

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460668

研究課題名(和文) アラームシグナル細胞外RNAの制御による血管恒常性維持

研究課題名(英文) The expression and localization of RNase and RNase inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells in homeostasis of the vascular system

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

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)：RNase活性の発現が高い血管内皮細胞と比較して血球からのRNase活性発現が低いことを明らかにした。mRNAレベル、タンパク質レベルの発現において、血管内皮細胞が血球よりRNase 1の発現が明らかに高いことに対し、RNase inhibitor (RI)の発現は細胞間で大きな差がないことから、血球ではRIがRNase 1を抑制していることが推測できる。

血管損傷部では高いRNase活性を持つ血管内皮細胞が損傷され、血小板、白血球が集まって血栓を形成することでRNase活性を低下させている機序が想定できる。炎症部位では活性化された血小板や白血球が病的な血栓形成を促進する可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文)：RNA may be released from vascular cells including endothelial cells in the event of injury and in vascular disease. RNase activity in the supernatant from the human umbilical vein endothelial cell line EAhy926 cells was 50 times than in blood cells (after 60 min). RNase 1 mRNA and protein expression in EAhy926 cells was highest among the cells examined. However, RNase inhibitor (RI) mRNA and protein expression was similar in most cell types examined. Furthermore, we observed that RNase 1 and von Willebrand factor were partially colocalized in EAhy926 cells and platelets. In conclusion, we propose that high RNase activity is ordinarily released from endothelial cells to support anticoagulation in the vasculature. On the other hand, platelets and leukocytes within thrombi at sites of vascular injury show very low RNase activity, which may support hemostatic thrombus formation. However, activated platelets and leukocytes may accelerate pathologic thrombus formation.

研究分野：血液凝固調節

キーワード：RNase RNase inhibitor (RI) 血管内皮細胞 血小板

1. 研究開始当初の背景

血管の損傷により細胞から放出される細胞外 RNA が新しい凝固促進因子、血管透過性因子であることをすでに我々は発見しているが、細胞外 RNA は RNase によって阻害される。8 種類ある RNase の中で、血漿中に最も多く含まれ、RNA 分解作用を強く持つ RNase 1 は膵臓や血管内皮細胞に発現することが知られているが、血球における詳細な発現や局在に関しては明らかではなかった。

2. 研究の目的

血管の恒常性に関与する RNase 1 と RNase inhibitor (RI) の血管内皮細胞と血球における発現と局在について研究を行った。

3. 研究の方法

RNase 1 とその阻害因子である RNase inhibitor (RI) の血管内皮細胞と血球（血小板、単核球、多形核顆粒球、赤血球）における発現と局在に関して、RNase 活性測定、RT-PCR、western blotting、免疫蛍光染色、透過電子顕微鏡法、免疫電子顕微鏡法 (pre- and post-embedding methods) といった様々な方法を用いて研究を行った。血管内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞株である EAhy926 を用いた。また、健常者由来の血液から分離した血小板、単核球、多形核顆粒球、赤血球を使用した。この研究は東京

医科歯科大学の倫理委員会の承認を得た (1487)。

4. 研究成果

血管内皮細胞が放出する RNase 活性は血球が放出する RNase 活性に比べて 50 倍高く (60 分後)、また時間が経つにつれて活性が上がっていることを明らかにした。RNase 1 の mRNA レベルの発現は血管内皮細胞が血球の 2.6 倍で最も高かったが、RI の mRNA レベルの発現に大きな差は見られなかった。タンパク質レベルの発現においても血管内皮細胞から放出される RNase 1 の発現は血球に比べて高く、RI の発現に差は見られなかった。この時 RNase 1 (28 kDa)、RI (48 kDa) のバンドの他に複合体とみられる分子量の大きなバンド (75 kDa) が見られたため、強力なカオトロピック剤である塩化グアニジウムを用いて複合体の分離を行い、その分離に成功した。

Post-embedding method を用いて血管内皮細胞と血小板における RNase 1 の局在を検討したところ、RNase 1 が von Willebrand factor (VWF) と一部共局在している様子が見られた。VWF は血管内皮細胞では Weibel-Palade bodies (WPB) と呼ばれる分泌小胞に、血小板では α 顆粒に局在することが知られているが、この方法では細胞小器官をはっきりと観察することはできなかった。そこで Pre-embedding method を用いたところ、Post-embedding method よりも鮮明な像を得

ることができた。以上より RNase 1 は VWF と血管内皮細胞では WPB で、血小板では α 顆粒で一部共局在していることを明らかにした。

免疫蛍光染色により、血小板にトロンピンを加えて活性化させることで、血小板中の RNase 1 の発現が活性化していない血小板より低下している様子が見られた。活性化されたことで脱顆粒が起こり、血小板中の RNase 1 が放出されたためだと考えられる。そこでトロンピン刺激した血小板上清中の RNase 1、RI のタンパク質レベルでの発現を刺激していないものと比べると、RNase 1、RI 共に発現が増加することがわかった。しかし RNase 活性に有意な差は見られなかった。RNase 1 と共に RI が放出されたことで、RI が RNase 活性を抑制している可能性が示唆された。

RNase 活性の発現が高い血管内皮細胞と比較して血球からの RNase 活性発現が低いことを明らかにした。mRNA レベル、タンパク質レベルの発現において、血管内皮細胞が血球より RNase 1 の発現が明らかに高いことに対し、RI の発現は細胞間で大きな差がないことから、血球では RI が RNase 1 を抑制していることが推測できる。

核を持たない血小板や赤血球において RNase 1 や RI の mRNA レベルでの発現が確認された。これらの大部分は血小板や赤血球に分化する前の巨核球、赤芽球で作られた mRNA の残滓だと推測できる。大変興味

深いことに血小板は核を持たないにも関わらずタンパク質の合成が可能である。また、トロンピンで刺激されることによりタンパク質合成が促進されることが報告されている。このことは今回の我々の結果とも合致する。

western blotting の結果に見られた RNase 1、RI よりも大きい分子量のバンドについて、当初 RNase 1 と RI が複合体を形成しているものだと推測した。なぜなら RNase 1 と RI は静電的に強く結合していることが知られており、その極めて強力な結合故に SDS-PAGE では分離することができなかったと考えたからだ。しかし血管内皮細胞上清中の RNase 活性が極めて高かったことを考慮すると、RI が RNase 1 と複合体を形成していることは考えにくい。それ故塩化グアニジニウムを用いて複合体から RNase 1 を分離することに成功したものの、RNase 1 と複合体を形成しているのは RI ではなく、RNase 1 自身や他のタンパク質であると推測できるが、それが何なのかは今後検討の必要がある。

これまでの研究から、血管損傷部では高い RNase 活性を持つ血管内皮細胞が損傷され、血小板、白血球が集まって血栓を形成することで RNase 活性を低下させている機序が想定できる。しかし炎症部位では活性化された血小板や白血球が病的な血栓形成を促進する可能性も考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Ohashi A, Murata A, Cho Y, Ichinose S, Sakamaki Y, Nishio M, Hoshi O, Fischer S, Preissner KT, Koyama T: The expression and localization of RNase and RNase inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells in homeostasis of the vascular system. PLoS ONE e0174237. 2017 Mar.

〔学会発表〕（計 3 件）

① Ohashi A, Cho Y, Ichinose S, Hoshi O, Koyama T: Analysis of the expression and localization of RNase and RNase inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells involved in homeostasis in the vascular system. The XXVth Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada, June, 2015.

② Ohashi A, Cho Y, Ichinose S, Hoshi O, Koyama T: Expression and localization of RNase and its inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells. 第 77 回日本血液学会総会 . 金沢 , 2015 年 10 月 17 日 .

③ Ohashi A, Cho Y, Ichinose S, Hoshi O, Koyama T: Analysis of the expression and localization of RNase and RNase inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells involved in blood coagulation. The 32nd

World Congress of Biomedical Laboratory Science. Kobe, Japan, September, 2016.

6. 研究組織

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先端血液検査学・准教授)

研究者番号：20234916