

◆トピックス◆

血液凝固 V 因子の欠損マウス

牟田 健吾^{*1}, 水口 純^{*1}, 濱本 高義^{*1},
岩永 貞昭^{*1*2}

Factor V Deficient Mice

Kengo MUTA^{*1}, Jun MIZUGUCHI^{*1}, Takayoshi HAMAMOTO^{*1},
Sadaaki IWANAGA^{*1*2}

Key words: factor V deficient mice, thrombin receptor, angiogenesis, yolk-sac

はじめに

血液凝固 V 因子 (FV) はプロトロンビンの活性化に働く重要なプロテインコファクターであり, その先天性欠乏症はパラヘモフィリアと呼ばれている。FV は血友病 A 患者の欠乏因子として知られる VIII 因子 (FVIII) と構造や機能の面で多くの共通点をもつ。一次構造は cDNA より明らかにされたが, それを機に FV についての理解が高まり, 現在, 次のような知見が得られている¹⁾。

①分子量 330,000 の一本鎖糖蛋白質であり, A1-A2-B-A3-C1-C2 ドメインで構成される。②前駆体の FV (不活性型) はトロンビンで活性化され, H 鎖 (A1-A2) と L 鎖 (A3-C1-C2) から構成されるヘテロダイマーの FVa に変換される。③ FVa は酸性リン脂質膜上で, Ca²⁺ および Xa 因子とプロトロンビナーゼ複合体を形成し, トロンビンを生成するが, その活性化速度は FVa の存在下, 約 3,000 倍高まる。④遺伝子は全長約 80 kbp, 第一染色体 q21-25 に存在し, 25 個のエクソンと 24 個のイントロンから

なる。

近年, Dahlbäck らはこれまで知られてない先天性血栓性素因患者を多数発見し, それらの患者の血漿に活性化プロテイン C (APC) を添加しても活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は延長せず, このときプロテイン S も正常値を示すので, 当初 APC レジスタンスと呼んだ²⁾。そして, その原因は FV の Arg₅₀₆ → Gln 点変異にあることが明らかにされた。またその後, FV が APC に対してコファクター機能を示すことも知られてきた³⁾。

FV 欠損マウスから得られる情報

1996 年, Cui らのグループは, FV 欠損マウスを作製するために, ヘテロ接合体 FV 欠損 (FV^{+/-}) マウス同士を掛け合わせ, ホモ接合体 FV 欠損 (FV^{-/-}) マウスを作出した⁴⁾。その結果, FV^{+/+} と FV^{+/-} マウスは正常に出生されるものの, FV^{-/-} マウスはその半数が胎齢 11.5 日から 18.5 日の間に死亡し, 残りの半数も出生後 2 時間以内に腹腔内に大出血をきたし死亡する (図 1)。一方, FV^{+/-} マウスの血漿中の FV 濃度

*1 (財) 化学及血清療法研究所 第三製造部 [〒 860 熊本市大窪 1-6-1]: Third Production Department, The Chemo-Sero Therapeutic Research Institute

*2 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 [〒 470-11 愛知県豊田市沓掛町田楽ヶ窪 1-98]: Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University

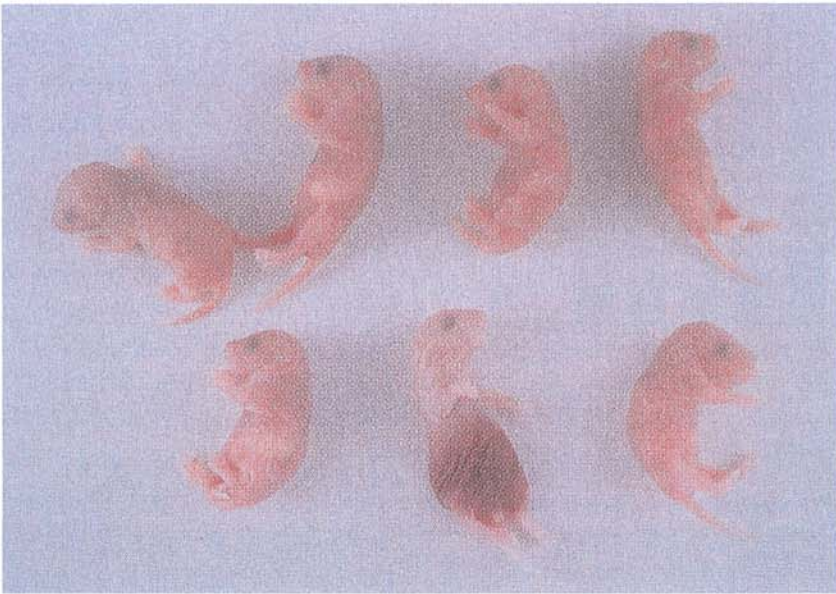


図 1 FV^{+/-} マウス交配で出生した各遺伝型の新生児 (文献 4 より引用)
 下段中央の腹部に出血を示す個体が FV^{-/-} マウスの新生児, 残りは FV^{+/-} および FV^{+/+} マウスである. (Reprinted by permission from Nature Vol. 384 pp. 66-68 Pub Date. Nov 1996 Copyright Macmillan Magazines Ltd.)

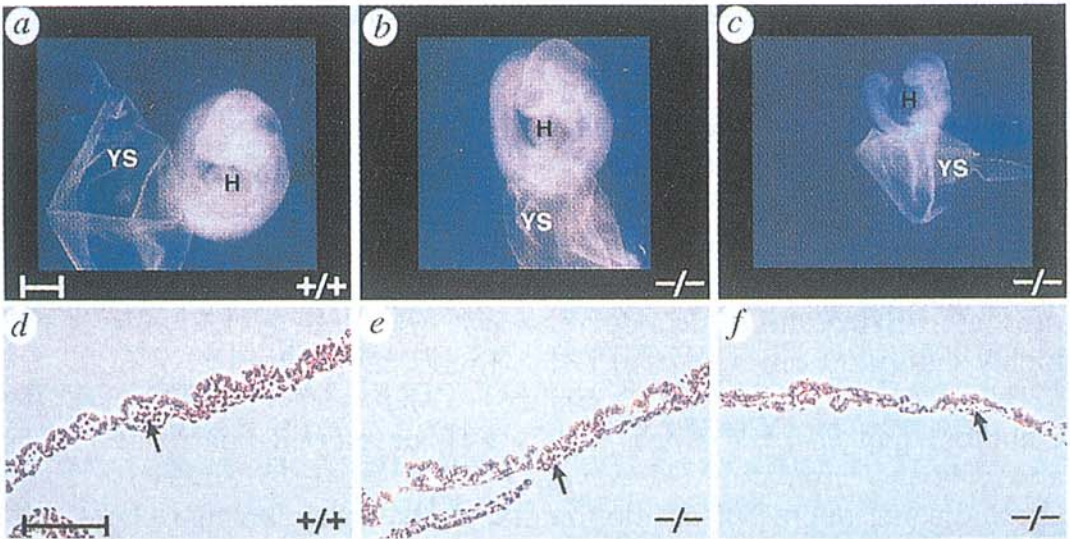


図 3 胎齢 9.5 日における胚の顕微鏡写真 (文献 4 より引用)
 a は FV^{+/+}, b は FV^{-/-} (発生良好), c は FV^{-/-} (発生遅延) マウスの胚形成の状態を示す. 図中, H は心臓, YS は卵黄嚢. 図中 a-c のスケールバーは 500 μ m, d は FV^{+/+}, e は FV^{-/-} (発生良好), f は FV^{-/-} (発生遅延) マウスの脈管形成と血液細胞群の形成を示す. d と e では血管叢と造血幹細胞 (矢印) が観察されるが, f では血管叢がつぶれて崩壊している (矢印). 図中 d-f のスケールバーは 100 μ m. (Reprinted by permission from Nature Vol. 384 pp. 66-68 Pub Date. Nov 1996 Copyright Macmillan Magazines Ltd.)

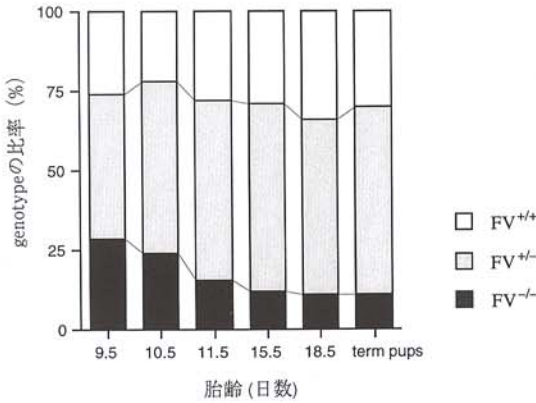


図2 胎齢にともなうFV^{+/+}, FV^{+/-}, FV^{-/-}マウスの個体数の比率変化(文献4より引用, 改変)
胎齢10.5日を過ぎると, 約半数のFV^{-/-}マウス胎児が死亡し, 残りは出産まで生存する。(Reprinted by permission from Nature Vol. 384 pp. 66-68 Pub Date. Nov 1996 Copyright Macmillan Magazines Ltd.)

はFV^{+/+}マウスの約50%であるが, 異常は観察されないという。

FV^{-/-}マウスは胎齢9.5日から10.5日まででは正常であるが, 11.5日以降に個体数が減少する(図2)。胎齢9.5日のFV^{+/+}, FV^{+/-}および60%のFV^{-/-}胎児は, 20から25の体節を有し, 心臓の鼓動, 卵黄囊の血液循環は良好であるが, 残り40%のFV^{-/-}胎児は体節数が10から16と発生が遅延し, 卵黄囊の循環不良および著しい臓側卵黄囊異常が見られる。FV^{+/+}およびFV^{+/-}マウスは体節の発達とともに, 脊椎が彎曲してUの字を示すが, FV^{-/-}マウスでは彎曲が不十分でありC字型に留まる(図3a, b, c)。また, 心筋発達の不良や頭部腸間膜での微細な出血, 尾部腸間膜の異常凝縮も見られる。FV^{+/+}マウスの内胚葉外層および中胚葉内部の造血幹細胞を含む血液細胞群は正常である。FV^{-/-}マウスで発生の良好なものは, 巨大な血管叢をともなう形態学的パターンを示すが, 不良の胚では血管の崩壊が観察される(図3d, e, f)。したがって, FVの完全な欠乏は, 主に胚形成の段階で障害を起こすと考えられる。FV^{-/-}マウスは胎齢11.5日から18.5日の間に約半分が死亡し, 半分が生き残るがその理由は不明である。

性差や遺伝的背景(系統)の差はないという。

組織因子(TF)欠損マウスの胚での致死性が複数のグループで調べられ^{5)~7)}, 胎齢8.5日から10.5日に起きる出血や初期血管形成不全がその原因とされている。FV^{-/-}マウス胎齢9.5日の出血は顔面の間充組織に顕著であり, TF欠損マウスの出血症状とは異なる。また, トロンビンレセプター(TR)欠損マウスでは, 胎齢9日から10日にかけて約50%の胎児が死亡するが, 胎児や出生マウスにおいて止血機能の欠損がないという点を除いて, FV^{-/-}マウスと多くの類似点が観察される。これらの結果から, FV依存性のトロンビン生成とそれに続くTRを介したシグナル伝達が, 発生初期での卵黄囊血管形成に必要であることが示唆される。FV^{-/-}マウスでは何らかの代償的なメカニズムがあって, 半数の胎児が致死をまぬがれて発生過程を続けるようである。よく知られているワーファリンの催奇性も, おそらく同じようなメカニズムで起きると推測される。初期胚においてTRは大量に発現しているが, プロトロンビン遺伝子は胎齢12.5日前後で発現するので⁸⁾, 発生初期におけるFVのターゲットとなるプロトロンビンは母体もしくは微量の胎児由来のものであろう。しかし, 未知のプロトロンビン類似体の存在も示唆される。

FVの完全欠損は致死であるが, ヒトの先天性FV欠乏症は比較的穏やかな出血症状を示し, FV^{-/-}マウスの胎形成初期から出生直後における致死性とは対照的である。マウスの結果をヒトには単純にあてはめられないが, ヒトFVの完全欠損があれば, 初期胚での致死性は推測されよう。これまでに発見されたヒトFV欠損患者は低下症でありFV遺伝子について詳細な解析は行われていない。

おわりに

以上を要約すると, ①FV^{-/-}の胚は胎齢11.5日から18.5日の間に約半分が死亡する。その原因としては卵黄囊の脈管形成不全の可能性が高い。残りの半分の胚は発生を続けるが, 出生後2時間以内に重篤な腹腔内出血により死亡する。この際, 腹腔内の血液は凝固能を失ってお

り, また血漿中の FV 活性も検出されない。② FV 依存的にトロンビンが生成され, トロンビンレセプターを介しての細胞へのシグナル伝達, 卵黄嚢の脈管形成に大きく関与すると考えられる。しかし, 代償的な経路があるらしく, FV^{-/-} 胚の半分は致死をまぬがれ, 発生過程を続ける。③ ヒト FV が完全に欠損すれば, パラヘモフィリアなどの欠乏症でみられる穏やかな出血傾向と異なって, 新生児の致死が引き起こされる可能性がある。

Cui らの成果は発生, 分化の過程で血液凝固系の作動が要求され, かつ FV を介さないトロンビン生成経路の存在を示唆しており, 極めて興味深いものがある。

謝 辞: 御校閲いただいた北本康則先生 (熊本大学医学部第三内科) に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ortel TL, Keller FG, Kane WH: Factor V (High KA, Roberts HR, eds): Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker, Inc., 1995, 119-146.
- 2) Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. Proc Natl Acad Sci USA **90**: 1004-1008, 1993.
- 3) Dahlbäck B, Hildebrand B: Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. Proc Natl Acad Sci USA **91**: 1396-1400, 1994.
- 4) Cui J, O'Shea KS, Purkayastha A, Saunders TL, Ginsburg D: Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. Nature **384**: 66-68, 1996.
- 5) 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.
- 6) 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, Collén D: Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. Nature **383**: 73-75, 1996.
- 7) Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ: Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. Blood **88**: 1583-1587, 1996.
- 8) Soifer SJ, Peters KG, O'Keefe J, Coughlin SR: Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. Am J Pathol **144**: 60-69, 1994.