

## フィブロネクチンの欠損マウス

平上 睦\*, 中富 靖\*, 水口 純\*

### Targeted Gene Disruption of Fibronectin in Mice

Mutsumi HIRAKAMI\*, Yasushi NAKATOMI\*, and Jun MIZUGUCHI\*

**Key words:** fibronectin, gene targeting, adhesive protein, extracellular matrix, alternative splicing

#### はじめに

フィブロネクチンは、1948年、血漿中の寒冷不溶性グロブリン (cold insoluble globulin) として発見され、その後20年以上経過してから、線維芽細胞の表面に存在する LETS 蛋白質 (large external transformation sensitive protein) や galactoprotein a と同じ蛋白質であることがわかり、統一してフィブロネクチン (FN) と呼ばれるようになった。周知の如く、FN は代表的な細胞接着因子で、細胞を細胞外マトリックス (ECM) に接着し進展させることによって細胞の分化・増殖・移動を調節する<sup>1)2)</sup>。

血液凝固反応では、Ca<sup>2+</sup> 存在下、活性化第 XIII 因子によるフィブリンの分子間架橋の際、 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとともに FN もフィブリンに架橋される。FN はフィブリン  $\alpha$  鎖に架橋され、フィブリンゲル内における細胞移動の足場として機能し、創傷治癒に大きく関与する。また、FN は可溶性のフィブリンとも結合し、網内系におけるフィブリンのクリアランスにも関与することが示唆されている。FN の組織への沈着という点では、冷血症や局所における necrosis といった病態との関連も注目され

ている。

現在までに、ヒト FN について、以下のよう  
な知見が得られている<sup>1)~10)</sup>。①ヒト FN は、分子量約 230,000~270,000 の2本のサブユニット鎖が C 末端で S-S 結合したヘテロ二量体 (A 鎖と B 鎖) として存在する糖蛋白質である。血漿型フィブロネクチン (pFN) と細胞型フィブロネクチン (cFN) に大別され、cFN はマルチマー構造をとっている。②pFN は肝臓で合成され、血漿中に約 0.3 mg/ml の濃度で存在する。一方、cFN は線維芽細胞や上皮細胞、マクロファージなどで合成され、主に細胞表面や ECM に分布する。③ヒト FN は、Extra domain-A (ED-A) および Extra domain-B (ED-B), type III connecting segment (IIICS) の3カ所で alternative splice されることにより、いくつかのアイソフォームを生成し、pFN と cFN の違いや、サブユニット間の違いもこれに起因する。pFN は ED-A と ED-B をともに欠失しているのに対し、cFN はその両方または一方のみを発現している。また、サブユニット B 鎖では IIICS が完全に欠失している (図 1)。④遺伝子の全構造は決定されてないが、ヒトでは約 50 個のエクソンを含むといわれ、ニワトリ

\* (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.]

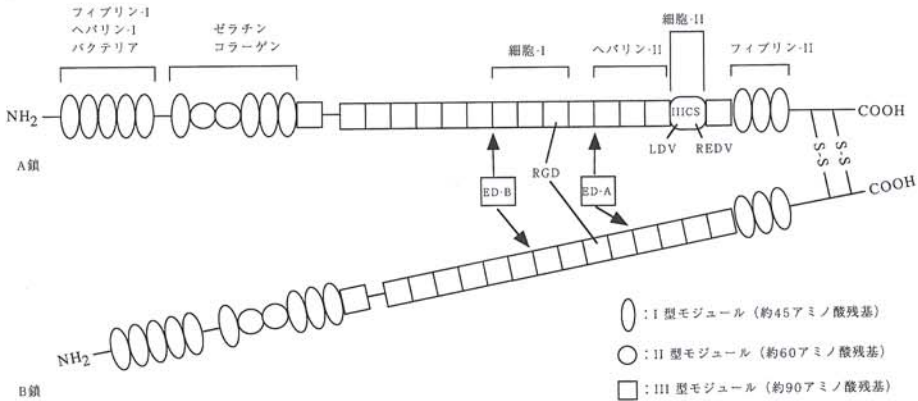


図1 ヒトフィブロネクチンの構造模式図と結合ドメイン

RGD: Arg-Gly-Asp 配列, LDV: Leu-Asp-Val 配列, REDV: Arg-Glu-Asp-Val 配列.

とラットの遺伝子はそれぞれ50kbと70kbにわたると推測されている。ヒトFNの染色体上の位置は、2p14-16と2q34-36が有力視されている。欠損患者の報告はない。⑤FNのサブユニットは、I型・II型・III型と呼ばれる3種類のモジュールから構成され、これらがさらに集合し機能ドメインを形成する(図1)。N末端より、1) フィブリン・ヘパリン・バクテリア結合ドメイン-I, 2) ゼラチン(コラーゲン)結合ドメイン, 3) 細胞結合ドメイン-I, 4) ヘパリン結合ドメイン-II, 5) 細胞結合ドメイン-II, 6) フィブリン結合ドメイン-IIなどから構成される。細胞結合ドメイン-Iには接着蛋白に特徴的なRGD(Arg-Gly-Asp)配列が、細胞結合ドメイン-IIにはLDV(Leu-Asp-Val)やREDV(Arg-Glu-Asp-Val)配列があり、それぞれ $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ などをはじめとする複数のインテグリンにより認識される。また、III型モジュールは免疫グロブリンスーパーファミリーに属するいくつかの蛋白質、組織因子やサイトカイン受容体等の数多くの蛋白質にも存在する。⑥このように複雑な構造を持つFNは、その機能も多岐にわたり、発生過程や創傷治癒、止血等での細胞の接着・移動・増殖・分化に深く関与している。⑦ alternative splicingによるFNアイソフォームの存在は非常に興味深く、最近、可変領域のED-AおよびED-B(図1)がともに

細胞接着に重要であるという報告<sup>8)9)</sup>、更にED-A領域がFNの細胞接着活性を調節しているという報告<sup>10)</sup>があり、シグナル伝達経路への関与と相俟って複雑な様相を示している。

### FN 欠損マウスからの情報

1993年、GeorgeらはFNのノックアウトマウスを作成した<sup>11)</sup>。ヘテロ接合体(FN<sup>+/-</sup>)マウスは正常に誕生し、大きさ、繁殖力ともに野生型(FN<sup>+/+</sup>)マウスと同様であったが、血中FN濃度はFN<sup>+/+</sup>マウスの約半分であった。更に、FN<sup>+/-</sup>マウス同士の交配からホモ接合体(FN<sup>-/-</sup>)マウスを得ようと試みたが、胎齢14.5日までに全て子宮内で死亡した(図2)。

FN<sup>-/-</sup>マウスの胚は、FNを欠如しているものの、胎齢7.5日までは形態上の異常をほとんど認めなかった。しかし、胎齢8.0日では全標本に異常が認められ、正常胚に比べて頭尾軸(anterior-posterior axis)が短く、頭部や胴体部の中胚葉が欠如し、体節も存在せず、外胚葉は弯曲やゆがみを多発していた。他方、内胚葉に由来する尿膜、卵黄囊および血島は正常に発生した。胎齢8.5日になると、悪化が進行し、頭ヒダ(head-fold)の奇形や、正常胚で観察される神経管の閉鎖は見られず、ねじれが顕著となった。また、この胎齢での体節数は通常8~12



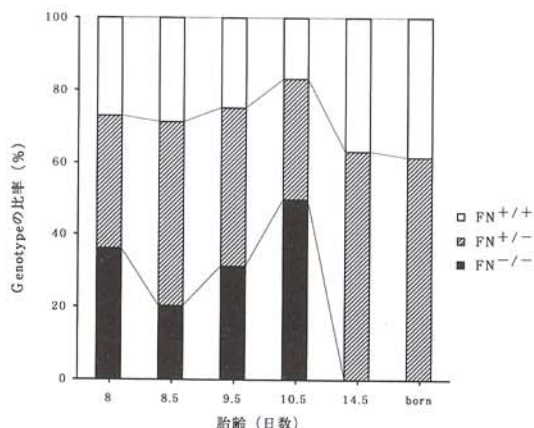


図2 胎齢ともなうFN<sup>+/+</sup>, FN<sup>+/-</sup>, FN<sup>-/-</sup>マウスの個体数の比率変化(文献11より引用, 改変, 転載許可取得). FN<sup>-/-</sup>の胚は胎齢8日以降異常を呈し, 胎齢14.5日までに子宮内ですべて死亡した.

であるが, FN<sup>-/-</sup>マウスでは全く観察されず, 脊索も組織化されなかった. 更に, 心臓の発達が不全で, 重度のものでは心臓原基が融合せず, 軽度のものでも心筋組織の肥厚や心内膜の形態異常が認められた. 血管形成も不全で, 原始血球細胞は胚外体腔に蓄積されていた. 羊膜や卵黄嚢は存在するが, 小型で位置も異常であった. これらのFN<sup>-/-</sup>マウスに認められる異常の原因は, FNを欠損することにより中胚葉の遊走や増殖が阻止され, 中胚葉の量的欠乏と相俟って中胚葉由来の各組織の形成不全が起きるためという.

その後, Georges-Labouesseらは, FN<sup>-/-</sup>マウス胚において, 脊索や体節の前駆細胞は正常に分化するものの, 脊索および体節への凝縮・組織化にいたらないことを報告している<sup>12)</sup>. こうした結果から, これら中胚葉由来細胞の分化や遊走はFNに依存しないが, 脊索や体節の正しい形態形成にFNが深く関与するとしている.

更に, Georgeらはその後の研究で, FN<sup>-/-</sup>マウスの胚が囊胚形成期に死亡する主原因は, 心臓および血管の発達不全であるとした<sup>13)</sup>.

FN<sup>-/-</sup>マウス胚において, 心筋細胞および心内膜細胞, 血管内皮細胞は正常に分化され, 正しい位置に局在するが, 心筒(heart tube), 心内膜および大動脈といった組織への形態形成は起きず, 組織の形状も異常を呈した. 特に卵黄嚢内の血管形成は, FNが存在しないと重篤に障害された. これらの組織形成不全のメカニズムは, FNが欠損することにより, 血管形成に必要な中胚葉細胞層と内胚葉細胞層の接触が分断されるためと予測される. ただし, この2つの細胞層の分断が, 細胞とECMの接着が障害されることによるのか, 細胞表面のインテグリンレセプターを介した細胞-細胞間の情報伝達に欠陥が生じるためなのかは, 未だ特定されていない.

## おわりに

以上を要約すると, ①FN<sup>-/-</sup>マウスの血中FN濃度は, 野生型マウスの約半分であったが, 正常に生育する. ②FN<sup>-/-</sup>マウスは, 胎齢8.0日から, 中胚葉の欠乏に由来する各組織の形成不全, 神経管のねじれ, 心臓および血管形成不全等が認められ, 胎齢14.5日までに子宮内で死亡する. ③FN<sup>-/-</sup>マウスの致死性障害の原因は, 特に心臓および血管の発達不全であり, FNの欠損により血管形成に必要な中胚葉細胞層と内胚葉細胞層の接着が分断されるためと考えられる. これらのことから, FNは囊胚形成期における中胚葉の遊走, 接着, 増殖, 分化に深く関与す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) Mosher DF, Fogerty FJ, Chernousov MA, Barry ELR: Assembly of fibronectin into extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci* 614: 167-180, 1991.

- 2) Jan McDonagh: Plasma Fibronectin. New York, Marcel Dekker Inc.: 1985.
- 3) Hirano H, Yamada Y, Sullivan M, de Crombrughe B, Pastan I, Yamada KM: Isolation of genomic DNA clones spanning the entire fibronectin gene. Proc Natl Acad Sci USA **80**: 46-50, 1983.
- 4) Ayad S, Boot-Handford RP, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA: Fibronectin: The Extracellular Matrix *Facts Book*. London, Academic Press Ltd, 104-107, 1994.
- 5) Wu BL, Milunsky A, Wyandt H, Hoth C, Baldwin C, Skare J: *In situ* hybridization applied to Waardenburg syndrome. Cytogenet Cell Genet **63**: 29-32, 1993.
- 6) Romberger DJ: Fibronectin: Int J Biochem Cell Biol **29**: 939-943, 1997.
- 7) 前田利長, 関口清俊: フィブロネクチンおよび類縁接着蛋白質とそのレセプター, 松田道生, 鈴木宏治, 編集, 「止血・血栓・線溶」東京, 中外医学社, 26-32, 1994.
- 8) Xia P, Culp LA: Adhesion activity in fibronectin's alternatively spliced domain EDa (EIIIA): Complementarity to plasma fibronectin functions. Exp Cell Res **217**: 517-527, 1995.
- 9) Chen W, Culp LA: Adhesion mediated fibronectin's alternatively spliced EDb (EIIIB) and its neighboring type III repeats. Exp Cell Res **223**: 9-19, 1996.
- 10) Manabe R, Oh-e N, Maeda T, Fukuda T, Sekiguchi K: Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. J Cell Biol **139**: 295-307, 1997.
- 11) 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.
- 12) Georges-Labouesse EN, George EL, Rayburn H, Hynes RO: Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. Developmental Dynamics **207**: 145-156, 1996.
- 13) 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.