

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07386

研究課題名(和文) 魚類聴覚器形成における組織間相互作用の解明

研究課題名(英文) Development of the lateral line system through local tissue-tissue interactions in the zebrafish head

研究代表者

和田 浩則 (Wada, Hironori)

北里大学・一般教育部・准教授

研究者番号：70322708

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)：魚類の側線器官(感丘)は、体表に決まったパターンで分布している。本研究で、我々はゼブラフィッシュの頭部の側線システム(ALL)の発生を解析した。ALLを構成する感丘は、以下の4つのメカニズムによって形成される。(1)移動しない側線原基の増殖、(2)移動する側線原基の増殖、(3)分化した感丘をつなぐ前駆細胞の増殖、(4)側線原基の出芽。さらに、我々は、Wntシグナル活性化因子であるRspo2が、舌顎骨に隣接する決まった感丘の増殖と分化に必要であることを見出した。遺伝学的な解析から、Rspo2は、第2鰓弓(舌弓)由来の間葉細胞から分泌され、隣接する前駆細胞の増殖を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物は、体の決まった場所に感覚器をつくることにより、様々な環境に適応してきた。しかし、感覚器を決まった場所につくる仕組みはよく分かっていない。この研究では、魚類の側線器官(水の流を感じる器官)の発生過程において、頭部の間葉組織(結合組織)から分泌されるタンパク質が、感覚器の細胞増殖を制御していることを示した。側線器官の前駆細胞は、増殖や移動を伴って、頭部に複雑なネットワークを作っている。特定の場所から分泌される増殖因子が働くことで、その場所に感覚器が形成される。このような、決まった場所でおきる組織どうしの相互作用が、感覚器の多様なパターンを生み出している。

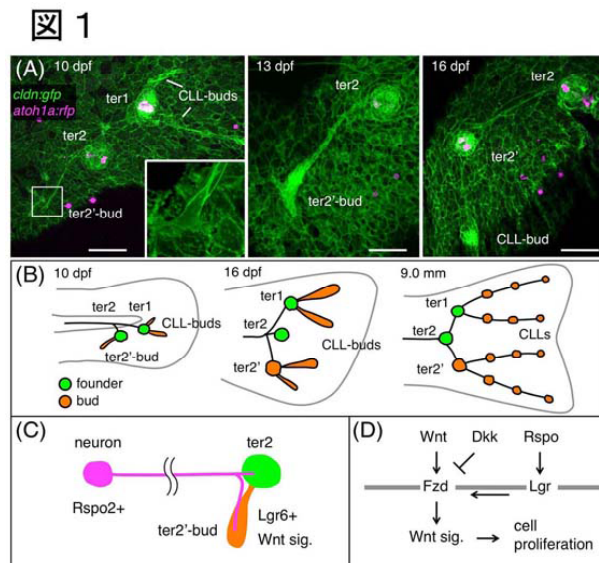
研究成果の概要(英文)：The distribution of sensory organs is important for detecting environmental signals efficiently. The mechanosensory receptors of the lateral line system, neuromasts, are stereotypically distributed over the head and body surface of fish. We investigated development of the anterior lateral line (ALL) system in zebrafish head. The ALL neuromasts formed in the predetermined positions through proliferation and differentiation of 1) non-migratory lateral line primordia, 2) migratory primordia, 3) interneuromast cells connecting pre-existing neuromasts, and 4) budding primordia. We demonstrated that R-spondin2 (Rspo2), an activator of Wnt/ -catenin signaling, is required for the development of a particular set of neuromasts associated with hyomandibular cartilage. Further genetic analyses suggested that Rspo2, which emanates from the hyoid mesenchyme, acts on the adjacent neuromast progenitor cells to stimulate their proliferation through activating Wnt/ -catenin signaling.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 側線 神経堤細胞 ブラコード Rspo2 Wnt signaling

## 1. 研究開始当初の背景

魚類の側線パターンは、領域特異的に決まっています、それぞれの魚種が環境に適応した結果であると考えられています。しかし、その発生メカニズムはよく分かっていない。例えば、ゼブラフィッシュの尾ヒレでは、4本の感丘クラスターからなるが(図1B)、他の魚種では全く異なるパターンをしている(Wada et al., 2008; *Dev. Dyn.*)。我々は、これまで、感丘クラスターが生じるさいに、感丘の出芽が起きること(図1A)、そして出芽にともなう細胞増殖には神経軸索投射が必要であることを見出した(図1C, Wada et al., 2013; *PNAS*)。一方、感丘の増殖にはWnt signalingが必要であることから(Wada et al., 2013, *Curr. Biol.*)、Wnt signalingの制御システムが重要な役割を担うのではないかと考えた(図1D)。



## 2. 研究の目的

側線パターンが多様性を生み出す分子メカニズムを明らかにすること。その際に、組織間相互作用が重要な役割を担っていることを示すこと。

## 3. 研究の方法

### (1) 頭部側線パターンの記載

遺伝的解析には、体幹部よりも発生が早い頭部の側線神経を対象とするのが有利であると考えた。しかし、体幹部の側線パターンに比べて、頭部の解析はほとんど行われていない。そこで、まず初めに、先行研究(Raible and Kruse, 2000; *J. Comp. Neurol.*)をベースに、現行のツール(トランスジェニック系統、抗体など)を用いた発生過程の記載を行った。側線原基(プラコード)、有毛細胞、神経軸索、神経堤細胞を標識するために、以下の系統を用いた。*atoh1a:rfp*, *cldnb:gfpm*, *Hgn39D*, *sox10:rfp*, *HuC:gal4*, *hspGFFDMC13F*, *UAS:gfpm*, and *UAS:rfp*。また、in situ hybridizationのプロープとして、*rspo2*, *dlx2*, *lgr6*, *sox9*、抗体染色として、anti-typeII collagen, anti-acetylated alpha-tubulinを用いた。軸索除去実験のために、*ngn1* 遺伝子に対する、anti-sense morpholinoを用いた。

### (2) Rspo2 突然変異体の遺伝学的解析

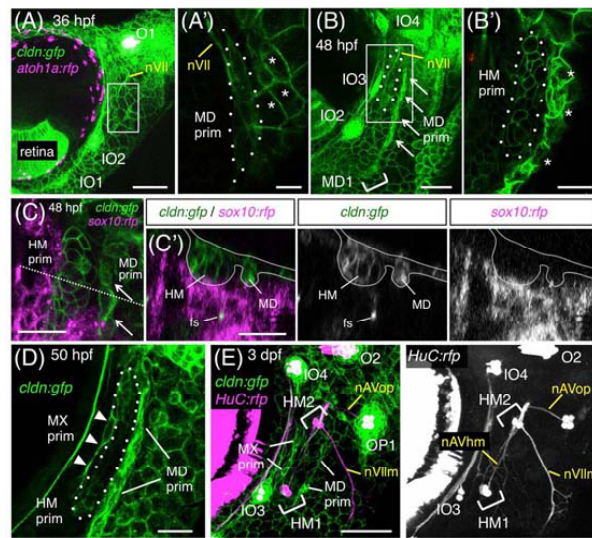
Rspo2 突然変異体(*rspo2<sup>is201/js201</sup>*) 系統を用いて遺伝学的解析を行った。Wnt signalingの機能阻害実験には、*hspGFFDMC131A*, *UAS:dkk1a-rfp*, 系統を用いた。試料の観察は、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM700 を用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 頭部側線神経系の発生

*cld:gfp* 系統を用い、頭部の側線原基（プラコード）がどのように生じるのか、詳細な発生段階の記載を行った。感丘は4つのメカニズムで生じた。いずれも前駆細胞の増殖と分化をとともなうが、その由来は、(1) プラコードが生じた場所で生じるもの (2) 側線原基が移動して生じるもの (3) 感丘同士をつなぐ前駆細胞から生じるもの (4) 出芽によって生じるものである (図2)。これまで、体幹部の感丘の形成は、側線原基の移動と deposition によって起きることが知られていたが、頭部の感丘はそれとは全く異なる発生メカニズムで生じることが分かった。

図2

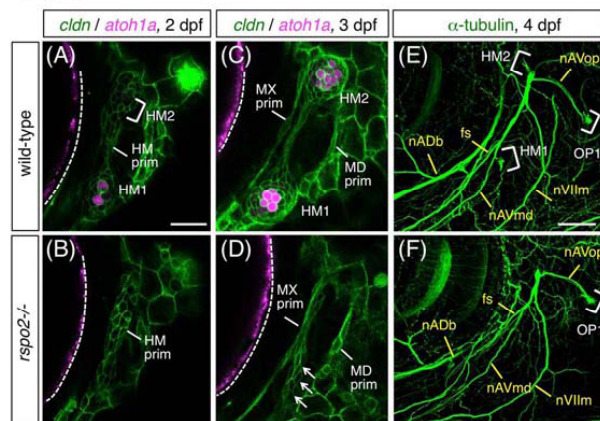


このとき、舌顎骨に隣接する2つの感丘 (HM1 と HM2, 図2E) が、第2鰓弓 (舌弓) の間葉細胞と接していることが分かった (図2C)。このことから、側線原基 (プラコード) と間葉細胞 (神経堤細胞) の間に、組織間相互作用があると考えた。

##### (2) 感丘形成における Rspo2 の役割

これまでの我々の研究から (Wada et al., 2013, *PNAS*, Wada et al., 2013, *Curr. Biol.*)、感丘の増殖には Wnt signaling が必要であり、その活性化因子として、分泌因子 Rspo2 が重要な役割を担うと考えられた (図1D)。*rspo2* 変異体では、舌顎骨に隣接する感丘 (HM1 と HM2) のみが特異的に欠損することが分かった (図3)。このとき、前駆細胞である側線プラコード (HM prim) は正常にできていることから (図3B)、Rspo2 はその増殖と分化に必要なと考えられた。2重 in situ hybridization から、Rspo2 は、第2鰓弓 (舌弓) の神経堤細胞由来の間葉細胞に発現し、一方、Rspo2 の受容体である Lgr6 (図1D) は、側線プラコード (HM prim) で発現していた。さらに、Wnt signaling 抑制因子である Dkk (図1D) を HM prim で異所的に発現させると、HM1 と HM2 が特異的に欠損した。

図3

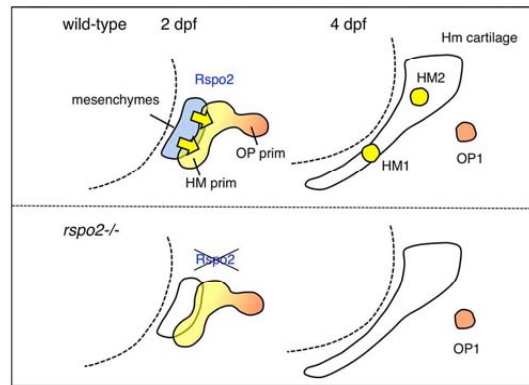


以上の結果から、神経堤由来の間葉細胞から分泌された Rspo2 は、隣接するプラコード由来の側線原基に働き、その細胞で Wnt signaling 活性を促進することによって、感丘の増殖と分化を引き起こしていることが示された。

### (3) まとめ

図4に、本研究の結果を模式図で示す。側線原基は、細胞の移動や増殖、出芽によって、頭部中に前駆細胞の複雑なネットワークをつくっている(図2)。第2鰓弓では、側線原基は神経堤由来の間葉細胞(図4, 青色)に接している。間葉細胞は、分泌因子 Rspo2 を分泌している(黄色の矢印)。Rspo2 は隣接する側線原基に働き、Wnt signaling を活性化することによって(図1D) 特定の感丘(HM1 と HM2) の増殖を制御している(図4)。このように、感覚器の形成は、それぞれの領域における構造に深く依存している。例えば、尾ヒレでは、投射する神経軸索が細胞増殖を制御している(図1C)。領域依存的な組織間作用が、複雑な感覚器パターンの形成を可能にし、また、種間の多様なパターンの違いを生み出していると考えられる。

図4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwasaki M, Kuroda J, Kawakami K, Wada H.	4. 巻 437
2. 論文標題 Epidermal regulation of bone morphogenesis through the development and regeneration of osteoblasts in the zebrafish scale.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 105-119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2018.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Iwasaki M, Kuroda J, Kawakami K, Wada H.
2. 発表標題 Epidermal regulation of bone patterning through the development and regeneration of osteoblasts in the zebrafish scale
3. 学会等名 Tokyo 2018 Cell and Developmental Biology Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田浩則
2. 発表標題 魚類側線系の多様性を生み出す発生システム
3. 学会等名 魚類分類研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwasaki M, Kawakami K, Wada H.
2. 発表標題 Epidermal patterning regulates directional bone growth during scale development in zebrafish
3. 学会等名 The 23rd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田浩則、川上浩一、岩崎美樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ頭部側線神経のパターン形成
3. 学会等名 第7回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩崎 美樹、川上 浩一、和田 浩則
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおいて表皮のパターンが鱗の形態形成を制御する
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩崎美樹・川上浩一・和田浩則
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの鱗における皮骨形成過程の解析
3. 学会等名 第6回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ようこそ和田のホームページへ  
[http://w01.tp1.jp/~a680124941/Wadas\\_home\\_page/homu.html](http://w01.tp1.jp/~a680124941/Wadas_home_page/homu.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----