

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790646

研究課題名（和文） 炎症における凝固 XIII 因子の役割についての研究

研究課題名（英文） Roles of coagulation factor XIII in inflammation

研究代表者

惣宇利 正善 (SOURI MASAYOSHI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：20292419

研究成果の概要：リポポリサッカライドで惹起される炎症反応において、血漿中の凝固 XIII 因子が組織内の血管内皮傷害に応答した微小血栓形成に関与して出血を阻止すること、単球 / マクロファージ細胞内に存在する XIII 因子が傷害組織へのマクロファージの浸潤に寄与することが強く示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：XIII 因子、炎症、サイトカイン、細胞増殖、細胞分化、単球 / マクロファージ、巨核球 / 血小板

1. 研究開始当初の背景

凝固 XIII 因子 (FXIII) は A (FXIII-A), B (FXIII-B) 二種類のサブユニットから成り、止血、創傷治癒、血栓症、動脈硬化等に関わる重要な血漿蛋白質である。血液や細胞外マトリックスに豊富に存在するフィブリ(ノーゲン)、フィブロンectin、コラーゲン等の蛋白質は FXIII によって架橋結合され、その性質が強化されたり、新たな機能が付加されたりすることで、血管や組織の構造を保っていると推定される。

近年、血液凝固反応と炎症・免疫との密接な関係が臨床的にも注目されている。FXIII

については、血漿のみならず単球・マクロファージといった炎症性細胞内にも FXIII-A 単独で存在しており、最近、炎症反応の制御に働いている可能性を強く示唆する知見が熊本大の山本らやハンガリーの Adany らの試験管内での研究により得られている。

研究代表者の所属する研究室では、FXIII の生体内での機能および関連する病態のメカニズムを解明する目的で、FXIII-A, -B それぞれのノックアウト (KO) マウスを作製し、血漿 FXIII の欠損が雄マウスでの出血に起因した心筋線維化をもたらすこと、FXIII-A KO 雌マウスでは妊娠時に子宮からの致死性出

血が起こることを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、1) 炎症惹起物質であるリポポリサッカライド (LPS) の投与における野生型と FXIII 欠損マウスの病理像の比較と、2) 炎症刺激に対する FXIII 遺伝子の発現応答とそのメカニズムを検討することにより、炎症傷害における FXIII の関与の有無とその役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスを用いた解析

FXIII-A KO、FXIII-B KO いずれのマウスとも、野生型 C57BL/6J マウスとの交配を 10 世代以上に渡って繰り返すことにより、遺伝的背景を均一化して研究に用いた。キログラム体重あたり 5 mg の LPS (0111:B4; Sigma) を腹腔内に投与し、1、3、7 日後に後大静脈から血液を、大腿骨から骨髓を採取し、同時に心臓および肝臓を摘出した。ホルマリン固定した各臓器をパラフィン包埋後に切片を作製した。心臓と肝臓の切片について、抗 FXIII-A、抗フィブリノーゲン、抗 Mac-3 (単球/マクロファージを認識する) 抗体を用いた免疫組織染色を行なった。骨髓での FXIII-A 発現の変動を Western blot 法にて、肝臓での FXIII-B mRNA 発現を Northern blot 法にて解析した。血漿中の FXIII-A および FXIII-B の変動はそれぞれに対する特異抗体を用いた Western blot 法により解析した。

(2) 培養細胞を用いた転写調節領域の解析

巨核球系 MEG-01 細胞は 10% 仔牛血清を含む RPMI1640 培地で、肝癌由来 HepG2 細胞は 10% 仔牛血清を含む D-MEM 培地でそれぞれ培養した。マウス FXIII-A (mFXIII-A) および FXIII-B (mFXIII-B) 遺伝子の 5' 上流領域 DNA 断片はそれぞれマウスゲノム DNA ライブラリからクローニングした。それぞれ翻訳開始コドンの上流の約 3 kb の DNA 断片をルシフェラーゼレポーターベクター-pGL3 に挿入した。MEG-01 細胞にはエレクトロポレーション法により、HepG2 細胞へはリン酸カルシウム法により、ガラクトシダーゼ発現ベクターと共にルシフェラーゼベクターを導入した。LPS もしくは各サイトカインを培養培地に添加して 48 時間培養後に、細胞内のルシフェラーゼ活性およびガラクトシダ

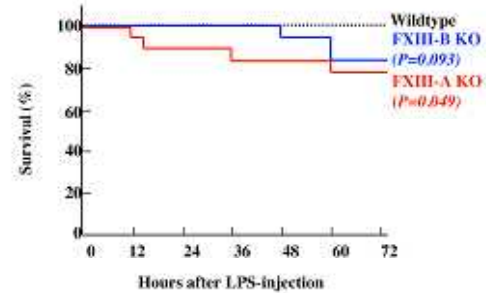


図1 LPS投与後の各マウスの生存率の変動

ーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) FXIII 欠損マウス個体における LPS 投与の影響

5 mg/kg 体重の LPS を腹腔内投与した場合、野生型マウス (n=16) では 1 匹も死亡しなかったのに対して、FXIII-A KO マウス (n=18) で 4 匹 ($P=0.049$)、FXIII-B KO マウス (n=18) では 3 匹 ($P=0.093$) が死亡した (図 1)。投与後の死亡時期は、FXIII-A KO マウス (36 時間以内に 3 匹) が FXIII-B KO マウス (48 時間以降) と比べ、より早期であった。死亡したマウスを解剖したところ、FXIII-A KO マウスでは腸管内、腹腔内、胸腔内に重度な出血が観察された。通常の飼育においても、FXIII-A KO マウスでは重度の出血を伴った死亡が高頻度に観察されており (惣宇ら、2008)、炎症傷害による FXIII-A KO マウスの止血異常の増悪が死因に関与していると思われる。一方、FXIII-B KO マウスでは明確な出血は確認されず、多臓器不全による死亡が疑われた。また、生存マウスにおいて、体重減少、活動性低下、眼脂といった所見は FXIII-A KO マウスでは野生型と同様に投与後 60 時間に渡って観察され、その後回復を認めたが、FXIII-B KO マウスでは投与 72 時間後においても活動性が低下していた。

続いて、LPS 投与後の心臓ならびに肝臓の組織像を各マウス間で経時的に比較検討した。投与 24 時間後の野生型マウスの心臓ならびに肝臓において、組織内での夥しい微小血栓が観察された (図 2)。これに対して、FXIII-A KO マウスでは、心臓、肝臓共に微小血栓がほとんど認められず、FXIII-B KO マウスにおいても野生型と比べて微小血栓の形成が減少していた。血漿中の FXIII-A が FXIII-B KO マウスでは著しく低下 (野生型マ

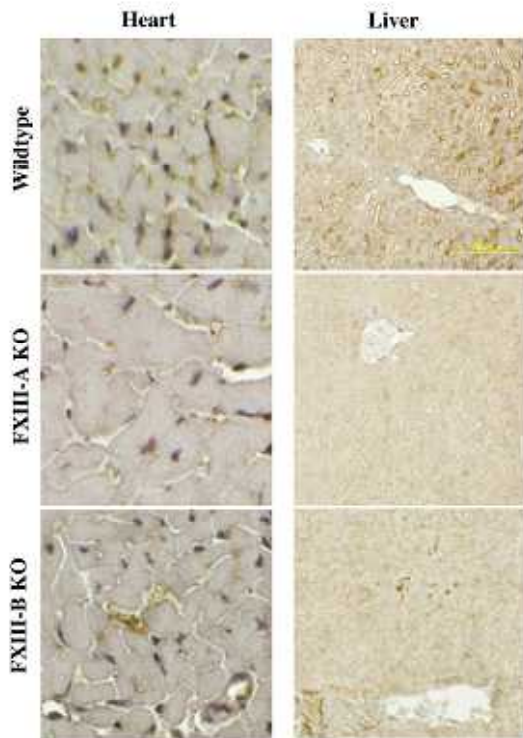


図2 LPS投与24時間後の心臓および肝臓における微小血栓

投与24時間後に摘出した心臓(上)と肝臓(下)の切片を製作し、抗フィブリノゲン抗体を用いて免疫染色を行った。

マウスの10%以下)していることから、LPSによる炎症の急性期における血管内皮傷害に際して、血漿FXIII-Aが強固な血栓形成によって出血阻止に寄与することが強く示唆された。

野生型マウスの心臓および肝臓において、LPSの投与後72時間をピークとして、FXIII-A陽性マクロファージの増加が観察された。そこで、LPS投与によるFXIII欠損マウスでの心筋内マクロファージの浸潤について検討した。LPS投与72時間後の心筋内マクロファージ数は、野生型マウスでは未投与時の3倍に増加したのに対して、FXIII-A KOマウスでは有意な増加を認めなかった(図3)。一方、FXIII-B KOマウスでは、野生型マウスと同様にLPS投与により非投与群の約3倍の心筋内マクロファージ数の増加が観察された。心筋での主要なマクロファージ化学誘引物質であるmacrophage chemoattract protein 1 (MCP-1)の心臓での産生をRT-PCRにより調べたところ、いずれのマウスにおいてもLPS投与によるMCP-1の顕著な産生増加が確認された(図3下右)。このことは、FXIII-A KOマウスのマクロファージ自身の走化性に障害がある可能性を示唆しており、FXIII-B KO

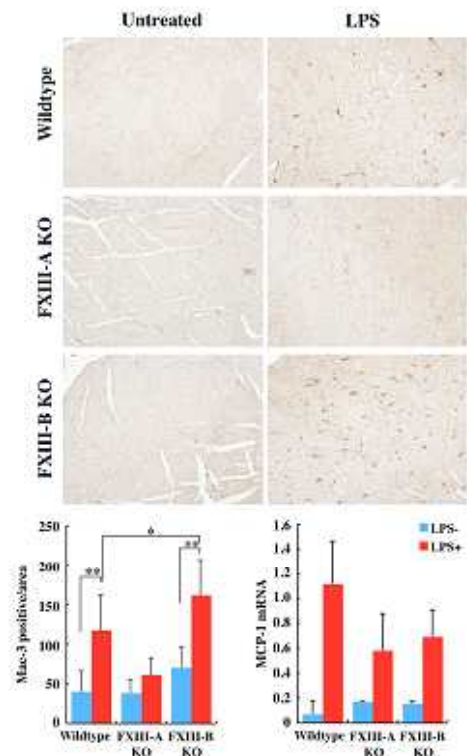


図3 LPS投与72時間後の心筋内へのマクロファージの浸潤

未投与およびLPS投与72時間後のマウスから摘出した心臓について、抗Mac3抗体を用いた免疫組織染色を行った。面積あたりのMac3陽性細胞数を計測して比較した。青は未投与群、赤はLPS投与群を表す。1個体あたり10カ所ずつ、各群3個体ずつ計測した(下左)。LPS投与72時間後の心臓におけるMCP-1の発現をRT-PCR解析した。

マウスでは細胞内FXIII-Aが野生型マウスと同等に存在し、マクロファージの浸潤も野生型と同様にLPS投与で増加することから、細胞内FXIII-Aの細胞走化性への関与が予測される。

(2) 炎症刺激に対するFXIIIの発現応答

野生型マウスにおけるLPS投与後のFXIII量の変動を調べた。血漿中のFXIII-AはLPS投与後7日にわたり時間経過に従って減少していた(図4)。血漿FXIII-Aの主要な産生場である骨髄では、LPS投与24時間後には著しくFXIII-Aの産生が減少し、その後も産生は抑制されていたことから、血漿FXIII-Aの減少は、骨髄での産生・供給停止の結果としての残存FXIII-Aのターンオーバー(半減期)に基づくものと推測された。

一方、FXIII-Bは専ら肝臓において産生されるが、LPS投与24時間後に発現の抑制が認められたものの72時間後には未投与と同等レベルに回復しており、血漿中のFXIII-B抗原は投与後も変動を示さなかった(図4)。

マウスFXIII-A (mFXIII-A)およびFXIII-B

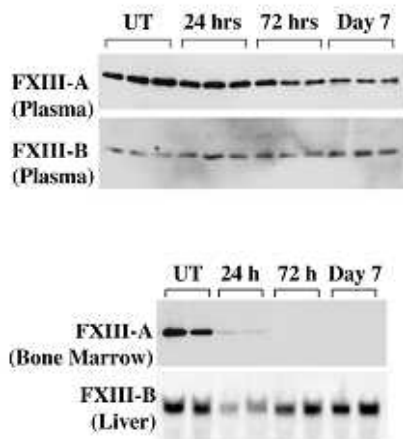


図4 野生型マウスにおけるLPS投与後のFXIIIの血中量および産生量の変動

未投与およびLPS投与24, 72時間および7日後の野生型マウスについて、血漿中のFXIII-A、-B量（各時間3個体ずつ）、および骨髄でのFXIII-A産生量（2個体ずつ）の変動をWestern blot法により、肝臓でのFXIII-B産生量（2個体ずつ）をNorthern blot法によりそれぞれ解析した。

遺伝子（mFXIII-B）それぞれの5'近傍領域のプロモーター活性に対するLPS及び炎症性サイトカインの影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。pGL3/mFXIII-A（mFXIII-A遺伝子上流の約3 kbのDNA断片をルシフェラーゼ遺伝子上流に連結したベクター）を導入した巨核球系MEG-01細胞をLPSで処理した場合、未処理と比べてわずかにルシフェラーゼ活性の低下が認められた（図5）。TNF処理した場合、約40%にまで活性が低下したが、プロモーター断片を持たないルシフェラーゼベクター（pGL3-Basic）においても同等の低下が見られたことから、mFXIII-A遺伝子に特異的な応答ではないと判断された。また、IL-6およびTGFβ添加による影響は認められなかった。

一方、mFXIII-B遺伝子の翻訳開始コドンから上流約3 kbのDNA断片を導入したルシフェラーゼベクター（pGL3/mFXIII-B）を肝癌由来HepG2細胞に導入して解析した。LPSによるルシフェラーゼ活性の低下は認められないものの、IL-6による有意な低下が観察された（図5）。TNF処理による活性低下はmFXIII-Aと同様、非特異的な応答であると考えられた。

LPSを投与したマウスの骨髄では著しいFXIII-A産生の低下が観察されたにもかかわらず、LPSや炎症性サイトカインによるmFXIII-A 5'近傍領域のプロモーター活性への影響は小さい。LPS投与24時間後の骨髄の細胞像は劇的に変化しており（図6）、

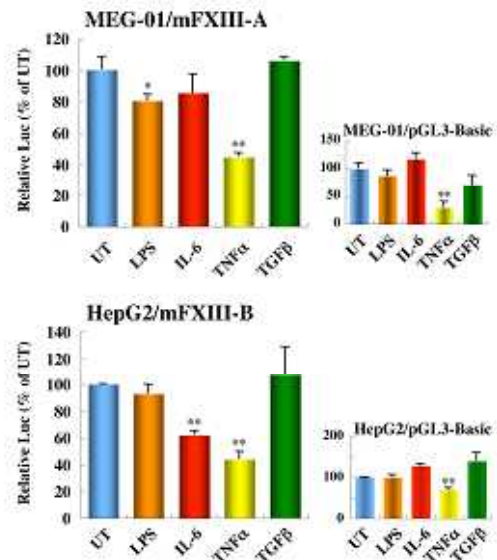


図5 FXIII-AおよびFXIII-B遺伝子5'近傍領域のプロモーター活性におけるLPSならびに炎症性サイトカインの影響

pGL3/mFXIII-Aは巨核球系MEG-01細胞に、pGL3/mFXIII-Bは肝癌由来HepG2細胞にそれぞれ導入し、LPSあるいは炎症性サイトカインを培養培地に添加して24時間インキュベートした後のルシフェラーゼ活性を測定した。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$

mFXIII-A発現の抑制よりもむしろFXIII-A産生細胞の消失がLPS投与による主なFXIII-A産生低下の原因と推測される。一方、肝臓におけるFXIII-Bの一過的な産生低下は、LPS刺激により誘導されるIL-6がmFXIII-Bの転写を抑制するためと考えられる。

(3) 総括と今後の展望

本研究では、LPSで惹起される炎症反応において、血漿中のFXIII(-A)が組織内の血管内皮傷害に応答した微小血栓形成に関与し、出血を阻止すること、単球/マクロファージ細胞内に存在するFXIII-Aが傷害組織へのマクロファージの浸潤に寄与することが強く示唆された（図7）。LPSによって血中のFXIII-Aが減少するが、FXIII-A遺伝子の転写発現の抑制よりもむしろ、骨髄内の産生細胞の減少・消失による産生低下、IL-6増加による肝臓でのFXIII-B産生の一過的な低下、および

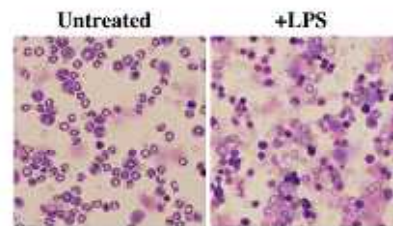


図6 LPS投与後の骨髄の細胞像

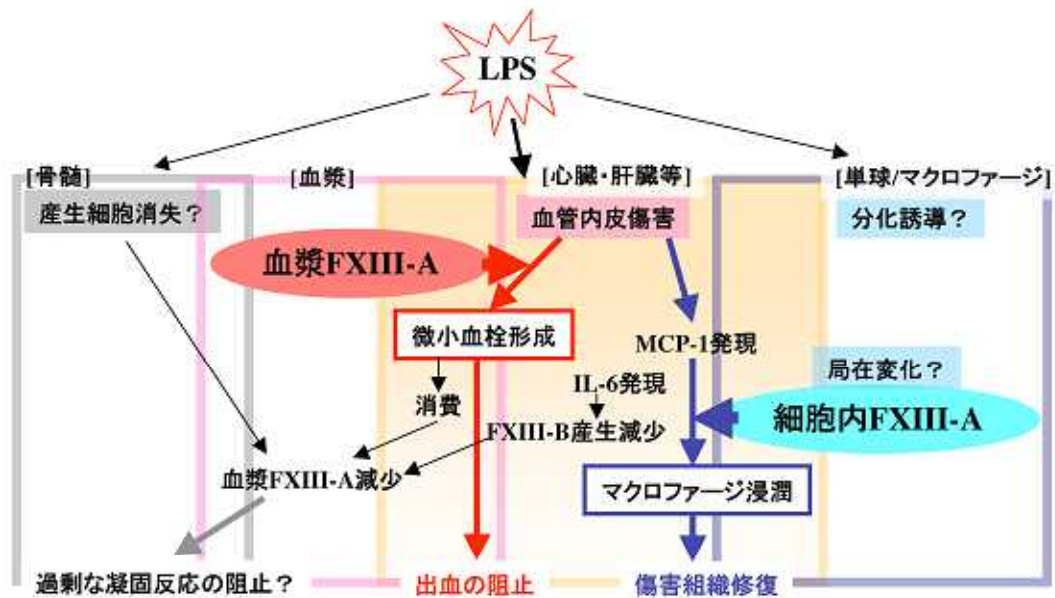


図7 LPS惹起炎症反応におけるFXIIIの動態と役割 (仮説)
MCP-1: Macrophage chemoattractant protein 1

血栓形成による消費が原因である可能性が示された。

これまで、細胞内 FXIII-A については、明確な機能・生理的な役割に曖昧な点が多く、本研究でのマクロファージ浸潤に関する知見は極めて意義深く重要であると考えられる。今後、FXIII-A 欠損マクロファージの走化性を *in vitro* で検討することで、組織内浸潤における FXIII-A の役割がより明確にされると期待される。また、FXIII-A が細胞内で様々な存在・局在を示すことを我々は以前より見出し、細胞の走化性における FXIII-A 局在の変化を動的に解析することで、そのメカニズムを明らかにしていきたい。

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 5 件)

惣利正善：凝固 XIII 因子欠損マウスにおけるオス特異的な心臓傷害．日本血栓止血学会誌，2009；20(1)：37-47. 査読無(依頼論文)

Souri M, Kaetsu H, Ichinose A: Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly. *Biochemistry* 2008; 47(33): 8656-64. 査読有

Palumbo JS, Barney KA, Blevins EA, Shaw MA, Mishra A, Flick MJ, Kombrinck KW, Talmage KE, Souri M, Ichinose A, Degen JL: Factor XIII transglutaminase supports hematogenous tumor cell metastasis through a mechanism dependent on natural killer cell function. *J Thromb Haemost* 2008; 6(5): 812-9. 査読有

Souri M, Koseki-Kuno S, Takeda N, Yamakawa M, Takeishi Y, Degen JL, Ichinose A: Male-specific cardiac pathologies in mice lacking either the A or B subunit of factor XIII. *Thromb Haemost* 2008; 99(2): 401-8. 査読有

Souri M, Koseki-Kuno S, Takeda N, Degen JL, Ichinose A: Administration of factor XIII B subunit increased plasma factor XIII A subunit levels in factor XIII B subunit knock-out mice. *Int J Hematol* 2008; 87(1): 60-8. 査読有

[学会発表](計 10 件)

Souri M, Koseki-Kuno S, Takeda N, Yamakawa M, Takeishi Y, Degen JL, Ichinose A: Male-specific cardiac pathologies in mice lacking either the A or B subunit of factor XIII. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 学術奨励賞受賞講演, 大阪; 2008 年 11 月 20 日 ~ 22 日

Ichinose A, Kasahara K, Kaetsu H, Souri M: Moving Outside: Translocation of a 'Cytosolic' Transglutaminase, the A Subunit of Coagulation Factor XIII. The 34th JSBBA Symposium on Chemistry and Biology, Nagoya; 2008年9月27日

惣宇利正善, 一瀬白帝: 血漿トランスグルタミナーゼ(凝固 XIII 因子)の細胞内局在と機能. BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会)ワークショップ, 横浜; 2007年12月11日~15日

澤田暁宏, 日笠 聡, 徳川多津子, 角田ちぬよ, 小川啓恭, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 後天性凝固第 XIII 因子欠乏が原因と考えられた筋肉内血腫の1例. 第30回日本血栓止血学会学術集会, 三重; 2007年11月15日~17日

西川拓朗, 川上 清, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 一過性に凝固第 XIII 因子活性の著明な低下を認めた頸部リンパ管腫の1例. 第30回日本血栓止血学会学術集会, 三重; 2007年11月15日~17日

安藝 薫, 桑原健太郎, 前田美穂, 福永慶隆, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 遷延する血液凝固第 XIII 因子活性低下を認めた反復性脳内出血の1男子例. 第30回日本血栓止血学会学術集会, 三重; 2007年11月15日~17日

一瀬白帝, 惣宇利正善, 雀部 誠, 小谷信行, 溝部貴光, 田中 綾, 塚田順一, 石田文宏, 伊藤俊朗, 杉田憲一, 安藝 薫, 澤田暁宏, 日笠 聡, 西川拓朗, 江浦瑠美子, 川上 清: 原因不明の後天性 XIII 因子欠乏症の診断と管理: 抗体は必ずしも全例の原因ではない. 第30回日本血栓止血学会学術集会, 三重; 2007年11月15日~17日

溝部貴光, 田中 綾, 白幡 聡, 塚田順一, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 第 XIII 因子インヒビター(自己抗体)による後天性第 XIII 因子欠乏症の2例. 第30回日本血栓止血学会学術集会, 三重; 2007年11月15日~17日

一瀬白帝, 久野・小関しおり, 惣宇利正善: 凝固 XIII 因子ノックアウトマウスの分子病態; 病因論の一元化と新しい機能/機構の追究. 第69回日本血液学会 第49回日本臨床血液学会 合同総会 学会シンポジウム, 横浜; 2007年10月11日~13日

惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝: 細胞膜ラフトにおける XIII 因子 A サブユニットの局在. 第29回日本血栓止血学会, 宇都宮; 2006年11月16日~18日

[図書](計1件)

惣宇利正善, 一瀬白帝: 遺伝子クローニングと塩基配列決定法. 一瀬白帝・鈴木宏治編, 図説・分子病態学(改訂4版), 東京; 中外医学社, 2008; 142-7.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

惣宇利 正善 (SOURI MASAYOSHI)
山形大学・医学部・講師
研究者番号: 20292419

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者