

◆トピックス◆

トロンボモジュリンの欠損マウス

亀井慎太郎^{1*} 水口 純^{1*} 岩永貞昭^{1*2}

Thrombomodulin Deficient Mice

Shintaro KAMEI^{*1}, Jun MIZUGUCHI^{*1}, Sadaaki IWANAGA^{*1*2}

Key words: thrombomodulin deficient mice, protein C, thrombin, embryonic stem

はじめに

トロンボモジュリン (以下, TM と略す) は主に血管内皮細胞に発現している抗凝固因子であり, トロンピンと 1:1 の複合体を形成し, トロンピンによるプロテイン C 活性化反応のコファクターとして機能する. すなわち, TM の共存下, トロンピンによるプロテイン C 活性化の速度は 10^3 倍増強される. ヒト TM の生化学的性質およびタンパク質構造と遺伝子構造などについては, 以下のような知見がある¹⁾²⁾.

① 還元条件下の SDS-PAGE で, 分子量 105,000 を示す一本鎖糖タンパク質で, ほとんどすべての臓器の動静脈, 毛細血管, リンパ管, 血小板などに広く存在する. ② TM 前駆体は 18 アミノ酸残基のシグナルペプチドを含む 575 アミノ酸残基から構成され, レクチン様ドメイン, 6 個の EGF 様ドメイン, O-グリコシド型糖鎖結合ドメイン (ある種の TM にはグリコサミノグリカン鎖が含まれる), 細胞膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含む. ③ トロンピンは TM と高い親和性で結合 ($K_d=0.5\sim 1.0$ nM) し, プロテイン C も Ca^{2+} 存在下に TM と結合する. 種々の組換え変異 TM を用いた検討

から, TM のコファクター活性の発現には, アミノ末端から 4~6 番目の EGF 様ドメインが必要であり³⁾, トロンピンは第 5EGF 様ドメインに⁴⁾, プロテイン C は Ca^{2+} 存在下, 第 4EGF 様ドメインの Asp³⁴⁹ 残基の周辺領域に結合する⁵⁾. ④ TM 遺伝子は第 20 番染色体に局在し, 3.7 kb 長でイントロンは持たない. 翻訳開始部位の上流 350~300 bp にプロモーター活性が, 1.1~0.9 kb 上流にサイレンサーが存在する. ⑤ 最近, TM 様作用, つまり α -トロンピンの基質特異性を変える有機化合物が Lilly 社の研究グループによって同定されたが, もし TM に代わるものとして *in vivo* でも有効であれば大変興味深い⁶⁾. ⑥ TM は血漿や尿中にも可溶性タンパク質として見いだされており, 特に血漿中の可溶性 TM は内皮細胞障害の分子マーカーとして利用されている.

トロンボモジュリン欠損マウスからの情報

1995 年, Healy らはヘテロ接合体の TM 欠損 (TM^{+/-}) マウスを作製した⁷⁾. TM^{+/-} マウスは野生型 (TM^{+/+}) マウスに比べると TM の mRNA, 発現タンパク質量, 及びコファクター活性とも約 50% 減少していた. しかし, TM^{+/-}

*1 (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

*2 藤田保健衛生大学 総合医学研究所 (〒470-11 愛知県豊明市香掛町田楽ヶ窪 1-98): Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University

マウスは大きさ, 繁殖力とも $TM^{+/+}$ 同様まったく正常で, 血栓性の合併症もない。一方, $TM^{+/-}$ の交配からはホモ接合体の TM 欠損 ($TM^{-/-}$) マウスはえられず, 胎齢 9.5 日までにすべて死亡する (表 1)。これら $TM^{+/+}$, $TM^{+/-}$,

$TM^{-/-}$ マウスを胎齢 7.5~9.5 日のものについて形態学的に比較すると, $TM^{-/-}$ は胎齢 7.5 日目までは大きさも正常で, 予定頭側ヒダ (prospective head folds) や神経溝 (neural grooves) のほか, 原始線条 (primitive streaks) や胚外体腔 (extraembryonic cavities) にもなんら異常はないという (図 1A, D, G)。しかし, 胎齢 8.5 日になると, 胚に顕著な体節 (6~12 対) が出現し (図 1B, E, H), 神経管は体節中央部分で閉じつつ, はっきりした頭側ヒダが形成されるとともに収縮し始める。胎齢 9.5 日では $TM^{-/-}$ は著しい異常を呈し, もはや識別可能な特徴は見あたらなくなり, 10.5 日目までに再吸収されてしまう (図 1C, F, I)。 $TM^{-/-}$ 胚の死に, 母胎側の何らかの因子が関与しているかを調べるため, 胎齢 7.5 日の $TM^{+/+}$, $TM^{+/-}$, $TM^{-/-}$ の胚を母胎脱落膜 (deciduous membrane) より単離し, *in vitro* で培養した。その結果, $TM^{-/-}$ の胚は $TM^{+/+}$ や $TM^{+/-}$ の胚と同様, 20 体節までは胚の成長, 臓側卵黄囊 (vis-

表 1 $TM^{+/-}$ 同系交配から作出されたマウスの性状 (文献 5 より引用・改変)

生育段階	母胎数	胎児数	遺伝型		
			+/+	+/-	-/-
E7.5	3	27	11	12	4
E8.5	8	59	21	27	11
E9.5	3	20	3	13	4*
E10.5	9	61	24	37	0
E12.5	1	10	3	7	0
E16.5	1	7	5	2	0
E17.5	1	3	2	1	0
E18.5	1	5	2	3	0
P28	32	152	56	96	0

胚 (E7.5~E18.5) および成熟マウス (P28) の遺伝型は, $TM^{+/-}$ の 2 つのクローンから, 同系交配でえられた子孫の総数として示す。*胚はいずれも著しい異常を示した。(転載許可取得)

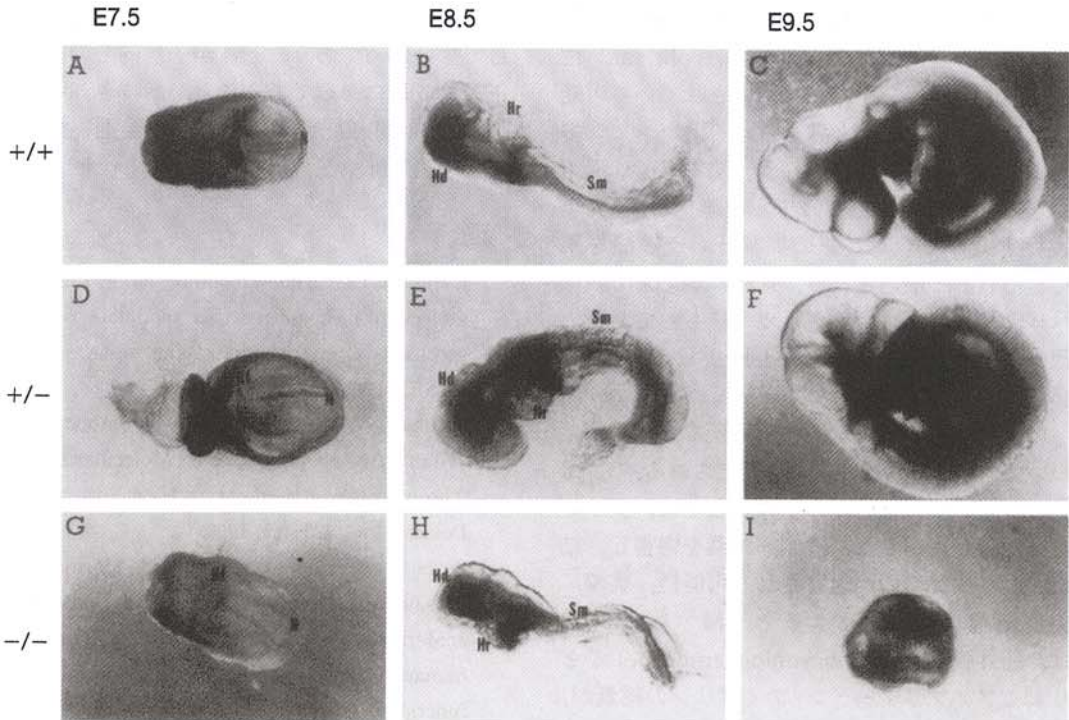


図 1 $TM^{+/+}$, $TM^{+/-}$, $TM^{-/-}$ の胎齢 7.5, 8.5 および 9.5 日における胚全体の顕微鏡写真 (文献 5 より引用)。Hd: 頭部, Hr: 予定頭側ヒダ, Sm: 体節, N: 神経溝。E 7.5: $\times 30$ 倍, E 8.5: $\times 25$ 倍, E 9.5: $\times 20$ 倍。(転載許可取得)

表 2 *in vitro* 胚子培養の結果(文献5より引用・改変)

遺伝型	総胚 子数	体節対		心臓 拍動	脈管 形成*	中軸 回転
		13-20	21-29			
TM ^{+/+}	20	16	4	20	10	2
TM ^{+/-}	20	16	4	20	7	2
TM ^{-/-}	7	7	0	7	0	0

数字は胚子の数を表す。*脈管の形成は、臓側卵黄囊(visceral yolk sac)内に循環する血液細胞の存在が認められるかどうかを判断の指標にした。(転載許可取得)

ceral yolk sac)での血管形成などが見られ、良好な心臓の鼓動が確認されるまで生育することが明らかになった(表2)。このことは母胎の脱落膜近傍の微小環境がTM^{-/-}胚の致死に関わることを示唆する。しかし、TM^{-/-}の胚は、TM^{+/+}やTM^{+/-}の胚が*in vitro*培養下で示す生育段階に匹敵するほどには生育しなかった。これは胎齢7.5日でTM^{-/-}胚を単離する際、すでに母胎で何らかの因子が影響を受けていたか、あるいはTM^{-/-}胚が生育する途上で、新たな障害が現れたことを示唆する。

さて、胚と母胎循環系との境界面において、胎盤形成に先立って起きる広範囲な組織リモデリングは、壁側卵黄囊(parietal yolk sac)付近での微小環境を過凝固状態にさせている可能性がある。その一因と考えられるトロンビンの発現は胎齢12.5日以降なので、この場合、母胎由来と考えられる⁹⁾。従って、壁側卵黄囊に発現したTMがトロンビンの抑制という機能を果たしていると推定される。実際、Reichert膜はヘパラン硫酸プロテオグリカンをもっており、壁側内胚葉(parietal endoderm)はt-PAを分泌している。

以上の知見から、TM^{-/-}が致死である原因について、次の3つの可能性が考えられる。(i)母胎のトロンビンレベルの上昇とともに、フィブリン沈着が誘導され、壁側卵黄囊を傷害し、結果として物質交換が阻害される可能性。実際、免疫細胞学的手法によるとTM^{-/-}マウスでは、胚外膜(extraembryonic membrane)をとりまくフィブリノーゲン/フィブリンの総量が、TM^{+/+}、TM^{+/-}マウスに比較して増加している。しかし、この仮説の厳密な検証には、フィブリノーゲンと反応しないフィブリン特異的抗

体を用いた実験が必要である。(ii)壁側卵黄囊近傍のフィブリン沈着がプラスミンを生成し、フィブリンを溶かすと同時にラミニンなどのReichert膜構成成分や壁側内胚葉に損傷を与える可能性⁹⁾。(iii)TM^{-/-}マウスでは、胚と母胎循環系の境界面に産生されるトロンピンはトロンピンレセプターを介したシグナリングに利用されるので、通常よりも早すぎる段階で活性化し、その結果、胚の発育に悪い影響を及ぼしている可能性などが示唆されよう。

おわりに

以上を要約すると、①TM^{+/-}マウスはTM^{+/+}マウスに比較してmRNAおよびタンパク質発現量が約半分であったが、TM^{+/-}マウスは正常で血栓性の合併症もない。②TM^{-/-}は胎齢8.5日から胚全体の生育及び発達が抑制され、9.5日までに死亡する。③TM^{-/-}を胎齢7.5日で母胎の脱落膜より単離し、*in vitro*で培養すると臓側卵黄囊と胚に血管が出現した。したがって、TM^{-/-}マウスが妊娠中期まで生き残れないのは、母胎と胚との間の相互反応が機能してないためであり、TMが子宮内での胎児の正常な成長に必須であることが示唆される。

謝辞:御校閲いただいた北本康則先生(熊本大学医学部第三内科)に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Esmon CT: Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* 9: 946-955, 1995.
- 2) Dittman WA, Nelson SC: Thrombomodulin (High KA, Roberts HR, eds): Molecular basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker, Inc., 425-445, 1995.
- 3) Zushi M, Gomi K, Yamamoto S, Maruyama I, Hayashi T, Suzuki K: The last three consecutive epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin comprise the minimum functional domain for protein C-activating cofactor activity and anticoagulant activity. *J Biol Chem* 264: 10351-10353, 1989.

- 4) Nagashima M, Lund E, Leonard JC, Morser J, Parkinson JF : Alanine-scanning mutagenesis of the epidermal growth factor-like domains of human thrombomodulin identifies critical residues for its cofactor activity. *J Biol Chem* **268**, 2888-2892, 1993.
 - 5) Zushi M, Gomi K, Honda G, Kondo S, Yamamoto S, Hayashi T, Suzuki K : Aspartic acid 349 in the fourth epidermal growth factor-like structure of human thrombomodulin plays a role in its Ca²⁺-mediated binding to protein C. *J Biol Chem* **266** : 19886-19889, 1991.
 - 6) Berg DT, Wiley MR, Grinnell BW : Enhanced protein C activation and inhibition of fibrinogen cleavage by a thrombin modulator. *Science* **273** : 1389-1391, 1996.
 - 7) Healy AM, Rayburn HB, Rosenberg RD, Weiler H : Absence of the blood-clotting regulator thrombomodulin causes embryonic lethality in mice before development of a functional cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 850-854, 1995.
 - 8) Soifer SJ, Peters KG, O'Keef J, Coughlin SR : Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. *Am J Pathol* **144** : 60-69, 1994.
 - 9) Inoue S, Leblond CP, Laurie GW : Ultrastructure of Reichert's membrane, a multilayered basement membrane in the parietal wall of the rat yolk sac. *J Cell Biol* **97** : 1524-1537, 1993.
-