平成 13 年度日本血栓止血学会学術奨励賞

ジーンターゲティングを用いた血液凝固制御因子の 生体における機能解明 : マウス antithrombin の 完全欠損による胎児死亡と syndecan-4 欠損による 胎盤迷路層胎児血管の変性

石 黒 和 博^{*1}, 小 嶋 哲 人^{*1*2}, 齋 藤 英 彦^{*1*3}

Functional Analyses of Anticoagulation Factors by Gene Targeting :
Embryonic Lethality due to Antithrombin Deficiency and
Degeneration of Fetal Vessels in the Placental Labyrinth
due to Syndecan-4 Deficiency

Kazuhiro ISHIGURO^{*1}, Tetsuhito KOJIMA^{*1*2}, Hidehiko SAITO^{*1*3}

Key words : ノックアウトマウス, 血液凝固因子, antithrombin, ヘパラン硫酸プロテオグリカン,
syndecan-4

1. ジーンターゲティング

ジーンターゲティングとは、人為的にゲノムの特定の遺伝子を相同組み替えを利用し特定の DNA で置換し、それによりその遺伝子に変異を起こさせることである。一般的にはその遺伝子を不活化することを目的とし、それにより作成されたマウスをノックアウトマウスという。このノックアウトマウスが作成されるより以前では、自然に存在する変異マウスあるいは先天的な疾患を有するヒトを解析することによりその原因遺伝子を突き止めることが行われてきた (forward genetics) が、ノックアウトマウスで

は特定の遺伝子を人為的に欠損させその遺伝子産物欠損による生体の影響 (これを表現型と言う) を評価し、その遺伝子産物の機能を解析する (reverse genetics), ということが行われる。ちなみにトランスジェニックマウスも reverse genetics の一手法として知られているがこれはノックアウトマウスとは逆に特定の遺伝子をマウスにおいて過剰発現させたものである。

ノックアウトマウス作成の方法は既に優れた成書^{1)~3)}が発行されているので詳細はそれらを参考にさせていただきたいが、概略を述べるとまず初めに全ての細胞に分化しうるマウスの embryonic stem 細胞 (いわゆる ES 細胞) に対

^{*1} 名古屋大学医学部病態内科学講座 (分子細胞内科学, 器官制御内科学) [〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65] First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine [65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550]

^{*2} 同 保健学科 [〒461-8673 名古屋市東区太閤南 1-1-20] Department of Medical Technology, Nagoya University School of Health Sciences [1-1-20 Daiko-Minami, Higashi-ku, Nagoya 461-8673]

^{*3} 国立名古屋病院 [〒460-0001 名古屋市中区三の丸 4-1-1] Nagoya National Hospital [4-1-1 Sannomaru, Naka-ku, Nagoya 460-0001]
Tel : 052-744-2151 Fax : 052-744-2157 e-mail : kio@med.nagoya-u.ac.jp

して相同組み換えを利用し特定の遺伝子が欠損するように、通常ではネオマイシン耐性遺伝子⁴⁾がその遺伝子の途中に導入される。これをネオマイシンで選別し、さらにサザンブロッティングなどで期待通りに変異を起こしたES細胞のコロニーを見つけ、別に採取しておいた初期胚に注入する。この胚から発生するマウスはES細胞由来と元の初期胚由来の異なる起源の細胞から構成されキメラマウスと呼ばれ、通常ES細胞が雄であるためES細胞の構成率が高いと雄になりその精子は特定の遺伝子が欠損したES細胞由来のものが多くなる。これを雌と交配すると特定の遺伝子が欠損したマウスが生まれてくるのであるが、この段階では相同染色体の片方の遺伝子が欠損しているにすぎず、ヘテロマウスと呼ばれ、その遺伝子産物の発現量は野生型と比較し半減している。この段階でも何らかの異常をきたす場合もあるが通常はこのヘテロマウスどうしを交配し、相同染色体の両方の遺伝子が欠損したマウスを作成することによりノックアウトマウスができあがる。これをヘテロマウスに対してホモマウスと呼ぶこともある。

われわれはこの手法を用いて antithrombin および膜結合型ヘパリン硫酸プロテオグリカンの一つである syndecan-4 (ryudocan) のノックアウトマウスを作成し、それらの生体における機能を解明した。

2. antithrombin

antithrombin は58キログルトンの一本鎖の糖蛋白であり、主に肝臓で産生される。antithrombin はトリプシン型セリンプロテアーゼを阻害するセルピンの代表的分子であり、トロンピンをはじめ血液凝固第IX, X, XI, XII 因子および血漿カリクレインなど全ての内因系凝固因子セリンプロテアーゼの活性型を阻害する。生理的にはトロンピン、活性型の第IXおよび第X凝固因子など凝固反応の中枢において機能する活性型ビタミンK 依存性凝固因子のイ

ンヒビターとして機能している。

これまで、ヒトではさまざまなTypeの antithrombin 欠乏症、異常症が報告されている⁴⁾。これらは大きく分けて抗原量および阻害活性の両者が同等に低下しているType1と抗原量は正常であるものの阻害活性が低下しているType2に分けられる。そしてType2はプロテアーゼ活性が異常を示すType2 RS (reactive site)、ヘパリン結合能が異常を示すType2 HBS (heparin binding site)、さらに単一の変異が多面的な機能異常を示すType2 PE (pleiotrophic effect) に分けられる。これら antithrombin 欠乏症は、特に下肢深部静脈など静脈系に血栓が生じやすいことが知られている。しかし、antithrombin の完全欠損の論文報告はなく、完全欠損により胎児死亡が起きると考えられている。

3. antithrombin ノックアウトマウス

われわれは antithrombin の胎児発生における機能を解析するため、ジーンターゲットイングの手法を用いて antithrombin 欠損型マウスを作成した⁵⁾。図1Aはジーンターゲットイングのストラテジーである。antithrombin 遺伝子のエクソン2をネオマイシン耐性遺伝子で置換した。antithrombin 欠損型胎児において antithrombin の遺伝子が破壊されたことをゲノムDNAに対するPCRおよびサザンブロッティング(図1B)により確認した。また、RT-PCRで欠損型では antithrombin のmRNAが発現していないことを確認した(図1C)。さらにウェスタンブロッティングによりその蛋白も発現していないことを確認した(図1D)。

表1は antithrombin ヘテロマウス同士の交配により妊娠10.5日から16.5日において得られた胎児および新生児の genotype の分布を示す。妊娠14.5日までは antithrombin 欠損型胎児でもメンデルの法則に従い約25%の割合で得られたが、妊娠15.5日には欠損型のうち約

図 1 A: ジーンターゲティングのストラテジー. antithrombin 遺伝子のエクソン 2 (Ex 2) をネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) で置換した。
 B: ゲノム DNA を *PvuII* で処理して行ったサザンブロッティング。
 C: 胎児全体より抽出した RNA に対して行った RT-PCR。
 D: 胎児の肝臓から抽出した蛋白に対して行ったウェスタンブロッティング。+/+, 野生型胎児; +/-, antithrombin ヘテロ型胎児; -/-, antithrombin 欠損型胎児。

表 1 Antithrombin ヘテロマウス同士の交配による胎児および新生児の Genotype 分布

胎齢	Genotype				全生存胎児数	全生存胎児中の -/- の %
	+/+	+/-	-/-	同定不能 ^A		
新生児	21	54	0	0	75	0
16.5 日	9	20	8 (8) ^B	1	29	0
15.5 日	21	47	17 (12)	2	73	6.8
14.5 日	23 (2)	37	21	3	79	26.6
13.5 日	3	12 (2)	6 (1)	0	18	27.8
12.5 日	6 (1)	12	6	1	23	26.1
11.5 日	9	19 (3)	6	0	31	19.4
10.5 日	9	16	8	1	33	24.2
合計	101 (3)	217 (5)	72 (21)	8	361	

^A胎児が既に吸収されていたため同定不能であった, ^Bカッコ内は死亡していた胎児の数を表す

70%が死亡したため, その率は 25%を大きく下回り, さらに妊娠 16.5 日以後は一匹も生存したものが得られなかった。そして死亡した antithrombin 欠損型胎児は図 2A に示すように全身

性の皮下出血をきたしていた。これら死亡した antithrombin 欠損型胎児を組織学的に検討した結果, 心臓と肝臓に広範なフィブリンの沈着を認めた (図 2B)。心臓では心筋の血管内だけ

図2 A: 死亡していた antithrombin 欠損型胎児の肉眼像, 広範な皮下出血を示す。
 B: 死亡していた antithrombin 欠損型胎児に対するフィブリンの免疫染色像, 心臓および肝臓に沈着したフィブリンが黒く染色されている。
 C: 心筋の拡大像, 血管内だけでなく心筋内の出血部位にもフィブリンが沈着している。
 D: 肝臓の拡大像, 中心静脈ではなく類洞にフィブリンが沈着している, サイズバーは $100\mu\text{m}$ を示す。

でなく出血部位にもフィブリンの沈着を認めた(図2C)。また肝臓では中心静脈にはフィブリンの沈着を認めず類洞に沿ってフィブリンの沈着を認めた(図2D)。なお, 脳, 肺, 腎臓などほかの臓器では明らかなフィブリンの沈着を認めなかった。一方, 妊娠14.5日に生存していた antithrombin 欠損型胎児の組織像を検討した結果, 4匹中1匹の胎児において心筋の一部に同様なフィブリンの沈着を認めた。妊娠15.5日

に生存していた欠損型胎児5例でも, その全例で心筋の一部にフィブリンの沈着を認め, 3例で肝臓の類洞の一部にフィブリンの沈着を認めた。これにより, 心筋と肝臓におけるフィブリンの沈着が単なる死後変化でないことが分かった。さらに, 死亡した antithrombin 欠損型胎児では広範な皮下出血が見られたが, 組織学的に検討した結果, 頭蓋内や腹腔内にも出血が認められた(図3A)。しかし, これらの部位ではフ

図 3 A: 死亡していた antithrombin 欠損型胎児のヘマトキシリン-エオジン染色像。皮下だけでなく頭蓋内にも広範な出血を認める。
B: A の連続切片に対するフィブリンの免疫染色像。明らかなフィブリンの染色を認めない。サイズバーは 100 μ m を示す。

図 4 A: 妊娠 13.5 日の胎児の胎盤に対する syndecan-4 の *in situ* hybridization 像, ヘマトシリンで対比染色。syndecan-4 が茶色に染色されている。矢印は有核赤血球を有する胎児血管を示す。
B: 妊娠 13.5 日の胎児の胎盤に対する syndecan-4 の免疫染色像, ヘマトキシリンで対比染色。syndecan-4 は赤色に染色されている。La, 迷路層; Sp, 海綿状層。サイズバーは 100 μ m を示す。

フィブリンの沈着を免疫染色では認めず (図 3B), antithrombin 欠損型胎児では心筋と肝臓における広範なフィブリン沈着により血液凝固因子が欠乏した状態, いわゆる消費性凝固障害が生じていたことが示唆された。

これまで antithrombin 以外にもプロテイン

C や tissue factor pathway inhibitor (TFPI) のノックアウトマウスが作成され, 胎児期もしくは周産期に致死的になることが示されている⁶⁷⁾。いずれの欠損型胎児でも肝臓にフィブリン沈着が認められる点が共通しているが, antithrombin 欠損型胎児では肝臓の中でも特

図 5 妊娠 17.5 日の胎盤の迷路層に対するヘマトシリン-エオジン染色像 (A: 野生型; B: syndecan-4 欠損型), 沈着したカルシウムを染色するコッサ反応 (C: 野生型; D: syndecan-4 欠損型), フィブリンの免疫染色像 (E: 野生型; F: syndecan-4 欠損型).

に類洞に沈着するのに対しプロテインCやTFPIの欠損型胎児では間質に沈着するとされる以外は詳細な検討がされていない。一方、心筋へのフィブリン沈着は antithrombin 欠損型胎児でのみ認められ, antithrombin が妊娠後半において心筋の抗血液凝固に重要な役割を果たしていることが示唆された。

4. syndecan-4 について

syndecan-4 は小嶋らにより antithrombin 結合分子としてラットの培養微小血管内皮細胞から膜結合型ヘパラン硫酸プロテオグリカンとしてクローニングされ, ryudocan とも呼ばれている⁸⁾⁹⁾。そのヘパラン硫酸鎖には TFPI も結合することから特に微小血管において抗血液凝固に関与し, 血液の流動性を維持している機能が

示唆されていた¹⁰⁾。

実際にマウスの成体の各臓器, 胎児, 胎盤を用いてその発現を検討した結果, 胎盤迷路層の胎児血管 (有核赤血球を有するのが特徴) で強く発現していることが分かった¹¹⁾ (図 4)。syndecan ファミリーの中で syndecan-1 も胎児血管で発現していたが, その程度は syndecan-4 と比べ非常に弱く, syndecan-4 が妊娠初期から後半にいたるまで強い発現を維持しているのに対して, syndecan-1 は妊娠が進むに従ってその程度はさらに弱くなっていった。したがって, syndecan-4 は胎盤迷路層の胎児血管で抗血液凝固に関与していることが考えられたため, syndecan-4 欠損型胎児の胎盤を野生型胎児の胎盤と比較検討した。

5. syndecan-4 ノックアウトマウス (胎盤) について¹¹⁾

syndecan-4 ノックアウトマウスを作成するため, syndecan-4 遺伝子のエクソン 2, 3 および 4 の一部をネオマイシン耐性遺伝子で置換した。syndecan-4 の遺伝子が破壊されたことはサザンブロッティングで確認し, ノーザンブロッティングおよびウェスタンブロッティングにより syndecan-4 が mRNA レベルおよびタンパクレベルで発現していないことを確認した。

胎盤を比較検討するにあたって母体内の環境を同じにするため, C57BL/6J に 6 回戻し交配を行った syndecan-4 ヘテロマウス同士を交配させ, syndecan-4 欠損型胎児と野生型胎児が同時に得られた場合のみを比較の対象とした。なお, ヘテロマウスどうしの交配によって syndecan-4 欠損型, 野生型胎児はほぼ同数得られた。

図 5A, B は妊娠 17.5 日の胎盤のヘマトキシリン-エオジン染色像であるが, 野生型 (図 5A) と比較しより高度な血管変性を syndecan-4 欠損型 (図 5B) で認めた (胎盤迷路層の組織像を検討するにあたって, 正常な血管構築が

消失し, 血球のデブリスと思われる好ヘマトキシリン物質が認められた場合は血管変性と考えた)。変性血管内には有核赤血球を時に認めたため, 胎児由来であることが示唆された。また, 変性血管に沈着するカルシウムを比較検討した結果, 同様に syndecan-4 欠損型でより高度であることが分かった (図 5C, D)。さらにフィブリンの免疫染色を行ったところ, syndecan-4 欠損型でより高度なフィブリンの沈着を変性血管において認めた (図 5E, F)。胎盤迷路層における血管変性, カルシウム沈着, フィブリン沈着の程度をそれぞれ 3 段階もしくは 4 段階に分け, ブラインドでスコアリングした結果, いずれも有意に syndecan-4 欠損型で高度であることがわかった (図 6)。

以上から, syndecan-4 欠損により antithrombin や TFPI の抗血液凝固機能が障害され血管内凝固が生じやすくなり, 胎盤迷路層の胎児血管の変性がより高度になったと考えられた。しかし, 胎児の大きさを妊娠 17.5 日において比較したところ有意差を認めず, syndecan-4 欠損により生ずる胎児血管障害の程度は胎児の子宮内発育を障害するほどではないことがわかった。

syndecan-4 欠損型マウスは出生後も正常に成長し, 妊娠, 出産も可能であったが, ストレスを加えるとさまざまな表現型を示し, syndecan-4 は特定の状況下で抗血液凝固以外にもさまざまな機能を果たしていることが明らかになってきている¹²⁾¹³⁾。

7. まとめ

ジーンターゲットングの手法を用いて antithrombin そして syndecan-4 の遺伝子を破壊し, それぞれのノックアウトマウスを作成することによってそれぞれの分子がなくなった場合に生体が受ける影響を評価できた。その結果, antithrombin 欠損型マウスでは予想通り胎児死亡が起きることがわかった。特に心筋と肝臓に限ってフィブリンが沈着していたのは興味深

図6 妊娠17.5日の胎盤の迷路層に対する血管変性(A), カルシウム沈着(B), フィブリン沈着(C)のスコアリング。スコアリングの詳細は論文¹¹⁾を参照。オープンカラム, 野生型; クローズカラム, syndecan-4欠損型。いずれも syndecan-4欠損型で有意に高度であった(A, $P < 0.005$; B, $P < 0.05$; C, $P < 0.05$: いずれも Mann-Whitney t test で検定)

い事実であった。現在 antithrombin のヘテロマウスを使用してヒトの antithrombin 欠乏症で見られる血栓形成傾向についても検討中である。一方, syndecan-4 欠損型マウスの胎盤では胎児の子宮内発育に影響するほどではなかったが, 野生型と比較し迷路層の胎児血管にフィブリン沈着を伴うより高度な変性が生じた。

謝 辞: 本研究は名古屋大学医学部第一生化学教室などとの共同研究で行われたもので, ここにご指導いただいた村松喬教授, 門松健治助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 相沢信一, ジーンターゲットング. 羊土社, 1995.
- 2) 野田哲生, ジーンターゲットング. メディカルサイエンスインターナショナル, 1995.
- 3) 東京都臨床医学総合研究所 実験動物研究部門 編, マウスラボマニュアル. シュプリンガー・フェアラーク, 1998.
- 4) 辻 肇, 中川雅夫, 先天性アンチトロンビン III 欠乏症/異常症, 血液症候群 III, 日本臨床, 1999.
- 5) Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K, et al.: Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic

- lethality. J Clin Invest **106**: 873-878, 2000.
- 6) Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, et al.: Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. J Clin Invest **102**: 1481-1488, 1998.
- 7) Huang Z-F, Higuchi D, Lasky N, et al.: Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. Blood **90**: 944-951, 1997.
- 8) Kojima T, Shworak NW, Rosenberg RD: Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line. J Biol Chem **267**: 4870-4877, 1992.
- 9) Kojima T, Leone CW, Marchildon GA, et al.: Isolation and characterization of heparan sulfate proteoglycans produced by cloned rat microvascular endothelial cells. J Biol Chem **267**: 4859-4869, 1992.
- 10) Kojima T, Katsumi A, Yamazaki T, et al.: Human ryudocan from endothelium-like cells binds basic fibroblast growth factor, midkine, and tissue factor pathway inhibitor. J Biol Chem **271**: 5914-5920, 1996.
- 11) Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, et al.: Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. Dev Dyn **219**: 539-544, 2000.
- 12) Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, et al.: Syndecan-4 deficiency increases susceptibility to kappa-carrageenan-induced renal damage. Lav Invest **81**: 509-516, 2001.
- 13) Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima K, et al.: Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. J Biol Chem in press.