

## ◆トピックス◆

## 血液凝固 X 因子の欠損マウス

中 富 靖\*, 友 清 和 彦\*

## Targeted Gene Disruption of Factor X in Mice

Yasushi NAKATOMI\*, Kazuhiko TOMOKIYO\*

Key words : factor X, gene targeting, lethality, bleeding

## はじめに

血液凝固 X 因子 (FX) は, トロンビン産生能をもつ活性化 X 因子 (FXa) の酵素前駆体であり, 止血反応において中枢的な役割を果たしている。FX は血管障害部位で組織因子 (TF) と血中の活性化 VII 因子 (FVIIa) の複合体により活性化されるほか, リン脂質膜上で  $Ca^{2+}$  存在下, 活性化 IX 因子 (FIXa) と活性化 VIII 因子 (FVIIIa) の複合体により活性化される。FX に関して, 現在までに次のような知見が得られている<sup>1)</sup>。

① ヒト FX は, 肝臓で一本鎖として合成されるが, 軽鎖 (139 アミノ酸残基) と重鎖 (306 アミノ酸残基) の間の Arg<sup>140</sup>-Lys-Arg のトリペプチドが遊離され, 445 個のアミノ酸残基からなる分子量約 59,000 の 2 本鎖糖蛋白質として血中を循環している。このトリペプチドを切断する酵素はまだ同定されておらず, endoprotease の一種である furin の関与が間接的に示唆されている<sup>2)</sup>。② ほかのビタミン K 依存性凝固因子同様に, 軽鎖はアミノ末端から  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメイン, 上皮性細胞成長因

子様の EGF 1 と EGF 2 ドメインからなり, 重鎖はセリンプロテアーゼドメインを構成している。③ FX は, IX 因子 (FIX) やプロテイン C といったビタミン K 依存性凝固因子と同様に, 重鎖の N 末端から活性化ペプチド (52 個のアミノ酸残基) が遊離されることにより FXa に変換する。FXa は, 酸性リン脂質膜上で,  $Ca^{2+}$  および活性化 V 因子 (FVa) とプロトロンビナーゼ複合体を形成し, プロトロンビンに働いてトロンビンを生成するが, その活性化速度は FVa の存在により, FVa 非存在下に対して約 12,000 倍高まる<sup>3)</sup>。④ FX 遺伝子は全長約 25 kb で, 第 13 染色体の q34-qter に位置し, 8 個のエクソンと 7 つのイントロンから構成される。FX 遺伝子の 2.8 kb 上流に FVII 遺伝子が位置している。先天性 FX 欠損症は, まれな常染色体劣性遺伝病であり, これまでに約 50 家系以上報告されている<sup>4)</sup>。患者の臨床症状の重篤性は, FX 活性の減少とよく相関し, 外科手術や癌に関連した出血から重篤な自発性の出血まで幅広く観察される<sup>5)</sup>。

最近, FXa の細胞レベルでの研究が進み, その特異的レセプターとして effector cell

\* (財) 化学及血清療法研究所, 血液製剤研究部 [〒 860-8568 熊本市大雀 1-6-1]

Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute [1-6-1 Okubo, Kumamoto 860-8568, Japan]

Tel. 096-344-2183, Fax. 096-344-9234, e-mail: nakatomi-ya@kaketsuken.or.jp

表 1 FX<sup>+/-</sup>マウス交配による各遺伝型マウスの個体分布 (文献12 より引用)

	+/+	+/-	-/-	missing or no DNA	合計
新生仔*	77 (25%)	182 (60%)	40 (15%*)	6	305
胎齢 9.5日	30 (22%)	65 (47%)	35 (25%)	8 (6%)	138
胎齢 11.5日	22 (19%)	67 (58%)	26 (23%)	0	115
胎齢 12.5日*	37 (32%)	59 (51%)	18 (17%)	1 (1%)	115
胎齢 14.5日*	51 (31%)	89 (54%)	26 (16%)	0	166
胎齢 17.5日*	82 (26%)	173 (55%)	50 (16%)	12 (3%)	317

新生仔数または母体に再吸収されなかった胎仔数を示す。括弧内は総数に対する比率(%)を示す。\*印はメンデルの予測数に対しカイ二乗検定で有意差 ( $p < 0.005$ ) があったことを示す。(＃) 生まれた直後に死亡して、母親に食されたマウス (missing; 6匹) も含む。(転載許可取得)

protease receptor-1 (EPR-1) が注目されている。EPR-1 は白血球をはじめ, 血小板, 血管内皮細胞および血管平滑筋細胞上で発現しており<sup>6)</sup>, *in vitro* での検討から, FXa による血管平滑筋細胞の増殖<sup>7)</sup> や急性期の炎症反応<sup>8)</sup> に EPR-1 が関与するといわれる。また, ヒト臍帯静脈内皮細胞をもちいた *in vitro* の系では, FXa が EPR-1 以外のレセプターを介してサイトカインの産生や, 接着タンパク質の発現を促進するとの報告もある<sup>9)</sup>。

これまで血液凝固に関係するタンパク質の欠損マウスが数多く報告されているが, FVII や FVIII, FIX の欠損マウスでは, 胎仔期における致死性は確認されず, 新生仔期に出血症状で死亡する例が多い。しかし, TF や tissue factor pathway inhibitor (TFPI), FV, プロトロンビン, トロンビンレセプターの欠損マウスは, 胎仔期に致死性あるいは一部致死性を示す<sup>10)11)</sup>。本稿では, 最近, 新たに作出された FX 欠損マウスについて紹介したい。

### FX 欠損マウスからの情報

ごく最近, Dewerchin らはエクソン 2 からエクソン 8 を欠失させた FX 遺伝子を胚性幹 (ES) 細胞に導入し, ヘテロ接合体 (FX<sup>+/-</sup>) マウスを作出した<sup>12)</sup>。さらに FX<sup>+/-</sup> マウス同士を交配させ, FX ホモ接合体 (FX<sup>-/-</sup>) マウスを作出した結果, FX<sup>-/-</sup> マウスは新生仔全体の 15%

しか産出されなかった (メンデル理論値は 25%) (表 1)。さらに, 出生した FX<sup>-/-</sup> マウスは 50% が致死性の出血により 1 日齢で死亡し, 生き延びた新生仔もそのほとんどは 5 日齢までに死亡し, 残りの個体も 19 日齢までにすべて死亡した (図 1)。出血症状としては腹腔内出血がもっとも多く, ついで皮下出血, 頭蓋内出血が 1 例確認された (図 2)。FX<sup>-/-</sup> マウス新生仔の形態学的分析によると, 心臓・肺・腎臓・肝臓・脳に組織学的な異常はなく, 血管内皮細胞および平滑筋細胞の免疫学的染色による観察でも, 特に異常は認められず, 血管は正常に発達していた。また, FX<sup>-/-</sup> 胎仔では, サザンブロッティングにより FX 遺伝子の不活化が確認され, 抗マウス FX 抗体を用いた肝臓の組織染色および RT-PCR 分析の結果, FX タンパク質および mRNA の発現は認められなかった。

次に, FX<sup>-/-</sup> マウスの出生率の低さが, どの時点に由来しているのか, 胎齢別に調べたところ, 以下のことが確認された (表 1, 図 3)。胎齢 9.5 日では, FX<sup>-/-</sup> 胎仔の比率は理論値通りであり, 肉眼的にも胎仔・卵黄囊の脈管構造は野生型と同様で, 再吸収された胎仔もほとんど観察されなかった (各群ともに 1 例のみ)。しかし, 胎齢 12.5 日では, FX<sup>-/-</sup> 胎仔の比率は 17% と有意に理論値 25% を下まわり, 再吸収された胎仔に占める FX<sup>-/-</sup> 胎仔の比率は, 胎齢 11.5 日で 75% (8 例中 6 例), 胎齢 12.5 日で 84% (7 例中 6 例) であった。この際の再吸収の程度は, 卵黄囊の



残骸中に分解された胎仔がみられるものから、ほぼ正常な大きさを持つが無血管の状態になっているものまでさまざまであった。再吸収されなかったFX<sup>-/-</sup>胚では、胎仔へのフィブリンの沈着度や卵黄嚢・胎盤組織は野生型とほぼ同様で、脳やほかの組織の分解も認められなかったが、脳室内や中心管内における血液の蓄積が数例観察された。胎齢12.5日以降、FX<sup>-/-</sup>胎仔の比率は約16%で一定に推移し、巨視的・微視的にも野生型と見分けがつかなかった。

フィブリノーゲンを欠損させたマウスは、新生仔期には出血により死亡するが、胎仔期には致死性を示さない<sup>10)11)</sup>。これに対し、FX、FV、プロトロンビン欠損マウスは胎仔期に一部致死

性を示すことから、このような致死性が血液凝固機転だけに起因しているとは考えにくい。また、妊娠中期に部分的な致死性を示す点は、FXやFV、プロトロンビン欠損マウスで共通しているが、その時期は異なる。FX、FVに由来する致死性は胎齢11.5日以降に現れるものの、プロトロンビンでは胎齢9.5~10.5日に致死性を示す。先に述べたように、FXaおよびトロンピンは血管平滑筋細胞の増殖や、特異的レセプターを介した細胞へのシグナリングを担っているので、FXもプロトロンビナーゼ複合体としての機能だけでなく、マウスの発生時に重要な役割を果たしているのかもしれない。

もう一つ特記すべきは、胎齢17.5日のFX<sup>-/-</sup>

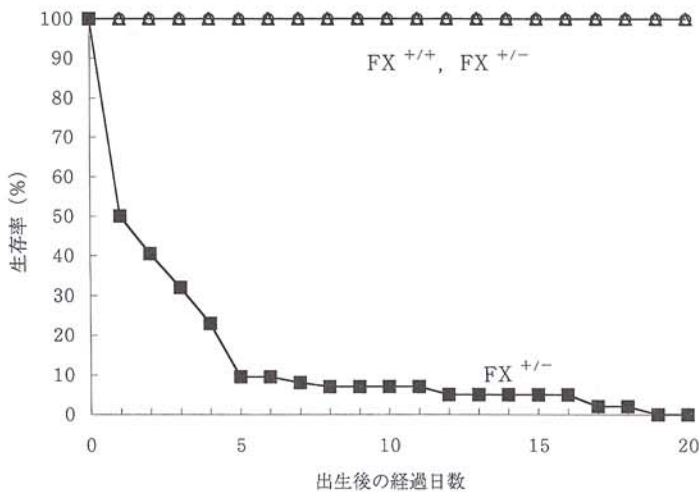


図1 各遺伝子型マウスの出生後の生存率(文献12より引用, 転載許可取得)

### 図2 FX<sup>-/-</sup>マウスの新生仔期における出血

生後1日齢の別々のFX<sup>-/-</sup>マウスで観察された腹腔内出血(A, B; Bは腹膜腔の顕微鏡観察結果)と皮下出血(D, E; Eは真皮下組織の顕微鏡観察結果), および野生型マウスにおける腹膜腔(C)と真皮下組織(F)の顕微鏡観察結果。(文献12より引用, 転載許可取得)

### 図3 各遺伝子型マウスの発生過程

A, B; 胎齢9.5日のFX<sup>-/-</sup>およびFX<sup>+/+</sup>胎仔をPECAM染色した。ともに血管の発達の発生は正常であった。C-G; 胎齢11.5日(C-E)と胎齢12.5日(F, G)の胚全体像。いずれもほぼ正常な形態をとっていたが、いくつかのFX<sup>-/-</sup>胚に出血が起きた徴候が観察された(C, F)。H-K; パネルCで示したFX<sup>-/-</sup>胚をH & E染色した脳室(H)と中心管(I)の組織切片と、同様にパネルEで示したFX<sup>+/+</sup>胚から得られた切片(J, K)を比較すると、FX<sup>-/-</sup>胚の切片で血液の集積が観察された。L, M; H & E染色した卵黄嚢の組織切片。パネルCで示したFX<sup>-/-</sup>胚の切片(L)とパネルEで示したFX<sup>+/+</sup>胚の切片(M)とともに卵黄嚢の血管構造は正常であった。(文献12より引用, 転載許可取得)

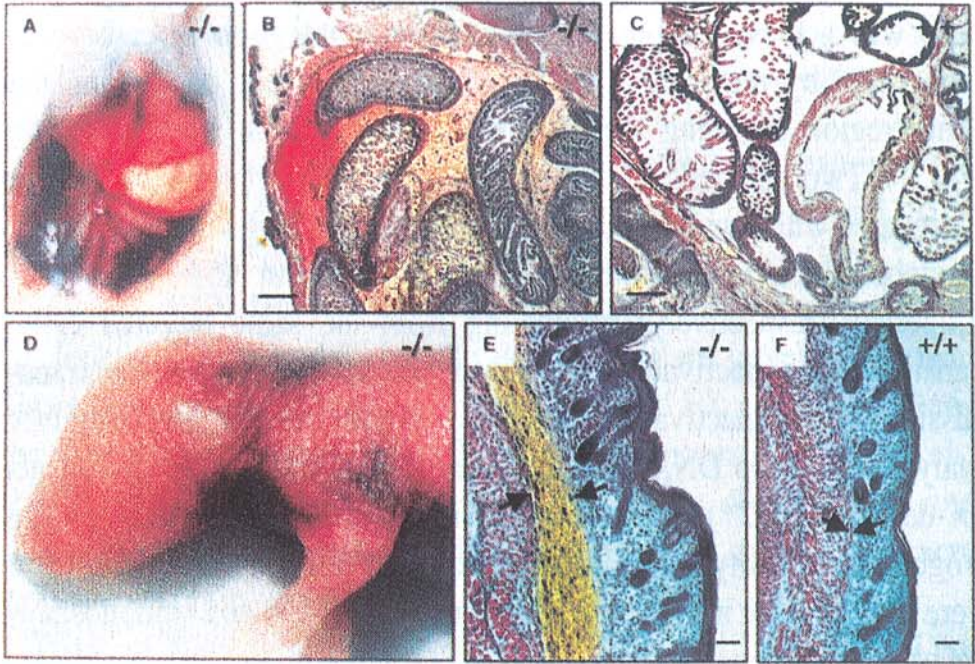


図 2

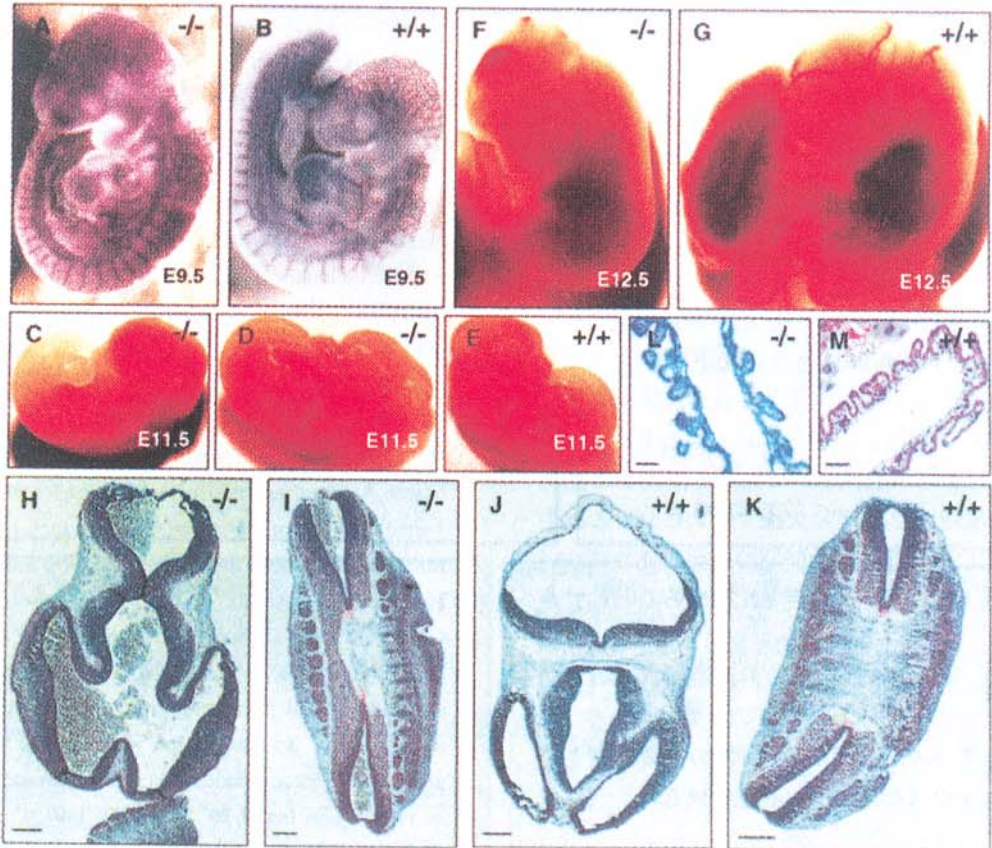


図 3



胎仔で、FVIIやFIX, FXI, FXII活性が低下していた点である。低下の程度は少ないが、FX<sup>+/-</sup>胎仔でも確認されており、FX<sup>+/-</sup>マウスの場合には成長すると正常レベルに戻ったという(データは示されていない)。各凝固因子欠損マウスの解析からFVII, FIX, FXIは胚の発生に影響しないため、FX<sup>-/-</sup>胎仔の部分的な致死性の原因は、これら因子の減少によるものではないと考えられる。ただし、すべての凝固因子について測定していないので、致死性の原因を討論するのは困難である。

### おわりに

以上を要約すると、①FX<sup>-/-</sup>マウスは、胎齢11.5~12.5日に約1/3が死亡し、少なくともその原因の一部は出血である。②FX<sup>-/-</sup>胎仔が一部致死性を示すことから、FXがトロンビン産生機能だけでなく、マウスの発生時に別の重要な役割を果たしている可能性も考えられる。③出生したFX<sup>-/-</sup>マウスの多くは、5日齢までに、残りの個体も19日齢までにすべて死亡し、腹腔内出血や皮下出血が観察されたが、血管や組織に異常がみられないので、その死因は出血と考えられた。

ヒトFX欠乏症では、主に関節内出血や筋肉内出血、鼻出血、子宮内出血、胃腸出血が観察される<sup>13)</sup>。この点で、出生したFX<sup>-/-</sup>マウスの出血症状はヒトでのFX欠乏症の臨床症状を幾分反映している。しかし、ヒトでのFX欠乏症では、FXのmRNAレベルまで消失する例はなく、現時点では、FX欠損マウスにおける出生後の死亡率の高さと胎仔期の一部致死性について、ヒトでのFX欠乏症と比較することはできない。

今後、FXの凝固活性以外の機能について明らかにするために、EPR-1の欠損マウスやFX変異体を発現するマウス、FXの発現時期を制限したマウスなどの作出が望まれる。

謝辞:御校閲を戴きました岩永貞昭先生(藤田保健衛生大学客員教授)に深謝いたします。

### 文 献

- 1) Watzke HH, High KA: Factor X (High KA, Roberts HR, eds): Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker, Inc., 239-255, 1995.
- 2) Himmelspach M, Pfeleiderer M, Fischer BE, Plaimauer B, Antoine G, Falkner FG, Dorner F, Schlokot U: Recombinant human factor X: High yield expression and the role of furin in proteolytic maturation *in vivo* and *in vitro*. *Thromb Res* **97**: 51-67, 2000.
- 3) Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG: The contribution of bovine factor V and factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* **254**: 10952-10962, 1979.
- 4) Cooper DN, Millar DS, Wacey A, Pemberton S, Tuddenham EGD: Inherited factor X deficiency: Molecular genetics and pathophysiology. *Thromb Haemost* **78**: 161-172, 1997.
- 5) Furie B: Vitamin K-dependent blood coagulation proteins: normal function and clinical disorders. In *Blood: Principles and Practice of Hematology*. (Handin RI, Lux SE, Stossel TP, eds) Philadelphia: JB Lippincott 1181-1217, 1995.
- 6) Altieri DC: Molecular cloning of effector cell protease receptor-1, a novel cell surface receptor for the protease factor X. *J Biol Chem* **269**: 3139-3142, 1994.
- 7) Herbert J, Bono F, Herault J, Avril C, Dol F, Mares A, Shaeffer P: Effector protease receptor 1 mediates the mitogenic activity of factor Xa for vascular smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* **101**: 993-1000, 1998.
- 8) Cilino G, Cicala C, Bucci M, Sorrentino L, Ambrosini G: Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation. Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor 1 induces acute inflammation *in vivo*. *J Clin Invest* **99**: 2446-2451, 1997.

- 9) Senden NH, Jeunhomme TM, Heemskert JW, Wagenvoord R, van't Veer C, Hemker HC, Buurman WA: Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* **161**: 4318-4324, 1998.
- 10) 水口 純, 岩永貞昭: 血液凝固・線溶因子のノックアウトマウスにみられる病態, 溝口秀昭, 平井久丸, 坂田洋一, 編集, 別冊・医学のあゆみ 血液疾患-State of Arts Ver. 2. 医歯薬出版, 313-318, 1998.
- 11) Carmeliet P, Collen D: Development and disease in proteinase-deficient mice: Role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res* **91**: 255-285, 1998.
- 12) Dewerchin M, Liang Z, Moons L, Carmeliet P, Castellino FJ, Collen D, Rosen ED: Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice. *Thromb Haemost* **83**: 185-190, 2000.
- 13) Peyvandi F, Mannucci PM: Rare coagulation disorders. *Thromb Haemost* **82**: 1207-1214, 1999.