

◆トピックス◆

Tissue factor pathway inhibitor の欠損マウス

神 窪 勇 一*

Tissue Factor Pathway Inhibitor Deficient Mice

Yu-ichi KAMIKUBO*

Key words: tissue factor pathway inhibitor deficient mice, activated blood coagulation factor VII, tissue factor, embryonic stem cell, disseminated intravascular coagulation, vasculogenesis

はじめに

Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) は、組織因子・活性型血液凝固 VII 因子複合体 (TF/VIIa) により開始される外因系凝固反応を制御する Kunitz 型プロテアーゼインヒビターである¹⁾。TFPI は生体内では主に血管内皮細胞や血管平滑筋細胞、線維芽細胞、巨核球、単球で産生されるが、肝細胞ではほとんど発現されない²⁾。血管内皮細胞に結合している TFPI はヘパリンを投与する事で血中に遊離してくることから、内皮細胞上のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合していると推定される³⁾。TFPI の生体内での役割は欠損症や異常症が見いだされてない現在、不明な点も多いが、抗体により TFPI を除去した動物では低濃度の TF により容易に血管内過凝固状態を呈すること、さらにエンドトキシンにより誘発される過凝固状態の抑制に TFPI の投与が有効であることから、内皮細胞の抗血栓機能の中心的役割を果たしていると考えられる⁴⁾⁵⁾。

現在までに、ヒト TFPI のタンパク質構造と機能との関連、遺伝子構造については次のような知見が得られている⁶⁾⁷⁾。

① TFPI は 276 残基からなる一本鎖糖蛋白質であり、分子内に 3 個の Kunitz 型阻害領域が存在する。TFPI は第 2 Kunitz 領域 (K2) で活性型血液凝固 X 因子 (Xa) と結合した後、さらに、第 1 Kunitz 領域 (K1) で TF/VIIa と結合することにより外因系凝固反応を阻害する。
② TFPI の凝固阻害活性はヘパリンで促進され、ヘパリンはカルボキシル末端の塩基性アミノ酸が集中する領域および第 3 Kunitz 領域 (K3) に結合する。
③ 血中には、リポ蛋白質に結合した LDL/VLDL 結合型や HDL 結合型、さらにリポ蛋白質に結合していない遊離型 TFPI の 3 つの形が存在する。TFPI は LDL/VLDL にカルボキシル末端の塩基性アミノ酸の集中する領域を介して結合し、一方、HDL では HDL 中のアポリポ蛋白質 A-II と S-S 結合を形成して存在する。
④ ヒト TFPI 遺伝子は染色体の 2q31-32.1 に位置し、約 70 kb で 9 つのエクソンと 8 つのイントロンから構成される。K1, K2, K3 はそれぞれエクソン 4, エクソン 6, エクソン 8 にコードされている。5'-flanking 領域には TFPI 転写に関与するエレメントとして AP-1 様モチーフや GATA モチーフ、さらに NF-1 モチーフが同定されているが、それらの

* (財) 化学及血清療法研究所 菊池研究所 血液製剤研究部 (〒 869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺):
Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

実際の機能は明らかでない。⑤ TFPI には翻訳後の修飾として、N-グリコシド型糖鎖と O-グリコシド型糖鎖の付加、さらにリン酸化セリンの存在が報告されているが、その意義については明らかでない。

1997年、HuangらはTFPIの生理的役割をより明らかにする目的で、TFPIのK1のみを欠失させたヘテロ接合体のTFPI欠損(TFPI_{K1}^{+/-})マウスとホモ接合体のTFPI欠損(TFPI_{K1}^{-/-})マウスを作製した⁸⁾⁹⁾。その結果、TFPIのK1が発生上重要な役割を果たしていることが、初めて明らかとなった。本稿では、このTFPIのK1欠損マウスについての報告を紹介する。

TFPI欠損マウスから得られる情報

TFPI_{K1}^{+/-}マウスはエクソン4(K1をコードする)とイントロンDの部分に欠失させたターゲティングベクターを胚性幹細胞(ES細胞)に導入し、得られた相同組換えES細胞を胚盤胞中に注入することで作出した。TFPI_{K1}^{+/-}マウスの血漿中には野生型TFPI(分子量43,000)に加え、K1を欠失した分子量37,000のTFPI_{desK1}が約41%存在し、TFPIのTF/VIIa阻害活性も野生型TFPI(TFPI_{K1}^{+/+})マウスの46%までに低下する。しかし、TFPI_{K1}^{+/-}マウスの血小板数や血漿フィブリノーゲンレベルはTFPI_{K1}^{+/+}マウスと同程度であり、特別な異常は見られない。次に、ホモ接合体のTFPI_{K1}^{-/-}マウスを作出するためにTFPI_{K1}^{+/-}マウス同士の交配を行った。しかし、得られた233の新生マウスのうち35%がTFPI_{K1}^{+/+}マウス、65%がTFPI_{K1}^{+/-}マウスであった。TFPI_{K1}^{+/-}マウスのうち約60%は胎齢10.5日までに死亡し、残りの40%は胎齢11.5日以降も生存するが、最終的には子宮内ですべて死亡する(図1)。そこで、死亡の原因を明らかにする目的で、TFPI_{K1}^{-/-}マウスの胚を胎齢の初期(胎齢11.5日まで)と後期(胎齢11.5日以降)に分けて形

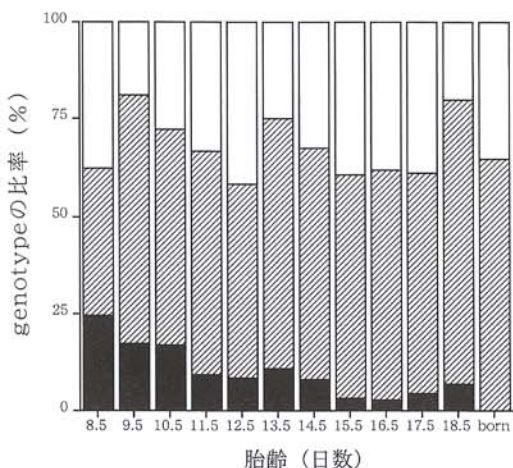


図1 胎齢にともなうTFPI_{K1}^{+/+}、TFPI_{K1}^{+/-}、TFPI_{K1}^{-/-}マウスの個体数の比率変化(文献8より引用、改変)。TFPI_{K1}^{-/-}マウス(■)のうち約60%は胎齢10.5日までに死亡し、残りの40%は胎齢11.5日以降も生存するが、最終的には子宮内ですべて死亡する。(□), TFPI_{K1}^{+/+}; (▨), TFPI_{K1}^{+/-}。(転載許可取得)

態学および組織学的解析を行った。その結果、胎齢8.5日のTFPI_{K1}^{-/-}は、TFPI_{K1}^{+/+}およびTFPI_{K1}^{+/-}と同様に正常であるが、胎齢9.5日から11.5日にかけて卵黄囊内に出血が見られ、卵黄囊血管内の血液は不足している(図2)。中程度の発育不良を示す胚では内胚葉細胞層と中胚葉細胞層の剥離により、卵黄囊、胎盤、臓側卵黄囊内の血管中の赤血球量が減少し、さらに重篤な発育不良の胚では内胚葉細胞層と中胚葉細胞層との広範囲な剥離と壊死を伴う卵黄囊構造の異常が生じた。したがって、胎齢11.5日までに見られるTFPI_{K1}^{-/-}マウスの致死は、血管形成の不全によりもたらされた卵黄囊内の出血と血液の損失に伴う循環障害が原因と考えられる。最近、TF欠損マウス¹⁰⁾や血液凝固V因子欠損マウス¹¹⁾で卵黄囊血管形成不全による致死が報告され、血管形成における血液凝固反応とトロンビン形成の重要性が示唆されている。TFPIのK1が初期胚の血管形成にどのように関与しているかは、今後の課題として注目され

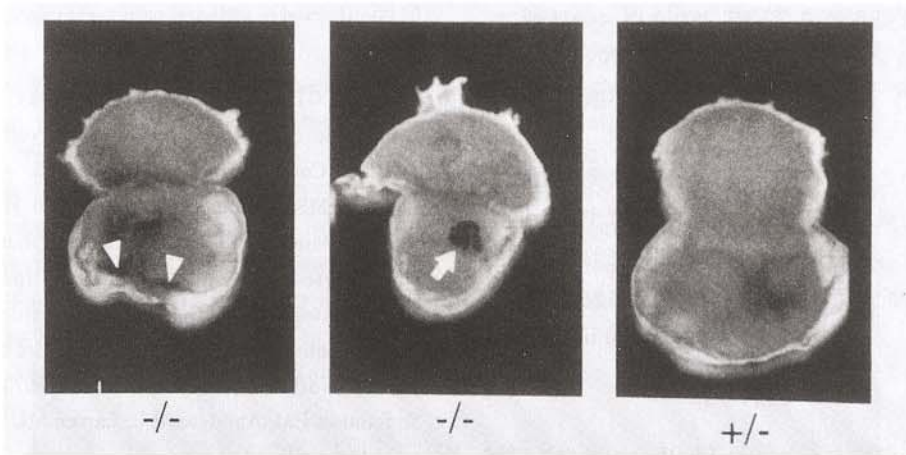


図 2 TFPI_{k1}^{+/+} と TFPI_{k1}^{-/-} の胎齢 10.3 日の胚の写真 (文献 8 より引用). TFPI_{k1}^{-/-} は, TFPI_{k1}^{+/+} に比べ卵黄嚢内に顕著な出血が見られる (矢印とやじり). 出血とそれに付随した循環不全が胚の衰弱と死をもたらすと考えられる. (転載許可取得)

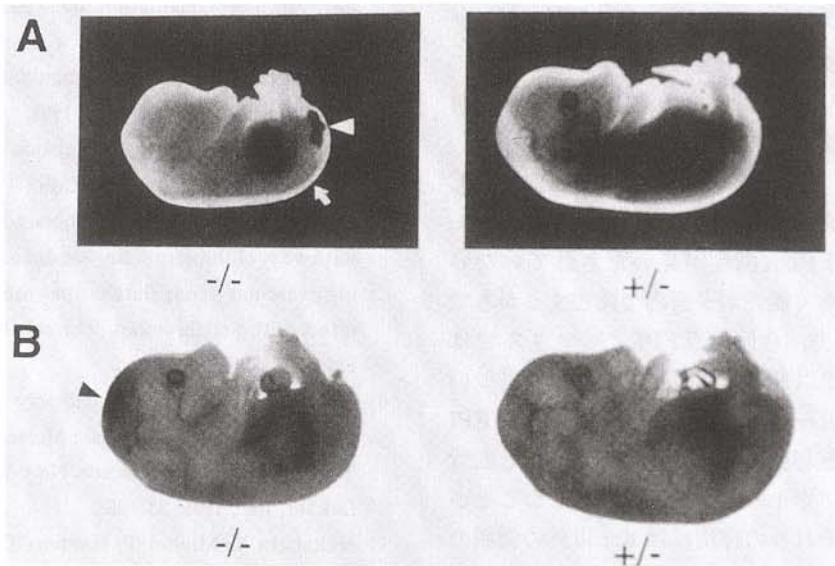


図 3 TFPI_{k1}^{+/+} と TFPI_{k1}^{-/-} の胎齢 14.5 日と 16.5 日の胚の写真 (文献 8 より引用). (A) TFPI_{k1}^{+/+} と TFPI_{k1}^{-/-} の胎齢 14.5 日の写真. TFPI_{k1}^{-/-} は TFPI_{k1}^{+/+} に比較して, 脊髄 (矢印) と尾 (やじり) に出血が見られる. (B) TFPI_{k1}^{+/+} と TFPI_{k1}^{-/-} の胎齢 16.5 日の胚の写真. TFPI_{k1}^{-/-} は頭蓋内に出血が見られ (やじり), 尾が短くなっている. (転載許可取得)

る.

一方, 胎齢 11.5 日を越えて生存した胚では心臓や血管などの器官は正常に発生してくるが, 尾が短く, 胎齢日数が進むに伴い, 頭部, 脊髄,

尾に出血が見られ, 胚の成長が遅延する (図 3). さらに, 胎齢 12.5 日を越えた胚では, 肝臓, 腸, 脳にフィブリン (フィブリノーゲン) 沈着を伴う血管内血栓が見られる. よって, 胎齢 11.5 日

を越えて見られる TFPI_{k1}^{-/-} マウスの致死は、TF/VIIa により生じた汎発性血管内凝固症候群 (DIC) に関連する重篤な出血が原因と考えられる。

以上のことから、TFPI の K1 は発生上重要な役割を果たしており、その作用は主に、初期胚における血管形成促進と後期胚における抗血栓作用を介したものであると推定される。

おわりに

以上を要約すると、① TFPI_{k1}^{+/-} マウスでは血漿中に野生型 TFPI に加え、K1 を欠失した TFPI_{desK1} が出現することにより、TF/VIIa に対する阻害活性が TFPI_{k1}^{+/+} マウスの 46% までに低下する。しかし、TFPI_{k1}^{+/-} マウスでは異常な出血等の症状は見られない。② TFPI_{k1}^{-/-} マウスは出血と循環不全により子宮内ですべて死亡する。出血や循環不全の原因は胎齢 11.5 日までに死亡する胚では卵黄嚢血管形成の不全、さらに胎齢 11.5 日以降に死亡する胚では DIC が原因と考えられる。現在までに、ヒトのホモ接合体の TFPI 欠損症が見いだされていないのは、おそらく胎児が子宮内で死亡するからであろう。一方、今回の TFPI_{k1}^{-/-} マウスでは TFPI の K1 以外の領域の発生上の機能については、全く明らかにされなかった。最近、TFPI が血管平滑筋細胞に対する増殖抑制作用と血管内皮細胞のアポトーシス誘導作用をもつことが報告され、それらの作用には K1 以外の領域の関与が示唆されている¹²⁾¹³⁾。今後、K2 や K3 の各 Kunitz 領域、さらに塩基性アミノ酸に富むカルボキシル末端などの欠損マウスを作成することで、これらの領域の生理的意義や機能がより明確になると予想される。

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) Broze GJ Jr: Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coag Fibrinol* 6: S7-S13, 1995.
- 2) Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Saito H, Spitzer SG, Bajaj SP: Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: Evidence that endothelium is the principal site of its synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8869-8873, 1990.
- 3) Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML: Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res* 50: 803-813, 1988.
- 4) Sandset PM, Warn-Cramer BJ, Rao LVM, Maki SL, Rapaport SI: Depletion of extrinsic pathway inhibitor (EPI) sensitizes rabbits to disseminated intravascular coagulation induced with tissue factor: Evidence supporting a physiologic role for EPI as a natural anticoagulant. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 708-712, 1991.
- 5) Kamikubo Y, Hamuro T, Matsuda J, Shinya N, Miyamoto S, Funatsu A, Kato H: Antithrombotic effect of human recombinant tissue factor pathway inhibitor on endotoxin-induced intravascular coagulation in rats: Concerted effect with antithrombin. *Thromb Haemost* 76: 621-626, 1996.
- 6) Wun T-C: Tissue factor pathway inhibitor, in High KA, Roberts HR (eds): *Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1995, 331-353.
- 7) Nakahara Y, Miyata T, Hamuro T, Funatsu A, Miyagi M, Tsunasawa S, Kato H: Amino acid sequence and carbohydrate structure of a recombinant human tissue factor pathway inhibitor expressed in chinese hamster ovary cells: One N- and two O-linked carbohydrate chains are located between Kunitz domains 2 and 3 and one N-linked is in Kunitz domain 2. *Biochemistry* 35: 6450-6459, 1996.
- 8) 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.
- 9) Huang Z-F, Broze GJ Jr: Consequences of tissue factor pathway inhibitor gene-disruption in mice. *Thromb Haemost* **78**: 699-704, 1997.
- 10) 中垣智宏, 水口 純, 岩永貞昭: 組織因子の欠損マウス. *日本血栓止血学会誌* **8**: 153-155, 1997.
- 11) 牟田建吾, 水口 純, 濱本高義, 岩永貞昭: 血液凝固 V 因子の欠損マウス. *日本血栓止血学会誌* **8**: 222-225, 1997.
- 12) 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.
- 13) 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* (in press)