

◆トピックス◆

VII 因子とプロテイン C の二重欠損マウス

上村 晃一朗*, 濱 本 高 義*

Combined Factor VII/Protein C Deficient Mice

Koichiro KAMIMURA*, Takayoshi HAMAMOTO*

Key words : factor VII/protein C deficient mice, tissue factor pathway inhibitor, coagulopathy, fibrin deposition

はじめに

止血反応は、血管傷害部位の細胞膜上に露呈した組織因子 (TF) と血中の活性型 VII 因子 (FVIIa) が、TF/FVIIa 複合体を形成し、IX 因子 (FIX) および X 因子 (FX) を活性化することによって開始される (外因系凝固反応)。活性型 FIX (FIXa) は、さらに FX を活性化し、生成した活性型 FX (FXa) を介して、プロトロンビンは α -トロンビンへ変換される。また、 α -トロンビンは XI 因子 (FXI) を活性化し、内因系凝固反応を作動しつつカスケード反応を増幅するとともに、最終的にフィブリノーゲンをフィブリンへ変換する。

こうした一連の反応の中で、 α -トロンビンは内皮細胞膜上でトロンボモジュリンと結合し、プロテイン C (PC) を活性化する。活性型 PC (APC) は、血小板および血管内皮細胞上でプロテイン S と V 因子 (FV) の存在下、活性型 FV と活性型 VIII 因子 (FVIIIa) を選択的に分解、不活化することにより凝固反応を制御する。一方、外因系凝固反応は、主に生理的インヒビターである Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) により制御されている。これらの凝固

反応に関わる因子の中には、単に止血のみならず、炎症反応や動脈硬化、癌の転移、血管新生などに密接に関連するものもあることが、最近、明らかにされつつある。また、これら因子の胚の分化・発生段階での役割を調べるために、ノックアウトマウスを用いた検討も進みつつある。

FVII, PC および FXI をそれぞれノックアウトしたマウスについての報告^{1)~6)}によると、① FVII 欠損 (FVII^{-/-}) マウスは、正常な胚発生を示すが、出生時に全体の 70% が腹腔内出血で、24 日齢までに、残りのすべてが頭蓋内出血により死亡する。② PC 欠損 (PC^{-/-}) マウスは、胎齢 17.5 日までは正常に発育するが、胎齢 13.5 日の時点で、まず脳に微量のフィブリン沈着が認められる。その後、フィブリン沈着が各臓器全般にわたって観察されるようになり、最終的に胎齢 17.5 日以降から出生までの間に、致死的な凝固異常を引き起こし、死産もしくは出生後 24 時間以内に全て死亡する。③ FXI 欠損 (FXI^{-/-}) マウスでは、胎仔期の発生および出生後の発育や繁殖・出産には何ら異常は見られず、尾切断後の出血時間を正常マウスと比較した時、わずかな延長が見られる以外は、正常との

* (財) 化学及血清療法研究所 血液製剤研究部 [〒 860-8568 熊本市大窪 1-6-1]
Blood Products Research Department, KAKETSUKEN [1-6-1 Ohkubo, Kumamoto 860-8568, Japan.]
Tel.096-344-2183 Fax.096-344-9234

表 1 FVII^{+/-}/PC^{+/-} マウスの交配により得られる各遺伝子型の出産新生仔数および発生胚数
(文献 11 より引用・改変, 転載許可取得)

	FVII ^{+/+} /PC ^{+/+}	FVII ^{+/+} /PC ^{+/-}	FVII ^{+/-} /PC ^{+/+}	FVII ^{+/-} /PC ^{+/-}	FVII ^{+/+} /PC ^{-/-}	FVII ^{+/-} /PC ^{-/-}	FVII ^{-/-} /PC ^{-/-}	FVII ^{-/-} /PC ^{+/-}	FVII ^{-/-} /PC ^{+/+}
出産後	6/9	20/17	19/17	28/34	6/9	8/16	0/ 8	12/16	9/9
胎齢 17.5 日 ¹⁾	3/6	9/12	18/12	22/23	4/6	15/12	5/ 6	9/12	9/6
胎齢 14.5 日 ¹⁾	3/4	2/ 8	14/ 8	17/16	3/4	7/ 8	5/ 4	4/ 8	4/4
胎齢 12.5 日 ¹⁾	5/5	16/10	8/10	15/20	5/5	15/10	13/10	13/10	5/5

¹⁾ 数値は個体数(実数/メンデルの予測数 [%])を示す

差は認められない。

また, TFPI については, 分子内に 3 つ存在する Kunitz-type プロテアーゼインヒビタードメインのうち, Kunitz-type 1 ドメインを選択的に欠損させた (TFPI_{K1}^{-/-} あるいは TFPI^{Δ8}) マウス, およびその FVII との二重欠損 (TFPI^{Δ8}/FVII^{-/-}) マウスが報告されている。それら^{7)~10)}によると, ④ TFPI_{K1}^{-/-} マウスは, 胎齢 11.5 日までに卵黄嚢血管形成不全による循環不全で, 約半数が死亡し, それ以降から出生前までに, 残りのほとんどが消費性凝固障害により死亡する。一方, ⑤ TFPI^{Δ8}/FVII^{-/-} マウスでは, 正常な胚発生を示し, メンデル則の予測値どおりに出生した。ただし, 出生後, 直ちに腹腔内出血あるいは頭蓋内出血で死亡する。TFPI_{K1}^{-/-} マウス胚の発生過程に見られる異常凝固が, FVII を欠損させると改善される。このことは, 胚発生過程における FVII 依存性凝固反応の制御を TFPI が担っていることを強く示している。

TFPI^{Δ8}/FVII^{-/-} マウスと同様に, PC^{-/-} マウスに見られる胚および出生時の過剰凝固が, FVII の欠損に応じて改善されるかどうかを知る目的で, FVII と PC の二重欠損マウスの作成が試みられた。

FVII/PC 二重欠損マウスからの情報

2000 年, Chan らのグループは, FVII と PC の二重欠損マウスを作成するために, まず, FVII 欠損のヘテロ接合体 (FVII^{+/-}) マウスに PC 欠損のヘテロ接合体 (PC^{+/-}) マウスを掛け

合わせ, 二重欠損ヘテロ接合体 (FVII^{+/-}/PC^{+/-}) マウスを作成し, さらに, それらを掛け合わせるにより, 二重欠損ホモ接合体 (FVII^{-/-}/PC^{-/-}) マウスを得た¹¹⁾。

FVII^{+/-}/PC^{+/-} マウス同士の交配により出生前までの胚では, 9 種の遺伝子型からなるマウスを, ほぼメンデル則にしたがった予測数で得ることができた。FVII^{-/-}/PC^{-/-} マウスは, 胎齢 17.5 日目までは生存が確認されるが, 出生時にはその生存がまったく認められなかった。また, FVII が完全に欠損している FVII^{-/-}/PC^{+/+} マウスおよび FVII^{-/-}/PC^{+/-} マウスでは, FVII^{-/-} マウスの場合と同様に, 出生後, 腹腔内出血や頭蓋内出血などで直ちに死亡した (表 1)。一方, PC の方だけが完全に欠損した FVII^{+/+}/PC^{-/-} マウスや FVII^{+/-}/PC^{-/-} マウスは, 出生するものの, PC^{-/-} マウスの場合と同様に, 消費性の凝固障害により死亡した。

FVII^{-/-}/PC^{-/-} マウスの場合, 胎齢 17.5 日目の解析では, メンデル則の予測数 (5/93 頭) だおりの胎仔数を示した (表 1)。そのうち 1 頭 (1/5) は死亡し, 残りの 4 頭 (4/5) についても高度の浮腫, 貧血, 各関節部皮下の出血や, その他の末梢性出血 (皮内および皮下出血), あるいは鼻周辺部の壊死が観察された (図 1a)。これらの諸症状を伴った表現型は, FVII や PC 単独の欠損マウスでは見られなかったものである。胚と卵黄嚢の間にも出血が見られるが, 卵黄嚢の発育および胚と卵黄嚢の間の血管内血流は正常で, 胎盤にも発育異常や出血は観察されなかった。さらに, FVII^{-/-}/PC^{-/-} 胚 (17.5 日目) の各臓器を調べると, 図 1 に示すように,

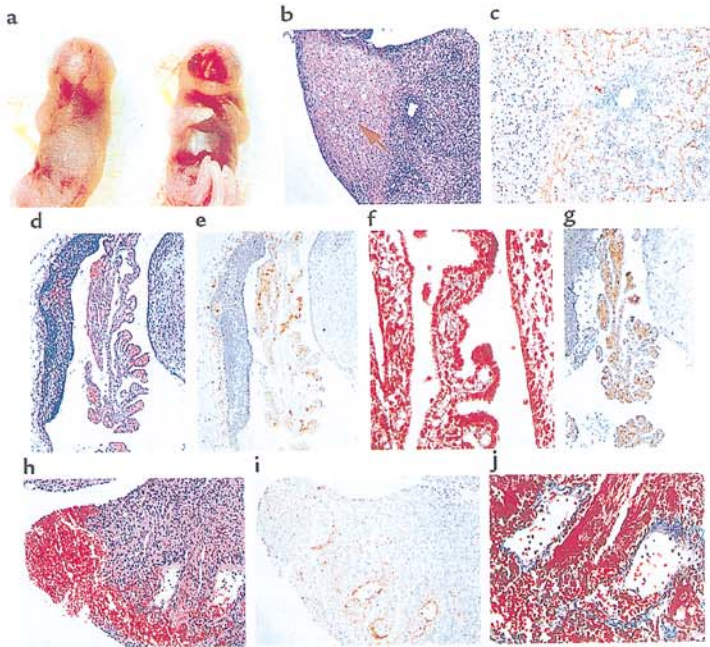


図 1

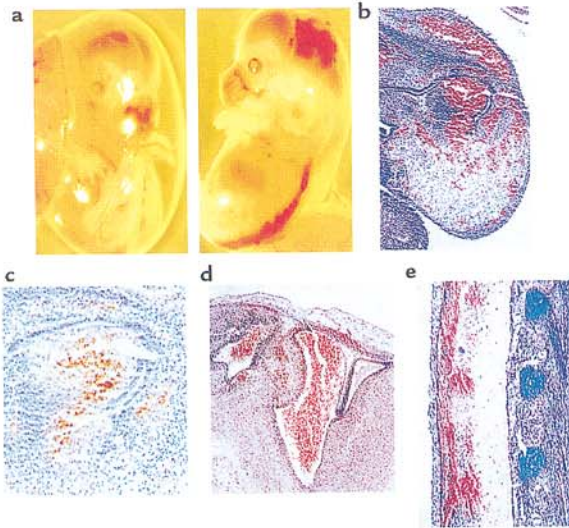


図 2

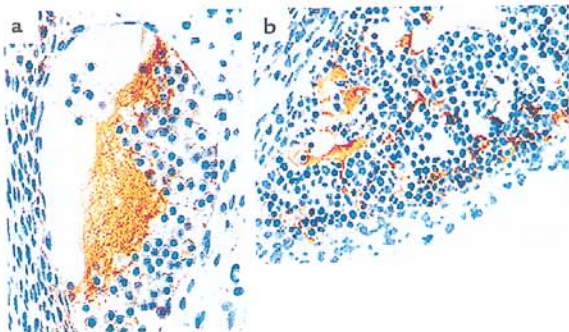


図 3

肝臓には繊維性の斑状修復部位が, 脳にはさまざまな程度の出血と壊死が観察され, 両心室は貧血状で, 両心房内には凝血塊が見られた. また, 1例ではあるが, 胃と腸管にも出血が見られた.

ヘマトキシリン-エオジン染色による組織検査で, 肝臓の繊維性斑状物は, 間質に出血した赤血球を抱み込んだ繊維性被膜であることが明らかとなった. さらにその周辺の間質にはフィブリン沈着が観察された. 脳の切片では, さまざまな大きさの壊死巣, 広範な出血やフィブリン沈着が見られた. これらの病変部の周囲にはコラーゲンが染色されたが, このことは瘢痕組織の浸入を意味しており, おそらく, 出血や組織損傷部位の被包化反応によるものと考えられる. また, 非マクロファージ性白血球 (CD 45⁺) が, 血管外フィブリン沈着部位に局在していた. これらの血管外フィブリン沈着部位には, P-selectin 染色の結果, 血小板は検出されなかった.

同じ発生時期の FVII^{+/+}/PC^{-/-} マウスと FVII^{+/-}/PC^{-/-} マウスの肝臓, 脳および心房においても, 同様の出血, フィブリン沈着および炎症性細胞浸潤が観察された. また, FVII^{+/-}/PC^{-/-} 胚では, FVII^{-/-}/PC^{-/-} 胚と同様な臓器における凝固異常所見は認められるものの, FVII^{-/-}/PC^{-/-} で観察される重篤な浮腫や末梢性の出血は見られなかった.

次に, これらの凝固異常の進行を明確にする

ために, FVII^{-/-}/PC^{-/-} マウスの胎齢 14.5 日での胚について調べた. この時期の PC^{-/-} マウスでは, 極微量の出血しか示さないものの, FVII^{-/-}/PC^{-/-} マウスでは, 貧血症を伴った末梢性出血および体内性出血が全てのマウスで見られた (図 2a). 卵黄囊の発育と血管内の血流は正常であるが, FVII^{-/-}/PC^{-/-} マウス胚の 1例に, 羊膜囊内に血液貯溜 (blood pools) が観察された. 組織学的にも, 広範な末梢性出血とフィブリン沈着が確認された (図 2b, 2c). 脳内, 脊髄周囲および肝臓内にもフィブリン沈着, 出血および組織破壊が確認された. 一方, この時期の 7つの FVII^{+/-}/PC^{-/-} 胚のうち 2例に, さまざまな程度の皮下出血が見られ, 羊膜囊内に血液貯溜を認めた. また, 間質性フィブリン沈着が, 肝臓や, 小規模だが脳にも認められた.

さらに, 胎齢 12.5 日の FVII^{-/-}/PC^{-/-} 胚についても調べたが, 発育は正常であり, 外観上の出血異常はなかった. しかし, 出血を伴わないフィブリン沈着が, 肝臓の間質や, 脳, 神経管, 尾動脈, 肺, 背部大動脈, 左後方肢芽などの血管内に, 組織学的に観察された (図 3a, 3b). 肝臓の間質および脳血管内でのフィブリン沈着は, PC^{-/-} 胚にも認められた. また, これらの血管内外のフィブリン沈着局所には, P-selectin 陽性の活性化血小板は存在しなかった.

この報告で大変興味あることは, TFPI_{K1}^{-/-} マウスから FVII を欠損させると, 凝固異常が

- 図 1 FVII^{-/-}/PC^{-/-} 胚の胎齢 17.5 日での分析. (a) 内出血や末梢性出血と浮腫を示している全体像. (b) 矢印で示す如く, 肝葉に繊維化がある (ヘマトキシリン-エオジン染色). (c) 肝臓のこの繊維化病変周囲に間質性フィブリン沈着 (ブラウン) を認める ((b) と鏡面切片の抗フィブリンノーゲン抗体による免疫染色). 菱脳切片の組織学的解析では, 出血 (d) や, フィブリン沈着 (e), コラーゲン増生 (f, 青), および CD 45⁺ 白血球 (g, 褐色) の存在を示している. 心房の組織学的解析では, 心房内に血液は存在 (h) するものの, フィブリン沈着 (i), そのフィブリンを取りまく間質性コラーゲンの侵入 (j) が観察される (文献 11 より引用. 転載許可取得).
- 図 2 FVII^{-/-}/PC^{-/-} 胚の胎齢 14.5 日での分析. 胚の全体像 (a). 胎齢 17.5 日で観察される出血症状は, 胎齢 14.5 日ですでに認められる. 出血は, 脊髄に沿った部分や, 脳内や, 鼻のような末端部で観察される. 胚切片の組織学的解析では, 出血 (b) とフィブリン沈着 (c) が鼻部に見られ, さらに出血は側脳室 (d) と脊髄後部 (e) に観察される (文献 11 より引用. 転載許可取得).
- 図 3 FVII^{-/-}/PC^{-/-} 胚の胎齢 12.5 日の組織切片を, 抗フィブリンノーゲン抗体で免疫染色すると, 脳内の血管 (a) や肝の間質 (b) にフィブリン沈着を認めるが, これは PC^{-/-} 胚では見られない (文献 11 より引用. 転載許可取得).

顕著に改善されたのに対し⁹⁾¹⁰⁾, PC^{-/-} マウスから FVII を欠損させた FVII^{-/-}/PC^{-/-} マウスでは, 凝固異常の改善もなく, 逆に, 各臓器でのフィブリン沈着の度合いが増悪していたということである. この点に関して, Chan らは次のような理由を挙げて説明している. (1) FVII 欠損によって TFPI が正しく機能していない可能性がある. (2) この TFPI の機能低下に加え PC が欠損したために, トロンピンが過剰に産生され, それに起因する過剰の thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) 活性化による線溶系の抑制が起こっている可能性がある. (3) 一方, 母体からの FVII の移行は見られないことから, FVII に依存した経路でのフィブリン沈着形成では説明できない¹⁾. (4) FXI の活性化を開始機転とする内因系凝固以外の新たなフィブリン形成経路の存在も可能性としてはある. しかし, いずれも明解な説明にはなっておらず, 特に, FXI に依存しないその他の凝固系代償経路の存在を立証するには, FVII と FXI の二重欠損マウスや FVII, FXI および PC の三重欠損マウスなどを作成して, 今後さらに詳細な研究が望まれる. その際, XII 因子から始まる古典的な内因系の開始経路(接触活性化系)が作動している可能性も十分に考慮しておく必要がある.

最近, Chan らは, PC^{-/-} マウスから FXI を欠損させた PC^{-/-}/FXI^{-/-} マウスについても報告しており¹²⁾, それによると FXI の欠損は, PC 欠損に基づくマウス胎仔期での致死を回避することができ, 出生した二重欠損ホモ接合体 (FXI^{-/-}/PC^{-/-}) マウスは 3 カ月齢まで生存したという. ただし, 死亡した FXI^{-/-}/PC^{-/-} マウスや生存している PC^{-/-}/FXI^{-/-} マウスを組織学的に調べると心臓, 肺, 肝臓にフィブリン沈着が認められた.

これらの結果は, PC がマウスの胎仔期の FXI を介した血液凝固反応の制御に重要な役割を果たしていることを示唆している.

おわりに

以上を要約すると, ① 出産時には, FVII^{-/-}/PC^{-/-} 遺伝型のマウスは 1 匹も生存していなかった. ② 胎齢 17.5 日目には, 胚はメンデル則により予測された数で存在していたが, 胎齢 12.5 日から胎齢 17.5 日までの胚発生過程において, 高度の浮腫や貧血, 関節部位の皮下出血などが見られた. また末梢性出血(皮内および皮下の出血)や鼻周辺の壊死, 肝臓の繊維性斑, 脳の出血と壊死, 心室内の貧血と心房内凝固や, 肝臓の間質や脳組織でのフィブリン沈着が観察された. ③ FVII^{-/-}/PC^{-/-} マウスは, TFPI_{K1}^{-/-} マウスのように, FVII の欠損で劇的な凝固異常の改善はなく, むしろ, 前者の場合は, 凝固異常が一層増悪していた. 従って, PC が, 止血機序, 特に FXI を介した凝固反応の制御に重要な役割を果たしていることは示されたが, 今後, PC^{-/-} マウスで FVII を欠損したにもかかわらず, 凝固異常が増悪した原因を確定する必要がある.

謝 辞: 御校閲を戴きました山本哲郎先生(熊本大学医学研究科教授), 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) Rosen ED, Chan JCY, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther T, Jalbert LR, Alblecht S, Zhong L, Lissens A, Schoonjans L, Moons L, Collen D, Castellino FJ, Carmeliet P: Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding: *Nature* **390**: 290-294, 1997.
- 2) 友清和彦, 副島見事, 水口純: 血液凝固 VII 因子の欠損マウス. *血栓止血誌* **9**: 141-145, 1998.
- 3) Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, Chan JCY, Carmeliet P, Collen D, Castellino FJ: Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest* **102**: 1481-1488, 1998.

- 4) 下瀬克郎, 濱本高義, 水口 純: プロテイン C の欠損マウス. 血栓止血誌 **10**: 219-222, 1999.
- 5) Gailani D, Lasky NM, Broze GJ Jr: A murine model of factor XI deficiency. *Blood Coag Fibrinol* **8**: 134-144, 1997.
- 6) 友清和彦, 水口 純: 血液凝固 XI 因子および IX 因子の欠損マウス. 血栓止血誌 **9**: 215-219, 1998.
- 7) Huang Z-F, Higuchi D, Lasky N, Broze GJ Jr: Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood* **90**: 944-951, 1997.
- 8) 神窪勇一: Tissue factor pathway inhibitor の欠損マウス. 血栓止血誌 **9**: 81-85, 1998.
- 9) Chan JCY, Carmeliet P, Moons L, Rosen ED, Huang Z-F, Broze GJ Jr, Collen D, Castellino FJ: Factor VII deficiency rescues the intrauterine lethality in mice associated with a tissue factor pathway inhibitor deficit. *J Clin Invest* **103**: 475-482, 1999.
- 10) 荒木辰也, 濱本高義, 水口 純: TFPI と FVII の二重欠損マウス. 血栓止血誌 **10**: 474-478, 1999.
- 11) Chan JCY, Cornelissen I, Collen D, Ploplis VA, Castellino FJ: Combined factor VII/protein C deficiency results in intrauterine coagulopathy in mice. *J Clin Invest* **105**: 897-903, 2000.
- 12) Chan JCY, Ganopolsky JG, Cornelissen I, Suckow MA, Sandoval-Cooper MA, Brown EC, Rosen ED, Ploplis VA, Castellino FJ: The characterization of combined protein C/factor XI deficiency in mice. XVth International Fibrinogen Workshop, Abstract, p17, Fibrinogen 2000, August 23-26, 2000, Leiden, The Netherlands.