

平成21年 5月 31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18770197

研究課題名 (和文) ヒレ再生メカニズムの細胞学的・分子学的解析

研究課題名 (英文) Cellular and molecular analyses of fish fin regeneration

研究代表者

中谷 友紀 (NAKATANI YUKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・科学研究費研究員

研究者番号：80397033

研究成果の概要：

メダカは高い再生能力をもち、特にヒレは切断後わずか10日でほぼ元通りのヒレを再生できる。本研究ではメダカのヒレ再生を細胞レベルおよび分子レベルの両方の側面から理解することを目的とし、研究を進めた。その結果、再生時に起こる個々の細胞現象を明らかにし、また低分子化合物阻害剤を用いた実験から、PI3K シグナル伝達経路がヒレ再生過程での間充細胞の移動やヒレの血管新生に関与していることを解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	978,691	0	978,691
2008年度	921,309	276,392	1,197,701
年度			
年度			
総計	3,600,000	276,392	3,876,392

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：形態形成・メダカ・再生

1. 研究開始当初の背景

硬骨魚類であるメダカは室内飼育が簡便で、かつ世代交代期間が約3ヶ月と短いことから、実験動物としての応用が精力的にすすめられ、日本を中心にゲノムプロジェクトが進行している。

またメダカを始めとした魚類は著しい再生能を示す。特にヒレは再生研究に最適の器官であり、再生にかかる時間も短く、約10日でほぼ元通りのヒレを再生できる。ヒレはわずかな種類数の細胞群(上皮、神経、鱗条(骨)、

血管、間充細胞)からなる単純な組織であり、再生のような複雑な現象を明らかにするのに適している。イモリなどの両生類に比べ透明であることから、再生過程の観察がしやすい。

我々はメダカ再生時に起こる細胞移動・増殖およびアポトーシス現象を明らかにし、ヒレ再生の基盤を築き上げてきた。またEST解析やマイクロアレイ解析により、ヒレ再生時に特異的に発現する遺伝子を網羅的に単離・同定することに成功してきた(Katogi, et al. (2004) Mech. Dev. 121, 861-872)。こ

の中には、再生芽の形成誘導時のみに発現する新規分子など、再生を担うキー因子である可能性が強く示唆されるものがあった。また、再生時には再生芽先端に傷上皮とよばれる分厚い上皮構造が形成され、再生芽の誘導・維持に重要であると考えられている。我々が単離した分子には、傷上皮のみで特異的に発現する遺伝子があった。つまり、この分子は細胞の再生能力維持に深く関わっていることが予測される。

2. 研究の目的

本研究ではメダカのヒレ再生を細胞レベルおよび分子レベルで理解することを目的としている。メダカ EST 解析およびマイクロアレイ解析で得られた、再生時に特異的に発現する遺伝子を中心に、細胞レベルの研究では、トランスジェニックメダカを用いた、個々の細胞レベルでのより詳細なヒレ再生メカニズムの解明を進めることを計画した。また分子レベルでは、低分子化合物である各種阻害剤を用いて、ヒレ再生に関与する分子経路とその影響を調べることを試みた。

再生能がどのようにして獲得され、維持されているのかを理解することで、再生医療への基礎的知見に大きく貢献できると考えている。

3. 研究の方法

ヒレ再生過程で起こる種々の細胞現象を明らかにするため、トランスジェニックメダカを用いた解析を試みた。トランスジェニックメダカ作製にあたっては、ヒートショックプロモーター下流に蛍光色素である EGFP をつないだコンストラクトを導入したトランスジェニックメダカを作製し、ヒレ再生時に特定の細胞を蛍光発色させることで、細胞移動などの追跡を行う。

また、EST 解析およびマイクロアレイ解析から得られた、再生芽や傷上皮で特異的に発現する遺伝子を候補とした。これら候補遺伝子のプロモーター領域に EGFP をつないだコンストラクトを作製し、メダカ卵へのインジェクションを行って、再生芽や傷上皮で特異的に EGFP を発現するトランスジェニックメダカのライン化を行い、ヒレ再生過程における EGFP 発現細胞の挙動を観察する。

一方分子レベルでの解析では、ヒレ再生に関与するシグナル伝達経路を同定するため、ヒレを切断したメダカに各種シグナル伝達経路阻害剤を投与し、ヒレ再生にどのような影響をおよぼすかを検討する。

4. 研究成果

メダカ尾ビレの構造を図 1 に示す。ヒレは鰭条（骨）、血管、神経、表皮、間充織細胞といった数種類の細胞群からなる、シンプルな構造のため、研究材料として非常に扱いやすい。

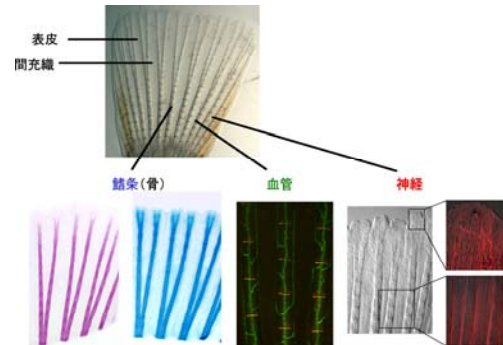


図 1：メダカ尾ビレの構造

写真上部が尾の先端（後方）を示す。鰭条（骨）はそれぞれアリザリンレッド、アルシアンブルー染色を行った。血管は血管内皮細胞特異的 EGFP 発現トランスジェニックメダカ（緑色が血管）、神経は抗アセチル化チューブリン抗体にて免疫染色（赤色が神経）を行った。

細胞学的解析では、ヒートショックプロモーター下流に EGFP をつないだコンストラクトを作製し、メダカ受精卵へのインジェクションを行った。胚を 38°C でヒートショック処理し、EGFP の発現がみられた個体を成魚にまで育て、さらに EGFP を発現する卵を産む成魚をヒートショックトランスジェニックメダカとして、そのライン化に成功した。

また EST 解析およびマイクロアレイ解析から、再生芽や傷上皮細胞で特異的に発現する遺伝子を検索した。再生芽に特異的に発現する遺伝子として、beta igh3、neurocan および新規遺伝子である e16d23 を選び、傷上皮に特異的に発現する遺伝子には、spp12 と tsp2 を用いることにした (Katogi et al. (2004) Mech. Dev. 121, 861-872; Nishidate et al. (2007) Dev. Dyn. 236, 2685-2693)。これら各候補遺伝子のプロモーター領域をメダカゲノムより単離し、その下流に EGFP をつなげたコンストラクトを作製した。完成したコンストラクトをメダカ受精卵にインジェクションし、ライン化を行った。今後はライン化に成功したトランスジェニックメダカのヒレを切断し、ヒレ再生過程で EGFP 発現細胞がヒレのどの組織に分化するのかを詳細に検討する予定である。

分子学的解析では、シグナル伝達経路阻害剤を用いて、メダカの新皮再生に関与するシグナル伝達経路の特定とその役割を検討した。フォスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3K) は細胞移動や増殖、アポトーシス、細胞内小胞輸送といった種々のメカニズムに深く関与していることが知られている。PI3K の阻害剤である LY294002 (LY) をヒレ切断後のメダカに投与すると、ヒレ再生が阻害されることがわかった (図2)。

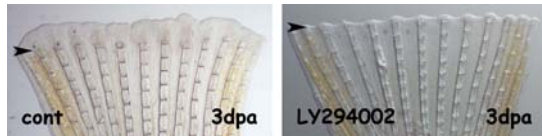


図2 : LY 処理によるヒレ再生の阻害。再生3日目のヒレの写真。左がコントロール (cont) の未処理の再生ヒレで、右が LY 処理した再生ヒレ (LY)。矢頭が切断面を示し、矢頭より上部が新しく再生したヒレ組織を示す。右の LY 処理したヒレでは、矢頭より上方に再生したヒレ組織がないことがわかる。

LY 処理による再生芽形成への影響を調べたところ、組織切片の結果から、LY 処理したヒレでは再生芽様の構造がほとんどみられなかった。そこで、再生芽の分子マーカーである *msxC* 遺伝子などの発現を観察したところ、これらの分子マーカーの再生芽での発現が減少しており、分子的にも再生芽形成が阻害されていることがわかった。

また再生芽は増殖能の高い細胞からなる細胞集団組織である。増殖中の細胞 DNA にピリミジンアナログである BrdU を取り込ませ、再生芽に存在する BrdU 陽性細胞、つまり増殖能をもつ細胞、の数やその局在パターンを調べた。未処理の通常の再生ヒレでは、ヒレ切断後に増殖能をもった細胞が多数出現し、その後、ヒレの再生部位先端に移動して、再生芽を形成していることがわかった。

ところが LY 処理した再生ヒレでは、ヒレ切断後に現れる BrdU 陽性細胞の数は、未処理のヒレとで大きな差はみられなかったものの、その後の再生芽への移動が阻害されていることが確認できた。

以上の結果から、PI3K シグナル伝達経路がヒレ再生過程において、再生芽形成に重要な役割を果たしており、特に再生芽を構成する細胞群の移動に深く関与していることが明らかになった。

ヒレ切断後に傷口に形成される傷上皮は、再生芽と同様、再生する組織に生じる特殊な構造である。傷上皮特異的に発現する *d1x5a* 遺伝子などの発現を観察したところ、LY 処理

した再生ヒレではそれらの発現が減少していることがわかった。

さらに蛍光色素である DiI を使い、再生ヒレの上皮細胞をラベルすると、ヒレ切断後、切断面下方に存在する上皮細胞がすみやかに移動し、傷口 (切断面) を覆うことで傷上皮が形成されることがわかった。一方、LY 処理した再生ヒレでは、この上皮細胞の傷口への移動に著しい遅れがみられた。

PI3K の下流因子である Akt は、リン酸化を受けることで活性型 Akt となる。ヒレ再生時に Akt が活性化されているかを調べるため、抗リン酸化 Akt 抗体を用いた、組織染色を行った。すると切断後の上皮細胞で、リン酸化 Akt 陽性細胞が多数確認された。その数は切断後 10 時間でほぼピークとなり、切断後 3 日目にはリン酸化 Akt 陽性細胞はほとんど観察されなかった。またリン酸化 Akt 陽性細胞の数は、LY 処理によって阻害された。

これまでの結果から、再生芽でも Akt がリン酸化されることが予想されていたが、我々の結果では、再生芽にはリン酸化 Akt 陽性細胞は確認できなかった。つまり、Akt 依存性の PI3K シグナル伝達経路は、再生芽ではなく上皮細胞ではたらいっていることが示唆された。

さらに、LY 処理したヒレでは、ヒレ内部に存在する血管の再生が阻害されていることがわかった (図3)。血管内皮細胞特異的に EGFP を発現するトランスジェニックメダカを作製し、ヒレ切断後の血管の再生を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、コントロールの未処理のヒレでは、再生部位に血管が広く張りめぐらされ、plexus と呼ばれる網目状の構造を形成していた。ところが LY 処理したヒレでは、血管の plexus 構造がまったく確認されなかった。

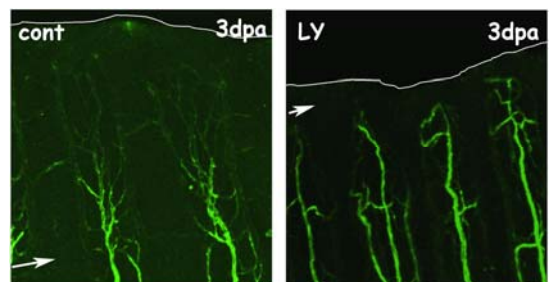


図3 : LY 処理による血管新生への阻害作用。再生3日目のヒレの写真。左がコントロール (cont) の未処理の再生ヒレで、右が LY 処理した再生ヒレ (LY)。白矢印が切断面を示し、矢印より上部が新しく再生したヒレ組織を示す。左の未処理のヒレでは血管が網目状に張りめぐらされているが、右の LY 処理したヒレでは、血管の再生はほとんどみられな

い。

以上の結果から、PI3K シグナル伝達経路がメダカのヒレ再生に関与していることが明らかとなった。ヒレ切断後には、①細胞周期の活性化、②間充織細胞の移動、③PI3K-Akt 依存性の上皮細胞の再編成、④細胞の分化、といった現象が起こることで、ヒレの再生が秩序正しく進んでいくことが示唆された。魚類のヒレ再生過程では、今回我々が示した PI3K シグナル伝達経路の他に、FGF シグナル伝達経路や Wnt シグナル伝達経路が関与していることが報告されており、各シグナル伝達分子の相互作用や再生過程への影響をより詳細に調べることで、今後の再生研究の発展性が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Nakatani, Y., Nishidate, M., Fujita, M., Kawakami, A. and Kudo, A.

Migration of mesenchymal cell fated to blastema is necessary for fish fin regeneration. *Development, Growth and Differentiation*, 50, 71-83, 2008. 査読有り

② Veeman, M. T., Nakatani, Y., Hendrickson, C., Ericson, V., Lin, C. and Smith, W. C.

chongmague reveals an essential role for laminin-mediated boundary formation in chordate convergence and extension. *Development*, 135, 33-41, 2008. 査読有り

③ Nakatani, Y., Kawakami, A. and Kudo, A. Cellular and molecular process of regeneration, with special emphasis on fish fins. *Development, Growth and Differentiation*, 49, 145-154, 2007. 査読有り

④ Nishidate, M., Nakatani, Y., Kudo, A. and Kawakami, A.

Identification of novel markers expressed during fin regeneration by microarray analysis in medaka fish. *Developmental Dynamics*, 236, 2685-2693, 2007. 査読有り

⑤ Sakaguchi, S., Nakatani, Y., Takamatsu, N., Hori, H., Inohaya, K. and Kudo, A. Medaka *unextended-fin* mutants suggest a role of *hoxb8a* in the cell migration and

the osteoblast differentiation during appendage formation. *Developmental Biology*, 293, 426-438. 2006. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

① 中谷友紀、西舘正修、藤田深里、川上厚志、工藤明

魚類におけるヒレ再生メカニズム、日本発生生物学学会第 40 回大会、2007 年 5 月 30 日、福岡

② 中谷友紀、西舘正修、藤田深里、川上厚志、工藤明

メダカヒレ再生時の再生芽形成に関与する分子メカニズムの解析、日本動物学会第 77 回大会、2006 年 9 月 22 日、島根

③ 西舘正修、中谷友紀、川上厚志、工藤明

メダカヒレ再生時に発現誘導される遺伝子群の解析、第 12 回小型魚類研究会、2006 年 9 月 16 日、三島

④ 中谷友紀、西舘正修、川上厚志、工藤明
メダカ成魚におけるヒレ再生メカニズムの解析、日本発生生物学学会第 39 回大会、2006 年 5 月 30 日、広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 友紀 (NAKATANI YUKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
科学研究費研究員

研究者番号：80397033

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし