

## ◆トピックス◆

## トロンボスポンジン-1 および-2 の欠損マウス

上村晃一朗\*, 嘉悦 洋\*, 水口 純\*

## Thrombospondins Deficient Mice

Koichiro KAMIMURA\*, Hiroshi KAETSU\* and Jun MIZUGUCHI\*

**Key words:** thrombospondin 1, thrombospondin 2, extracellular matrix, pulmonary homeostasis, connective tissue abnormalities

## はじめに

トロンボスポンジン (TSP) は、トロンビン刺激による血小板の活性化を介して、 $\alpha$  顆粒から分泌される血小板 TSP として最初に同定された。その後、進化的に関連のある複数のタンパク質が明らかにされ、現在では細胞外のカルシウム結合性タンパク質ファミリーを構成している<sup>1)</sup>。このファミリーの遺伝子産物として、血小板 TSP と呼ばれていた TSP1 に加え、TSP2 および TSP3, TSP4, cartilage oligomeric matrix protein (COMP) が現在知られている (図 1)。TSP は細胞外マトリックスで機能発現すると考えられており、血小板凝集への関与に加え、細胞接着および血栓形成、創傷治癒、発生、血管新生、癌の転移における役割が想定され、多彩な機能をもつタンパク質として注目されている。

TSP は、タンパク質のドメイン構造から 2 つのサブグループに分けられる。サブグループ A は、TSP1 および TSP2 から構成されるが、両者は構造的類似性が高く、アミノ末端およびカルボキシル末端は電子顕微鏡像から球状ドメイン構造であることが明らかにされており<sup>2)</sup>、分

子中央部にはシステイン残基に富む繰り返し配列モチーフが存在する。一方、サブグループ B は、TSP3 および TSP4, COMP から成る。カルシウム結合部位は、両サブグループに共通の 3 型繰り返し構造 (タイプ 3 リピート) 内に存在する (図 1)。

TSP1 および TSP2, TSP3 の遺伝子は、ヒトおよびマウスについて調べられており、それぞれ 15q15 および第 2 染色体バンド F (TSP1), 6q27 および第 17 染色体バンド A (TSP2), さらに 1q21-24 および第 3 染色体バンド E3-F1 (TSP3) に存在する。

マウス胚での *in situ* ハイブリダイゼーションの結果<sup>3)</sup>、TSP1 および TSP2, TSP3 の mRNA 発現は、骨形成や神経器官形成、肺の発達と関係していることが明らかとなった。しかし、各 TSP は以下に述べるように、異なった発現様式を示しており、それぞれ独自の機能をもつと考えられている。TSP1 の mRNA 発現は胎齢 10~13 日で顕著であり、この間、一時的に高い発現が神経管や頭部間充織、房室管隆起に認められる。TSP1 mRNA の一定した特異的発現は、循環血中巨核球ならびに肝常在性の巨核球に見られる。一方、TSP2 の mRNA 発現は、

\* (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.]

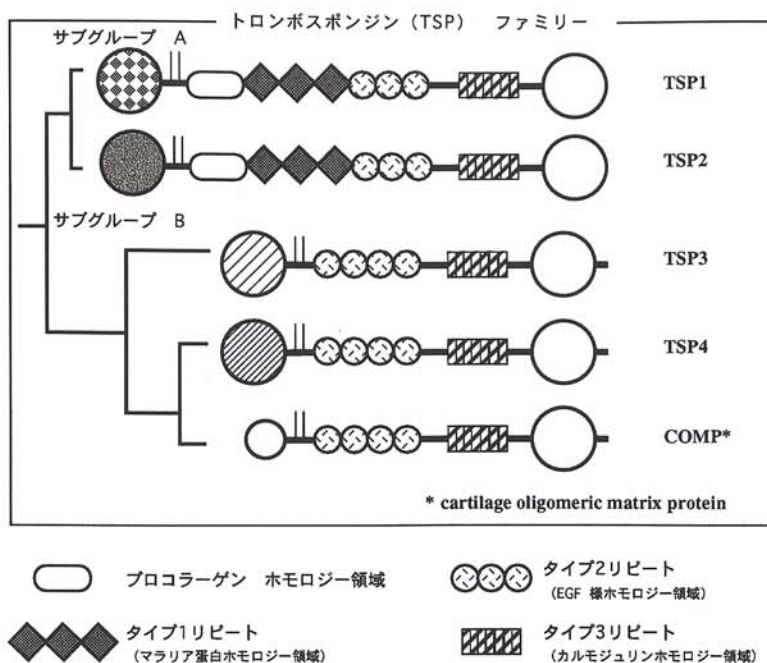


図 1 トロンボスポンジンファミリーとドメイン構造

主として心膜, 胸膜, 軟骨膜, 骨膜, 髄膜, 靭帯, 真皮などの器質性の結合組織に限定されるが, 平滑筋細胞および内皮細胞にも存在する。また, TSP3 の mRNA 発現は, 脳や軟骨, 肺に限定されるという。

TSP1 は, 1151 アミノ酸残基からなる分子量約 14 万のポリペプチド鎖が, 3 つアミノ末端側でジスルフィド結合したホモ 3 量体の糖タンパク質である。TSP1 は血小板を刺激することにより  $\alpha$  顆粒から分泌されるが, 成体組織の肺および骨などでも高レベルに発現している。血小板から分泌された TSP1 は血小板表面に会合しており, 血小板凝集への関与が示唆されている。TSP1 は N 結合型糖鎖を有するが, 興味深いことに, ヒトおよびウシの血液凝固 VII 因子, IX 因子, およびプロテイン Z の第 1 EGF 様ドメイン内に見られるセリン残基へのグルコースを介したオリゴ糖の結合(グルコース-キシロースもしくはグルコース-(キシロース)<sub>2</sub>)と同様に, グルコースとキシロースから成る O-結合型糖鎖の存在が, ウシ TSP1 で報告されてい

る<sup>4)</sup>。ヒト TSP1 の第 1 EGF 様ドメイン内にもウシと類似のセリン残基近傍の共通配列(-Cys-X-Ser-X-Pro-Cys-)が存在しており, 同様なオリゴ糖の結合が推定されている。

TSP1 は, カルシウムに加え, 細胞表面のプロテオグリカンや, インテグリン, CD36, さらに, プラスミノーゲン, フィブリノーゲン, フィブロネクチン, ウロキナーゼなどの細胞外タンパク質にも結合し, TGF- $\beta$  の活性化能も示す<sup>5)</sup>。これらの相互作用を通じて, TSP1 は細胞の接着, 増殖, 遊走, ならびに分化を調節するといわれている。

TSP2 は 1154 アミノ酸残基から成るポリペプチド鎖のホモ 3 量体として存在する。TSP2 も TSP1 同様, プロテオグリカンをはじめとした多数の細胞表面タンパク質と相互作用することが明らかにされているが, TSP2 の細胞外マトリックスにおける機能はまだ良く理解されていない。

個々の TSP に対し複数の細胞表面受容体の存在が想定されており, 表現型として現れる細

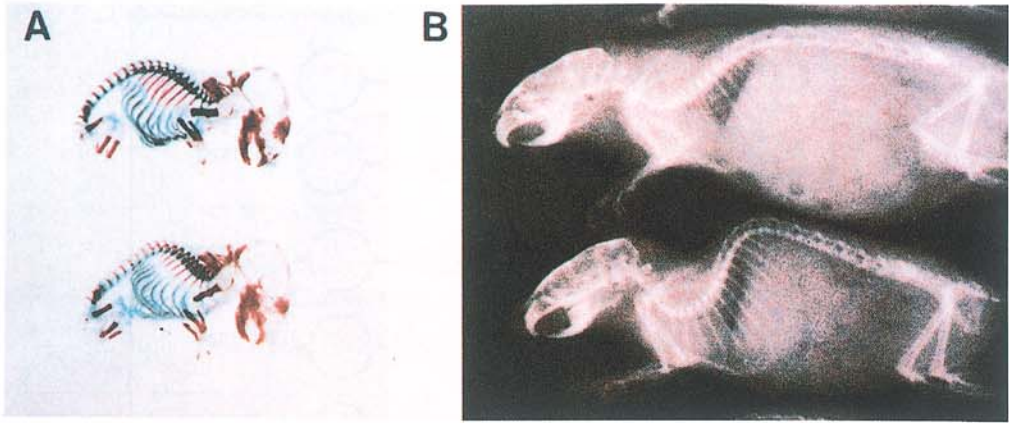


図2 トロンボスポンジン-1欠損マウス (TSP1<sup>-/-</sup>;下段)と対照マウス (TSP1<sup>+/+</sup>;上段)の背骨前弯部の屈曲 (文献6より引用; Reprinted from The Journal of Clinical Investigation, 1998, 101, p 982-992 Copyright permission of the American Society for Clinical Investigation.)  
 パネルA: アリザリンレッドおよびアルシアンブルーで染色した新生仔マウスの骨格, パネルB: 成体マウスのX線写真.

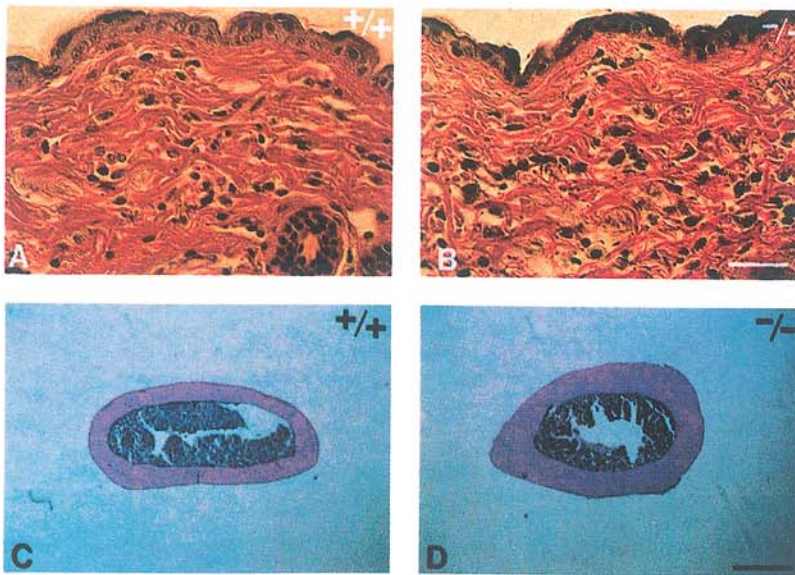


図3 トロンボスポンジン-2欠損マウス (TSP2<sup>-/-</sup>)の皮膚および骨の組織学的解析 (文献7より引用, 転載許可取得)  
 パネルAおよびB: 対照マウス (TSP2<sup>+/+</sup>; A)およびTSP2<sup>-/-</sup>マウス (B)の背部真皮に対するベルヘッフワングーソン染色. TSP2<sup>+/+</sup>のコラーゲン線維は枝編み状の網目を形成するが, 大部分は上皮表面に平行した方向性を持つ. TSP2<sup>-/-</sup>のコラーゲン線維は無秩序な状態を呈し, 上皮表面との平行性はない. パネルCおよびD: 対照マウス (TSP2<sup>+/+</sup>; C)およびTSP2<sup>-/-</sup>マウス (D)の大腿骨幹中央横断面に対するヘマトキシリン・エオジン染色. TSP2<sup>-/-</sup>では, 骨密度および皮質厚の増大が認められ, 骨横断面の輪郭も卵形に変形している.

胞の応答も複雑かつ多岐にわたると考えられる。したがって、TSP の機能解明に向けて TSP 欠損マウスの作出が待ち望まれていた。

### TSP 欠損マウスから得られる情報

1998 年, Lawler らのグループは, *in vivo* での TSP1 の機能を解析することを目的として, TSP1 欠損マウスを作出した<sup>6)</sup>。TSP1<sup>-/-</sup>マウスはメンデル則の期待値に比し出生数が低下していたものの, ほとんどは生育可能であった。TSP1<sup>-/-</sup>マウスは生殖能を有しているが, 産仔数は野生型に比べ少ない。TSP1<sup>-/-</sup>マウスの血小板は TSP1 タンパク質を完全に欠損していたが, トロンピンで誘導される血小板凝集の減弱は認められず, 出血時間も野生型と同等であった。従来の抗 TSP1 抗体を用いた *in vitro* 試験からは, TSP1 が血小板凝集で必須であると考えられていたが, TSP1<sup>-/-</sup>マウスから得られた結果は相反するものとなった。TSP1<sup>-/-</sup>マウスでの特徴的变化として, 出生後に種々異なるレベルの脊椎前弯の屈曲が見られ (図 2), 循環血中の白血球数は野生型に比べて約 1.6 倍増加していた。さらに, TSP1 の発現レベルが高い肺に関しては, TSP1<sup>-/-</sup>マウスの出生時には正常であったものの, 4 週齢以降では, 好中球浸潤に伴う広範な急性の器質性肺炎が観察された。時間経過とともに好中球数は減少し, 肺胞でのびまん性出血によるマクロファージ数の顕著な増大が認められ, 上皮の過形成およびコラーゲンとエラスチンの沈着が観察された。気道上皮の肥厚ならびに形態変化は, TSP1<sup>-/-</sup>マウスでの細胞増殖の増大に基づくものであり, TSP1 が正常肺の恒常性に関わることを示唆している。

一方, Kyriakides らのグループは, 1998 年, TSP2 の機能を明らかにする目的で, TSP2 欠損マウスを作出した<sup>7)</sup>。TSP2<sup>-/-</sup>マウスは, メンデル則に従った比率で出生し, 外見上は正常で生殖能も有した。しかしながら, 精査の結果, 多岐にわたる異常が明らかとなった。すなわち, TSP2<sup>-/-</sup>マウスは, 皮膚および腱のコラーゲン

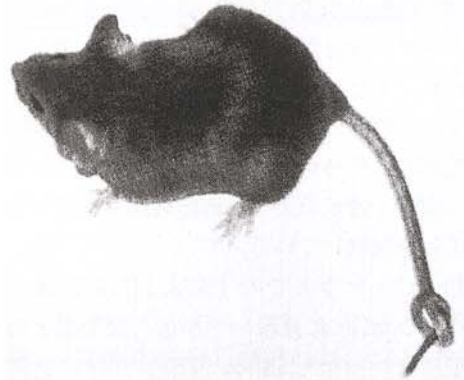


図 4 トロンボスポンジン-2欠損マウス (TSP2<sup>-/-</sup>) の外観 (文献7より引用, 転載許可取得)

TSP2<sup>-/-</sup>マウスの外観には変化がないが, 尾の腱と靭帯が変化し, 柔軟性が増したことにより, 正常マウスでは起こり得ない尾に結び目を作るという状態が可能となっている。

線維が不規則化しており (図 3), これに伴い皮膚は脆弱化し, 抗張力が低下するとともに, 尾は異常な柔軟性を示した (図 4)。また, この TSP2<sup>-/-</sup>マウスから採取された皮膚線維芽細胞は, 基底層への付着能が低下していた。TSP2<sup>-/-</sup>マウスは加齢とともに緩徐な脊椎後弯の屈曲を示すが, これは骨性の異常というよりはむしろ靭帯が緩んだ結果と考えられる。また, 大腿骨幹中央の骨密度ならびに皮質厚の増大が認められ, 骨横断面の輪郭も卵形に変形していた (図 3)。

さらに, TSP2<sup>-/-</sup>マウスは凝固パラメータが正常であるにもかかわらず, 出血時間の延長を示した。この原因としては, von Willebrand 因子 (vWF) のアンカリング作用により血小板凝集体が損傷内皮下層に粘着する際, vWF の内皮下層コラーゲンへの結合に対し TSP2 が直接的, あるいは間接的に要求される可能性が考えられている。また, TSP2<sup>-/-</sup>マウスでは, 真皮をはじめとした多くの組織において, 血管数の増大に伴う組織中血管密度の有意な増加が認められた。したがって, TSP2 は *in vivo* では血管新生阻害の機能をもつ可能性を示している。

これらの結果から、TSP2は皮膚および腱でのコラーゲン線維素の生成に関わっていると推定される。また、TSP2<sup>-/-</sup>マウスで見られた多種多様な表現型の多くは、TSP2が間充織細胞の細胞表面の特性を調節する能力を有し、その結果、接着・遊走のような細胞機能に影響を及ぼすことを示唆している。

TSP1<sup>-/-</sup>マウスでのTSP2, TSP3, およびTSP4のmRNA発現レベルは、野生型と有意な差はなかった<sup>6)</sup>。逆に、TSP2<sup>-/-</sup>マウスでのTSP1のmRNA発現レベルも有意に増大しなかった<sup>7)</sup>。したがって、各TSPタンパク質欠損に伴うほかのTSPファミリーによる代償作用は働いていないと考えられた。

### おわりに

TSP欠損マウスから得られた情報を要約すると、①従来の*in vitro*データからの予想とは異なり、TSP1の血小板凝集への関与は認められない。②TSP1は、正常な脊椎の形態維持に重要であり、炎症細胞の漸加およびクリアランスの調節を通じて、肺の恒常性維持に関わっていると考えられる。③一方、TSP2は、コラーゲン線維素の生成や骨増殖、正常な血管密度の維持、止血、皮膚線維芽細胞などの細胞付着特性に関与していることが示唆される。

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。

### 文 献

- 1) Lawler J: Thrombospondins, in High KA, Roberts HR (eds): Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis. New York, Marcel Dekker, Inc, 1995, 621-638.
- 2) Lawler J, Derick LH, Connolly JE, Chen J-H, Chao FC: The structure of human platelet thrombospondin. *J Biol Chem*, **260**: 3762-3772, 1985.
- 3) Iruela-Arispe ML, Liska DJ, Sage EH, Bornstein P: Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev Dyn*, **197**: 40-56, 1993.
- 4) Nishimura H, Yamashita S, Zeng Z, Walz DA, Iwanaga S: Evidence for the existence of O-linked sugar chains consisting of glucose and xylose in bovine thrombospondin. *J Biochem*, **111**: 460-464, 1992.
- 5) Schultz-Cherry S, Ribeiro S, Gentry L, Murphy-Ullrich JE: Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor- $\beta$  in a chemically defined system. *J Biol Chem*, **269**: 26775-26782, 1994.
- 6) 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.
- 7) Kyriakides TR, Zhu Y-H, 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.