◆ 総 説 ◆

血液凝固・線溶因子の遺伝子改変動物の現状[‡]

水 口 純*

Targeted Gene Disruption and Modification of Coagulation and Fibrinolysis Factors in Mice

Jun MIZUGUCHI*

Key words: Gene disruption, Knockout mice, coagulation, fibrinolysis

はじめに

1980年代末頃のノックアウト (KO) マウスとその関連技術の登場は、任意の遺伝子をターゲットとして、その特異的な破壊・欠損・置換を可能とした。これにより、自由自在に遺伝子を改変・破壊したモデル動物を作り出す事が可能となった。これらのモデル動物を用いて、今日、発生や分化の過程にある胚・胎仔形成などの病態や、ヒトでの解析が十分でない分子異常症などについての詳細が明らかにされつつある。現在も、KO マウスは質・量ともに凄まじい勢いで作出され続けており、既に単離された遺伝子の10%はKOされているという。さらに近年では、ダブルノックアウトやノックインマウスに加えて、時空間を限定してターゲット遺伝子の発現を制御する、いわゆる、コンディショナル KO マウスの作出や、これらの KO マウスに負荷をかけたり、また救済処置をするなどして、標的遺伝子の生理機能を研究した論

文が、数多く発表されている。

血液凝固・線溶の分野でも、KO マウスに代表される遺伝子改変動物の応用が、1990年代中頃から爆発的に広まった。現在まで、フィブリノーゲン、プロトロンビン、トロンビンレセプター、Tissue Factor (TF)、Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)、セルピン族、V 因子、VII 因子、トロンボモジュリン、プロテイン C とそのレセプター、プラスミノーゲン、tPA、uPA、uPA-receptor、PAI-1、Thrombin-activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) など、凝固と線溶に関与する遺伝子の殆どは改変もしくは破壊されている。これらの中には、発生過程や種々の病態において、凝固・線溶以外の機能を担う因子のある事も明らかにされた。もとより「KO マウスの病態解析=各因子の機能決定」にはならないが、こうした遺伝子に関係した分子異常症や血栓症、血管病などの一層の理解に役立つ事は疑いないであろう。1997 年より本誌のトピックス欄で、これらの KO

* (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, KAKETSUKEN [1-6-1, Okubo, KUMAMOTO, 860-8568, Japan]

Tel: 096-344-2183 Fax: 096-344-9234

[‡] 本総説は、第 25 回日本血栓止血学会のコンセンサスシンポジウム血管バイオロジーで行った講演に加筆修正したものです。オーガナイザー・座長をして戴いた、宮崎医大の浅田祐士郎先生、理化学研究所の小嶋聡一先生に御礼申し上げます。

表 1 日本血栓止血学会誌に紹介された KO マウス

標的	略号	年	巻	頁	文献
組織因子	TF	1997	8	153	1
フィブリノーゲン	fbg	1997	8	156	2
トロンボモジュリン	TM	1997	8	218	3
V 因子	V	1997	8	222	4
Plasminogen Activator Inhibitor-1	PAI-1	1997	8	406	5
プラスミノーゲン	plg	1997	8	410	6
VIII 因子	VIII	1997	8	517	7
トロンビンレセプター	PAR1	1997	8	521	8
α_2 -マクログロブリン	α_2 MG	1998	9	78	9
Tissue Factor Pathway Inhibitor	TFPI	1998	9	81	10
VII 因子	VII	1998	9	141	11
プラスミノーゲン/プラスミン系因子	plg/plm	1998	9	146	12
Lipoprotein Receptor-related Protein	LRP	1998	9	205	13
XI 因子および IX 因子	XI, IX	1998	9	215	14
ビトロネクチン	VN	1998	9	382	15
フィブロネクチン	FN	1998	9	467	16
プロトロンビン	PT	1998	9	471	17
フォンビルブランド因子	vWF	1999	10	212	18
プロテイン C	PC	1999	10	219	19
Thrombospondin-1 および -2	TSP1	1999	10	320	20
TFPI と VII の二重 KO マウス		1999	10	474	21
X 因子	X	2000	11	304	22
プロテイン Z	PZ	2000	11	572	23
VII とプロテイン C の二重 KO マウス		2000	11	578	24
vWF とフィブリノーゲンの二重 KO マウス		2001	12	78	25
β_2 -glycoprotein 1	β_2 -GPI	2001	12	509	26
Growth arrest-specific gene 6	Gas 6	2001	12	514	27
プロテアーゼネキシン 1	PN-1	2001	12	522	28
ヘパラン硫酸スルホトランスフェラーゼ		2002	13	80	29
Thrombin-activatable Fibrinolysis Inhibitor	TAFI	2002	13	343	30
Endothelial Protein C Receptor	EPCR	2002	13	504	69
プロテアーゼ活性化受容体	PARs	2002	13	311	37
ノックインマウスの作製		2002	13	334	38
血管内皮細胞の ATP, ADP 分解酵素	CD39	2000	11	173	39
α_2 -Antiplasmin		1999	10	315	40
Antithrombin および Syndecan-4		2002	13	9	41

マウスを紹介するシリーズが始まった。このシリーズも今年で足掛け 6 年を迎え、その間に紹介された KO マウスは 30 種を超える。

本稿では、これらを纏めるとともに、その中から、特に興味深いもの、意外な結果が得られたもの、これまでの知見をより深めたものなど、幾つかの例を挙げて紹介したい。なお、紙面の都合上、全ての KO マウスを網羅する事はできないので、各 KO マウスについては過去の本誌のトピックス欄を参照して戴きたい

(表 1)^{1)~30)}。

なお、血液凝固関連の KO マウスについては、Carmeliet, Degen, Lord, Preissner らによるレビューがあり、それぞれ血管構築と線溶系、フィブリノーゲン、機能別、レセプター別などの切り口で纏められている^{31)~34)}。また、マウスの止血全般に関するレビューおよび、主な凝固・線溶因子の各胎齢期における発現に関するレビュー³⁵⁾³⁶⁾もある。さらに、実際に KO マウスを作製し、本誌に報告されている実験

例^{37)~41)}も参照されたい。

血液凝固カスケードと KO マウス

血液凝固という概念は、生体の機能的分類法におけるカテゴリーのひとつであるが、その特徴を示しているものに「カスケード (理論)」がある。歴史的には内因系の解析から始まり、外因系、プロテイン C 系、Protease Activated Receptors 系などが加わり、最近では、 α -トロンビンによる XI のフィードバック的な活性化の他、TAFI、プロテイン Z-セルピン系などが新たに提唱され、論議を呼んでいる。これに加え、各種インヒビターや線溶系、キニン系、補体系なども密接にリンクしている。現時点で、凝固カスケードを構成する殆どの諸因子について、既に KO マウスが作出されているので、図 1 にこの凝固カスケードに沿ってそれらの KO マウスの性状を簡単に纏めた。

外因系凝固のトリガーである TF とそのインヒビターの TFPI の KO マウスは、発生過程で主に血管形成不全により、その殆どが死亡するが、TF のリガンドである VII 因子の KO マウスの発生過程は正常である^{1)10)11)42)~47)}。興味深いことに、カスケード上これらの下流に位置する X 因子、V 因子、プロトロンビンの KO マウスは、約 50% の胎性致死を示し*脚注¹⁾、主な原因はやはり血管形成不全といわれる^{4)17)22)48)~51)}。一方、IX 因子や VIII 因子を介した経路は血友病からも解るように、KO マウスでも胎性致死は殆ど見られない^{7)14)52)~55)}。つまり、外因系の開始因子に位置付けられている VII 因子、および内因系を構成する諸因子を欠損させても胎発生は正常である。しかし、これらの合流点に位置する X 因子以降の欠損は約 50% の胎性致死を示す。こうした実験結果を説明するために、次の 2 つの仮説が考えられた¹¹⁾⁴⁶⁾。① TF には VII 因子以外のリガンドが存在し、VII 因子を介さないで X 因子を活性

化する第 3 の経路の存在、②凝固活性や ELISA など、通常の測定法では検出できない極微量の VII 因子が存在すれば、胎発生に必要なシグナルを生み出す事が可能、という考えであり、この問題については後で触れる。

さて、プロトロンビンの KO マウスは 70~90% の胎性致死を示すが、その基質であるフィブリノーゲンの KO マウスの胎発生は正常である²⁾⁵⁶⁾。では、X 因子や、V 因子、プロトロンビンの KO マウスに見られる致死性はどこに帰納されるであろうか。 α -トロンビンは凝固カスケードの中で最も多機能な酵素の 1 つであり、基質としてフィブリノーゲンの他にトロンビンレセプターを活性化し、血小板を凝集する。トロンビンレセプターの PAR 1 をノックアウトしたマウスは、X 因子、V 因子、プロトロンビンの KO マウスと同様、主に血管形成不全で約 50% の胎性致死を示すので、原因の 1 つはここに帰着されると考えられる³⁷⁾⁸⁾⁵⁷⁾。この PAR 1 の KO マウスの肺より調製した繊維芽細胞は、当然の事ながら、 α -トロンビンに反応しないが、驚くことに同じマウスの血小板は α -トロンビンで凝集する。これが契機となって第二のトロンビンレセプターである PAR 3 が発見され、更にこれを KO させることにより PAR 4 の発見へと繋がった^{37)58)~60)}。また、凝固因子の中には、血漿中のみならず血小板にも存在するものが幾つか知られているが、von Willebrand Factor (vWF) や、Thrombospondin-1 (TSP1)、Vitronectin (VN)、XIIIa 因子、Fibronectin (FN) もそれらの 1 つである。FN を除くこれら 4 つの因子をそれぞれ KO しても胎発生は正常だが^{8)18)20)15)61)~65)}、FN の KO マウスは 100% 胎性致死であるという^{16)66)~68)}。

また、 α -トロンビンは、フィブリノーゲンや PAR family の他にも、血管内皮細胞上に

¹ プロトロンビンの KO マウスの胎性致死率は 70~90%。

発現するトロンボモジュリン系を介してプロテインCを活性化し、活性型プロテインCは補酵素であるプロテインSやプロテインCインヒビターで制御を受けながら、活性型VIIIa因子やVa因子を不活化する。これらプロテインCを中心とした凝固制御系のKOマウスについても広く調べられており、トロンボモジュリンやEndothelial Protein C Receptor (EPCR) のKOマウスは完全な胎性致死を^{3)69)70)~75)}、また、プロテインCのKOマウスは胎齢末期に70%以上の致死性を示す¹⁹⁾⁷⁶⁾。一方、プロテインCの基質であるV因子の分子異常にV因子Leidenがあり、ヒトでは血栓傾向を示すが、V因子Leidenマウスは、凝固亢進状態となるものの、その程度はマウスの系統に強く依存するという⁷⁷⁾。さらに、発見後、長らく機能が不明であったプロテインZについても、これだけをKOしても症状は出ないが、Leidenマウスと掛合わせると、その凝固亢進状態を著しく悪化させる。このようにKOマウステクノロジーはプロテインZの機能解明にも役立っている²³⁾⁷⁸⁾。また、線溶系を構成する殆どの諸因子やインヒビターについても、多くのKOマウスが作製・解析されている⁵⁾⁶⁾⁹⁾¹²⁾³⁰⁾。凝固カスケードに沿って、各因子のKOマウスを胎性致死率と、その原因や時期から眺めて見ると、凝固因子の主な機能が、誕生後、止血にあるのは間違いないものの、幾つかの因子は、胎発生過程においてそれ以外の役割を担っている可能性が考えられよう。

胎齢と致死性

凝固系を構成する幾つかの因子のKOマウスは胎性致死を示したが、それらについて発生過程のどの時点で起きるかを簡単に纏めた(図2)。TFのKOマウスは、胎齢9.5~10.5日の間に血管形成不全で殆ど死亡する^{1)42)~44)}。そのリガンドのVII因子のKOマウスの胎発生は正常だが、7割の新生仔は分娩時に出血で死亡

し、残りの新生仔も24日齢以内に出血死する¹¹⁾⁴⁶⁾。V因子のKOマウスは胎齢11.5~18.5日の間にやはり血管形成不全で約半数が死亡し、残りの個体も出生後、2時間以内に出血で全滅する⁴⁾⁴⁸⁾。プロトロンビンとトロンビンレセプターのKOマウスも、TFとほぼ同様な胎齢期に死亡するものの、一部は正常に発生し出生する⁸⁾¹⁷⁾³⁷⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾⁵⁷⁾。プロトロンビンのKOマウス新生仔は、出生後24時間以内に殆どが出血で死亡する(strainによる違いあり)という。なお、胎児期に致死を免れたPAR1のKOマウスの出生後の状況は不明である。一方、100%の胎性致死を示す因子には、フィブロンネクチン^{16)66)~68)}、EPCR^{69)73)~75)}、トロンボモジュリン^{3)70)~72)}などがあり、トロンボモジュリンの場合、胎齢8.5~9.5日の間に発育不全で100%死亡する。

以上の如く、主に血管形成不全による胎性致死を示すKOマウスを、胎発生時間軸で眺めて見ると、時期的にはほぼ一致するもの、ずれているものなどがある。また、凝固制御に関与するTFPI¹⁰⁾⁴⁵⁾、プロテインC¹⁹⁾⁷⁶⁾、AT-III⁴¹⁾、HC-II⁸¹⁾、plasmin系⁶⁾¹²⁾のKOマウスの胎発生期における死因や致死時期、致死率は千差万別である。

KOマウスの問題点と次世代のKOマウス

これまで述べてきた様に、KOマウス作出の手法は、研究者が目的とする任意の遺伝子の特異的に破壊する事により、その機能を成体期のみならず、発生過程にまで遡り、詳しく調べる事ができる点で画期的であった。しかし、さまざまなKOマウスが作出されるにともなって、次のような問題点が新たに浮上した。

① **胎齢期における致死性**: 胎仔が全部死亡してしまうと、それ以降の解析はできない。

② **系統差**: TFのKOマウスは系統によって致死率が10倍以上違う⁸²⁾。また、V因子Leidenマウスの血栓症状も系統によって著し

図1 血液凝固カスケードとKOマウス
マウスのカラーリングは、発生過程における各KOマウスのおおよその致死率を示す、緑は正常な胚発生を、黄色は約50%の致死率、オレンジは50~100%の致死率、赤は完全な致死をそれぞれ示す。

図2 マウスの発生過程と各因子をKOしたマウスの致死時期
上図はマウスの発生過程を表したもので、横軸の数字は胎齢を示す。拡大倍率的に、①受精から着床、②胎盤形成、③臓器形成、④胎仔成熟~出生までの4段階に分類されている。下図は、各KOマウスが致死となる期間を色分けして示す。緑は正常な発生、黄色は約50%の致死率、オレンジは50~100%の致死率、赤は完全な致死をそれぞれ示す。

図4 VIIとTFの立体構造とKOマウス
図中央はVIIとTF複合体の立体構造、グレーがVII、ブルーがTFを示す。X線構造解析より、直接相互作用しているアミノ酸残基の数は、VII側が25個、TF側が27個、それらの総接触面積は約1800 Å²、この広範囲な結合が解離定数を小さくする要素と考えられる。

図5 各種ヒト TF 誘導体の低レベル発現による, TF-KO マウスの致死性の回避 (本文参照)

mTF, hTF, Δ cyto, KD20-D44-F144 は, マウス TF, ヒト TF 野生型, 細胞内ドメインを欠除したヒト TF, 細胞外に存在する VII との結合部位 3 ヶ所を特異的に Ala に置換したヒト TF をそれぞれ示す。

図6 プロトロンビンと関連因子の KO マウス (本文参照)

マウスのカラーリングは, 発生過程における各 KO マウスのおおよその致死率を示す, 緑は正常な胚発生を, 黄色は約 50% の致死率, オレンジは 50~100% の致死率, 赤は完全な致死をそれぞれ示す。

図7 フィブリノーゲンの構造と $\Delta\gamma 5$ マウスのデザイン

青は α 鎖, 緑は β 鎖, 赤は γ 鎖を示す。血中のフィブリノーゲン分子の内, 10% はその半分子 (heterozygous) の γ 鎖のカルボキシル末端が Alternative splicing により 21 残基変化した γ' 鎖を含む。

い差がある⁷⁷⁾。この系統差の問題は、現状では解決しようもなく、いろいろな総説にもその原因は不明とされている^{31)~34)}。

③ **マウスとヒトとの種差**: ヒトの PAI-1 欠損患者は出血傾向を示すが、KO マウスではその様な症状は見られない⁵⁾⁸³⁾⁸⁴⁾。α₂-マクログロブリン (α₂MG) の KO マウスは、エンドトキシンショックに対する抵抗性が増加した以外、見かけは正常であるが、ヒトでの α₂MG の欠損は致死性と推測されている⁹⁾⁸⁵⁾。また、PAR family の分類と機能もマウスとヒトでは異なる³⁷⁾。更に、Protein C Inhibitor (PCI) の KO マウスは不妊であるが⁸⁶⁾、PCI の組織発現分布は、マウスが生殖系のみであるの対し、ヒトは全身レベルである。従って、マウスの結果をそのままヒトに応用できない。

④ **代償機能**: ある標的遺伝子を KO しても、生体は何らかの代替機能を持っていた場合、期待した結果が得られない事がある。ただ、トロンビンレセプターの場合、この代償機能を1つ1つ潰す事で一連のファミリーの発見に至っている⁸⁾³⁷⁾。

⑤ **母体からの移行**: 極めて微量で機能する因子については、母体からの移行をどこまで否定できるか、という点も今後の課題であろう。

このような問題点を解決するために、例えば、図3の様な工夫がなされている。

① **多重破壊マウス**: 標的とする遺伝子を複数同時に破壊したもので、凝固・線溶の分野では、プラスミノゲンとフィブリノーゲンの二重欠損を始めとして^{6)87)~89)}、VII因子とTFPI²¹⁾⁴⁷⁾、プロテインCとXI⁹⁰⁾、VII因子とプロテインC⁹¹⁾など、多数のものが作られている。

② **改変マウス**: 標的分子の全体を破壊せず、特定のドメインやアミノ酸残基を欠失させたり、置換させる手法で、本分野では、トロンボモジュリンの細胞内ドメインを特異的に欠失させたものや⁷²⁾、フィブリノーゲンのγ鎖のカルボキシル末端の5つのアミノ酸残基のみを欠

失させたマウス⁹²⁾、504番目のArg (ヒトでは506番目) をGlnに変位させたV因子Leidenマウス⁷⁷⁾などが知られている。

③ **Knock-in マウス**: ②に述べた改変マウスもKnock-in マウスの一種だが、ここでのいうのは、本来存在する標的遺伝子をLacZやGFPなどのレポーター遺伝子と入れ替えたマウスの事で、これにより胎発生過程における標的遺伝子の発現時期や場所を調べる事が可能となる (遺伝子発現制御領域の *in vivo* 解析)。

④ **Conditional KO マウス**: 標的とする遺伝子をマウスの全生涯、全臓器において破壊する手法をGlobal KOと称するが、これに対し、標的遺伝子の発現時期や発現組織を特異的に制御する手法で、PAR1やトロンボモジュリン、フィブロネクチンなどについて、血管内皮細胞特異的な発現の制御が行われている^{93)~95)}。

⑤ **トランスジェニックレスキュー**: (胎性) 致死を示すKOマウスに、少量の野生型または改変体を発現させ、致死を回避する事により、死因を分析するもので、TFやプロトロンビンについて行われている^{96)~98)}。

⑥ **これらの手法の組合せ**: V因子LeidenマウスとプロテインZのKOマウスの掛け合わせなどがある⁷⁸⁾。

① 多重破壊	Plg ^{-/-} /Fbg ^{-/-} , VII ^{-/-} /TFPI ^{-/-} , PC ^{-/-} /XI ^{-/-}
② 改変	TM ^{Δcyto/Δcyto} , Fbg ^{γΔ5/γΔ5} , V ^{Leiden/Leiden}
③ Knock in	Promoter ^{VWF} -Lac Z
④ Conditional	PAR1, TM, FN: 血管内皮細胞特異的な発現
⑤ Transgenic Rescue	mTF ^{-/-} +human TF ^{Δcyto}
⑥ Combination	Protein Z ^{-/-} /V ^{Leiden/Leiden}

図3 次世代のKOマウスの種類 (本文参照)

Transgenic Rescue ; 胎性致死を示すTFのKOマウスに、ヒトTFの改変体 (細胞内ドメインを欠除した分子) を発現させて、胎性致死回避を試みる手段。

以上の如く, KO マウスには致死性のみならず, 系統差や種差, 代替性, 母体から移行など, 幾つかの限界やその結果を解釈する上での問題点がある. これを解決するため, 現在, さまざまな次世代の KO マウス技術や transgenic rescue による改良実験が盛んに行われており, 今後の発展が期待される.

VII 因子と TF の KO マウス

先に述べたように, TF の KO マウスは血管構築不全を起こし, 殆どが発生過程で死亡するのに比べ, そのリガンドである VII 因子の KO マウスの発生過程は正常であると報告された¹¹⁾⁴⁶⁾. 以下, この現象について現在までどのような仕事が行なわれたかを簡単に触れたい (図 4).

活性化 VII (VIIa) 因子はセリンプロテアーゼで, その天然基質は IX 因子と X 因子であるが, 最近では PAR も候補に挙げられている. VIIa 単独でのプロテアーゼ活性は極めて微弱で, TF との結合により著しく増強される. 一方, 膜蛋白質である TF は VIIa の補酵素であり, VII/VIIa と広範囲で接触する事により強固に結合する (K_d : pM~nM オーダー). VII 因子の KO マウスは, 1997 年, Carmeliet-Castellino らのグループによって¹¹⁾⁴⁶⁾, TF の KO マウスは, 1996 年, 3 カ所のグループからほぼ同時に報告された^{1)42)~44)}. VII 因子の KO マウスは, 胎発生は正常だが, 出生後出血で全滅する. 一方, TF の KO マウスは, 胎齢 9.5~10.5 日に血管の未分化による循環不全で死亡するが, これは TF の欠損により, 血管平滑筋層を形成すると考えられている間葉系細胞の総数が低下し, 本来作られるべき大きな卵黄血管の形成ができず, 代わりに異常な毛細血管叢が形成されてしまう事によるもので, 内皮や造血系の細胞は正常といわれている. この 2 つの KO マウスの結果から, 次の様な問題が提起された. すなわち, ① TF には VII 因子以

外のリガンドがあるのか? ② TF の構造で, どの部分が発生過程に重要であるのか?

先ず, 胎性致死を示す TF の KO マウスに, ヒト由来の TF およびその様々な誘導体を transgenic 的に低レベル発現させ, その致死性を回避する試みが, Mackman らによって行われた (図 5)⁹⁶⁾⁹⁹⁾. その結果, ① ヒト由来の野生型 TF を低レベル発現させると, 致死性は回避される. ② 細胞内ドメインを欠損したヒト TF を発現させても, 致死性は回避される. しかし, ③ VII 因子との結合に重要な 3 カ所のアミノ酸残基のみを特異的に Ala に変えたヒト TF 変異体を発現させると, 致死性は回避されない. 従って, TF の細胞内ドメインよりも細胞外の VII 因子との結合が重要であり, 次の様に推測された. すなわち, VII 因子の KO マウスの発生過程は正常であるものの, TF の KO マウスが致死であるという事は, TF に VII 因子以外のリガンドが存在する可能性が示唆される. しかし, TF の細胞内ドメインを欠損させてもマウスは正常に発生するので, TF に起因する細胞内へのシグナリングは無視できる. 従って, 別のリガンドの TF 結合依存的な活性が重要であるという考えが成り立つ. しかし, VII 因子との結合部位のみを特異的に改変した TF を導入したマウスが致死という事は, VII 因子と TF の特異的な結合が発生に極めて重要である事を示唆し, 新規リガンド存在説と一致し難いものがある. これを説明する考え方の 1 つとして, 凝固活性や ELISA など通常の測定法では検出できない極めて微量な VII 因子があれば胎発生は可能であり, それは母体に由来するというものである.

この点を明らかにするために, Castellino らのグループは doxycycline による遺伝子発現阻害システム^{*脚注2)}を活用した. すなわち, 母マウスの VII 因子の発現量を極めて低下させた状態での, VII 因子 KO マウスの発生過程を

調べた。その結果、母体からの移行を限りなく低くした VII 因子の KO マウスは胎性致死であり、その時期も症状も TF の KO マウスと極めて類似する事が明らかとなった¹⁰⁰⁾。まとめると、VII 因子を単純に KO しても、その胎児期における機能判断は難しい。VII 因子が極微量でも母体から胎仔へ移行すると、見かけは正常になってしまからである。このように（胎仔期に）極めて微量で作用する因子については、単純な KO マウスの作製だけでは、その機能評価はかなり困難といえる。

プロトロンビン関連の KO マウス

プロトロンビンは、凝固カスケードの中で最も多機能な酵素前駆体の 1 つであり（図 6）、その活性型 α -トロンビンの基質、補酵素には、①フィブリノーゲンや XIII 因子、② PAR family、③ トロンボモジュリン-EPCR 系を介したプロテイン C、④ TAFI などがある。このうちフィブリノーゲンはクロットの本体であるゲル化物質として、XIII 因子はフィブリンのクロスリンカーとして、PAR family はさまざまな細胞応答時のレセプターとして、トロンボモジュリンは α -トロンビンの特異性をフィブリノーゲンからプロテイン C に変えるモジュレーターとして、プロテイン C は V 因子や VIII 因子分解し、過凝固反応を調節するレギュレーターとして、TAFI はフィブリンのプラスミノゲン結合部位を削る事によって、抗線溶作用を示すインヒビターとして、それぞれ作用する（TAFI は Thrombin-activatable Fibrinolysis Inhibitor の略で、発見の経緯からこのように名付けられたが、実体はカルボキシペプチダーゼ B（メタロプロテアーゼの 1 種）と同一酵素である³⁰⁾）。それぞれの KO マウス

の発生過程は、プロトロンビンが 70~90% 致死、フィブリノーゲンは正常、PAR 1 は 50% 致死、トロンボモジュリンは発育不全で 100% 致死、プロテイン C は胎齢後期に DIC 様症状で 70% 致死、TAFI は正常というように、それぞれの致死率・死因は相互に異なる。

フィブリノーゲンの KO マウスの発生過程が正常であるのに加え、ヒトでのフィブリノーゲン欠損患者が生存する事、また、さまざまな種類の機能異常血小板を持つ患者や KO マウスが生存し、かつそれらの発生過程も正常な事³⁵⁾、血友病の患者や VIII 因子 KO マウスも発生過程は正常である事^{71)4)52)~55)} などから、発生過程のみに限れば、フィブリノーゲンや血小板の凝固機能は不要ともいえる。胎仔（期）は母体の中で羊水に浮かんだ状態にあるため、出血の危険性が少なく、凝固機能は不要なのかも知れない*脚注³⁾。しかし、凝固反応は出生直後から必須であり、出生直前にカスケードを構成する諸因子が準備されてないと、出生後に出血~出血死に至る。この事は血友病や種々の KO マウスの例からも明らかである。このため、胎齢後期~出生直前にはこれらの凝固因子の血中濃度は「ready to go」の状態まで達しており、それと同時に、これらを制御する TFPI や AT-III などのインヒビターやプロテイン C についても同様でなければならない。事実、これらの制御系の KO マウスは、胎齢後期に過凝固状態（DIC 様症状）により、著しく生存率が低下する¹⁰⁾¹⁹⁾⁴¹⁾⁴⁵⁾⁷⁶⁾。

一方、PAR family については、石原の報告に詳しい^{34)57)~60)}。まさに KO マウステクノロジーによって、PAR ワールドが開拓されたといえる。トロンボモジュリンに関しては、当

² Tetracycline-controlled transactivator (tTA) 制御下の conditional VII KO mice を使った実験。飲料水に doxycycline (tetracycline の誘導体で血液脳関門を通過しやすい物質) を混合し、VII^{tTA/-} マウスに飲水させると、tTA に doxycycline が特異的に作用し、VII の発現が停止あるいは著しく低下する。

³ これに対し、母体側は妊娠すると、幾つかの凝固因子の濃度が急激に増加する。

初、その致死性より解析が困難であったが、現在、Conditional KO mice を用いた解析が行われつつある^{3)70)~72)93)}。EPCR については、最近報告が出たばかりで、今後の解析が期待される^{69)73)~75)}。プロテイン C の機能については、抗凝固という概念で理解できそうであるが¹⁹⁾⁷⁶⁾、AT-III⁴¹⁾やヘパリンコファクター II⁸¹⁾、更には線溶系⁶⁾¹²⁾との関連を考えると、胎性致死率やその時期の違いは興味深い。

フィブリノーゲン関連の KO マウス

フィブリノーゲンの KO マウスは、当初、3 本鎖の内の α 鎖を破壊する事によって作出された²⁾⁵⁶⁾。 α 鎖の欠損が原因となるフィブリノーゲンの細胞内アセンブリー異常と、それに伴う細胞外への分泌異常は、*in vitro* では予想されていたが¹⁰¹⁾、*in vivo* でもそれが証明された。また、 β と γ 鎖の mRNA の発現は正常だった事より、フィブリノーゲン遺伝子の発現は、血中のフィブリノーゲンや FDP 濃度によって左右されない事も判明した。つまり、血中 FDP 濃度が増加すると、それが刺激というかポジティブフィードバックして、肝細胞でのフィブリノーゲンの生合成が促進される事はないといえる。この KO マウスは、凝固能は無く、クロットしないにもかかわらず発生は正常である。しかし、KO マウス同士の妊娠は、母体側に致死性の子宮内出血を生じる。

次に、フィブリノーゲンと血小板の膜蛋白質間の相互作用領域をノックアウト技術を用いて

調べた実験例を述べる。フィブリノーゲンの重要な機能の 1 つである、血小板との相互作用部位は、 α 鎖に 2 ヲ所ある「RGD」配列と、「 γ 鎖のカルボキシル末端の 12 残基」という 2 つが知られている¹⁰²⁾¹⁰³⁾。その後、フィブリノーゲンには、alternative splicing による γ' 鎖という分子種が（ヘテロ分子）約 10%存在する事がわかった¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾。この γ' は、カルボキシル末端の 4 つのアミノ酸残基が 21 個のアミノ酸残基に置換されたものである（図 7）。これを組換え体（ホモ分子）として作製し、血小板凝集に対する影響を調べたところ（同時に RGD を RGE に変えた改変体も作製して比較）、フィブリノーゲンの場合、血小板凝集で見える限り、RGD よりもむしろ γ 鎖の末端構造が重要であるという¹⁰⁶⁾。しかし、「RGD」はあまりにも有名な接着モチーフなので、*in vivo* では違う結果が得られるかも知れないという懸念があり、これを調べる為に、フィブリノーゲンの γ 鎖のカルボキシル末端の 5 残基を欠損させたマウスが作出された⁹²⁾。このマウスの血小板数等の hematological profile や、血中 fbg 濃度、クロスリンク、血液凝固能（PT:13 sec）、および妊娠などは正常だが、出血時間の延長（5 → 25 min）や、血小板凝集能の欠除（ADP, Collagen）、 α IIb β 3 との結合力の低下が見られるという（表 2）。従って、フィブリノーゲンの場合、血小板凝集に関与する領域は、RGD よりもむしろ γ 鎖の末端構造が重要という事が *in vivo* でも確められた。

最後にフィブリノーゲンと同時に他の因子を

表 2 フィブリノーゲンおよび関連因子の KO マウス

	発生・出産	凝固系	成長	寿命	創傷治癒	妊娠
Fibrinogen	正常	出血症	正常	正常	正常	致死
$\gamma\Delta 5$ -fibrinogen	正常	出血症	正常	正常	正常	正常
Plasminogen	正常	血栓症	遅延	短縮	遅延	—
Fbg/plg	正常	出血症	正常	正常	正常	致死
vWF	正常	出血症	正常	正常	正常	正常
Fbg/vWF	正常	出血症	2 割死亡	正常	正常	?

KOした、多重破壊マウスについて簡単に紹介したい。現在のところ、フィブリノーゲンとvWFのダブルKOマウス、フィブリノーゲンとプラスミノーゲンのダブルKOマウスが作出、解析されている。vWFはフィブリノーゲンと並んで、血小板の粘着・凝集に関与する分子であるが、そのKOマウスの症状はヒトでの欠損患者とほぼ同じである¹⁸⁾⁶¹⁾。そこで、Niらは、これら血小板に対する2つの主要なリガンドを同時に欠損させたマウスについて調べた。その結果、両者を同時に欠損させたダブルKOマウスは、新生仔の23%が離乳前に出血で死亡するが、ここを生き延びたマウスはそれ以降、貧血も無く、血小板数も正常であった。また、血小板の粘着凝集は、時間はかかるものの観察されるという²⁵⁾¹⁰⁷⁾。これに対し、血小板上でのこれらの分子に共通のレセプターと考えられているインテグリン $\beta 3$ のKOマウスは、粘着は見られるが凝集しない¹⁰⁸⁾。これらの事より、フィブリノーゲンとvWF以外のリガンドは何か、という疑問が新たに提起されている。1つの候補としてフィブロネクチンが挙げられているが、その欠失は初期段階で致死であるため、global KOマウスの手法では解析できず、conditional KOマウスでの解析が期待されるところである¹⁶⁾⁶⁶⁾⁹⁵⁾。

フィブリノーゲンとプラスミノーゲンのダブルKOマウスについてであるが⁶⁾⁸⁹⁾、プラスミノーゲン単独KOマウスは次のような表現型を示す。①胎仔は正常に発育する。②出生後重篤な血栓症を起こし、③生誕後、2カ月を経過すると成長が遅延し、体重は野生型の2/3以下である。③血栓による多臓器不全様症状を示し、野生型に比べて寿命が約1/4に低下する(700→176日)。④創傷治癒の遅延が見られる。このように、正常マウスからプラスミノーゲンを欠損させると、出生後の凝固系・成長・寿命などに異常が現れる。プラスミノーゲンのKOマウスからフィブリノーゲンを更にKOす

ると、プラスミノーゲンのKOマウスで見られた諸症状は殆ど緩和されるが、野生型に戻るわけではなく、表現型としてはフィブリノーゲンのKOマウスと同じになるという。

以上をまとめると、フィブリノーゲンのKOマウスの実験結果から、従来*in vitro*で推測されていた種々の現象が*in vivo*でも確認された。ただ、妊娠が母体にとって致死であるのはヒトと異なる¹⁰⁹⁾。 $\gamma\Delta 5$ フィブリノーゲンマウスの結果から、血小板との相互作用はRGDモチーフよりも γ 鎖のカルボキシル末端領域が担っている。フィブリノーゲンとvWFのダブルKOマウスでも血小板粘着が起きる事より($\beta 3$ KOマウスは起きない)、これら以外のリガンドの存在が推定される。フィブリノーゲンとプラスミノーゲンのダブルKOマウスのフェノタイプは、フィブリノーゲンのKOマウスとほぼ同じであるので、無負荷時の生体におけるプラスミンの主な基質はフィブリノーゲンといえそうである。

謝 辞:日本血栓止血学会誌にトピックスを執筆して下さった、化血研スタッフの、中垣智弘、亀井慎太郎、牟田健吾、濱本高義、嘉悦洋、野村浩一郎、羽室強、上村・長松晃一郎、神窪勇一、友清和彦、副島見事、中原洋、中富靖、平上睦、手嶋かおり、矢野寿、下瀬克郎、荒木辰也、下田純一、湯口正人、小林英哲、中島輝久、中武博(執筆順)の皆様に深謝致します。また、6年以上にわたり、御指導、御校閲を戴きました岩永貞昭先生(九州大学名誉教授、化血研顧問)に深謝いたします。

文 献

- 1) 中垣智弘, 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.
- 2) 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.
- 3) 亀井慎太郎, 水口純, 岩永貞昭: トロンボモジュリンの欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 8: 218-221, 1997.
- 4) 牟田健吾, 水口純, 岩永貞昭: 血液凝固 V 因子の欠損マウス.

- ス. 日本血栓止血学会誌 **8**: 222-225, 1997.
- 5) 濱本高義, 岩永貞昭: PAI-1 の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **8**: 406-409, 1997.
- 6) 嘉悦洋, 水口純: プラズミノーゲンの欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **8**: 410-413, 1997.
- 7) 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.
- 8) 羽室強, 水口純, 中垣智弘: トロンビンレセプター欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **8**: 521-523, 1997.
- 9) 上村晃一郎, 水口純, 中垣智弘: α_2 -マクログロブリンの欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **9**: 78-80, 1998.
- 10) 神窪勇一: TFPI の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **9**: 81-85, 1998.
- 11) 友清和彦, 副島見事, 水口純: 血液凝固 VII 因子の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **9**: 141-145, 1998.
- 12) 嘉悦洋, 水口純: プラズミノーゲン/プラスミン系因子の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **9**: 146-152, 1998.
- 13) 中原洋, 神窪勇一: LRP の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **9**: 205-214, 1998.
- 14) 友清和彦, 水口純: 血液凝固 XI 因子および IX 因子の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **9**: 215-219, 1998.
- 15) 中富靖, 友清和彦, 水口純: ビトロネクチンの欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **9**: 382-386, 1998.
- 16) 平上睦, 中富靖, 水口純: フィブロネクチンの欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **9**: 467-470, 1998.
- 17) 手嶋かおり, 中垣智弘: プロトロンビンの欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **9**: 471-474, 1998.
- 18) 矢野寿, 友清和彦, 水口純: フォンビルブランド因子の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **10**: 212-218, 1999.
- 19) 下瀬克郎, 濱本高義, 水口純: プロテイン C の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **10**: 219-222, 1999.
- 20) 上村晃一郎, 嘉悦洋, 水口純: TSP-1 および-2 の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **10**: 320-324, 1999.
- 21) 荒木辰也, 濱本高義, 水口純: TFPI と VII の二重欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **10**: 474-478, 1999.
- 22) 中富靖, 友清和彦: 血液凝固 X 因子の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **11**: 304-309, 2000.
- 23) 下田純一, 水口純, 濱本高義: プロテイン Z の欠損マウスおよび新しい PZ 依存性セルピンの特性. 日本血栓止血学会誌 **11**: 572-577, 2000.
- 24) 上村晃一郎, 濱本高義: VII 因子とプロテイン C の二重欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **11**: 578-583, 2000.
- 25) 湯口正人, 水口純, 円城寺慶一: vWF とフィブリノーゲンの二重欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **12**: 78-84, 2001.
- 26) 小林英哲, 濱本高義: β_2 -glycoprotein I 欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **12**: 509-513, 2001.
- 27) 下田純一, 濱本高義: Gas6 の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **12**: 514-521, 2001.
- 28) 上村晃一郎, 嘉悦洋, 濱本高義: プロテアーゼネキシン 1 の欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **12**: 522-526, 2001.
- 29) 羽室強: ヘパラン硫酸スルホトランスフェラーゼ欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **13**: 80-84, 2002.
- 30) 中島輝久, 友清和彦, 水口純: TAFI の生化学的性質と欠損マウス. 日本血栓止血学会誌 **13**: 343-351, 2002.
- 31) Carmeliet P. Insights from gene-inactivation studies of the coagulation and plasminogen. Fibrinolysis and Proteolysis **11** (suppl. 2) 181-191, 1997.
- 32) Degen JL: Genetic interactions between the coagulation and fibrinolytic systems. Thromb Haemost **86**: 130-137, 2001.
- 33) Hogan KA, Weiler H, Lord ST: Mouse Models in Coagulation. Thromb Haemost **87**: 563-574, 2002.
- 34) Preissner KT: Hemostatic protease receptors and endothelial cell function: Insights from gene targeting in mice. Semin Thromb Hemost **26**: 451-462, 2000.
- 35) Tsakiris DA, Scudder L, Hodivala-Dilke K, Hynes RO, Coller BS: Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review. Thromb Haemost **81**: 177-188, 1999.
- 36) Ong K, Horsfall W, Conway EM, Schuh AC: Early embryonic expression of murine coagulation system components. Thromb Haemost **84**: 1023-1030, 2000.
- 37) 石原宏朗: プロテアーゼ活性化受容体. 日本血栓止血学会誌 **13**: 311-318, 2002.
- 38) 羽生清: ノックインマウスの作製. 日本血栓止血学会誌 **13**: 334-338, 2002.
- 39) 円城寺慶一: 血管内皮細胞の ATP, ADP 分解酵素: Ecto-ATP Diphosphohydrazase/CD39. 日本血栓止血学会誌 **11**: 173-184, 2000.
- 40) 岡田清孝: マウス α_2 -antiplasmin 遺伝子の解析とジーンターゲットング. 日本血栓止血学会誌 **10**: 315-319, 1999.
- 41) 石黒和博, 小嶋哲人, 斎藤英彦: ジーンターゲット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仔死亡と syndecan-4 欠損による胎盤迷路層胎仔血管の変性. 日本血栓止血学会誌 **13**: 9-16, 2002.
- 42) Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmbæk K, Danton MJS, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EW, Degen JL: Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. Proc Natl Acad Sci USA **93**: 6258-6263, 1996.
- 43) Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Vlaenderen IV, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muler M, Risau W, Edgington T, Collen D: Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. Nature **383**: 73-75, 1996.
- 44) Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ: Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. Blood **88**: 1583-1587, 1996.
- 45) Huang Z-F, Higuchi D, Lasky N, Broze GJ: Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. Blood **90**: 944-951, 1997.
- 46) 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.
- 47) Chan JCY, Carmeliet P, Moons L, Rosen ED, Huang Z-F, Broze GJ, Collen D, Castellino FJ: Factor VII deficiency rescues the intrauterine lethality in mice associated with a tissue factor pathway inhibitor deficit. J Clin Invest **103**: 475-482, 1999.
- 48) Cui J, O'Shea KS, Purkayastha A, Saunders TL, Ginsburg D: Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. Nature **384**: 66-68, 1996.
- 49) Dewerchin M, Liang Z, Moons L, Carmeliet P, Castellino FJ, Collen D, Rosen ED: Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice. Thromb Haemost **83**: 185-190, 2000.
- 50) Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmbæk K, Xiao Q, Bugge TH, Degen SJF: Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. Proc Natl Acad Sci USA

- 95 : 7597~7602, 1998.
- 51) Xue J, Wu Q, Westfield LA, Tuley EA, Lu D, Zhang Q, Shim K, Zheng X, Sadler JE : Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 7603~7607, 1998.
 - 52) 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. *Nat Genet* **10** : 119-121, 1995.
 - 53) 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.
 - 54) 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.
 - 55) Gailani D, Lasky NM, Broze JG : A murine model of factor XI deficiency. *Blood Coag Fibrinol* **8** : 134-144, 1997.
 - 56) Suh TT, Holmbk K, Jensen NJ, Daugherty CC, Small K, Simon DI, Potter SS, Degen JL : Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. *Genes Dev* **9** : 2020-2033, 1995.
 - 57) Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RJ, Coughlin SR : Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature* **381** : 516-519, 1996.
 - 58) Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR : Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* **386** : 502-506, 1997.
 - 59) Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC : Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 6642-6626, 1998.
 - 60) Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Tam C, Coughlin SR : A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **394** : 690-694, 1998.
 - 61) Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Cullere M, Hynes RO, Wagner DD : A mouse model of severe von Willebrand disease : defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 9524-9529, 1998.
 - 62) Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H, Hynes RO : Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest*, **101** : 982-992, 1998.
 - 63) Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, Bain SD, Yang Z, Lin MT, Danielson KG, Iozzo RV, LaMarca M, McKinney CE, Ginns EI, Bornstein P : Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol* **140** : 419-430, 1998.
 - 64) Zheng X, Saunders TL, Camper SA, Samuelson LC, Ginsburg D : Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 12426-12430, 1995.
 - 65) Lauer P, Metzner HJ, Zettlmeissl G, Li M, Smith AG, Lathe R, Dickneite G : Targeted inactivation of the mouse locus encoding coagulation factor XIII-A : Hemostatic abnormalities in mutant mice and characterization of the coagulation deficit. *Thromb Haemost*. **88** : 967-974, 2002.
 - 66) George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO : Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* **119** : 1079-1091, 1993.
 - 67) Georges-Labouesse EN, George EL, Rayburn H, Hynes RO : Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Developmental Dynamics* **207** : 145-156, 1996.
 - 68) George EL, Baldwin HS, Hynes RO : Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood* **90** : 3073-3081, 1997.
 - 69) 中武博, 中垣智弘 : ヒト EPCR の立体構造と機能に関する最近の話題. *日本血栓止血学会誌* **13** : 504-512, 2002.
 - 70) Healy AM, Rayburn HB, Rosenberg RD, Weiler H : Absence of the blood-clotting regulator thrombomodulin causes embryonic lethality in mice before development of a functional cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 850-854, 1995.
 - 71) Weiler-Guettler H, Christie PD, Beeler DL, Healy AM, Hancock WW, Rayburn H, Edelberg JM, Rosenberg RD : A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. *J Clin Invest* **101** : 1983-1991, 1998.
 - 72) Conway EM, Pollefeyt S, Cornelissen J, DeBaere I, Steiner-Mosonyi M, Weitz JI, Weiler-Guettler H, Carmeliet P, Collen D : Structure-function analyses of thrombomodulin by gene-targeting in mice : the cytoplasmic domain is not required for normal fetal development. *Blood* **93** : 3442-3450, 1999.
 - 73) Gu JM, Crawley JT, Ferrell G, Zhang F, Li W, Esmon NL, Esmon CT : Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. *J Biol Chem* **277** : 43335-43343, 2002.
 - 74) Crawley JT, Gu JM, Ferrell G, Esmon CT : Distribution of endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) during mouse embryo development. *Thromb Haemost* **88** : 259-266, 2002.
 - 75) Castellino FJ, Liang Z, Volkir SP, Haalboom E, Martin JA, Sandoval-Cooper MJ, Rosen ED : Mice with a severe deficiency of the endothelial protein C receptor gene develop, survive, and reproduce normally, and do not present with enhanced arterial thrombosis after challenge. *Thromb Haemost* **88** : 462-472, 2002.
 - 76) Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, Chan JC, Carmeliet P, Collen D, Castellino FJ : Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest* **102** : 1481-1488, 1998.
 - 77) Cui J, Eitzman DT, Westrick RJ, Christie PD, Xu ZJ, Yang AY, Purkayastha AA, Yang TL, Metz AL, Gallagher KP, Tyson JA, Rosenberg RD, Ginsburg D : Spontaneous thrombosis in mice carrying the factor V Leiden mutation. *Blood* **96** : 4222-4226, 2000.
 - 78) Yin ZF, Huang ZF, Cui J, Fiehler R, Lasky N, Ginsburg D, Broze GJ Jr : Prothrombotic phenotype of protein

- Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6734-6738, 2000.
- 79) Mann KG: Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* **82**: 165-174, 1999.
 - 80) Maurer MC, Peng JL, An SS, Trosset JY, Henschen-Edman A, Scheraga HA: Structural examination of the influence of phosphorylation on the binding of fibrinopeptide A to bovine thrombin. *Biochemistry* **37**: 5888-5902, 1998.
 - 81) He L, Vicente CP, Westrick RJ, Eitzman DT, Tollefsen DM: Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury. *J Clin Invest* **109**: 213-219, 2002.
 - 82) Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Broze GJ: Effect of tissue factor deficiency on mouse and tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6922-6926, 1997.
 - 83) Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, Ream B, Nuffelen AV, Prendergast G, Cole M, Bronson R, Collen D, Mulligan RC: Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest* **92**: 2746-2755, 1993.
 - 84) Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, Ream B, van den Oord JJ, De Mol M, Mulligan RC, Collen D: Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice II. Effect on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. *J Clin Invest* **92**: 2756-2760, 1993.
 - 85) Umans L, Serneels L, Overbergh L, Lorent K, Van Leuven F, Berghe HV: Targeted inactivation of mouse α_2 -macroglobulin gene. *J Biol Chem* **270**: 19778-19785, 1995.
 - 86) Uhrin P, Dewerchin M, Hilpert M, Chrenek P, Schofer C, Zechmeister-Machhart M, Kronke G, Vales A, Carmeliet P, Binder BR, Geiger M: Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility. *J Clin Invest* **106**: 1531-1539, 2000.
 - 87) Bugge TH, Flick MJ, Daugherty CC, Degen JL: Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Genes Dev* **9**: 794-807, 1995.
 - 88) Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van Vlaenderen I, Moons L, Plow EF, Collen D: Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* **92**: 2585-2593, 1995.
 - 89) Bugge TH, Kombrinck KW, Flick MJ, Daugherty CC, Danton MJS, Degen JL: Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* **87**: 709-719, 1996.
 - 90) Chan JC, Ganopoulosky JG, Cornelissen I, Suckow MA, Sandoval-Cooper MJ, Brown EC, Noria F, Gailani D, Rosen ED, Ploplis VA, Castellino FJ: The characterization of mice with a targeted combined deficiency of protein C and factor XI. *Am J Pathol* **158**: 469-479, 2001.
 - 91) Chan JC, Cornelissen I, Collen D, Ploplis VA, Castellino FJ: Combined factor VII/protein C deficiency results in intrauterine coagulopathy in mice. *J Clin Invest* **105**: 897-903, 2000.
 - 92) Holmbk K, Danton MJS, Suh TT, Daugherty CC, Degen JL: Impaired platelet aggregation and sustained bleeding in mice lacking the fibrinogen motif bound by integrin α IIb β 3. *EMBO J* **15**: 5760-5771, 1996.
 - 93) Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR: A role for the thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science* **293**: 1666-1670, 2001.
 - 94) Isermann B, Hendrickson SB, Hutley K, Wing M, Weiler H: Tissue-restricted expression of thrombomodulin in the placenta rescues thrombomodulin-deficient mice from early lethality and reveals a secondary developmental block. *Development* **128**: 827-838, 2001.
 - 95) Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, Sakai K, Magnuson MA, Wieloch T, Cronberg T, Isshiki A, Erickson HP, Fassler R: Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med* **7**: 324-330, 2001.
 - 96) Parry GC, Mackman N: Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *J Clin Invest* **105**: 1547-1554, 2000.
 - 97) Sun WY, Coleman MJ, Witte DP, Degen SJ: Rescue of Prothrombin-deficiency by transgene expression in mice. *Thromb Haemost* **88**: 984-991, 2002.
 - 98) Yang TL, Cui J, Taylor JM, Yang A, Gruber SB, Ginsburg D: Rescue of fatal neonatal hemorrhage in factor V deficient mice by low level transgene expression. *Thromb Haemost* **83**: 70-77, 2000.
 - 99) Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P, Luther T, Mackman N: Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J Clin Invest* **101**: 560-569, 1998.
 - 100) Rosen ED, Zhong L, Cornelissen I, Martin A, Castellino FJ: Coagulation factor VII is required for embryonic development in mice. *Blood* **98**, Suppl.: 3242, 2001.
 - 101) Huang S, Mulvihill ER, Farrell DH, Chung DW, Davie EW: Biosynthesis of human fibrinogen. Subunit interactions and potential intermediates in the assembly. *J Biol Chem* **268**: 8919-8926, 1993.
 - 102) Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J: Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. *Biochemistry* **23**: 1767-1774, 1984.
 - 103) Plow EF, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie GA, Ginsberg MH: The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 8057-8061, 1985.
 - 104) Wolfenstein-Todel C, Mosesson MW: Human plasma fibrinogen heterogeneity: evidence for an extended carboxyl-terminal sequence in a normal gamma chain variant (gamma'). *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 5069-5073, 1980.
 - 105) Chung DW, Davie EW: Gamma and gamma' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. *Biochemistry* **23**: 4232-4236, 1984.
 - 106) Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW: Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10729-10732, 1992.
 - 107) Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN,

- Hynes RO, Wagner DD: Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest* **106**: 385-392, 2000.
- 108) Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Cullere M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S and Hynes RO: $\beta 3$ -integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* **103**: 229-238, 1999.
- 109) 小林隆夫, 寺尾俊彦, 高松純樹: 先天性無フィブリノーゲン血症—妊娠・分娩管理を中心に—. *日本血栓止血学会誌* **12**: 57-65, 2001.