

◆トピックス◆

ヘパリンコファクター II 欠損マウス

濱 本 高 義*

Heparin Cofactor II Deficient Mice

Takayoshi HAMAMOTO*

Key words : heparin cofactor II deficient mice, heparin cofactor II, arterial thrombosis, endothelial injury

はじめに

ヘパリンコファクター II (HCII) は、分子量約 66 kDa の 1 本鎖糖タンパク質で、セリンプロテアーゼインヒビターファミリー (セルピン) に属し、主にトロンビン活性を特異的に阻害する。HCII のトロンビン活性阻害が、ヘパリンよりむしろ血管平滑筋細胞や線維芽細胞から産生されるデルマトン硫酸の存在下で顕著に促進されることから、HCII はデルマトン硫酸が豊富に存在する血管外でのトロンビン活性の制御に機能していると考えられている。

現在までに、HCII については次のような知見が得られている¹⁾²⁾。① ヒト HCII の成熟タンパク質は、480 アミノ酸残基からなる約 66 kDa の 1 本鎖糖タンパク質で、糖含量は約 10 % 占める。② HCII は、主に肝臓で生合成され、正常人の血中濃度は約 100 $\mu\text{g/ml}$ である。③ HCII の遺伝子は、全長約 14.5 kbp で、5 個のエクソンと 4 個のイントロンからなり、第 22 染色体の 22q11 に局在し、活性部位はエクソン 5 にコードされている。④ HCII 分子の NH_2 末端側領域には、ヘパリン様物質との結合部位が存在し、

COOH 末端近傍に活性化セリンプロテアーゼとの反応部位 (Leu444-Ser445) が存在する。HCII が構造的にアンチトロンビン (AT) と最も違っている点は、 NH_2 末端領域が 56 残基長く、その領域にヒルジン構造に似たユニークな酸性アミノ酸残基の繰り返し配列が含まれることである。⑤ HCII は、*in vitro* ではトロンビンの他に α -キモトリプシン、カテプシン G の活性を阻害することが知られている。HCII の反応部位は Leu444-Ser445 で、P 1 位のアミノ酸残基が Leu であることから、HCII が α -キモトリプシンやカテプシン G 活性を阻害することは理解できるが、トロンビンの基質特異性とは一致しない。このことから、HCII にはその特異的なトロンビン認識機構があると考えられている。⑥ ヒト HCII 分子内の Tyr 60 と Tyr 73 は硫酸化されている。さらに、ヒト HCII の分子内には 3 個のシステイン残基が存在するが、ジスルフィド結合は形成せず、それぞれフリーのシステイン残基として存在する。

⑦ ヒト HCII には、一次構造上 3 カ所のアスパラギン残基 (Asn30, Asn169, および Asn 368) を介した N 結合型糖鎖の結合部位が含ま

* 財団法人 化学及血清療法研究所 (化血研) 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 Institut (KAKETSUKEN) [1-6-1 Okubo, Kumamoto 860-8568, Japan] Tel: 096-344-2183 Fax: 096-344-9234 e-mail: hamamoto@kaketsuken.or.jp

れる。

最近, Bohme ら³⁾ がヒト HCII の糖鎖構造解析結果を報告した。それによると, N 結合型糖鎖結合部位として推定された 3 カ所のアスパラギン残基すべてに複合型糖鎖が存在し, 2 側鎖と 3 側鎖の割合は 6:1 であり, N-アセチルノイラミン酸がガラクトースと $\alpha 2 \rightarrow 6$ 結合しており, シアル酸化率は 90% を超えていた。また, 3 側鎖構造の約 50% に 1 つのシアリル Le^xモチーフが存在した。こうした分子修飾と機能との関係については, 糖付加や硫酸化の起きないとされる大腸菌で発現した HCII がトロンビン阻害活性を示すことから, 糖付加や硫酸化は, HCII の活性発現には必須ではない⁴⁾。最近の文献⁵⁾ では, HCII の糖鎖や硫酸化がヘパリン様物質との結合や HCII の活性増強作用に寄与していることが示唆されている。しかし, これらの分子修飾が, *in vivo* において安定性 (生体内半減期) や代謝に, どのように関与しているかは不明である。⑧ HCII は, ヘパリンやデルマタン硫酸, コンドロイチン硫酸, デキストラン硫酸などのグリコサミノグリカン (GAG) によって, トロンビン阻害活性が著しく促進され, 2 次反応速度定数の変化からみると, GAG 非存在下に比較して, GAG 存在下では約 1,000 倍阻害速度が促進される。特にデルマタン硫酸は, HCII に特異的に作用するが, AT に対する効果はほとんどない⁶⁾⁷⁾。また, HCII (デルマタン硫酸存在下) は AT (ヘパリン存在下) よりも, Meizothrombin や DesF 1-meizothrombin の合成基質水解活性阻害速度が約 10 倍速い⁸⁾。

⑨ HCII の GAG 存在下でのトロンビン阻害機構については, 最近報告された Baglin らの HCII 及び HCII-トロンビン複合体の X 線結晶構造解析から明らかになった⁹⁾。このことは, 既に本誌 (小出武比古著: 第 13 巻 6 号, 519-524 頁, 2002 年)¹⁰⁾ のトピックス覧にも掲載されているので参照していただきたい。⑩ HCII の GAG の結合部位は, AT との相同性から, ヘリックス D 中の Lys173-Arg193 の塩基性アミノ

酸残基に富む領域と考えられている。Arg189 が His に置換した HCII Oslo が, ヘパリン結合能は正常だがデルマタン硫酸への結合能がなかったこと¹¹⁾, また, 組換え変異体を用いた HCII の GAG との結合能の検討結果から, Lys173, Arg184, Lys185 はヘパリンとの結合に, Lys185, Arg189, Arg192 はデルマタン硫酸の結合に重要であることがわかっている¹²⁾¹³⁾。さらに, HCII 分子のヘリックス A 中 Lys101 と Arg103 についても, AT のヘパリン結合部位の Arg46 と Arg47 と立体構造的に相同な個所に存在するのでヘパリン結合部位と考えられる。Baglin らの X 線結晶構造解析結果も, これらのことを支持している。

⑪ 冒頭にも述べたように, HCII がヘパリンよりデルマタン硫酸特異的にトロンビン活性阻害を促進し, また, デルマタン硫酸が主に血管平滑筋細胞や線維芽細胞によって産生されることから, 血管内のトロンビン阻害は主に AT が担い, 血管外のトロンビン阻害に HCII が働いていると考えられる。また, デルマタン硫酸は胎盤組織に豊富に存在し, 胎盤組織でのトロンビン活性阻害に HCII が関与している可能性もある¹⁴⁾。⑫ HCII の先天性欠損症は, 常染色体優性の遺伝性疾患で, 抗原量・活性値ともに低下する欠乏症と, 抗原量は正常で活性値が低下する機能異常症に分けられる^{15)~18)}。ヒトの場合, HCII の完全欠損症は未だ発見されていないが, ヘテロ患者の多くは (家族性 HCII 欠損), 下肢深部静脈血栓症や脳血栓症を発症する。一方, HCII の抗原量がかなり低下しても, 血栓症の発症を認めない無症状例の報告もあり, HCII の生理的意義については未だ不明な点が多い。しかし, 分子異常症である HCII Tokushima の患者が, 体内のいたるところの動脈にアテローム性動脈硬化巣病変を多発することは特記すべきである¹⁹⁾。後天性の異常症では, 肝硬変, DIC, 産科合併症などにおいて, HCII の抗原量と活性が低下しているとの報告¹⁵⁾ があり, また, 糖尿病で, 抗原量は正常だが活性が低下し

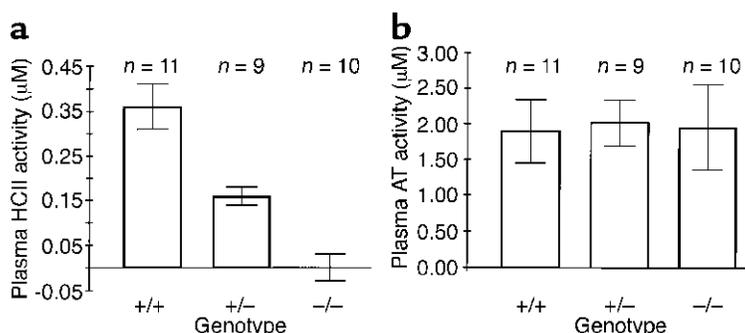


図1 各遺伝型マウス血漿中のHCII活性とAT活性。(文献23より引用)
 (a) HCII活性は、デルマトン硫酸存在下でのトロンビン阻害活性。
 (b) AT活性は、ヘパリン存在下での活性化FX阻害活性。
 (掲載許可取得)

たという症例報告もある²⁰⁾。動脈硬化血管の粥状硬化巣から単離されたデルマトン硫酸分子をもつビグリカンやデコリンなどのプロテオグリカンは、正常血管から単離されたものより硫酸化量が低く、かつ、HCIIのトロンビン阻害能が低いので²¹⁾、HCIIが血管で重要な機能を果たしている可能性が示唆される。さらに、好中球エラスターゼやカテプシンGによって分解されたHCIIの断片(Asp39-Ile66)には、好中球に対してケモカイン活性があり、創傷治癒に関与するという²²⁾。

このように、HCIIの分子レベルでの知見は数多く蓄積されているが、HCIIの生理的意義については不明な点が多く、欠損マウスからの情報が待たれていた。本稿では、最近Heらにより報告されたHCII欠損マウスについて紹介する。

ヘパリンコファクターII 欠損マウスからの情報

Heらのグループ²³⁾は、HCII遺伝子を欠失したヘテロ接合体HCII欠損(HCII^{+/-})マウス同士を掛け合わせ、ホモ接合体HCII欠損(HCII^{-/-})マウスを作出した。正常(HCII^{+/+})マウスと同様に、HCII^{+/-}マウス及びHCII^{-/-}マウスも正常に出生し、出生仔数比率

(HCII^{+/+}:24.8%, HCII^{+/-}:53.6%, HCII^{-/-}:21.6%)はメンデル則に従っていた。HCII^{-/-}マウスの雌雄の交配で誕生する同腹仔数は6.8±3.0匹で、HCII^{+/-}マウスの雌雄の交配で誕生する同腹仔数の6.7±3.1匹とほぼ同数なので、両者に繁殖能力の差はない。HCII^{-/-}マウスが正常に出生したことは、ヒトでHCII完全欠損症が未だ確認されていないことと対照的である。

HCII^{-/-}マウスでは、血漿中のHCII抗原量は検出されず、HCII^{+/-}マウスのHCII抗原量はHCII^{+/+}マウスの約半量であった。HCII活性(デルマトン硫酸存在下でのトロンビン活性阻害能)も、HCII^{-/-}マウスでは検出されず、HCII^{+/-}マウスはHCII^{+/+}マウスの約半量に相当する活性を示した。一方、AT活性(ヘパリン存在下での活性化X因子活性阻害能)は、HCII^{-/-}マウス及びHCII^{+/-}マウスで正常であった(図1a, 1b)。出生1年後のHCII^{-/-}マウスの体重、外観や生存率には、HCII^{+/+}マウスと何ら差はなく、4匹のHCII^{-/-}マウスについての剖検所見からも何ら異常は認められなかったという。また、HCII^{-/-}マウスの血液検査においても、白血球分類を含む血液細胞数や尿中窒素量、クレアチン量、総タンパク質量、アラニンアミノ基転移酵素量、アスパラギン酸アミノ基転移酵素量などは正常値を示し、HCII^{+/+}マウスと何ら差はなかった。

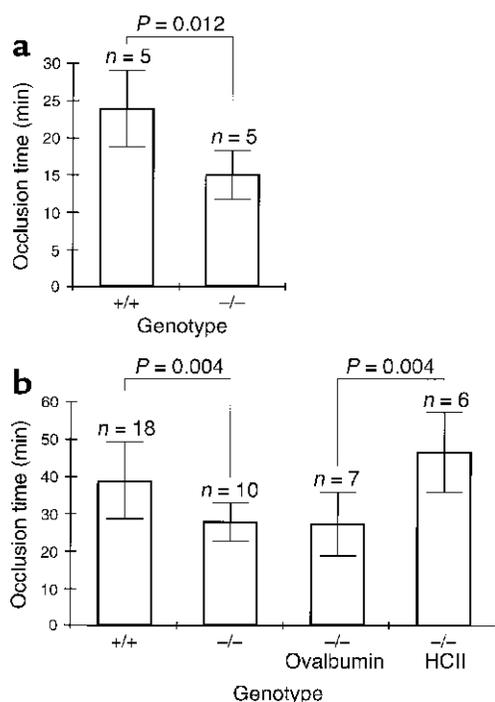


図2 HCII欠損が頸動脈閉塞性血栓形成時間に与える影響。(文献23より引用) 頸動脈の血流量を超音波血流量計で連続モニターした。マウスの尾静脈からローズベンガル (50mg/ml) を投与後、頸動脈に波長540nmのレーザー光を照射し、局所血管傷害を誘起した。(a) 遺伝系統の異なる背景をもつC57BL/6-129/SvJマウス。(b) C57BL/6マウスを使用。精製ヒトHCIIあるいはオボアルブミンは、ローズベンガルを投与する5分前に血漿レベルが $1\mu\text{M}$ になるように静脈投与した。(掲載許可取得)

次に、動脈血栓におけるHCII欠損の影響についてHCII^{-/-}マウスとHCII^{+/+}マウスとで比較した。ここではローズベンガル投与後、頸動脈に540nm波長のレーザー光(緑色光)を照射することでその周辺に一重項酸素を発生させ、これにより生じる血栓形成の時間をHCII^{-/-}マウスとHCII^{+/+}マウスとで比較した。予想したように、血栓形成時間はHCII^{-/-}マウスが 14.9 ± 3.2 分、HCII^{+/+}マウスが 23.7 ± 5.1 分で、HCII^{-/-}マウスの血栓形成時間をHCII^{+/+}マウスと比較すると、有意に短か

かった(図2a)。また、Heらは、マウスの遺伝系統の異なる背景を持つC57BL/6-129/SvJとC57BL/6の2種の系統で、それぞれHCII^{-/-}マウスとHCII^{+/+}マウスについて、頸動脈閉塞性血栓形成時間を比較した。その結果、図2に示すように、2種のマウス系統間で頸動脈閉塞性血栓形成時間に差が認められるものの(例えば、HCII^{+/+}マウスの場合、C57BL/6-129/SvJ; 23.7 ± 5.1 分、C57BL/6; 38.6 ± 10.2 分。HCII^{-/-}マウスの場合、C57BL/6-129/SvJ; 14.9 ± 3.2 分、C57BL/6; 27.7 ± 5.0 分。)、それぞれのマウス系統内でのHCII^{-/-}マウスとHCII^{+/+}マウスの頸動脈閉塞性血栓形成時間を比較すると、HCII^{-/-}マウスの血栓形成時間の方が有意に短かった(図2a, 2b)。HCII^{-/-}マウスの血栓形成時間の短縮は、構造的にセルピニンファミリーに類似するオボアルブミンを静脈投与しても正常化しなかったが、精製ヒトHCIIを投与すると血栓形成時間は正常化した(図2b)。次に、上述の血栓形成モデルを用いて、HCII^{-/-}マウスとHCII^{+/+}マウスの頸動脈血管内の血流量を測定したところ、図3aに示したように、やはりHCII^{-/-}マウスの方がHCII^{+/+}マウスより血流停止までの時間が短縮した。しかし、HCII^{-/-}マウスとHCII^{+/+}マウスにおいて頸動脈血管腔内に形成した血栓には、両者で組織学的な所見や性状に差異はなかった(図3b, 3c)。

これら一連の検討結果から、HCIIの発生段階での役割は明らかでないが、HCIIが動脈血管傷害性の血栓形成抑制を担っていることは確からしく、HCIIの生理的意義の一端を垣間見たといえる。

おわりに

以上を要約すると、①HCII^{-/-}マウス胚数はメンデル則に従っており、胎仔期の胚は何ら異常も認められず、HCII^{-/-}マウスの新生仔は正常に出生した。また、1年の観察期間中、

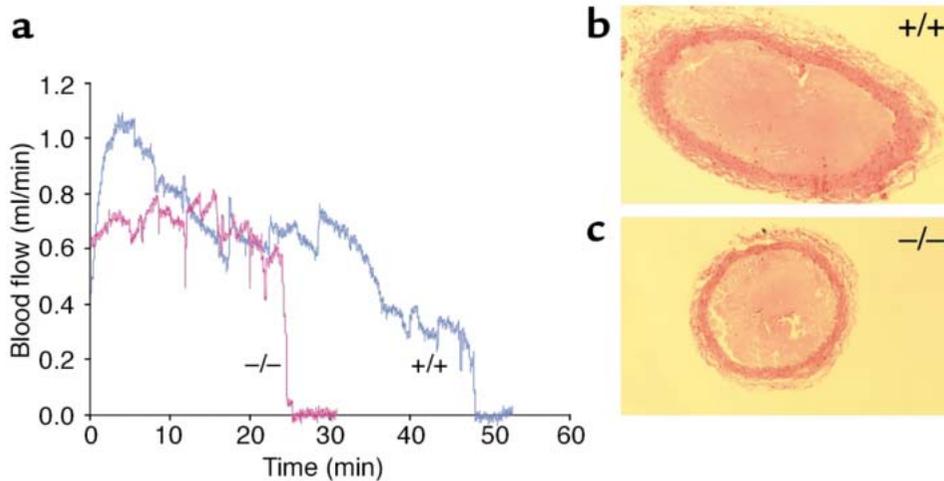


図 3 頸動脈血栓形成マウスの経時的な頸動脈血流量変化と血栓形成の性状。(文献 23 より引用)
 (a)は、 $HcII^{-/-}$ (赤ライン) と $HcII^{+/+}$ (青ライン) の経時的な血流量を示した。時間 0 分にローズベンガルを投与した。(b)と(c)は、血管傷害部位 ($HcII^{-/-}$ 及び $HcII^{+/+}$) で完全に血流量が停滞した頸動脈の交差部位の顕微鏡写真(ヘマトキシリン-エオシン染色像)。(掲載許可取得)

$HcII^{-/-}$ マウスは死亡せず、血栓形成も起こさず、健全に生育し、繁殖能力も正常であった。さらに、 $HcII^{-/-}$ マウスは解剖学的及び生化学的、血液学的所見についても何ら異常は認められなかった。②しかし、 $HcII^{-/-}$ マウスは頸動脈閉塞性血栓形成において、血栓形成時間が $HcII^{+/+}$ マウスと比較すると有意に短かった。この結果は、マウスの遺伝系統の異なる背景を持つ C57BL/6-129/SvJ と C57BL/6 の 2 種の系統間でも矛盾しなかった。また、 $HcII^{-/-}$ マウスと $HcII^{+/+}$ マウスで形成した血栓自体には、両者で組織学的な差はなかった。

今回の検討結果から、 $HcII$ が動脈血管傷害性の血栓形成抑制に重要な役割を担っていることは確かであろう。今後、 $HcII$ と AT あるいはプロテイン C、TFPI などの因子との二重欠損マウスを作製することによって、 $HcII$ の生理的意義が一層解明されることを期待したい。

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)、水口純博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Tollefsen DM: Heparin cofactor II. *Adv Exp Med Biol* **425**: 35-44, 1997.
- 2) Church FC, Shirk RA, Phillips JE: Heparin cofactor II (High KA, Roberts HR, eds): *Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1995, 355-377.
- 3) Bohme C, Nimtz M, Grabenhorst E, Conradt HS, Strathmann A, Ragg H: Tyrosine sulfation and N-glycosylation of human heparin cofactor II from plasma and recombinant chinese hamster ovary cells and their effects on heparin binding. *Eur J Biochem* **269**: 977-988, 2002.
- 4) Blinder MA, Marasa JC, Reynolds CH, Deaven LL, Tollefsen DM: Heparin cofactor II: cDNA sequence, chromosome localization, restriction fragment length polymorphism, and expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **27**: 752-759, 1988.
- 5) Mitchell JW, Church FC: Aspartic acid residues 72 and 75 and tyrosine-sulfate 73 of heparin cofactor II promote intramolecular interactions during glycosaminoglycan binding and thrombin inhibition. *J Biol Chem* **277**: 19823-19830, 2002.
- 6) Ragg H, Ulshofer T, Gerewitz J: On the activation of human leupeptin-2, a thrombin inhibitor, by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **265**: 5211-5218, 1990.
- 7) Van Deerlin VM, Tollefsen DM: The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **266**: 20223-20231, 1991.

- 8) Han JH, Cote HC, Tollefsen DM: Inhibition of meizothrombin and meizothrombin (desF1) by heparin cofactor II. *J Biol Chem* **272**: 28660-28665, 1997.
- 9) Baglin TP, Carrel RW, Church FC, Esmon CT, Huntington JA: Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 11079-11084, 2002.
- 10) 小出武比古: X線結晶構造解析から明らかになったヘパリンコファクター II のヘパリン依存性トロンビン阻害機構. *日本血栓止血学会誌* **13**: 519-524, 2002.
- 11) Blinder MA, Andersson TR, Abildgaard U, Tollefsen DM: Heparin cofactor II Oslo. Mutation of Arg-189 to His decreases the affinity for dermatan sulfate. *J Biol Chem* **264**: 5128-5133, 1989.
- 12) Blinder MA, Tollefsen DM: Site-directed mutagenesis of arginine 103 and lysine 185 in the proposed glycosaminoglycan-binding site of heparin cofactor II. *J Biol Chem* **265**: 286-291, 1990.
- 13) Whinna HC, Blinder MA, Szewczyk M, Tollefsen DM, Church FC: Role of lysine 173 in heparin binding to heparin cofactor II. *J Biol Chem* **266**: 8129-8135, 1991.
- 14) Brennan MJ, Oldberg A, Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan in human fetal membranes: demonstration of an antigenically similar proteoglycan in fibroblasts. *J Biol Chem* **259**: 13742-13750, 1984.
- 15) Tollefsen DM: Heparin cofactor II deficiency. *Arch Pathol Lab Med* **126**: 1394-400, 2002.
- 16) Bertina RM, van der Linden IK, Engesser L, Muller HP, Brommer EJ: Hereditary heparin cofactor II deficiency and the risk of development of thrombosis. *Thromb Haemost* **57**: 196-200, 1987.
- 17) Villa P, Aznar J, Vaya A, Espana F, Ferrando F, Mira Y, Estelles A: Hereditary homozygous heparin cofactor II deficiency and the risk of developing venous thrombosis. *Thromb Haemost* **82**: 1011-1014, 1999.
- 18) Kondo S, Tokunaga F, Kario K, Matsuo T, Koide T: Molecular and cellular basis for type I heparin cofactor II deficiency (heparin cofactor II Awaji). *Blood* **87**: 1006-1012, 1996.
- 19) Kanagawa Y, Shigekiyo T, Aihara K, Akaike M, Azuma H, Matsumoto T: Molecular mechanism of type I congenital heparin cofactor (HC) II deficiency caused by a missense mutation at reactive P2 site: HC II Tokushima. *Thromb Haemost* **85**: 101-107, 2001.
- 20) Duboscq C, Quintana I, Barros J, Kordich L: Heparin cofactor II in diabetic patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* **5**: 201-204, 1994.
- 21) Shirk RA, Parthasarathy N, San Antonio JD, Church FC, Wagner WD: Altered dermatan sulfate structure and reduced heparin cofactor II-stimulating activity of biglycan and decorin from human atherosclerotic plaque. *J Biol Chem* **275**: 18085-18092, 2000.
- 22) Church FC, Pratt CW, Hoffman M: Leukocyte chemoattractant peptides from the serpin heparin cofactor II. *J Biol Chem* **266**: 704-709, 1991.
- 23) He L, Vicente CP, Westrick RJ, Eitzman DT, Tollefsen DM: Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury. *J Clin Invest* **109**: 213-219, 2002.