)産生測定から、EA.hy926細胞によるチューブ形成およびNO産生が観察され、EA.hy926細胞が血管内皮細胞としての機能を保持していることが確認できた。そこでsiRNAによりMARCKSノックダウンの影響を観察したところ、細胞増殖率の低下(図1)、創傷治癒アッセイにおける細胞浸潤率の低下(図2)および血管新生アッセイにおけるチューブ形成能の低下が観察された。以上の結果から、MARCKSは内皮細胞の増殖とその機能に深く関与することが明らかとなった。

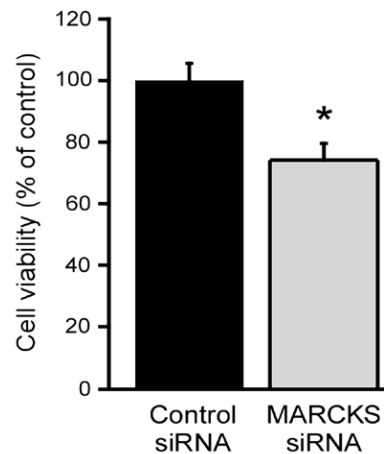


図1. 内皮細胞の細胞増殖率に対するMARCKSノックダウンの影響

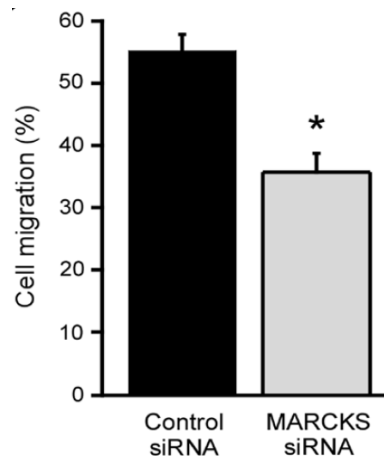
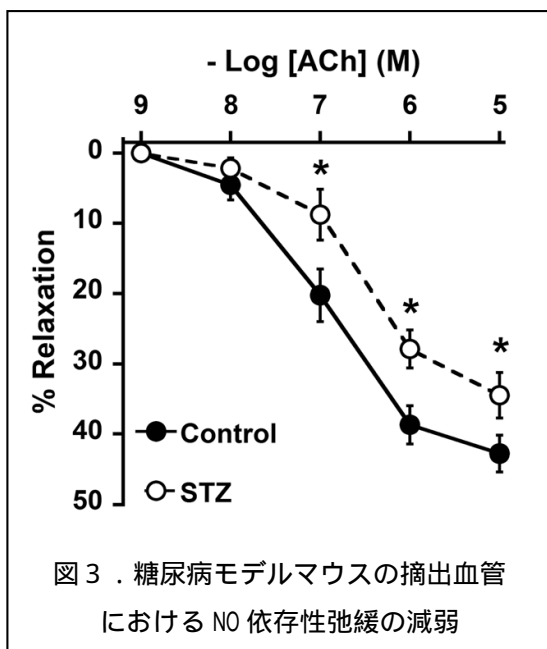


図2. 内皮細胞の創傷治癒アッセイにおけるMARCKSノックダウンの影響

また、神経細胞において、メチル水銀毒性

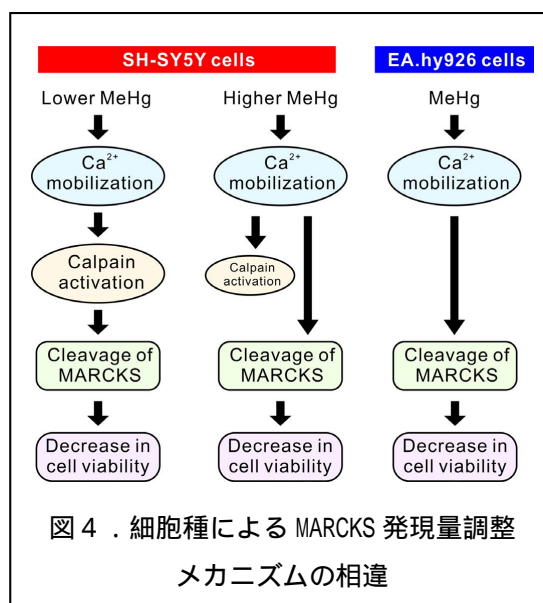
への MARCKS の関与が示唆されていることから、EA.hy926 細胞にメチル水銀を処置し MARCKS への影響を観察した。メチル水銀は濃度依存的に EA.hy926 細胞の細胞生存率低下および NO 産生量の低下を引き起こし、これに伴い MARCKS リン酸化量の増加と発現量の低下が認められた。また MARCKS ノックダウンにより、メチル水銀による細胞生存率および NO 産生量の低下が増強された。以上の結果から、MARCKS は血管内皮細胞の増殖や生理機能のみならず毒性物質に対する防御機構にも深く関与することが示唆された。

糖尿病モデルマウスを作成しその血管機能の異常について解析を行ったところ、血管内皮細胞および血管平滑筋の異常に起因すると考えられる変化が摘出血管における血管収縮測定実験において認められた。また内皮細胞における NO 産生量の低下が、血管収縮異常の原因の一つであることが示唆された(図3)。



培養細胞を用いた in vitro および糖尿病モデルマウスを用いた in vivo 実験でこれまでに得られた結果から、特に血管内皮細胞における MARCKS の重要な役割と病態との関連が示唆された。そこで血管内皮における MARCKS 発現量の調整メカニズムについて、その分子基盤をさらに明らかにすることを目的として実験を行った。カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインに注目し、MARCKS 発現量調整機構におけるその役割をカルパイン阻害薬 (MDL28170 および Calpeptin) を用いた薬理的解析および MARCKS ノックダウンなどの分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、神経細胞株 (SH-SY5Y 細胞) では、MARCKS 発現量の減少におけるカルパインの中心的な役割が示唆されたが、一方内皮細胞ではその関与が小さ

いと考えられた。以上の結果は、MARCKS 発現量の調整機構は細胞種により大きく異なることを示唆していると考えられた(図4)。糖尿病モデルマウスおよびメチル水銀中毒モデルにおける病態メカニズムを明らかにするため検討を行ったところ、これらのモデル動物では共通して血管内皮細胞および平滑筋細胞を中心とした以上が認められ、その分子基盤として活性酸素種や MARCKS リン酸化に寄与することが報告されている Rho キナーゼの関与が示唆された。



また、ラット平滑筋由来の細胞株である A10 細胞およびラット単離血小板においても MARCKS が発現していること、またホルボールエステル処置によるプロテインキナーゼCの活性化により MARCKS がリン酸化されることをウェスタンブロット法により確認した。さらに、A10 細胞ではメチル水銀の処置による細胞生存率の低下、MARCKS 発現量の減少および MARCKS リン酸化の増加が観察され、血管内皮細胞と同様に MARCKS が血管平滑筋における機能異常に関与する可能性が示された。また、血管内皮細胞に比べ血管平滑筋細胞はメチル水銀に対する高い感受性を示した。また、糖尿病では血小板活性化が亢進していることが知られていることから、糖尿病モデルラットから血小板を単離し、血小板における一酸化窒素合成酵素 (NOS)、ミオシン軽鎖 (MLC) および MARCKS の変化について検討した。糖尿病モデルラットでは、血糖値の増加に加え、トリグリセリドおよびコレステロールの増加が観察された。各種タンパク質の発現量やリン酸化量に有意な変化は認められず、実験条件や手法の最適化を含め、さらなる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

(1) Md. Zahorul Islam, Cuong Van Dao, Atsushi Miyamoto, Mitsuya Shiraishi. Rho-kinase and the nitric oxide pathway modulate basilar arterial reactivity to acetylcholine and angiotensin II in streptozotocin-induced diabetic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 390: 929-938, 2017 (査読有)
DOI: 10.1007/s00210-017-1396-x

(2) Cuong Van Dao, Mitsuya Shiraishi and Atsushi Miyamoto. The MARCKS protein amount is differently regulated by calpain during toxic effects of methylmercury between SH-SY5Y and EA.hy926 cells. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 1931-1938, 2017 (査読有)
DOI: 10.1292/jvms.17-0473

(3) Md. Zahorul Islam, Cuong Van Dao, Mitsuya Shiraishi, Atsushi Miyamoto. Methylmercury affects cerebrovascular reactivity to angiotensin II and acetylcholine via Rho-kinase and nitric oxide pathways in mice. *Life Sci.* 147: 30-38, 2016 (査読有)
DOI: 10.1016/j.lfs.2016.01.033

(4) Cuong Van Dao, Md. Zahorul Islam, Kasumi Sudo, Mitsuya Shiraishi and Atsushi Miyamoto. MARCKS is involved in methylmercury-induced decrease in cell viability and nitric oxide production in EA.hy926 cells. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 1569-1576, 2016 (査読有)
DOI: 10.1292/jvms.16-0249

〔学会発表〕(計 12 件)

(1) 白石光也, Dao Van Cuong, 宮本篤. MARCKS タンパク質を介するメチル水銀毒性におけるカルパインの関与. 第 70 回日本薬理学会西南部会, 2017.

(2) 白石光也. メチル水銀の細胞毒性 - 神経細胞と血管内皮細胞 -. 第 76 回日本公衆衛生学会総会, 2017.

(3) Cuong Dao, 白石光也, 宮本篤. Cleavage of MARCKS by calpain is involved in cytotoxicity of methylmercury in SH-SY5Y cells. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017.

(4) 白石光也. メチル水銀の毒性発現機構: 血管収縮機能への影響とそのシグナル伝達機構. 第 59 回日本平滑筋学会総会, 若手の会シンポジウム, 2017.

(5) 白石光也, Cuong Van DAO, 宮本篤. メチル水銀毒性におけるカルパイン活性化と

MARCKS 発現量の制御. 第 44 回日本毒性学会学術年会, 2017.

(6) 白石光也. メチル水銀による血管内皮細胞機能の障害と MARCKS タンパク質の関与. 平成 28 年度メチル水銀研究ミーティング, 2016.

(7) Cuong. V. Dao, 宮本篤, 白石光也. Role of MARCKS in endothelial cell functions and involvement in methylmercury toxicity. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016.

(8) 白石光也. メチル水銀毒性における MARCKS タンパク質の関与とそのリン酸化動態への影響. 平成 27 年度メチル水銀研究ミーティング, 2016.

(9) Cuong Dao Van, 白石光也, 宮本篤. Toxic effects of methylmercury on endothelial cell function and involvement of MARCKS. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015.

(10) Cuong. V. Dao, Md. Zahorul Islam, 宮本篤, 白石光也. Effect of methylmercury exposure during fetal and lactation period on the cardiovascular system in mice. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015.

(11) Md. Zahorul Islam, Cuong V. Dao, 白石光也, 宮本篤. Effect of in vivo exposure of low concentration of methylmercury on the cardiovascular system in adult mice. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015.

(12) Islam Md. Zahoru, Dao Van Cuong, 白石光也, 宮本篤. Methylmercury affects cerebrovascular reactivities to angiotensin II and acetylcholine via rho-kinase and NO pathways. 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者
白石光也 (SHIRAISHI, Mitsuya)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授
研究者番号: 20383656

(3) 連携研究者
宮本篤 (MIYAMOTO, Atsushi)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授
研究者番号: 70219806