

◆トピックス◆

 β_2 -Glycoprotein I 欠損マウス

小林 英 哲*, 濱 本 高 義*

 β_2 -Glycoprotein I Deficient Mice

Hideaki KOBAYASHI* and Takayoshi HAMAMOTO*

Key words : β_2 -Glycoprotein I deficient mice, anti-phospholipid syndrome, thrombin

はじめに

β_2 -Glycoprotein I (β_2 -GPI) は, 正常人血漿中に約 200 $\mu\text{g/ml}$ 存在する分子量約 50 kDa の糖タンパク質であり, 別名アポリポプロテイン H と呼ばれる. 分子構造的な特徴は, 補体系因子や凝固 XIII 因子 B サブユニットなどに存在するスシドメイン (Complement Control Protein; CCP, あるいは Short Consensus Repeat; SCR, とも呼ぶ) が 5 つ存在していることである¹⁾²⁾. β_2 -GPI の生理的な機能については不明な点も多いが, *in vitro* の研究から β_2 -GPI は, DNA やヘパリン様物質などの陰性荷電物質, あるいはカルジオリピン (ミトコンドリアの膜に局在するリン脂質) などの陰性荷電リン脂質に結合することが知られており, 血液凝固の制御に関与するといわれている³⁾⁴⁾. また, 近年, 抗リン脂質抗体症候群 (Anti-phospholipid syndrome: APS) にしばしば発症する血栓症と β_2 -GPI との関連が注目されている⁵⁾. APS 患者の保有する抗リン脂質抗体の中でも, 特に抗カルジオリピン抗体は, 陰性荷電を有するリン脂質に結合して構造変化した β_2 -GPI を抗原として認識すると推定されてい

る⁶⁾⁷⁾. このように β_2 -GPI は, 生理的あるいは生化学的, タンパク質構造的にも興味深い血漿タンパク質の一つである.

従来, β_2 -GPI については次のような知見がある. ① ヒト β_2 -GPI の成熟タンパク質は, 326 個のアミノ酸残基から構成される分子量約 50 kDa の 1 本鎖糖タンパク質である. ② 分子内には, 補体系因子や凝固 XIII 因子 B サブユニットにも存在するスシドメインが 5 つ存在し, そのうち NH_2 末側の 4 つのドメイン (第 I から第 IV ドメイン) は約 60 アミノ酸残基から成り, 相互のホモロジーは高い. 一方, 5 番目のドメイン (第 V ドメイン) は約 80 アミノ酸残基から成り, Lys 残基が多く, S-S 結合がほかのドメインと異なる. このドメインはリン脂質との結合に重要であると考えられている. ③ NMR 解析と X 線結晶構造解析の結果, 第 V ドメインにはリン脂質などの疎水性表面との結合に重要な flexible loop 部分 (Trp 316-Thr 318) に加えて, その近傍には陽性荷電の short β -hairpin 構造 (Cys 281-Cys 288) のあることがわかり, その 2 つの部分は β_2 -GPI の陰性荷電リン脂質への結合に重要であるという⁸⁾⁹⁾. ④ β_2 -GPI の遺伝子は, 約 18 kb で 8 つのエクソンを含み, 第

* (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, KAKETSUKEN [1-6-1 Ohkubo, Kumamoto 860-8568, Japan.]

Tel: 096-344-2183 Fax: 096-344-9234

17 染色体の p 23-24 に存在する¹⁰⁾。

⑤ β_2 -GPI は、活性化血小板などの陰性荷電のリン脂質膜上に結合する特徴があり、ADP による活性化血小板の凝集抑制作用や内因系凝固の抑制作用など、抗血栓作用が確認されている³⁾⁴⁾¹¹⁾。一方、 β_2 -GPI は活性化プロテイン C の抗凝固作用を阻害するので、APS 患者の血栓症との関連から生体内での凝固亢進状態への関与が示唆されている¹²⁾。⑥ APS 患者が有する抗カルジオリピン抗体は、 β_2 -GPI の第 I ドメイン、第 IV ドメインおよび第 V ドメインを認識し、特に第 I ドメインを認識する抗体は IgG である¹³⁾。⑦ さらに、 β_2 -GPI が apolipoprotein(a) のクリングル IV タイプ 2 ドメインを介して相互作用していること、 β_2 -GPI が血管内皮細胞に アネキシン II を介して結合すること、マクロファージによる β_2 -GPI を介したアポトーシス細胞のクリアランスの促進に関与すること、などの興味深い報告もある^{14)~16)}。⑧ 臨床的には、 β_2 -GPI のリン脂質結合能を欠如した第 V ドメイン分子異常症や β_2 -GPI 欠損症の症例報告がある。Thiagarajan らは、 β_2 -GPI の第 V ドメインに遺伝的異常があり、陰性荷電リン脂質との結合能の欠如した分子異常症で、かつ原発性の APS 症例を見い出し、 β_2 -GPI 欠損が APS 血栓症の一因になると報告した¹⁷⁾。一方、Takeuchi らは、2 例の β_2 -GPI 欠損症について正常人と比較した結果、 β_2 -GPI 欠損症では、ラッセル蛇毒凝固時間の短縮が認められるものの、トロンビン生成能や、プロテイン C 経路の抗凝固能、フィブリン塊の溶解能については、正常人と何ら差のないことを報告した¹⁸⁾。このように APS 患者の血栓症の発症に、 β_2 -GPI がどのように関わっているか、現在のところ明白でない。

本稿では、 β_2 -GPI のノックアウトマウスについての報告を紹介する。

β_2 -Glycoprotein I 欠損マウスからの情報

2001 年、Sheng らは、 β_2 -GPI ヘテロ欠損

(β_2 -GPI^{+/-}) マウス同士を掛け合わせ、 β_2 -GPI ホモ欠損 (β_2 -GPI^{-/-}) マウスを作出した¹⁹⁾。産生比率については、全体で 336 匹の仔マウスが出生し、そのうち正常 (β_2 -GPI^{+/+}) は 121 匹、 β_2 -GPI^{+/-} は 185 匹であり、 β_2 -GPI^{-/-} はわずかに 30 匹 (全体の 8.9%) であった。この結果は、ヘテロ欠損マウス同士の掛け合わせで期待されるメンデル則の予想出生比率 (1:2:1) を、大幅に外れるものであった。

そこで、出生した仔マウスの各臓器(心、肺、胸腺、脾、リンパ節、肝、胆のう、腎、膀胱、生殖系、胃、小腸、盲腸、結腸、膵、脳、眼、骨格筋)の組織標本を顕微鏡下で観察したところ、 β_2 -GPI^{-/-} 仔マウスでは、正常仔マウスと比べても組織学・病理学的な異常はまったく認められなかった。従って、 β_2 -GPI は発生・分化の過程において、胚の発達時期あるいは着床時期などの妊娠初期段階で、重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

次に、 β_2 -GPI^{-/-} マウスの繁殖力および生殖能力について調べた。① 対照として、 β_2 -GPI^{+/+} 雄と β_2 -GPI^{+/+} 雌あるいは β_2 -GPI^{+/-} 雌を掛け合わせ、一定期間繁殖させた群と、② β_2 -GPI^{-/-} 雄と β_2 -GPI^{-/-} 雌との掛け合わせの群について、両群における生殖能力の差を比較した。その結果、表 1 に示す如く、予想に反し両群ともに、妊娠期間、仔マウスの出生数、出生から 24 時間後の生存数、体重などにほとんど差は認められず、同等の生殖能力を示した。また、表 2 に示したように、妊娠期における両群の母親マウスの血小板数は、妊娠 18 日目で妊娠前よりやや上昇するものの、それぞれの血小板数自体は両群で差はなかった。これらの結果を考えると、 β_2 -GPI は発生・分化の段階には不可欠な因子ではなさそうである。しかし、なぜ、ヘテロ欠損 (β_2 -GPI^{+/-}) マウス同士の掛け合わせで生まれる各遺伝子型の出生数が、メンデル則に従った予測出生比率 (1:2:1) から大幅に外れたのか、その理由は明確でない。従って、 β_2 -GPI の発生段階での機能については、さらに詳細な

表 1 マウスの繁殖力および生殖能力に与える β_2 -GPI 欠損の影響
(文献 19 より引用・改変.)

	♂ β_2 -GPI ^{+/+}	♂ β_2 -GPI ^{-/-}
	♀ β_2 -GPI ^{+/+} または ♀ β_2 -GPI ^{+/-}	♀ β_2 -GPI ^{-/-}
妊娠数 (妊娠率)	15/17 (88%)	16/20 (80%)
同腹新生仔マウス数	8.2±1.1*	7.9±1.6*
誕生時の仔マウスの体重 (g)	1.51±0.13*	1.53±0.12*
生後24時間後の生存数 (生存率)	122/123 (99%)	112/116 (97%)
生後3週間後の生存数 (生存率)	120/123 (98%)	112/116 (97%)

* 平均値±標準偏差

表 2 処女マウスと妊娠 18 日マウスの血小板数に
与える β_2 -GPI 欠損の影響
(文献 19 より引用・改変.)

	β_2 -GPI ^{+/+} または β_2 -GPI ^{+/-}	β_2 -GPI ^{-/-}
処女	697±109 (n=10)	664±185 (n=7)
妊娠 18 日*	924±178 (n=6)	928±226 (n=6)

・表中の数値は、(平均値±標準偏差)×10⁻³/μl
で示した。

*独立 2 群の T 検定により処女群と比較し、有意
差があった (p=0.001)。

研究が必要である。

前述したように、 β_2 -GPI は、抗血栓作用 (ADP による血小板凝集や内因系凝固の抑制作用など) に加え、活性化プロテイン C の抗凝固活性阻害作用を示すなど、凝固反応の制御に関わっている。そこで、 β_2 -GPI^{+/+}、 β_2 -GPI^{+/-}、 β_2 -GPI^{-/-} の 3 つの遺伝子型マウスの血液を採取し、 β_2 -GPI の血中濃度測定や凝血学的な研究を行った。その結果、 β_2 -GPI の産生は当然 β_2 -GPI^{-/-} では確認されず、 β_2 -GPI^{+/-} の β_2 -GPI の血中濃度は、 β_2 -GPI^{+/+} の半量であった。表 3 に、3 つの遺伝子型マウス血漿を用いた凝固活性の比較を示した。希釈カオリン凝固時間 (dKCT) のほか、希釈ラッセル蛇毒凝固時間 (dRVVT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、蛇毒 (*Agkistrodon contortrix* 由来) を用いたプロテイン C の活性化による dRVVT の延長 (PC pathway time) にも、3 つ

の遺伝子型でほとんど差は認められなかった。また、プロトロンビンや V, VII, VIII, IX, X, XI, XII などの凝固因子活性にも差はなかった。ただし、dRVVT については、前述のヒト β_2 -GPI 欠損症例の結果とは異なっていることは留意すべき点である¹⁸⁾。

ところが、 β_2 -GPI^{+/+}、 β_2 -GPI^{+/-}、 β_2 -GPI^{-/-} の 3 つの遺伝子型マウスそれぞれの血漿から脱フィブリノーゲンし、トロンビンの生成量を合成基質を用いて調べたところ、図 1 に示す如く、 β_2 -GPI^{-/-} の場合は、明らかに β_2 -GPI^{+/+} や β_2 -GPI^{+/-} の場合よりトロンビン生成量は低下していた。それは遺伝子型に依存しており、 β_2 -GPI^{+/+}> β_2 -GPI^{+/-}> β_2 -GPI^{-/-} の順であった。 β_2 -GPI^{-/-} でトロンビン生成量が低下したという今回の結果は、 β_2 -GPI がトロンビン生成に促進的に働くことを示唆しており、従来の β_2 -GPI がプロトロンビン活性化抑制作用 (*in vitro*)、を有するといった結果とは矛盾する。また、ヒトの β_2 -GPI 欠損症でトロンビン生成量には差がないという結果とも一致しない。

おわりに

以上を要約すると、① 第一世代の β_2 -GPI^{+/-} マウス同士の掛け合わせで誕生した 3 つの遺伝子型 (β_2 -GPI^{+/+}、 β_2 -GPI^{+/-}、 β_2 -GPI^{-/-}) の数は、出生数に期待されるメンデル則に従った出生

表3 β_2 -GPI^{+/+}, β_2 -GPI^{+/-}, β_2 -GPI^{-/-} 各遺伝子型マウスの凝血学的試験成績
(文献19より引用・改変.)

	β_2 -GPI ^{+/+}	β_2 -GPI ^{+/-}	β_2 -GPI ^{-/-}
dRVVT ¹⁾ (秒)	17.8±2.0	18.5±1.6	19.3±1.4
dKCT ²⁾ (秒)	53.7±6.2	59.5±8.9	56.5±2.5
APTT ³⁾ (秒)	24.0±0.5	23.1±1.8	23.4±2.8
PC pathway time ⁴⁾ (秒)	22.4±1.4	23.7±0.8	23.6±0.2

・表中の数値は平均値±標準偏差で示した。
・測定は、各遺伝子型マウス5匹のプール血漿を用いた。

- 1) dRVVT: 希釈ラッセル蛇毒凝固時間
- 2) dKCT: 希釈カオリン凝固時間
- 3) APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間
- 4) PC pathway time: 蛇毒を用いたプロテインC活性化による希釈ラッセル蛇毒凝固時間

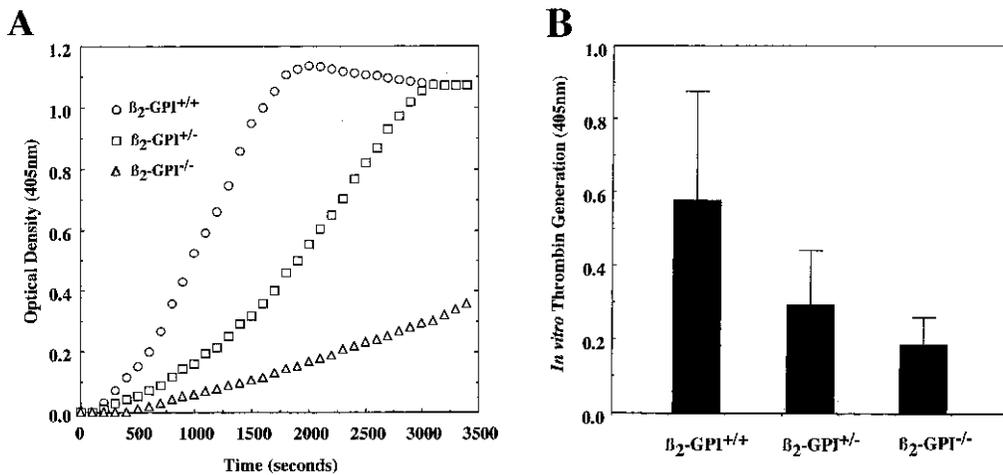


図1 *in vitro* 試験でのトロンビン生成

A: β_2 -GPI^{+/+}, β_2 -GPI^{+/-}, β_2 -GPI^{-/-} 遺伝子型マウスそれぞれ5匹のプール血漿から脱フィブリノーゲンし、希釈したトロンボプラスチン(常法濃度の10分の1に希釈)添加後カルシウムにより反応を開始し、経時的なトロンビン生成量を合成基質(スペクトロザイム TH; H-D-HHT-Ala-Arg-pNA)を用いて測定した。

B: β_2 -GPI^{+/+}, β_2 -GPI^{+/-}, β_2 -GPI^{-/-} 遺伝子型マウスそれぞれ10匹ずつの各個体の血漿について、上述の方法でトロンビン生成量を測定した。図は、反応開始から1000秒後のトロンビン生成量を示している。

比率(1:2:1)から大幅に外れていた。この結果は、 β_2 -GPIの欠損はマウスの初期胚に致死をもたらすため出生数が減少すると考えられたが、この結論を出すにはなお検討が必要である。
② β_2 -GPI^{-/-} マウスは発育も正常であり、組織学的、病理学的、凝血学的にも特に異常は認められず、生殖能力も雌雄ともに正常で、妊娠期の血小板数にも異常は認められなかった。③

β_2 -GPI^{-/-} 血漿の *in vitro* でのトロンビン生成能は有意に低かった。この結果は、 β_2 -GPIがトロンビンの生成に促進的に働いていることを示唆しており、ヒトの β_2 -GPI欠損症例の検討結果や、これまで *in vitro* で確認されていた β_2 -GPIが凝固抑制作用を有するという報告とは矛盾する。

以上のように、 β_2 -GPIが発生・分化や生殖能、

発育には関与していないことは明らかになったが, β_2 -GPI の凝固系との関わりや生理的機能の解明には, さらに β_2 -GPI 欠損マウスに種々の負荷をかける試験のほか, 適当なほかの因子との二重欠損マウスの作出などの研究が必要であろう。

謝辞: 御校閲を戴きました岩永貞昭先生(九州大学名誉教授)に深謝いたします。

文 献

- 1) Kato H, Enyoji K: Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine β_2 -Glycoprotein I: The presence of five Sushi domains. *Biochemistry* **30**: 11687-11694, 1991.
- 2) 後藤祐児, 萩原義久: 立体構造から見たスシドメイン. *血栓止血誌* **10**: 457-462, 1999.
- 3) Schousboe I: β_2 -Glycoprotein I: A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* **66**: 1086-1091, 1985.
- 4) Nimpf J, Bevers EM, Bomans PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, Zwaal RF: Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by β_2 -glycoprotein-I. *Biochim Biophys Acta* **884**: 142-149, 1986.
- 5) 山崎雅英: 抗リン脂質抗体症候群に関する2000年のトピックス(2)抗リン脂質抗体症候群の病態について. *血栓止血誌* **12**: 333-339, 2001.
- 6) McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA: Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -Glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4120-4124, 1990.
- 7) Matsuura E, Igarashi M, Igarashi Y, Katahira T, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA, Koike T: Molecular studies on phospholipid-binding sites and cryptic epitopes appearing on β_2 -glycoprotein I structure recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus* **4**: S13-S17, 1995.
- 8) Hong DP, Hagihara Y, Kato H, Goto Y: Flexible loop of β_2 -Glycoprotein I domain V specifically interacts with hydrophobic ligands. *Biochemistry* **40**: 8092-8100, 2001.
- 9) Hoshino M, Hagihara Y, Nishii I, Yamazaki T, Kato H, Goto Y: Identification of the phospholipid-binding site of human β_2 -Glycoprotein I domain V by heteronuclear magnetic resonance. *J Mol Biol* **304**: 927-939, 2000.
- 10) Okkels H, Rasmussen TE, Sanghera DK, Kamboh MI, Kristensen T: Structure of the human β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H) gene. *Eur J Biochem* **259**: 435-440, 1999.
- 11) Nimpf J, Wurm H, Kostner GM: β_2 -Glycoprotein-I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis* **63**: 109-114, 1987.
- 12) Mori T, Takeya H, Nishioka J, Gabazza EC, Suzuki K: β_2 -Glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. *Thromb Haemost* **75**: 49-55, 1996.
- 13) McNeeley PA, Dlott JS, Furie RA, Jack RM, Ortel TL, Triplett DA, Victoria EJ, Linnik MD: β_2 -Glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies preferentially bind the amino terminal domain of β_2 -glycoprotein I. *Thromb Haemost* **86**: 590-595, 2001.
- 14) Kochl S, Fresser F, Lobentanz E, Baier G, Utermann G: Novel interaction of apolipoprotein (a) with β_2 -glycoprotein I mediated by the kringle IV domain. *Blood* **90**: 1482-1489, 1997.
- 15) Ma K, Simantov R, Zhang JC, Silverstein R, Hajjar KA, McCrae KR: High affinity binding of β_2 -glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J Biol Chem* **275**: 15541-15548, 2000.
- 16) Balasubramanian K, Schroit AJ: Characterization of phosphatidylserine-dependent β_2 -glycoprotein I macrophage interactions. Implications for apoptotic cell clearance by phagocytes. *J Biol Chem* **273**: 29272-29277, 1998.
- 17) Gushiken FC, Arnett FC, Thiagarajan P: Primary antiphospholipid antibody syndrome with mutations in the phospholipid binding domain of β_2 -glycoprotein I. *Am J Hematol* **65**: 160-165, 2000.
- 18) Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, Takeya H, Yasuda S, Ichikawa K, Tsutsumi A, Suzuki K, Koike T: Coagulation and fibrinolytic activities in 2 siblings with β_2 -glycoprotein I deficiency. *Blood* **96**: 1594-1595, 2000.
- 19) Sheng Y, Reddel SW, Herzog H, Wang YX, Brighton T, France MP, Robertson SA, Krilis SA: Impaired thrombin generation in β_2 -glycoprotein I null mice. *J Biol Chem* **276**: 13817-13821, 2001.