

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：22591058
 研究課題名（和文） 血小板／フィブリン血栓の収縮反応における凝固 XIII 因子の新しい機能と分子機構
 研究課題名（英文） Novel functions and Mechanisms of Coagulation Factor XIII/13 in the Platelet/Fibrin Clot Retraction Reaction
 研究代表者
 一瀬 白帝 (ICHINOSE AKITADA)
 山形大学・医学部・教授
 研究者番号：10241689

研究成果の概要（和文）：

3 年間の研究の結果より、細胞内血液凝固第 XIII 因子 (Factor XIII, FXIII) A サブユニット (FXIII-A) は、単球／マクロファージ系、巨核球／血小板系の増殖と分化に関与している可能性が示唆された。

また、細胞外 FXIII-A は、糖タンパク質 IIb/IIIa との結合を介して、血小板内のシグナル伝達系を活性化し、血餅退縮を惹起していることが、明らかになった（論文投稿中）。ただし、細胞内 FXIII-A がこの反応に必須であるか否かについては、結論を得るに至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

The results of our 3-years studies strongly suggested that intracellular factor XIII (FXIII) A-subunit (FXIII-A) plays a role(s) in the proliferation and differentiation of monocytes/macrophages and megakaryocytes/platelets. It was clearly demonstrated that extracellular FXIII-A activated the platelet signal transduction system(s) and induced platelet/fibrin clot retraction via binding to glycoprotein IIb/IIIa (Submitted). However, we could not conclude whether or not intracellular FXIII-A was essential in this reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：血液内科学

キーワード：第 XIII 因子、架橋結合、血小板、フィブリン、血餅退縮

1. 研究開始当初の背景

血液凝固第 XIII 因子 (Factor XIII, FXIII) A サブユニット (FXIII-A) ノックアウト (KO) マウスの tail cutting (尾切断) に

よる出血時間を測定すると、延長傾向が認められた (J Int Hematol, 2008)。

出血時間は、一般的には血小板や血管の

機能に依存する。本申請者らは、FXIII-A KO マウスの血餅退縮(凝血塊が血小板により収縮する反応)が不完全であることを確認し(Blood, 2010;115:1277-1279)、凝集直後の血小板の収縮反応にも欠陥があると推定した。更に、連携研究者の笠原博士は、血小板のトロンビン刺激により、血小板脂質ラフト上のフィブリンが活性型FXIII(FXIIIa)によって架橋結合することを発見した。最近、血小板膜表面にあるトロンビン受容体とFXIII-Aが結合することが報告されたが、これはあくまで細胞外の現象である。Glycoprotein (GP)IIb/IIIaは血小板膜のフィブリン受容体であり、血餅退縮に関与していることが知られている。

血小板内のFXIII-Aについては、*in vitro*ではアクチンやミオシンを架橋結合することは知られているものの、その意義は不明である。このように、細胞内FXIII-Aがどのように血小板機能に関与し、どのタンパク質と相互作用しているのか分かっていないので、本研究により明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

FXIII-Aは、止血栓の安定化に不可欠な血漿タンパク質である。血小板内にも血漿と同等量のFXIII-Aが存在することが知られているが、血小板凝集時に放出されることがなく、血小板内での存在意義と役割は長い間不明であった。我々が作製したFXIII-A ノックアウト(KO)マウスにおいて、止血・血栓に関連する表現型を検索したところ、出血時間の延長と血餅退縮の異常という全く新しい所見を発見した。

そこで、これらの表現型に着目して、主に血小板内・外のFXIII-Aの止血、血栓形成におけるFXIII-Aの新しい機能を明らかにするのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) *ex vivo*では、まず、血小板の基本的な性状、即ち血小板の数と形態、凝集能、粘着能、放出能、退縮能について、また骨髄における巨核球の数や形態などについて、FXIII-A KO マウス、血中のFXIII-Aのみが高度に欠乏したFXIII-B KO マウスと野生型マウスとの相違を明らかにする。

(2) *in vitro*では、血小板膜表面におけるフィブリンやGPIIb/IIIa、その他の膜タンパク質、血小板内のアクチン、ミオシン

などFXIII-Aの基質あるいは相互作用するタンパク質の量と分子量(架橋結合による多量体化)の変化、血小板収縮反応へのFXIII-Aの影響とそのメカニズムを検索する。

(3) 血小板にはユビキタスなTGaseである組織型TGase (Tissue TGase; tTG)が存在することが知られているので、その関与、特にFXIII-Aとの相互補完の有無を明らかにするため、tTG KO マウスの血小板についても、上述した項目を測定して比較する。

4. 研究成果

(1) 初年度 (平成 22 年度)

予備実験で血餅退縮能にFXIIIが関与することが示唆されている。血餅退縮能に最も寄与するのは血小板数なので、初年度は、血小板の産生や機能に及ぼすFXIII-A欠損の影響を検索し、異常の存在を検証することに主眼をおいた。

① 血小板産生系

野生型およびFXIII-A KO マウスの末梢血において、血小板の形態を比較したり、血小板数を計測して比較したところ、明らかな差は認められなかった。従って、実験的に乏血小板血症を惹起して、血小板数回復能を調べる必要がある。

それぞれの系統のマウスの骨髄の標本作製して、各血球系の大まかな割合、形態を観察して比較した。特に巨核球系については数には大きな違いはなかったが、FXIII-A KO マウスの骨髄ではやや幼若な巨核球が多かった。

巨核球系細胞 MEG-01 を培養して核DNA染色によりDNA量(N数)を計測して、成熟度の相違を比較したところ、FXIII陽性細胞は陰性細胞に比してN数が高いことが判明した。

② 血小板機能

高濃度ADP、トロンビンを用いた予備実験では、野生型とKOマウスの間で多血小板血漿の凝集能に大きな差はなかった。今後、他のリガンドを用いて凝集能を比較する必要がある。

FXIII-A KO マウスの血餅退縮の欠如は、FXIIIの投与で部分的に回復されるので、細胞外のFXIIIも関与していることが示唆された。今後、野生型とFXIII-A KO マウスの洗浄血小板をそれぞれの血漿に混和してトロンビンで刺激して、細胞内・外のFXIII-Aの反応への寄与の程

度を比較する必要がある。

マウスの背部、腹部の皮膚に器具によって一定の切開創を加えたところ、野生型と FXIII-A KO マウスの間に有意な出血時間の差は認められなかったため、創傷治癒を時経的に観察したところ、FXIII-A KO マウスでは明らかに遅延が認められ、創部の周辺に潰瘍が拡大していた。

(2) 次年度（平成 23 年度）

① 巨核球成熟・血小板産生に関わる分子機構の解析

FXIII-A 欠損マウスの血液において、統計的に有意ではないものの血小板数が野生型よりも少ない傾向が認められた。

マウス骨髄の FACS 解析において、FXIII-A 欠損マウスでは野生型に比べて CD61 陽性細胞全体ではやや少ない傾向にあるものの、巨核球前駆細胞（CD61 陽性かつ cKit 陽性細胞）が有意に多かった。

以上の結果から、FXIII-A は巨核球の成熟を促進し、血小板の産生に寄与している可能性が示された。

② 血小板膜・細胞内タンパク質の生化学的解析

トロンピンによる血小板活性化に伴い、 α 顆粒中のフィブリノゲンがフィブリンとなり、FXIII 依存的に膜ラフト（スフィンゴ脂質マイクロドメイン）へ移行した。

膜ラフトは血小板表面においてフィブリンとアクトミオシン系を結びつける中継点として血餅退縮に関わっていることを示した。

フィブリンと活性化ミオシンの分布を免疫蛍光染色により解析したところ、スフィンゴミエリン特異的膜ラフトに共局在したことから、これらのタンパク質がスフィンゴミエリン特異的膜ラフトに移行することがわかった。

ラフト破壊試薬メチル β シクロデキストリン処理により、スフィンゴミエリン特異的膜ラフトの破壊とともに血餅退縮が完全に抑制された。

細胞外のフィブリン線維と細胞内のアクトミオシン系が主にスフィンゴミエリン特異的膜ラフトを介して連結し、血餅退縮を促進していると考えられた。

(3) 3 年度（平成 24 年度）

① 巨核球成熟・血小板産生に関わる分子

機構の解析

2 年度の研究で、FXIII-A 欠損マウス骨髄の巨核球前駆細胞が野生型マウスと比べて有意に多かったことから、トロンボポエチン存在下で骨髄細胞の培養を行なったところ、巨核球前駆細胞の増加が FXIII-A 欠損骨髄細胞では野生型細胞と比べてより大きい傾向が示された。

一方、FXIII-A 欠損、FXIII-B 欠損いずれのマウスとも、血中の血小板数は野生型マウスよりやや少ない傾向にあった。また、LPS 投与後の血小板数の変動は各マウス間で違いはなかった。

以上より、細胞外の FXIII-A が巨核球の成熟に関与しているものと思われた。

巨核球系細胞 MEG-01 において FXIII などのトランスグルタミナーゼによって架橋される核タンパク質の同定を行い、少なくとも 17 種同定した。

同定した基質タンパク質には RNA、DNA のプロセッシングに関与するタンパク質や Wnt シグナルなど細胞外からのシグナル応答に関与するタンパク質などが含まれていた。

以上より、基質タンパク質の架橋結合がシグナル伝達に影響している可能性が示された。

② 血小板膜・細胞内タンパク質の生化学的解析

3 年度は、野生型マウスで FXIII-A に対するポリクローナル抗体の静注により中和を行い、白血球数、血小板数、赤血球数を計測、および多血小板血漿を調製し、血小板退縮時間の測定を行った。

陰性コントロールの IgG を静脈注射したものと比べ、有意差はないものの単球は増加傾向で、顆粒球は減少傾向だった。一方、赤血球数は変化がなかった。

血餅退縮時間については陰性コントロールとほとんど差がなかった。

以上より、FXIII-A は白血球の産生や動員に関与している可能性がある。

以上の結果より、細胞内 FXIII-A は、単球/マクロファージ系、巨核球/血小板系の増殖と分化に関与している可能性が示唆された。

また、細胞外 FXIII-A は、GPIIb/IIIa との結合を介して、血小板内のシグナル伝達系を活性化し、血餅退縮を惹起していることが、明らかになった（論文投稿

中)。ただし、細胞内 FXIII-A がこの反応に必須であるか否かについては、結論を得るに至らなかった。

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 18 件)

1. 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(3): 415-419.
DOI: 10.1111/hae.12072.
2. 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(5):471-478.
DOI: 10.1093/jb/mvs088.
3. 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(3):506-510.
DOI: 10.1016/j.thromres.2012.05.003.
4. 尾崎 司, 一瀬白帝: 血液凝固制御のメカニズム. *医学のあゆみ*, 査読無, 2012; 242(2): 153-158.
DOI および URL なし
5. 一瀬白帝: フィブリン重合・安定化と血栓の消長. *Thrombosis Medicine*, 査読無, 2012; 2(2): 166-170.
DOI および URL なし
6. Ichinose A. Factor XIII is a key molecule at the intersection of coagulation and fibrinolysis as well as inflammation and infection control. *Int J Hematol*. 査読無, 2012;95(4):362-370.
DOI: 10.1007/s12185-012-1064-3
7. 一瀬白帝: 血栓の退縮 血栓の運命を決める血餅退縮反応のメカニズムとその意義. *血管医学*. 査読無, 2011; 12(2): 161-175.
DOI および URL なし
8. 一瀬白帝: 炎症と凝固第 XIII(13)因子(基礎編); 第 XIII(13)因子と炎症性タンパク質、

細胞とのクロストーク. *Coagulation & Inflammation*, 査読有, 2010; 4(2): 1-8
DOI および URL なし

[学会発表] (計 59 件)

1. 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
2. 笠原浩二, 兼田瑞穂, 三木俊明, 飯田和子, 鈴木英紀, 小林俊秀, 岡崎俊朗, 一瀬白帝, 山本正雅: 血小板スフィンゴミエリン特異的膜ラフトへのフィブリン移行と血餅退縮. 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, 尾崎 司, 一瀬白帝: 細胞核における凝固第 XIII 因子のトランスグルタミナーゼ活性. 第 20 回山形分子生物学セミナー, 鶴岡メタボロームキャンパス (鶴岡市先端研究産業支援センター) (鶴岡、山形); 2012 年 11 月 26 日
4. Ichinose A: Diverse molecular mechanisms of congenital and acquired factor XIII/13 deficiency and its newly proposed biological functions. Symposium 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. Kaneko M, Kanno N, Suzuki A, Tanaka R, Souri M, Yatomi Y, Ichinose A. A novel quick point of care test of coagulation factor XIII activity based on clot retraction in humans. 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)
6. Kasahara K, Kaneda M, Miki T, Iida K, Suzuki H, Hara Y, Shimonaka M, Arai M, Kobayashi T, Ichinose A, Yamamoto N: Translocation of Fibrin and myosin into platelet membrane rafts is an important process for clot retraction via a functional property of GPIIb/IIIa. 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)

7. 一瀬白帝 : 血液凝固第 XIII/13 因子の新機能と疾患における意義. 第 73 回日本血液学会学術集会 (シンポジウム 6 : 血栓止血学・血管生物学の最近の進歩), 名古屋国際会議場 (名古屋); 2011 年 10 月 14-16 日
8. 一瀬白帝 : 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. 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
9. 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
10. 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. 山形大学医学部実験動物セミナー第 22 回研究成果発表会, 山形大学医学部 (山形); 2011 年 12 月 8 日
11. 惣宇利正善, 一瀬白帝 : 血球の分化における凝固 XIII 因子 A サブユニットの関与について. 第 19 回山形分子生物学セミナー, 山形大学医学部 (山形); 2011 年 11 月 16 日
12. 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 4 回トランスグルタミナーゼ研究会 & 日本ポリアミン学会合同学術集会, 京都工芸繊維大学 60 周年記念館 (京都); 2011 年 9 月 20 日
13. 張 偉光, 惣宇利正善, 岩田宏紀, 一瀬白帝 : 妊娠期の止血における凝固第 XIII 因子陽性細胞の存在意義. 第 9 回血液・血管オルビス, 東京ドームホテル (東京); 2011 年 8 月 20-21 日
14. Kaneko M, Yatomi Y, Ichinose A : Point-of-care assay of FXIII (13) activity by utilizing clot retraction reaction in clinical settings. International workshop Factor XIII - recent advances in the FXIII research at the 55th Annual Meeting Society of Thrombosis and Haemostasis Reserch (GTH), Feb.16-19, 2011, Rhein-Main-Hallen Wiesbaden (Wiesbaden, Germany).
15. Kaneko M (金子 誠), Suzuki A (鈴木明子), Kanno N (菅野信子), Tanaka R (田中亮子), Ishizaka T (石坂泰三), Souri M (惣宇利正善), Yatomi Y (矢富 裕), Ichinose A (一瀬白帝) : A novel quick point of care test of coagulation factor XIII activity based on clot retraction in humans. 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 Workshop 3W19 (血栓形成における凝固系と血小板の相互作用), 神戸ポートアイランド (神戸); 2010 年 12 月 9 日
16. Kasahara K (笠原浩二), Kaneda M (兼田瑞穂), Miki T (三木俊明), Iida K (飯田和子), Suzuki H (鈴木英紀), Yamamoto N (山本正雅), Arai M (新井盛大), Souri M (惣宇利正善), Ichinose A (一瀬白帝) : Factor XIII-Dependent-Clot Retraction (CR) and -Fibrin Translocation to Platelet Rafts: Factor XIII-Crosslinked Fibrin-Glycoprotein (GP) IIb/IIIa Axis. 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 Workshop 3W19 (血栓形成における凝固系と血小板の相互作用), 神戸ポートアイランド (神戸); 2010 年 12 月 9 日
17. Ichinose A : The coagulation system interacts with platelets in clot formation: an overview. 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 Workshop 3W19, 神戸ポートアイランド (神戸); 2010 年 12 月 7-10 日
18. 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
19. 金子 誠, 鈴木明子, 菅野信子, 田中亮子, 石坂泰三, 惣宇利正善, 一瀬白帝, 矢富 裕 : 血餅退縮能を用いた血液凝固第 XIII 因子活性の迅速簡易測定法の開発と臨床応用. 第 72 回日本血液学会学術集会, パシフィコ横浜 (横浜); 2010 年 9 月 24-26 日
20. 笠原浩二, 惣宇利正善, 兼田瑞穂, 三木俊明, 山本正雅, 一瀬白帝 : 凝固 XIII 因子 A サブユニット欠損マウスでは血餅退縮反応が欠如する. 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

21. 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
22. 金子 誠, 菅野信子, 鈴木明子, 田中亮子, 惣宇利正善, 矢富 裕, 一瀬白帝: 血餅退縮反応を用いた新しい迅速第 XIII 因子活性測定法. 第 11 回 TTM フォーラム学術集会, 大手町サンケイプラザ (東京); 2011 年 3 月 5 日
23. 張 偉光, 岩田宏紀, 惣宇利正善, 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. 山形大学医学部実験動物セミナー 第 21 回研究成果発表会, 山形大学医学部 (山形); 2010 年 12 月 16 日
24. 矢富 裕, 金子 誠, 鈴木明子, 菅野信子, 田中亮子, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 血餅退縮反応を用いた新しい迅速第 XIII 因子活性測定法. 第 3 回後天性第 XIII(13)因子欠乏症研究会, パンパシフィック横浜ベイホテル東急 (横浜); 2010 年 9 月 23 日
25. 笠原浩二, 兼田瑞穂, 三木俊明, 飯田和子, 鈴木英紀, 原 裕太, 下仲基之, 小嶋聡一, 新井盛大, 惣宇利正善, 一瀬白帝, 山本正雅: フィブリンの血小板脂質ラフト移行と血餅退縮における働き. 第 48 回東北止血・血栓研究会, 山形テルサ (山形); 2010 年 9 月 4 日
26. 金子 誠, 鈴木明子, 菅野信子, 田中亮子, 石坂泰三, 惣宇利正善, 矢富 裕, 一瀬白帝: A novel quick point of care test of coagulation factor XIII activity based on clot retraction in humans. 第 8 回血液・血管オルピス, 東京ドームホテル (東京); 2010 年 8 月 21-22 日

[図書] (計 7 件)

1. 一瀬白帝: 凝固第 XIII/13 因子の役割: 新しい知見と提言. 高久史磨・小澤敬也・坂田洋一・金倉 譲・小嶋勢二編, Annual Review 血液 2012, 東京; 中外医学社, 2012, 220-229.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬 白帝 (ICHINOSE AKITADA)
山形大学・医学部・教授

研究者番号: 10241689

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

惣宇利 正善 (SOURI MASAYOSHI)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号: 20292419
(H22,H23,H24)

尾崎 司 (OSAKI TUKASA)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 60380565
(H24)

笠原 浩二 (KOHJI KASAHARA)
(公財)東京都医学総合研究所・細胞膜研究室・副室長
研究者番号: 60250213
(H22,H23,H24)

矢富 裕 (YATOMI YUTAKA)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 60200523
(H23,H24)

岩田 宏紀 (IWATA HIROKI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 70361251
(H22,H23)