

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06381

研究課題名（和文）血友病発症犬におけるフコイダンの血小板及び凝固活性化を介した出血抑制機序の解明

研究課題名（英文）Understanding the mechanism of bleeding control via platelet and coagulation activation by fucoidan in dogs with hemophilia.

研究代表者

鬼頭 克也 (KITOH, Katsuya)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80270974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：血友病は人及び犬に頻繁に自然出血を起こすが、長期間投与しても安全で有効な治療法は未だ確立されていない。本研究はオキナワモズク由来フコイダンが血友病を発症した犬の自然出血を抑制する機序を解明することを目的として実施した。その結果、フコイダンにより活性化した血小板は表面にホスファチジルセリンを発現し、マイクロパーティクルを放出することで血液凝固能を高めること、フコイダンは組織因子経路インヒビターを直接阻害し凝固能を亢進すること、フコイダンを血友病発症犬に経口投与した場合の凝固能亢進は希釈プロトロンビン時間法によって評価できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血友病の治療では、投与が平易で、自然出血を抑制する効果が持続し、有害作用を発生しないことが求められる。本研究では、食用のモズクから抽出したフコイダンが犬の血小板を活性化して血液凝固能を高め、加えて直接作用でも凝固能を亢進すること、さらに犬に経口投与した後の凝固能亢進を希釈プロトロンビン時間法という簡便な方法でモニターできることを明らかにした。本研究の成果から、血友病に罹患した犬の飼い主が食用フコイダンを自宅で与えることで自然出血を予防できることが期待でき、飼い主の不安の解消、動物と人の福祉の向上に貢献することとなる。

研究成果の概要（英文）：Hemophilia frequently causes spontaneous bleeding in humans and dogs, but a safe and effective treatment has not yet been established, even after long-term administration. The aim of this study was to elucidate the mechanism by which fucoidan from Okinawa mozuku inhibits spontaneous bleeding in dogs with hemophilia. The results showed that platelets activated by fucoidan express phosphatidylserine on their surface and release microparticles to enhance blood coagulability, that fucoidan directly inhibits tissue factor pathway inhibitor and enhances coagulability, and that the enhancement of coagulability after oral administration of fucoidan to dogs with hemophilia can be evaluated by the diluted prothrombin time assay.

研究分野：獣医学

キーワード：フコイダン 血友病 オキナワモズク 血小板 血液凝固 犬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血友病 A は血液凝固第 因子が欠損する先天性出血性疾患であり、人及び犬の出血性疾患の中では最も発生頻度が高い。血友病に罹患すると日常生活でたびたび自然出血を起こし、その程度によっては致死的な経過をとることもある。人の血友病では、効果のより持続する第 因子製剤が開発され、これを用いた定期補充療法により関節腔内出血を予防することが試みられているが、頻回の注射を必要とするにも関わらず、その効果は十分ではない。一方、犬の血友病では、筋肉内出血や皮下出血あるいは血腫の発生頻度が高く、出血時に第 因子を含む血液を輸注するオンデマンド療法が主体となっている。しかし、輸血体制の確立されていない獣医療において出血のたびに迅速に血液を準備することは甚だ困難である。また、人及び犬にこれらの治療を繰り返すと第 因子インヒビターが発生し、効果が消失する。このため血友病を発症した人ならびに犬とその飼い主は、出血の恐怖に常に悩まされることになり、確実に安全な出血予防法の開発は医療及び獣医療において喫緊の課題である。

フコイダンはモズクなどの褐藻類のぬめりの基となる硫酸化多糖である。オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) から抽出したフコイダンには抗血液凝固作用が証明されているが、血液凝固や血小板機能を亢進する作用あるいはその機序は知られていなかった。申請者は先行研究で、オキナワモズク由来のフコイダンが犬の血小板を活性化すること、血友病を発症した犬にフコイダンを経口投与すると自然出血の発生を抑制することを明らかにした(特許第 6059578 号、図 1、2)。しかし、フコイダンが血小板を活性する機序、活性化した血小板と自然出血の発生が抑制される機序との関連は明らかではなかった。

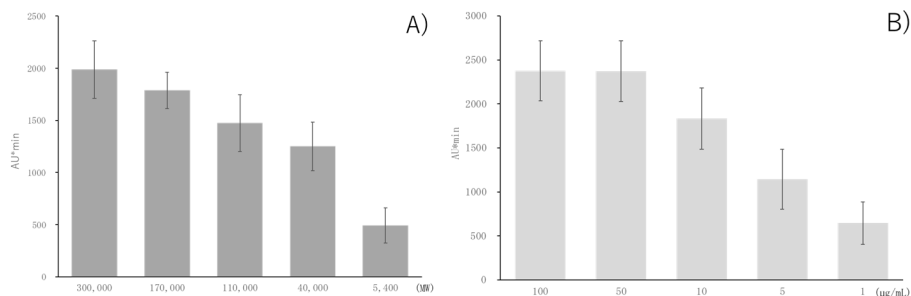


図 1. オキナワモズクから熱水処理により抽出したフコイダンによる健康犬の血小板活性化。健康犬から採取した抗トロンピン全血を対象に、インピーダンス法血小板凝集計により測定した凝集曲線下面積 (AU*min) の平均値 (n = 3) と標準偏差 (垂線) を示す。A) 硫酸化度を一定 (14%程度) にした分子量約 30 万、17 万、11 万、4 万、0.54 万のフコイダンを終濃度 50 µg/mL で添加した場合、B) 高分子量 (約 30 万、硫酸化度 14%) のフコイダンを終濃度 100、50、10、5、1 µg/mL で添加した場合の血小板凝集能。フコイダンは高分子量ほど強く、50 µg/mL までは高濃度ほど強く犬の血小板を凝集した。フコイダンは血友病犬の血小板も同様に活性化した。

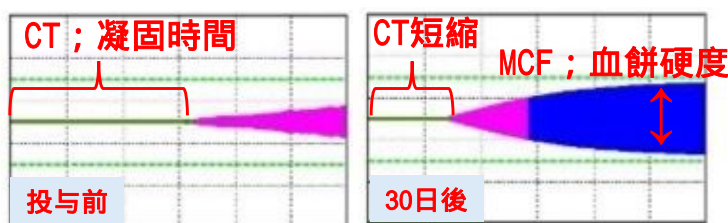


図 2. フコイダンを経口投与した血友病犬のトロンボエラストグラフ (TEG) の変化。オキナワモズクから熱水処理により抽出したフコイダン (分子量約 30 万) を血友病発症犬に体重 1kg あたり 20 mg を 1 日量として 30 日間、経口投与した時の止血機能の変化を示す。TEG は、3.2%クエン酸処理抗凝固全血に 0.2 mol/L CaCl₂ を添加して 120 分間測定した。凝固時間 CT は投与 30 日後に著しく短縮、血小板とフィブリノゲンの機能が関与する血餅硬度 MCF は 30 日後に増強し、止血機能が高まっていることが分かる。

また、オキナワモズクから酸加熱処理で抽出した分子量約 41 万、6 万、0.5 万のフコイダンを健康犬の抗トロンピン全血に終濃度 50 µg/mL で添加して凝集能を評価したところ、高分子量 (41 万) 及び中分子量 (6 万) のフコイダンによる凝集曲線下面積 (平均値 ± 標準偏差) は、それぞれ 2,411 ± 233 AU*min、2,325 ± 326 AU*min であり、これらはほぼ同程度に血小板を凝集したが、低分子量 (0.5 万) フコイダンでは 691 ± 454 AU*min であり、その凝集作用は弱かった。

2. 研究の目的

生体内では、血小板と血液凝固因子が密接に連携して止血機能を担う。血友病発症犬に経口投与されたフコイダンが自然出血の発生を抑制するまでの一連の機序を解明することを最終目的とし、本研究では、フコイダンによる血小板活性化機序の解明、活性化した血小板による血液凝固能促進活性の評価、ならびにフコイダンによる組織因子経路インヒビター (TFPI) 阻害と血液凝固能亢進の証明、犬に経口投与したフコイダンの吸収動態と血小板活性化の検証を目的として実施した。

3. 研究の方法

本研究では、オキナワモズクから熱水処理で抽出した高分子量 (約 30 万) フコイダンと酸加熱処理で抽出した中分子量フコイダン (分子量約 6 万) を対象として、以下の方法で行った。

(1) フコイダンによる血小板活性化機序の解明; 健康犬 5 頭 (去勢雄 3 頭、避妊雌 2 頭、3~5 歳) から採取した抗トロンピン全血に高分子量フコイダン (終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、インピーダンス法により血小板凝集能を測定した。凝集能の評価には凝集曲線下面積 ($\text{AU}\cdot\text{min}$) を用いた。活性化機序を明らかにするために、血小板内シグナル伝達を阻害する薬剤あるいは受容体との結合を阻害する薬剤を抗トロンピン全血にあらかじめ処置した後にフコイダンを投与し、血小板凝集能を測定した。

中分子量フコイダンでは、はじめに終濃度 50、10、5、1、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のフコイダンを抗トロンピン全血に添加して最大凝集が得られる濃度を決定し、次いで同様の手順で活性化機序を検討した。

(2) フコイダンにより活性化した血小板の血液凝固能促進活性の評価; 健康なビーグル 3 頭 (雌、3 歳) から採取した 3.2% クエン酸処理抗凝固全血 (血小板数 288,500~453,000/ μL) に、高分子量フコイダンを 3 種類の濃度 (50、20、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で加えて血小板を刺激 (37、15 分、攪拌) し、血小板膜外側へのリン脂質ホスファチジルセリン (PS) の表出と血小板からのマイクロパーティクル (PDMPs) の放出をフローサイトメトリーにより測定した。血小板の識別に CD61 抗体を用い、血小板の活性化は CD62P 抗体による P-selectin 発現率により評価した。PS の表出はアネキシン V を用いて検出し、PDMPs の放出は約 0.2-0.5 μm の CD61 陽性粒子を対象として算出した。血小板活性化の陽性対照にはコラーゲン (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、陰性対照には PBS を用いた。統計には ANOVA、Tukey-Kramer 法を用い、P 値が 0.05 未満を有意とした。

(3) フコイダンによる組織因子経路インヒビター (TFPI) 阻害と血液凝固能亢進の証明; 健康犬の血漿を混和したプール血漿 (3.2% クエン酸処理血漿) に遺伝子組換え型ヒト TFPI (rhTFPI、終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して凝固時間を延長させ、これに高分子量フコイダンまたは中分子量フコイダンを 4 種類の濃度 (500、100、50、5 nM) で添加し、希釈プロトロンピン時間法 (dPT 法) により凝固時間を測定した。また、血友病発症犬の血漿を対象に同様に凝固時間を測定した。

(4) 犬に経口投与したフコイダンの吸収動態と血小板活性化の検証; 健康なビーグル 3 頭 (雌、3 歳) を対象に、高分子量フコイダンを体重 1 kg あたり 40 mg を 1 日量として 56 日間経口投与し、投与前、投与 7 日後、14 日後、28 日後、56 日後に採血して、血清フコイダン濃度、血小板凝集能、血液凝固能を測定した。血清フコイダン濃度は、長嶺らの方法¹⁾に従ってサンドイッチ ELISA 法により測定し、吸収動態の指標とした。血小板凝集能は、抗トロンピン全血に 3 種類の濃度の ADP (2.5、5、10 μM) 及び Collagen (1.25、2.5、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、インピーダンス法により凝集曲線下面積を求め、50%凝集を得る凝集閾値濃度を算出して評価した。血液凝固能は dPT 法で評価した。

4. 研究成果

(1) フコイダンによる血小板活性化機序の解明; 高分子量フコイダン (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による血小板凝集は、Src family kinase (SFK) 阻害剤の PP2 を前処置すると著しく減弱した (図 3A)。次いで spleen tyrosine kinase (Syk) 阻害剤の OXSI-2 または Go6976 を前処置した場合も著しく減弱した (図 3B)。さらにホスホリパーゼ C (PLC) 選択的阻害剤の U-73122 を前処置した場合にも血小板凝集は著しく減弱した (図 3C)。これらの結果から、高分子量フコイダン (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による犬の血小板凝集には、非受容体型チロシンキナーゼ SFK 及び Syk とその下流にある PLC が活性化するチロシンキナーゼ依存性経路が関与していることが明らかになった。

一方、中分子量フコイダンも健康犬の血小板を終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までは高濃度ほど強く凝集した。また、この濃度 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による血小板凝集は PP2 の前処置により減弱しなかったが (図 4A)、選択的 Gq/11 阻害剤の YM-254890 で処置した場合には著しく減弱した (図 4B)。したがっ

て、中分子量フコイダン (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による犬の血小板凝集には、G 蛋白共役受容体を介した経路が関与しており、高分子量と中分子量のフコイダンでは血小板活性化機序が異なることが示唆された。

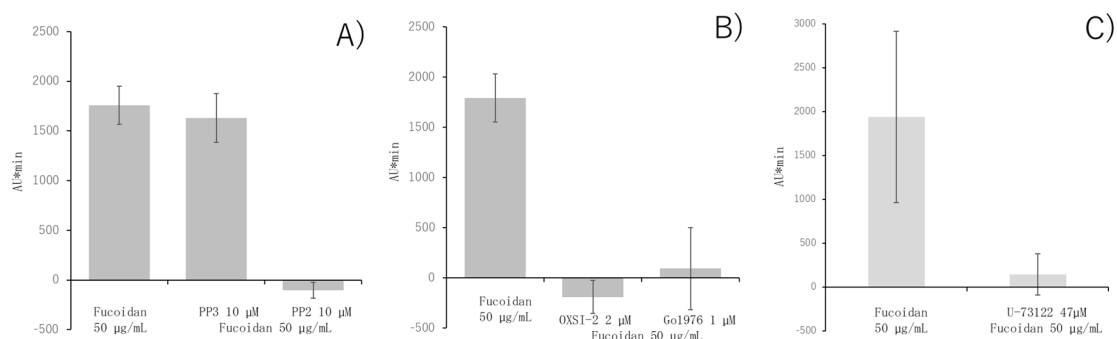


図 3．高分子量フコイダンによる犬の血小板活性化

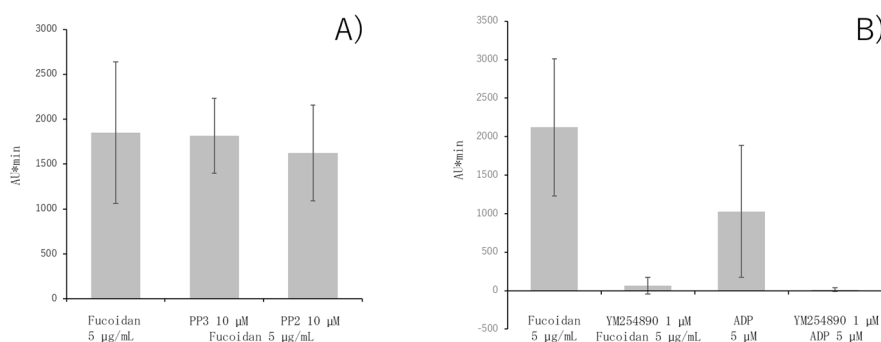


図 4．中分子量フコイダンによる犬の血小板活性化

フコイダンを認識する血小板受容体を同定することを目的に、チロシンキナーゼ依存性経路の受容体であるコラーゲン受容体 GP のアンタゴニスト及び C-type lectin receptor 2 (CLEC-2) 受容体のアンタゴニスト、FcR A を阻害する β 3 抗体 (Fc R /CD32 抗体) ヒト血小板の GP アンタゴニストで CLEC-2 受容体には作用しないヒノキチオールを前処置して凝集能を測定したが、いずれの場合も血小板凝集を抑制することはなく、受容体を同定するに至らなかった。

同じ原料 (オキナワモズク) から抽出したフコイダンでもその抽出法が異なると、犬の血小板を活性化する強度、すなわち最大凝集をもたらす分子量及び濃度と、その作用機序 (チロシンキナーゼ依存性経路、G 蛋白共役受容体を介した経路) が異なることを確認することができた。したがって、フコイダンを認識する受容体が単一ではないことが推察される。

(2) フコイダンにより活性化した血小板の血液凝固能促進活性の評価；血小板を高分子量フコイダンで刺激すると濃度に依存して P-selectin 発現率は上昇した ($P < 0.05$)。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のフコイダンで刺激した時の P-selectin 発現率は 13.9 ± 6.2 (平均値 \pm SD) % で、コラーゲン (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の P-selectin 発現率 3.0 ± 2.2 % よりも有意に高かった ($P < 0.01$)。アネキシン V 陽性率で示す血小板膜外側への PS の表出は、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のフコイダンで刺激した時が最も高く (7.5 ± 4.1 %) 濃度を下げると有意に低下した (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 1.7 ± 0.6 , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 1.7 ± 1.2 , $P < 0.05$)。PDMPs の放出も 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のフコイダンで刺激した場合が最も高かった (23.8 \pm 6.3%, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 19.9 \pm 6.4% 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 13.2 \pm 2.5%, コラーゲン (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 21.2 \pm 3.9%, $P < 0.01$)。以上の結果から、犬の血小板をフコイダンで刺激すると、血小板は活性化して P-selectin を発現し、血小板膜外側に PS が表出して血液凝固反応の足場を形成すること、同時に PDMPs を放出することで血小板周囲の凝固促進活性を高めることが示唆された。

(3) フコイダンによる組織因子経路インヒビター (TFPI) 阻害と血液凝固能亢進の証明；犬プール血漿 (dPT 35.4 sec, duplicate の平均値) に rhTFPI (終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加すると dPT は 293.6 sec (同) に延長した。これに高分子量または中分子量フコイダンを 4 種類の濃度 (終濃度 5、50、100、500 nM) で添加すると、延長していた凝固時間は短縮し、いずれも 500 nM を添加した時に最も短縮した (図 5 A)。また、血友病発症犬の血漿 (dPT 32.4 sec) に rhTFPI (終濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加すると dPT は 94.3 sec に延長し、これに高分子量または中分子量フコイダンを添加すると、延長していた凝固時間は短縮した (図 5 B)。これらの結果から、フコイダ

ンは直接 TFPI を阻害し、血液凝固能を亢進することが示唆された。

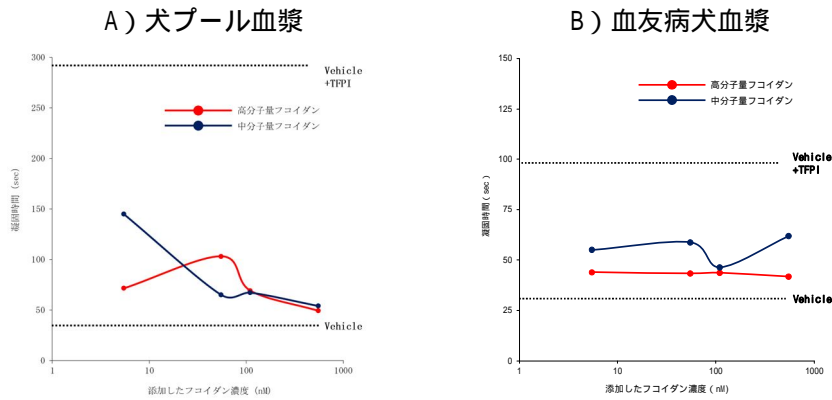


図5. フコイダンによる組織因子経路インヒビター (TFPI) 阻害

(4) 犬に経口投与したフコイダンの吸収動態と血小板活性化の検証；高分子量フコイダン投与後の健康犬の血清フコイダン濃度は、投与28日後までは3頭の濃度変化にばらつきが大きく、一定の傾向は認められなかった。投与56日後には、3頭とも検出限界 (0.5 ng/mL) 未満となった。また、凝集閾値濃度により評価した血小板凝集能は、ADP 凝集では投与28日後に2頭の閾値が低下し、Collagen 凝集でも投与7日後から2頭の閾値が低下して凝固能の亢進が示唆された。しかし、他の1頭では投与56日後まで閾値は上昇したままであった。一方、dPT法で評価した血液凝固能では、3頭の凝固時間は投与後7日後から28日後まで短縮し、凝固能の亢進を把握することができた。しかし、投与56日に2頭の凝固時間は延長に転じた (図6)。

これらの結果から、フコイダンを犬に経口投与した場合、投与後の血小板機能と血中濃度に有意な関係は認められなかったが、dPT法によって凝固能亢進を把握できることが明らかになった。また、投与56日後に血清フコイダン濃度が検出限界未満となり、凝固時間が延長に転じたことは、血友病発症犬に継続してフコイダンを経口投与すると、TEGによって評価できる止血機能(図2参照)の亢進が、減弱することと一致していた。

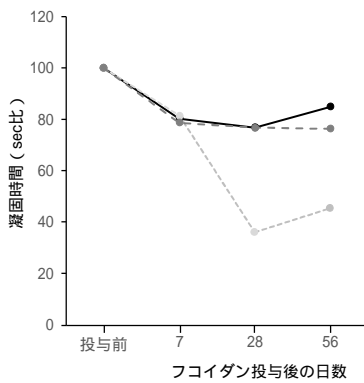


図6. 高分子量フコイダンを経口投与した後の凝固時間。健康なビーグル3頭(雌、3歳)に高分子量フコイダンを体重1kgあたり40mgを1日量として56日間経口投与した時の凝固時間の変化を示す。凝固時間はdPT法で測定し、投与前の凝固時間を100としてその比を示す。

<引用文献>

Tokita, Y., Nakajima, K., Mochida, H., Iha, M., Nagamine, T. Development of a fucoidan-specific antibody and measurement of fucoidan in serum and urine by sandwich ELISA. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010, 74(2), 350-357.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------