

◆トピックス◆

プロトロンビンの欠損マウス

手嶋 かおり*, 中垣 智弘*

Prothrombin Deficient Mice

Kaori TESHIMA* and Tomohiro NAKAGAKI*

Key words : prothrombin, knockout mice, embryogenesis, thrombin receptor, protease activated receptor

はじめに

プロトロンビン(FII)は、分子量72,000のセリンプロテアーゼ前駆体で、主に肝臓で合成され血液中に分泌される。限定分解を受け活性化された α -トロンビン(34KDa)は、止血栓形成に関与するだけでなく多様な生物活性を発揮する。プロトロンビンおよびトロンビンについての主な性状をまとめると¹⁾、①ヒトFIIは579アミノ酸残基からなるビタミンK依存性の1本鎖糖蛋白質で、 γ -カルボキシグルタミン酸(Gla)ドメイン、2つのクリングルドメインおよびセリンプロテアーゼドメインからなる。②血液凝固カスケードが作動すると、プロトロンピンはプロトロンビナーゼ(Xa因子およびVa因子、リン脂質、Ca⁺⁺からなる複合体)によりArg²⁷¹-Thr²⁷²およびArg³²⁰-Ile³²¹の2カ所が限定分解され、最終的にフラグメント1・2(フラグメント1はGlaドメインとクリングル1からなり、フラグメント2はクリングル2からなる)と308アミノ酸残基からなる2本鎖の α -トロンビンを生成する。③血管外でも、MAPA(Membrane Associated Prothrombin Activator)を介して α -トロンビンが形成され

る²⁾³⁾。④ α -トロンビンは凝固系においてフィブリノーゲンやV因子(FV), VIII因子, XI因子, XIII因子, トロンボモジュリン, プロテインCに作用し、止血栓形成およびその制御に関与している。⑤血小板のほか、白血球や内皮細胞、平滑筋細胞などの種々の細胞に対する α -トロンビンの作用は、細胞膜上のG蛋白共役型のトロンビンレセプター(Protease Activated Receptors; PARs)を介してなされ、その結果、接着蛋白およびサイトカイン、成長因子、プロスタサイクリン、NOの分泌が刺激される。このように α -トロンピンは止血はもとより、炎症や組織修復においても重要な役割を果たしている。⑥FIIとPAR-1の脳細胞上の分布に関して、ラット脳内での検討から両者のmRNAの分布がよく一致していることが示された。従って、脳細胞上で形成された α -トロンピンはPAR-1を介してニューロンやグリアの分化に関与すると考えられている。⑦FII遺伝子は、全長26kbで、14個のエクソンと13個のイントロンからなる。⑧ヒトでは第11染色体上に位置し、マウスではヒトの第11染色体と相同性の高い第2染色体上に位置する。

個体の発生においてトロンビン依存性のシグ

* (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, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, [1-6-1 Okubo, Kumamoto, 860-8568, Japan.]

ナル伝達が重要なことは、組織因子およびFV、トロンピンレセプターの欠損マウス^{4)~6)}が、胎齢8.5~10.5日で子宮内で死亡してしまうことから予想されるが、FII欠損マウスでも同様な成績が得られることが明らかとなった。

プロトロンビン欠損マウスからの情報

1998年、Xue⁷⁾およびSun⁸⁾のグループはプロトロンビンのノックアウトマウス(FII^{-/-})を作製し、ほぼ同様な成績を報告した。FII遺伝子のエクソン7-12(Xueら)または1-2(Sunら)を欠失させたターゲティングベクターをES細胞に導入し、blastocystに注入することにより作出したキメラマウスからヘテロ接合体のFII^{+/-}マウスを得た。FII^{+/-}マウスは正常に出生し、野生型と何ら差は認められなかった。FII^{+/-}マウスを交配し得られた仔マウスの出生率は、Xueらの報告では、620匹の仔マウスのうち、36%(221匹)がFII^{+/+}、61%(378匹)がFII^{+/-}、3%(21匹)がFII^{-/-}であった。一方、Sunらの報告では、134匹の仔マウスについておのおの35%(47匹)、57.5%(77匹)、7.5%(10匹)とほぼ同じ成績であり、FII欠損は妊娠中に致死的效果をもたらすことが示された。稀に出生するFII^{-/-}新生児マウスは出産1日目で死亡する例が多いものの、マウスのstrainの差により1週間生存する例もあった。

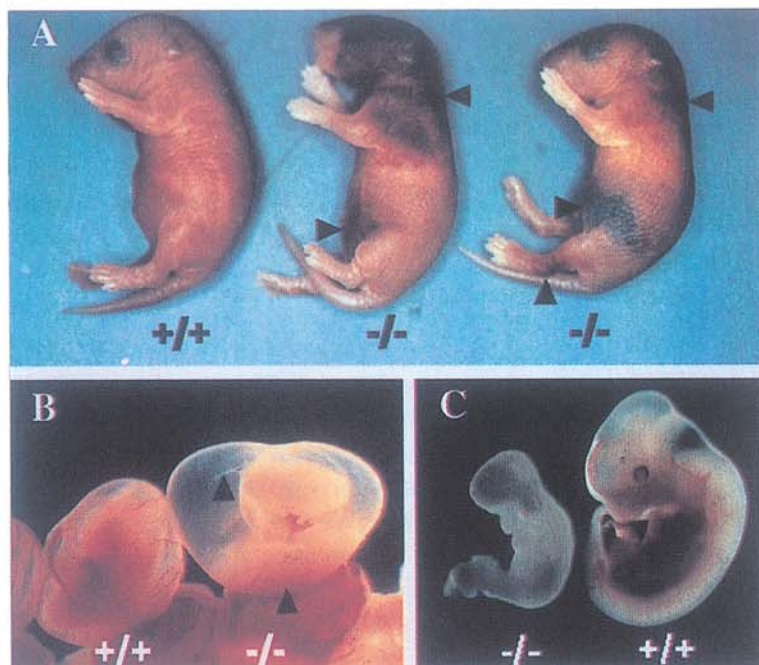
出生後早期に死亡する原因は、解剖の結果から広範な腹部の出血、頭部での皮下出血および頭蓋内出血によることが明らかとなった(図1A)。なお、ヒトでのFIIの完全欠損症例についての報告はない。FII^{-/-}マウスの胚が子宮内で死亡する時期は、胎齢9.5~10.5日の間と両報告とも一致しており、Xueらはさらに15.5日以降の死亡例も見られると云う。しかしながら、FII^{-/-}胎児の組織学的な解析結果については、両者の報告の間で幾分異なる。Xueらによると、FII^{-/-}胚の卵黄嚢では毛細血管の拡張と内臓性内胚葉層の伸長を示すことから、卵黄嚢血

管系の形成不良が致死的效果をもたらすとしており、この点は組織因子の欠損マウスときわめて類似する。なお、この間、組織あるいは卵黄嚢内での出血は認められない。

一方、Sunらは胎齢初期の胚で血管は正常に発達しているが、卵黄嚢内への出血を認めている。その主な観察所見は以下の通りである。胎齢12.5日の胚の卵黄嚢では、血管の発達はあるものの血液は流れていない(図1B)。また、13個体の胚のうち6個体で発育不良が認められ、FII^{+/+}胎児に比べ15%程度の大きさしかなかった(図1C)。胎齢10.5日の胚の組織学的観察では、18個体中9個体で卵黄嚢腔内への出血が認められ、その出血量は個体によって異なった(図2A, B)。出血の多い個体では血管腔に血液細胞は認められないが、卵黄血管や臍帯血管を含む胚体外血管はほぼ完全に形成されている(図2E, H, I)。出血が重篤でない胚では、これらの血管は血液で満たされており、このような胚において血管の構造は十分に発達し、血管系が形成されている(図2AおよびDを、FII^{+/+}の図2Gと比較)。また、卵黄嚢腔内への出血がある個体では胚組織に壊死が生じている(図2C, F)。子宮側の組織には母体の血液細胞が認められ(図2D, E)、栄養外胚葉や脱落組織などの子宮側に接する組織で壊死はない。このことから、胚で観察された組織の壊死は、胎児血液の卵黄嚢腔内への出血によって、胚組織への血液の供給が不十分となったためと考えられる。また、SunらはFII^{+/+}とFII^{-/-}胚の超薄切片の電子顕微鏡像の観察から、血管系へと分化する内臓性内胚葉層や中胚葉層、内皮細胞層等の細胞層については、FII^{+/+}とFII^{-/-}とも基本構造の差はないと云う。

おわりに

以上要約すると、①FII^{-/-}マウス胚の約半数は、胎齢9.5日から10.5日の間に死亡する。その原因は卵黄嚢血管の形成不全、あるいは出血



◀図 1

FII^{-/-} 新生児マウスおよび胎児マウスの出血状態 (文献 8 より引用)

(A) FII^{-/-} 新生児マウスに見られる重篤な出血。腹腔内や頭部皮下, 足関節で出血している (矢印)。

(B) 胎齢 12.5 日の卵黄嚢と胎児。FII^{-/-} 胚の卵黄嚢膜に走る血管に血流がなく, 卵黄嚢腔内に血液細胞の塊が見られる (矢印)。

(C) 写真 B の胚を卵黄嚢から取り出したところ。FII^{+/+} に比べ FII^{-/-} マウスには発育遅延が見られる。(転載許可取得)

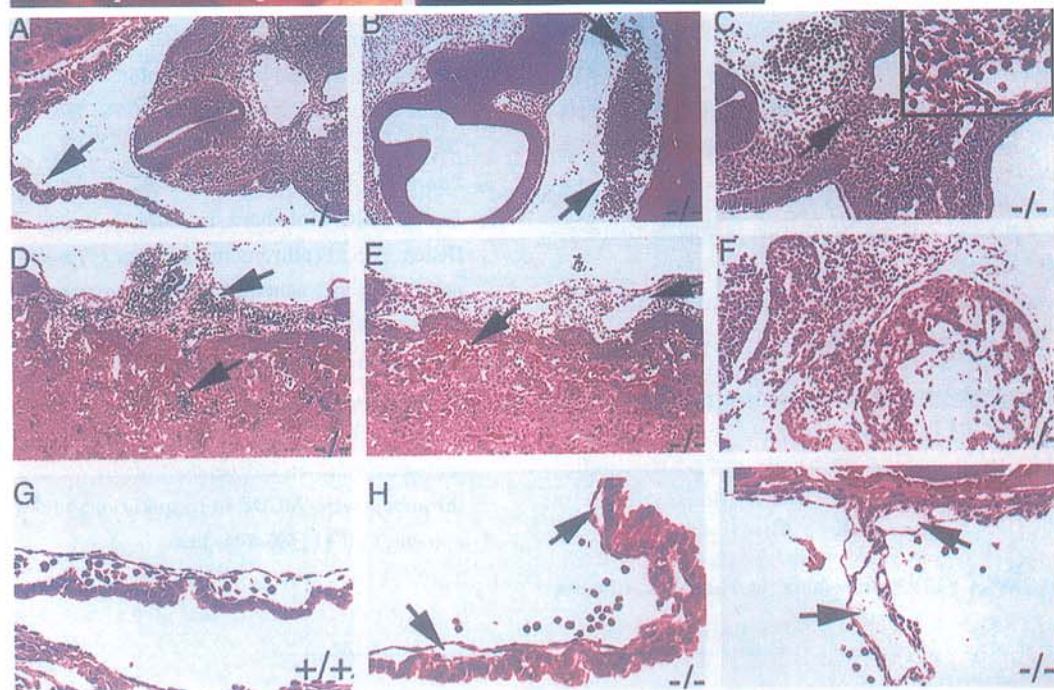


図 2 胎齢 10.5 日胚の顕微鏡像 (文献 8 より引用)

(A) 正常に発生している FII^{-/-} 胚。しかし卵黄嚢腔内に血液細胞がある。(B) 卵黄嚢腔内に大量の血液細胞 (矢印) が見られた FII^{-/-} 胚。(C) 卵黄嚢腔内に大量の出血が見られた FII^{-/-} 胚で, 組織の一部が壊死している (矢印)。枠内は壊死部分の拡大像。(D) A に示した胚の胎盤との結合部分。胚, 胎盤それぞれの側に血液細胞が存在している (矢印)。(E) B に示した胚の胎盤との結合部分。胎盤側には母体の血液細胞が見られるものの, 胎児側の血管には血液細胞が見られない (矢印)。(F) FII^{-/-} 胚でみられた広範囲な組織の壊死。(G) 胎齢 10.5 日の FII^{+/+} 胚の卵黄嚢膜。(H) 胎齢 10.5 日の FII^{-/-} 胚の卵黄嚢膜。血管内に血液細胞が見られない。(I) 胎齢 10.5 日の FII^{-/-} 胚の卵黄嚢膜の血管像。血管の構造はよく発達しているものの, 血液細胞がなく空洞になっている。(転載許可取得)

が関係している。②この間の異常に関わる FII の役割は不明であるが、組織因子あるいは FV、トロンビンレセプター (PAR-1) 欠損マウスでも同様な時期に死亡することから、外因系凝固系を介してのトロンビン形成が不良なため、PARs を介してのシグナリングが起こらないことに起因すると考えられる。胎児期のトロンビン形成が止血にあまり重要でないことは、転写因子の NF-E2 の欠損によって引き起こされる血小板のノックアウトマウス⁹⁾やフィブリノゲンのノックアウトマウスは、新生児期に致死的な出血を引き起こすが、胎児期に致死にならないことから予測される。③外因系凝固反応に不可欠な VII 因子 (FVII) の欠損マウスで胎児期に死亡がみられない理由は、胎齢 10.5 日の FVII^{-/-} 胚への母体からの胎盤を介しての FVII の供給 (0.06%) があることによるのかも知れない。事実、FVII^{+/-} 胚の胎齢 11.5 日での FVII レベルは 0.1% にすぎないと云う。従って、FII^{-/-} や FV^{-/-} 胚が 50% 致死なのは、母体からの各凝固因子のある程度の移行が関係すると推測されよう。④新生児 FII^{-/-} マウスは、すべて出生後に腹部での大出血や頭蓋内出血を伴って死亡する。

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) Degen SJF: Prothrombin, in High KA, Roberts

HR (eds): Molecular basis of thrombosis and hemostasis. New York, Marcel Dekker Inc, 1995, 75-99.

- 2) Sekiya F, Usui H, Inoue K, Fukudome K, Morita T: Activation of prothrombin by a novel membrane-associated protease. *J Biol Chem* **269**: 32441-32445, 1994.
- 3) Shikamoto Y, Shibusawa S, Okuyama I, Morita T: Characterization of membrane-associated prothrombin activator in normal and injured murine tissues. *FEBS Letters* **412**: 526-530, 1997.
- 4) 中垣智弘, 水口 純, 岩永貞昭: 組織因子の欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 153-155, 1997.
- 5) 牟田健吾, 水口 純, 濱本高義, 岩永貞昭: 血液凝固 V 因子の欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 222-225, 1997.
- 6) 羽室 強, 水口 純, 中垣智弘: トロンビンレセプター欠損マウス. *血栓止血誌* **8**: 521-523, 1997.
- 7) Xue J, Wu Q, Westfield LA, Tuley EA, Lu D, Zhang Q, Shim K, Zheng X, Sadler JE: Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7603-7607, 1998.
- 8) Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmbäck K, Xiao Q, Bugge TH, Degen SJF: Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7597-7602, 1998.
- 9) Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJM, Orkin SH: Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* **81**: 695-704, 1995.