

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34304

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20625

研究課題名（和文）クッペル胞上皮細胞の分化転換機構解明

研究課題名（英文）Mechanisms underlying transdifferentiation of Kupffer's vesicle epithelial cells

研究代表者

池田 貴史（Ikeda, Takafumi）

京都産業大学・タンパク質動態研究所・研究員

研究者番号：40962329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：真骨魚類胚に存在するクッペル胞の構成細胞は、発生の進行に伴って上皮性を失い、周囲の中胚葉組織へと移行する。本研究では、クッペル胞構成細胞の標識技術の改良や、分化転換の上流シグナルの探索をはじめとして、クッペル胞構成細胞の分化転換機構を解明するための基盤構築に取り組んだ。これまで解析対象としていたゼブラフィッシュ胚に加えてメダカ胚においてクッペル胞上皮細胞を追跡するための遺伝子組換え系統を作出したほか、ゼブラフィッシュ胚において、より初期の段階からクッペル胞上皮細胞を可視化できる系統の作出に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分化が進んだ動物細胞は、一般に他の系譜の細胞に再分化することはないが、主として再生過程において、特定の細胞が性質を変化させて別の細胞種となることが知られている。こうした分化転換は動物細胞の分化可塑性を解明する上で重要な研究対象であるが、その制御機構はいまだ解き明かされていない。本研究の学術的意義は、正常発生における分化転換の役割と機構に注目し、複数の生物種においてクッペル胞上皮細胞の分化転換の動態を可視化する技術を確認した点である。

研究成果の概要（英文）：The Kupffer's vesicle cells in teleost embryos lose their epithelial nature and translocate to the surrounding mesodermal tissue as development progresses. In this study, we established a basis for elucidating the mechanism of transdifferentiation of Kupffer's vesicle cells, including improvement of labeling technology for these cells and search for upstream signals of transdifferentiation. In addition to the zebrafish embryos that have been used in my previous study, I have generated a transgenic line for tracking Kupffer's vesicle cells in medaka embryos, and also generated a line that can visualize Kupffer's vesicle cells from an earlier stage in zebrafish embryos.

研究分野：発生生物学

キーワード：クッペル胞 分化転換 上皮間充織転換 dand5 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

一般的な動物発生においては、細胞の分化能は系譜の特定化に伴って低下し、成熟した細胞が他の系譜に転換することはほとんどない。しかし、一部の再生過程においては、分化細胞が別の細胞種に変化することがある。こうした現象は分化転換と呼ばれ、細胞の可塑性や分化能を研究する上で重要な材料であるが、正常発生における役割や機構はいまだ不明である。

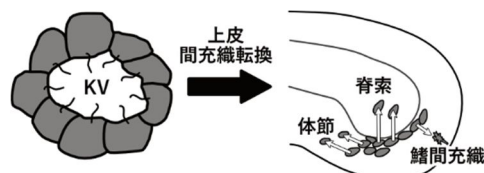


図1: KVを構成する上皮細胞は、KVの退化後に上皮間充織転換により体節、脊索、鰭間充織という複数の中胚葉組織に組みこまれる。

私は大学院における研究から、ゼブラフィッシュ初期胚に存在するクッセル細胞(KV)の構成細胞が、正常発生において分化転換することを提唱した(Ikeda et al., *Dev Growth Differ*, 2022)。KVは胚の尾部に一過的に形成され、左右軸オーガナイザーとしての機能を果たしたのちに退化する。ゼブラフィッシュ胚を用いた研究から、KVの退化後に、KV上皮細胞が体節や脊索、鰭間充織といった中胚葉性組織に移動し、中胚葉性の分化マーカーを発現して各組織の構成細胞に再分化することが明らかになった(図1)。この結果は、機能的な分化細胞であるKV上皮細胞が未分化中胚葉への分化転換を通じて別の細胞系譜へ再利用されることを示しており、動物発生における細胞の分化可塑性を研究するうえで興味深い現象である。しかし、KV上皮細胞の分化転換がどのようなシグナルにより誘導されるか、また、他の生物種においてこの現象が普遍的にみられるかは、ほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュ胚を用いてKV上皮細胞の分化転換をつかさどるシグナルを探索することに加えて、メダカ胚においてもKV上皮細胞の追跡実験を行い、KV上皮細胞の分化転換現象の普遍性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

分化転換シグナルの探索

研究代表者が過去に樹立したクッセル胞上皮細胞可視化ゼブラフィッシュ系統 *Tg(dand5:EGFP)* を用い、各種シグナル阻害剤を添加した際のクッセル胞上皮細胞の挙動を共焦点顕微鏡により観察することで、クッセル胞上皮細胞の分化転換に異常を生じさせる薬剤を探索した。

メダカ胚におけるKV上皮細胞の追跡

メダカ胚において、KV上皮細胞のマーカーである *dand5* のプロモーターの下流でEGFPを発現する遺伝子組換え系統をI-SceI法により再樹立したほか、光変換型蛍光タンパク質であるmEosEM(Fu et al., *Nat. Methods*, 2020)を *dand5* プロモーター下流で発現する系統の作出にも取り組んだ。得られた系統の胚を共焦点顕微鏡により観察し、メダカ胚のKV上皮細胞の予定運命を解析した。

ゼブラフィッシュ胚におけるKV上皮細胞の標識技術改良

*Tg(dand5:EGFP)*はKV上皮細胞を特異的かつ高輝度に標識できる一方で、蛍光が検出可

能になる発生段階が比較的遅いという欠点があった。特に、KV 上皮細胞は dorsal forerunner cells と呼ばれる非上皮性の前駆細胞から間充織上皮転換により分化することが知られているが (Cooper & D'Amico, *Dev. Biol.*, 1996 ほか) *Tg(dand5:EGFP)* では、dorsal forerunner cells において EGFP が発現しないため、この分化過程を追跡することが不可能であった。そこで、dorsal forerunner cells に発現する複数の遺伝子のプロモーターをクローニングして EGFP を用いたレポーターアッセイを行い、*Tg(dand5:EGFP)* よりも早い段階から KV 上皮細胞の系譜追跡を行える系統の作出を目指した。

4. 研究成果

分化転換シグナルの探索

Tg(dand5:EGFP) 胚に対して Nodal、BMP、FGF シグナル等の阻害剤を添加し、KV 上皮細胞の挙動を解析したところ、FGF シグナル阻害剤 (SU5402) 処理胚において、分化転換開始後の KV 上皮細胞の形態および分布に異常が生じる可能性を見出した。しかし、SU5402 処理により周囲の中胚葉細胞の形態にも異常が生じたため、現在 KV 上皮細胞自律的に FGF シグナルを摂動する実験系の構築を行っている。

メダカ胚における KV 上皮細胞の追跡

メダカ胚において *dand5* のプロモーターの下流で EGFP および mEosEM を発現する遺伝子組み換え系統を作出した。このうち、*Tg(dand5:EGFP)* における観察から、メダカ胚において KV 上皮細胞が KV 崩壊後にも生存することを見出し、現在 KV 上皮細胞の分布を詳細に解析している。*Tg(dand5:mEosEM)* については、異所的な mEosEM の発現が見られたため、系統を作製し直している。

ゼブラフィッシュ胚における KV 上皮細胞の標識技術改良

dorsal forerunner cells に発現する複数の遺伝子のプロモーターをクローニングして EGFP を用いたレポーターアッセイを行ったところ、*dand5* に比べてより初期の段階から KV 上皮細胞において EGFP を発現させるプロモーターが得られた。ただし、このプロモーターを用いて作製した系統では、dorsal forerunner cells における EGFP 発現が十分検出できなかった。そこで現在、より高輝度のレポーター遺伝子を用い、dorsal forerunner cells の段階から KV 上皮細胞の追跡実験を行える実験系の開発に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagura Kei, Ikeda Takafumi, Hasebe Takashi, Satou-Kobayashi Yumeko, Udagawa Sumio, Shigenobu Shuji, Ishizuya-Oka Atsuko, Taira Masanori	4. 巻 -
2. 論文標題 Histological and gene-expression analyses of pyloric sphincter formation during stomach metamorphosis in <i>Xenopus laevis</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.04.29.591326	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 Fukushima Hiroto S, Ikeda Takafumi, Ikeda Shinra, Takeda Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Cell cycle length regulates heterochromatin reprogramming during early development in non-mammalian vertebrates	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.01.23.576847	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 Mikami Tomoyuki, Ikeda Takafumi, Muramiya Yusuke, Hirasawa Tatsuya, Iwasaki Wataru	4. 巻 66
2. 論文標題 Three dimensional anatomy of the Tully monster casts doubt on its presumed vertebrate affinities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Palaeontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pala.12646	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 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda
2. 発表標題 Extracellular interplay of Nodal and Dand5 proteins during the left-right asymmetric pattern formation in the lateral plate mesoderm
3. 学会等名 The 4th GfE-JSDB Young Scientist Exchange Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda
2. 発表標題 Extracellular interplay of Nodal and Dand5 proteins during the left-right asymmetric pattern formation in the lateral plate mesoderm
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda
2. 発表標題 Extracellular behavior of Nodal and Dand5 proteins in zebrafish embryos during left-right asymmetry formation
3. 学会等名 Yamada Conference LXXV Origin of left-right asymmetry in animals (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda
2. 発表標題 Extracellular regulation of Nodal morphogens in the left-right asymmetry formation of zebrafish embryos
3. 学会等名 The Company of Biologists Workshop: The Biology and Physics of Left-Right Patterning (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda
2. 発表標題 Extracellular regulation of Nodal and Dand5 proteins in the left-right asymmetry formation of zebrafish embryos
3. 学会等名 The 28th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda
2. 発表標題 Transdifferentiation of Kupffer's vesicle-derived cells into mesodermal lineages (クッペル胞由来細胞の中胚葉系譜への分化転換)
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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