

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号： 14301  
 研究種目： 基盤研究(B)  
 研究期間： 2010～2012  
 課題番号： 22370076  
 研究課題名（和文） メタロプロテアーゼに依存した血液循環開始機構の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of the metalloprotease-dependent onset of blood circulation  
 研究代表者  
 瀬原 淳子 (SEHARA ATSUKO)  
 京都大学・再生医科学研究所・教授  
 研究者番号： 60209038

研究成果の概要（和文）：ゼブラフィッシュ胚のライブイメージングにより、赤血球の循環開始の瞬間を捉えることに成功した。それを用いて、血液循環の開始には赤芽球と血管の接着の解除が必要であること、その過程には赤芽球で発現する ADAM8が必要であること、その接着の解除は血管形成の制御にも関与することを明らかにした。またマウスの筋再生において、ADAM8が好中球や単球などの炎症細胞に発現し、損傷を受けた骨格筋の除去に関与していることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：We succeeded to observe the onset of erythrocyte circulation in living zebrafish embryos. We could show that the start of blood circulation requires detachment of erythrocytes from blood vessels, in which process ADAM8 expressed in erythrocytes participate. Moreover, erythrocytes-blood vessel detachment dependent on ADAM8 was involved in the blood vessel development. ADAM8 is expressed in inflammatory cells such as neutrophils and monocytes during muscle regeneration in mice, and this protease is required for the removal of injured muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：メタロプロテアーゼ、ADAM8、造血、血液循環、赤芽球、血管、ゼブラフィッシュ、細胞間接着

## 1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュにおいて最初に生まれる赤血球は intermediate cell mass (ICM) と呼ばれる背側大動脈周辺の領域に血島様構造を形成してそこから発生する。しかし、赤血球がどのような機構で体内を循環し始めるのかに関しては、魚類においても未解明なところが多い。特に、心臓の拍動・血管形成への依存に加えて、血球・血管相互作用に依存する制御があるのかどうかは不明であった。一方、成体型の赤血球は明らかに循環系確立後に産生されるわけであるが、こちらに関しても循環開始のメカニズムは殆ど未解明である。

我々は胚発生における血液循環開始機構を解明する目的で、血管を GFP (Fl1:GFP)、血球を RFP (GATA-1:RFP) でラベルしたゼブラフィッシュ胚を用いて、

赤血球がどのように循環を開始するかを詳細に観察し、血球の循環開始の瞬間を、ライブイメージングにより捉えることに初めて成功した。その結果、赤血球の循環は、(1) 心臓の拍動・血管形成のプロセスと密接にリンクしているが、心臓の拍動による血漿の循環より遅れて開始する、(2) 大動脈腹側に集積した赤血球前駆細胞は、transmigration によって次々に大動脈内に出現するが、(3) 個別に循環を開始するのではなく、ある時期にほぼ同調的に循環を開始する、という厳密に制御されたプロセスであることが明らかになってきた。

我々はさらに、(2) から (3) への移行の際、赤血球が血管から遊離することを観察し、(4) この過程が血管内のメタロプロテアーゼ活

性を必要とすることを示した。拍動直前の24時間胚の心臓内にメタロプロテアーゼインヒビターを注入すると、血管内に赤血球が血管内に接着・集積し、血液循環が開始できないことから、赤血球循環開始には、プロテアーゼに依存した血球-血管細胞間の接着の解除が必要であることが示唆されたのである。(5)そして、その過程に関与するメタロプロテアーゼのひとつとして、主に血球で発現するADAM8を同定し、

(6)ADAM8が、培養細胞において血球と血管の接着に関与することが知られるPSGL1を切断する活性を有し、活性型メタロプロテアーゼとして機能しうることをつかてきた。このような血液循環開始機構に関わる新たな遺伝子の同定、それによってそのような血球と血管の相互作用・接着の解除が果たす役割の解明が必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

脊椎動物発生過程において最初の造血の場(ほ乳類では卵黄嚢壁の血島)では主に胎児型赤血球が産生されるが、意外にも、そこで産生される赤血球がどのように循環し始めるのか、その制御機構は殆ど解明されていない。この状況でまず明らかにすべきことは、その循環開始が単に心臓・血管からなる循環系の確立という受動的プロセスにのみ依存するのか、あるいは血球自体や血球・血管相互作用に依存する能動的プロセスも必要とするのか、という根本的な問題である。我々はゼブラフィッシュ胚のライブイメージングにより、胎児型赤血球の循環開始が循環系内で働くメタロプロテアーゼ活性に依存すること、血球で高発現する膜型メタロプロテアーゼADAM8を必要とすることを発見した(投稿中)。本研究はその発見を発展させ、血液循環開始機構をADAM8を中心とする血球血管の相互作用・接着制御の観点から解明し、能動的プロセスとしての循環開始機構の存在を証明したい。さらにADAM8に依存したプロテオリシスの時間的空間的制御を生きた個体で捉えることによって、心臓の拍動や血管形成とどのようにリンクしているか、を明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

「ADAM8は赤血球前駆細胞で発現し、その血球表面の接着因子の切断によって血球・血管の接着を解除する」という作業仮説を検証するため、次のような研究方法を用いた。

平成22年度

実験① 血液循環開始においてADAM8を必要とする細胞系譜の解明

ADAM8は膜型のメタロプロテアーゼであり、cDNAの1塩基置換により、その活性中心のグルタミン酸残基をグルタミンに変換したもの(ADAM8EQ)を作成すると、不活性な分子ができる。そのことを、培養系で確かめたあと、このcDNAをGATA-1プロモーター制御下で発現させるプラスミドをインジェクションして、血球特異的にADAM8EQを発現させ、ドミナントネガティブ効果が見られないかどうかを検討した。

実験② マウスを用いた、血液循環開始のプロテアーゼ制御の普遍性の検討

ドイツのJ. Bartsch博士との共同研究として、彼のグループからADAM8ノックアウトマウスの提供を受けた。このマウスは、赤芽球の循環には致死となるような異常は見られない。従って、他の血球、マクロファージおよび好中球での発現と機能を、それらの炎症細胞の寄与が調べられている、筋再生の系を用いて、ADAM8の役割を調べた。

平成23・24年度

実験① ADAM8により解除される赤芽球-血管接着の分子実体の解明

実験② 血液循環開始におけるADAM8の基質の同定  
これまでの報告からL-selectinを、ESTの検討からセレクチンリガンドPSGLを基質候補として検討し、これらをHEK293細胞にADAM8あるいはADAM8EQと共発現することによって、基質となりうるかを検討した。

また、抗vinculin抗体を用いて、インテグリンを介する接着が影響をうけていないかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

まず、血液循環開始にADAM8を必要とする細胞を検討した。一般に、プロテアーゼ変異型ADAMタンパク質の過剰発現は、発現細胞にドミナントネガティブ効果をもたらす。その性質を利用して、コントロール胚にプロテアーゼ変異型ADAMであるADAM8EQをGATA-1プロモーター制御下で発現させることにより、赤芽球細胞特異的なADAM8阻害を行ったところ、ドミナントネガティブフォームを発現する赤芽球は血管に接着して循環をスタートすることができなかつた。このことから、ADAM8は、赤芽球で必要とされることと同時に、赤芽球循環開始にはADAM8のプロテアーゼ活性が必要であることを示すことができ、血液細胞は自ら、血管からの接着を解除することにより、循環を開始する、という血液循環の新しいメカニズムを提唱することができた(Iida et al., *Current Biol.*, 2010)。ADAM8に依存した血球と血管の接着解除が起こらない場合、接着斑を示すVinculinの発現が上昇することから、この接着がインテグリンに依存する、示唆的な結果を得ることができた。血球と血管の接着制御をモニターするため、赤芽球のF-アクチンをモニターするゼブラフィッシュ系統を作製し、循環開始時の赤芽球のfilopodiaの動きをモニターする実験系を構築した。

次に、ADAM8が接着を解除できない場合に、血管にどのような変化が起こるかを検討した。その結果、接着が解除できないと、節間動脈の伸長が阻害されることを見いだした。さらに、節間動脈伸長時に節間動脈や大動脈において発現する遺伝子発現の異常として、血管のNotchシグナルに異常が生ずることがわかった。さらに、ここで血球と血管の接着に関わるインテグリンを同定し、モルフォリンによりその発現をおさえると、大静脈の形成異常が見いだされた。これらの結果からADAM8は、血管形成に必要な血球-血管のインテグリン依存的な接着を解除し、血液循環の開始とともに、血管形成に関わることを示した。これらの結果は、血液循環と血管形成開始の同期にこのプロテアーゼが関与することを示唆している。

一方、マウスにおけるADAM8の役割について、筋再生をモデルとして解析を行った。筋再生において、ADAM8は筋損傷後1日目に、好中球・単球を中心とする血球系で強く発現することがわかった。ADAM8ノックアウトマウスでは、好中球や単球は、再生部位に概ね到達し、筋再生も起こるが、損傷を受け壊死を起こした骨格筋がこれらの炎症細胞によって除去する活性が不完全であることがわかった。ADAM8の作用点・基質について、この系を用いて検討中である。

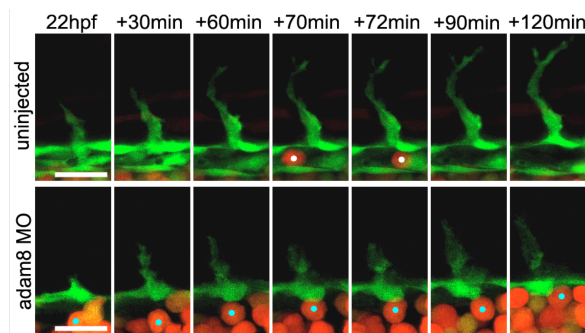
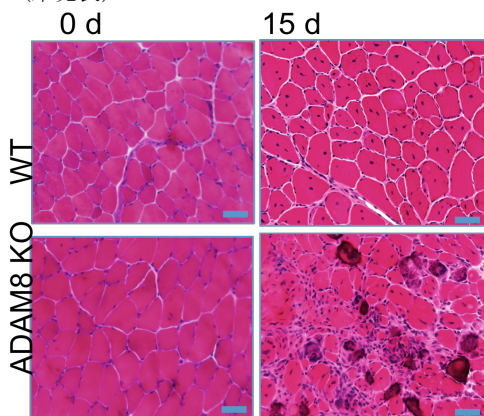


図1 ADAM8欠損胚では血管形成に遅れが生ずる (未発表)



H&E staining of transverse sections of TA muscle at day 0 and day 15 after injury

図2 ADAM8欠損マウスでは、筋再生時の炎症が不完全で筋壊死が起こりやすくなる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

① Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles and Functions of Meltrin beta / ADAM19. Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edition (Editor in Chief: Rawlings & Salvesen) 査読有、2013 Academic Press

② Suzuki, K., et al. Activity-dependent Proteolytic Cleavage of Neuroligin 1 Neuron, 査読有、76(2): 410-22, (2012) DOI: 10.1016/j.neuron.2012.10.003.

③ Frohlich, C., et al. ADAM12 produces by tumor cells rather than stromal cells accelerates breast tumor progression. Mol. Cancer Res. 査読有、9(11):1449-61. (2011) DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0100.

④ 飯田敦夫、瀬原淳子 ADAM8プロテアーゼによる血液循環開始の制御、II. 冠循環の基礎 冠循環系の生理学、日本臨牀 (日本臨牀社)、査読無、69巻増刊号7: 37-41 (2011)

⑤ 飯田敦夫、瀬原淳子 ADAM8による血液循環開始の制御、生化学、査読無、82(10): 921-930. (2010)

⑥ Iida, A., et al. Metalloprotease-Dependent Onset of Blood Circulation In Zebrafish. Current Biol., 査読有、20(12): 1110-1116. (2010) DOI: 10.1016/j.cub.2010.04.052.

[学会発表] (計44件)

① Atsuko Sehara: Exploring roles of ADAM proteases in development using zebrafish. 国際高等研究所研究プログラム「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」2012年度第1回研究会 (2013. 2. 23 京都府)

② 西邨大吾、飯田敦夫、坂口和弥、杉山立樹、長澤丘司、千葉彩乃、望月直樹、パーツ、J.W.、瀬原淳子: 血液の発生と挙動におけるADAM8の役割、第35回日本分子生物学会年会 (2012. 12. 13 福岡県)

③ 瀬原淳子: ゼブラフィッシュの筋維持における増殖因子の役割とその制御、第26回日本宇宙生物科学会 (2012. 9. 28 徳島県)

④ Atsuko Sehara-Fujisawa: Exploring Roles of ADAM Proteases in Development using Zebrafish. (2012. 7. 26 Singapore, Singapore)

⑤ 瀬原淳子: 生きたゼブラフィッシュを用いてADAMプロテアーゼの役割と機能に迫る、第12回日本抗加齢医学会総会 (2012. 6. 24 神奈川県)

⑥ 瀬原淳子: 異なる細胞間の相互作用におけるADAMプロテアーゼの役割、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「動植物に共通するアロ認証機構の解明」シンポジウム「細胞間相互認識とアロ認証」(2012. 1. 11 茨城県)

⑦ Atsuo Iida, Kazuya Sakaguchi, Daigo Nishimura, Anna Tomozawa, Atsuo Kawahara, Atsuko Sehara-Fujisawa: 生きたゼブラフィッシュを用いて血管形成の新しいメカニズムに迫る、第84回日本生化学会大会 (2011. 9. 21 京都府)

⑧ Atsuo Iida, Kazuya Sakaguchi, Anna Tomozawa, Daigo Nishimura, Atsuo Kawahara, Atsuko Sehara-Fujisawa: A Role of ADAM8 in the Onset of Blood Circulation. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, KumamotoUniversity (2011. 9. 9 熊本県)

⑨ Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of Meltrin beta (ADAM19) in development of peripheral nervous system. The 5th Asia-Oseania Zebrafish Meeting. (2011. 8. 27 北京、中国)

⑩ Atsuko Sehara-fujisawa: Roles of ADAM19 in nervous system development in zebrafish. Gordon Research Conference "Metalloproteinase Research at the intersection of Basic Science and Applied Medicine" (2011. 8. 7 Smitnfield, RI, USA)

⑪ Atsuko Sehara-Fujisawa: A roles of ADAM8 in the onset of blood circulation. The 7th Aso International Meeting (2011. 7. 30 熊本県)

⑫ Atsuko Sehara-Fujisawa: The Role of ADAM and RIP Proteases in Development and Beyond. Gordon Research Conferences "Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins" (2011.7.10 Davidson, USA)

⑬ 瀬原淳子: Roles of ADAM proteins in spatial and temporal regulation of ectodomain shedding events. BMB2010 (2010.12.9 兵庫県)

⑭ Atsuko Sehara-Fujisawa: Metalloprotease-dependent regulation of nerve regeneration. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting Jointly with Japanese Society of Developmental Biologists. (2010.8.5 Albuquerque, USA)

⑮ Atsuo Iida, Kazuya Sakaguchi, Kiyooki Sato, Hidetoshi Sakurai, Daigo Nishimura, Aya Iwaki, Makoto Kobayashi, Shigenobu Yonemura, Atsuo Kawahara, and Atsuko Sehara-Fujisawa: Metalloprotease-Dependent Onset of Blood Circulation In Zebrafish. 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology (2010.5.16 Paris, France)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬原 淳子 (SEHARA ATSUKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号: 60209038

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: