

◆トピックス◆

TFPI と FVII の二重欠損マウス

荒木辰也*, 濱本高義*, 水口 純*

Double Targeted Gene Disruption of TFPI and FVII in Mice

Tatsuya ARAKI*, Takayoshi HAMAMOTO* and Jun MIZUGUCHI*

Key words: tissue factor pathway inhibitor, factor VII, embryogenesis, disseminated intravascular coagulation

はじめに

外因系凝固反応は、血管傷害部位の細胞膜上に露呈した組織因子 (TF) と血中の活性化第 VII 因子 (FVIIa) が TF/FVIIa 複合体を形成することにより開始される。外因系凝固の生理的なインヒビターである tissue factor pathway inhibitor (TFPI) は、主に血中および血管内皮細胞上に存在し、分子内に 3 つの Kunitz-type プロテアーゼインヒビタードメイン (N 末端側から K1, K2, および K3) を含み、K1 は TF/FVIIa 複合体を、K2 は活性化第 X 因子 (Xa) を阻害する。これら外因系凝固に関わる因子の中には、単に止血にとどまらず、炎症や動脈硬化、癌の転移、血管新生などに、直接あるいは間接的に関与することが最近明らかにされつつある¹⁾²⁾。そして、これらの因子の分化・発生段階での役割を調べるために、ノックアウトマウスを用いた検討もなされている。

それによると、① TF 欠損マウスは、胎齢 9.5~10.5 日の間に全て子宮内で死亡し、その主な原因は卵黄嚢血管形成不全による胚の循環不全と考えられている^{3)~6)}。② TF のリガンドである FVII の欠損マウスは、胎仔期は正常に

発育するが、出生時にその全個体数の約 70% が腹腔内出血で、24 日齢までに残り全てが頭蓋内出血により死亡した⁷⁾⁸⁾。これらの対照的な結果から、TF が血液凝固反応以外に、何らかの細胞内シグナル伝達を担うことにより、血管の発生に関わっている可能性が考えられている。③ TFPI については、K1 を選択的に欠損させた (TFPI_{k1}^{-/-}) マウスが報告され、胎齢 11.5 日までの胎齢初期に、卵黄嚢血管形成不全による循環不全で約半数が死亡し、それ以降から出生前までに残り全てが消費性の凝血障害により死亡することが示された⁹⁾¹⁰⁾。

最近、TFPI の血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果や、血管内皮細胞に対するアポトーシス誘導作用など、血管形成に関わる機能を示唆する報告もあり¹¹⁾¹²⁾、TFPI_{k1}^{-/-}マウスの胎齢初期における死因が、血液凝固以外の機能によるものかどうかを知る上で、これら因子を組み合わせたダブルノックアウトマウスの作出が望まれていた。

FVII/TFPI 二重欠損マウスからの情報

1999 年、Chan らのグループは、胚発生時の

* (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 Ohkubo, Kumamoto 860-8568, Japan)

表 1 FVII^{+/-}/TFPI^{+δ}マウスの交配により得られる各遺伝子型の生存数と血漿中の TFPI, FVII 活性 (文献 13 より引用・改変)

	FVII ^{+/+} / TFPI ^{+/+}	FVII ^{+/+} / TFPI ^{+δ}	FVII ^{+/-} / TFPI ^{+/+}	FVII ^{+/-} / TFPI ^{+δ}	FVII ^{+/+} / TFPI ^{δ/δ}	FVII ^{+/-} / TFPI ^{δ/δ}	FVII ^{-/-} / TFPI ^{δ/δ}	FVII ^{-/-} / TFPI ^{+δ}	FVII ^{-/-} / TFPI ^{+/+}
出生後* ¹⁾	24/23 (104%)	57/46 (124%)	50/46 (109%)	77/92 (84%)	5/23 (22%)	24/46 (52%)	25/23 (110%)	32/46 (70%)	15/23 (65%)
胎齢 17.5 日* ¹⁾	17/14 (121%)	27/28 (96%)	38/28 (136%)	48/56 (86%)	4/14 (29%)	26/28 (93%)	10/14 (71%)	24/28 (86%)	11/14 (79%)
TFPI 活性* ²⁾ 6 週齢	97±25	53±9	114±27	63±9	ND	ND	ND	ND	ND
FVII 活性* ²⁾ 6 週齢	95±23	96±9	48±7	54±9	ND	ND	ND	ND	ND
TFPI 活性* ²⁾ 胎齢 17.5 日	203±35	170±66	322±130	148±61	<0.01	<0.01	<0.01	140±70	ND
FVII 活性* ²⁾ 胎齢 17.5 日	14.2±1.6	9.0±3.6	5.4±1.0	3.7±0.9	16.7±2.1	5.7±1.2	<0.05	<0.05	<0.05
TFPI 活性* ³⁾ 胎齢 11.5 日	30±5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* 1): 数値は個体数を示す。カッコ内は [生存数/メンデルの予測数 (%)] を示す。予測数と大きく異なる場合、太字で示した。

* 2): TFPI 活性と FVII 活性は野生型成熟マウスの活性に対する%で表示した (n=4-6)。

* 3): 胎齢 11.5 日野生型マウスの血漿をプールして測定した。ND: not determined. (転載許可取得)

TFPI の機能を調べるため、FVII と TFPI の K1 の二重ヘテロ接合体欠損 (FVII^{+/-}/TFPI^{+δ}) マウスを作出し、それらの交配により二重ホモ接合体欠損 (FVII^{-/-}/TFPI^{δ/δ}) マウスを得た¹³⁾。その結果、表 1 に示すように、FVII^{+/-}/TFPI^{+δ} マウス同士の交配により出生した 9 種の遺伝子型からなる 309 匹の新生仔は、ほぼメンデルの法則に従って出生した。しかし、TFPI ホモ欠損遺伝子型の中で、FVII を発現する FVII^{+/+}/TFPI^{δ/δ} マウスと FVII^{+/-}/TFPI^{δ/δ} マウスは、それぞれ予測値の 22%、52% という割合でしか生まれてこなかった。

FVII のみがホモ欠損である FVII^{-/-}/TFPI^{+/+} マウスは、Rosen らの報告と同様の結果を示し⁷⁾、正常な胚発生と、周産期前後における頭蓋内・腹腔内の致死出血を呈した。また、FVII に加えて TFPI も欠損した FVII^{-/-}/TFPI^{+δ} マウスと FVII^{-/-}/TFPI^{δ/δ} マウスも、正常な胚発生を示し、かつ出生後直ちに腹腔内あるいは頭蓋内出血を起こして死亡したことから、FVII^{-/-} マウスの胚発生ならびに出生前後の死因は TFPI の発現とは無関係であると考えられた。

一方、TFPI のみがホモ欠損である FVII^{+/+}/TFPI^{δ/δ} マウスは、前述のとおり胚発生過程において高頻度に死亡していたが、メンデル則における予測値の 22% は出生まで生存した。これは、先の Huang らの報告⁹⁾とは異なる結果であり、FVII^{+/+}/TFPI^{δ/δ} マウスが必ずしも子宮内において致死ではないことを示している。

さらに、今回の検討から得られた重要な知見は、FVII および TFPI 双方をノックアウトした FVII^{-/-}/TFPI^{δ/δ} マウスが、子宮内で正常に発達し、かつメンデル則の予測値どおりに出生したことである。しかし、FVII^{-/-}/TFPI^{δ/δ} 新生仔は、FVII^{-/-}/TFPI^{+/+} マウスと同様、出生直後に腹腔内あるいは頭蓋内出血を起こして死亡した。また、FVII^{+/-}/TFPI^{δ/δ} 新生仔は、FVII^{+/+}/TFPI^{δ/δ} マウス同様、肌が紫色であざも見受けられ、出生後間もなく死亡した。このように、TFPI^{δ/δ} 遺伝子型をもつ一連のマウスの生存数とその症状は、FVII の発現レベルに影響されると推測された。これを詳しく調べるため、胚発生過程について解析を加えた。

胎齢 17.5 日の 205 匹の胎仔について観察す

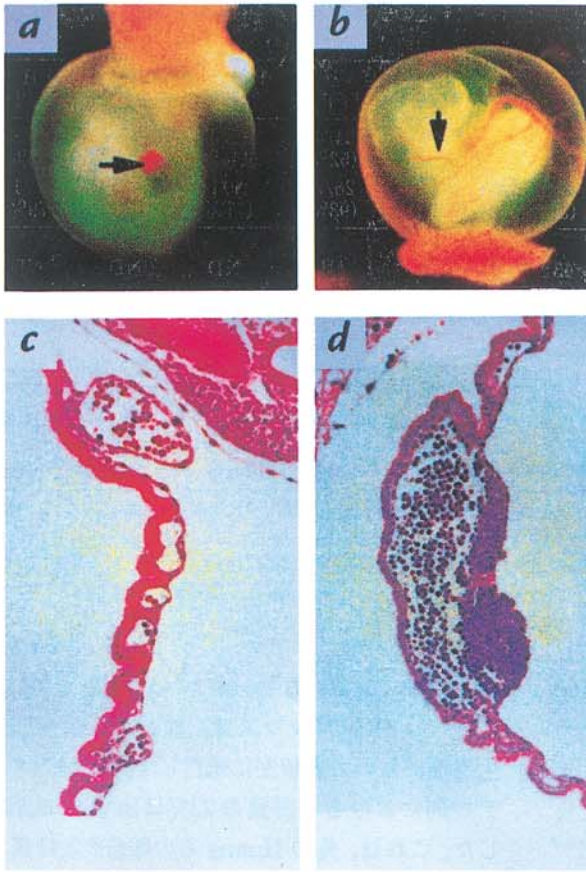


図1 FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ}, FVII^{+/-}/TFPI^{Δ/Δ}, および FVII^{-/-}/TFPI^{Δ/Δ} マウスの胎齢 9.5 日胚の顕微鏡写真(文献 13 より引用) FVII^{+/-}/TFPI^{Δ/Δ} 胚 (a) では大血管の発生が認められず、漏出した血液が蓄積されている (矢印)。FVII^{-/-}/TFPI^{Δ/Δ} 胚 (b) は野生型と同様、卵黄嚢内に正常な血管(矢印)が見られる。FVII^{-/-}/TFPI^{Δ/Δ} 卵黄嚢 (c) は野生型と同様に正常であるのに対し、FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 卵黄嚢 (d) には、漏出した赤血球およびその変性物が認められる。c, d はヘマトキシリン・エオシン染色像。(転載許可取得)

ると、FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胎仔のみがメンデル則の予測値の 29% という成育率を示し、その他の遺伝子型は正常であった(表1)。FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胎仔は、Huang らの報告⁹⁾ で示されているように、尻尾が短く、頭蓋が陥没しており、脳では出血が認められた。一方、FVII の発現が 50% である FVII^{+/-}/TFPI^{Δ/Δ} の胎仔や 0% である FVII^{-/-}/TFPI^{Δ/Δ} の胎仔の生存数は正常であったことから、FVII の発現量の低下は、TFPI 欠損による早期子宮内死を防ぐと考えられた。しかし、FVII^{+/-}/TFPI^{Δ/Δ} 胎仔は、心・肺・肝・腎各臓器の成長は正常であったものの、野生型と比較すると脳血管内には fibrin 沈着や出血もみられた。胎齢 17.5 日における TFPI 欠損遺伝子型を示す各マウスは、その FVII 発現レベルと逆相関して尾が長くなり、また脳・肝・腎

における障害も低下した。

次に、胎齢 9.5 日胚では、図 1 に示すように FVII^{+/-}/TFPI^{Δ/Δ} 胚の半数において、FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胚と同様の血管形成不全に伴う循環不全が卵黄嚢内に見られたが、胎仔自体の成育に異常は認められなかった。一方、FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胚の半数は、卵黄嚢内の循環不全に加えて胎仔にも異常が見られた。稀に生存する胎齢 14.5 日の FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胎仔は、頭蓋内や皮膚で出血し、著しい貧血を呈した(図 2-a, e)。一方、FVII^{+/-}/TFPI^{Δ/Δ} の胎仔も同様の頭蓋内出血を示すものの(図 2-b, d)、FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胎仔ほどひどくはなかった。これらとは対照的に、FVII^{-/-}/TFPI^{Δ/Δ} 胚の卵黄嚢や胎仔には、胎齢 9.5 日から 14.5 日を通じて、異常は認められなかった(図 1-b, c, 図 2-c)。また興味あること

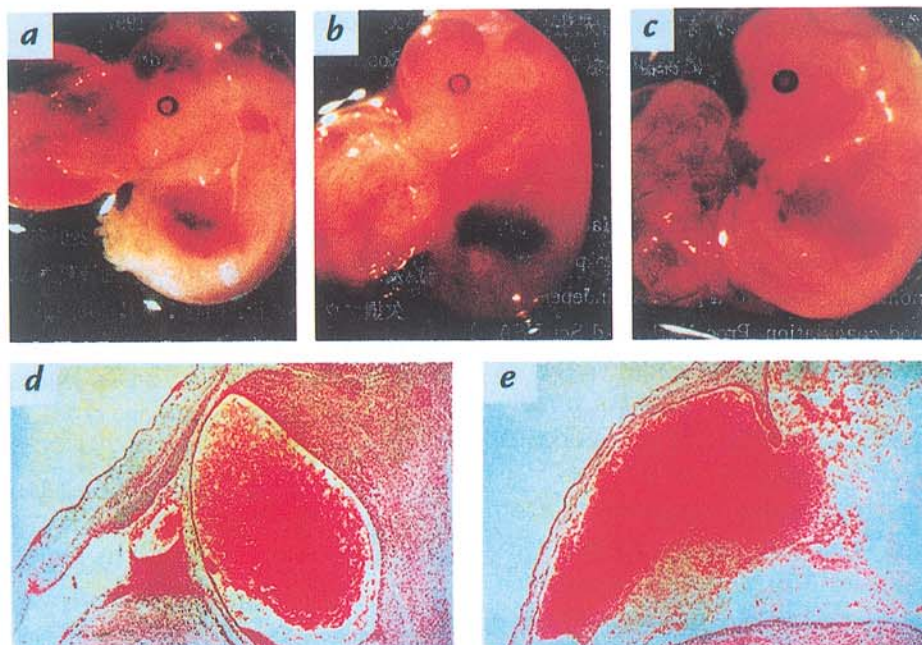


図 2 FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ}, FVII^{+/-}/TFPI^{Δ/Δ}, および FVII^{-/-}/TFPI^{Δ/Δ} マウスの胎齢 14.5 日胚の顕微鏡写真 (文献 13 より引用)

胎齢 14.5 日まで生存していた FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胚 (a) の頭部には出血と浮腫が見られ、貧血 (白い部分) を呈している。FVII^{+/-}/TFPI^{Δ/Δ} 胚 (b) の頭部にも幾分出血が見られる。FVII^{-/-}/TFPI^{Δ/Δ} 胚 (c) は正常である。FVII^{+/-}/TFPI^{Δ/Δ} 胚 (d) と FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胚 (e) の頭部には広範な出血が見られるが、d は e ほどひどくない。d, e はヘマトキシリン・エオシン染色像 (転載許可取得)

に、胎齢 10.75 日の FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胚の 4 例中 1 例では、卵黄嚢血管に fibrin 沈着が観察された。これは胎齢 12.5 日以降にしか見られないとする Huang らの報告⁹⁾とは異なり、胎齢 10.75 日のような初期に fibrin 形成が起き得ることを示している。

TFPI 欠損による諸症状は FVII 欠損の程度に応じて回避されたので、各胎齢における各遺伝子型の両因子活性を調べた。胎齢 11.5 日と 17.5 日の野生型胎仔は、それぞれ成熟マウスの TFPI 活性の 30% と 200~300% という値を示し、一方、FVII 活性は、胎齢 17.5 日において 9~16% という値であった。これらの結果から、Chan らは、胚発生過程における FVII 依存的な凝固反応の抑制を TFPI が担っていると考察している。

おわりに

以上を要約すると、① TFPI の K1 ドメインを欠失すると、TF/FVIIa 複合体に対する制御作用が消失することが *in vivo* で証明された。② TFPI が欠損すると TF/FVIIa 活性に歯止めがきかなくなり、Xa やトロンピンが無秩序に作られる。このため、凝固反応やレセプターを介した細胞への signaling が制御されなくなり、これが、FVII^{+/+}/TFPI^{Δ/Δ} 胚の胎齢初期 (9.5~11.5 日) での死因と考えられる。③胎仔の TFPI 活性は FVII 活性よりもかなり高く、胎齢 17.5 日においては TFPI 活性が成熟マウスの約 2~3 倍と高いことが明らかとなった。この胚発生過程における過剰な TFPI の存在が何を意味しているのかは、今後の課題であろう。

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) 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) 神窪勇一: 血管の発生とその形成に果たす Tissue Factor および Tissue Factor Pathway Inhibitor の役割について. *血栓止血誌* **10**: 56-71, 1999.
- 3) Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmbäck 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.
- 4) 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.
- 5) Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ Jr: Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* **88**: 1583-1587, 1996.
- 6) 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.
- 7) Rosen ED, Chan JCY, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther T, Jalbert LR, Albrecht S, Zhong L, Lissens A, Schoonjans L, Moons L, Collen D, Castellino FJ, Carmeliet P: Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature* **390**: 290-294, 1997.
- 8) 友清和彦, 副島見事, 水口 純: 血液凝固 VII 因子の欠損マウス. *血栓止血誌* **9**: 141-145, 1998.
- 9) Huang Z-F, Higuchi D, Lasky N, Broze GJ Jr: Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood* **90**: 944-951, 1997.
- 10) 神窪勇一: Tissue factor pathway inhibitor の欠損マウス. *血栓止血誌* **9**: 81-85, 1998.
- 11) Kamikubo Y, Nakahara Y, Takemoto S, Hamuro T, Miyamoto S, Funatsu A: Human recombinant tissue factor pathway inhibitor prevents the proliferation of cultured human neonatal aortic smooth muscle cells. *FEBS Letters* **407**: 116-120, 1997.
- 12) Hamuro T, Kamikubo Y, Nakahara Y, Miyamoto S, Funatsu A: Human recombinant tissue factor pathway inhibitor induces apoptosis in cultured human endothelial cells. *FEBS Letters* **421**: 197-202, 1998.
- 13) Chan JCY, Carmeliet P, Moons L, Rosen ED, Huang Z-F, Broze GJ Jr, Collen D, Castellino FJ: Factor VII deficiency rescues the intrauterine lethality in mice associated with a tissue factor pathway inhibitor deficit. *J Clin Invest* **103**: 475-482, 1999.