

## 組織因子の欠損マウス

中垣 智弘\*<sup>1</sup> 水口 純\*<sup>1</sup> 岩永 貞昭\*<sup>1,2</sup>

### Targeted Disruption of the Murine Tissue Factor Gene

Tomohiro NAKAGAKI\*<sup>1</sup>, Jun MIZUGUCHI\*<sup>1</sup>, Sadaaki IWANAGA\*<sup>1,2</sup>

**Key words:** Tissue factor, Angiogenesis, Knockout mouse

#### はじめに

組織因子(組織トロンボプラスチン)は主に血管内皮下組織の中膜や外膜に存在し、血管が損傷し出血した時、直ちにVII因子(VIIa因子)と複合体を形成し外因系血液凝固反応を作動させる。こうした開始因子としての組織因子の役割は大きく、例えば、VIIa因子のX因子やIX因子活性化速度は、組織因子の存在下で約10<sup>7</sup>倍高まる。組織因子の蛋白構造・遺伝子・生合成等については、現在までに次の様な知見が得られている。①ヒト組織因子は263アミノ酸残基からなる分子量47,000の膜結合型1本鎖糖タンパク質で、サイトカインレセプタースーパーファミリーに分類され、219残基の細胞外ドメイン、23残基の膜貫通ドメイン、21残基の細胞内ドメインで構成される。②分子全体はほとんどβシート構造からなり、かつN末端側とC末端側の2つのドメインに分けられる。③組織因子とVIIa因子とのKd値は測定条件によって大きく異なるが、82pM~21nMと極めて結合親和性が高い(可溶性組織因子に比べ細胞上の組織因子の方が大きいKd値を示す)。④遺伝子は約13kb、第1染色体のp21-22上に存在

し、6つのエクソンと5つのイントロンからなる。⑤その転写はフォルボールエステルやLPS、IL-1の存在下で促進される。

凝固因子としての組織因子の機能は生理的な止血において重要であるだけでなく、炎症、アテローム性動脈硬化症、癌の転移や血管新生等の病態にも関与していると考えられている。更には、凝固反応を介さない機能として、組織因子の細胞内ドメインがメラノーマ細胞の転移に関係していることが報告されており<sup>1)</sup>、組織因子の新たな機能についての関心が急速に高まりつつある。

#### 組織因子欠損マウスからの情報

1996年、3つのグループ<sup>2)~4)</sup>がほぼ同時期に組織因子のノックアウトマウス(strain C57BL/6<sup>2)4)</sup>)を作製し、致死的效果をもたらすことを報告した。すなわち、組織因子の遺伝子を特異的に欠失させると、卵黄血管(vitelline vessel)及び胎児胚血管形成が不全となり、卵黄から胚への循環に異常をきたし、遂には子宮内で死亡してしまう。このことから、少なくとも出生前の組織因子の主要な機能の一つは血管形成にあることが示唆された。

\*<sup>1</sup> (財)化学及血清療法研究所 第III製造部〔〒860 熊本市大窪1-6-1〕:Third Production Department, The Chemo-Sero Therapeutic Research Institute

\*<sup>2</sup> 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所〔〒470-11 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98〕:Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University

表 1 組織因子欠損マウスの性状 (文献3より引用・改変)

胎齢	表現型	遺 伝 型		
		TF <sup>+/+</sup>	TF <sup>+/-</sup>	TF <sup>-/-</sup>
8.5日		11 (35%)	12 (39%)	8 (26%)
9.5日		39 (27%)	69 (48%)	36 (25%)
	胚: 正常/卵黄: 正常	9/9 (100%)	7/7 (100%)	6/17 (35%)
	胚: 正常/卵黄: 衰弱			2/17 (12%)
	胚: 壊死/卵黄: 衰弱			4/17 (24%)
	胚: 壊死/卵黄: 壊死			5/17 (29%)
10.5日		6 (15%)	21 (51%)	14 (34%)
	胚: 壊死/卵黄: 壊死			14/14 (100%)

数字は胚の数を, カッコ内の数字はその%を表している。

胎齢 9.5 日の各遺伝型と胎齢 10.5 日の TF<sup>-/-</sup> の胚の卵黄については, その異常の程度を衰弱と壊死に区別して評価している。

実験では組織因子遺伝子をノックアウトするために, ヘテロ接合体組織因子欠損マウス (TF<sup>+/-</sup>) 同士を掛け合わせた, TF<sup>+/+</sup> (正常) と TF<sup>+/-</sup> は正常に出産してくるものの, TF<sup>-/-</sup> (ホモ接合体組織因子欠損マウス) は胎齢が 9.5 日から 10.5 日の間に子宮内で死亡した (表 1)。なお, TF<sup>+/-</sup> 胎児組織の組織因子活性や mRNA 発現量は TF<sup>+/+</sup> 胎児のおおよそ半分であることが確認されている。さて, 8.5 日目までは TF<sup>-/-</sup> の胚では形態学的に観察される異常はなく, 胚外血管や胚に連結する卵黄血管も発生していたが, 9.5 日目になると胚の衰弱が見られる。これは卵黄血管を介しての胚への循環不全の結果, 虚血状態になるためと考えられた。ひどい例では広範な組織の壊死が見られるようである。この 9.5 日目の卵黄囊では, 約 2/3 の症例において本来あるべき大きな卵黄血管の形成が認められず, 代わりに不規則な拡張した毛細血管叢が形成され, 血液細胞が主に体腔内に集まり実質組織は貧血状態にあることが観察されている。造血系の機能に関しては TF<sup>+/+</sup> と TF<sup>-/-</sup> とで差のないことから, これは異常卵黄血管からの血球の血管外への漏出を示唆するものであろう。10.5 日までには全ての TF<sup>-/-</sup> の胚が異常となった (表 1)。また, 異常卵黄囊の顕微鏡での観察では, 正常の卵黄血管が欠如し, 代わりに拡張した毛細血管が互いにランダムに融合した血管叢が認められる。これが衰弱, 壊死を起こす原因と推定される。9.5 日目の TF<sup>-/-</sup> の胚では, 内臓性内胚葉細胞層と血管内皮細胞層を

界する間質に存在すべき間葉系細胞 ( $\alpha$  アクチンを発現しており, 血管平滑筋を形成してゆくと考えられている細胞種) の数が TF<sup>+/+</sup> の約 20% に低下しているため平滑筋性が不足している。このため 9.5 日目以降の発生過程で必須の血圧負荷に耐える筋性血管 (中膜に平滑筋層を有する血管) が TF<sup>-/-</sup> では形成されにくく, 代わりに平滑筋層を欠く毛細血管が連結・融合した異常な血管叢を形成すると推定されている。この異常は, 卵黄囊, 胚及び胎盤のどの部位でも同様に生じることが想定されるが, 発生過程では, 卵黄囊に最も早くこの筋性血管が要求されるため, 卵黄囊血管形成不全が, 強く表現されるのではないかとされている。

#### おわりに

以上を要約すると, ① TF<sup>-/-</sup> の胚は 9.5 日から 10.5 日の間に子宮内で死亡するが, その原因は卵黄囊血管の形成不全による胚の循環不全と考えられる。②卵黄囊血管の形成不全は内皮細胞や造血細胞の機能異常ではなく, 血管平滑筋層を形成するはずの間葉系細胞/血管周細胞の集積あるいは機能不全のため, 発生初期の毛細血管と幼若筋性血管の分化が TF<sup>-/-</sup> の卵黄囊血管では起こらず, 9.5 日以降の胚での循環血流量の増加要求に対応しきれないと推測される。③この間の異常にかかわる組織因子の分子レベルでの役割は不明であるが, Xa 因子やトロンビンのように, 組織因子が直接シグナル伝達することによって, 血管の分化にある種の役

割を果たしている可能性は濃い<sup>3)</sup>。④ただし、この発生異常機構として、組織因子の凝固因子としての役割の欠損が否定しきれているわけではない。すなわち、発生過程で必須と考えられる血管同士の連結の際には出血の危険性が伴っており、これ乗り越えるためには血液凝固系が不可欠だという見方もある<sup>2)</sup>。ただし、フィブリノーゲン欠損も含め、多くの凝固因子欠損者や欠損マウスでも発生が正常に経過できることと矛盾するように見える。しかしながら、胚発生の初期には、これらの可溶性凝固因子が母体から供給される可能性も残されていると考えられる。

謝 辞: 御校閲を戴きました山本哲郎先生(熊本大学医学部教授)に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, Pawashe A, Garen A: Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8205-8209, 1995.
- 2) Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmbæk K, Danton MJS, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EW, Degen JL: Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6258-6263, 1996.
- 3) Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Vlaenderen IV, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Müller M, Risau W, Edgington T, Collen D: Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* **383**: 73-75, 1996.
- 4) Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ: Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* **88**: 1583-1587, 1996.