

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2023

課題番号：19KK0233

研究課題名（和文）遺伝子改変ゼブラフィッシュの骨イメージングによるメカニカルストレス応答機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanical stress response mechanism using imaging analysis of genetically modified zebrafish

研究代表者

茶谷 昌宏 (Chatani, Masahiro)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：80628628

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：骨形成が異常となるゼブラフィッシュ変異体としてcloche変異体に着目し、種を超えた仕組みを調べるためnpas41遺伝子欠損メダカを作製した。npas41欠損型では血球細胞と血管内皮細胞が顕著に減少した。シングルセルRNA-seq解析から、血球細胞と血管内皮細胞の両マーカーを発現する細胞集団が同定され、遺伝子発現解析からヘマンジオブラストは初期胚の周囲に局在することが示唆された。また一部の骨の形成不全が観察され、硬組織形成への血管の関与が示唆された。ゼブラフィッシュの鰭再生時に機能するエンハンサーをメダカに導入し、鰭再生時に発現するエンハンサーを同定した。硬組織再生機構解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で小型魚類を用いることで血球と血管の両者に共通な前駆細胞である血球血管芽細胞の存在を示唆し、それに関する遺伝子発現のデータベースを構築できた点で学術的意義がある。また血管、血球、一部の骨を欠失した変異体を作成しており、その解析から生体内メカニカルストレスの受容メカニズム解明が期待される。血球血管芽細胞はヒトにも存在する幹細胞と考えられており、その分化メカニズム解明により関連疾患の解決が期待されるという点で社会的意義がある。種を超えて保存されている、組織の再生に重要なエンハンサー領域を明らかにすることは、再生医学においても重要な課題であり、将来的に再生医療への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：We focused on the cloche zebrafish mutant. We generated npas41 gene-deficient medaka to elucidate the mechanism conserved across species. The npas41-deficient medaka exhibited a marked decrease in hematopoietic and vascular endothelial cells. Single-cell RNA-seq analysis identified a cell population expressing both hematopoietic and vascular endothelial cell markers, and gene expression analysis suggested that hemangioblasts were localized around the early embryo. In addition, dysplasia of some bones was observed, suggesting the involvement of blood vessels in hard tissue formation. The enhancers that function during fin regeneration in zebrafish were analyzed in medaka, and an enhancer that is strongly expressed during fin regeneration in medaka was identified. It is expected to elucidate the mechanism of hard tissue regeneration that is conserved across species.

研究分野：骨生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ メダカ 骨 血管 血球細胞

1. 研究開始当初の背景

人が宇宙に行くと骨量減少、筋量減少、心機能低下など様々な障害が発生する。これは重力が無くなることで体内の器官に働いていたメカニカルストレスに変化が生じ、器官の恒常性維持機構が破綻したためと考えられるが、詳細なメカニズムはまだわかっていない。申請者らはメダカの骨研究モデルを用いた国際宇宙ステーション飼育研究の経験を活かし、小型魚類におけるメカニカルストレス応答能を有する器官の形成・再生機構の一端を解明する。そのため申請者はマックス・プランク心臓肺研究所所長の Didier Stainier 教授と共同研究を行い、ゼブラフィッシュやメダカの遺伝子改変体を駆使したメカニカルストレス応答器官である骨、血管などの研究を遂行する。

2. 研究の目的

(1) 生体内のメカニカルストレス受容に関与する骨と血管が欠失する小型魚類の変異体をゼブラフィッシュとメダカで新たに作出して詳細を比較し、種を超えて保存されている器官形成の基礎メカニズムを明らかにする。

(2) ゼブラフィッシュとメダカを用いて、鰭(ひれ)組織の再生現象を比較し、再生に働く重要なエンハンサーを明らかにすることで、種を超えて保存されている再生エンハンサーを同定する。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 システムを駆使し、マイクロインジェクション法を用いて小型魚類であるゼブラフィッシュやメダカの遺伝子を改変し、遺伝子欠損魚やレポーター魚を作製する。レポーター魚は、蛍光実体顕微鏡を用い、胚が生きた状態で生体内の細胞の挙動を観察する。シングルセル RNA-seq 解析を行って細胞集団の特徴を調べ、ヘマンジオブラスト集団を探索する。RNA in situ hybridization 法を用いて、血球や血管に特異的に発現する遺伝子の発現部位を明らかにする。

(2) 米国の研究室との共同研究により、すでに明らかにされているゼブラフィッシュの鰭再生で機能するエンハンサーに関して、蛍光タンパク質を発現する 4 種類の DNA ベクターを供与していただき、マイクロインジェクション法を用いてレポーターラインを作製し、メダカで機能するエンハンサーを同定する。

4. 研究成果

(1) 生体内ではメカニカルストレスが絶えず生じており、正常な器官の活動には欠かせない存在である。骨、心臓、血管はメカニカルストレスの影響を直接受ける器官の代表であり、これらの器官形成メカニズムの解析は、メカニカルストレス受容機構の解明につながる。近年、血管細胞と造血細胞の両方を調節する未知遺伝子として転写因子の *npas4l* がゼブラフィッシュの研究により同定されたが、血球血管芽細胞の存在や性質は未解明である。血球血管芽細胞は胎児期にみられる血球細胞および血管内皮細胞の共通前駆細胞とされ、硬組織形成においても重要な役割を担うと考えられる。本研究ではゼブラフィッシュ、メダカを用いて *Npas4l* の機能解析と血球血管芽細胞の探索を行った。CRISPR/Cas9 システムで *npas4l* 遺伝子欠損メダカを作製し、血球細胞・血管内皮細胞が標識されたレポーターメダ

カと交配したところ *npas41* 欠損型では GFP 陽性の血球細胞と血管内皮細胞が顕著に減少しゼブラフィッシュと同様の結果を得た(図1)。発生初期の野生型胚および *npas41* 欠損型胚を用いてシングルセル RNA-seq 解析を行ったところ、13 個の細胞集団に分けることが出来、血球細胞と血管内皮細胞のマーカーを発現する細胞集団が存在することがわかり、血球血管芽細胞の候補が見出された(図2)。さらに、RNA in situ hybridization 法で内在性の遺伝子発現を調べたところ、その細胞集団が胚の周囲に存在していることが示された。また、この変異体の骨組織を調べると、形成不全になっている骨が一部のみつかり、血管、血球、心臓の発生が硬組織形成とどのようにリンクするかを示唆するデータが得られた。本研究で作製した血管や骨が欠落した変異体モデルを解析することで、生体内メカニカルストレスと器官形成のさらなるメカニズム解明が期待される。現在、論文にまとめ投稿準備中である。

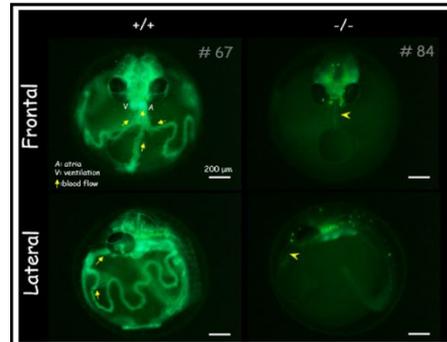


図1. 変異体(右)では血球・血管の蛍光シグナルが顕著に減少した。

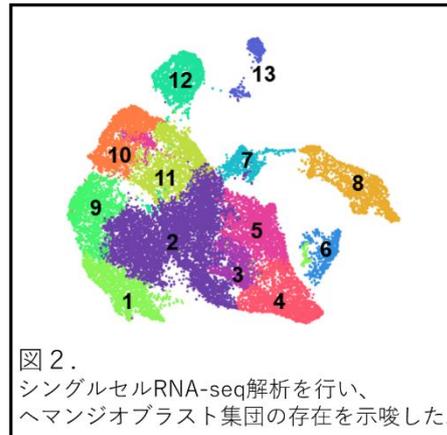


図2. シングルセルRNA-seq解析を行い、ヘマングリオblast 集団の存在を示唆した。

(2) 米国の研究チームは、ゼブラフィッシュの鰭(ひれ)の再生時に機能するエンハンサーをいくつか同定している。種を超えて保存されたエンハンサーの仕組みを明らかにするため、それらのエンハンサーで GFP が発現誘導される DNA 発現ベクターを米国の研究室から複数提供していただき、今回、メダカに導入して解析した。その結果、4 系統のうち 1 系統においてメダカの鰭(ひれ)再生時に強く発現するエンハンサーを同定した(図3)。このエンハンサーは、種を超えて保存されている再生に重要な働きをするエンハンサー領域である可能性が高く、骨組織の周囲に発現していたことから、硬組織の再生に必要なエンハンサーであることを示唆した。今後は転写因子などを同定することで、ゲノムレベルにおける再生メカニズムの解明が期待される。現在、論文にまとめ投稿準備中である。

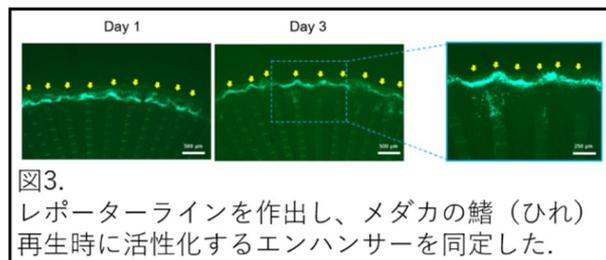


図3. レポーターラインを作出し、メダカの鰭(ひれ)再生時に活性化するエンハンサーを同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ikeda Megumi, Karakawa Akiko, Takizawa Hideomi, Azetsu Yuki, Sakai Nobuhiro, Chatani Masahiro, Suzuki Noriyuki, Takami Masamichi	4. 巻 48
2. 論文標題 Effects of Anti-Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand Antibody and Zoledronic Acid on Periapical Lesion Development in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Endodontics	6. 最初と最後の頁 632 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joen.2022.02.002	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 -

1. 著者名 Sato Yurie, Hosonuma Masahiro, Sugawara Daiki, Azetsu Yuki, Karakawa Akiko, Chatani Masahiro, Funatsu Takahiro, Takami Masamichi, Sakai Nobuhiro	4. 巻 156
2. 論文標題 Cholesterol and fat in diet disrupt bone and tooth homeostasis in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2022.113940	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 -

1. 著者名 Yamaguchi Maho, Takami Masamichi, Azetsu Yuki, Karakawa Akiko, Chatani Masahiro, Funatsu Takahiro, Sakai Nobuhiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Effects of anti-RANKL antibodies administered to pregnant mice on bone and tooth development in neonates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 186-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.03.001	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 -

1. 著者名 Hideomi Takizawa, Akiko Karakawa, Tetsuo Suzawa, Masahiro Chatani, Megumi Ikeda, Nobuhiro Sakai, Yuki Azetsu, Masahiro Takahashi, Eri Urano, Ryutaro Kamijo, Koutaro Maki, Masamichi Takami	4. 巻 146
2. 論文標題 Neural crest-derived cells possess differentiation potential to keratinocytes in the process of wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 112593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2021.112593	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 -

1. 著者名 Masahiro Chatani, Akira Kudo	4. 巻 32
2. 論文標題 Fish as a Model for Research in Space	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Handbook of Space Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 701-715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-05526-4_5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Satoshi Furukawa, Masahiro Chatani, Atsushi Higashitani, Akira Higashibata, Fuminori Kawano, Takeshi Nikawa, Takuro Numaga-Tomita, Toshihiko Ogura, Fuminori Sato, Atsuko Sehara-Fujisawa, Masahiro Shinohara, Toru Shimazu, Satoru Takahashi, Haruko Watanabe-Takano	4. 巻 7
2. 論文標題 Findings from recent studies by the Japan Aerospace Exploration Agency examining musculoskeletal atrophy in space and on Earth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41526-021-00145-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Natsuhiko Takahashi, Masamichi Takami, Masahiro Chatani	4. 巻 35
2. 論文標題 Investigation of osteogenesis changes in medaka larvae reared in normal gravity, simulated-microgravity and hypergravity environments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological Sciences in Space	6. 最初と最後の頁 24-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2187/bss.35.24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dodo Y, Chatani M, Azetsu Y, Hosonuma M, Karakawa A, Sakai N, Negishi-Koga T, Tsuji M, Inagaki K, Kiuchi Y, Takami M.	4. 巻 133
2. 論文標題 Myelination during fracture healing in vivo in myelin protein zero (p0) transgenic medaka line.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115225	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 -

1. 著者名 畔津佑季、百々悠介、高見正道、茶谷昌宏	4. 巻 63, 10
2. 論文標題 メダカからひも解く骨の科学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 1417, 1422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18888/se.0000001463	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kai Otake, Yuki Azetsu, Masahiro Chatani, Akiko Karakawa, Satoko Nishida, Aiko Hirayama, Rina Kobayashi, Nobuhiro Sakai, Noriyuki Suzuki, Masamichi Takami	4. 巻 66
2. 論文標題 Abnormal bone regeneration induced by FK506 in medaka fin revealed by in vivo imaging	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 381-390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2024.02.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Satoko Nishida, Yuki Azetsu, Masahiro Chatani, Akiko Karakawa, Kai Otake, Hidemitsu Sugiki, Nobuhiro Sakai, Yasubumi Maruoka, Mie Myers, Masamichi Takami	4. 巻 66
2. 論文標題 Tacrolimus, FK506, promotes bone formation in bone defect mouse model	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 391-402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2024.02.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomohiko Makiyama, Takashi Obama, Yuichi Watanabe, Masahiro Chatani, Yuki Azetsu, Kosuke Kawaguchi, Tsuneo Imanaka, Hiroyuki Itabe	4. 巻 433
2. 論文標題 Behavior of intracellular lipid droplets during cell division in HuH7 hepatoma cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2023.113855.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masahiro Chatani, Justin Martinez, Didier Stainier
2. 発表標題 Cloche/Npas4l is Essential for Hematopoiesis and Vasculogenesis
3. 学会等名 International Institute Evaluation by the Scientific Advisory Board
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiro Chatani, Shunsuke Kobayashi, Takashi Takaki, Masamichi Takami
2. 発表標題 New type of TRAP-positive cell contributes to actinotrichia degradation during fin fold formation
3. 学会等名 11th EUROPEAN ZEBRAFISH 2020 VIRTUAL MEETING (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 茶谷昌宏、小林俊介、高木孝士、高見正道
2. 発表標題 遺伝子改変メダカを用いた鰭の原繊維を壊す細胞の探索
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤ゆり絵, 坂井信裕, 黒滝優太郎, 細沼雅弘, 唐川亜希子, 畔津佑季, 茶谷昌宏, 高見正道
2. 発表標題 高コレステロール食によって誘発されるマウス骨量低下の解析
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 百々 悠介、茶谷 昌宏、石川 紘司、畔津 佑季、永井 隆士、木内 祐二、高見 正道、稲垣 克記
2. 発表標題 遺伝子改変メダカを用いた骨折治癒過程における髄鞘と骨芽細胞の機能解明
3. 学会等名 第40回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畔津 佑季、茶谷 昌宏、唐川 亜希子、坂井 信裕、高見 正道
2. 発表標題 骨および歯の恒常性維持におけるグルココルチコイド受容体の機能-遺伝子改変メダカを用いた解析-
3. 学会等名 第142回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 唐川 亜希子、坂井 信裕、茶谷 昌宏、高見 正道
2. 発表標題 抗RANKL抗体とゾレドネートがマウスの歯の恒常性に及ぼす薬理作用の比較
3. 学会等名 第142回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井 信裕、黒滝 優太郎、佐藤 ゆり絵、畔津 佑季、唐川 亜希子、茶谷 昌宏、高見 正道
2. 発表標題 脂質の過量摂取が歯の恒常性維持機構に及ぼす影響
3. 学会等名 第142回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 茶谷昌宏
2. 発表標題 メダカを用いた宇宙と地上の骨生物学研究
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 茶谷昌宏 高見正道
2. 発表標題 メダカnpas4lは血球および血管内皮細胞の分化に必須である
3. 学会等名 第42回日本骨代謝学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Masahiro Chatani, Justin Martinez, Hendrik Schultheis, Kikhi Khrievono, Stefan Guenther, Masamichi Takami, Mario Looso, Didier Stainier
2. 発表標題 Exploration of a new hemangioblast population by analysis of medaka npas4l mutants
3. 学会等名 International Zebrafish Conference 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>昭和大学歯学部歯科薬理学講座ホームページ https://www10.showa-u.ac.jp/~dpharmac/</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Max Planck Institute for heart and lung			
米国	Duke University			