

トロンビンレセプター欠損マウス

羽室 強*, 水口 純*, 中垣 智 弘*

Thrombin Receptor Deficient Mice

Tsutomu HAMURO*, Jun MIZUGUCHI* and Tomohiro NAKAGAKI*

Key words: thrombin receptor deficient mice, protease-activated receptor 3, platelet, fibroblast

はじめに

トロンビンはフィブリン形成や幾つかの血液凝固関連因子の活性化といった反応において中心的役割を果たすほかに、血小板、血管内皮細胞をはじめとする様々な細胞に対しても作用を示す。トロンビンによる細胞応答反応はトロンビンレセプターを介した作用であり、そのレセプターの存在も巨核球-血小板、単球-マクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、心臓、肺および肝臓などで広く見いだされている¹⁾²⁾。従って、細胞応答反応も、放出や増殖あるいは遊走など、細胞種により多様である。

トロンビンレセプター (TR) は 1991 年に Vu らによって初めて同定され³⁾、今日までに様々な研究が行われてきたが、最近、新しいトロンビンレセプターといえる protease-activated receptor3 (PAR3) が報告された⁴⁾。従って、トロンビンレセプターは現在 2 種類存在することになるが、ここで述べる TR は PAR1 とも呼ばれる第 1 のトロンビンレセプターを意味する。この TR のタンパク質構造と機能および遺伝子構造についての知見を、以下に概略すると⁵⁾⁶⁾⁷⁾、

① TR 前駆体は 26 アミノ酸残基のシグナルペプチドを含む 425 アミノ酸残基から構成さ

れ、分子量は約 5 万である。② 7 個の膜貫通領域をもつ G 蛋白共役型レセプターの構造をとっており、G 蛋白を介したシグナル伝達を行う。③ TR の細胞外領域に存在するヒルジン様ドメイン (Asp⁶⁰-Glu⁶⁰) にトロンビンが結合し、その近傍の N 末端領域 (Arg⁴¹-Ser⁴²) を切断する。こうして新たに生じた N 末端領域がアゴニスト作用を発揮する。この点で TR は従来のレセプターにない特徴を示す。また、このアゴニストドメインの合成ペプチド単独でも TR は活性化される。④ TR 遺伝子は第 5 染色体 q13 に位置し、全長約 3.5 kb の長さでイントロンは持たない。⑤ PAR3 もその分子内にヒルジン様ドメインを保持しており、その近傍の N 末端領域 (Lys³⁸-Thr³⁹) がトロンビンによって切断されて活性化する。しかし、同じ TR のファミリーである PAR2 は、ヒルジン様ドメインが欠如しているためトロンビンによって活性化せず、トリプシンによって効率的に活性化を受ける⁸⁾。

トロンビンレセプター欠損マウスからの情報

1996 年、Connolly らは、ヘテロ接合体 TR 欠損 (TR^{+/-}) マウス (strain C57BL/6) を掛け合わせることでホモ接合体 TR 欠損 (TR^{-/-}) マウスを作製した⁹⁾。その結果、TR^{+/+} および

* (財)化学及血清療法研究所 血液製剤研究部 (〒860 熊本市大塚 1-6-1) : Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

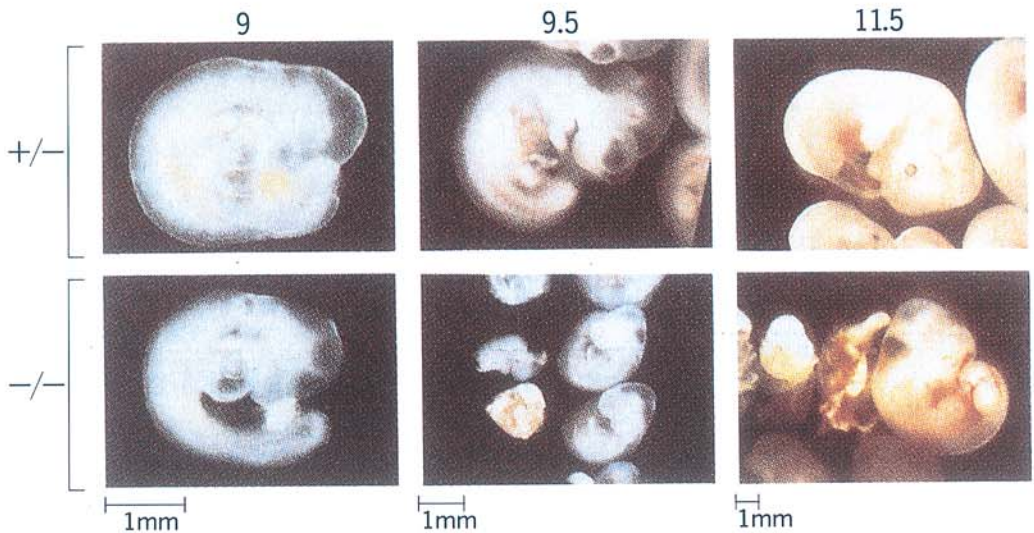


図1 TR^{+/+}、TR^{-/-}の胎齢9日、9.5日および11.5日における胚の顕微鏡写真(文献9より引用)
上段のTR^{+/+}に比べ、下段のTR^{-/-}は9.5日で明らかな発育の遅延が見られる(Reprinted by permission from Nature Vol. 381 pp. 516-519 6 June 1996 Copyright Macmillan Magazines Ltd.)

TR^{+/+}マウスは正常に出生するものの、TR^{-/-}マウスは50%が胎児期に死亡した。TR^{+/+}とTR^{-/-}の胚形成の状態を比較すると(図1)、胎齢8.5日までは形態学的に差はなく、良好な心臓の鼓動および卵黄嚢の血液循环を保持している。しかし、胎齢9日の時点で、TR^{-/-}の胚は一樣に成長が遅延し、胎齢9.5日にはTR^{-/-}の胚の半数は心臓が停止してしまう。この胚の発育不良は胎盤の成長の遅延と相関しており、TRの胎盤の成長への関与が示唆される。胎齢9日から10日の間を生き残ったTR^{-/-}の胚の成長は、胎齢11.5日までにはTR^{+/+}に追いつき、その後は正常に発育する。なぜTR^{-/-}マウスの50%が死亡してしまうのか原因は不明であるが、異なる系統(strain 129/Sv)のTR^{-/-}でも同様に観察されることから、遺伝的背景によるものではない。胎齢9日から9.5日の時点でTR-mRNAの発現が心臓、血管、造血細胞、胎盤、脳および間葉系細胞などに幅広く確認されるが²⁾、どの組織のTR欠損が致死の直接要因となっているか不明である。また、プロトロンビンmRNAの発現は胎齢12.5日以降であることから²⁾、発生初期ではTRの活性化物質として母胎由来のプロトロンビンやトロンビン以外

のプロテアーゼ、あるいは未知のアゴニストペプチドなどの関与が考えられる。

驚くべきことに、出生したTR^{-/-}マウスの血小板はトロンビン刺激により正常に活性化され、TR^{-/-}マウスの出血時間(bleeding time)もTR^{+/+}と全く差がない。また、マウスTRのアゴニストペプチドはTR^{-/-}のみならずTR^{+/+}マウスの血小板も活性化しない。これらの結果は、TRがマウスの血小板の活性化機能に関与していないことを示唆し、新たなトロンビンレセプターであるPAR3の発見に結びついた。

血小板とは逆に、TR^{-/-}マウスの成獣肺あるいは胎児より調製した線維芽細胞は、トロンビン刺激による細胞内Ca²⁺濃度の上昇あるいはイノシトールリン脂質の分解などの細胞応答が欠如していた。これは、トロンビンによる線維芽細胞の活性化には、TRが重要であることを示している。

ヒト血小板においては、TRのアゴニストペプチドにより活性化されることから、TRが関与しているといえよう³⁾。しかし、アゴニストペプチドによる活性化の程度はトロンビンに比べて弱いことから、ヒト血小板上でも第2のTRが共存している可能性が考えられる。いずれに

せよ TR^{-/-}マウスでみられた血小板と線維芽細胞間のトロンビンに対する応答性の違いは、組織の違いによりレセプターの種類と役割が異なる可能性を示唆する点で非常に興味深い。

おわりに

以上を要約すると、① TR^{-/-}の胚は、9 から 10 日にかけて発育の抑制がみられ約 50% が死亡する。② TR^{-/-}マウスは発生過程あるいは出生後も出血傾向を呈さず、トロンビンに対する血小板の応答も正常である。③ TR^{-/-}マウス由来の線維芽細胞はトロンビンによる細胞応答反応が欠如しており、細胞によってレセプターが異なる可能性が示唆される。事実、PAR3 の mRNA はヒト骨髄細胞やマウス脾臓巨核球を始め、ヒトの心臓、肝臓や胎盤、あるいはマウスの脳や肺などにも発現しており、トロンビンの細胞活性化機構において PAR3 も重要な役割を果たしているものと考えられる。そして異なる種類のトロンビンレセプターが組織特異的に作用を発揮しているのであれば、組織選択的にトロンビンのシグナルを阻害することも可能となり、血栓症や炎症あるいは細胞増殖性の疾患などの治療の新たな標的となるであろう。

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) ならびに岩永貞昭先生 (藤田保健衛生大学客員教授) に深謝いたします。

文 献

1) Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, Vu T-KH, Charo IF, Coughlin SR: Thrombin receptor

- expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest* **90**: 1614-1621, 1992.
- 2) Soifer SJ, Peters KG, O'Keefe J, Coughlin SR: Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. *Am J Pathol* **144**: 60-69, 1994.
- 3) Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**: 1057-1068, 1991.
- 4) Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR: Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* **386**: 502-506, 1997.
- 5) Simons ER, Davies TA, Greenberg SM, Larsen NE: Thrombin receptors on human platelets. *Methods Enzymol* **215**: 155-176, 1992.
- 6) Vu T-KH, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR: Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* **353**: 674-677, 1991.
- 7) Bahou WF, Nierman WC, Durkin AS, Potter CL, Demetrick DJ: Chromosomal assignment of the human thrombin receptor gene: localization to region q13 of chromosome 5. *Blood* **82**: 1532-1537, 1993.
- 8) Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J: Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9208-9212, 1994.
- 9) Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RV, Coughlin SR: Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature* **381**: 516-519, 1996.