

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18549

研究課題名(和文)細胞接着を基盤とした赤芽球の血管内侵入機構の解析

研究課題名(英文) Analysis for a mechanism of erythroblast migration based on intercellular adhesions

研究代表者

飯田 敦夫 (Iida, Atsuo)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：90437278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血液循環の開始にあたり、赤血球の前駆細胞である赤芽球が、どのような仕組みで血管内皮細胞と相互作用して移動するかを解析した。細胞接着に関わるインテグリン $\beta$ 1因子を赤芽球で機能阻害したゼブラフィッシュ胚では、顕著な異常は見られなかった。一方、血管内皮細胞での機能阻害で、血管形成の異常や頭部での出血を観察した。本研究により、インテグリン $\beta$ 1の機能の一端が明らかになると共に、研究に有用なゼブラフィッシュ系統の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトやマウスなどの哺乳類では、発生初期の母体内で進行する現象を観察することは容易ではない。生命活動に必須の血液循環が開始する機構も、この例外ではない。この点に関して、体外受精で体づくりが進行する魚類(ゼブラフィッシュ)を使うことで解決を試みた。特定の遺伝子の機能を任意の細胞で阻害できる技術を用い、血管内皮細胞でのインテグリン $\beta$ 1の機能が血管形成とその維持に関わることを明らかにした。本研究で開発したゼブラフィッシュ系統は、他の研究にも応用することが可能であるため、国内外の共同研究先に譲渡できるように体制を整える。

研究成果の概要(英文)：I investigated how erythroblasts migrate into vascular tubes prior to onset of blood circulation. There were no apparent phenotypes in the zebrafish embryo which lacks an integrin  $\beta$ -1 activity in erythroblasts. On the other hands, I found blood vessel abnormalities and cephalic hemorrhage in the endothelial cell-specific integrin  $\beta$ -1 inhibition zebrafish. I revealed the integrin  $\beta$ -1 functions in zebrafish and generated useful transgenic zebrafish line for related studies.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 血管 血球 インテグリン 蛍光ライブイメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血液循環は酸素や栄養分を身体中に運搬する、生命維持に必須の機構である。だが、血管と血球の前駆細胞がどのように振る舞い、管状構造の中を血球が流れる一連のシステムを形作るかは分からないことが多かった。これは、マウスを始めとする哺乳類において、血液循環システムの成立が母体内で起こる現象であり、自然状態での細胞の振る舞いを生きた状態で観察することが難しかったことに起因する。研究代表者は体外受精で発生するゼブラフィッシュをモデルに用い、血液循環開始の瞬間を生きた個体で観察した。血管内皮細胞と赤芽球がそれぞれ異なる蛍光タンパク質 (GFP, RFP) で標識された遺伝子組み換えゼブラフィッシュを用い、血管外で発生した赤芽球が血管内皮細胞と相互作用しながら血管内へと侵入する様子を観察した。侵入の過程で赤芽球と血管内皮細胞は細胞接着を形成しており、それが血管内侵入の足場となっていると推測された。だが接着を担う責任因子と、移動に際し能動的に運動する細胞とそのメカニズムは不明であり、血液循環開始に伴う分子機構の全容解明には更なる検証が必要であった。そこで我々は、遺伝学的手法と光学的手法を組み合わせ、血液循環の成立に関わる細胞間相互作用の解明を目指して本研究計画を提案した。

### 2. 研究の目的

注目している現象は、受精後 20-30 時間付近のゼブラフィッシュ胚で起こる赤芽球の血管内侵入プロセスである。ライブイメージング観察では、運動能を持ちアメーバ状に変形した赤芽球が主体となって細胞移動しているように見える。しかし可能性として、血管内皮細胞が運動の主体となって赤芽球を内部に引き込んでいる可能性も考えられる。したがって本研究では、全身の細胞で遺伝機能が欠損する突然変異個体の観察に加え、Gal4-UAS システムによる任意の細胞での外来遺伝子発現システムを利用し、血管内皮細胞あるいは赤芽球のみで標的遺伝子の機能阻害実験を設計した。本研究では細胞間相互作用のインターフェイスを構成する、細胞表面の接着因子群および膜型プロテアーゼ因子群に着目した。接着因子は細胞間の相互作用に正に働き、互いを足場にした移動の原動力となり得る。膜型プロテアーゼ因子は接着因子や細胞外基質 (ECM) の分解に関わることで、細胞の遊離と移動能の向上に関与し得る。本研究課題では赤芽球の血管内移動に関わる分子機構の理解を通じ、脊椎動物の形態形成に寄与する細胞間相互作用に関する知見を深める。

### 3. 研究の方法

細胞接着の責任因子としてインテグリン  $\beta 1$  に注目した。本研究ではインテグリン  $\beta 1$  変異体ゼブラフィッシュを同定し、材料として用いた。また任意の細胞における遺伝学的操作のために、Gal4-UAS システムを利用した実験系を構築した。血管内皮細胞で標的因子を発現させるために、*fli1:Gal4* システムを入手した。赤芽球で標的因子を発現させるために、*gata1:Gal4* システムを作出した。Gal4 存在下でインテグリン  $\beta 1$  の機能を阻害するために、UAS 下流にインテグリンドミナントネガティブ分子を挿入した UAS:*itgDN* システムを作出した。インテグリンドミナントネガティブは哺乳類や線虫における先行研究に倣い、インテグリン細胞外領域を欠失させた配列を用いてデザインした。上記の Gal4 システムと UAS システムを掛け合わせ、標的細胞におけるドミナントネガティブ因子の発現を確認した。その後、血管と血球が蛍光タンパク質で可視化された *fli1:GFP* および *gata1:GFP* 遺伝子組み換え系統との掛け合わせを行い、任意の細胞におけるインテグリン機能阻害が血管および血球の動態に与える影響を評価した。蛍光観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞レベルの蛍光観察を実施した。

#### 4 . 研究成果

赤芽球でインテグリン  $\beta 1$  の機能障害を実施したゼブラフィッシュは、見た目上は正常に発生し、少なくとも血液循環成立に伴う顕著な表現型は認められなかった。血管内皮細胞特異的な機能障害系統においても、当初の目的に掲げた赤芽球移動に関わる表現型は観察されなかった。したがって、インテグリン  $\beta 1$  は赤芽球の異動に関与していない、もしくは冗長的に機能する他の因子の存在することが示唆された。一方で、血管内皮細胞特異的なインテグリン  $\beta 1$  の機能障害では、脈管径の縮小や頭部における出血の表現型が観察された。上記の表現型は、インテグリン  $\beta 1$  変異体においても再現された。このことから、インテグリン  $\beta 1$  が血管内皮細胞の成熟や安定性に関与していることが示唆された。以上の内容をまとめて論文発表を行った (Iida et al., 2018)。また、本研究課題に関連して開発したゼブラフィッシュ系統および実験手法を活用し「ADAM12 ノックアウトゼブラフィッシュの解析 (Tokumasu et al., 2016)」「メダカ受精卵における前核融合のライブイメージング (Inoue et al., 2016)」「乳癌細胞の転移メカニズムの解明 (Itou et al., 2017)」「心臓弁形成における接着斑の役割 (Gunawan et al., 2019)」「造血幹細胞の発生におけるインテグリンの役割 (Rho et al., 2019)」の 5 報の論文発表に寄与した。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Rho SS, Kobayashi I, Oguri-Nakamura E, Ando K, Fujiwara M, Kamimura N, Hirata H, Iida A, Iwai Y, Mochizuki M, Fukuhara S\*. Rap1b Promotes Notch Signal-Mediated Hematopoietic Stem Cell Development by Enhancing Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Developmental Cell* 49 (2019) 1-16.
2. Gunawan F, Gentile A, Fukuda R, Tseke AT, Jimenez-Amilburu V, Ramadass R, Iida A, Sehara-Fujisawa A, Stainier D\*. Focal adhesions are essential to drive zebrafish heart valve morphogenesis. *Journal of Cell Biology* 218 (2019) 1039-1054.
3. Iida A\*, Wang Z, Hirata H, Sehara-Fujisawa A. Integrin  $\beta 1$  activity is required for cardiovascular formation in zebrafish. *Genes to Cells* 23 (2018) 938-951.
4. Itou J\*, Tanaka S, Li W, Iida A, Sehara-Fujisawa A, Sato F, Toi M. The Sal-like 4 - integrin  $\alpha 6\beta 1$  network promotes cell migration for metastasis via activation of focal adhesion dynamics in basal-like breast cancer cells. *BBA Molecular Cell Research* 1864 (2017) 76-88.
5. Inoue T<sup>†</sup>, Iida A<sup>†</sup>, Maegawa S, Sehara-Fujisawa A, Kinoshita M\*. Generation of a transgenic medaka (*Oryzias latipes*) strain for visualization of nuclear dynamics in early developmental stages. *Development, Growth & Differentiation* 58 (2016) 679-687.
6. Tokumasu Y<sup>†</sup>, Iida A<sup>†</sup>, Wang Z, Ansai S, Kinoshita M, Sehara-Fujisawa A\*. ADAM12-deficient zebrafish exhibit retardation in body growth at the juvenile stage without developmental defects. *Development, Growth & Differentiation* 58 (2016) 409-21.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Atsuo Iida, Zi Wang, Atsuko Sehara-Fujisawa. Endothelial cell-specific Integrin $\beta$  1 inhibition results reduction of vascular diameters and induction of cephalic hemorrhage. 第 23 回 小型魚類研究会, 山梨県立図書館, 2017 年 8 月
2. 飯田 敦夫. 小型魚類ゼブラフィッシュを使った発生機構の研究. 第 2 回次世代生命科学の研究会, 九州大学, 2017 年 7 月
3. 飯田 敦夫. ゼブラフィッシュを用いた血管・血球分化の研究. 第 3 回血管生物若手研究会, 淡路夢舞台, 2017 年 3 月
4. 井上 喬允, 飯田 敦夫, 前川 真吾, 瀬原 淳子, 木下 政人. メダカ受精卵の前核および細胞核の生きた状態での可視化. 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2016 年 12 月
5. 徳増 雄大, 飯田 敦夫, 王 梓, 安齋 賢, 木下 政人, 瀬原 淳子. マウスで肥満に関わる ADAM12 遺伝子のゼブラフィッシュ変異体の樹立. 第 2 回ゼブラフィッシュ創薬研究会, みんなの森 ぎふメディアコスモス, 2016 年 11 月
6. 飯田 敦夫. 魚を使った研究とかどうでしょう? 第 1 回次世代生命科学の研究会, 徳島大学, 2016 年 8 月

〔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:

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:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：王 梓

ローマ字氏名：Zi Wang

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。