

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893300

研究課題名(和文)凝固因子の新しい受容体による凝固・血栓形成機構の解明

研究課題名(英文) Study of coagulation and thrombogenic system via the coagulation factor and the its new receptor.

研究代表者

藤田 佳子 (FUJITA, YOSHIKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30416218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血液凝固システムの新しいメカニズム、それによる血栓形成機構を解明することを目的とした。そして、凝固因子Aと新規受容体Bの相互作用による血漿、再構成系でのトロンビン活性化促進作用、凝固促進効果が明らかになった。

本研究の結果より、これまでに知られていない機構により、凝固系の活性化が促進することが明らかになった。本研究で、既知の凝固因子カスケードに、それを促進方向に修飾する新しい因子を見出したことにより、止血・血栓・凝固の生理的・病態生理的メカニズムを再考する機会をつかむことができたと考えられる。これにより、病的凝固・血栓の未解明の病態を解く糸口になることを期待している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the new mechanism of blood coagulation system. In this study, the interaction of coagulation factor A and the its new receptor B caused acceleration of thrombin production and blood coagulation by the serial measurement of thrombin activation in normal human plasma and reconstitution system.

We have unraveled the new mechanism which accelerates the activation of coagulation system. It was a chance to rethink of the physiological and pathophysiological mechanism of hemostasis-thrombus-coagulation. We expect that this study will find the resolution key to pathological coagulation thrombus.

研究分野：薬理学

キーワード：血管 血液

1. 研究開始当初の背景

血栓塞栓症は、脳梗塞、心筋梗塞、肺塞栓症などを引き起こす。血栓形成、血栓のできやすさは、血管機能の病理的变化と結びついていると古くから考えられてきた。Virchow's triad として知られるように、向血栓性は血液・血流・血管壁の3者の病理的变化と結びついている。つまり、血液の粘稠度の増加、繊維素溶解活性低下、血液凝固因子の増加、血流の緩慢、血管内皮障害が血栓形成の要因となる。

近年、血液性状の変化に着目した、抗凝固薬が登場してきた。これまでに用いられてきた経口抗凝固薬ワルファリンに代わり、トロンピン阻害薬、第 Xa 因子阻害薬という新薬が開発されてきた。しかし、これらの新薬にも出血のリスクが付きまとうため、さらに、それらの阻害薬について研究が行われているのが現状であり、凝固因子だけでは、凝固血栓形成のメカニズムは未だ明らかになっていない。

血漿中に存在する凝固関連蛋白質は、通常非活性化状態で存在し、活性化されてフィブリン形成に至るカスケード反応を引き起こす。組織因子により活性化される外因系経路、コラーゲンなどとの接触により開始される内因系経路があるが、これまでの研究から、凝固カスケードの最初期は組織因子により外因系が開始すること、そして決定的な増幅が内因系経路によってなされることがわかってきた。

このような中で、申請者は、凝固因子 A とその新規受容体 B の相互作用によって、血液凝固が促進される現象を見出した。既存の抗凝固薬が標的としてこなかった凝固因子 A が、他の凝固因子のような血漿タンパク質ではなく細胞膜上に存在する受容体 B と相互作用することで、凝固カスケードの活性化を調節している可能性が出てきた。

2. 研究の目的

本研究は、血液凝固系の新しい活性化機構を解明することを目的とする。止血、血液凝固は古くから知られており、30年間新しい発見がなかった。しかし、本研究で凝固系カスケードに新しい因子が加わることを解明することで、凝固・血栓の新しい治療へ発展する可能性がある。

このベースとなるのは、凝固因子 A と新規受容体 B の相互作用による血液凝固の促進という観察である。これまで、血管内皮障害に目を向けた研究がなされてきた新規受容体 B による凝固因子 A と新規受容体 B の相互作用が血栓塞栓症に与える意義、そして、この新しい凝固機構での血栓塞栓症の時空間的制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 血漿を用いたトロンピン活性化の検出
反応溶液を2種(反応溶液、反応溶液)

作製し、それらを 384-well プレート(high bind, Greiner Bio-One) に混合して反応を開始させた。試薬の調製には 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH7.4 緩衝液を用いた。新規受容体 B の中和抗体またはコントロール IgG を加える場合は、新規受容体 B の添加の前に行った。反応溶液は、血漿(1:9)、0.1-10 µg/mL 新規受容体 B、0.5 mM トロンピン基質(Chromogenix, Milano, Italy, S-2238)を混合した。反応溶液は、2 mM CaCl₂、凝固因子 C、1 µM リン脂質を混合した。反応溶液を 1 well あたり 40 µL 加え、反応溶液を 10 µL 加えて反応を開始させる。405 nm での吸光度を Spectra Max 340PC384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)で 10 秒ごとに kinetic mode で測定した。SoftMax Pro ソフトウェア(Molecular Devices)にて解析し、kinetic reduction の Vmax mode (milli-units per min, Max OD/min)にて数値化を行った。

リン脂質溶液は、L- α -phosphatidylcholine (PC) (Avanti, Alabaster, AL, 187535) と L- α -phosphatidylserine (PS) (Avanti, 189557)を用いて調製した。8 mM の PC と 2 mM の PS とをガラス容器にて混合し、窒素ガスで風乾させ、使用までは -80 °C にて保管した。リン脂質小胞は、PBS(-)を加えた PC:PS 溶液を 1 分以上 vortex し、ソニケーター (BIORUPTOR UCD-300, COSMO BIO, Tokyo, Japan) の Low パワーにて、10 秒 ON、20 秒 OFF サイクルを 25 回にて作製した。PBS(-)は滅菌した Dulbecco's PBS(-) (Wako, Osaka, Japan) を用いた。

(2) 再構成系でのトロンピン活性化の検出

再構成系の反応溶液は、プロトロンピン (HTI, HCP-0010)、凝固因子 A など、新規受容体 B、0.5 mM トロンピン基質を混合した。

反応溶液は、2 mM CaCl₂、リン脂質、凝固因子 C を含む混合液を用意した。反応溶液を 1 well あたり 40 µL 加え、反応溶液を 10 µL 加えて反応を開始させる。後は、血漿での実験と同様に実験解析を行った。

4. 研究成果

予備の実験として新規受容体 B による正常血漿での、Ca²⁺再加凝固試験において凝固時間の短縮が観察されていた。その結果をもとに、本研究では血液凝固反応を定量的に評価した。

血液凝固が成される際、凝固カスケードの最終産物であるトロンピンが生成されている。そして、生成されたトロンピンは、凝固カスケードを増幅させ、さらに血液凝固を加速させる。そこで、申請者はトロンピン基質を血漿中に混合し、トロンピンの活性化を評価した。新規受容体 B 蛋白質を正常血漿に添加してトロンピン活性化を検出した。新規受容体 B 蛋白質は濃度依存的にトロンピン活性化を亢進させた。受容体 B のコントロール蛋白質を加えた well ではトロンピン活性化亢

進は検出されなかった (図 1)。

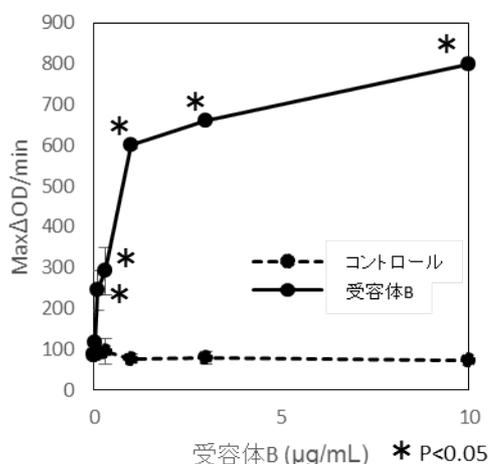


図 1 血漿中での受容体 B によるトロンビン活性化亢進

新規受容体 B (1 μg/mL) による血漿中でのトロンビン活性化亢進は、新規受容体 B の中和抗体によって抑制された。コントロール IgG の添加では抑制されなかった (図 2)。

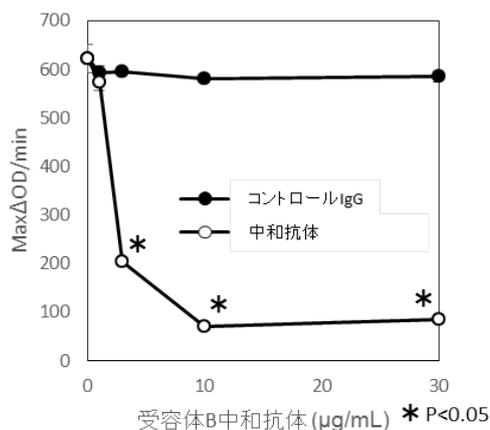


図 2 血漿中の受容体 B によるトロンビン活性化亢進は受容体 B 中和抗体で抑制された

新規受容体 B は、凝固カスケードを阻害させることなくトロンビン活性化を相加的、もしくは相乗的に亢進させている可能性が考えられた。

次に、精製タンパク質を用いた再構成系を構築し、凝固因子 A と新規受容体 B を加えた系におけるトロンビン生成促進作用を定量的に検出した。精製タンパク質を用いることによって、凝固因子 A と新規受容体 B によるトロンビン活性化促進作用を経時的に測定した。凝固因子各種、CaCl₂、リン脂質、プロトロンビンを加えた in vitro での血液凝固反

応再構成系では、そこに新規受容体 B が存在することによってトロンビン活性化が亢進した。新規受容体 B 濃度依存的にトロンビン活性化の亢進が検出された。

また凝固因子 A によって検出されるトロンビン活性化は、新規受容体 B が存在することによって、凝固因子 A 濃度依存的なトロンビン活性化をより強く引き起こした。

精製蛋白質を用いた、凝固因子 A と新規受容体 B を含む再構成系でのトロンビン活性化亢進は、新規受容体 B 中和抗体によって抑制された。

以上の結果より、これまでに知られていない機構により、凝固系の活性化が促進することが明らかになった。本研究で、既知の凝固因子カスケードに、それを促進方向に修飾する新しい因子を見出したことにより、止血・血栓・凝固の生理的・病態生理的メカニズムを再考する機会をつかむことができたと考えられる。これにより、病的凝固・血栓の未解明の病態を解く糸口になることを期待している。

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 3 件)

著者名: Yamamoto K, Kakino A, Takeshita H, Hayashi N, Li L, Nakano A, Hanasaki-Yamamoto H, Fujita Y, Imaizumi Y, Toyama-Yokoyama S, Nakama C, Kawai T, Takeda M, Hongyo K, Oguro R, Maekawa Y, Itoh N, Takami Y, Onishi M, Takeya Y, Sugimoto K, Kamide K, Nakagami H, Ohishi M, Kurtz TW, Sawamura T, Rakugi H.
論文標題: Oxidized LDL (oxLDL) activates the angiotensin II type 1 receptor by binding to the lectin-like oxLDL receptor.

雑誌名: *FASEB J*.

査読の有無: 有

発行年: 2015 [Epub ahead of print]

著者名: Okamura T, Sekikawa A, Sawamura T, Kadowaki T, Barinas-Mitchell E, Mackey RH, Kadota A, Evans RW, Edmundowicz D, Higashiyama A, Nakamura Y, Abbott RD, Miura K, Fujiyoshi A, Fujita Y, Murakami Y, Miyamatsu N, Kakino A, Maegawa H, Murata K, Horie M, Mitsunami K, Kashiwagi A, Kuller LH, Ueshima H; ERA JUMP Study Group.
論文標題: LOX-1 ligands containing apolipoprotein B and carotid intima-media thickness in middle-aged community-dwelling US Caucasian and Japanese men.

雑誌名: *Atherosclerosis*.

査読の有無: 有

巻: 229

発行年：2013
ページ：240-245

著者名：Takanabe-Mori R, Ono K, Wada H, Takaya T, Ura S, Yamakage H, Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Takahashi Y, Fujita M, Fujita Y, Sawamura T, Hasegawa K.

論文標題: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 plays an important role in vascular inflammation in current smokers.

雑誌名: *J Atheroscler Thromb.*

査読の有無：有

巻：20

発行年：2013

ページ：585-590

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者：垣野明美、李蕾、池末昌弘、中野厚史、藤田佳子、岡澤慎、真下知土、沢村達也

発表標題：LOX-1 遺伝子欠損 SHRSP の作製とその形質の予備的解析

学会名：第 50 回高血圧関連疾患モデル学会

発表年月日：平成 26 年 12 月 5 日(金)

発表場所：和歌山県立医科大学 生涯研修センター(紀三井寺キャンパス)

発表者：垣野明美、山本浩一、李蕾、藤田佳子、楽木 宏美、沢村達也

発表標題：AT1 は LOX-1 と複合体を形成し、酸化 LDL によるシグナル伝達を促進する

学会名：第 88 回日本薬理学会

発表年月日：平成 27 年 3 月 18 日(水)

発表場所：名古屋国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

特願 2013-273308

抗血液凝固剤

出願日：平成 25 年 12 月 27 日

発明者：沢村達也、藤田佳子、垣野明美

出願人：(独)国立循環器病研究センター

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 佳子 (FUJITA YOSHIKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター

研究所・研究員

研究者番号：30416218

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし