

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2022

課題番号：16KT0176

研究課題名(和文) 器官サイズの再生現象における痛みシステムバランスの理解

研究課題名(英文) Systematical analyses of the organ reconstruction in zebrafish

研究代表者

矢野 十織 (Yano, Tohru)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10648091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュの鰭(ヒレ)を対象として、器官サイズを体長に対して適切な大きさに調節する分子メカニズムの理解を目指した。器官サイズを変化させる要因の1つとして、器官再生や侵害受容など広範な生命現象に関わる「カルシウムイオン」に着目し、器官損傷の初期応答から器官形成完了期までに関与する因子群を解析した。本研究ではカルシウムチャネル変異体を作成し、カルシウムチャネルの細胞膜電位を記録する実験系を構築した。また鰭(器官)サイズを示す解剖学的指標として骨連結部と骨全長の構造・形態形成を定義し、*evx1*遺伝子に着目することでカルシウムイオンとの関連性を見いだすことを可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

解剖学や発生学を専門とする研究代表者が、本研究をきっかけに電気生理学・薬理学研究者と分野横断的な挑戦的研究を行えた点について、特設分野として採択された本研究の今後さらなる発展を期待している。そのうえで、本研究で得られた鰭(ヒレ)の関節の構造情報と形態形成機構の一端は、「魚のヒレの関節はヒトの指の関節に似ている」と言及するために必要なはじめての論拠であり、日本から世界へ発信される基盤的情報としてインパクトのある成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated systemic regulation of the organ size in zebrafish fin development and regeneration. We generated mutant zebrafish of calcium channels and constructed in vivo patch-clamp electrophysiology tools in collaboration with another department in our institution. Furthermore, we used a transgenic line with GFP-labelled joint cells and defined the fin-ray joint (lepidotrichial joint) and measured the ray bone length to describe anatomical structures in organ morphogenesis. We found that the joint was filled with collagen fibers (ligament) and covered on both sides by *evx1*/gfp-expressing joint cells. In the *evx1* deficient condition, a calcium-related gene was downregulated.

研究分野：形態学

キーワード：ゼブラフィッシュ 形態 骨 器官形成 器官再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物において、損傷後の器官・臓器を元通りに再形成(再生)させるための分子メカニズムを探索する研究は古くから動物学分野でなされており(Tamura et al, *Dev Growth Differ* 2010)。近年ではヒト幹細胞を用いた基礎医学系分野でも盛んに行われ、器官・臓器を機能面から再構成することは目ざましい研究進捗がみられる。一方で本研究課題が目指す形態面、すなわち「元通りのかたち(見た目)に戻す」ためには、受精卵からどのように器官がつくられたかといった発生生物学的視点や、魚類・両生類にみられる高い器官再生能力から学ぶとった再生生物学的視点が必要となり、遺伝子・分子といったミクロな側面から肉眼解剖学的なマクロな側面までを含んだ統合分野となる。本研究で扱うモデル動物・ゼブラフィッシュの鰭(ヒレ)は、ヒトの四肢に相当する運動器官であるが(Yano and Tamura *J Anat* 2013)、損傷後約2週間で元の形態まで再生することが知られている。さらには損傷の程度に応じて修復サイズを分子レベルで調整しており、損傷が大きい場合と比較して、損傷が小さい場合は細胞増殖にブレーキがかかるシステムを自然に有している(Lee et al, *Development* 2005)。器官の修復サイズを適切に調節する分子メカニズムの理解は、再生医学のみならず個体成長に関する基礎医学研究分野への貢献が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュの鰭を対象として、器官サイズを適切に調節する分子メカニズムを理解するためには、器官の損傷から修復完了までの2週間の期間において、「いつ」「どこで」「どんな細胞が」「どんな分子メカニズムで」器官が修復されていくかを複合的に知る研究が必要であったが、既存の研究分野で既に進行中あるいは進行が予想されるため新規性に乏しかった。研究代表者・矢野は、基礎生物学・動物学分野における「器官再生現象」に登場する因子群・メカニズムのほとんどが、医学・神経科学分野における「痛みの侵害受容と鎮痛」に登場する因子群・メカニズムと同一であることに着目した。したがって本研究では特に、「切断後0秒からおこる器官修復メカニズムの解明」を研究申請段階から標榜し、神経科学・電気生理学的アプローチを取り入れることで、これまでに報告の無い最初期メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらには、最初期から最終的な器官サイズの決定までを定量化するための指標について、研究実施期間中に探索する必要性があったことから、器官サイズを肉眼的に観察・評価するための解剖学的構造の抽出と、その構造の形態形成メカニズムを解析することを目的とし、研究計画を立案した。

3. 研究の方法

本研究課題の着想は、研究代表者・矢野が研究申請段階で得ていたデータと、Kujawski らによる報告(Kujawski et al, *Dev Cell* 2014)とが一致したことに端を発する。Kujawski らは器官サイズの決定にFKBP (FK506-binding proteins) や Calcineurin が関与することを示したが、これに加えて我々はカルシウムチャネルの阻害が器官修復サイズに影響を与えることを見いだしていた(Yano et al, 第20回小型魚類研究会2013)。そこで(1)パッチクランプ法を用いたカルシウムチャネル記録(Kawamura et al, *J Neurosci* 2010)を計画した。また我々が行った Calcineurin 阻害実験(FK506 添加実験)では、鰭の骨連結部(関節、Joint)が無形成となる表現型を得ており、これが *evx1* (*even-skipped homeobox 1*) 遺伝子欠損時の表現型と一致することを見いだしていた(Yano et al, 第20回小型魚類研究会2013)。そこで(2) *evx1* 遺伝子発現細胞を GFP 蛍光可視化した遺伝子組換え系統を川上浩一博士(国立遺伝学研究所)との共同研究で利用し、骨連結部を鰭形態や修復サイズの指標として研究展開することとした。

4. 研究成果

(1)カルシウムチャネル構成遺伝子のノックアウト解析

ゼブラフィッシュにおいてカルシウムチャネルを構成する遺伝子のうち、本研究課題では *cacna1h* (*calcium voltage-gated channel subunit alpha1 h*) 遺伝子に着目し、*cacna1ha*, *cacna1hb* の2遺伝子を CRISPR/Cas9 法にてノックアウトした胚を作製することに成功した。さらに研究申請時は成魚での形態解析を予定していたが、胚時期までしか成長しなかったことから、成魚の鰭形態を計測するまでに至らなかった。現時点では、本法で得られる変異体は胚発生期におけるカルシウムチャネル解析に今後応用可能と考えられる。また研究実施期間前半ではゲノム編集に用いる不安定な RNA 試薬を自作していたが、近年では外注にて安価かつ安定した状態で購入することができるため、今後の発展的研究はより展開しやすいと予想される。鰭形態計測解析のための代替法として研究申請時から計画していたものの1つに、塩化ニッケル添

加によるイオンチャネル阻害実験系があったためこれを構築し、胚ならびに成魚を用いた(2)の研究を行うこととした。

(2)パッチクランプ法による電気生理学的解析手法の構築

研究分担者・川村将仁(東京慈恵会医科大学)はこれまでにラット海馬を用いたイオンチャネル記録を行っており、本研究実施期間の初年度から最終年度までの長期にかけて、ゼブラフィッシュ胚を用いた電気生理学的解析方法の構築を研究代表者・矢野とともにいった。同一研究機関内でゼブラフィッシュの飼養ならびに電位記録解析ができる環境は、2週間の期間修復期間を追ううえで大きなアドバンテージであると考えられた。具体的には、鰭の損傷部位付近の細胞膜電位を測定する挑戦的な計画として申請を行っていたが、成魚ならびに胚において薄膜状の鰭を麻醉下で生体解析することは想定通りの困難が生じ、不動化することができない胚ならびに成魚を用いた研究デザインについて、研究者間で長期間にわたる試行錯誤が必要となった。最終的には胚の鰭のみならず、巨大な神経細胞(Rohon-Beard細胞)を用いて電位記録を試みたものの(Ribera and Nusslein-Volhard, *J Neurosci* 1998)有用なデータを得ることができなかった。研究実施期間を延長申請し、解析にかかる設備ならびに消耗品等の研究環境を構築するまでに達したため、期間終了後も引き続きデータ取得を行い、野生型ならびに塩化ニッケル処理個体間での電位変化を計測する予定である。

(3) *evx1* 遺伝子発現細胞の可視化による骨連結部の構造と形態形成解析

共同研究者・川上浩一博士(国立遺伝学研究所)に供与いただいた遺伝子組換え系統は、*evx1* 遺伝子配列近傍に *gal4* 配列が挿入された UAS/EGFP 系統であるため、*evx1* 遺伝子が発現する細胞集団において GFP 蛍光が観察される。共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元再構築解析から、骨連結部を形成する細胞は連結部の靭帯(コラーゲン線維)に細胞膜・細胞質成分を挟み込みながら、骨連結部外周を被包する特殊な細胞形態をとることが明らかとなった。これは透過型電子顕微鏡解析、ならびに SBF-SEM (Serial block-face scanning electron microscopy) を用いた高解像度の三次元再構築解析からも明らかとなり、「魚のヒレの骨同士は靭帯でのみ連結される」と先行研究で称されるものとは異なり (Zylberberg et al, *Bone* vol. 4 1991) むしろ「ヒトの指の関節同様に包状に包まれた、可動性のある構造」として本邦からはじめて発信される基盤的成果を得るまでに至った。SBF-SEM 解析は大野伸彦博士(自治医科大学・生理学研究所)・齊藤成博士(藤田医科大学)との共同研究 (ABiS 先端バイオイメージング支援プラットフォームから支援)にて行われ、これら成果の派生的研究として次の基盤研究課題が現在順調に遂行中である。これら成果の速やかな論文公表が研究実施期間中に果たせなかったが、喫緊の業務として位置付けて現在研究を行っている。また、鰭の骨連結部のみならず、頭蓋縫合ならびに骨折修復部位でも GFP 陽性細胞すなわち *evx1* 遺伝子の転写活性化がおこっていることを見だし、運動器関節・縫合・骨修復といった骨の連結部位に共通な分子メカニズムが *Evx1* を介しておこっていることが示唆された。これら 3 か所の骨連結部位を比較検討する実験系を立ち上げ、*evx1* 遺伝子発現に相関して変動する遺伝子群を探索したところ、カルシウムチャネル関連因子を 1 つ同定することができた。当該因子のモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色を試みたが、ゼブラフィッシュでは当該因子の組織内局在を研究実施期間中に確認するに至らなかったため、期間終了後も引き続き染色実験を行う予定である。本研究課題はカルシウムイオンという、生命現象にありふれた因子をキーワードに展開されているが、カルシウムチャネルに起因する器官損傷シグナルと、カルシウムイオンに起因して形成される解剖学的指標(骨連結部)との関連性を説明づける重要な知見が本研究課題遂行によって得られたと考えている。

(4) 骨連結部以外の解剖学的指標の探索

鰭の骨連結部は 1 つではなく、鰭の近位から遠位方向に向かって直列に多数存在する。したがって鰭はしなやかに運動・遊泳可能な器官となっている。骨連結部の数や骨連結部間の距離(骨片の長さ)といったパラメータは、鰭全体の形態や成長過程を記載するうえでこれまでに多くの研究で測定されているが (Iovine and Johnson, *Genetics* 2000; Goldsmith et al, *Dev Biol* 2006) *evx1* 遺伝子変異によって鰭の骨連結部が無形成となった場合に鰭形態や鰭の長さは変化しない (Schulte et al, *Dev Dyn* 2011) 。したがって、鰭における骨連結部が解剖学的指標となるのは 1 個体内での解析時に限られ、個体間・系統間での比較には注意を要する。本研究課題では鰭の骨全長を解剖学的指標とする新しい測定法・解析法を取り入れ、幼魚から成魚期にかけての器官成長を数式・モデル化した。その結果、ゼブラフィッシュ野生型個体の標準体長が 7 から 8.3 mm までの時期を境にして、器官サイズ成長のシステムが変わることを見いだした。したがって(3)における骨連結部データ、ならびに(4)における骨全長データの両者を計測していくことによって、器官サイズの記載がはじめて可能となると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 矢野十織
2. 発表標題 骨同士をつなぐ線維性連結と可動性
3. 学会等名 日本解剖学会・若手研究者の会 2022年度春の学校
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshimi Fujita, Tohru Yano, Koichi Kawakami, Masataka Okabe
2. 発表標題 Formation of cranial sutures in zebrafish
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (MBSJ 2020 Online)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野瞳, 矢野十織, 川上浩一, 岡部正隆.
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの鰭の骨折修復過程におけるeven-skipped homeobox 1遺伝子の発現とその役割.
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野十織, 岡部正隆.
2. 発表標題 条鰭類における鰭節間関節の構造と機能.
3. 学会等名 2020年度日本魚類学会年会(ウェブ大会).
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀夢乃, 矢野十織, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ尾鰭の形態プロポーション成長の調節機構
3. 学会等名 第9回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野十織, 李鹿路, 齊藤成, 川上浩一, 佐野瞳, 田村宏治, 大野伸彦, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの鰭の鰭節間関節の組織構造と形態形成
3. 学会等名 第9回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀夢乃, 矢野十織, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの形態形成において尾鰭のプロポーションを規定する因子の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野瞳, 矢野十織, 川上浩一, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ膜内化骨におけるeven-skipped homeobox 1遺伝子発現の骨折応答性惹起
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会(コロナウイルスの影響による紙上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tohru Yano, Lulu Li, Sei Saitoh, Koichi Kawakami, Hitomi Sano, Koji Tamura, Nobuhiko Ohno, Masataka Okabe
2. 発表標題 Morphological and functional joint formation in zebrafish fins
3. 学会等名 The fifth conference “ Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology ” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tohru Yano, Lulu Li, Sei Saitoh, Koichi Kawakami, Hitomi Sano, Koji Tamura, Nobuhiko Ohno, Masataka Okabe
2. 発表標題 Histological and molecular analyses of the joint architecture in zebrafish fins
3. 学会等名 The 24th Japanese medaka and zebrafish meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李鹿路, 藤田由見, 矢野十織, 川上浩一, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの骨連結部 (joint) に局在するeven-skipped homeobox 1遺伝子発現細胞の挙動解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古賀夢乃, 矢野十織, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ尾鰭の骨長計測による成長変化の評価
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野十織, 岡部正隆
2. 発表標題 糸鰭類の鰭条骨関節の組織学的形態と分子特性
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀夢乃, 矢野十織, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ尾鰭をモデルとした形態成長におけるプロポーション制御機構の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野十織, 李鹿路, 齊藤成, 川上浩一, 佐野瞳, 田村宏治, 大野伸彦, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの鰭における骨連結部の組織学的形態と形成機構
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野十織, 藤田由見, 岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける器官再生因子の時空間変化と再生組織容量の計測
3. 学会等名 動物学会第89回札幌大会(地震による紙上開催)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Li L, Yano T, Kawakami K, Tamura K, Okabe M
2. 発表標題 Positioning of fin ray joints during fin regeneration in zebrafish
3. 学会等名 第23回 小型魚類研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yano T, Li L, Saitoh S, Kawakami K, Sano H, Tamura K, Ohno N, Okabe M
2. 発表標題 Maintenance and injury-induced regeneration of joint tissues in zebrafish fins
3. 学会等名 CDB Symposium 2018 “Dynamic Homeostasis: from Development to Aging”
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李鹿路 (路は「王へん」に「路」)、矢野十織、川上浩一、田村宏治、岡部正隆
2. 発表標題 ゼブラフィッシュのヒレにおける骨-連結部パターンの形成機構
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

個人ウェブサイト https://tohruurhot.webnode.com 大学ウェブサイト http://www.jikei.ac.jp/academic/course/02_sokaiibo.html
--

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
研究分担者	川村 将仁 (Kawamura Masahito) (10408388)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授 (32651)	パッチクランプ設備構築と解析

	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
研究協力者	川上 浩一 (Kawakami Koichi)		遺伝子組換え系統の供与、研究ディスカッションと学会発表
研究協力者	大野 伸彦 (Ohno Nobuhiko)		電子顕微鏡解析、研究ディスカッションと学会発表
研究協力者	齊藤 成 (Saitoh Sei)		電子顕微鏡解析、研究ディスカッションと学会発表
研究協力者	岡部 正隆 (Okabe Masataka)		飼養設備・研究室設備の提供、研究ディスカッションと学会発表
連携研究者	田村 宏治 (Tamura Koji) (70261550)	東北大学・生命科学研究科・教授 (11301)	遺伝子組換え系統の供与、研究ディスカッションと学会発表

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