

◆トピックス◆

血液凝固 VII 因子の欠損マウス

友 清 和 彦*¹, 副 島 見 事*², 水 口 純*¹

Factor VII Deficient Mice

Kazuhiko TOMOKIYO*¹, Kenji SOEJIMA*² and Jun MIZUGUCHI*¹**Key words** : factor VII deficient mice, tissue factor, development, blood vessel

はじめに

外因系凝固反応は、血管障害部位の細胞膜上に露呈した組織因子 (TF) と血中の活性化 VII 因子 (FVIIa) が 1:1 の複合体を形成し、IX 因子 (FIX) および X 因子 (FX) を活性化することにより開始される。FVIIa はそれ自身ではきわめて弱い酵素活性しか示さないが、TF と結合することにより FIX および FX の活性化速度は約 10^4 倍高められる。したがって生理的な FVIIa の凝固活性発現に TF は必須である。血液凝固 VII 因子 (FVII) に関しては、現在まで次のような知見が得られている¹⁾。①ヒト FVII は、肝臓で合成される 406 個のアミノ酸残基からなる分子量約 50,000 の 1 本鎖糖蛋白であり、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、上皮性細胞成長因子様の 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 つのドメイン構造からなっている。② FVII は *in vitro* において多くのセリン型酵素 (FXa や FXIIa, FIXa など) によって Arg¹⁵²-

Ile¹⁵³ が切断され、二本鎖 (L 鎖と H 鎖) の FVIIa へと変換されるが、FIX や FX, プロテイン C などに見られるような活性化ペプチドの遊離はない。③血漿中には FVII の約 1% が FVIIa として検出されるが、最近、Butenas ら²⁾ は生理的濃度における FVII の活性化反応を 4 つの酵素 (FXa および FVIIa/TF, トロンピン, FIXa) を用いて行い、その動力学的解析から FXa が生理的な FVII 活性化酵素であることを明らかにした。しかし、定常状態下の血中で FXa が産生されるとは考えにくく、正常血漿中に観察される FVIIa がどのように活性化されて生じたのかは未だ明白でない。④また、FVIIa の血中での半減期は約 2.5 時間であり、ほかの FIXa, FXa などの活性型凝固因子が数分以内であるのと比べてきわめて長い。これは外因系凝固の阻害物質である Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) が TF/FVIIa 複合体にしか作用せず、アンチトロンピン III による阻害の寄与も小さいためと考えられている。⑤ FVII 遺伝子は全長 12.8 Kb で、第 13 染色体の q 34 qter に位置し、8 個のエクソンと 7 つのイ

*¹ (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 Okubo, Kumamoto 860-8568, Japan]

*² (財)化学及血清療法研究所 第一研究部 [〒 869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺] Research Department 1, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, [Kawabe Kyokushi-mura, Kikuchi-gun, Kumamoto 869-1298, Japan]

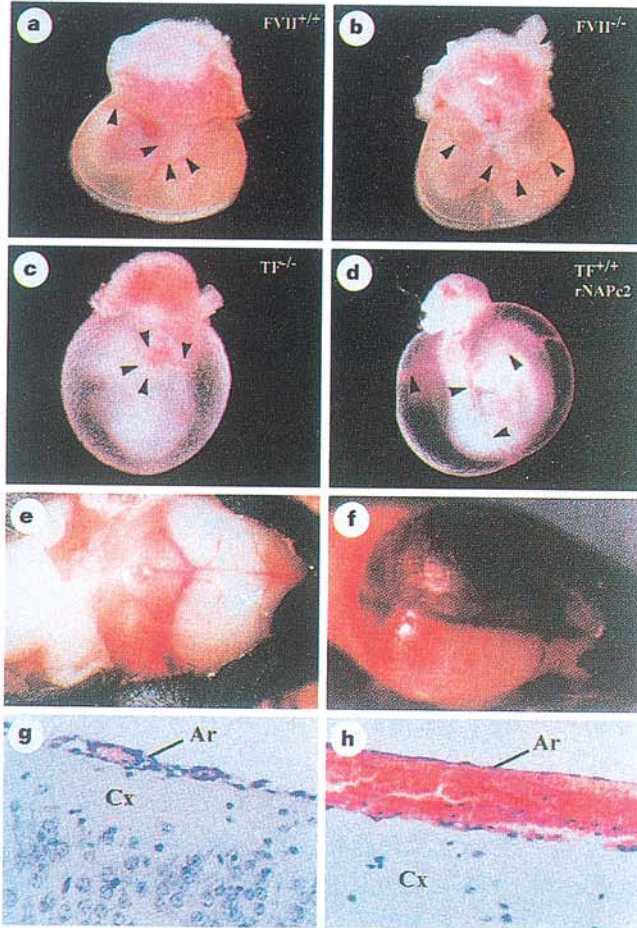


図1 胎齢10.5日におけるFVII^{+/+}, FVII^{-/-}, TF^{-/-}胚の顕微鏡観察(文献4より引用)

(a)FVII^{+/+}, (b)FVII^{-/-}, (d)rNAPc2処理FVII^{+/+}では明瞭な叢が形成されているが(矢印), (c)TF^{-/-}では卵黄嚢内に、微小動脈瘤に伴う血液の堆積(blood lakes)および異常な叢が観察される(c, dは培養胚)。(e)は正常なFVII^{+/+}脳と、(f)は硬膜下出血をきたしたFVII^{-/-}脳を示す。(g)と(h)はそれぞれのクモ膜と白脳(White-brain)であるが、FVII^{+/+}では血管内の血液が明瞭であり、FVII^{-/-}では硬膜下に血液の堆積が認められる。(Reprinted by permission from Nature Vol. 390 pp. 290-294, 20 Nov. 1997 Copyright Macmillan Magazines Ltd.)

ントロンからなる。FVII遺伝子の下流2.8KbにFX遺伝子が位置する。

1996年、3つのグループがほぼ同時期にTFの欠損マウス(TF^{-/-})を報告した³⁾。それらによるとTF^{-/-}の胚は、胎齢9.5日から10.5日にかけて卵黄嚢血管・胚血管の形成不全を生じ、それに伴う循環異常により死亡することが明らかになった。このことから、TFは、発生過程において、血管同士の連結時における出血を防止する役割をはたす一方で、凝固因子としての機能以外にも血管の分化への関与が示唆されている。これらをより詳細に明らかにするため、TFのリガンドであるFVIIの欠損マウスの作出が望まれていた。

FVII欠損マウスからの情報

1997年、RosenらのグループはFVII欠損マウスを作成するために、ヘテロ接合体FVII欠損マウス(FVII^{+/-})を掛け合わせ、ホモ接合体FVII欠損マウス(FVII^{-/-})を作出した⁴⁾。その結果、FVII^{-/-}胎児の発育は、いずれの胎齢においても異常はなく(図1a, b)、またTF^{-/-}胚にみられた血管形成不全も(図1c)生じなかった。しかし、FVII^{-/-}の新生児はその70%が分娩時に致死的な腹腔内出血を生じ、生き延びた残りの個体も大部分が24日齢になる以前に頭蓋内出血で死亡した(図1e, f)。一方、血管形成については、内皮細胞におけるvon Willebrand因子(vWF)の存在、平滑筋細胞における α ア

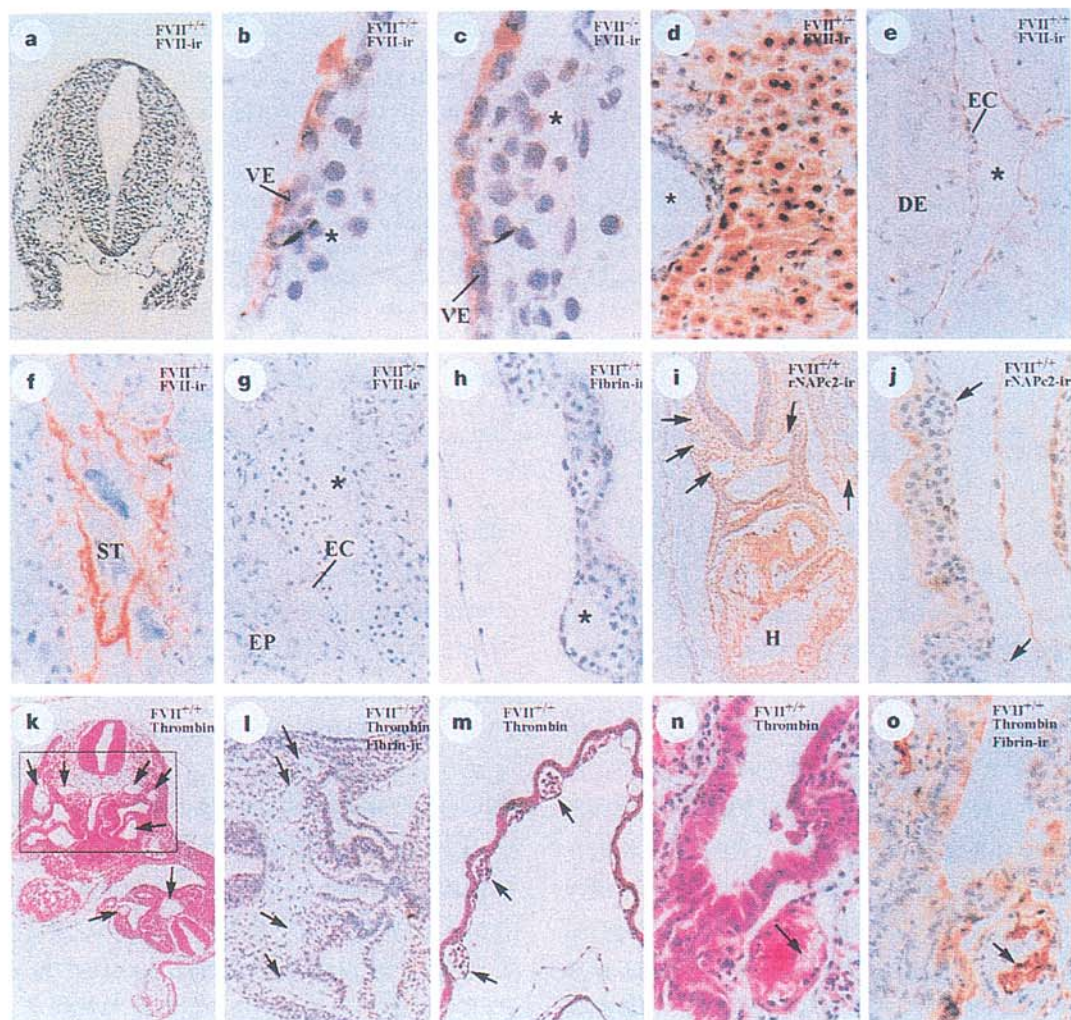


図 2 胚での FVII およびフィブリン形成の免疫染色による分析 (文献 4 より引用)

胎齢 9.5 日における FVII の免疫反応性 (FVII-ir) : (a) FVII^{+/+} は陰性, (b) FVII^{+/+} および (c) FVII^{-/-} の卵黄嚢の近位内胚葉細胞先端部 (母体側) は陽性. (d) FVII^{+/+} の成熟マウスの肝臓は陽性. 胎齢 9.5 日の (e) 胎盤脱落膜中の血管内皮細胞内および, (f) 合体栄養細胞層上は陽性だが, (g) 胚胎盤内の胚血管は陰性. 胎齢 9.5 日におけるフィブリノーゲン/フィブリンの免疫染色反応性 (フィブリノーゲン/フィブリン-ir) : (h) FVII^{+/+} 卵黄嚢血管は陰性. rNAPc2 処理後 2 日目の胚 (胎齢 15 日) における, rNAPc2 の免疫染色反応性 (rNAPc2-ir) : (i) 胚と (j) 卵黄嚢は陽性. トロンビン投与によるフィブリン形成の誘導 : (k および l, l は k の拡大図) 胎齢 9.5 日の FVII^{+/+} 胚と, (m) 卵黄嚢血管ではフィブリン形成は陰性. (n, o) 成熟マウスの肺では血栓を生じた. k, m, n はヘマトキシリン-エオシン染色像. *印は内腔を示している. (Reprinted by permission from Nature Vol. 390 pp. 290-294, 20 Nov. 1997 Copyright Macmillan Magazines Ltd.)

クチンの存在が確認され, 共に正常であった. また, FVII 以外の凝固因子の中で FVII を代償する因子はなかった (表 1). FVII^{+/+} の mRNA レベルは, 胎齢 9.5 日の胚と卵黄嚢で最も低値

を示し, このことは FVII の活性が胎齢 11.5 日でもっとも低かったことと一致する (表 1). これに比べて分娩後 2 日の新生児, あるいは成熟マウスの肝臓では豊富な FVII の mRNA が認

表 1 F VII 欠損マウスの血漿中の凝固因子活性 (文献 4 より引用・改変)

凝固因子	胎齢	遺 伝 型		
		F VII ^{+/+}	F VII ^{+/-}	F VII ^{-/-}
F II	18.5 日	42±4 (9)	39.3±3 (21)	46±4 (8)
F V	18.5 日	45±6 (9)	41±4 (21)	60±6 (8)
F VII	11.5 日	0.2±0.1(11)	0.1±0.1 (3)	≤0.05 (2)
	14.5 日	1.7±0.3(8)	0.9±0.1*(11)	≤0.05 (9)
	18.5 日	39±8 (3)	13±2* (17)	≤0.05 (12)
	新生児	23±4 (12)	10±2* (12)	≤0.05 (3)
F VIII	18.5 日	74±15 (9)	62±7 (21)	64±8 (22)
F IX	18.5 日	37±4 (9)	28±2 (21)	19±2*(8)
F X	18.5 日	30±3 (9)	27±2 (22)	34±3 (8)

数字は成熟マウスを 100% とした時の値±標準偏差, () 内は匹数を示す.

*印は F VII^{+/+} に対して有意差 (P<0.05) があったことを示す.

(Reprinted by permission from Nature Vol. 390 pp. 290-294, 20 Nov. 1997 Copyright Macmillian Magazines Ltd.)

められた. FVII の免疫染色像解析によると FVII は胎齢 9.5 日の FVII^{+/+} 胚には認められなかったが, 生後 2 日から成熟マウスになるにつれて肝臓において豊富に認められた (図 2a, d).

胚の正常な発育が母体から胚への FVII の移行によるものであるか否かを調べるために, 胎齢 11.5 日, 14.5 日, 18.5 日の FVII^{-/-} 胎児血漿の FVII 活性を測定したが, いずれにも検出されなかった (表 1). また, 母体に組換ヒト活性化 FVII 因子 (rFVIIa) を血漿濃度が 5 µg/ml になるよう (生理的 FVII 濃度の 10 倍量) 投与しても, 胎児血漿中の rFVIIa 濃度は, 母体血漿中濃度の 0.1% 未満であった. 通常, 母体から胚への栄養分の供給は, 発生初期では卵黄囊を通して行われ, 次に絨毛膜-尿膜融合期 (胎齢 9.0~9.5 日) の後では主として胎盤を通しておこなわれる. そこで, 胎齢 9.5 日または 10.5 日における FVII の免疫染色像解析を行った結果, FVII は FVII^{+/+} においては卵黄囊内の母体から延びた近位内胚葉細胞に検出されたが, FVII^{-/-} では, 主として母体側の絨毛先端部 (villous brush border) にしか検出されなかった (図 2b, c). また, 胎齢 9.5 日の絨毛膜尿膜胎盤における FVII 免疫反応性は, 母体の血管の内皮と合胞体栄養細胞層にしか認められず (図 2e, f), 胎児血管は一貫して陰性であった

(図 2g).

TF^{-/-} 胚の多くは, その血管の脆弱性に起因する致死的な出血を呈するので, 正常な胚の発育にはフィブリン形成もしくは末梢内皮細胞の機能が重要であることが予想された. しかし, FVII^{+/+} の胎齢 9.5 日と 10.5 日の卵黄囊のフィブリノーゲン/フィブリンの免疫染色 (図 2h), および超微構造分析 (倍率 3,000 倍, 視野 20 以上の電子顕微鏡観察) の結果では, 血管内部およびその周囲にフィブリン沈着は認められなかった. また, TF^{-/-} において血管が脆弱になる時期に相当する胎齢 8.5 日~10.5 日の FVII^{+/+} の胚を, 鉤虫由来の FVIIa 特異的インヒビターの組換改変体である「rNAPc 2⁵⁾」存在下で培養しても, TF^{-/-} 胚のような微小動脈瘤やそれに伴う血液の堆積 (blood lakes) は生じなかった (図 1c, d, 2i, j). さらに, 胎齢 9.5 日の FVII^{+/+} 胚の心臓内に致死量の 1,000 倍量のトロンピンを投与したが, 驚くことにフィブリン沈着は, 胚または卵黄血管には検出されなかった (図 2k-m). これらのことから, 胎齢 9.5 日の胚での止血にはフィブリン形成の寄与は小さいと推察された. また, 成熟した血小板は胎齢 9.5 日では同定されないこと, および血小板の有無が出生前の出血に関与しないことから⁶⁾, 血小板依存性の止血が生じている可能性も低い.

おわりに

以上を要約すると, ① TF の唯一のリガンドである FVII^{-/-} の胚は正常に発育し, 周産期から 24 日齢までに腹腔内出血および頭蓋内出血のため死亡した. なお, TF^{-/-} の胚は胎齢 9.5 日から 10.5 日の間に壊死する. ② FVII^{-/-} 胎児の正常な発育は, 母体から胚への FVII の供給による可能性もあるが, 過剰な母体への rFVIIa の投与および FVII の免疫染色像解析の結果からみてその可能性は低い. ③ FVII^{+/+} 胎齢 9.5 日と 10.5 日の卵黄囊の FVII 免疫反応性および超微構造分析では, 血管内部およびその周囲にフィブリン形成は認められない. つまり, FVII^{-/-} 胎児の生存は, 母体から胎児への FVII の移行によるものではなく, TF/FVIIa を介したフィブリン形成によるものでもない. これらのことは, 胚形成時の TF が, トロンピンや Xa などのシグナル伝達による血管の分化, 細胞接着, 走化性など, 血液凝固反応以外の機能を持つことを強く示唆している.

文 献

- 1) Pertersen LC, Hedner U, Wildegoose P: Factor VII (High KA, Roberts HR, eds): Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker, Inc., 147-165, 1995.
- 2) Butenas S, Mann KG: Kinetics of human factor VII activation. *Biochemistry*, **35**: 1904-1910, 1996.
- 3) 中垣智弘, 水口純, 岩永貞昭: 組織因子欠損マウス, 日本血栓止血学会誌 **8**: 153-155, 1997.
- 4) Rosen ED, Chan JCY, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther T, Jalbert LR, Alblecht S, Zhong L, Lissens A, Schoonjans L, Moons L, Collen D, Castellino FJ, Carmeliet P: Mice Lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding: *Nature* **390**: 290-294, 1997.
- 5) Stanssens P, Bergum PW, Cansemans Y, Jespers L, Laroche Y, Huang S, Maki S, Messens J, Lauwereys M, Cappello M, Hotez PJ, Lasters I, Vlasuk GP: Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*: *Biochemistry* **93**: 2149-2154, 1996.
- 6) Shivdasani RA, Orkin SH: Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8690-8694, 1995.

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.