

## ADAM8 による血液循環開始の制御

飯田 敦夫, 瀬原 淳子

ADAM プロテアーゼによる細胞外での基質切断は細胞の増殖, 分化, 移動などに関わり, 生物の発生や形態形成において重要な役割を担っている. しかし個体において『どこで』『何が』『どのように』分解されるかは殆ど分かっていなかった. 我々はゼブラフィッシュを用いたライブイメージングを通じ, ADAM8 が赤血球表面の接着因子の切断を介して, 赤血球が循環を開始するタイミングの決定に関わることを示した. ADAM8 は造血系で特異的に発現している膜型メタロプロテアーゼであり, 同じく血球系で発現する接着因子 PSGL の分解活性を持つ. これまで赤血球は血漿の流れに依存して受動的に循環を開始すると考えられていたが, 自らが持つ分子ハサミ (ADAM8) により自律的な接着解除を行い, 自分自身の移動を能動的に制御する機構を持つことが明らかとなった.

## 1. ADAM 研究の現状と課題

膜タンパク質の細胞外ドメインが脂質二重層近傍で限定的に切断され, 膜内・細胞内ドメイン (intracellular domain: ICD) から分離される現象が知られる. これを膜タンパク質のエクトドメインシェディング (ectodomain shedding) と呼ぶ. エクトドメインシェディングを受ける膜タンパク質としては, 膜型増殖因子やそのレセプター [heparin binding-epidermal growth factor (HB-EGF) やニューレグリンなどの ErbB ファミリーリガンドやそのレセプター ErbB4, Kit リガンド, hepatocyte growth factor (HGF) など], Notch および Notch リガンド, アミロイド前駆体, 接着因子 (E-カドヘリン, N-カドヘリンや L-セレクトリンなど), 膜型細胞外マトリックス (ECM) (シンデカン, コラーゲン XVII や CD44 のような ECM 結合タンパク質) などが知られている.

これらのエクトドメインシェディングは何故必要なの

か. エクトドメインシェディングは, 膜分子から細胞外可溶性分子への変換, あるいは細胞内機能分子への変換など, タンパク質の質的変換をもたらす. 例えば, エクトドメインシェディングは, HB-EGF の可溶型を産生し, それによって ErbB レセプターを活性化し細胞増殖を促すという正の制御を担う<sup>1)</sup>. それに対して, 細胞死に関与する Fas リガンドの場合, そのエクトドメインシェディングは, 細胞死シグナル分子としての機能を消失させる, 負の制御を担っているようである<sup>2)</sup>. また, エクトドメインシェディングに続く膜内切断により生ずる ICD が核移行して転写制御の機能を発揮する Notch の場合, これは細胞自律的な活性化制御であって, レセプターを介する細胞間シグナル伝達制御とは質的に異なるものである. これら近年の一連の研究結果は, エクトドメインシェディングが種々の膜タンパク質の生理活性のオンオフに重要なプロセスであることを示した.

では, このように膜タンパク質の生理活性のオンオフを制御するエクトドメインシェディングは, どのようなプロテアーゼにより, またどのような分子機構により時間的・空間的に制御されているのだろうか.

膜タンパク質のエクトドメインシェディングに関わる主たるプロテアーゼとして知られているのが ADAM ファミリーに属するプロテアーゼである. ADAM とは a disintegrin and metalloprotease の略で, 1 回膜貫通型のマルチド

京都大学再生医科学研究所 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53 京都大学再生医科学研究所西館 4 階)  
ADAM8-dependent onset of blood circulation in zebrafish  
Atsuo Iida and Atsuko Sehara (Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku Syogoin Kawaharacho 53, Kyoto 606-8507, Japan)

メインタンパク質の総称である (図 1A)。ADAM は線虫等の無脊椎動物から、哺乳類に至るまで幅広い生物種に分布している。哺乳類ではヒトが 20~30、マウスで 30~40 ほどの ADAM 遺伝子をゲノムに保持している。筋形成や神経分化、心臓・血管形成などの発生・再生プロセス、肥満・がん・炎症などの病態、あるいは受精など、その役割は多岐にわたっている。現在分かっている ADAM の約半数は構造的に亜鉛イオンが配位するプロテアーゼ活性部位が保存されていることからプロテアーゼ活性を持つと予想され、膜タンパク質のエクトドメインシェディングや膜近傍における ECM の切断により、細胞接着や細胞間シグナル伝達を制御すると考えられてきた<sup>3)</sup>。

しかし、ADAM プロテアーゼによるエクトドメインシェディングは、未だ大きな謎を抱えている。それはまず、これらのプロテアーゼの基質特異性の謎である。例えば、TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE/ADAM17) のプロテアーゼ活性部位を欠失させたマウスの胎児繊維芽細胞 (MEF) を用いた実験によって、このプロテアーゼが上記の殆どの膜タンパク質の PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 依存的な切断に関与していることが示されている。しかし、TACE 欠失マウスの表現型は、想像に比してマイルドなものであり、発生過程のあらゆるプロセスにおけるエクトドメインシェディングにこのプロテアーゼが関与しているとは考えがたい。したがって、個々の ADAM プロテアーゼの生理的基質やエクトドメインシェディングの制御機構を知るためには、個体レベルでそれらのプロテアーゼがどのような役割を果たしている、その際の生理的基質は何か、またその切断制御機構はどのようなものか、を研究する必要がある (図 1B)。

我々はノックアウトマウスの作製とそれらの解析によ

り、メルトリン  $\alpha$  (ADAM12) が肥満に関わることや、メルトリン  $\beta$  (ADAM19) が心室中隔形成や神経筋接合部形成、神経再生におけるグリア細胞の分化に関わることなどを見いだしてきた<sup>4,5)</sup>。また、メルトリン  $\beta$  が、グリア細胞の移動や分化・神経筋接合部形成に関与する膜型増殖因子ニューレグリンのエクトドメインシェディング能を有することを、培養細胞を用いて示している<sup>6)</sup>。しかし、個体での表現型と *in vitro* での基質分解の関係は、未だ示唆的な段階にとどまっており、表現型に至るどのようなプロセスにこのプロテアーゼが関与するのか、より具体的に明らかにすることが求められている。注目すべきことに、TACE とメルトリン  $\beta$  のダブルノックアウトマウスを作成することにより、発生における心筋の増殖が著しく阻害されることが見いだされ、これらの ADAM プロテアーゼの相乗効果が示された<sup>7)</sup>。しかし、それがそれぞれの ADAM プロテアーゼが HB-EGF とニューレグリンのような異なる生理的基質の切断に関与するためなのか、それとも同じ基質を時空間的に異なる切断様式によって切断制御するためなのか、不明である。ここでも再び、それらの生理的基質と切断制御機構という、ふたつの基本的な疑問が残されているのである。

近年、細胞の分化や活性化に対する細胞外の微小環境 (ニッチ) の重要性が提唱されているのは周知の通りである。ニッチとは幹細胞が分化する上で重要な役割を果たす周囲の微小環境を指し、生体において各器官・組織ごとに異なったニッチが細胞の運命決定に関わっている。我々は、培養細胞系では個体環境におけるニッチを完全に再現することは難しく、それが ADAM プロテアーゼの生理的基質と切断制御機構の解明を阻む要因のひとつだと考えている。我々の目指す ADAM 研究のためには、どうして

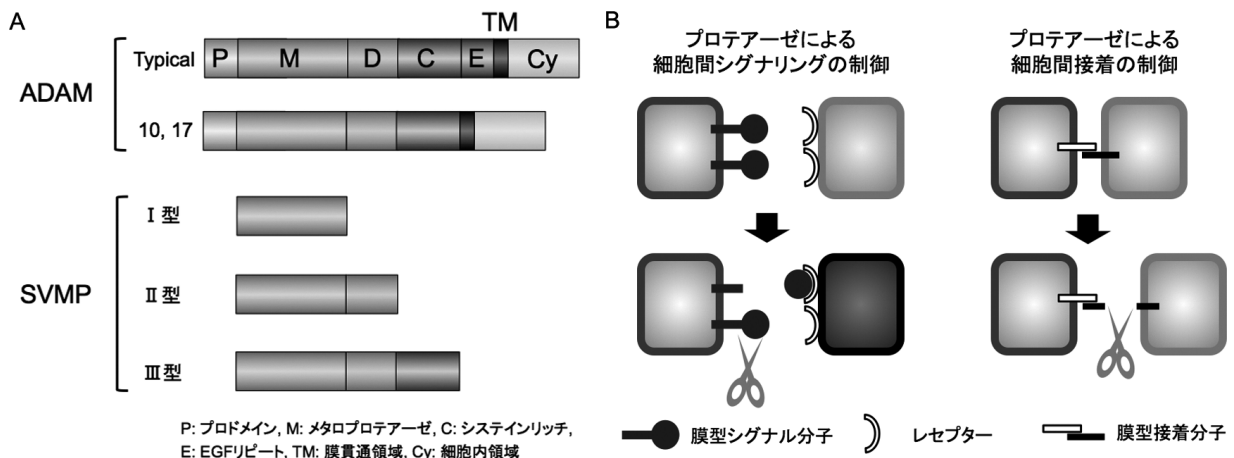


図 1 ADAM タンパク質のドメイン構造と機能

(A) ADAM (a disintegrin and metalloprotease) は細胞外領域に複数の機能ドメインを持つ 1 回膜貫通型の膜分子である。細胞外のドメイン構造は一部の SVMP (snake venom metalloprotease) との間で保存されている。

(B) ADAM は膜分子を切断するはさみの役割を果たし、細胞間シグナル伝達分子の可溶化や細胞接着の解除に関与している。

も、個体の解析から生化学的解析を包括的に行うことのできるモデル動物が必要であった。

## 2. セブラフィッシュとの出会い

そこで我々は新たなモデル動物の検討を行い、小型魚類ゼブラフィッシュを用いた解析をスタートさせた。ゼブラフィッシュは飼育が容易で、体も小さいため省スペースで維持・繁殖が可能である。何より透明な胚が体外受精で発生し、基本的な形態形成が48時間以内に完了するといったメリットから、発生学の分野において1990年代初頭から急速に普及したモデル脊椎動物である。体の基本構造は哺乳類と類似しており、ゲノム情報の解読によりほとんどの遺伝子が保存されていることも分かっている。また近年では胚操作の手法も確立され、遺伝子導入や生化学的解析などで他のモデル動物と遜色なく扱える。さらにゼブラフィッシュ独自の利点として、特定の組織を蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックゼブラフィッシュを用い、初期発生を生きのまま観察できるということが挙げられる。何よりも幸運なことに、プロテアーゼ研究のモデルとしてゼブラフィッシュを用いることは世界的に見ても我々が初めてであり、全くの新規分野の開拓であった。

## 3. 循環・造血系のライブイメージング

モデル動物は決まった。ではどのような現象を解析対象としようか？我々はかねてから「血管形成・造血に関与するADAMがあるのではないか？」という期待・予想を持っていた。この予想は、ADAMのドメイン構造に起因している。先に述べた通り、ADAMは複数の機能ドメインを持つ。多くのADAMは、金属プロテアーゼドメインのC末端側にディスインテグリンドメインとシステインリッチドメインを並列に持つという、III型ヘビ出血毒金属プロテアーゼ様のドメイン構造を持つ。ヘビ毒金属プロテアーゼは出血毒を構成する可溶性タンパク質のひとつであり、接着分子やECMの分解を介して血管内皮細胞の破壊・出血・凝固阻害などを引き起こし、獲物を死に至らしめる。我々はヘビが進化の過程で、膜型のADAMを可溶性へと変換し、獲物を捉えるための毒として利用するようになったのではないかと予想した。ヘビと共通祖先を持つ現在の脊椎動物には、ヘビ出血毒のプロトタイプとも言うべき血管形成や維持・造血に関わるADAMを持つものがあるのではないかと考えたのである。現在までに、クズバニアン(ADAM10)、TACE、メルトリン $\beta$ が血管形成や心臓形成に関与することが分かっている。では、造血に関与するADAMはあるだろうか？そのような生理機能を持つADAMはこれまで見つかっていなかった。そこで我々は「ヘビ出血毒の祖先の候補となり得るADAMの探索」という観点から、血管・血球が可視化されたゼブラ

フィッシュを用い、血液循環の開始に伴う血管系の構築・赤血球の発生に注目した観察を行った。

## 4. 血液循環開始における膜型メタロプロテアーゼのはたらき

解析に先立ち、我々は2種類のトランスジェニックゼブラフィッシュを入手した。ひとつは*friend leukemia integration 1 (fli1)* プロモーター下流にGFPを連結した*fli:GFP*で血管内皮が、もうひとつは*gata1* プロモーター下流にRFPを連結した*gata1:RFP*で赤血球が可視化されている<sup>8,9)</sup>。この2種類の魚を交雑することでダブルトランスジェニックラインを構築し、同一個体で血管と血球の相互作用を生きのまま可視化できる系を構築した(図2A)。そして、発生における最初の赤血球が循環に至るまでの過程を観察した(図2B)。

その観察結果は驚くべきものであった。ゼブラフィッシュにおいて最初に現れる胎児型赤血球は、体幹部の血管外造血領域で発生・分化する。隣接する脈管の構築に伴い、赤血球は血管内皮を介して血管内へと移動する(Invasion, 図2CおよびD)。ここで、血管内へと移動した赤血球はすぐには循環を開始せずに、しばらくのあいだ血管内に留め置かれる(Idling, 図2CおよびD)。この際、脈管の管状構造はほぼ完成しており、心臓の拍動に伴う血漿成分の循環も観察されている。我々は、赤血球のIdlingは血管内に侵入した赤血球が、血管内皮細胞と接着することで起こるのではないかと考えた。電子顕微鏡観察によると、赤血球は血管内に移動後も血管内皮細胞に糸状仮足様の突起を介して接着しており、これがIdlingの原因であると考えた(図3BおよびD)。しばらくIdling状態が持続した後、血管内の赤血球は突如として循環を開始する(Release, 図2CおよびD)。すなわち血液循環を開始するためには、血漿成分の流れにプラスして、血球-血管内皮間の接着の解除が必要ではないかと考えられた。

我々は、ADAMがプロテアーゼとして機能し、その接着解除を担っていると予想した。その仮説を実証するために、我々はメタロプロテアーゼ阻害剤をゼブラフィッシュ稚魚の血管内へと注入し、血液循環の様子を観察した(図4)。阻害剤には*o*-フェナンスロリンおよびGM6001を用いた。前者は金属イオンのキレート剤であり、亜鉛に限らず血漿中の金属イオンに広く作用する。後者はメタロプロテアーゼ活性部位への結合阻害剤であり、ADAMやMMP(matrix metalloproteinase)に広く作用する。実験の結果、これらの阻害剤注入胚において一部の赤血球で循環開始が阻害され、赤血球と血管内皮との接着が解除されず、蓄積している様子が観察された(図4BおよびC)。この際にも心臓の拍動および血漿成分の循環、そしてInvasionに異常は見られなかった。したがって、血管内腔におけるメタ

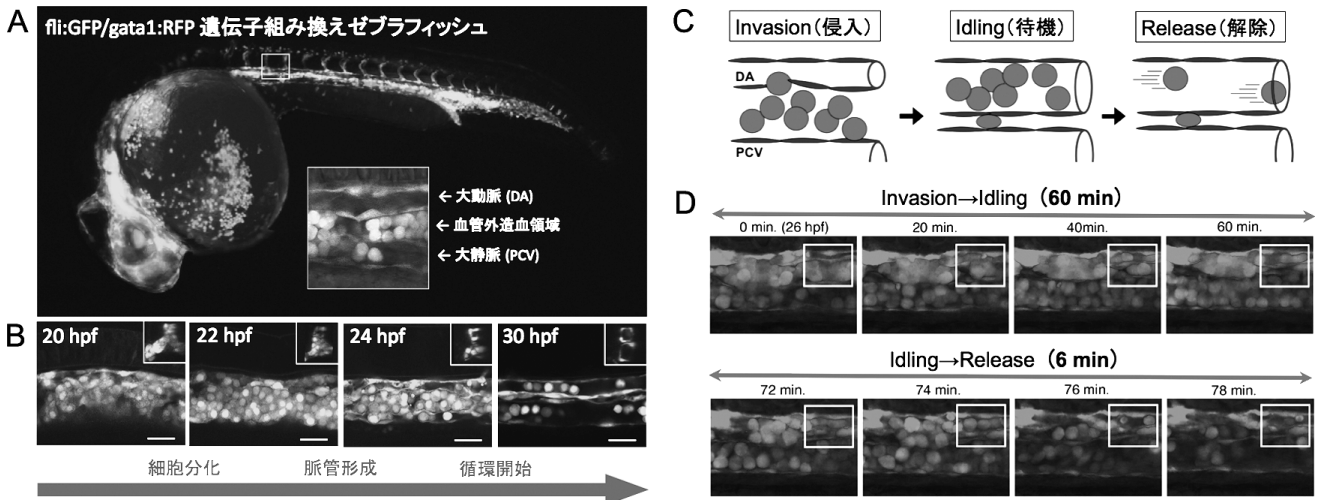


図 2 ゼブラフィッシュによる血液循環の可視化とライブイメージング

(A) 血管内皮細胞が GFP で、赤血球前駆細胞が RFP で標識されたトランスジェニック系統 (28hpf)。ゼブラフィッシュの一次造血は体幹部の ICM (intermediate cell mass) 領域で起こる。拡大写真は ICM 領域における大動脈 (DA)、大静脈 (PCV) および血管外造血領域の位置関係を示す。

(B) ICM 領域における一次造血および脈管形成。トランスジェニック系統において血管内皮と血球は 20hpf 付近から形態的な分化が始まる。24hpf では動脈と静脈に挟まれた領域で赤血球前駆細胞が発生し、数時間の間に血管内へと移動して循環を開始する。

(C) 血液循環開始のモデル図。血管外造血領域から血管内へ向けた赤血球の侵入 (Invasion) が起こり、移動した赤血球は血管内ですぐには循環に入らず一定の待機時間をおく (Idling)。その後、血管内に蓄積した赤血球は同調的に循環を開始する (Release)。図示した領域は D における四角部分に相当する。

(D) 血液循環開始を捉えたライブイメージング映像。Invasion を経た Idling は個々の赤血球において連続的に起こり、Idling 状態は最大で約 60 分間維持される。一方 Idling から Release への移行は、殆どの赤血球において同調的に起こり数分間で終了する。

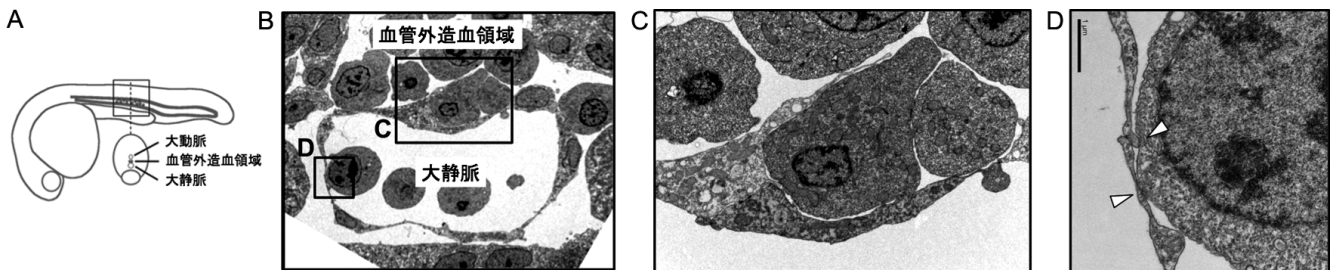


図 3 Invasion および Idling 状態の赤血球の電子顕微鏡観察

(A) 27hpf 胚の体幹部を横断面で切片化し、ICM 領域を観察した。

(B) Sub-aortic から PCV へと侵入する Invasion 状態の赤血球、および PCV 内部で内皮細胞に接触して Idling 状態にある赤血球が認められる。

(C) Invasion 状態の赤血球の拡大図。異なる血管内皮細胞同士の間を突き抜けて侵入している。

(D) Idling 状態の赤血球の拡大図。赤血球は血管内皮細胞と部分的に接しており、弱く接着しているように見える。

ロプロテアーゼを介した接着解除が、赤血球の循環開始に重要であることが示唆された。

我々は次に、接着解除を担いうる ADAM プロテアーゼの特定を試みた。最初に述べたように、ADAM プロテアーゼはカドヘリンなどの接着因子のエクトドメインシグナリングへの関与が報告されているからである。哺乳類 EST データベースおよび、ゼブラフィッシュにおける WISH (whole-mount *in situ* hybridization) 解析を行った。その結果、血球系で高発現を示す膜型メタロプロテアーゼ ADAM8 を候補遺伝子として絞り込んだ。ゼブラフィッ

シユ稚魚において、ADAM8 は最初の造血組織である intermediate cell mass (ICM) 領域に強く発現している (図 5 A および B)。蛍光標識 ADAM8 タンパク質の赤血球での強制発現実験により、ADAM8 タンパク質は細胞膜移行能を保持しており、細胞膜上および細胞外の基質に相互作用することが可能であることが示された (図 5C)。次に ADAM8 の生理機能を調査する目的で、アンチセンスモルフォリーノオリゴによる ADAM8 の発現抑制処理を行った。その結果、メタロプロテアーゼ阻害剤注入と同様に血液循環の阻害が観察された (図 6A)。この場合も心臓の拍

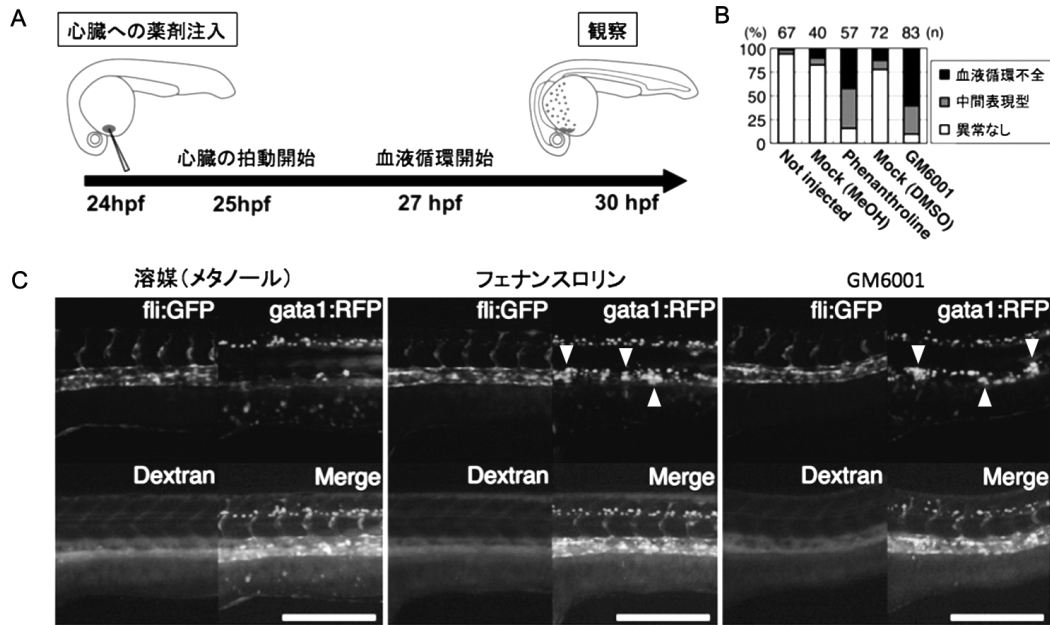


図4 メタロプロテアーゼ阻害剤の血管内投与実験

(A) 実験の原理。心臓の拍動開始前のゼブラフィッシュ胚の心臓に薬液を注入する。注入された薬液は血漿の循環開始に伴い ICM 領域に到達する。

(B) *o*-フェナンスロリンおよび GM6001 の投与により、80% 以上の胚で何らかの血液循環の異常が観察された。

(C) 阻害剤の血管内投与は、血管形成 (fli: GFP) および血漿の流れ (Dextran) に目立った異常は与えず、血球の循環開始のみを阻害する。

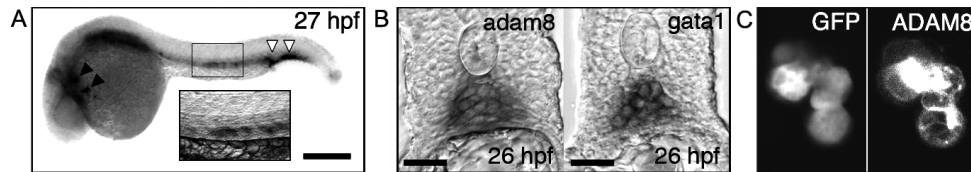


図5 血球系での ADAM8 発現解析

(A) ゼブラフィッシュ発生初期において ADAM8 は ICM 領域 (拡大部)、マクロファージ (黒矢頭)、および成体型造血が開始する posterior blood island (PBI) 領域 (白矢頭) などの造血組織で発現している。

(B) ICM 領域での ADAM8 の発現は *gata1* 陽性の赤血球前駆細胞と一致する。

(C) 蛍光タンパク質で標識した ADAM8 を *gata1* プロモーターにより赤血球前駆細胞で強制発現すると、細胞膜での局在が観察される。

動および血漿成分の循環、および Invasion に目立った異常は生じなかった。電子顕微鏡観察においても、血管内に移動後の赤血球と血管内皮細胞が強固に接着している様子が観察された (図 6C)。このことから、ADAM8 は赤血球の血管内皮上での移動 (Rolling, 図 6D) あるいはそれに先行しうる強固な接着の解除に関わっているのではないかと考えられた。ライブイメージングにおいても、野生型胚では内皮細胞上を移動する赤血球が観察できるのに対し、ADAM8 発現抑制胚ではアメーバ状の赤血球が 1 箇所に留まっている様子が観察された。また、プロテアーゼ欠損型 ADAM8 の赤血球での強制発現はドミナントネガティブ効果を示した。よって、ADAM8 は細胞自律的にプロテアー

ゼとして機能していることが分かった。

では、ADAM8 によって解除される接着とは何であろうか？ 結論から言うと、接着の本質はまだ特定できていない。ここではいくつかの示唆的なデータについて紹介する。電子顕微鏡観察によると、赤血球と血管内皮の接着はタイトジャンクションやアドヘレンスジャンクションなどの強固な結合によるものではなかった。また、白血球が血管内皮を介して組織内へ浸潤する際には、レクチンを介した一時的な結合がまず起こり、それが刺激となりインテグリンを介した focal adhesion が誘起されるとの報告がある<sup>10</sup>。つまり複数の細胞接着のリレーにより、白血球は血管内皮細胞を通過するのである。以上の背景を踏まえ、

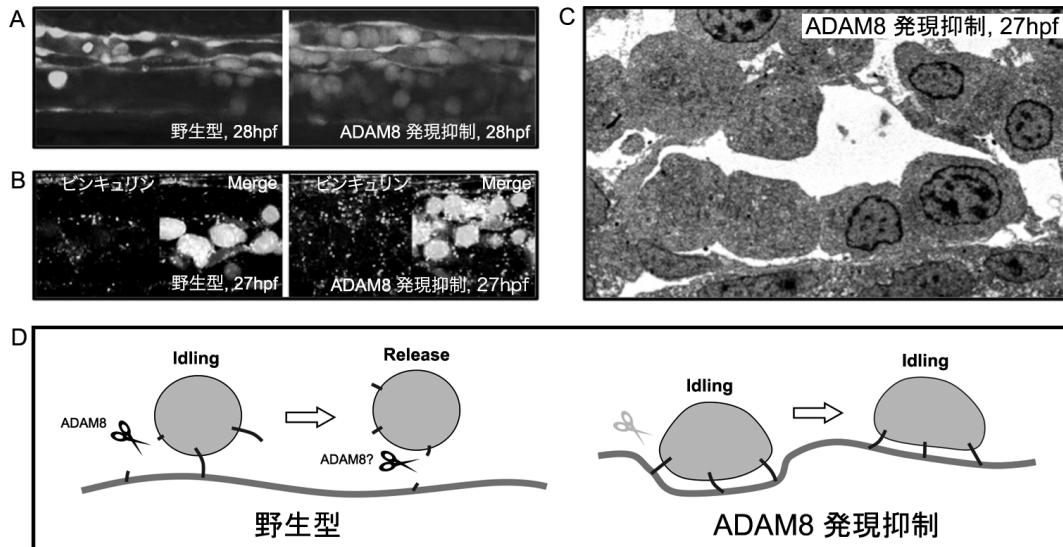


図6 モルフォリーノオリゴによるADAM8発現抑制実験

- (A) 発現抑制胚は血球の循環が開始しないという表現型を示す。この際、血管形成、血漿の循環およびTransmigrationは正常に進行し、Releaseのみが阻害されている。
- (B) ADAM8発現抑制条件下でビンキュリンのシグナルは増強する。
- (C) ADAM8発現抑制条件下で血管内における赤血球と血管内皮の接着は増強する。この際、図2Bと比較して血球の形状がいびつになっている。
- (D) ADAM8による赤血球の接着制御モデル。赤血球は血管内で接着と解除を繰り返して内皮上を移動している (Idling)。その後、ADAM8の活性上昇もしくは他のプロテアーゼにより接着が完全に解除され、血漿中に放出され循環へと入る (Release)。一方ADAM8発現抑制条件下では、ADAM8による接着解除が起こらないため、活発な移動を伴わないIdling状態が持続する。この際、接着面は野生型に比べて増加する。その後も接着が維持されるため、Releaseされることができず血管内皮上に滞留する。

focal adhesionのマーカであるビンキュリンを用い、ゼブラフィッシュ赤血球の接着能の評価を行った。ビンキュリンのシグナルは、ADAM8発現抑制胚において赤血球表面および赤血球-血管内皮接着面で強く観察され、ADAM8がfocal adhesionの解除に関わっていることが示唆された(図6B)。しかしこれは、上記のような接着のリレーを考慮に入れると必ずしもADAM8が直接インテグリンの接着を解除していることを示すものではなく、インテグリンをADAM8の基質として示唆する根拠としてはやや弱い。

そこで我々は、ADAM8によって直接分解を受ける基質分子の探索を行った。ESTデータベースよりADAM8と共発現して、且つエクストメインシェディングされることが報告されている分子を絞り込んだ(図7A)。その結果、我々はL-セレクトリンおよびPSGL (P-selectin glycoprotein ligand)を基質候補としてピックアップした。生理機能から予測されたレクチンの関与と、遺伝子発現情報の検索から導き出された基質候補が一致する結果となった。そこで我々はまず、培養細胞系でのアッセイを行った。ヒトHEK293T細胞にL-セレクトリンおよびPSGLの Maus ホモログを過剰発現させ、それぞれの細胞外ドメインを認識する抗体で染色しフローサイトメトリーでシグナルを検出した。次に、ADAM8と共発現させた場合のシグナルの測定

を行った。もし基質候補がエクストメインシェディングを受けるのであれば、ADAM8の共存下で細胞外ドメインは培地中に放出され、シグナルは減少するはずである。その結果、PSGLのみでシグナルの有意な減少を検出することができた。シグナルの減少はマウスおよびゼブラフィッシュのADAM8の共存下で観察され、プロテアーゼ活性欠損型ADAM8では見られなかった。したがって培養細胞系において、ADAM8によるPSGLのエクストメインシェディングが起こっていることが明らかとなった。

次に、より直接的にエクストメインシェディングを検出するために、ウェスタンブロットによる解析を行った。マウスPSGLのC末端にHAタグを挿入し、HEK293T細胞でADAM8と共存させた。フローサイトメトリーでの結果と同様にADAM8のプロテアーゼ活性に依存して、エクストメインシェディング後のC末端断片と思われるシグナルが検出された。切断片の大きさおよびシグナル強度は、マウスとゼブラフィッシュそれぞれのADAM8の間で違いはなく、同等の基質特異性と活性が保存されていることが分かった(図7C)。そこで次に、PSGLのゼブラフィッシュホモログ(zPSGL)のクローニングおよび発現解析を行った。zPSGLはゼブラフィッシュ初期発生において、ADAM8と同様にICM領域に発現していることが

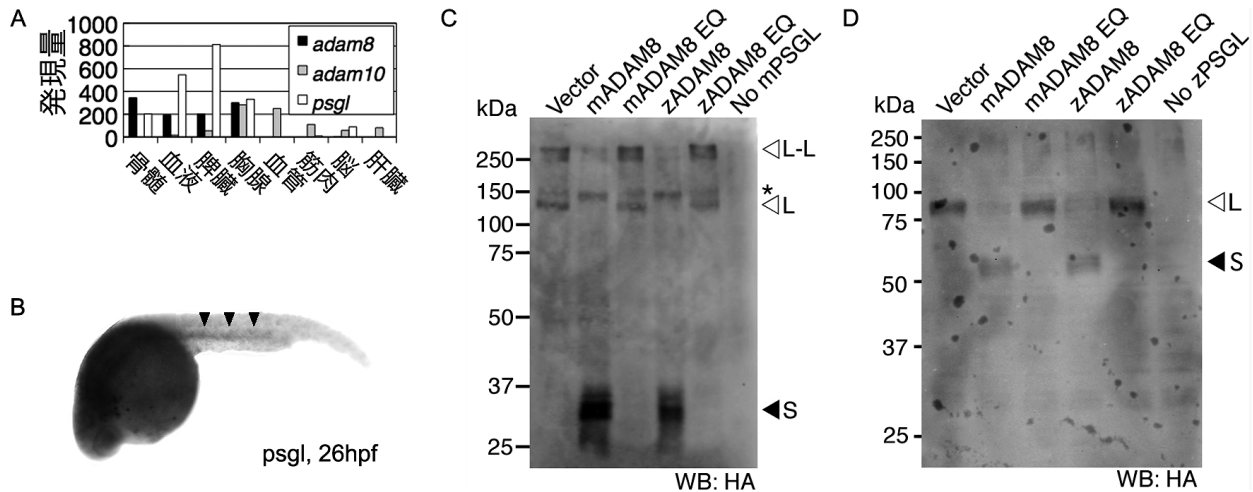


図7 PSGLの発現解析, およびADAM8による切断の検出

(A) ヒトESTによる発現解析. ADAM8およびPSGLは造血系組織で共発現している.

(B) ゼブラフィッシュ初期胚においても, PSGLはADAM8と同様にICM領域での発現が見られる.

(C) マウスPSGLはHEK293T細胞において, ADAM8のプロテアーゼ活性依存的な切断を受ける. PSGL分子のC末端にHAタグを挿入し, 細胞内領域を含むペプチドを検出した. m: マウスホモログ, z: ゼブラフィッシュホモログ, EQ: アミノ酸置換によるプロテアーゼ活性欠損変異, L: 完全長, S: 切断片, L-L: 完全長二量体, \*: 細胞膜移行前の細胞内フォーム.

(D) ADAM8による被切断活性は, zPSGLにおいても保存されている.

分かった (図7B). しかし同時に脳や体幹におけるユビキタスな発現も観察され, モルフォリノによる発現抑制は著しい発生の阻害作用を示した. したがってzPSGLの機能や切断効果を *in vivo* で解析することは, 現時点では困難であると結論づけた. そこでzPSGLについても, HEK293T細胞における被切断活性についての調査を行った. その結果, zPSGLもマウスおよびゼブラフィッシュADAM8の両方により分解を受け, 基質としての性質は保存されていることが明らかになった (図7D).

PSGLは哺乳類で様々なタイプの血球で発現している1回膜貫通型のムチン型糖タンパク質である. 細胞外領域に付加されたシアリル Lewis<sup>x</sup> 糖鎖を介して, 血管内皮細胞や他の血球上にあるセレクチン分子と会合して細胞接着を形成する. セレクチン-PSGLの会合は血管内皮と白血球の間の一時的な接着に関与していることが知られている<sup>10</sup>. このことからセレクチン-PSGLあるいはPSGL様ムチンによる血管内皮と赤血球の接着がIdlingの原動力であり, ADAM8はその接着解除を介してReleaseのタイミングを決定していると考えた (図9).

## 5. ADAMによる血液循環開始の制御が意味するもの

前述した通り, 幹細胞の分化・増殖についてはニッチとの相互作用による制御が重要な役割を果たすことが明らかになってきている. しかし赤血球は, 血管内を浮遊して体内を循環するという性質上, 組織への浸潤・移動を主とする白血球などに比べて, 細胞接着や組織内の移動に関する

研究は決して活発ではなかった. 本研究は赤血球前駆細胞が循環を開始する, すなわち循環器系を構成する要素として成熟するために, ADAMプロテアーゼによる細胞自律的な接着制御が必要であることをはじめて示した. すなわち赤血球は自身の循環開始に関して, 心臓の拍動・血漿の流れによる受動的・他律的な制御を受けるだけでなく, 自分自身で循環開始のタイミングを決定する能動的な機構を保持していたのである.

では, 血液循環開始がそのようなプロテオリシスによる自律的な制御を必要とすることの意義はなんだろうか? 初期発生では, 様々な器官形成が同時並行で進行する. 例えばゼブラフィッシュの循環器系において, 心臓と脈管はほぼ同時期に形成が進行するが, 心臓が微弱に拍動を始める受精後25時間において閉鎖血管系の構築は完全ではない可能性がある. また脈管の管状構造が成熟するためには, 血球の経路としての十分な径を確保する必要がある. 血管拡張のためのスペースを確保するためには, 血管外造血領域を満たしている赤血球前駆細胞が血管内に移動することが必要である. つまりIdlingによる待機時間なしに心臓の拍動開始とともに血球の循環が始まってしまうと, (1)不完全な血管の隙間から血球が漏れ出してしまう, (2)血管径が十分でないため血球が円滑に循環できず詰まってしまう, などの危険性がある. これらのリスクを回避するため, 閉鎖血管系および血管径の成熟が完了するための待機時間としてIdlingが重要な役割を果たしており, その解除機構としてプロテオリシスが存在していると考えてい

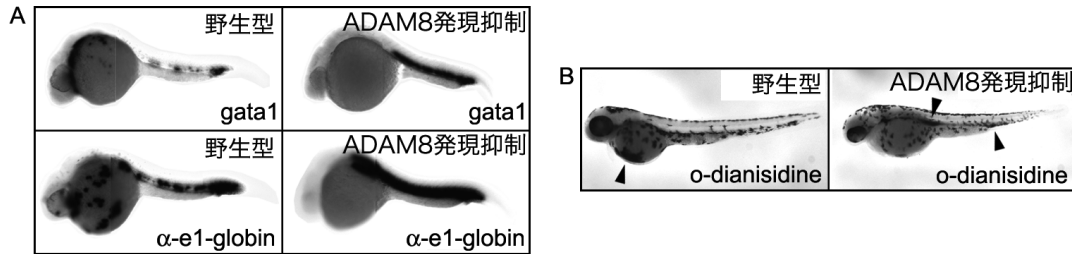


図8 ADAM8発現抑制による赤血球分化への影響

(A) 30hpf胚を用いたWISH解析. 赤血球分化マーカーの発現は, 循環開始阻害による分布の違いのみが観察された. *gata1*,  $\alpha$ -e1-globinのいずれも, 顕著な発現レベルの増減は見られなかった.

(B) 50hpf胚を用いた*o*-dianisidineによるヘモグロビン染色. 野生型では循環していた赤血球が固定・染色処理により卵黄表面に蓄積するが, ADAM8発現抑制胚では体幹部の血管に蓄積していた赤血球がそのままの場所で観察される. いずれの胚においても*o*-dianisidine陽性であり, 赤血球の分化に顕著な違いは認められない.

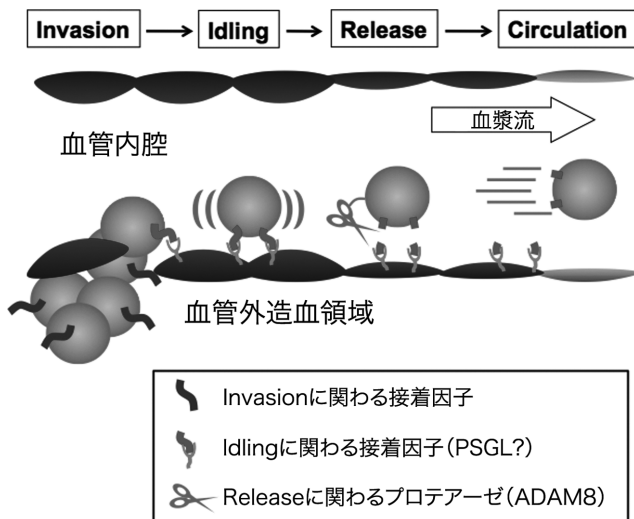


図9 循環に入るまでの赤血球の移動のモデル図

赤血球はまず, 血管内皮との接着を介して血管内へと移動する (Invasion). 血管内ですぐには循環に入らず, 細胞接着により血管内皮上につなぎ止められている (Idling). 血管系の成熟や血管径の拡張に伴って, プロテアーゼにより接着が解除される (Release). 赤血球は循環に入り, 全身に酸素を運搬する (Circulation).

る.

しかし, 我々はこの研究のスタートラインに立っているに過ぎない. 最初に述べた (1) 生理的基質は何か, (2) 切断制御機構は何か, というふたつの問題を解かねばならないからである. PSGLのようなムチン型糖タンパク質を基質として切断するとして, 切断制御機構に関してはどのようなことが考えられるだろうか. 最も魅力的な仮説は, ADAM8が血漿の流圧依存的に活性化される可能性である. ヒト成体の循環血液中のADAM8の発現レベルは高く, 血漿の流圧が血球循環を促進している, あるいは血管壁への停滞を阻止している可能性が考えられる. 流圧が血管内皮の活性化を介して, そこに接する赤血球内の

ADAM8依存的なエクトドメインシェディングを活性化することも考えられる. 他にも様々な可能性が考えられることから, 基質の検討と合わせて, 研究していきたい.

一方, ADAM8による接着能の解除は, 赤血球の細胞分化には何らかの影響を及ぼしているのだろうか? 現在までのところ, 赤血球分化マーカーを用いたWISH解析では分化レベルには違いを見いだせていない (図8A). ADAM8発現抑制により血管内に蓄積した赤血球も*o*-dianisidine染色において陽性を示し, 酸素運搬能を持つ段階まで分化していることが明らかになっている (図8B). だがこの点に関しては, より詳細に解析される余地が残っている.

## 6. 血液循環開始メカニズムの全容の解明

本研究では, 血液循環が開始する際に, 血管内でのIdlingの解除にADAM8が必要であることを示した. では, その前段階であるInvasionを制御する機構はなんだろうか? 電子顕微鏡観察において, Invasion過程の赤血球と血管内皮細胞の間にも, 細胞接着が存在することが分かっている (図3C). また, Invasion途中の赤血球においてもピンキュリンのシグナルが観察された (図6B, 野生型). さらに, ADAM8の発現抑制胚においてInvasionは正常に進行しているように見える. これらのことから, Invasionの過程では赤血球は血管内皮に接着したままであると考えている. しかし実は, InvasionからIdlingにかけての接着がADAM8依存的に解除されるのかどうか, まだ実証できていない. ADAM8依存的な接着解除は, 血液循環開始の必要条件あるいは前提となるものであるが, それが循環開始の最終的なトリガーになっているかどうかは, 不明なのである. もしかすると, ADAM8依存的な接着解除は, 第1段階としての強固な接着の解除であり, それに対して第2段階としてADAM8とは違うメタロプロテアーゼが血管内での赤血球のローリングのような弱い接



着を解除していることも考えられる。

では、これらの赤血球-血管の間の接着因子としては何が関わっているのだろうか？ これまでにも述べている通り、我々の観察した現象は白血球の Extravasation（血管外浸潤）と似通ったメカニズムの存在を示唆している。平時において血管内を循環している白血球は、異物の侵入などに応答して組織内へと浸潤する。この行程は、(1) 循環している白血球が自身の持つ PSGL 分子と血管内皮細胞上にある P-セレクトリンのような分子との会合により血管表面に接着する（ローリング）、(2) ローリングが血球および血管内皮細胞でのインテグリンの発現を誘起してより強い接着を形成し血管外へと遊走する（Transmigration）、の2ステップから成る。我々は赤血球の“Invasion→Idling”は、白血球の“ローリング→Transmigration”の逆回しに近い分子機構ではないかと考えている。すなわち PSGL による Idling に先立って、インテグリンを原動力とした Invasion が起こっているとするものである（図9）。この仮説を検証し、造血から循環開始までの赤血球の移動のメカニズムを解明するため、筆者達は現在も解析を進めている。ただ、ゼブラフィッシュ PSGL は、マウスやヒト PSGL に見られるセレクトリン結合部位を持たない。このことから、この ADAM8 の接着制御が内在する PSGL を介するとしても、これまで考えられている PSGL-セレクトリン結合の制御とはやや違う可能性もあり、この解析はなかなか手強そうである。

## 7. 哺乳類における ADAM8 の機能

最後に、哺乳類における ADAM8 の機能について述べる。前述の通り、ADAM8 の PSGL 分解活性はマウスホモログにおいても保存されている。したがって ADAM8 は哺乳類においても、PSGL を介した何らかの生理的機能を持っているものと考えている。しかしながら、現在までに報告された ADAM8 ノックアウトマウスにおいて顕著な表現型は観察されておらず、見た目上は健康に成長してホモ個体同士の交配も可能である<sup>11)</sup>。これはどういうことだろうか？ 我々は、ゼブラフィッシュとマウスの発生様式の違いに着目している。ゼブラフィッシュ胚では脈管に隣接する血管外領域で一次造血が進行し、なおかつ体外受精で発生が進行する<sup>12)</sup>。一方、マウスでは母体内で発生が進行する E7.5 付近の卵黄嚢で一次造血が進行する<sup>13)</sup>。哺乳類では母体からの酸素・栄養の補給を受けながら造血様式が成体型へと切り替わるため、仮に一次造血で欠陥があったとしてもそれは一過的なものであり、表現型として現れにくいのではないかと考えた。以上の点を留意しつつ、我々は現在 ADAM8 ノックアウトマウス初期胚の表現型解析を進めている。また、マウス成獣においても末梢血および造血組織で ADAM8 は発現しており、成体型造

血においても何らかの機能を担っていると考えている。

## 8. さ い ご に

以上で本稿は終了となるが、先にも述べた通り我々はようやくゼブラフィッシュ個体を用いた ADAM 研究のスタートラインに立ったに過ぎない。血液循環開始に伴う ADAM8 のはたらき・活性制御などの詳細な解析はもとより、ADAM8 欠損による血球循環不全に起因する二次的な表現型も、今後、哺乳類における血液循環機構や ADAM8 の役割・機能を探る上で、重要な指標になると考えている。一方、ADAM8 の欠損は血液凝固ではなく、うっ血をもたらすもので、それが脳梗塞などを引き起こす血液凝固の亢進や異常の直接的な原因となるわけではない。しかし、ADAM8 発現低下がもたらすうっ血傾向は、脳梗塞・心筋梗塞等の血栓性疾患のリスクファクターのひとつとなりうると考えられ、これも今後の検討課題である。

最初に述べた通り ADAM ファミリーの因子は様々な生命現象への関与が知られている。我々はゼブラフィッシュを用いた ADAM8 研究をモデルケースとして、他の ADAM に関してもプロテオミシスの現場を捉え、種々の生命現象におけるエクソドメインシェディングの機能・メカニズムを明らかにしていきたい。これらの知見から、細胞間相互作用制御の新しいメカニズムを解明し、生命科学・医学に貢献したい。

## 文 献

- 1) Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M., & Mekada, E. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3221-3226.
- 2) Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T., & Nagata, S. (1997) *J. Exp. Med.*, **186**, 2045-2050.
- 3) Dylan, R.E., Madeleine, M.H., & Caroline, J.P. (2008) *Mol. Asp. Med.*, **25**, 258-289.
- 4) Komatsu, K., Wakatsuki, S., Yamada, S.I., Yamamura, K.I., Miyazaki, J.I., & Sehara-Fujisawa, A. (2007) *Dev. Biol.*, **303**, 82-92.
- 5) Masaki, M., Kurisaki, T., Shirakawa, K., & Sehara-Fujisawa, A. (2005) *Endocrinology*, **146**, 1752-1763.
- 6) Yokozeki, T., Wakatsuki, S., Hatsuzawa, K., Black, R.A., Wada, I., & Sehara-Fujisawa, A. (2007) *Genes to Cells*, **12**, 329-343.
- 7) Horiuchi, K., Zhou, H.M., Kelly, K., Manova, K., & Blobel, C. P. (2005) *Dev. Biol.*, **283**, 459-471.
- 8) Lawson, N.D. & Weinstein, B.M. (2002) *Dev. Biol.*, **248**, 307-318.
- 9) Kitaguchi, T., Kawakami, K., & Kawahara, A. (2009) *Mech. Dev.*, **126**, 314-323.
- 10) Miner, J.J., Xia, L., Yago, T., Kappelmayer, J., Liu, Z., Klopocki, A.G., Shao, B., McDaniel, J.M., Setiadi, H., Schmidtke, D.W., & McEver, R.P. (2008) *Blood*, **112**, 2035-

- 2045.
- 11) Kelly, K., Hutchinson, G., Nebenius-Oosthuizen, D., Smith, A. J., Bartsch, J.W., Horiuchi, K., Rittger, A., Manova, K., Docherty, A.J., & Blobel, C.P. (2005) *Dev. Dyn.*, **232**, 221–231.
- 12) Detrich, H.W. 3<sup>rd</sup>, Kieran, M.W., Chan, F.Y., Barone, L.M., Yee, K., Rundstadler, J.A., Pratt, S., Ransom, D., & Zon, L.I. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10713–10717.
- 13) Kingsley, P.D., Malik, J., Emerson, R.L., Bushnell, T.P., McGrath, K.E., Bloedorn, L.A., Bulger, M., & Palis, J. (2006) *Blood*, **107**, 1665–1672.
-