

平成 27 年 5 月 7 日

平成 26 年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：大分大学医学部

職名：助教

氏名：佐々木 隆子

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：細胞外基質分子 fibulin-4 の腱・靭帯機能維持における役割解明
2. 再生医科学研究所共同研究者： 開 祐司 教授
3. 研究期間：平成 26 年 4 月 1 日～平成 27 年 3 月 31 日
4. 研究経過及び研究成果：

弾性線維形成に必須である細胞外マトリックスタンパク質 fibulin-4 欠損マウスのすべてに前肢拘縮が観察される。これまでの解析で、前肢拘縮の原因は伸筋腱の切断によることが明らかになった。腱の形成自体は正常に進行するが、胎生期 17.5 日ごろから一部切断が観察され始める。これらの結果から、fibulin-4 は腱・靭帯の形成過程ではなく、これらの機能維持に重要であることが示唆されるが、fibulin-4 欠損マウスは大動脈または横隔膜破裂により生後 1 日目に死亡するため生後の解析は不可能である。そこで、本研究では fibulin-4 の腱・靭帯の機能維持における役割の解明を目的とし、腱・靭帯特異的 fibulin-4 欠損マウスの作製ならびにその解析を行った。

Fibulin-4 flox マウス (Horiguchi et al., PNAS, 2009) は関西医大・中邨先生から分与していただき、京都大学再生医科学研究所・開研究室で樹立された腱・靭帯特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェクマウス (Scx-Cre) (Sugimoto et al., Genesis, 2013) と交配した。Scx-Cre マウスには Cre recombinase を低発現と高発現する二系統あるので、まずは低発現のマウスと交配し、腱・靭帯特異的 fibulin-4 欠損マウスの作製を試みた。しかし、このマウスでは前肢拘縮は認められず、fibulin-4 の欠失も不十分であったため、次に高発現マウスと交配した。こうして生まれた *Fbln4<sup>flox/flox</sup> ScxCre-H(+)* は前記マウス同様に、外見上の異常は認められず、図 1 に示すように前肢伸筋腱の構築にも異常は認められなかった。また、アキレス腱を主とする後肢の腱より I 型コラーゲンを抽出したが、fibulin-4

欠損マウスの骨で観察されたような酸で溶解されるコラーゲンの増加 (Sasaki et al., 未発表) は認められなかった (図2)。尾から分離した腱細胞での fibulin-4 mRNA は70%まで低下していた。一方、横隔膜の免疫染色では、fibulin-4 の発現はコントロールと比べて変化なかった。

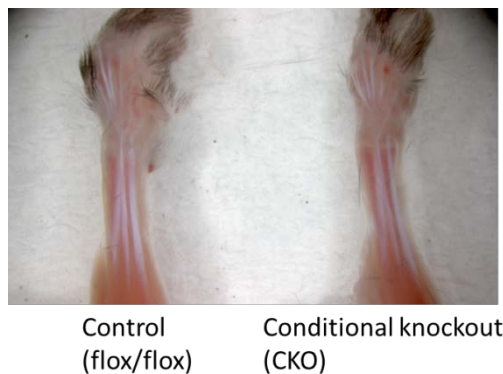


図1 前肢伸筋腱

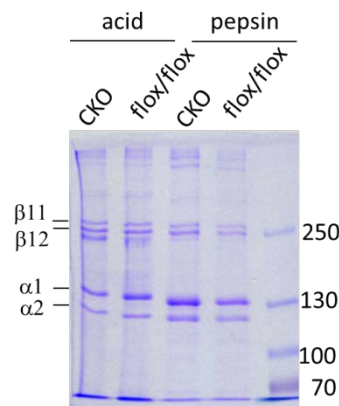


図2 後肢腱から抽出したI型コラーゲン  
まず0.5M酢酸で抽出後(acid)、さらに不溶性成分をペプシン消化した(pepsin)。酢酸処理により酸感受性の架橋が切断される。

これまでの結果は、fibulin-4 の遺伝子の構造上欠失が起こりにくいこと、または、腱の周辺組織からの fibulin-4 が腱で機能している可能性を示唆している。前者の可能性を改善するために、現在 *Fbln4<sup>flox/-</sup>* と *ScxCre-H* との交配によるマウスの作製を進行中である。今後、得られたマウスの腱の機能変化 (張力等) に焦点をあて解析を進め、fibulin-4 の腱・靭帯における役割を解明したい。

## 文献

- Horiguchi M., Inoue T., Ohbayashi T Hirai M., Noda K., Marmorstein L.Y., Yabe D., Takagi K., Akama T.O., Kita T., Kimura T., and Nakamura T. (2009) Fibulin-4 conducts proper elastogenesis via interaction with cross-linking enzyme lysyl oxidase. PNAS 106:19029-19034.
- Sugimoto Y., Takimoto A., Hiraki Y and Chukunami C. (2013) Generation and characterization of *ScxCre* transgenic mice. Genesis 51: 275-283.

## 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト (掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可)、学会発表等