

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570182

研究課題名(和文)血液凝固におけるフィブリン血小板膜ラフト移行の役割

研究課題名(英文)Fibrin translocation to platelet membrane rafts in blood coagulation

研究代表者

笠原 浩二 (KASAHARA, Kohji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副室長

研究者番号：60250213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：血小板を活性化させると、フィブリンが膜ラフトに移行することを見出した。フィブリンが血小板に結合すると血餅退縮が起きることが知られている。そこで、フィブリンのラフト移行が血餅退縮に関与しているかどうかを調べた。免疫染色法でスフィンゴミエリンラフトとフィブリンが共局在することがわかった。スフィンゴミエリン合成酵素欠損血小板では血餅退縮の速度が遅くなり、スフィンゴミエリンラフトは血餅退縮に関わっていることがわかった。血液凝固XIII因子欠損血小板では、フィブリンラフト移行および血餅退縮が欠如することを見出し、フィブリンラフト移行および血餅退縮には血液凝固XIII因子が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We observed that sphingomyelin (SM)-rich rafts are identified histochemically in the central region of adhered platelets where fibrin is colocalized on activation by thrombin. The clot retraction of SM-depleted platelets from SM synthase knockout mouse was delayed significantly, suggesting that platelet SM-rich rafts are involved in clot retraction. Furthermore, fibrin translocation to DRM rafts was impaired in factor XIII A subunit-deficient mouse platelets, which show impaired clot retraction. Furthermore, the disruption of SM-rich rafts by methyl- β -cyclodextrin impaired clot retraction. Thus, we propose that clot retraction takes place in SM-rich rafts where a fibrin- IIb 3 complex is formed as a primary axis to promote platelet contraction.

研究分野：機能生物化学

キーワード：ラフト 血小板 フィブリン 血液凝固

1. 研究開始当初の背景

止血血栓の形成には血小板膜上における血液凝固因子の活性化が必要である。従来、血小板は活性化により表面に出てくるリン脂質が血液凝固因子に活性化の場を提供するとされてきた。近年、スフィンゴ糖脂質マイクロドメインである膜ラフトが、血小板機能との関係で注目されはじめた。私は血小板膜ラフトに移行する血液凝固因子の存在の可能性を検討し、洗浄血小板をトロンピンで刺激し膜ラフト画分に移行するタンパク質をシヨ糖密度勾配遠心法により解析したところ、フィブリンが膜ラフトに移行することを見出した。

2. 研究の目的

フィブリンが血小板に結合すると outside-in signal が惹起され血餅退縮が起きることが知られている。ラフトは細胞膜を介するシグナル伝達の中継点として働いている。そこで本研究では、フィブリンのラフト移行が血餅退縮シグナルに関与しているかどうかを確認し、その移行メカニズムの詳細を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

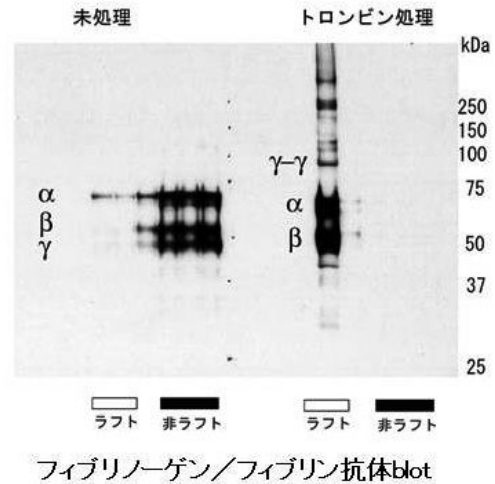
フィブリンのラフト移行は、シヨ糖密度勾配遠心法、ラフトマーカーとの二重免疫蛍光染色法、免疫電子顕微鏡法で解析した。ラフトと血餅退縮との機能的関わりについては、メチルβシクロデキストリンによるラフト破壊およびラフト構成脂質の欠損マウス血小板を使って解析した。

4. 研究成果

(1) トロンピン刺激血小板におけるフィブリンのラフト画分移行 (図)

血管が傷つくと血液凝固反応が開始され、血中の血液凝固第Ⅰ因子であるフィブリノーゲンがトロンピンによる切断でフィブリンに変わりフィブリンの網が強固な血栓として傷口を固める。血小板は血栓の主要な細胞成分であり、一連の血液凝固因子の活性化を血小板膜表面でおこなうことにより、血栓形成開始時において先導的な役割を果たしている。また、血液が凝固したのちにフィブリン網と血小板からなる凝血塊が収縮する血餅退縮という現象が知られ、形成した血栓を強固にして止血を完全にしている働きをしている。私は血小板活性化に伴い膜ラフトに移行する血液凝固因子の存在の可能性を検討し、フィブリンが膜ラフトに移行すること質量分析法により見出した。

図:トロンピン刺激によって膜ラフト画分に移行するフィブリンαβγ鎖



(2) 免疫染色法により示されたフィブリンのスフィンゴミエリンラフト移行

シヨ糖密度勾配遠心は膜ラフトの標準的な精製法であるが、「膜ラフトへの移行」と結論づけるためには他の方法でも移行を示すことが一般的である。そこでスフィンゴミエリン特異的膜ラフト認識毒素 Lysenin をラフトマーカーとして用いて、フィブリンが脂質ラフトに移行しているかどうかを免疫染色法で調べた。トロンピンで活性化した接着血小板では中央領域のみが Lysenin とフィブリン抗体で特異的に共染色され、スフィンゴミエリン特異的膜ラフトとフィブリンが共存することがわかった。

(3) 血餅退縮との関与

メチルβシクロデキストリン前処理によりラフトを破壊すると、outside-in signal および血餅退縮が抑制された。さらにラフト構成脂質であるスフィンゴミエリンの合成酵素欠損血小板を用いて血餅退縮の解析をおこなった。するとスフィンゴミエリン合成酵素欠損血小板では野生型と比較し、スフィンゴミエリンラフトの減少量に相関して血餅退縮の速度が遅くなった。このことから、スフィンゴミエリンラフトは血餅退縮に関わっていることがわかった。

(4) フィブリンラフト移行メカニズム

血液凝固 XIII 因子トランスグルタミナーゼ阻害剤は、フィブリンラフト移行および血餅退縮を抑制した。また XIII 因子トランスグルタミナーゼで修飾されるグルタミン 398,399 に変異を入れたフィブリンでは、ラフト移行が起きなかった。さらに XIII 因子欠損血小板では、フィブリンラフト移行および血餅退縮が欠如することを見出した。以上のことから、フィブリンラフト移行および血

餅退縮には血液凝固 XIII 因子が必要であると
考えられた。

(5) フィブリン以外の XIII 因子基質
XIII 因子欠損血小板の系に外から組換 XIII
因子を補充すると、血餅退縮が回復するよう
になる。しかし、血餅退縮回復の程度が充分
でないことから、血小板細胞質内の XIII 因
子トランスグルタミナーゼ活性の必要性が
示唆された。そこで血小板細胞質内 XIII 因
子トランスグルタミナーゼ基質の単離を試
みたところ 95kDa タンパク質を見出した。

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 9 件)

Hayashi M, Kasahara K.: Blood
Coagulation Factor XIII: A Multifunctional
Transglutaminase
Transglutaminases- multiple functional
modifiers and targets for new drug
discovery, Springer (in press)

笠原浩二、山本正雅: Update Review 「血
小板による血栓形成メカニズム研究の最新
動向」

実験医学 羊土社 32(18) 2966-2971,
(2014), 査読有

笠原浩二: "Introduce My article" 臨床血
液 55(3). 366 (2014), 査読有
DOI 10.11406/rinketsu.55.366

Kasahara K.: "Fibrin-translocation to
platelet lipid rafts and clot retraction." Jap
J Thromb. Hemost. 25(1). 92-94 (2014), 査
読有
DOI 10.2491/jjsth.25.92

Miki, T., Kaneda, M., Iida, K., Hasegawa,
G., Murakami, M., Yamamoto, N., Asou, H.,
Kasahara, K.: "An anti-sulfatide antibody
O4 immunoprecipitates sulfatide rafts
including Fyn, Lyn and the G protein alpha
subunit in rat primary immature
oligodendrocytes." Glycoconj. J. 30(9).
819-823 (2013), 査読有
DOI 10.1007/s10719-013-9487-5

Kasahara, K., Kaneda, M., Miki, T., Iida,
K., Sekino-Suzuki, N., Kawashima, I.,
Suzuki, H., Shimonaka, M., Arai, M.,
Ohni-Iwashita, Y., Kojima, S., Abe, M.,
Kobayashi, T., Okazaki, T., Souri, M.,
Ichinose, A., Yamamoto, N.: "Clot
retraction is mediated by factor
XIII-dependent fibrin-aIIbb3-myosin axis
in platelet sphingomyelin-rich membrane
rafts" Blood 122(19). 3340-3348 (2013), 査

読有

DOI 10.1182/blood-2013-04-491290

Sekino-Suzuki, N., Yuyama, K., Miki, T.,
Kaneda, M., Suzuki, H., Yamamoto, N.,
Tamamoto, T., Oneyama, C., Okada, M.,
*Kasahara, K.: "Involvement of
gangliosides in the process of Cbp/PAG
phosphorylation by Lyn in developing
cerebellar growth cones." J.Neurochem.
124. 514-522 (2013), 査読有
DOI 10.1111/jnc.12040

三木俊明、兼田瑞穂、*笠原浩二: "三量体 G
タンパク質 Goa の糖脂質ミクロドメインに
おけるシグナル伝達" 膜 37. 168-173.
(2012), 査読有
DOI 10.5360/membrane.37.168

Yuyama K, Sekino-Suzuki N, Yamamoto
N, Kasahara K: "Ganglioside GD3
monoclonal antibody-induced paxillin
tyrosine phosphorylation and filamentous
actin assembly in cerebellar growth cones."
J.Neurochem. 116. 845-850 (2011), 査読有
DOI 10.1111/j.1471-4159.2010.07071.x

[学会発表](計 11 件)

Kasahara K: Clot retraction is mediated
by factor XIII-dependent fibrin
-alphaIIbbeta3 -myosin axis in platelet
sphingomyelin-rich membrane rafts. BIT 's
5th World Gene Convention,
(2014.11.13-16.) Haikou China (invited)

笠原浩二: フィブリンの血小板脂質ラフト
移行と血餅退縮 第 19 回 近畿血栓症研究
会 (2014.10.11.) 北浜フォーラム 大阪

Kasahara K: "Clot retraction is mediated
by factor XIII-dependent fibrin
-alphaIIbb3-myosin axis in platelet
sphingomyelin-rich membrane rafts" 58th
Annual Meeting Society of Thrombosis and
Haemostasis Research.
(2014.2.12-2014.2.15). Vienna, Austria

Kasahara K, Ichinose A, Yamamoto N.:
"Clot retraction is mediated by factor
XIII-dependent fibrin-alphaIIbb3-myosin axis
in platelet sphingomyelin-rich membrane
rafts." Keystone Symposia "New Frontier in
the Discovery and Treatment of Thrombosis".
(2014.1.26-2014.1.30). Colorado, USA

笠原浩二: "血液凝固 XIII 因子によるフィ
ブリンの血小板スフィンゴミエリンラフト
移行と血餅退縮" 第 36 回日本分子生物学会
年会. (2013.12.3). ポートアイランド神戸
(兵庫・神戸)

笠原浩二、兼田瑞穂、三木俊明、飯田和子、小林俊秀、岡崎俊朗、山本正雅: "血小板スフィンゴミエリン特異的ラフトへのフィブリン移行と血餅退縮" 第7回スフィンゴテラピー研究会. (2012.7.13) ロイヤルホテル能登 (石川・羽咋)

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" 34回日本血栓止血学会学術集会. (2012.6.8.)ハイアットリージェンシ - 東京 (東京・新宿)

笠原浩二: "細胞膜ラフトにおける機能分子の集積とその意義" 第27回日本動物細胞工学シンポジウム(招待講演). (2012.6.1.) キャンパスイノベーションセンター (東京・港)

笠原浩二: "糖脂質マイクロドメインを介するシグナル伝達による生体制御" 日本膜学会第34年会生体膜シンポジウム(招待講演). (2012.5.9) 早稲田大学 (東京・新宿)

Kasahara K: "Fibrin-associated platelet rafts function as platform for clot retraction." Gordon Research Conference "Glycolipid & Spingolipid Biology". (2012.4.22-2012.4.27). (バルガ・イタリア)

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.. (2011.7.24-28). 京都国際会館 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 浩二 (KASAHARA, Kohji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副室長

研究者番号: 60250213