

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18799

研究課題名(和文) 追いつき成長における神経堤細胞のインスリン様活性の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Roles of insulin-like activity and neural crest cells in catch-up growth

研究代表者

亀井 宏泰 (KAMEI, HIROYASU)

金沢大学・自然システム学系・助教

研究者番号：00610362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、個体発生を支える神経堤細胞(NCCs)が個体成長を促進するインスリン・インスリン様シグナリング(IIS)の働きをどのように利用し胚の成長遅滞や追いつき成長がおこるのかゼブラフィッシュを用いた実験系により調べた。その結果NCCsでは低酸素状態でもIISの活性が最低限維持されており、このことがNCCsの生存及び追いつき成長の達成に必要なことが分かった。また、次世代シーケンサーを用いた解析から、胚の成長遅滞と追いつき成長で発現が変動する新しい成長関連遺伝子を見出した。これらの成果は、胎生期の成長阻害に端を発する様々な生理的変化を理解することの一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Most animals retard growth in response to adverse conditions; however, upon the removal of unfavorable factors, they often show quick growth restoration, which is known as “catch-up” growth. In this study, by using zebrafish embryo model of hypoxia/reoxygenation-induced catch-up growth, I aimed to know how the neural crest cells (NCCs) and insulin/insulin-like growth factor signaling (IIS) play roles in this phenomenon. I found that the viability of NCCs was maintained under hypoxia with the activation of IIS at certain level, and it was seemingly crucial for the survival of these cells during the stunting period. In addition, by next generation sequencing analysis, previously unreported “catch-up growth”-related genes were discovered in this study. These results could be an aid for decoding the mechanism underlying various physiological changes including adult onset disease induced by growth arrest and by subsequent growth restoration at the early stages of animal growth.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 低酸素 成長遅滞 追いつき成長 インスリン・インスリン様成長因子シグナル
神経堤細胞

1. 研究開始当初の背景

動物の発生・成長はしばしば後天的要因の悪化により遅滞するが、多くの場合、遅滞要因が除かれると短期間のうちに正常な発育度へ復帰する。この現象は『追いつき成長』として幅広く動物界全般で見られている。畜産動物では、胎生期あるいは胚・仔魚期に成長が遅滞し追いつき成長が見られない場合には、その後の生残率の低下や出生後の歩留まりを生じやすく生産効率が低下する。また、ヒトでは成長遅滞や追いつき成長を経験した個体には、遅滞履歴のない個体と比べて外見の成長度からでは判別できない生理機能の差異が頻繁に生じることも指摘されていた。しかし、個体発生の初期におこる追いつき成長の分子機構や、これに伴い生理機能に差異が生じる仕組みについては、胎生期の実験が容易ではないことや、追いつき成長の簡便な実験系が確立されていない理由から分子・細胞レベルでの解析は大きく立ち後れていた。

2. 研究の目的

このような中、申請者はゼブラフィッシュ胚と低酸素ストレスを組み合わせた独自の実験系を用いて『神経堤細胞(NCCs)』及び『インスリン・インスリン様成長因子シグナル(IIS)』がそれぞれ個体成長の初期における追いつき成長に必要な不可欠であることを見出した。本研究課題では個体発生を支えるNCCsが発生・成長を制御するIISの働きをどのように利用し追いつき成長を可能にするか、ゼブラフィッシュ胚をモデルにその仕組みの一端を分子から個体レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

神経堤細胞がオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質で標識されるトランスジェニックゼブラフィッシュ(*Tg(-4725sox10:EGFP)*)の作出を行った。次に、これらのゼブラフィッシュ胚の成長を低酸素条件で遅滞させ、その後、常酸素条件に移行することで追いつき成長が誘導される実験モデルを確立した。この実験系を用いて、追いつき成長時のNCCsにおいてIISの感受性やIISの活性化がどのように変化するかを*in situ* hybridization法や免疫染色法により調べた。そして、NCCsにおける細胞生存活性や細胞死、また全身の成長度の変化や主要な組織の分化状態を発生生物学的手法により評価した。さらに、次世代シーケンス解析やセルソーターを用いた解析を行い、成長遅滞や追いつき成長の過程における細胞や分子レベルの変化を調べた。これらの解析により、NCCとIISがどのように胚の追いつき成長に関与しているのかを検討した。

4. 研究成果

(1) *Tg(-4725sox10:EGFP)*の作出

まず、本研究で着目したNCCsが緑色蛍光タ

ンパク質(以下GFPと省略)で標識された遺伝子組み換えゼブラフィッシュの作出を試みた。NCCsで特徴的に活性化する*sox10*遺伝子の4,725bps上流のプロモーターDNAをクローニングし、これの下流にGFPをコードするDNAを連結させた遺伝子発現ベクターを構築した。すでに確立されているトランスポゾンシステムを用いて、構築した遺伝子発現ベクターを野生型ゼブラフィッシュのゲノムDNA中に組み込んだ。NCCsにおけるGFPの発現を指標に選別・交配を繰り返し、安定的にNCCsがGFPで標識される第五世代のトランスジェニックゼブラフィッシュを得た(図1)。さらに、これらの個体で確かにNCCsがラベルされていることを調べる目的で、NCCs前駆細胞の増殖を阻害する薬剤(レフルノミド)でトランスジェニック個体を処理したところ、明らかにGFP蛍光を示す細胞の数が減少していた。以上の結果から、NCCsがGFPでラベルされたゼブラフィッシュの作出に成功したと判断した。

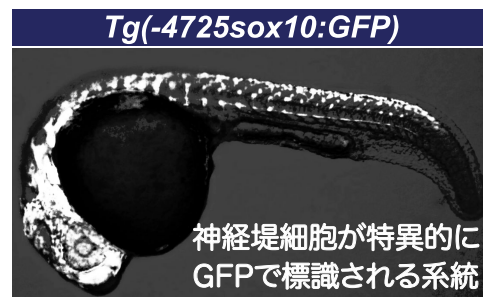


図1. 本研究で樹立した神経堤細胞特異的にGFPが発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ

(2) NCCsの単離と遺伝子発現の解析

次にこの実験動物を用いて、NCCsの効率的な分離を試みた。低酸素で成長を遅滞させた胚、低酸素後の酸素の再供給により追いつき成長を誘導した胚、ならびにそれぞれの胚と成長度が等しい常時常酸素環境下で成長させた胚(対照群の胚)に物理的及び生化学的(酵素的)処理を施し、試料を1細胞単位にまで分解した。これらをセルソーターに供しGFP蛍光を有するNCCsのみを単離・分取した。分取したNCCsから総RNAを抽出し、細胞あたりの総RNA量を調べたところ、対照群の個体と比較して成長遅滞や追いつき成長を示す個体ではその量が顕著に変化していたが、そのような変化は胚全体としては観察されなかった。このことから、成長遅滞や追いつき成長の過程ではNCCs特異的にRNA代謝に関する変化が生じていることが推察された。

(3) 成長遅滞と追いつき成長時に特異的に発現変化を示す遺伝子の同定

次世代シーケンス解析を行い、種々の実験条件で発現量が変化する遺伝子群を多数同定することに成功した。その中でも、個体成長を担う IIS の細胞内シグナル伝達の主要な仲介分子であるインスリン受容体基質 (*irs/IRS*) やヒトの身長決定遺伝子としても知られている低身長ホメオボックス遺伝子等の個体成長に関連が深い遺伝子の発現が低酸素条件下や再酸素処理において顕著に変化していることが確認された。また、追いつき成長時に顕著な発現変化を示すものの中に、これまで成長関連因子として知られていない複数の遺伝子を見出しており、追いつき成長現象を解明するための新たな着眼点を得ることができた。

(4) IIS 関連遺伝子の追いつき成長における役割の解析

脊椎動物の *irs/IRS* の中でも、特にマウスでは *IRS1* は個体成長に必要であることが示されている。ゼブラフィッシュ *irs1* の発現量が低酸素状態で上昇していたことを受けて、この遺伝子が追いつき成長に果たす役割を調べた。その為に *irs1* の翻訳を特異的に阻害するアンチセンスモルフォリノ核酸を用いて、*irs1* の発現を人為的に減少させる実験を行なった。その結果、追いつき成長は通常の成長以上に阻害された。*In situ* hybridization の結果、*irs1* の発現は NCCs を含む広範な組織で確認された。さらに NCCs のマーカー分子、IIS の主要なシグナル伝達分子 (Akt や Erk1/2) のリン酸化状態そして細胞死を調べる免疫染色及びイムノプロット解析の結果から、低酸素環境に置かれた場合、*irs1* の発現阻害胚では対照群の個体と比較して NCCs における IIS の活性化が明らかに低下し細胞死が引き起こされることが明らかとなった。また、*irs2* についても低酸素環境下で顕著な発現上昇を示したため同様の解析を行なった。その結果、*irs2* の発現阻害により追いつき成長は顕著に阻害されることがわかった。一方で、*irs1* の発現阻害では、追いつき成長時の IIS に大きな変化が見られなかったのに対し、これまでの *irs2* の発現阻害の解析からは、*irs2* の発現の低下は追いつき成長時の IIS を一定程度阻害する傾向が見られている。これらのことから、*irs2* は追いつき成長に必要なだが、その仕組みの少なくとも一部は *irs1* と独立していることが示唆された。これらのことと他の結果を併せ「成長中の胚が低酸素等の遅滞要因に晒された場合、直接的または間接的に *irs1/2* が働き、NCCs の IIS 活性が担保されることで NCCs の生存が保証される。そして遅滞要因が除去され、成長が再開する時点で IIS に対する高い感受性と十分な生存活性を保持した NCCs を保っていることが、追いつき成長の達成に必須である。」という作業仮説が考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計2件)

1) Takagi H., Nishibori Y., Katayama K., Katada T., Takahashi S., Kiuchi Z., Takahashi S.I., **Kamei H.**, Kawakami H., Akimoto Y., Kudo A., Asanuma K., Takematsu H., Yan K. USP40 gene knockdown disrupts glomerular permeability in zebrafish. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* doi: 10.1152/ajprenal.00197.2016., 2017

2) Hakuno, F., Fukushima T., Yoneyama Y., **Kamei H.**, Ozoe A., Yoshihara H., Yamanaka D., Shibano T., Sone-Yonezawa M., Yu B.C., Chida K., Takahashi S. § The novel functions of high-molecular-mass complexes containing insulin receptor substrates in mediation and modulation of insulin-like activities: Emerging concept of diverse function by IRS-associated proteins. *Front. Endocrinol.* doi: 10.3389/fendo.2015.00073, 2015.

(学会発表)(計8件)

1) **Kamei H.**, Yoneyama Y., Sawada R., Duan C., Hakuno F., Shimizu T., Takahashi S. Early embryonic insulin receptor substrate-1 signaling underpins neural crest cell survival contributing to *catch-up growth* induced by changing environmental oxygen tension in developing zebrafish. Gordon Research Conference "Insulin-Like Growth Factors In Physiology & Disease" in Ventura, USA. 2017, March 12-17

2) Usui A., Hakuno F., Yoneyama Y., **Kamei H.**, Chida K., Takahashi S. Roles of IRS-1-induced cell competition in myogenic differentiation. Gordon Research Conference "Insulin-Like Growth Factors In Physiology & Disease" in Ventura, USA. 2017, March 12-17

3) Goda Y., Nishi H., Kumano M., Yamanaka D., **Kamei H.**, Yamanouchi K., Katsumata M., Kato H., Chida K., Nishihara M., Hakuno F., Takahashi S. Lysine deficiency signal selectively induces lipid accumulation in muscle and adipose tissues of rats. Gordon Research Conference "Insulin-Like Growth Factors In Physiology & Disease" in Ventura, USA. 2017, March 12-17

4) Kumano M., Nishi H., Yamanaka D., **Kamei H.**, Goda Y., Toyoshima Y., Takenaka A., Chida K., Hakuno F., Takahashi S. Amino acid-deficiency signal induces insulin-like effects on gluconeogenic gene regulation independently of insulin signaling in

hepatocytes. Gordon Research Conference "Insulin-Like Growth Factors In Physiology & Disease" in Ventura, USA. 2017, March 12-17

5). Nishi H., Yamanaka D., **Kamei H.**, Goda Y., Kumano M., Toyoshima Y., Takenaka A., Masuda M., Shioya R., Chida K., Hakuno F., Takahashi S. Hepatic steatosis induced by amino acid deficiency or by manipulation of the dietary amino acid composition. Gordon Research Conference "Insulin-Like Growth Factors In Physiology & Disease" in Ventura, USA. 2017, March 12-17

6). **Kamei H.** Roles of Insulin/Insulin-like growth factor signaling in hypoxia/reoxygenation induced catch-up growth in zebrafish embryo. INTERNATIONAL SEMINAR "Insulin-like Signaling and Nutrient Signaling: universal signaling for extension of healthy lifespan and improvement of quality for humans and animals" in The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 2017, Jan. 24-26

7). **亀井宏泰**, ゼブラフィッシュ胚における神経堤細胞を介した追いつき成長, 2016(平成28年)年度 日本比較内分泌学会大会・シンポジウム, 北里大学(相模原), 2016年12月9-11

8). **Kamei H.** Catch-up growth in tiny fish embryos: Roles of IIS in accelerated growth induced by changing environmental oxygen availability. "The Model Organism Conference at Kanazawa" in Juzen Studio, Kanazawa University, Kanazawa, Japan, 2016, Oct. 7th

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail_en.php?id=4489

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 宏泰 (KAMEI HIROYASU)

金沢大学・理工研究域・自然システム学系・助教

研究者番号：610362

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者 無し