

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291051

研究課題名(和文) 多段階プロセスとしての胎児型赤芽球の循環開始機構の解明

研究課題名(英文) Analyses of the onset of embryonic blood circulation as multi-step processes

研究代表者

瀬原 淳子 (Sehara-Fujisawa, Atsuko)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：60209038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：膜貫通型プロテアーゼADAM8はゼブラフィッシュにおいて血液循環の開始に関わる(Iida et al., 2010)。血液循環機構のさらなる理解のため、ADAM12の解析を行った。ADAM12-GFP BACTgフィッシュの作成によりADAM12が胚の血球・血管で発現することがわかったが、ADAM12ノックアウトフィッシュでは造血や血管形成には顕著な影響はなかった(Tokumasu et al., 2016)。一方ADAM8欠損マウスの解析により、ADAM8が、筋再生に先行する炎症細胞の損傷筋への浸潤・壊死繊維の除去により、筋再生に関わることを見出した(Nishimura, 2015)。

研究成果の概要(英文)：We investigated roles of ADAM8 in blood development and in inflammatory reactions prior to regenerative myogenesis, by which injured myofibers are eliminated to make new one. No evident defects were observed in ADAM8 knockout (KO) mice. We showed that efficient elimination of injured myofibers during regeneration requires ADAM8. Upon cardiotoxin-induced skeletal muscle injury, neutrophils invade into myofibers through the basement membrane and cluster in wild type, but not in ADAM8 KO mice although neutrophils of the latter infiltrate into interstitial tissues similarly to those of wild type mice. Neutrophils lose their adhesiveness to blood vessels after infiltration, which involves an ectodomain shedding of PSGL-1 on their surface. Expression of PSGL-1 on the surface of neutrophils remain higher in ADAM8 KO than in wild type mice, suggesting that ADAM8 mediates the invasion of neutrophils by the removal of their adhesiveness to blood vessels after infiltration into injured muscle.

研究分野：発生生物学・細胞生物学

キーワード：ADAMプロテアーゼ 血管形成 血液循環 造血 ゼブラフィッシュ ライブイメージング 再生 インテグリン

1. 研究開始当初の背景

発生過程で最初に胎内を循環する胎児型赤血球は、やがて造血幹細胞から産生される赤芽球に置き換わる。ひとつの疑問は、一過的出現にも関わらずその存在が脊椎動物で保存されている意義である。本研究は主にゼブラフィッシュを用いて、その疑問の解決に挑む。

2. 研究の目的

造血幹細胞とは異なり、胎児型赤血球は一過的に出現するだけだが、その存在は脊椎動物でよく保存されており、そこには重要な存在意義が隠されているだろう。我々は生きたゼブラフィッシュ胚の胎児型赤血球の循環開始過程を観察し、これらの血球が、最初の造血の場である背側大動脈の腹側において(1)動静脈と分離し、(2)血管内腔に侵入後、(3)膜型プロテアーゼ ADAM8 依存的に血管との接着を解除して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により循環を開始することを見いだした (Iida *et al.*, *Curr Biol.*, 2010)。本研究はこれら一連の血球の挙動の制御機構を解明し、これらのプロセスの赤血球分化・血管形成への関わりを明らかにする。また、マウスにおいて同様の血球分化・血管形成機構の存在を検証する。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュとマウスを用いて、次の研究を行う。

実験①胎児型赤血球循環開始過程に関わる分子機構の解明：血管と血球を異なる蛍光タンパク質でラベルしたゼブラフィッシュ胚を用いて、胎児型赤血球の循環開始に関与する分子群を同定し、その多段階プロセスの分子機構を明らかにする。

実験②赤血球分化・血管形成における各プロセスの位置づけ・生物学的意義の検証：ADAM8 および上記同定因子群の欠損胚の赤血球・血管内皮での遺伝子発現や血管形成への影響を調べ、赤血球分化・血管形成における個々のプロセスの役割を明らかにする。

実験③血球循環開始に関わる分子の、哺乳類における役割：この赤血球循環開始機構、血球分化・血管形成制御機構が哺乳類でどのように働いているかを、マウスを用いて検証する。

4. 研究成果

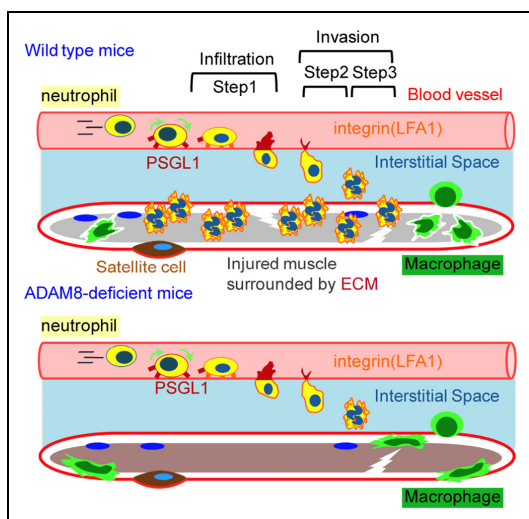
脊椎動物発生過程において最初の造血の場(ほ乳類では卵黄囊壁の血島)では主に胎児型赤血球が産生されるが、意外にも、そこで産生される赤血球がどのように循環し始めるのか、その制御機構は殆ど解明されていなか

った。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。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解明をめざしてきた。その結果、ADAM8 に依存する血液循環の開始がないと、血管における Notch シグナルに異常が生じ、Notch のリガンドである Dll4・Notch の下流ではたらく hey2 の発現上昇がみられること、それは、ADAM8 のドミナントネガティブフォームを血球で発現しても同様に見られることから、血球の血管への接着が、血管の分化を妨げて、その結果、節間動脈の形成が妨げられることがわかった。また、ADAM10 という他のプロテアーゼのノックダウンでは、さらに早期に血管形成が妨げられること、血球で発現するインテグリンや細胞外基質の変異体においても、血管形成初期でその制御をおこなっていることを見いだした。

一方、ほ乳類における ADAM8 の役割を探るため、ADAM8 ノックアウトマウスの解析も行っている。ADAM8 ノックアウトマウスは、赤血球の循環には異常がなかった。そこで、ADAM8 を強く発現する炎症性の細胞である好中球・マクロファージに着目し、これらの細胞の挙動を ADAM8 が制御している可能性を検討した。

ADAM8 の炎症への関与を検証するため、骨格筋損傷に伴う炎症・筋再生過程における ADAM8 の役割と機能を探った。カルジオトキシンによりマウスに筋損傷を与え、ADAM8 の発現の経時変化を調べたところ、ADAM8 の発現は損傷後 1 日後にピークに達した後に徐々に減少した。ADAM8 は、損傷後 1 日後の筋肉では CD45 (+) の白血球成分特異的に強く発現し、それを表面抗原マーカーである Ly6G、Ly6C を用いてさらに分画すると、好中球成分である Ly6G (+) Ly6C (-) の集団で特に高い発現がみとめられた。次に ADAM8 の筋再生に対する寄与を評価するために、骨格筋の損傷・再生が繰り返す起こるデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス(北里大学 花岡和則博士より供与)と ADAM8 欠損マウス(Marburg 大学 J. Bartsch 博士より供与)を掛け合わせ、両方の遺伝子が欠損したマウスの骨格筋を解析したところ、このマウスでは壊死した筋繊維の顕著な残存と石灰化像の亢進が観察され、壊死細胞を取り囲む多数のマクロファージの残存が見られた。さらにカルジオトキシンによる筋損傷においても、ADAM8 欠損マウスは壊死繊維残存の亢進を示した。この際、損傷組織への単球の浸潤低下

は見られなかった。これに対し、筋損傷後の好中球の損傷組織への浸潤を免疫染色により調べると、ADAM8 欠損マウスの好中球は、損傷筋のまわりの間葉組織には野生型と同程度に浸潤するが、基底膜を越えて筋繊維内に侵入し大きな凝集塊を形成する割合が、野生型マウスの好中球に比べ顕著に減少していた。好中球は、PSGL-1/セレクトリン接着による血管内でのローリングからインテグリンを介した血管との強い接着を誘導し間葉組織へと浸潤する。好中球等の炎症細胞で発現する接着分子 P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) は細胞外ドメインの切断制御を受けることが知られており、ADAM8 はその切断制御に関与するプロテアーゼのひとつである。そこで、筋損傷後の好中球における PSGL-1 の発現を免疫染色によって調べると、好中球は間葉組織に浸潤後も PSGL-1 の細胞外ドメインを発現しているが、基底膜を越え筋繊維内侵入後の好中球ではその発現が消失することがわかり、好中球の損傷筋への侵入が PSGL-1 の細胞外ドメイン消失を伴うことが示唆された。さらにフローサイトメトリーによる解析において、野生型に比べ ADAM8 欠損マウスでは PSGL-1^{low} の好中球の割合が有意に低下しており、好中球の損傷筋組織内移動における PSGL-1 細胞外ドメイン消失への ADAM8 の寄与が示された(Nishimura D., et al., *Mechan Dev.*, 2015)。



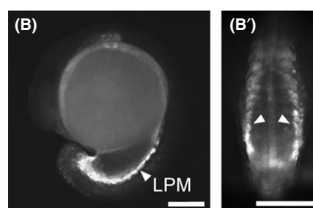
好中球除去により損傷筋の除去が不完全になることなどを考え合わせると、ADAM8 は、好中球の損傷筋繊維内への侵入を促進することにより、骨格筋再生に先行する損傷筋の効率的な除去に関与していると考えられる。そもそも、好中球が基底膜を越えて損傷筋内に入ることは、今まで報告されていなかった。そこでマルチフォトン顕微鏡を用いて、マウス筋組織の深部までの観察を行い、好中球が損傷筋内に入って行く過程を捉えるべく、好

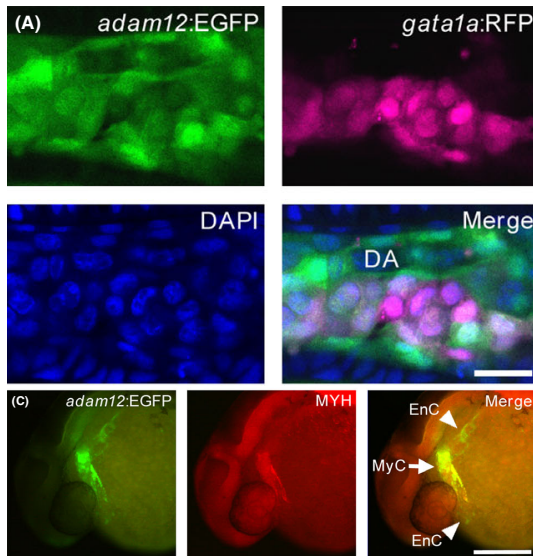
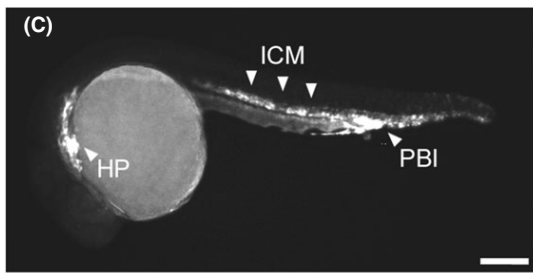
中球を可視化できるトランスジェニックマウスと骨格筋を可視化出来るマウスの掛け合わせを行い、その解析をスタートした。

一方、これまでの脈管形成モデルでは、側板中胚葉から体軸中央での脈管形成に至るまで、常に血管内皮細胞に隣り合っている赤芽球の関与については不明である。側板中胚葉に含まれる赤芽球と血管内皮細胞の前駆細胞は、互いに隣接して体軸中央へと移動する。その後、互いを足場とした細胞移動により脈管構造を構築し、赤芽球の血管内侵入を経て血液循環を開始する (Iida et al., *Curr Biol*, 2010)。このことから、発生における血液循環系の構築において、循環前には赤芽球と血管内皮は接着していることが見出された。しかし、その接着因子は不明であり、赤芽球と血管内皮の接着は脈管形成に対する意義はほとんど分かっていない。そこで本研究では、そのような赤芽球-血管内皮間接着因子、増殖因子、およびプロテアーゼの役割に着目した。接着因子として、フィブロネクチンのレセプターであるインテグリン $\alpha 4$ が赤芽球に特異的に発現しており、それとヘテロダイマーを形成するインテグリン $\beta 1$ は、赤芽球・血管両方で発現していた。そこで、標的細胞特異的にインテグリンの機能を阻害する方法として、赤芽球特異的な Gal4 発現系統 (*gatal:gal4*) と、UAS 制御下でインテグリン $\beta 1$ のドミナントネガティブを発現する系統 (UAS: *integrin-DN*) をそれぞれ作成した。樹立された系統を掛け合わせ、インテグリン $\beta 1$ が脳血管形成に関与することを見出した。

このインテグリンに着目する研究においては、脳血管形成に寄与するのが、どのタイプのインテグリンであるかを知る必要がある。まず、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ である可能性を検証すべく、そこで CRISPR-Cas9 システムを用いてインテグリン $\alpha 4$ ノックアウト (KO) フィッシュを作成した。現在、その解析を継続して行っている。

一方、血液循環機構のさらなる理解のため、プロテアーゼに着目した研究として、ADAM12 に関する研究を行った。ADAM12-GFP BACTg ゼブラフィッシュの作成により ADAM12 が胚の血球・血管で発現することがわかった (下図参照)。





さらに、ADAM12 遺伝子のノックアウトフィッシュを樹立した。血液循環や血管形成には関与していないようであるが、ADAM12 が体の大きさに関わる事を見出した (Tokumasu Y et al., *Dev Growth Diff.*, 2016)。

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 11 件)

1. Tsumagari K, Shirakabe K, Ogura M, Sato F, Ishihama Y, Sehara-Fujisawa A., Secretome analysis to elucidate metalloprotease-dependent ectodomain shedding of glycoproteins during neuronal differentiation. *Genes to Cells*. 査読有, 237-224 2017 doi: 10.1111/gtc.12466
2. Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K, Matsuzaki F, Sehara-Fujisawa A., Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing in vitro and in vivo. *Scientific Rep.*, 査読有, 6:28873, 2016, DOI:10/1035/srep28873
3. Tokumasu Y, Iida A, 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*, 査読有, 58(4):409-421, 2016, DOI:10/1111/dgd.12286

[学会発表] (計 21 件)

1. Atsuko Sehara-Fujisawa: Lessons from Space: Studies on Skeletal Muscle Regeneration and Atrophy, Lecture in Philipps-University Marburg, Marburg, Germany, 2017.3.14 (招待講演)
2. 瀬原 淳子: 幹細胞の増殖・分化制御機構のプロテアーゼ制御, 第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 豊中市, 2016.8.5 (口演)
3. Nishimura D, Sakai H, Sato T, Sato F, Nishimura S, Toyama-Sorimachi N, Bartsch JW, Sehara-Fujisawa A: Role of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration, 44th European Muscle Conference, Warsaw, Poland, 2015.9.22 (口演)
4. Atsuko Sehara-Fujisawa: Mechanisms of Skeletal Muscle Regeneration. Symposium "Genomic and epigenomic insights into vertebrate regeneration, development and evolution - development and evolution - Xenopus and fish as models", Chile, 2014.11.5 (招待講演)
5. Atsuko Sehara-Fujisawa: Novel Molecular and Cellular Mechanisms of Skeletal Muscle Regeneration, KEY Forum: From Stem Cells to Organs 熊本医学・生物科学国際シンポジウム「幹細胞制御と臓器再建」, 熊本市, 2014.9.5 (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)
該当なし

[その他] ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc03/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬原 淳子 (SEHARA-FUJISAWA, Atsuko)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所
・教授

研究者番号: 60209038