

## 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 31 日現在

機関番号：11501  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590281  
 研究課題名（和文） マクロファージの組織内浸潤における凝固 XIII 因子の役割の解明  
 研究課題名（英文） Role of coagulation factor XIII in invasion of macrophages  
 研究代表者  
 惣宇利 正善 (SOURI MASAYOSHI)  
 山形大学・医学部・准教授  
 研究者番号：20292419

### 研究成果の概要（和文）：

マクロファージの組織内浸潤における凝固 XIII 因子(FXIII)の役割について検討した。FXIII の酵素部位である A サブユニット(FXIII-A)欠損マウス由来のマクロファージは、野生型と比べて走化性に低下傾向を示した。炎症を誘導した野生型マウスの心臓では I 型コラーゲンの沈着が増加し、マクロファージはコラーゲン沈着部位に浸潤していたのに対して、FXIII-A 欠損マウスでは I 型コラーゲンの沈着増加は認められなかった。本研究の結果、マクロファージ細胞内の FXIII-A が走化性に関与するとともに、傷害組織におけるマクロファージ浸潤の足場としての I 型コラーゲンの産生・沈着に寄与する可能性が強く示唆された。

### 研究成果の概要（英文）：

A possible role of coagulation factor XIII (FXIII) in invasion of macrophages was examined using catalytic A subunit of FXIII (FXIII-A)-deficient mice. FXIII-A-deficient macrophages showed lower chemotactic ability than wildtype cells, although it was not stationary significant. In the heart tissue of lipopolysaccharide (LPS)-treated wildtype mice, type I collagen transiently increased lesions where macrophages invaded. In contrast, deposition of type I collagen hardly increased in heart of FXIII-A-deficient mice treated with LPS. Thus, it was suggested that FXIII-A inside cells involved in chemotaxis of macrophages, and FXIII-A contributed to increase of type I collagen deposition in damaged tissues.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：XIII 因子、架橋結合、炎症と血液凝固、単球、マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

凝固 XIII 因子 (FXIII) は蛋白質分子間の架橋結合を触媒するトランスグルタミナーゼの一員であり、血漿においては、出血に応じてフィブリン分子同士やフィブリンと  $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター、フィブロネクチン等を架橋して、止血の維持と創傷治癒に働く。FXIII は酵素本体である A サブユニット (FXIII-A) と FXIII-A の安定化に働く B サブユニット (FXIII-B) のそれぞれ 2 つずつから成る異種四量体として血中に存在する。

FXIII-A は骨髄由来の単球・マクロファージや巨核球・血小板等で産生されており、これらの細胞内で FXIII-B とは独立して存在する。細胞内の FXIII-A について、活性を伴い核内にも存在することや、食作用に関与すること、および、単球や線維芽細胞の接着と走化性を活性化した細胞外 FXIII が促進することが報告されている。われわれは、巨核球系の培養細胞において、FXIII-A が中間径フィラメントタンパク質であるビメンチンと核周辺および膜ラフトに共局在することを見出し、また、酵母 Two-hybrid 法を用いたスクリーニングにより、骨髄 cDNA ライブラリから FXIII-A と相互作用する分子としてアクチン等の細胞骨格関連分子を同定されたことから、細胞の形態や運動性において、細胞内 FXIII-A が重要な役割を果たしていると推定している。

マクロファージは血中を循環する単球から分化したもので、様々な組織に存在する。感染・炎症や組織傷害時にリンパ球から放出される種々のサイトカインやリポポリサッカライド (LPS) 等のエンドトキシンにより活性化し、細菌・ウイルスや死んだ細胞を食作用により除去して防御と組織修復に働くとともに、抗原提示による免疫制御を行なう。

われわれのこれまでの研究で、FXIII-B 欠損雄マウスの心臓線維化部位において、多数の FXIII-A 陽性マクロファージの集積が観察されていること、野生型マウスで LPS 投与により誘導される心筋内でのマクロファージの増加が FXIII-A 欠損マウスでは起こらず、FXIII-B 欠損マウスでは逆に野生型マウスよりも増加する傾向にあることから、細胞内外の FXIII-A がマクロファージの組織内への浸潤に何らかの役割を担い、傷害組織の修復に寄与すると仮定するに至った。

## 2. 研究の目的

野生型マウスで起こる LPS 投与後の組織内のマクロファージ数の増加が、なぜ FXIII-A 欠損マウスでは起こらないのか、その理由を明らかにし、炎症期のマクロファージの組織内浸潤における FXIII の役割とそのメカニズムを突き止めることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究の組換え DNA 実験については山形大学遺伝子組換え実験委員会の、動物実験については山形大学動物実験委員会の承認を得て行った。

[マウス個体の解析] FXIII-A 欠損、FXIII-B 欠損いずれのマウスとも、野生型 C57BL/6J マウスとの交配を 10 代以上にわたって繰り返すことにより遺伝的背景を統一して、研究に用いた。体重 kg 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、大腿骨から骨髄を採取し、同時に心臓を摘出した。血液中の各血球数は、多項目自動血球測定装置 (Vet Scan HMII, Hematology System) を用いて計測した。血球および骨髄細胞を FXIII-A や種々の細胞表面マーカーに対する抗体で標識して、FACS Canto II (BD Bioscience) を用いて解析した。心臓から acid guanidinium-phenol-chloroform 法により RNA を抽出して、RT-PCR 法によりマクロファージ化学誘引物質 (MCP-1) mRNA の発現を調べた。ホルマリン固定後にパラフィン包埋した心臓の連続切片を作製し、FXIII-A、I 型および IV 型コラーゲン、フィブロネクチン、マクロファージ (F4/80) それぞれに対する抗体を用いて免疫組織染色して、画像解析ソフト (Image J, National Institute of Health, 米国) を用いて解析した。

[細胞を用いた解析] マクロファージはマウスの腹腔から直接採取した。また、骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 添加培地中で培養してマクロファージに分化させた。マクロファージおよび単球系培養細胞 THP-1 の走化性は、カルチャーインサートを用いてボイデンチャンバー法により測定した。I 型・IV 型コラーゲンあるいはフィブロネクチンをコートした培養プレートを用いて、THP-1 細胞の付着性を検討した。また、骨髄細胞について、幹細胞因子 (SCF)、インターロイキン (IL)-3, IL-6, エリスロポエチン (EPO) 存在下、あるいは

M-CSF 存在下でコロニー形成試験を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) マクロファージの走化性に対する FXIII-A 欠損の影響

マウス腹腔内から採取したマクロファージの走化性を検討したところ、FXIII-A 欠損マクロファージについて、仔牛血清や MCP-1 に対する走化性が、有意差はないものの野生型よりも低い傾向が示された。同様に、骨髓細胞から *in vitro* で分化させたマクロファージについても、FXIII-A を欠損した場合の走化性の低下傾向が認められた。FXIII-A に対する抗体を処理した場合に野生型マクロファージの走化性に影響を与えなかったことから、少なくとも細胞表面に存在する FXIII-A は細胞の走化性には寄与しないことが示唆された。我々のこれまでの研究において、FXIII-A が中間径フィラメント（ビメンチン）と共局在をすること、アクチンと相互作用することを見出しており、細胞内に存在する FXIII-A が細胞骨格の再構成に寄与して走化性に関与する可能性が示唆された。

##### (2) LPS 投与後の心臓における変化

組織内へのマクロファージの浸潤は組織内での走化性因子である MCP-1 の産生に起因することから、LPS 投与後の心臓における MCP-1 の発現を RT-PCR 法により調べたところ、野生型マウスと同様に FXIII-A 欠損マウスにおいても LPS による MCP-1 mRNA 発現の誘導が確認された。

傷害組織の修復にかかわる細胞外マトリックス（I 型および IV 型コラーゲン、フィブロネクチン）の産生・沈着について、免疫組織染色により検討したところ、野生型マウスの心臓では組織内マクロファージが増加する LPS 投与 3 日後に I 型コラーゲンが一過的に増加したのに対して、FXIII-A 欠損マウス

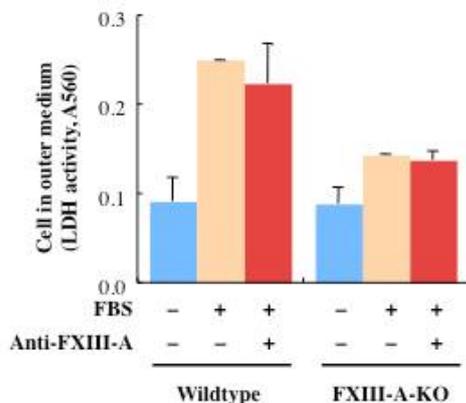


図1 腹腔内マクロファージの仔牛血清に対する走化性

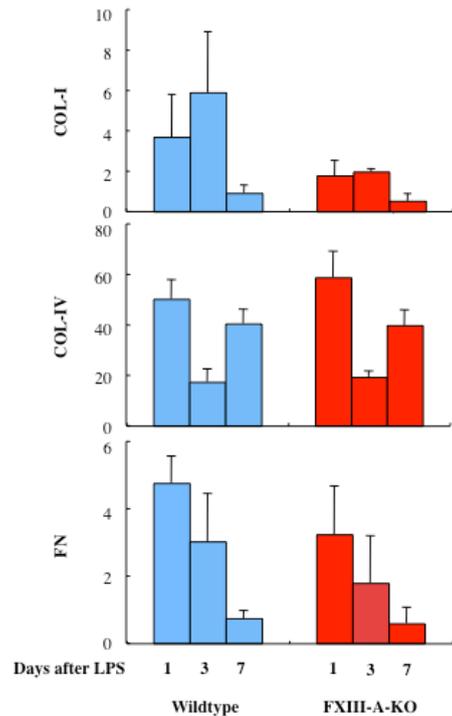


図2 LPS 投与後の心臓内の I 型・IV 型コラーゲン (COL-I, COL-IV) およびフィブロネクチン (FN) 沈着の変化

ではほとんど増加がみられなかった。IV 型コラーゲンとフィブロネクチンの変動は、野生型と FXIII-A 欠損マウスの間で違いが認められなかった。また、野生型マウスの心臓に浸潤したマクロファージが I 型コラーゲンの沈着部位に存在することを免疫二重染色により確認した。

単球系 THP-1 細胞を用いて細胞外マトリックスに対する付着性を検討したところ、短時間（1～数時間）においては I 型コラーゲンに対する強い付着性を示した。この付着性は抗 FXIII-A 抗体による影響を認めなかった。以上の結果から、LPS 投与後の心臓におけるマクロファージの浸潤の増加が I 型コラーゲンの産生（沈着）に依存する可能性があること、FXIII-A は単球/マクロファージの付着性には関与せず、I 型コラーゲンの産生もしくは沈着に寄与することが示唆された。

##### (3) 血球分化における FXIII-A の関与

血中を循環する単球を含む血球の LPS 投与後の変動を調べたところ、LPS 投与前は FXIII-A 欠損マウスでは野生型マウスと比べて単球が有意に多いこと、LPS 投与後は野生型と FXIII-A 欠損マウス間の単球数の差がなくなるのに対して、一時的に増加したリンパ球と顆粒球が野生型マウスより早く減少することが示された。これらの結果は、FXIII-A 欠損マウスにおけるマクロファージの組織内浸潤の欠如が、循環中の単球数の低下によ

るものではないことを確認するものであり、一方で、FXIII-A が血球の分化に関与する可能性を示唆するものである。

骨髄の FACS 解析において、LPS 投与後の FXIII-A 欠損マウスは野生型とは著しく異なる細胞分布を示し、特に多染性赤芽球の増加を認めた。また、野生型マウスにおいて、LPS 投与後に FXIII-A 陽性かつ CD34 陽性細胞の一過的な増加を示すこと、CD34 陽性細胞増加の程度が野生型マウスに比べて FXIII-A 欠損マウスでは極めて低いことが示された。骨髄細胞のコロニー形成試験では、FXIII-A 欠損骨髄細胞において顆粒球マクロファージ形成単位(CFU-GM)が有意に多く、逆に顆粒球形成単位(CFU-G)は有意に少なかった。これらの結果から、血球分化における FXIII-A の関与が強く示唆された。

本研究で、マクロファージの組織内浸潤において、FXIII-A は細胞内から細胞の走化性を制御し、かつ傷害組織における I 型コラーゲンの沈着を促進している可能性が強く示唆された。また、特に炎症の急性期において、比較的幹細胞に近い段階から FXIII-A が血球の分化を制御している可能性が新たに浮上した。今後は、I 型コラーゲンの沈着における FXIII-A 関与のメカニズムを解明するとともに、血球分化を制御するメカニズムについても検討を進める予定である。

#### 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 12 件)

- ① Kawano H, Yamamoto D, Uchihashi Y, Wakahashi K, Kawano Y, Sada A, Minagawa K, Katayama Y, Kohmura E, Souri M, Ichinose A. Severe inhibitor-negative acquired factor XIII/13 deficiency with aggressive subdural haemorrhage. *Blood Coagul Fibrinolysis*. (査読有) 2013 印刷中  
doi: 10.1097/MBC.0b013e32835facef
- ② Zhang WG, Souri M, Ichinose A. Proteosomal degradation of naturally recurring R260C missense and exon-IV deletion mutants of factor XIII A-subunit expressed in mammalian cells. *Haemophilia*. (査読有) 2013;19:415-419.  
doi: 10.1111/hae.12072.
- ③ Wada H, Souri M, Matsumoto R, Sugihara T, Ichinose A. Alloantibodies against the B subunit of plasma factor XIII developed in its congenital deficiency. *Thromb Haemost*. (査読有) 2013;109:661-668.  
<http://dx.doi.org/10.1160/TH12-12-0936>
- ④ Sugiyama H, Uesugi H, Suzuki S, Tanaka K, Souri M, Ichinose A. Aggressive fatal case of autoimmune hemorrhaphilia resulting from anti-Factor XIII antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis*. (査読有) 2013;24:85-89.  
doi: 10.1097/MBC.0b013e328358e8e7.
- ⑤ Matsuoka M, Majima T, Onodera T, Ieko M, Souri M, Ichinose A, Kurita T, Kasahara Y, Inoue M, Takahashi D. Hemorrhagic-acquired factor XIII deficiency associated with tocilizumab for treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Hematol*. (査読有) 2012;96:781-785.  
doi: 10.1007/s12185-012-1191-x.
- ⑥ Maeda S, Zhang WG, Souri M, Yee VC, Ichinose A. Impaired dimer assembly and decreased stability of naturally recurring R260C mutant A subunit for coagulation factor XIII. *J Biochem*. (査読有) 2012;152:471-478.  
doi: 10.1093/jb/mvs088.
- ⑦ Souri M, Yee VC, Fujii N, Ichinose A. Molecular modeling predicts structural changes in the A subunit of factor XIII caused by two novel mutations identified in a neonate with severe congenital factor XIII deficiency. *Thromb Res*. (査読有) 2012;130:506-510.  
doi: 10.1016/j.thromres.2012.05.003.
- ⑧ Hayashi T, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H, Souri M, Ichinose A. A case of acquired FXIII deficiency with severe bleeding symptoms. *Haemophilia*. (査読有) 2012;18:618-620.  
doi: 10.1111/j.1365-2516.2012.02763.x.
- ⑨ Fujii N, Souri M, Ichinose A. A short half-life of the administered factor XIII (FXIII) concentrates after the first replacement therapy in a newborn with severe congenital FXIII deficiency. *Thromb Haemost*. (査読有) 2012;107:592-4.  
<http://dx.doi.org/10.1160/TH11-09-0625>

⑩ Ichinose A, Souri M. Reduced difference of  $\alpha$ - $\kappa$ -plasmin inhibitor levels between plasma and serum in patients with severe factor XIII deficiency, including autoimmune hemorrhaphilia due to anti-factor XIII antibodies. *Int J Hematol.* (査読有) 2012; 95:47-50. doi: 10.1007/s12185-011-0992-7

⑪ Ichinose A, Souri M; Japanese collaborative research group on "Acquired haemorrhaphilia due to factor XIII deficiency". As many as 12 cases with haemorrhagic acquired factor XIII deficiency due to its inhibitors were recently found in Japan. *Thromb Haemost.* (査読有) 2011;105:925-927. doi: 10.1160/TH10-11-0724.

⑫ Ishida F, Okubo K, Ito T, Okumura N, Souri M, Ichinose A. Spontaneous regression of the inhibitor against the coagulation factor XIII A subunit in acquired factor XIII deficiency. *Thromb Haemost.* (査読有) 2010; 104:1284-1285. doi: 10.1160/TH10-06-0355.

[学会発表] (計 6 件)

① 惣宇利正善, 尾崎 司, 一瀬白帝: 後天性血友病 XIII/13 における抗 XIII 因子自己抗体の阻害特性. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡); 2012 年 12 月 14-16 日

② 惣宇利正善, 一瀬白帝: 凝固 XIII 因子 A サブユニット欠損マウスにおける血球の分化について. 第 34 回日本血栓止血学会学術集会, ハイアットリージェンシー東京 (東京); 2012 年 6 月 7-9 日

③ 惣宇利正善, 一瀬白帝: 生体内における細胞内凝固 XIII 因子 A サブユニットの新たな機能. 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム [1S14p トランスグルタミナーゼ (タンパク質架橋化酵素) の進化と機能分化], 国立京都国際会館 (京都); 2011 年 9 月 21-24 日

④ Souri M, Iwata H, Zhang WG, Ichinose A: Biochemical characterization of anti-factor XIII autoantibodies in patients with hemorrhagic acquired factor XIII deficiency. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2011) and 57th

Annual SSC Meeting, July 23-28, 2011, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)

⑤ 惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: 妊娠期の止血における凝固 XIII 因子陽性細胞の存在意義. BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同年会, 神戸ポートアイランド (神戸); 2010 年 12 月 7-10 日

⑥ 惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: マクロファージのエンドトキシン誘導性組織内浸潤における XIII 因子の関与. 第 33 回日本血栓止血学会学術集会, 城山観光ホテル (鹿児島); 2010 年 4 月 22-24 日

[図書] (計 1 件)

① 惣宇利正善, 一瀬白帝; 第 XIII 因子 A および B サブユニット欠損症. 別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ No.22 血液症候群 (第 2 版) II—その他の血液疾患を含めて—, 2013; 539-544.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/MolPathoBiochem/Bunbyo.html>

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・准教授

研究者番号: 20292419