

第 VIII 因子欠損マウス

濱 本 高 義*¹ 野村 浩 一 郎*¹ 水 口 純*¹
 岩 永 貞 昭*^{1*2}

Factor VIII Deficient Mice

Takayoshi HAMAMOTO*¹, Koichiro NOMURA*¹,
 Jun MIZUGUCHI*¹, Sadaaki IWANAGA*^{1*2}

Key words: factor VIII, gene targeting, knockout mouse, development, embryonic stem

はじめに

第 VIII 因子 (FVIII) は、血液凝固反応において活性化第 IX 因子 (FIXa) による第 X 因子 (FX) 活性化反応に必須のタンパク質コファクターであり、血中では von Willebrand 因子 (vWF) と複合体を形成して循環している。FVIII の先天性の欠乏・欠損は、X 連鎖劣性遺伝性の出血性疾患、血友病 A として知られており、血友病 A 患者が重篤な出血症状を呈することから、FVIII が生理的な血液凝固反応において極めて重要な役割を担っていると考えられている。近年、タンパク質工学、遺伝子工学的解析の進歩により、FVIII タンパク質や FVIII 遺伝子解析が進み、FVIII の構造と機能に関する理解が深まってきた。FVIII のタンパク質構造、遺伝子、生合成などについては、現在までにつきのような知見が得られている¹⁾。

① ヒト FVIII の遺伝子は、全長約 186 kbp で、X 染色体長腕末端部 Xq28 に位置し、FVIII の主な生合成部位は肝臓であるとされている。

しかし、mRNA の産生部位を調べると腎・脾・リンパ腺・筋・胎盤にも存在している。

② FVIII は、2,332 アミノ酸残基からなる約 330kDa の 1 本鎖糖蛋白質の成熟分子として生合成され、分子内には 25 か所の potential glycosylation site と少なくとも 2 か所の硫酸化部位 (vWF との結合に関与) が存在する。

③ A1-A2-B-A3-C1-C2 のドメイン構造を形成しており、N 末端から A1 (アミノ酸残基 1~336), A2 (375~719), A3 (1691~2019) ドメインの 3 つの A ドメインは、第 V 因子及びセルロプラスミンと相同性が高い (約 30%)。また C 末側の C1 (2020~2172), C2 (2173~2332) ドメインは、ディスコイジンレクチンと相同性が高い (約 20%)。B ドメインはアミノ酸残基 741~1648 に相当する領域で、19 個の Asn 結合型糖鎖が存在する。B ドメインは FVIII の分泌に関与しているようであるが、FVIII 活性の発現には必須でなく、その生理的機能については不明である。

④ 血流を循環する FVIII の大部分は、分泌

*¹ (財) 化学及血清療法研究所 血液製剤研究部 [〒 860 熊本市大窪 1-6-1]: Blood Products Research 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 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98]: Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University

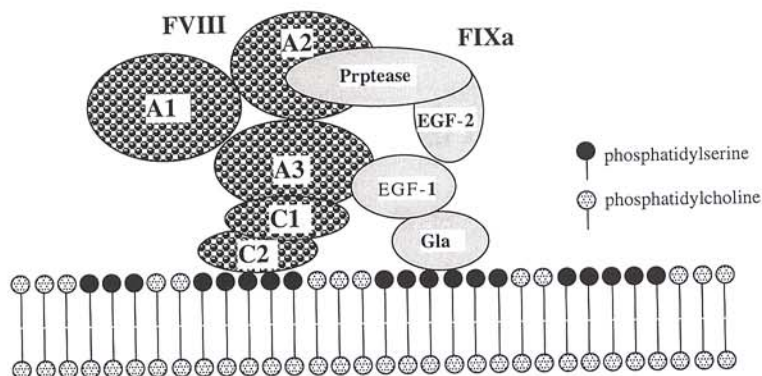


図1 第X因子活性化複合体の模式図

FVIIIはC2ドメインを介してリン脂質と結合し、A1, A2, A3ドメインは3角形配置を取っている。A2ドメイン(S558-Q565)はFIXaのプロテアーゼドメインと、A3ドメイン(E1811-K1818)はFIXaのEGF-1ドメインと相互作用している。(文献3より引用・改変)

の過程で Thr1648-Arg1649 結合が加水分解され、さらに B ドメインが分解を受けると考えられており²⁾、A1-A2-B からなる重鎖 (90-210 kDa) と A3-C1-C2 からなる軽鎖 (80kDa) がカルシウムなどの 2 価の陽イオンを介したヘテロ 2 本鎖複合体を形成し、主に軽鎖の酸性領域 (アミノ酸残基 1649-1689) と C2 ドメインを介して vWF と結合して存在する。また、FVIII の血中濃度は約 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

⑤ FVIII は血漿中では vWF と結合しているために、ほとんどコファクター活性を持たない状態で存在するが、血液凝固反応の場で α -トロンビンにより FVIII の Arg740-Ser741 (B ドメインの遊離) と Arg1689-Ser1690 (vWF からの遊離)、Arg372-Ser373 (FVIII の完全活性化) 結合の 3 カ所が限定分解されると、FVIIIa に変換されてコファクター機能を発揮する。FXa によっても FVIII は活性化されるが、生理的に意味があるかどうか明らかでない。

⑥ FVIIIa は活性化プロテイン C (APC) により、A1 ドメインの Arg336-Met337 及び A2 ドメインの Arg562-Gly563 が限定分解を受け不活性化される。FVIIIa は α -トロンビンによっても不活性化されるが、その生理的意義は APC によるものほど重視されてない。

⑦ FVIIIa の A3 ドメイン (E1811-K1818) と A2 ドメイン (S558-Q565) は、それぞれ FIXa の

EGF1 ドメインとプロテアーゼドメインを介して結合することが示唆されている。また、FVIIIa の A3 ドメインは APC に結合し、C2 ドメインはリン脂質 (特にフォスファチジルセリン) に結合する。また、最近のセルロプラスミンの結晶解析の結果を基に FVIII および FIXa、リン脂質複合体 (FX 因子活性化複合体) の立体的配置が推定されている (図 1)³⁾。

一方、血友病の病態や効果的な治療方法を開発する上で血友病のモデル動物が求められてきたが、モデル動物の維持の煩雑さや入手の困難さなどから、その使用には限界がある。本稿では、血友病のモデル動物としても期待される、FVIII ノックアウトマウスに関するトピックスを紹介する。

第 VIII 因子欠損マウスからの情報

1995 年に Bi らのグループ⁴⁾⁵⁾が、さらに 1997 年には Muchitsch らのグループ⁶⁾⁷⁾が、FVIII のノックアウトマウスの作製に成功し、そのマウスの特性について報告した。それぞれのグループは、まずジーンターゲット手法によりマウス FVIII 遺伝子エクソン 17 欠失マウスあるいは FVIII 遺伝子エクソン 16 欠失マウスを作出し、つぎに雌雄遺伝子欠失マウス同士の掛け合わせによりホモ接合体 FVIII 欠損マウスを作出した。雌ヘテロ接合体マウス (VIII: X⁻/X⁺)

表 1 F VIII欠損マウスおよび正常マウスの第VIII因子活性値 (文献6より引用・改変)

	X ⁻ /Y	X ⁻ /X ⁺	X ⁻ /X ⁻	X ⁺ /Y	X ⁺ /X ⁺
合成基質法(u/ml)	<0.02±0.01	0.27±0.25	<0.02±0.00	0.80±0.51	0.56±0.27
凝固法(u/ml)	0.01±0.01	0.10±0.11	0.02±0.02	0.37±0.19	0.20±0.12

n数は10~15, データは平均値±標準偏差を示す.

全ての測定にはIMMUNO AGの測定キットの試薬を使用した.

と雄へミ接合体マウス (VIII: X⁻/Y) を掛け合わせた場合, 出生した仔マウスの産生比率は, VIII: X⁻/X⁺ (25%), 雌ホモ接合体 (VIII: X⁻/X⁻) (25%), VIII: X⁻/Y (25%) と雄正常 (VIII: X⁺/Y) (25%) であった. 雌 FVIII 欠損マウスの出産率, 妊娠期間は正常マウスと変わらず, また胎盤ヘモクロマトーシスなどにも関わらず多数回にわたる出産を生き抜いた. 出産仔マウスの性別比は雌:雄=1.0:0.85であり, 出生仔マウス数は6.5±0.4と正常マウスのそれと比較すると優位に低かった. 仔マウスの生存率は, 出産後2日目で88.0±4.2%, 離乳時(出産後21日目)で86.9±4.2%であった. さらに仔マウスの成長における体重増加は正常マウスと比較しても何ら変わらなかったという.

FVIII 欠損マウスの aPTT は顕著に延長しており, FVIII 活性は表 1 に示したように, VIII: X⁻/Y 及び VIII: X⁻/X⁻ で 0.02 U/ml 以下で, VIII: X⁻/X⁺ は VIII: X⁺/X⁺ の 1/2 であった. また, Turecek らの方法⁹⁾ に従い, マウスの尾の先端部から 3 mm の部分を手術用メスで切断し, 切断部から 2 分間に流出する血液量がヘモグロビン定量により測定された. 結果は, 正常マウスの出血量が約 5 μ l/min であったのに対し, FVIII 欠損マウスである VIII: X⁻/Y の出血量は約 20 μ l/min と著しく増加した. また, VIII: X⁻/Y で少なくとも 11% の, VIII: X⁻/X⁻ で少なくとも 7% の自発性の出血が胸膜腔内や膝関節部, 股関節部, 腹腔内に確認され, 血友病 A 患者の出血症状に類似した. 6 週齢の FVIII 欠損マウスの尾を切断したり, 尾に火傷を負わせると, 大量出血で死亡するマウスが高頻度に確認された. しかし, 8~10 週を経過した FVIII 欠損マウスでは, 尾を切断したり, 尾を火傷させた場合でも, 全マウスが問題なく生存したという. 何故このように週齢の差で出血・死亡に差が見られるのかその理由につ

いては明らかでないが, マウスにおいては週齢によって止血機構の味が異なる可能性もあろう.

おわりに

以上述べてきたように, FVIII 欠損マウスは, 実際の臨床における血友病 A 重症患者に比べると, 自発的な出血症状の発生頻度が低いと考えられるものの, ヒトの血友病 A 患者と非常に類似した症状を示した. しかし, 今回の 2 つのグループから報告された FVIII 欠損マウスは, 分化・発生学的結果が示されていないために, 胎齢期において何らかの異常や死亡を起こす個体が存在するのかがどうか明らかでない. 今後の検討課題であろう.

最近の血友病 A 患者における遺伝子解析やタンパク質化学的解析の研究成果の蓄積から, 血友病 A 重症度と遺伝子あるいは FVIII 分子異常との関係, あるいは臨床的に問題視されている FVIII インヒビターの認識部位 (インヒビターの多くは IgG であり, 認識部位は A ドメインのアミノ酸残基 379~538 あるいは C2 ドメインアミノ酸残基 2178~2332 の範囲に局限していることが示されている) については明らかになりつつある⁹⁾. しかし, FVIII インヒビターの発症機序については, 遺伝子欠損あるいはナンセンス変異 (Arg → stop) の患者がインヒビター発生が高率であることは示されているものの¹⁰⁾, 未だ不明な点が多く残されている.

Bi ら⁵⁾ は, ヒト FVIII を FVIII 欠損マウスに免疫してマウス FVIII と交差反応性を有する 2 つの抗 FVIII モノクローナル抗体の作製に成功し, それら抗体のクラスはそれぞれ IgM と IgG₁ であり, 認識部位はいずれも軽鎖であったと報告している. これら抗体作製に用いた FVIII 欠損マウスは 3 回目の免疫後, アナフィラキシーショック症状を呈し死亡した. しかし

ながら、実際に FVIII 欠損マウスに臨床投与量の FVIII を静脈投与して、そのようなショック症状を呈するのか、インヒビターがどれ位の頻度で発生するのかという点に興味をもたれる。これらの FVIII 欠損マウスは、今後血友病 A 患者のインヒビターの発生機序の解明や遺伝子治療における有効性の評価などに応用されるであろう。

謝 辞：御校閲を戴きました吉岡章先生（奈良県立医科大学小児科教授）に深謝いたします。

文 献

- 1) Tuddenham EGE: Factor VIII (High KA, Roberts HR, eds): Molecular basis of thrombosis and hemostasis. New York, Marcel Dekker, Inc., 1995, 167-195.
- 2) Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ: Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* **263**: 6352-6362, 1988.
- 3) Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EGD, Kemball-Cook G: A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* **89**: 2413-2421, 1997.
- 4) Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH: Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nature Genetics* **10**: 119-121, 1995.
- 5) Bi L, Sarkar R, Naas T, Lawler AM, Pain J, Shumaker SL, Bedian V, Kazazian HH: Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood* **88**: 3446-3450, 1996.
- 6) Muchitsch EM, Turecek PL, Gritsch H, Pichler L, Schwarz HP: Factor VIII deficiency in knockout mice is associated with spontaneous bleeding. *Thrombosis and Haemostasis, supplement*: 230, 1997.
- 7) Turecek L, Gritsch H, Richter G, Muchitsch EM, Auer L, Pichler L, Schwarz P: Factor VIII exon 17 knockout mice have a hemorrhagic defect which is not corrected by factor VIII replacement. *Thrombosis and Haemostasis, supplement*: 769, 1997.
- 8) Turecek L, Gritsch H, Richter G, Auer L, Pichler L, Schwarz P: Assessment of bleeding for the evaluation of therapeutic preparations in small animal models of antibody-induced hemophilia and von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis* **77**: 591-599, 1997.
- 9) 新井盛夫: 第 VIII 因子インヒビター: 基礎的展望. *日本血栓止血学会誌* **5**: 213-227, 1994.
- 10) 神谷 忠, 齊藤英彦: 血友病の遺伝子変異. "血友病", 福井 弘編, 1993, 94-125, 西村書店.