

令和元年6月6日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07365

研究課題名(和文) 組織再生における細胞系譜の解明

研究課題名(英文) Cell lineages during zebrafish fin regeneration

研究代表者

川上 厚志 (Kawakami, Atsushi)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：00221896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物は、からだを長期に維持、再生する能力=組織恒常性を持つが、このメカニズムはほとんど明らかになっていない。イモリや魚類などは四肢や鱗を再生することができるが、この過程の研究から、組織恒常性の秘密が解明できることが期待される。

本研究では、ゼブラフィッシュ尾ヒレの再生における細胞の振る舞いについて研究を行い、以下の成果を得た。(1)皮膚、骨を再生する過程では、組織に保存されている組織幹細胞が重要な役割を果たす。(2)炎症は再生に必要なが、過剰の炎症は再生細胞の死を起こす。マクロファージは細胞の生存を助けている。(3)組織の最終サイズや形を決める情報が存在し、長期に安定な性質を持つ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イモリや魚類などは、失った四肢や鱗を完全に再生することが古くから知られている。この驚くべきメカニズムは、近年、急速に分子的な背景の解明も進んできたが、再生における細胞の振る舞いは解明が遅れていた。本研究は、皮膚と骨について、細胞の再生過程を解明し、組織にある幹細胞の重要性を示した。またさらに、炎症やマクロファージの再生における役割も示し、形や大きさがどのように再生されるかについても、位置情報の存在を示すことに成功した。

このような再生過程の解明から、ほ乳類で再生能力が限定されている原因や、いかにして組織が一定に保たれているか、さらに幹細胞から組織、器官を作る技術へと繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Multi-cellular organisms have an ability to maintain and regenerate their bodies, which is called as "tissue homeostasis", but the mechanism that regulates the process has not been clarified. Particularly, urodele amphibians like newt and teleost fish can regenerate their appendages such as the limbs and fins, and the analysis of this process will help us to reveal the mystery of tissue homeostasis.

In this study, we investigated the cellular processes during the zebrafish fin regeneration and obtained the following results. (1) We tracked the origin and fates of regenerating cells and revealed that the tissue stem cells reserved in each tissue play a crucial role for epidermal cells and osteoblasts. (2) Adequate tissue inflammation is necessary both for initiating regeneration and support the regenerative cell survival. (3) Shape and size of the fin is determined by the positional information. It has a stable and long-lasting nature in local areas.

研究分野：再生生物学

キーワード：再生 ゼブラフィッシュ 幹細胞 トランスジェニック Cre-loxP 位置情報

## 1. 研究開始当初の背景

生物は、多細胞体制を長期に維持、再生する能力=組織ホメオスタシスを持つが、この分子・細胞的基盤はまだほとんど明らかになっていない。特に、顕著な再生現象として、有尾両生類や魚類は四肢や鰭を完全に再生することが知られているが、このような完全再生過程のメカニズム解明から、ほ乳類で再生能力が限定されている原因や、組織ホメオスタシスの普遍原理の理解、幹細胞から組織、器官を誘導する技術へと繋がることが期待される。

再生メカニズムの研究は、長い間組織学的記載以上に進まなかったが、この10年ほどの間に、様々の組織再生モデルにおいて分子的な解析がめざましく進んできた。この数年の間、再生過程に関与する分子やシグナル、分子マーカーの同定などが、私達やほかの研究者によって行われ、それらの研究から、再生組織は上皮と間質からだけ成るシンプルな組織ではなく、実際にはそれぞれ多数の細胞小集団から構成されること、つまり再生は従来考えられていたよりも多彩な細胞の相互作用によって成り立っていることもわかってきた。

私達が系としている尾部鰭の再生では、イモリなどの四肢再生と同様、傷上皮と呼ばれる再生上皮(傷上皮)と、再生芽(増殖細胞を含む)ニッチが形成される。近年、内外の研究者や私達の解析から、再生における *Fgf*, *Wnt*, *JNK* を始めとする、多数のシグナルや分子の関与が示されてきた。

しかしながら、このような分子基盤の解明の一方で、再生における個々の細胞の振る舞いはほとんど明らかになっていない。すなわち、新たな組織を形成する細胞は、再生前のどの細胞に由来し、どのような過程を経て、それぞれの分化細胞になっていくのかという点=細胞系譜については、不明な点が多く残されている。

両生類における研究では、脱分化による多分化能細胞の誘導(脱分化モデル)が提唱されていたが、近年、*Kragl* らはアホロートルで、再生の間、細胞タイプ毎に分化能が固定されていることを示している(分化メモリーモデル)。つまり、再生前後で、細胞は上皮、間質、骨、血管など元の細胞の系譜に拘束され、他のタイプには転換しないことが示唆されている。一方、再生は、再生芽や再生上皮など、再生に特有の多様な細胞を中間段階として起こり、これらの細胞からの分化能や運命については明らかになっていない。再生における多様な細胞の系譜や機能の一端がわかってきたが、今後さらに、再生過程における細胞の振る舞いを理解するためには、傷上皮、再生芽をはじめ、再生に関わる様々の細胞の長期追跡から、これらの細胞の存在意義、機能の解明が必要と考えられる。

また、私達は、独自に開発してきた再生アッセイ系として、発生直後のゼブラフィッシュ幼生の膜ヒレ再生を用いて再生過程の解析を行ってきたが、近年、造血系細胞を欠損する *cloche* 変異体で、再生に応答して再生細胞のアポトーシスが起ること、この現象は造血系細胞に由来する生存因子の不在によっていることを発見した。組織再生における造血系細胞の役割については、近年、これを支持する研究報告が多数あるが、どのようなメカニズムによって再生を制御しているかは今後の課題となっていた。

さらに再生過程において興味深いのは、どのように切断を受けようとも、元通りの形態やサイズが回復することである。このことは位置情報の存在を示唆するものであるが、実際に魚類のヒレの再生において位置情報の存在や性質を示した研究はかつてなかった。再生における細胞の振る舞いを理解するには、細胞系譜、相互作用の理解と共に、どのようにサイズや成長が制御されているか解明する必要がある。

## 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュをなど、高い組織再生能力を持つ生物モデルを用いた組織再生過程の研究では、近年、多くのシグナルや分子の関与が明らかにされつつある。一方で、新たな組織を作る多彩な細胞が再生前のどの細胞に由来し、それらはどのような過程を経て、組織を再形成していくのか、また、再生細胞の誘導や生存がどのように調節されているのかなどは、未だほとんど明らかになっていない。

本研究では、第一に、傷上皮、骨芽細胞をはじめとする再生組織の細胞群の系譜を、ゼブラフィッシュモデルの利点である蛍光イメージングと追跡によって解明する。

また、第二に、再生細胞の誘導・生存と造血細胞との相互作用を解明するため、*cloche* 変異体において再生細胞がアポトーシスを起こすメカニズムの解明を行う。

さらに第三に、組織の再生する最終サイズを規定する位置情報の存在や性質について解析を進める。

以上の研究によって、多細胞生物組織における細胞の再生、新生メカニズムや組織幹細胞の関与、再生細胞と造血系細胞との相互作用についての包括的な理解を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 再生における細胞系譜の解明: 傷上皮と骨芽細胞に主に注目し、再生遺伝子の *BAC* などを用いたトランスジェニック (*Tg*) 作製とこれらを用いた *Cre-loxP* 組み換えにより、再生組織における細胞の長期細胞系譜の解明を目指す。

以前の研究から、傷上皮には *fibronectin (fn) 1b* が強く誘導されることを示している。そこで、

*fn1b* を含む BAC クローンに EGFP またはタモキシフェン誘導型リコンビナーゼ CreERT2 を導入して、*fn1b* 制御下に発現する Tg を作製する。そして、Tg において傷上皮細胞を EGFP で標識し、長期の細胞イメージングと追跡を行う。

また、魚類のヒレの鰭条はミネラル化した硬骨からなる。硬骨の再生には骨芽細胞の供給が必要であるが、骨芽細胞は付近の骨芽細胞の脱分化によって再増殖することが示されている一方で、それ以外の骨芽細胞再生メカニズムの存在も示唆されている。私達は最近、*matrix metalloproteinase (mmp) 9* の Tg を作製し、*mmp9* 発現細胞がヒレの節に局在すること、さらにヒレ切断に反応して一部は骨芽細胞に分化することを示す予備的なデータを得ている。そこで、本研究においては、上と同様に Cre-loxP を用いたアプローチによって、再生組織へ骨芽細胞を供給する新たな細胞源の特定と、発生期にまで遡る細胞系譜の解明を行う。

(2) 再生細胞の誘導・生存と造血細胞との相互作用： 以前の研究で、造血系細胞が供給する未知の因子によって、再生細胞の生存が支えられていることを示した (Hasegawa et al. 2015. *Developmental Biology* 399, 80–90)。なぜ再生細胞だけがアポトーシスに高感受性で細胞死を起こすのかを、RNA シーケンスによる細胞死誘導候補因子の探索、およびノックダウンやケミカルなどを用いた解析によって解明する。

(3) 位置情報の存在や性質： 上に述べたように、ヒレにおける位置情報の存在は、これまで実験的に証明されていない。本研究では、ゼブラフィッシュの尾部ヒレが、背腹の長い鰭条と、中央部の短い鰭条を持つことに注目し、それらの移植実験を行って、位置情報の存在や性質について検証する。

#### 4. 研究成果

(1) 傷上皮の細胞系譜： 傷上皮は再生中に形成される上皮であり、再生に深く関与するとともに、再生後の表皮を構成する。BAC Tg 作製から、再生中の傷上皮を、Cre-loxP 組み換えにより EGFP で遺伝的に永久ラベル(図 1)、長期の細胞のトレーシングを行い細胞系譜を解明することに成功した (Shibata et al. 2018. *Development* 145, dev.162016.)。その結果、傷口付近にあった上皮細胞は、いくつかの異なった運命をたどることが判明した。

まず傷口にやってくる上皮細胞の第一群は、傷口を塞いだ後、数日以内に細胞死を起こし消失した。遅れてやって来た第二の上皮細胞群は、再生した皮膚を作る細胞になった。

しかしながら、これらの再生した皮膚細胞の多くは、1週間から2週間程度経つとヒレの末端へ向かって押し出され消失する。皮膚細胞がどこから新たに供給されたのかを調べると、再生過程では、広範囲の皮膚で、幹細胞を含む細胞の増殖が活性化することで新たな上皮細胞が多数供給されていることがわかった。

また、再生過程における皮膚細胞は、脱分化して幹細胞に戻って

再生するようなことはなく、すでにある基底層の幹細胞や表層の分化細胞がそれぞれ、個性を保ったまま増殖して皮膚を再生していくことが明らかとなった。

本研究により、瘢痕が残らない、完全な皮膚再生で起こっているプロセスを明らかにすることができた。ヒトなど他の脊椎動物でも、基底層の幹細胞の自己増殖を制御することで、皮膚の再生が可能になると考えられる。

(2) 鰭条の再生に関わる骨芽細胞の細胞系譜： 上と同様に、トランスジェニックを用いた標識と細胞の追跡によって、ヒレの節の *mmp9* 発現細胞は、再生において骨芽細胞を供給するとともに、それ自身も再生する組織幹細胞であることを示し、骨芽前駆細胞 (OPC) と名付けた。

さらに遺伝的ラベルや移植実験により、この前駆細胞の細胞系譜解析を行った。その結果、この前駆細胞は、発生期の体節に由来し、間葉細胞を経て、成体のニッチに蓄えられて、骨芽前駆細胞として、骨の再生

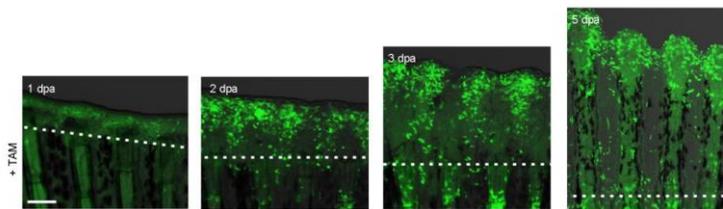


図 1 細胞標識には、Cre-loxP を用い、*fn1b* 遺伝子の制御下で発現させた。組み換えは、タモキシフェンによって誘導できる。※dpa: ヒレ切断後の日数

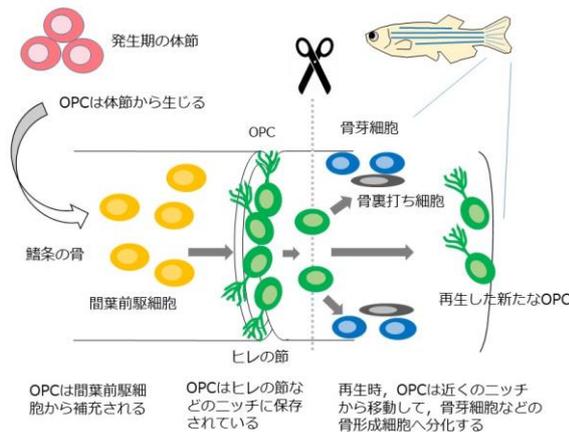


図 2 ゼブラフィッシュにおける骨芽前駆細胞の系譜

と維持に働くことを示した (Ando et al. 2017. *Developmental Cell* 43, 1–8 ; 図 2)。

さらに長期の細胞追跡を行うと、この前駆細胞は再生時だけでなく、正常な組織が骨組織を新生する恒常性維持の際にも、骨芽細胞を供給していることもわかった。

この研究によって、これまで予想されながらも存在が明らかでなかった骨芽前駆細胞が同定され、骨の再生に預かる骨芽細胞は、脱分化によって形成される骨芽細胞と幹細胞由来の骨芽細胞の両方によることを解明できた。

(3) 再生細胞の誘導・生存と造血細胞との相互作用： 以前の研究で、造血系細胞の供給する生存因子により、再生細胞の生存と再生が進むことを示したが、今回、なぜ変異体で再生細胞だけが細胞死を起こしやすいのか調べた。

RNA シーケンスによる探索の結果、*interleukin (il) 1β*などの炎症分子が傷害組織で亢進していることが明らかになった。さらに *il1β*の再生における作用を詳細に検証した結果、過剰な *il1β*による炎症作用は、再生細胞の死を誘導するが、正常な組織では主にマクロファージによって炎症が抑制され、再生細胞は生存し、再生が進んでいくことが示された (Hasegawa et al. 2017. *eLife* 10.7554/eLife.22716)。

*il1β*の作用や炎症は再生にとって悪い面ばかりではなく、組織傷害伴って起こる一過的な炎症は、組織再生を開始する上で必須の働きもすることが示された。この研究によって、組織再生と炎症の予想外の関係が明らかになった (図 3)。今回の研究により、*il1β*を介した炎症をほどほどのレベルに制御することが、組織再生において重要なことが明らかになった。

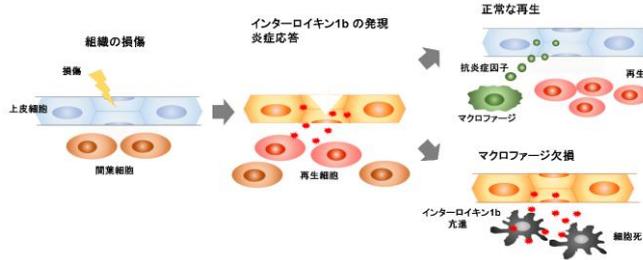


図 3. 組織の傷害と再生における *il1β* と炎症の働き。

(4) 位置情報の存在と性質： ヒレを直線的に切断した場合、背腹側の鰭条は早く伸長し、中央部の鰭条はゆっくりと伸長することにより、V字型のヒレの形状を回復する。この過程を精密に定量すると、再生芽形成時点では同数の *msxc+*再生芽と細胞増殖が見られるが、その後数日で、再生芽細胞数と増殖に差が生じ、両端が余分に伸長して形状を回復することがわかった。

このような伸長長さの制御過程に、位置情報が関与するかどうか、鰭条の交換移植実験を行った。すると、元長かった鰭条は、移植先でも周囲よりも長く再生しようとし、逆に元短い鰭条は、周囲よりも短く再生し、位置情報の存在が実験的に示唆された。このような保持された位置情報は、再度の再生でも、1年後でも情報が保持されており、位置情報は極めて強固で安定な性質を持つことが示された。また、蛍光タンパクを発現する組織を使って細胞の追跡を行ったところ、位置情報は、間充織細胞に保持されていることが示唆された (Shibata et al. 2018. *Development, Growth & Differentiation* 00:1–11. dgd.12558)。

これによって、ヒレの鰭条の長さの違いによって生み出される独特の形態は、個々の鰭条の持つ位置情報に従って、伸長する長さを制御することで生じていることが示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Shibata, E., Liu, Z., Kawasaki, T., Sakai, N. and \*Kawakami, A. (2018) Robust and local positional information within a fin ray directs fin length during zebrafish regeneration. *Development, Growth & Differentiation* 00:1–11. <https://doi.org/10.1111/dgd.12558>. **\*Corresponding** (査読有)
- (2) Shibata, E., Ando, K., Murase, E. and \*Kawakami, A. (2018) Heterogeneous fates and dynamic rearrangement of wound epidermis-derived cells during zebrafish fin regeneration. *Development* 145, dev.162016. doi: 10.1242/dev.162016 **\*Corresponding** (査読有)
- (3) Ando, K., Shibata, E., Hans, S., Brand, M. and \*Kawakami, A. (2017) Osteoblast production by reserved progenitor cells in zebrafish bone regeneration and maintenance. *Developmental Cell* 43, 1–8. **\*Corresponding** (査読有)
- (4) Hasegawa, T., Hall, C. J., Crosier, P. S., Abe, G., Kawakami, K., Kudo, A. and \*Kawakami, A. (2017) Transient inflammatory response mediated by interleukin-1β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. *eLife* 10.7554/eLife.22716. **\*Corresponding** (査読有)
- (5) Shibata, E., Ando, K. and \*Kawakami, A. (2017) Transplantation of mesenchymal cells including the blastema in regenerating zebrafish fin. *Bio-protocol* 7(2), e2109. **\*Corresponding** (査読有)
- (6) Shibata, E., Yokota, Y., Horita, N., Kudo, A., Abe, G., Kawakami, K. and \*Kawakami, A.

(2016) Fgf signalling controls diverse aspects of fin regeneration. *Development* 143, 2920-2929. \*Corresponding (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

## 2018

- (1) 日本動物学会第 89 回大会代替大会 (東京)  
ゼブラフィッシュのひれ再生に関するエンハンサー配列の同定  
◦田牧輝久、柴田恵理、川上厚志
- (2) 分子生物学会第 41 回大会 2018.11.28-30 (横浜)  
ゼブラフィッシュのひれ再生における骨芽細胞は、間葉細胞の直接の分化によっても供給される  
◦荒木 裕翔、安藤和則、柴田恵理、川上厚志
- (3) 分子生物学会第 41 回大会 2018.11.28-30 (横浜)  
レチノイン酸シグナルはゼブラフィッシュのヒレ再生を不可逆的に停止する  
◦谷下絵里、川上厚志
- (4) 日本動物学会第 89 回大会 2018.9.13-15 (札幌)  
長期に安定に保持される位置情報による再生鱗の長さの決定  
◦川上厚志、柴田恵理、Liu Zhengcheng、河崎敏弘、酒井則良
- (5) 日本動物学会第 89 回大会 2018.9.13-15 (札幌)  
ゼブラフィッシュのひれ再生に関するエンハンサー配列の同定  
◦田牧輝久、柴田恵理、川上厚志
- (6) 第 1 回 再生学異分野融合研究会 2018.8. 30-31 岡崎カンファレンスセンター  
完全な皮膚再生における上皮細胞の供給メカニズム  
◦川上厚志、柴田恵理、安藤和則、村瀬瑛美子
- (7) 第 24 回 小型魚類研究会 2018.8.25-26 名古屋大学  
The mechanism that regulates inflammation and regeneration by chemical biology approach.  
◦Siyu Zhou and Atsushi Kawakami
- (8) 第 50 回日本発生生物学会・細胞生物学会合同大会 (東京)  
Positional information DOES exit within cells of a single fin ray during zebrafish  
◦Atsushi Kawakami, Eri Shibata
- (9) 日本動物関東支部第 70 回年会 2018.3.21 (上智大)  
ゼブラフィッシュのひれ再生における間葉細胞系譜の解析  
◦荒木裕翔、柴田恵理、安藤和則、川上厚志
- (10) 日本動物関東支部第70回年会 2018.3.21 (上智大)  
ゼブラフィッシュの再生応答に関するエンハンサー配列の同定  
◦田牧輝久、柴田恵理、川上厚志
- (11) 日本動物関東支部第70回年会 2018.3.21 (上智大)  
ゼブラフィッシュヒレ再生過程におけるレチノイン酸シグナルの解析  
◦谷下絵里、川上厚志
- (12) 新学術領域「幹細胞老化と疾患」・「細胞競合」総括班若手の会 2018.2. (熱海)  
骨組織のニッチにリザーブされた骨芽前駆細胞による骨の再生と維持  
◦安藤和則、川上厚志

## 2017

- (13) 第 50 回日本発生生物学会 2017. 5. (東京)  
Osteoblast precursor cells are the committed stem cells involved in bone maintenance and regeneration of zebrafish  
◦Kazunori Ando, Eri Shibata, Stefan Hans, Michael Brand, and Atsushi Kawakami
- (14) 第 50 回日本発生生物学会 2017. 5. (東京)  
Positional memory during zebrafish fin regeneration  
◦Eri Shibata and Atsushi Kawakami
- (15) 10th European Zebrafish Meeting 2017. 5. (Budapest, Hungary)  
Osteoprogenitor cells, OPCs, derived from the somites are the committed stem-like cells that are involved in bone regeneration and maintenance  
◦K Ando, E Shibata, A Kudo, S Hans, M Brand, A Kawakami
- (16) 10th European Zebrafish Meeting 2017. 5. (Budapest, Hungary)  
Transplantation experiments of zebrafish fin ray show the existence of positional value  
◦Eri Shibata and Atsushi Kawakami
- (17) 第 23 回 小型魚類研究会 2017.8.30-31. (甲府)  
Positional information of fin shape and size is interpreted by distal blastema cells during zebrafish fin regeneration

- Keina Matsumura, Yuki Yokota, and Atsushi Kawakami  
(18) 日本動物学会第 88 回大会 2017.9.21.-23. (富山)  
骨組織のニッチにリザーブされた骨芽前駆細胞によるゼブラフィッシュの骨再生と維持  
◦安藤和則, 柴田恵里, Stefan Hans, Michael Brand, 川上 厚志

## **2016**

- (19) 日本発生生物学会特別シンポジウム 2016.6.2. (東京大学)  
Zebrafish fin fold regeneration requires proper control of inflammation via macrophage.  
◦Tomoya Hasegawa, Christopher J.Hall, Philip S. Crosier, Akira Kudo, and Atsushi Kawakami
- (20) 12<sup>th</sup> International Conference on Zebrafish Development and Genetics 2016.7.13-17.  
(Orlando)  
Zebrafish fin fold regeneration requires proper control of inflammation via macrophage.  
◦Tomoya Hasegawa, Christopher J.Hall, Philip S. Crosier, Akira Kudo, and Atsushi Kawakami
- (21) 12<sup>th</sup> International Conference on Zebrafish Development and Genetics 2016.7.13-17.  
(Orlando)  
Committed stem cells derived from the somites supply the osteoblasts during adult bone homeostasis and regeneration  
◦Kazunori Ando, Eri Shibata, Akira Kudo, Gembu Abe, Koichi Kawakami, Stefan Hans, Michael Brand, Atsushi Kawakami
- (22) 発生生物学会秋季シンポジウム 2016 : H28.10.19-21  
リザーブされた骨芽幹細胞によって骨組織の新生と再生は起こる  
Reserved osteoblast stem cells are involved in bone renewal and regeneration  
Kazunori Ando, Rie Shibata, Akira Kudo and ◦Atsushi Kawakami
- (23) 日本動物学会第 87 回沖縄大会 2016 年 11.17-19 沖縄コンベンションセンター  
Lineage analysis of epidermal cells during zebrafish fin regeneration  
◦Eri Shibata, Kazunori Ando, Akira Kudo, and Atsushi Kawakami

[図書] (計 0 件)  
(該当なし)

[産業財産権]  
◦出願状況 (計 0 件)  
(該当なし)

◦取得状況 (計 0 件)  
(該当なし)

[その他]  
ホームページ等

<http://www.kudo.bio.titech.ac.jp/Index2.htm>

## **6. 研究組織**

(1)研究分担者  
(該当なし)

(2)研究協力者  
(該当なし)

※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。