

◆トピックス◆

プロテイン C の欠損マウス

下瀬 克郎*, 濱本 高義*, 水口 純*

Protein C Deficient Mice

Katsuro SHIMOSE*, Takayoshi HAMAMOTO* and Jun MIZUGUCHI*

Key words: protein C, protein C deficiency, thrombomodulin, disseminated intravascular coagulation

はじめに

プロテイン C (PC) は γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を含む, ビタミン K 依存性のセリンプロテアーゼ前駆体であり, 血管内皮細胞上でトロンボモジュリン (TM) と結合した α -トロンビンにより活性化される. 活性化プロテイン C (APC) は血小板と内皮細胞上で, プロテイン S と凝固第 V 因子 (FV) の存在下, 活性化第 V 因子 (FVa) と活性化第 VIII 因子 (FVIIIa) を選択的に分解することにより抗凝固作用を示し, 正常時の血液流動性の維持に重要な役割を果たしている. PC のタンパク質構造および遺伝子構造などに関する知見を要約すると¹⁾, ①ヒト PC は分子量約 62,000 (419 アミノ酸残基) のセリンプロテアーゼ前駆体で, おもに肝で一本鎖糖蛋白質として合成され, 血中に分泌される. 循環血液中の濃度は約 $4 \mu\text{g/ml}$ であり, その大部分は S-S 結合で連結された L 鎖 (155 残基) と H 鎖 (262 残基) の二本鎖分子として存在する. 成熟した PC 分子の構造は, アミノ末端からビタミン K 依存性因子に特徴的な Gla ドメインおよび, 2 つの上皮性細胞成長因子様 (EGF-1, EGF-2) ドメイン, 活性化ペ

プチド領域, プロテアーゼドメインからなる. ② PC 遺伝子は第 2 染色体 q13-14 に位置し, 全長約 11.2 kb, 9 個のエクソンより構成される²⁾. ③最近発見されたプロテイン C レセプター (EPCR) は PC と結合し, α -トロンビン/トロンボモジュリン複合体に基質を提示することにより, PC 活性化の反応速度を高める. TM が比較的, 毛細血管に発現しているのに対し, EPCR は毛細血管以外の動脈や静脈に発現しているため, 大きい血管での PC 活性化反応促進に EPCR が重要と考えられている³⁾. ④ APC は生理的にはプロテイン C インヒビター (PCI) によって阻害されると考えられている. PCI は血漿以外に尿や精漿中に存在し, その阻害反応はヘパリンやデキストラン硫酸によって高められる. また, APC は α_1 アンチトリプシンによっても阻害される. ⑤先天性プロテイン C 欠損症は常染色体優生遺伝形式をとり, 患者の多くはヘテロ接合体で, 成人になってから深部静脈血栓症や肺梗塞, 脳梗塞などを発症する. ホモ接合体では出生直後から電撃性紫斑病の症状を呈することが多い. ⑥ APC レジスタンスは先天性血拴性素因の一つで, 実体は FV の異常 (Arg506 \rightarrow Gln 変異) であり, この異常 FV は

* (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.]

APCによって失活化されない。患者には人種差があり、欧米白人に多く、東洋人にはほとんど存在しないという。深部静脈血栓症や血栓性静脈炎、肺梗塞などの血栓閉塞症をきたし、遺伝様式は常染色体性優生遺伝である⁴⁾。⑦ APCはその他にも線溶促進作用⁵⁾や抗炎症作用⁶⁾を示すと言われている。

1995年にTMのノックアウトマウスが作出され、致死性であることが示された⁷⁾。この致死性がPCに依存するものか否かを知る上で、PCのノックアウトマウスの作出が望まれていた。

プロテインC欠損マウスからの情報

1998年、Jalbertらはneo遺伝子の挿入により破壊されたPC遺伝子を相同組換えによりES細胞に導入し、PCヘテロ欠損(PC^{+/-})マウスを作出した⁸⁾。PC^{+/-}マウス同士を交配させ、207匹の仔マウスを得たが、そのうちPCホモ欠損(PC^{-/-})の出生比率は全体の8%(16匹)にすぎず、PC^{-/-}マウスは死産あるいは出生後24時間以内に死亡した。そこで、各胎齢での生存率を調べたところ、胎齢17.5日までは正常に発育することが明らかとなった。胎齢17.5日では、PC^{+/+}(22%)、PC^{+/-}(52%)、PC^{-/-}(26%)の各遺伝型マウスがメンデルの法則の割合で生存しており、かつPC^{-/-}マウスの外見も正常なことより、致死的な変化が胎齢17.5日から誕生までの間に起きると考えられた。PC^{-/-}マウスの肝臓中にmRNAは検出されず、また血漿中にもPC活性は検出されなかった。

PC^{-/-}の新生仔マウスは誕生しても24時間以内に死亡するが、この時明らかに頭部に傷害を受けており、頭蓋骨を除去すると硬膜下に血液がみられ、脳には血栓痕が観察された。しかし、肝臓、腎臓、心臓、肺、脳のいずれにおいても血管形成は正常であった。さらに胚発生期における器官形成も正常であったが、成長に伴い、脳や肝臓、腎臓、心臓などに血栓を生じることが判明した。

顕微鏡観察によりPC^{-/-}マウスと野生型マウスの分析を行ったところ、PC^{-/-}マウスの新生仔では脳の微小血管にフィブリン沈着(図1-J)や、出血が認められたが(図1-I)、野生型では変化がなかった(図1-K, L)。この血栓が胎仔発生のどの段階で生じるかについて調べてみると、まず胎齢13.5日の時点で、終脳(telencephalic region)に微量のフィブリン沈着が血栓の初期兆候として認められた(図1-A, B)。次いで胎齢17.5日以降になると、脳室の外側にも広範囲にわたる血栓形成が観察された(図1-E, F)。肝臓においてもPC^{-/-}マウスではフィブリン沈着、肝細胞の壊死(図2-E, F)が認められたが、野生型では見られなかった(図2-G, H)。また、PC^{-/-}マウスではこれに伴い胎齢17.5日には白血球の浸潤が認められるが(図2-A)、これはPC欠損によるか、あるいはフィブリン沈着や出血に反応して出現した可能性が考えられる。

さて、野生型およびPC^{+/-}マウスの新生仔は成熟マウスの30~40%のフィブリノーゲンを有していたが、驚くべき事にPC^{-/-}の胎齢17.5日の胎仔と新生仔マウスの血漿はフィブリン塊を生じない。したがって、消費性凝固異常によるフィブリノーゲンの枯渇が示唆された。以上の所見から、PC^{-/-}マウスではPCの抗凝固機構が破綻したことにより、トロンビン濃度の制御が効かなくなり、汎発性血管内凝固症候群(DIC)様の症状を呈し、出生前後に死亡したものと考えられる。

一方、PC活性化能を低下させたTM変異体(Glu 387 → Pro)マウスは血栓傾向を呈するものの、正常に生育することからも⁹⁾、PCによる抗凝固経路は胚形成には重要ではないと考えられる。また、以前本稿のトピックスでも紹介したように、TM欠損マウスは母胎と胚の相互作用が異常なために、胎齢9.5日までに死滅してしまうのに対し¹⁰⁾、今回紹介したPC^{-/-}マウスは少なくとも胎齢12.5日までは正常に生育していることから、発生におけるTMの役割は、

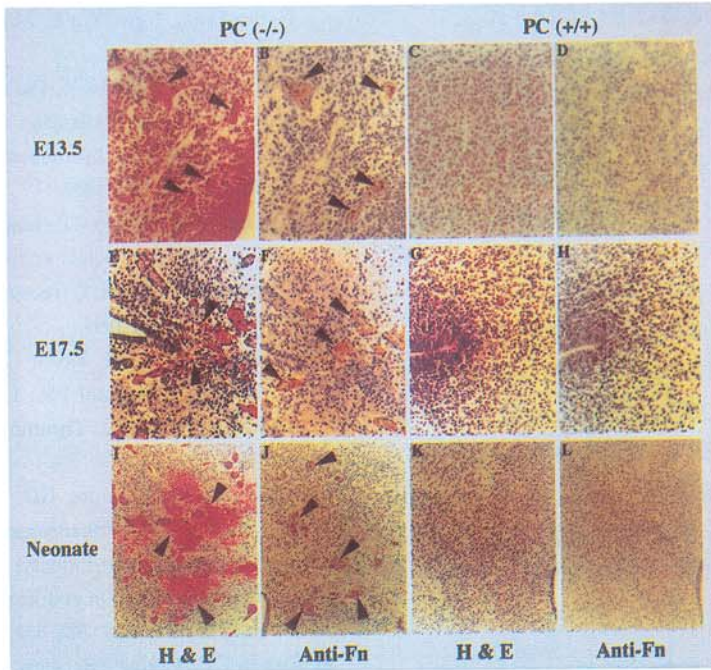


図 1 各胎齢および新生仔期における PC^(-/-) および PC^(+/+) マウスについての脳の顕微鏡像 (文献 8 より引用) 胎齢 13.5 日では, PC^(-/-) マウスの終脳に微量の凝血部位が認められる (A, B), その後, 胎齢 17.5 日には出血が脳室の外側に広がり (E, F), 出生時には重篤な出血となるが (I, J), PC^(+/+) マウスに出血は認められない (C, D, G, H, K, L). A, E, I, C, G, K はヘマトキシリン-エオシン染色, B, F, J, D, H, L はフィブリン形成の免疫染色. (転載許可取得)

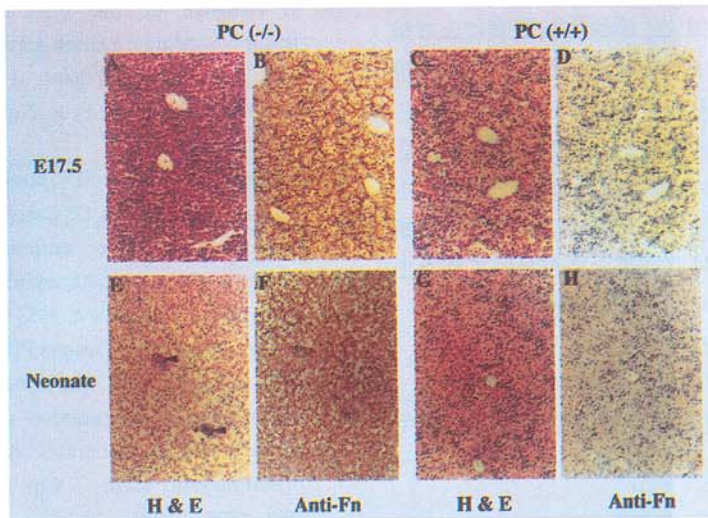


図 2 胎齢 17.5 日および新生仔期における PC^(-/-) および PC^(+/+) マウスについての肝臓の顕微鏡像 (文献 8 より引用) 胎齢 17.5 日の PC^(-/-) マウスでは浸潤した白血球と (A), 間質組織でのフィブリン (フィブリノーゲン) 沈着 (B) が認められ, 新生仔の PC^(-/-) マウスでは肝組織の壊死 (E) と, 間質組織でのフィブリン (フィブリノーゲン) 沈着 (F) が認められる. PC^(+/+) マウスにはこれらの異常は認められない (C, D, G, H). A, E, C, G はヘマトキシリン-エオシン染色, B, F, D, H はフィブリン形成の免疫染色. (転載許可取得)

抗凝固作用以外にあることが示唆される。

PC^{-/-}マウスは、先天性プロテインC欠損症のホモ接合体患者と同様に、出生前後よりDIC様症状をきたすという点で共通している。したがって、PC^{-/-}マウスは、PC欠損症の病態や、それによって生じるDIC等の過凝固状態の解析、ならびに効果的な治療法を開発するためのモデル動物として有用であろう。特にヒトのヘテロ欠損患者は、成人してから発症するため、PC^{+/-}マウスの今後の長期にわたる解析が望まれる。また、今回の報告において、PC^{-/-}マウスの血栓形成部位が脳から始まったことは非常に興味深く、PCの脳循環系における抗凝固能の重要性や、脳特異的なPCあるいはAPC受容体の存在を示唆しているのかもしれない。

おわりに

今回の内容をまとめると、①野生型およびPC^{+/-}マウスは正常に出生するのに対し、PC^{-/-}マウスは胎齢17.5日から出生までの間に致死的な血栓症を引き起こし、死産あるいは出生後24時間以内に死亡する。②顕微鏡観察による検討から、PC^{-/-}マウスは、まず胎齢中期に脳血栓が認められ、後期には肝臓などのほかの器官に血栓が広がっていくことが明らかとなった。③PCの抗凝固経路が破綻すると、マウスの出生前後に致死をもたらすことから、PCは胚形成には無関係で、やはり従来から言われてきた止血応答の制御に極めて重要な役割を果たしていることが再確認された。

謝辞：御校閲をいただ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) Suzuki K: Protein C (High KA, Roberts HR, eds): Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker, Inc., 1995, 393-424.
- 2) Patracchini P, Aiello V, Palazzi P, Calzolari E, Bernardi F: Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14. Hum Genet, 81: 191-192, 1989.
- 3) Fukudome K, Esmon CT: Identification, cloning, and regulation of a new endothelial cell protein C/activated protein C receptor. J Biol Chem, 269: 26486-26491, 1994.
- 4) van der Meer FJM, Koster T, Vandenbroucke JP, Briët E, Rosendaal FR: The leiden thrombophilia study (LETS). Thromb Haemost, 78: 631-635, 1997.
- 5) Krishnamurti C, Young GD, Barr CF, Colleton CA, Alving BM: Enhancement of tissue plasminogen activator-induced fibrinolysis by activated protein C in endotoxin-treated rabbits. J Lab Clin Med, 118: 523-530, 1991.
- 6) Esmon CT, Taylor FB, Snow TR: Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. Thromb Haemost, 66: 160-165, 1991.
- 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) 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.
- 9) Weiler-Guettler H, Christie PD, Beeler DL, Healy AM, Hancock WW, Rayburn H, Edelberg JM, Rosenberg RD: A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. J Clin Invest, 101: 1983-1991, 1998.
- 10) 亀井慎太郎, 水口純, 岩永貞昭: トロンボモジュリンの欠損マウス, 日本血栓止血学会誌 8: 218-221, 1997.