

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2012～2015

課題番号：24570233

研究課題名(和文) 魚類の組織再生における細胞間相互作用のメカニズム

研究課題名(英文) Study of cell interacting mechanism during fish tissue regeneration

研究代表者

川上 厚志 (Kawakami, Atsushi)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：00221896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織再生の分子過程を理解するために、本研究ではゼブラフィッシュ鱗の再生開始・進行に関わるシグナルメカニズムの解析と、多様な細胞の機能を解明することを目標とした。第一に、再生におけるFgfシグナルの作用メカニズムの解明を行い、Fgf20a、Fgf3の異なった作用を明らかにした。また、再生細胞の細胞死を起こす変異体の解析を行い、ミエロイド細胞の供給する液性因子によって、再生細胞の増殖、生存がサポートされていることを示した。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular processes of tissue regeneration, we aimed to elucidate the signalling mechanism and cellular functions that control the zebrafish fin regeneration. We analyzed the role of Fgf signals during regeneration and revealed the essential functions of Fgf20a and Fgf3. Further, we analyzed a mutant that displays the apoptosis of regenerating cells and showed that a diffusible substance from the myeloid cells supports the survival and proliferation of regenerating cells.

研究分野：生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 再生 細胞系譜 トランスジェニック Fgfシグナル

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

有尾両生類や魚類における再生能力は数世紀も前から知られてきた。特に、魚類は脊椎動物でも多様な組織が再生可能な生物であり、心臓、鱗、脊髄臓器、肝臓、腎臓をはじめ様々の組織を材料として再生の解析が行われてきた。

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、私たち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充織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。

近年、再生への関与が示されているシグナルの中でも、Fgf シグナルは必須の作用をすることがドミナントネガティブ(dn)Fgfr トランスジェニックを使った解析によって示されており、Fgf シグナルは再生過程の細胞間の情報伝達に関わっていることは確実である。しかし、Fgf シグナルが実際に再生のどの段階の、どの細胞で作用しているかは明らかになっていなかった。

また、再生過程の研究には歴史的に成体組織が用いられてきたが、一方で、私達は孵化直後の幼生を使った再生解析系を開発し、これを使って再生過程の解析を行ってきたこの系はホモ致死性の変異個体でも再生のアッセイが可能であり、私達はこれまでの研究で、再生細胞がアポトーシスを起こす変異体 *cloche* を発見した。この変異体は血球と血管内皮細胞の分化に欠損を持つ変異として1995年に報告された変異体である。私たちは、特定領域研究「細胞周期」公募研究(H22-23年度)によって解析を進め、Cloche が再生における増殖細胞の細胞周期制御に関わっていることを報告した。

2. 研究の目的

本研究では第一に、我々の開発してきた再生細胞マーカーやトランスジェニックレポーターを使い、Fgf をコアとした細胞間相互

作用を解明することを目標の一つとした。これによって、Fgf シグナルの細胞レベルの作用点や役割だけでなく、再生過程の重要な細胞間相互作用を明らかにできることが期待できる。

さらに第二に、私達がゼブラフィッシュ幼生の再生アッセイで発見した再生細胞のアポトーシス変異体 *cloche* の解析を進め、再生細胞の増殖と生存のメカニズムを解明することを第二の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 再生過程における Fgf シグナルの作用メカニズム

再生過程に必須の Fgf リガンドの同定

Fgf シグナルは再生に必須なことが示されているが、再生組織ではどのリガンドがどの細胞へ作用することが再生に必須なのか明らかになっていない。そこで、網羅的な発現解析を行い、再生過程に発現する Fgf リガンドとそれらの発現細胞を明らかにする。

Fgf シグナル阻害による標的プロセス解析

本研究では、熱ショックプロモーター誘導 dnFgfr1 発現ゼブラフィッシュ系統と、我々の持つプローブやトランスジェニックを用いて解析を行い、Fgf シグナルを阻害した際の細胞レベルの影響について解析し、再生における標的プロセスを解明する。

強制発現による Fgf 機能の解明

再生で発現するそれぞれの Fgf の役割を強制発現実験によって解析する。

(2) 再生細胞の増殖と生存メカニズムの解析

Cloche 作用の自律性に関する解析

これまでに、細胞周期制御のエラーによって再生細胞の細胞死が起こることを我々は示唆している。Cloche がどの細胞で作用するかについて、変異体と野生型胚の間の細胞移植、さらに遺伝学的解析から、細胞自律性の解析を行う。

再生細胞の生存メカニズムの解析

変異体における再生細胞の生存には、ミエロイド細胞の存在が必須であることが、上の

解析から示唆された。そこで、ミエロイドと再生細胞がどのようなメカニズムで相互作用するか解析を行う。特に、何らかの細胞外分子、拡散性因子が介在しているかどうかをフォーカスし、外植体アッセイで解析する。

4. 研究成果

(1) 再生過程における Fgf シグナルの作用メカニズム

再生過程に必須の Fgf リガンド

再生組織ではどの Fgf リガンドが再生に必須なのか解明するため、網羅的な発現解析を行った。RT-PCR により、再生初期から fgf20a が上皮で、さらに再生芽形成後からは、fFgf3、fgf10a が再生芽に発現することがわかった。

これらの発現細胞をさらに詳しく調べるため、fgf20a エンハンサートラップシステムを用い、fgf20a は再生 12 時間の初期から、上皮、特に基底層細胞に発現することが示された。さらに、fgf3、fgf10a については、in situ 発現解析により、先端再生芽に発現することがわかった。

Fgf シグナル阻害による標的プロセス解析

本研究では、再生芽移植により、ショックプロモーター誘導 dnFgf1 発現細胞をモザイクに持つ鱗を作り、これらの細胞で Fgf シグナルを阻害するモザイクノックダウンという新たな手法を開発した。この手法を用いて、Fgf シグナルを再生芽形成前または後で阻害した際の影響について解析した。これによって、早期の Fgf シグナルは間充織細胞をリクルートして再生芽を形成させるのに必須であること、一方、後期のシグナルは再生芽の増殖に必須であることが示された。

強制発現による Fgf 機能の解明

Fgf20a と Fgf3 の機能を直接に調べるために、それぞれを熱誘導で強制発現するトランスジェニックを作製し解析を行った。

Fgf20a 発現は、再生芽マーカーの発現を誘導することが示された。また、培養再生芽を使った細胞増殖アッセイの結果、Fgf3 発現は細胞増殖を促進することがわかった。Fgf3 は、Fgf20a と異なり、再生芽マーカーの発現を誘導することはなく、これらは別個の機能を果たすことがわかった。

(2) 再生細胞の増殖と生存メカニズムの解析

Cloche 作用の自律性に関する解析

再生細胞の生存に関わる Cloche がどの細

胞で作用するかについて、変異体と野生型胚の間の細胞移植を行った結果、再生細胞死に対し、Cloche は細胞非自律的に作用することが示唆された。さらに、他の血球分化欠損変異対体や血球分化のノックダウンでも細胞死は起こり、ミエロイド細胞の存在が再生細胞の生存に必須であること、すなわち Cloche 自身は間接的に再生細胞の生存に作用することがわかった。

再生細胞の生存メカニズムの解析

再生細胞の生存にはミエロイド細胞の存在が必須であるとして、ミエロイドと再生細胞がどのようなメカニズムで相互作用するかについて、幼生尾部のホールマウント外植体によって解析を行った。

変異体の外植体でも細胞死は起こったが、ここに野生型幼生の抽出液を培養に加えると細胞死はレスキューされた。一方で、変異体の抽出液ではレスキューは起こらなかった。従って、再生細胞はミエロイド細胞からの何らかの細胞外分子、拡散性因子によって、生存をサポートされていることが示唆された。

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3件)

Hasegawa, T., Nakajima, T., Ishida, T., Kudo, A. and Kawakami, A. (2015) A diffusible signal derived from hematopoietic cells supports the survival and proliferation of regenerative cells during zebrafish fin fold regeneration. *Developmental Biology* 399, 80–90. *Corresponding (査読あり)

Yoshinari, N., Ando, K., Kudo, A., Kinoshita, M. and *Kawakami, A. (2012) Colored medaka and zebrafish: Transgenics with ubiquitous and strong transgene expression driven by the medaka b-actin promoter. *Development Growth & Differentiation* 54, 818–828. *Corresponding (査読あり)

Fujita, M., Mitsuhashi, H., Isogai, S., Nakata, T., Kawakami, A., Nonaka, I., Noguchi, S., Hayashi, Y. K., Nishino, I. and Kudo, A. (2012) Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles,

revealed by the medaka mutant *zacro*.
Developmental Biology 361, 79-89.
(査読あり)

[学会発表](計 17 件)

2015

ゼブラフィッシュひれ再生における傷上
皮細胞の細胞系譜解析
柴田恵里、工藤明、川上厚志
日本動物学会第 86 回新潟大会 (新潟)
2015 年 09 月 17 日

Cell fates of wound epidermis during
zebrafish fin regeneration
Eri Shibata, Akira Kudo, Atsushi Kawakami
9th European Zebrafish Meeting (Oslo,
Norway)
2015 年 6 月 30 日

Chronic inflammation induces the
blastema apoptosis during zebrafish fin
fold regeneration
ゼブラフィッシュの膜ヒレ再生において、過
剰な炎症反応が再生芽のアポトーシスを誘
導する
Tomoya Hasegawa, Akira Kudo, and Atsushi
Kawakami
第 48 回日本発生生物学会大会 (筑波、国際
会議場)
2015 年 6 月 4 日

ゼブラフィッシュの石灰化組織の成長、維
持および再生における骨幹細胞の役割
Role of bone stem cells in growth,
maintenance and regeneration of calcified
tissues in zebrafish
Kazunori Ando, Genbu Abe, Koichi Kawakami,
Akira Kudo, and Atsushi Kawakami
第 48 回日本発生生物学会大会 (筑波)
2015 年 6 月 4 日

2014:

A trophic factor derived from the
myeloid cells supports the survival and
proliferation of blastema during tissue
regeneration in zebrafish
ミエロイド系細胞由来の栄養因子が、ゼブラ
フィッシュの再生芽の生存と増殖に必要であ
る
Tomoya Hasegawa, Teruhiro Nakajima,
Takashi Ishida, Akira Kudo, Atsushi
Kawakami

第 47 回日本発生生物学会大会 (名古屋)
2014 年 5 月 27 日

Transgenic imaging and tracing of the
wound epidermis during zebrafish fin
regeneration
再生傷上皮のトランスジェニックイメー
ジングと細胞系譜解析
Eri Shibata, Kazunori Ando, Natsumi Horita,
Gembu Abe, Koichi Kawakami, Akira Kudo,
Atsushi Kawakami
第 47 回日本発生生物学会大会 (名古屋)
2014 年 5 月 27 日、28 日、29 日

Distal blastema is a signaling center
that directs cell proliferation during
zebrafish fin regeneration ”
Yuki Yokota, Natsumi Horita, Gembu Abe,
Koichi Kawakami, Akira Kudo, and Atsushi
Kawakami
第 47 回日本発生生物学会大会 (名古屋)
2014 年 5 月 27 日

Wound epidermal signal as a director of
zebrafish fin regeneration
Eri Shibata, Yuki Yokota, Natsumi Horita,
Gembu Abe, Koichi Kawakami, Akira Kudo and
Atsushi Kawakami
第 37 回日本分子生物学会大会 (横浜)
2014 年 11 月 25 日

Distal blastema mediates cell
proliferation in the proximal blastema
via Fgf signals during zebrafish fin
regeneration
Yuki Yokota, Natsumi Horita, Gembu Abe,
Koichi Kawakami, Akira Kudo, and Atsushi
Kawakami
第 37 回日本分子生物学会大会 (横浜)
2014 年 11 月 26 日

2013:

Imaging and characterization of
mmp9-expressing cells during zebrafish fin
regeneration using the Tol2 BAC transgenic
Kazunori Ando, Akira Kudo, Atsushi
Kawakami
第 46 回日本発生生物学会大会 (松江)
2013 年 5 月 28 日

Critical role of *fibronectin 1b* during
zebrafish fin regeneration ”
Eri Shibata, Emiko Murase, Akira Kudo and

Atushi Kawakami

第 46 回日本発生生物学会大会 (松江)
2013 年 5 月 29 日

Analysis of the source of ‘blastema survival factor’ and its downstream signaling during the zebrafish fin fold regeneration”

Tomoya Hasegawa, Teruhiro Nakajima, Takashi Ishida, Akira Kudo, Atsushi Kawakami

第 46 回日本発生生物学会大会 (松江)
2013 年 5 月 29 日

Tomoya Hasegawa, Teruhiro Nakajima, Takashi Ishida, Akira Kudo, Atsushi Kawakami

Blastema survival and proliferation are supported by a factor derived from hematopoietic/endothelial tissues during zebrafish fin fold regeneration”

8th European Zebrafish Meeting (Barcelona, Spain)
2013 年 7 月 11 日

An intercalation model in the zebrafish fin regeneration”

Yuki Yokota, Akira Kudo, and Atsushi Kawakami

第 19 回 小型魚類研究会 (仙台)
2013 年 9 月 20 日

Identification of bone stem cells during growth and regeneration of endo- and exo-skeletons in zebrafish”

⁰Kazunori Ando, Genbu Abe, Akira Kudo, Koichi Kawakami, and Atsushi Kawakami

第 19 回 小型魚類研究会 (仙台)
2013 年 9 月 21 日

Differential actions of Fgf signaling controls blastema formation and regeneration in zebrafish”

Natsumi Horita, Genbu Abe, Koichi Kawakami, Akira Kudo, and Atsushi Kawakami

第 19 回 小型魚類研究会 (仙台)
2013 年 9 月 21 日

2012:

Blastema survival depends on a diffusible factor that acts from a distance during fin fold regeneration

Tomoya Hasegawa, Teruhiro Nakajima,

Takashi Ishida, Atsushi Kawakami

第 45 回日本発生生物学会大会 (神戸):
2012 年 5 月 29 日

[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) 研究代表者

川上 厚志 (KAWAKAMI ATSUSHI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授

研究者番号 : 00221896

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし