

◆トピックス◆

血液凝固 XI 因子および IX 因子の欠損マウス

友 清 和 彦*, 水 口 純*

Factor XI and Factor IX Deficient Mice

Kazuhiko TOMOKIYO*, Jun MIZUGUCHI*

Key words : factor XI deficient mice, factor IX deficient mice, gene therapy, inhibitors, bleeding-time

はじめに

血液凝固 XI 因子 (FXI) および IX 因子 (FIX) はともに、内因系凝固因子として位置づけられる。FXI は *in vitro* においてサルファチドやデキストラン硫酸、ガラス、カオリンなど、マイナス電荷をもつ異物表面上で、活性化 XII 因子 (FXIIa) によって限定的な水解を受け、活性化 XI 因子 (FXIa) へと活性化される。さらに FXIa は、Ca²⁺ 存在下に FIX を活性化 IX 因子 (FIXa) に変換する。FIXa の生理的な活性発現には補酵素である VIII 因子 (FVIII) を必要とし、FIXa/FVIIIa/リン脂質/Ca²⁺ は Xase として X 因子 (FX) を活性化する。また、FIX は外因系開始因子である活性化 VII 因子/組織因子複合体 (VIIa/TF) によっても活性化を受けることから、内因系および外因系凝固経路の交差点に位置する因子である。

FXI 欠乏症は常染色体劣性遺伝形式をとり、ユダヤ人に多いのが特徴であり、血友病 C とも云われている。臨床的には、FXI レベルが <1% の場合でも、血友病 A, B に見られる自発的な筋肉出血や関節出血を生じることはまれであり、出血は外科手術や外傷時にしか観察されな

い。

一方、FIX 欠乏症は血友病 B として知られる。伴性劣性遺伝形式をとり、25,000~30,000 人に 1 人の確率で発生し、血友病患者 (血友病 A と B, von Willebrand 病) 数の約 25% をしめる。重篤な患者 (FIX 活性 <1%) では関節、筋肉出血および臓器の反復性深部出血が観察される。

FXI および FIX の蛋白質構造・遺伝子・生合成等に関しては、現在まで次のような知見が得られている。

FXI¹⁾ : ①ヒト FXI は 607 個のアミノ酸残基からなる分子量約 80,000 の 1 本鎖糖蛋白質が、1 個の S-S 結合で結合した分子量約 160,000 のホモダイマーである。モノマーは約 90 個のアミノ酸残基からなる 4 つのアップドメインを含む N 末端側の H 鎖 (1~369) と、プロテアーゼドメインである L 鎖 (370~607) から構成されており、血漿プレカリクレインとは 58% の相同性配列を示す。②血中濃度は約 5 μg/ml であり、1 分子の FXI に 2 分子の高分子キニノーゲン (HMW-K) が結合して存在する。異物表面には HMW-K を介して結合し、FXIIa により Arg369-Ile370 が水解されて FXIa に変換され

* (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 Oukubo, Kumamoto-shi, 860-8568, Japan.]

る。FXIの活性化は α -トロンビンおよびFXIaによるautoactivationでも進行する。③FXI遺伝子は約23 kb, 15個のエクソンと14個のイントロンからなり、第4染色体上4q35に位置し、肝臓で合成される。

FIX²⁾: ①ヒトFIXは415個のアミノ酸残基からなる分子量約55,000の1本鎖糖蛋白質である。多くのビタミンK依存性凝固因子同様に、アミノ末端から γ -カルボキシグルタミン酸(Gla)ドメイン、上皮細胞成長因子様のEGF1ドメインとEGF2ドメイン、セリンプロテアーゼドメインの4つのモザイクから構成される。②血中濃度は約5 μ g/mlであり、FIXの活性化はFXIa/Ca²⁺およびFVIIa/TF/Ca²⁺/リン脂質によってArg145-Ala146とArg180-Val181の2カ所が水解され、活性化ペプチドを遊離しつつ、二本鎖(L鎖とH鎖)のFIXaに変換される。FIXaによるFXの活性化速度はFVIIIa/Ca²⁺/リン脂質の存在下で1 \times 10⁹倍高められる。③FIXの遺伝子は約34 kbであり、性染色体Xq27.1上に位置し、8個のエクソンと7個のイントロンからなり、肝臓で合成される。④転写制御には、C/EBPやHNF-4などが関与しているといわれ、制御領域の異常としてはFIX-Lydenが有名である。

内因系凝固因子欠損患者の臨床所見では、FXIIあるいはプレカリクレイン、HMW-K欠損患者は出血症状を示さないが、FXI欠損患者には線溶活性の高い組織(口腔咽頭、尿路)に出血症状が認められる³⁾。最近、von dem Borneらは、FXIの欠乏血漿およびFXIに対する抗体を用いた*in vitro*系で、トロンビンのポジティブフィードバックにより活性化されたFXIaが、クロット形成後もトロンビン産生を促しつつ、フィブリンの線溶抵抗性を促進させると報告した⁴⁾。さらに、Bajzarらは、 α -トロンビン/トロンボモジュリンによる血漿プロカルボキシペプチダーゼB(pCPB)の活性化とフィブリンの線溶抵抗性とを相関を示し、pCPBがフィブリンのカルボキシ末端に存在するLys残基(プ

ラスミノーゲンの結合に関与)を切断することによって、線溶抵抗性を高めるとする仮説を提唱している^{5)~7)}。

FXIおよびFIX欠損マウスからの情報

FXI欠損マウス: 1997年、GailaniらはFXI遺伝子の第5番目のエクソンにneomycin phosphotransferaseを導入することにより破壊し、FXI欠損(FXI^{-/-})マウスを作出した⁸⁾。FXIの欠損は、胎児の発育および出産には何等影響を与えず、また発育したFXI^{-/-}マウスの雌は、その妊娠期間中に危機に瀕することもなく、野生型(FXI^{+/+})同様多産であった。FXI^{-/-}マウスの活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)は著しい延長を示したが、プロトロンビン時間(PT)はFXI^{+/+}と同等であった(表1)。さらに、FXI^{-/-}マウス50匹(6~8週齢)の止血機能を、尾切断後の出血時間⁹⁾で評価したところ、止血時間は各遺伝型で多少異なり、FXI^{+/+}<FXI^{+/-}<FXI^{-/-}の順にわずかな延長傾向を示した(表2)。遺伝的なFXI欠損は、ヒトはもとよりウシとイヌでも知られており、いずれの場合も手術時や外傷後の出血においては

表1 FXI欠損マウスの凝血的パラメータ(文献8より引用、転載許可取得)

測定方法*	正常マウス ブール血漿		遺伝型	
		FXI ^{+/+}	FXI ^{+/-}	FXI ^{-/-}
aPTT(s)	26~28	25~37	40~61	158~>200
PT(s)	8~10	8~12	10~12	10~12
FXI(%)	100	54~64	17~20	<1

* aPTT(s): 活性化部分トロンボプラスチン時間
PT(s): プロトロンビン時間
FXI(%): 正常血漿を100%とした時のFXIの濃度

表2 FXI欠損マウスの出血時間測定結果(文献8より引用、転載許可取得)

遺伝型	匹数	平均値 (min)	標準偏差 (min)	上下限值 (min)
FXI ^{+/+}	14	2.55	2.24	1.33~>10
FXI ^{+/-}	23	3.11	2.58	1.17~>11
FXI ^{-/-}	12	4.27	3.51	1.42~>12

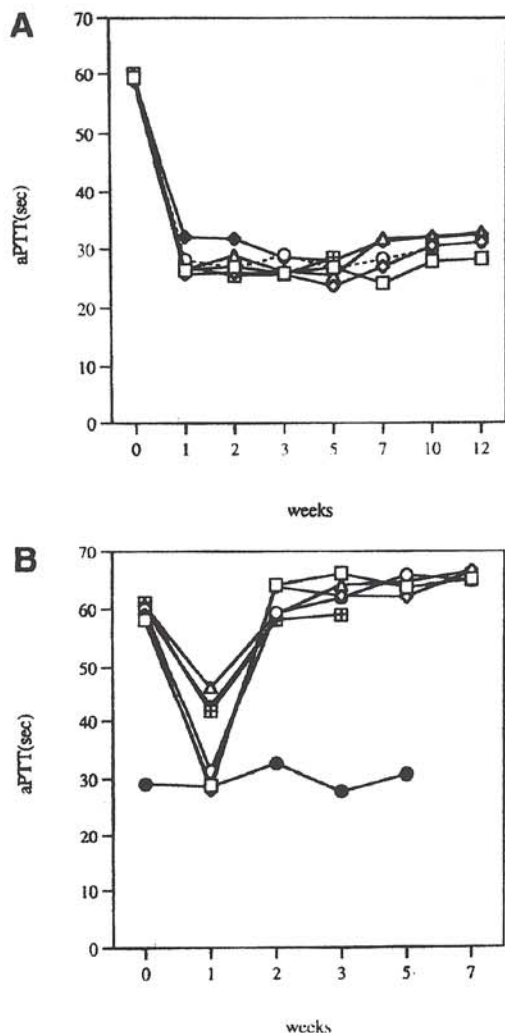


図 1 遺伝子治療用ベクター (Ad-FIX) を投与した FIX 欠損マウス血漿の aPTT の経時的变化 (文献 12 より引用, 転載許可取得) FIX 欠損マウスに 1×10^{11} 個の Ad-FIX を投与し, 経時的にクエン酸採血を行い, aPTT を測定した. (A) は C57BL/6 系・FIX 欠損マウス, (B) は CD-1 系・FIX 欠損マウスでの結果を示す. 図中の各シンボル (□~◆) は FIX 欠損マウスそれぞれの個体を示す (●のみ野生型マウス).

正常との差が認められる. しかし, その出血は, 次に述べている FIX 欠損のような重度のものではなく, FXI^{-/-}マウスの場合も正常との間に明瞭な差は見られない.

FIX 欠損マウス: 1997 年, Lin らは FIX 遺伝

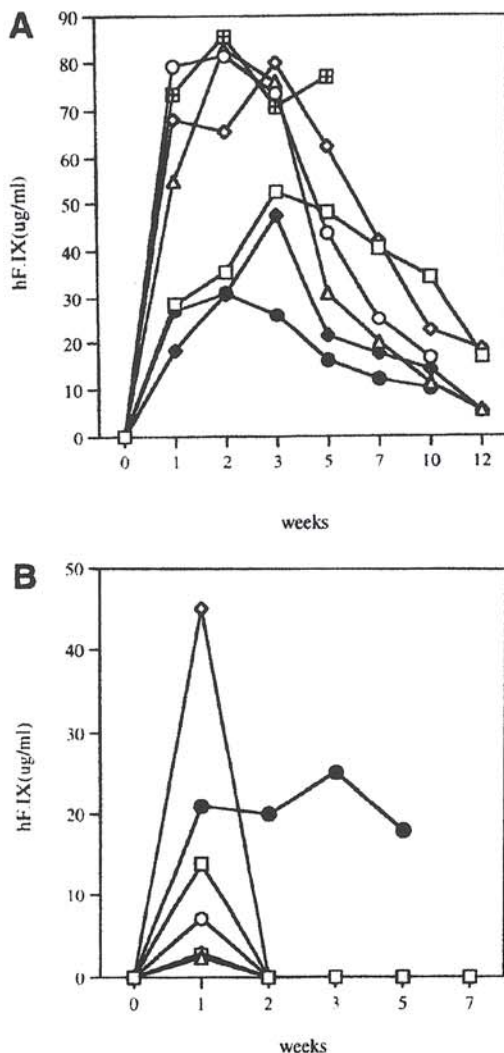


図 2 Ad-FIX を投与した FIX 欠損マウス血漿の FIX の抗原量の経時的变化 (文献 12 より引用, 転載許可取得) FIX 欠損マウスに 1×10^{11} 個の Ad-FIX を投与し, 経時的に採血を行い, 抗原量を測定した. (A) は C57BL/6 系・FIX 欠損マウス, (B) は CD-1 系・FIX 欠損マウスでの結果を示す. 図中の各シンボル (□~◆) は FIX 欠損マウスそれぞれの個体を示す (●のみ FIX 野生型マウス).

子の「プロモーター~エクソン 3」の領域を破壊することにより, C57BL/6 系の FIX 欠損マウスを作出した¹⁰⁾. FIX 遺伝は X 染色体依存であるため, 雄新生児の 50% がヘミ接合体 (FIX :

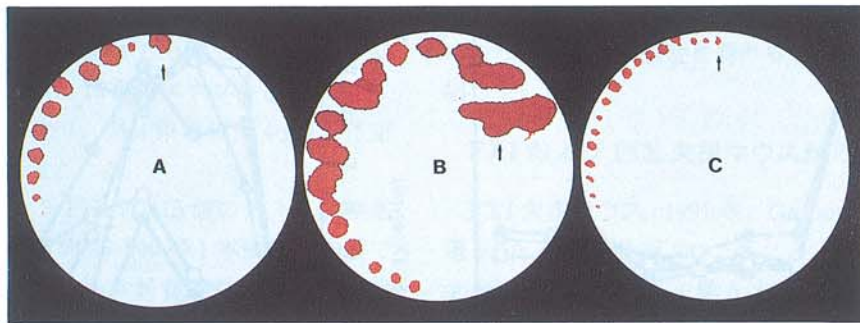


図3 Ad-FIX投与によるFIX欠損マウスの出血時間の補正効果(文献12より引用, 転載許可取得)

尾切断後, 流出する血液を出血停止まで30秒毎に濾紙に吸引させた。

(A)はFIX野生型マウス, (B)はC57BL/6系・FIX欠損マウスを, (C)はAd-FIX投与後1週目のC57BL/6系・FIX欠損マウスを示す。

X-/Y)であることが期待されたが, 40%と低く(統計上有意差あり)出産時の死亡が原因と推測された。FVIII因子欠損マウスは自発的な出血はないものの, 血友病A患者と似た症状を示すことが既に報告されている¹¹⁾。FIX欠損マウスも同様に血友病Bに近い症状を示した。FIX欠損マウスでは足の腫脹(先端部や足裏)および足裏の内出血, 脾腫, 貧血などが観察されるが, 外観上は野生型と区別つかない。怪我をしなければ生き延びるようで, 成長過程で仲間同士の喧嘩による内臓出血を原因とする死亡が観察された。解剖所見では皮下と背側の筋肉表面に大量の出血が認められ, 頭蓋内, 腋, 鼠径部, 唾液腺, 心膜にも出血があった。尾を切断すると, 傷害部を焼灼止血しないかぎり出血で死亡する。FIX欠損マウス血漿中のFIX凝固活性を測定すると, 約8%の活性が検出された。これは採血時の外因系凝固の活性化のほか, 使用したヒトの欠乏血漿とマウス血漿の種間の差に由来する可能性もあるが, 詳細は明らかではない。

1998年, Kungらは血友病Bの遺伝子治療を目指し, C57BL/6系に加え, CD1系統のFIX欠損マウスを作出した¹²⁾。FIX欠損マウス血漿のaPTTがヒトFIXの添加により正常化することを*in vitro*で確認した後, 両系統のFIX欠損マウスにヒトFIXcDNAを組み込んだアデノウイルスベクター(Ad-FIX)を静脈投与した。

その結果, C57BL/6系・FIX欠損マウスでは, aPTTの短縮およびヒトFIXの抗原量の増加が12週まで確認され(図1A, 2A), 出血の程度も野生型レベルまで改善された(図3)。一方, CD-1系・FIX欠損マウスでのaPTTの短縮, およびヒトFIX抗原量の増加は, 共に一過性であり, 投与後2週目には投与前レベルに後退した(図1B, 2B)。CD-1系・FIX欠損マウスには抗ヒトFIX中和抗体の産生が確認されたが, 系統の相違によりこのような差が生ずる理由は明らかではない。しかし, フィブリノーゲン欠損マウスでも系統差による生存率の差が報告されており¹³⁾, 系統差にもとづくデータの食い違いはしばしば見られることである。

おわりに

以上を要約すると, ①FXIの欠損は, 胎児の発育に何等影響を与えず, FXI^{-/-}雌マウスの妊娠, 出産の機能も野生型と変わりなかった。また, aPTTは著しく延長したが, 尾切断後の出血時間の延長はわずかであった。一方, ②FIXの欠損は血友病Bに近い症状を示すが, 傷害がなければ順調に発育する。尾を切断すると出血時間は著しく延長し, 止血しなければ死亡する。③FIX欠損マウスの血漿にはFIX活性の残存が認められたが, 採血時における外因系の活性化によるのか, マウスとヒトの血液凝固システ

ムの差によるのか不明である。④ C57BL/6 と CD-1 の 2 系統の FIX 欠損マウスに Ad-FIX を静脈投与した結果, ヒト FIX の高い発現が確認され, C57BL/6 系・FIX 欠損マウスでは中和抗体の産生もなく出血時間が補正された。この結果はノックアウト血友病モデルマウスを用いて遺伝子治療の可能性を示した初めての例であり, 今後, 遺伝子治療法の開発に, こうした欠損マウスは極めて有用な tool となるであろう。

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), 嶋 緑倫先生 (奈良県立医科大小児科助教授) に深謝いたします。

文 献

- 1) Fujikawa K, Chung DW: Factor XI (High KA, Roberts HR, eds): Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker Inc, 1995, 257-268.
- 2) High KA, Roberts HR: Factor IX (High KA, Roberts HR, eds): Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker Inc, 1995, 215-237.
- 3) Broze JGJ, Gailani D: The role of factor XI in coagulation. : *Thromb Haemost* **70**: 72-74, 1993.
- 4) von dem Borne PA, Meijers JCM, Bouma BN: Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. : *Blood* **86**: 3035-3042, 1995.
- 5) Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME: Purification and characterization of TAFI, a thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. : *J Biol Chem* **270**: 14477-14484, 1995.
- 6) von dem Borne PA, Bajzar L, Meijers JCM, Nesheim ME, Bouma BN: Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. : *J Clin Invest* **99**: 2323-2327, 1997.
- 7) Bajzar L, Nesheim ME, Morser J, Tracy PB: Both cellular and soluble formes of thrombomodulin inhibit fiblynlolysis by potentiating the activation of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. : *J Biol Chem* **273**: 2792-2798, 1998.
- 8) Gailani D, Lasky NM, Broze JGJ: A murine model of factor XI deficiency. : *Blood Coag Fibrinol* **8**: 134-144, 1997.
- 9) Dejana E, Calliomi A, Quintana A, de Gaetano G: Bleeding time in laboratory animals II. A comparison of different assay in rats. : *Thromb Res* **15**: 191-198, 1979.
- 10) Lin HF, Maeda N, Smithies O, Straghit DL, Stafford DW: A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. : *Blood* **90**: 3962-3966, 1997.
- 11) 濱本高義, 野村浩一郎, 水口 純, 岩永貞昭: 第 VIII 因子欠損マウス. *日本血栓止血学会誌* **8**: 517-520, 1997.
- 12) Kung SH, Hagstrom JN, Cass D, Tai SJ, Lin HF, Stafford DW, High KA: Human factor IX corrects the bleeding diathesis of mice with hemophilia B. : *Blood* **91**: 784-790, 1998.
- 13) 水口 純, 中垣智弘, 岩永貞昭: フィブリノーゲンの欠損マウス. *日本血栓止血学会誌* **8**: 156-158, 1997.