アンチトロンビン凝固制御系遺伝子改変マウスを用いた血栓症発症メカニズムの解明

名古屋大学図書
20106735

（研究課題番号　13470203）

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））
研究成果報告書

平成15年３月

研究代表者　高　松　純　樹
（名古屋大学医学部附属病院教授）

アンチトロンビン凝固制御系遺伝子改変マウスを用いた血栓症発症メカニズムの解明
（研究課題番号　　13470203）

平成13年～平成14年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）
研究成果報告書

研究代表者　高松　純樹
（名古屋大学医学部附属病院教授）

〒466-8550　名古屋市昭和区鶴舞町65
名古屋大学医学部附属病院輸血部

TEL:052-744-2652
FAX:052-744-2656
E-Mail: jtkmtsu@med.nagoya-u.ac.jp

名古屋大学図書
20106735

はしがき

血栓止血学分野では長く先天性疾患の解析を通じて遺伝子の機能を探るという手法が中心であった。実際、種々の凝固因子欠乏症の発見がなければ今日の確立された凝固因子カスケードはあり得なかったし、その後発見された多くのmutationの解析は、異常遺伝子の細胞株でのexpressionによって行われている。しかしこれらの手法は in vitro の解析にとどまるため、遺伝子機能が血栓・出血というダイナミックな生体現象につながるのかどうかが未知のままになっている。一方で血栓形成は、遺伝子の somatic な発現のみならず局所における発現パターンによって大きく左右され、このことも試験管内では再現できない重要なポイントである。本研究ではこれらの諸問題を解決すべくこれまでの試験管内のカスケード反応を個体レベルに移して in vivo の観察を行うという画期的な試みにチャレンジした。本研究で得られる情報は試験管内はおろかヒトの疾患の検討によっても明らかにすることはできないという点に大きな特徴がある。

凝固・線溶因子の活動は微妙なバランスの上に成り立っており、血栓症リスクの高い個体においては他の因子の遺伝子発現調節に乱れが生じることが考えられる。現在、免疫・癌化・アポトーシス・細胞内シグナル伝達など多くの細胞機能にとって重要な多くのタンパク質の機能がノックアウトやトランスジェニックなど遺伝子改変マウスの解析を用いて解析されている。抗凝固因子として代表的な Protein C や Thrombomodulin などさまざまな抗凝固蛋白での欠失マウス作製報告が相次ぐ中、AT 欠失マウスの報告はこれまでなく、出血と血栓という phenotype に HSPG-AT 系がどのように関与するかは依然として明らかになっていなかった。我々は、すでにマウス AT ゲノムの単離を世界に先駆けて報告しており、今回これを用いたターゲティングベクターの作製および相同組換え体を単離し、欠失マウスを作製した(1)ので一連の成果(2-9)につきここに報告するものである。

平成15年2月末日

高松　純樹

研究組織
研究経費
研究発表

研究組織

研究代表者：高松純樹　（名古屋大学医学部附属病院教授）

研究分担者：小嶋哲人　（名古屋大学医学部教授）

研究分担者：松下　正　（名古屋大学医学部附属病院助手）

研究分担者：山本晃士　（名古屋大学医学部附属病院医員）

研究経費

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	１１，５００千円	0	１１，５００千円
平成14年度	４，４００千円	0	４，４００千円
総計	１５，９００千円	0	１５，９００千円

研究発表

(1)　学会誌等

1. Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K, Nakayama Y, Takagi A, Suzuki M, Takeda N, Ito M, Yamamoto K, Matsushita T, Kusugami K, Muramatsu T, Saito H. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. J Clin Invest. 2000;106:873-878

2. Shimokawa T, Yamamoto K, Kojima T, Saito H. Down-regulation of murine tissue factor pathway inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha in vitro and in vivo. Thromb Res. 2000;100:211-221

3. Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Iwase M, Yoshikai Y, Yanada M, Yamamoto K, Matsushita T, Nishimura M, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T. Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide- injected mice. J Biol Chem. 2001;3:3

4. Kojima T, Takagi A, Maeda M, Segawa T, Shimizu A, Yamamoto K, Matsushita T, Saito H. Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. Thromb Haemost. 2001;85:793-799.

5. Takeshita K, Yamamoto K, Ito M, Kondo T, Matsushita T, Hirai M, Kojima T, Nishimura M, Nabeshima Y, Loskutoff DJ, Saito H, Murohara T. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging, "Klotho" mouse. Semin Thromb Hemost. 2002;28:545-554

6. Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H. Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis : increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide signaling with aging. Am J Pathol. 2002;161:1805-1814

7. Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Kojima T, Loskutoff DJ, Saito H. Aging and obesity augment the stress-induced expression of tissue factor gene in the mouse. Blood. 2002;100:4011-4018

8. Yamamoto K, Takeshita K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Loskutoff DJ, Saito H. Plasminogen activator inhibitor-1 is a major stress-regulated gene: implications for stress-induced thrombosis in aged individuals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:890-895

9. Yanada M, Kojima T, Ishiguro K, Nakayama Y, Yamamoto K, Matsushita T, Kadomatsu K, Nishimura M, Muramatsu T, Saito H. Impact of antithrombin deficiency in thrombogenesis: lipopolysaccharide and stress-induced thrombus formation in heterozygous antithrombin- deficient mice. Blood. 2002;99:2455-2458.

10. Nakayama Y, Kojima T, Takagi A, Yanada M, Yamamoto K, Matsushita T, Saito H. Cloning and characterization of the murine antithrombin gene [In Process Citation]. Thromb Res. 2000;100:179-183

(2) 口頭発表

松下　正，中山享之：vWF因子から見た反応軸制御機構
第61回日本血液学会総会，東京，平成11年4月

NAKAYAMA Takayuki, MATSUSHITA Tadashi, SAITO Hidehiko:
Analysis of the regulation of the VWF binding to GPIb by site-directed mutagenesis.
International Society of Thrombosis and Haemostasis 17th meeting, Washington D.C., USA, August, 1999

国島伸治，井上千加子，神谷忠，小澤和郎，小嶋哲人，齋藤英彦，田中敏博，中村祐輔：連鎖解析による May-Hegglin Anomaly 責任遺伝子座の同定　第62回日本血液学会総会，福岡，平成12年3月

石黒和博，小嶋哲人，松下正，山本晃士，中山亨之，柳田正光，齋藤英彦：シンデンカン4（リュウドカン）欠損による胎盤胎児血管の障害　第23回日本血栓止血学術集会，名古屋，平成12年11月

山本晃士，下川高賢，柳田正光，中山亨之，中山由紀子，松下正，小嶋哲人，齋藤英彦：LPS投与老齢マウスにおける PAI-, TF 発現変化と血栓傾向　第23回日本血栓止血学術集会，名古屋，平成12年11月

竹下亨典，山本晃士，柳田正光，中山亨之，松下正，小嶋哲人，齋藤英彦：早期老化モデル「klotho 遺伝子欠損マウス」における線溶系因子の発現と病理学的検討
第23回日本血栓止血学術集会，名古屋，平成12年11月

清水敦哉，柳田正光，中山亨之，竹下亨典，中山由紀子，山本晃士，松下正，小嶋哲人，平井真理，齋藤英彦：アラニンスキャニング法を用いた血小板膜蛋白 GP Ibα鎖の VWF 結合部位の解析
第 23 回日本血栓止血学術集会，名古屋，平成 12 年 11 月

清水敦哉，柳田正光，中山亨之，竹下亨典，中山由紀子，山本晃士，松下正，小嶋哲人，平井真理，齋藤英彦：種々の抗ヒト GP Ibα鎖モノクローナル抗体のエピトープ解析：アラニンスキャニング法による検討　第 23 回日本血栓止血学術集会，名古屋，平成 12 年 11 月

小嶋哲人，高木明，山田貴之，村手隆，柳田正光，中山亨之，山本晃士，松下正，高松純樹，齋藤英彦：Long PCR 法を用いた血液凝固第 VIII 因子遺伝子の逆位（Inversion）解析
第 23 回日本血栓止血学術集会，名古屋，平成 12 年 11 月

高木明，小嶋哲人，山田貴之，村手隆，高松純樹，齋藤英彦：血液凝固第 XIII 因子の遺伝子多型解析
第 23 回日本血栓止血学術集会，名古屋，平成 12 年 11 月
石黒和博，小嶋哲人，中山由紀子，高木明，山本晃士，松下正，柳田正光，中山亨之，齋藤英彦：マウスアンチトロビン完全欠損による胎児死亡　第 63 回日本血液学会，名古屋，平成 13 年 4 月

柳田正光，石黒和博，中山亨之，中山由紀子，山本晃士，松下正，小嶋哲人，齋藤英彦：アンチトロンビン欠乏マウスに対する LPS 投与の影響　第 63 回日本血液学会，名古屋，平成 13 年 4 月

小嶋哲人，高木明，前田雅弘，神戸栄喜，柳田正光，中山亨之，山本晃士，松下正，齋藤英彦：心筋梗塞患者における ryudocan 血中濃度　第 63 回日本血液学会，名古屋，平成 13 年 4 月

Koji YAMAOTO, Takayoshi SHIMOKAWA, Tetsuhito KOJIMA, Hidehiko SAITO:DECREASED EXPRESSION OF ANTICOAGULANT PROTEN C MURINE MODELS OF INFLAMMATORY OR PROTHROMBOTICRENAL DISEASES
第 63 回日本血液学会，名古屋，平成 13 年 4 月

Kazuhiro ISHIGURO, Tetsuhito KOJIMA, Kazuo KUSUGAMI, Kenji KADOMATU, Takashi MURAMATSU, Hidehiko SAITO:SYNDECAN-4 DEFICIENCY INCREASES SUSCEPTIBILITIES TO THROMBOSIS IN THEFETAL VESSELS OF THE PLACENTA,KAPPA-CARRAGEENAN-INDUCED RENALDAMAGE AND LIPOPOLYSACCHARIDE-IN-DUCED LETHALITY
第 63 回日本血液学会，名古屋，平成 13 年 4 月

山本晃士，竹下亨典，柳田正光，中山亨之，松下正，小嶋哲人，齋藤英彦：拘束ストレス負荷マウスにおける PAI-1 の発現変化－TNF-antiplasmin の発現調節の解析
第 24 回日本血栓止血学会学術集会，京都，平成 13 年

石黒和博，小嶋哲人，山本晃士，松下正，柳田正光，高木明，中山亨之，齋藤英彦：リュウドカン欠損によるエンドトキシンショックの増悪　第24回日本血栓止血学会学術集会，京都，平成13年

研究成果

＜本研究の目的＞

血管内皮の抗血栓性は血管内皮ヘパリン様分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカン（以下 HSPG）・Syndecan-4 (Ryudocan)と血漿抗凝固タンパク質である Antithrombin (III、以下 AT)に負うところが大きい。最近、我々は Ryudocan 欠失マウスの作製に世界で初めて成功し（JBC, 1999）、その血栓傾向について興味深い特質を見いだしている（Dev. Dynam. 1999）しかし Ryudocan 欠失は致死的 Phenotype とはならず、生理的リガンドである AT の In vivo thrombogenesis における寄与を検討する必要がある。本研究では Antithrombin 欠失マウスを作製、このマウスのホモ接合体、ヘテロ接合体それぞれについてその Phenotype 解析を行い、さらに Ryudocan 欠失マウスとのダブル欠失マウスを作製に進んだ。これらの表現型を解析することにより、①血栓症発症のタイミング・部位・重症度における差異、②向血栓刺激に対する反応性の相違、③血栓症病態発症条件の特定、④個体発生、炎症・臓器障害における HSPG-AT 系の役割について明らかにすることを目的とした。

＜本研究の背景＞

脳梗塞、心筋梗塞を代表とする血栓性疾患は、日本人の生活様式の欧米化や高齢化の促進とともにますます増加傾向にあり、我が国における成人の死亡原因の最上位に位置している。血栓症の予防、治療の重要性は非常に高いにもかかわらず、残念ながらその病因病態は十分に解明されてはいない。これまで我々のグループでは、ヘパリン様糖鎖をもつ抗血栓性分子として HSPG･Ryudocan の cDNA やゲノム構造を解析報告し（Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993; J. Biochem. , 1996）、Ryudocan がヘパリン親和性分子（bFGF、Midkine、TFPI など）との相互作用を介して様々な血管機能に関わっていることを示してきた（JBC, 1996）。最近、Ryudocan 欠失マウスの作製に成功し（JBC, 1999）、生理的抗凝固分子として胎盤機能に重要であることが明らかになった（Dev. Dynam., 1999）。一方、Ryudocan がそのコファクターとして働き、内皮細胞上のレセプターである AT は、抗凝固因子として知られその部分的欠損症が特発性血栓症の基礎疾患であることが最も古くから知られている。しかしながら、ヒトにおける欠損症は部分欠損症のみで、完全欠損症の報告もなく、また Antithrombin 欠失マウスの作製解析もなされていないことから、完全欠損で何が起こるのかは不明であった。このような従来の研究成果ならびに世界での研究進展状況を踏まえて、今回我々は AT 欠失マウスを作製することとした。これらの欠失マウスは血栓症動物モデルとしての血栓症の発症病態解析研究に有用であるばかりでなく、血栓症治療法の評価システム構築にも応用でき、得られる研究成果の社会的貢献度は多大なものとなることが期待できると考えられた。

＜本研究の特色＞

血栓止血学分野では長く先天性疾患の解析を通じて遺伝子の機能を探るという手法が中心であった。実際、種々の凝固因子欠乏症の発見がなければ今日の確立された凝固因子カスケードはあり得なかったし、その後発見された多くの mutation の解析は、異常遺伝子の細胞株での expression によって行われている。しかしこれらの手法は in vitro の解析にとどまるため、遺伝子機能が血栓・出血というダイナミックな生体現象につながるのかどうかが未知のままになっている。一方で血栓形成は、遺伝子の somatic な発現

のみならず局所における発現パターンによって大きく左右され、このことも試験管内では再現できない重要なポイントである。本研究で作成する血栓症リスクの高いマウスの主要臓器の凝固線溶遺伝子の発現パターンを将来解析することで成体の血栓ストレスに対する反応を解析することができるであろう。すなわち本研究ではこれらの諸問題を解決すべくこれまでの試験管内のカスケード反応を個体レベルに移すこととした。

このような情報は試験管内はおろかヒトの疾患の検討によっても明らかにすることはできず、本研究で得られる成果は、老齢化社会を迎えてますます増加傾向にある脳梗塞、心筋梗塞を代表とする血栓性疾患の病態生理の解明、さらにはその診断法や新しい治療法の開発、同一遺伝背景にも関わらず個体により異なる血栓症発症条件の特定に寄与でき、その社会的意義は極めて大きいと思われたのである。

＜研究方法と結果＞

（平成１３年度）

１.相同組換え体の単離・同定と Antithrombin 欠失マウスの作製およびその表現型解析

既に単離されている(10)129SVJ マウスのゲノムライブラリーからマウス Antithrombin ゲノム遺伝子全長をもとにネオマイシン耐性遺伝子（MC1-neo）とジフテリア毒素 A フラグメント遺伝子（PGK-DTA）によるポジティブ・ネガティブセレクション用のターゲティングベクターを作成した（図１）。

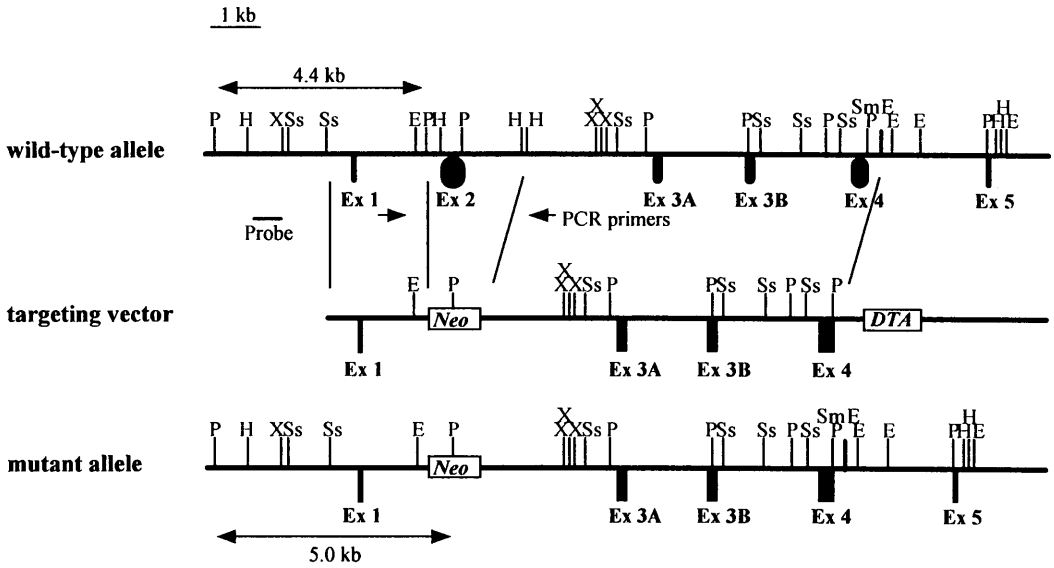


図１　ターゲッティングベクター

ベクターはエレクトロポレーションにより ES 細胞（D3 細胞）に導入、G-418 含有 ES 培地により選択培養し、PCR および Southern blotting にて解析して相同組換え体の単離・同定を行った。これをマイクロマニピュレーターによるインジェクションにより C57BL/6J マウスより採取した胚盤胞に注入し、仮親の子宮に移植した。仮親から生まれたキメラマウスを ICR マウスと交配し、生まれたマウスを PCR および Southern blotting により変異アレルの伝搬を調べた。得られたヘテロ変異マウスの雄雌を交配してホモ体を作製し、その表現型解析を行った。

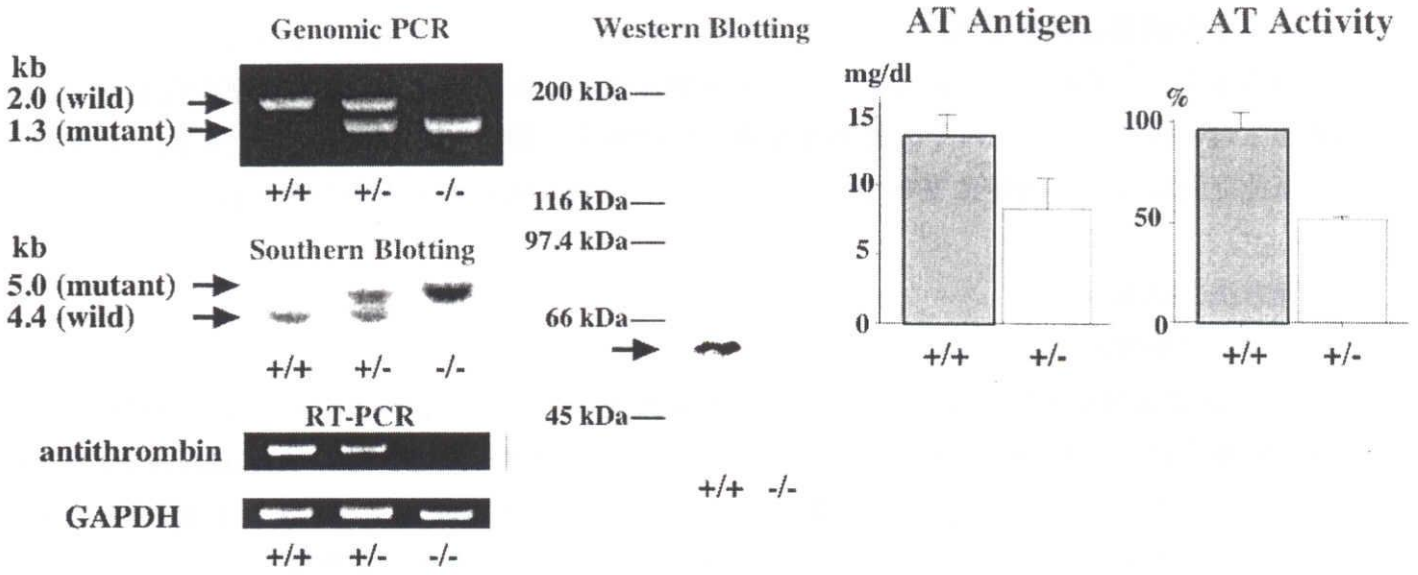


図２　AT ノックアウトマウスの genotyoe および血漿中 At 量

その結果、作成したホモ、ヘテロマウスの genotype にしたがって、AT の発現量が相関し、このノックアウトシステムが正常に作動していることが確認された（図２）。

ヘテロ接合体同士の交配では妊娠１４．５日まではメンデルの法則に従い各遺伝子型の胎児が得られ、野生型、アンチトロンビン・ホモ欠損型胎児の間に外見上は差異を認めなかった。しかし妊娠１５．５日になると約７０％の、妊娠１６．５日になると１００％のアンチトロンビン・ホモ欠損型胎児は広範な皮下出血を伴い死亡していた。これらの胎児を組織学的に解析したところ心筋と肝臓に広範なフィブリンの沈着を認めた（図３）。特に肝臓では類洞に沿ってフィブリンの沈着を認めた。これらのフィブリン沈着は生存していた妊娠１５．５日のアンチトロンビン欠損型胎児にも軽度ではあるものの認められ、妊娠１４．５日のアンチトロンビン欠損型胎児も４匹調べた結果、そのうち１匹において心筋の一部にフィブリンの沈着を認めた。一方、脳や肺などの他の組織には明らかなフィブリン沈着を認めなかった。更に皮下、頭蓋内などの広範な出血部位でもフィブリンの沈着を認めず、消費性凝固障害および肝障害によるフィブリンノゲンの欠乏が考えられた。これらの所見よりアンチトロンビンは胎児の生存に必須であり、特に心筋と肝臓における血液凝固の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。（以上主に文献(1)に記載）

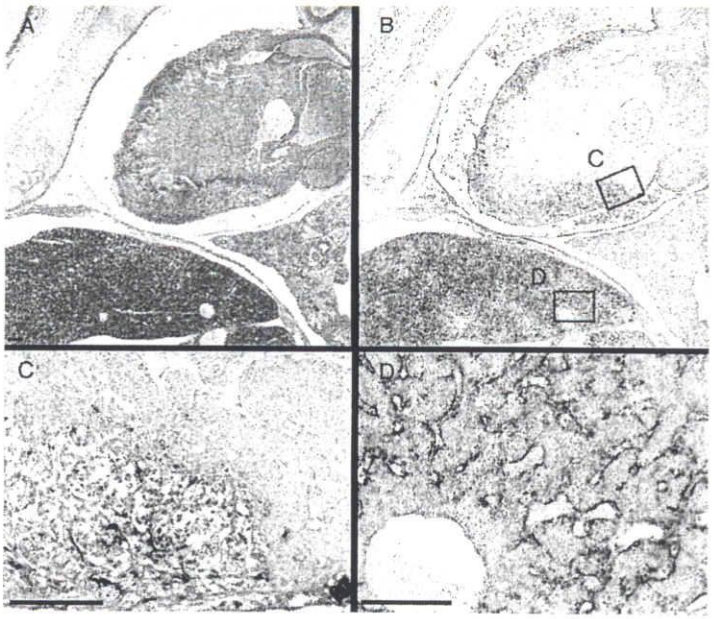


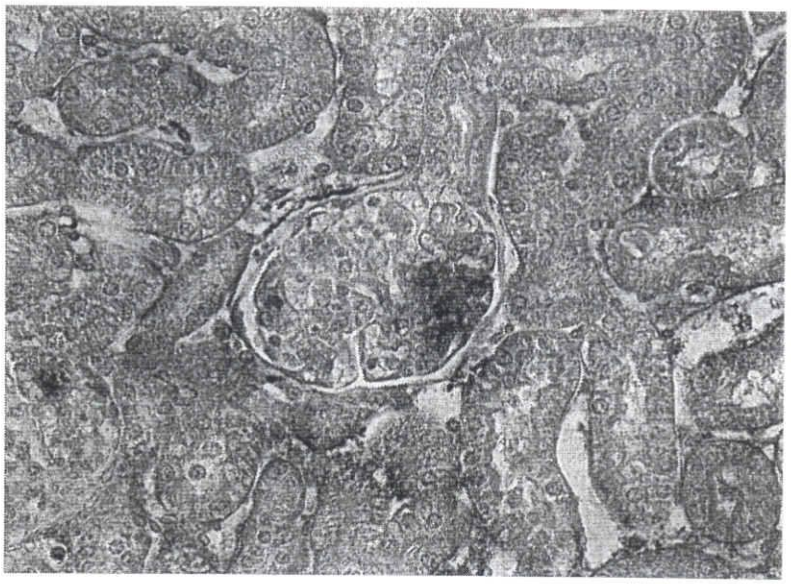
図3 ATノックアウトマウスの心臓、肝臓のHE染色（A）、フィブリン染色（BCD）像。Aの上（心臓）下（肝臓）にそれぞれの臓器が固定されており、C,DはB中の拡大図。

（平成14年度）

2. ヘテロ接合体：AT(-/+)マウスの抗血栓性

AT(+/-)マウスは出産、繁殖をはじめ、正常マウスと何ら変わりない生活を営み、これまでの観察期間内(最長:13M)において早期死亡や原因不明の死亡はみられていない。そこで次に、血栓誘発条件下での血栓傾向について AT 欠乏マウスと正常マウスとの比較検討を行なった。LPS 5g/体重 g あたりを腹腔内投与し、4h 後に臓器（腎、肝、心臓、肺、脳、副腎など）を摘出し、抗フィブリン抗体による免疫染色を含んだ形態的観察を行った。中でも腎では抗フィブリン抗体にてフィブリン沈着の認められた糸球体（図4）の比率（%GFR）を計算し、血栓症発症の定量化を行った。

図4 フィブリン沈着のみられたマウス腎糸球体。



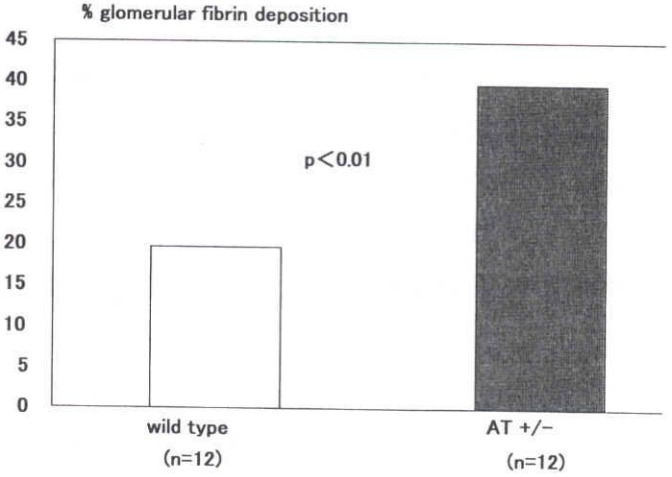
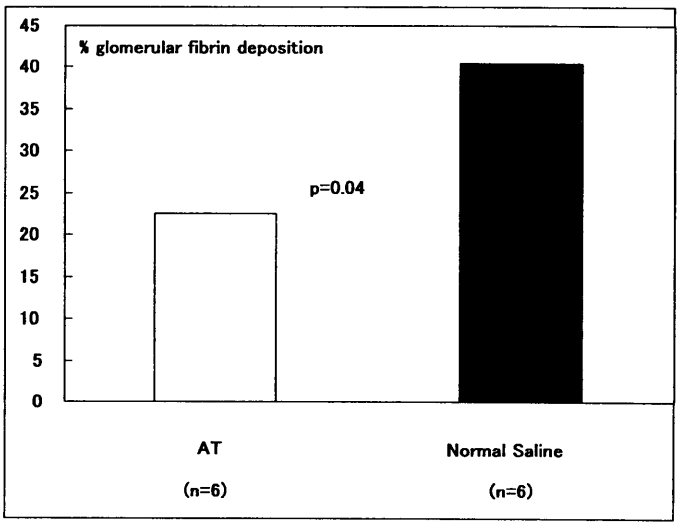


図5 LPS 投与により正常対照（wild type）マウスとヘテロマウス（AT +/-）に見られた糸球体フィブリン沈着の差異

あらかじめ AT(-/+)マウスの AT 活性は約50％であることが確認されている（図2）。図5に示すように AT(-/+)マウスは、LPS 投与において正常対照マウスに比べて有意に高い血栓症発症率を呈することが明らかとなった。しかしこの差は果たして血漿中 AT が低下していることで説明されるのだろうか？このこと

に対する答えを得るために我々は AT(-/+)マウスにあらかじめヒト AT を投与しておき血栓症発症率が rescue されるかどうか検討した。この結果血中濃度が（正常対照マウスに対して）１００％となる図5 LPS投与によりヘテロマウス（AT +/-）に見られる糸球体フィブリン沈着はヒト AT 投与により rescue される。

ように AT を４時間前に静脈内投与した AT 欠乏マウス（AT(-/+)マウス）は、生食を投与された AT(-/+)マウスに比べて明らかに低く、正常対照マウス(AT(+/+)マウス)に LPS を投与した際に見られる程度と同程度に血栓症発症率が低下した（以上主に文献９に記載）。



3. Antithrombin/Ryudocan ダブル欠失マウスの作製

Antithrombin 欠失マウスと、内皮細胞上のアンチトロンビンの生理的なレセプターである Ryudocan を完全に欠失したマウス（すでに作製済み）を交配させ、誕生したマウスを同様に PCR・Southern blotting によりスクリーニングしてまず Antithrombin（-/+）Ryudocan（-/-）：ダブル欠失マウスを同定した。このマウスは AT (-/+)マウス同様平常時においては明らかな血栓傾向を認めなかったが、LPS 投与によって明らかに高い血栓傾向を示した（投稿準備中）。

（まとめ）

今回、特に ATAT（-/+)マウスが有用な血栓症発症動物モデルであることが明らかとなった。ヒトにおいては遺伝的に血栓症リスクにある個体（先天性 Antiyhrombin, Protein C, Protein S などの欠乏症）においても必ず発症するとは限らず、その発症条件が何であるか突き止めることが急務となっている。今後ヒトにおける血栓症病態発症の条件として何が重要なのか検討していく上での有用な研究手段になると考えられる。

本研究で得られる成果は、老齢化社会を迎えてますます増加傾向にある脳梗塞、心筋梗塞を代表とする血栓性疾患の病態生理の解明、さらにはその診断法や新しい治療法の開発、同一遺伝背景にも関わらず個体により異なる血栓症発症条件の特定に寄与でき、その社会的意義は極めて大きいと思われる。