

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16146

研究課題名(和文) 魚類の骨組織におけるパターン形成機構の解明

研究課題名(英文) Development of scales and the hyomandibular bone in zebrafish through ECM remodeling

研究代表者

岩崎 美樹 (Iwasaki, Miki)

北里大学・一般教育部・非常勤講師

研究者番号：70792563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨の形態形成制御機構を明らかにするため、ゼブラフィッシュの骨組織(鱗・舌顎骨)の形成過程を解析した。鱗と舌顎骨の細胞で細胞外基質を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ(mmp9)が発現した。鱗では溝条・隆起線を構成する細胞で発現し、細胞を除去すると、再生鱗で溝条の形成が阻害された。舌顎骨では、舌顎骨孔を通り抜ける神経軸索のシュワン細胞と孔の周囲に隣接する破骨細胞でmmp9が発現した。シュワン細胞を除去すると舌顎骨孔周囲の軟骨細胞が過剰に肥大した。破骨細胞が低形成の変異体では、骨形成に異常を示した。mmp9は、軟骨基質、骨基質の分解を促進することで舌顎骨の形態形成に必要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨の形態形成には、複数の細胞(骨芽細胞・破骨細胞・軟骨細胞)と細胞外基質が協調して働いている。これらの細胞同士がどのように相互作用しているのかよく分かっていない。この研究では、骨芽細胞や破骨細胞による骨リモデリングが骨の形態を制御するだけでなく、軟骨基質、骨基質の分解が重要な役割を担うことを示した。その制御を担う分子としてmmp9を同定した。今後、mmp9の機能解析によって、分解する基質を明らかにし、そのとき生じる周囲の細胞の動態を調べることで、これまで知られていない骨の形態形成メカニズムを解明できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Development of scales and the hyomandibular bone in zebrafish, and revealed that Matrix metalloproteinase 9(mmp9), which degrades the extracellular matrix (ECM), is expressed in groove and ridge of scales, and around the hyomandibular (Hm) foramen. We showed that ablation of mmp9-expressing cells of scales regeneration, resulted in significant reduction of groove, suggesting a role of mmp9 in scale morphogenesis.

In the hyomandibular bone, mmp9:GFP is expressed in Schwann cells myelinating the facial nerve passing thorough the Hm foramen. The genetical ablation of Schwann cells reduced size of the Hm foramen accompanied by excess hypertrophy of chondrocyte. Further, mmp9:GFP-expressing osteoclasts are required for enlargement of the Hm foramen by bone resorption. In the csfr-/- mutant fish, in which osteoclasts activities are impaired, enlargement of the Hm foramen was severely affected. These results show that mmp9 is essential for degradation of ECM during bone morphogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 骨組織 MMP ECM パターン形成

## 1. 研究開始当初の背景

生物の発生・再生過程において器官の形や大きさは正確に制御されている。骨は巨大な結合組織であるため、その形態や大きさの制御機構はよく分かっていない。ゼブラフィッシュの骨組織(鱗・舌顎骨)は透明な皮膚の下にあり、形成過程が容易に観察できる。これまで、鱗には2種類の骨芽細胞(中央細胞・辺縁細胞)が存在し、辺縁細胞は表皮からのシグナルによって分化することを示した(Iwasaki et al., 2018. Dev. Biol.)。また、鱗の骨基質の上面には多様な形態をした細胞が存在し、それらは細胞外基質(ECM)を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ9(mmp9)を発現した(Fig1-A, a.)。さらに、mmp9は、ゼブラフィッシュ幼魚の舌顎骨(Fig1-B,b)でも発現が見られたことから、mmp9は様々な骨において形態形成に働くことが考えられた。

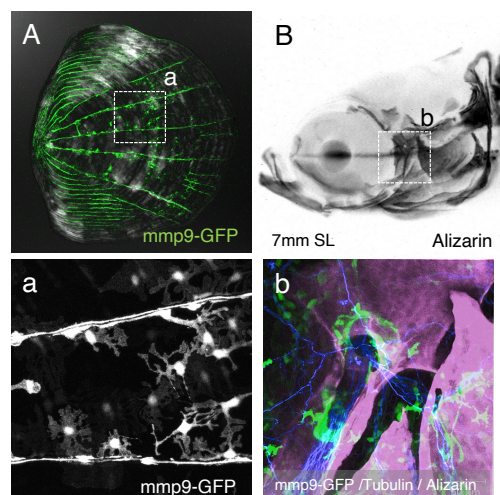


Fig.1. 鱗・舌顎骨における mmp9:GFP 陽性細胞。

mmp9:GFP は鱗の溝条および隆起線に局在する(A,a), 舌顎骨は頭蓋と顎骨を繋ぐ骨である(B)。mmp9:GFP 陽性細胞は神経軸索が通り抜ける舌顎骨孔周囲に局在 (B-b)。

## 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュ鱗および舌顎骨の形態形成過程における mmp9 発現細胞の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 【再生鱗における mmp9 発現細胞の除去実験】

まず初めに mmp9:GFP 系統を観察し、mmp9:GFP 陽性細胞が鱗の立体構造である溝条(groove)、隆起線(ridge)に沿って存在することを示した(Fig1.A,a)。次に、mmp9 突然変異体(mmp9<sup>tyt210/tyt210</sup>)の解析、および mmp9:GFP-NTR 系統をメトロニダゾール(Mtz)処理し、mmp9:GFP 陽性細胞を除去した際の再生鱗の形態を解析した。mmp9 突然変異体は鱗除去後4日で観察を行った。mmp9:GFP-NTR 系統は鱗除去24時間前に5 mM Mtz 処理し、GFPの発現が消失したことを確認した後、鱗を除去し、再生鱗を共焦点レーザー顕微鏡 LSM700(Zeiss)を用いて観察した。

### 【遺伝学的手法を用いた舌顎骨形成の解析】

舌顎骨は神経頭蓋と顎骨を繋ぐ骨で、顔面神経軸索が骨の中央にある舌顎骨孔を通り抜ける(Fig1-B,b, Fig3-B,C)。まず、舌顎骨の形成過程において各組織(軟骨細胞、神経堤細胞、神経軸索)を標識する以下の系統(col2:GFP、Sox10:RFP、Hgn39D)と mmp9:GFP 系統をそれぞれ掛け合わせ、舌顎骨における mmp9:GFP 陽性細胞の局在を調べた。次に、mmp9が発現するシュワン細胞と破骨細胞の役割を、それぞれの細胞に異常を示す突然変異体(*erbb2*<sup>-/-</sup>、*csfr*<sup>-/-</sup>)を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

##### 【鱗における mmp9:GFP 陽性細胞の働き】

溝条は鱗に放射状に存在する骨化していない溝であり、鱗の柔軟性を保つために働いていると考えられる。

mmp9(-/-)突然変異体および mmp9:GFP-NTR では、mmp9(+/-)と control(DMSO 処理)と比べ再生鱗における溝条の形成が著しく阻害された(Fig.2-C,D,E)。

骨は、骨芽細胞が分泌する細胞外基質にリン酸カルシウムが沈着し形成される。mmp9 陽性細胞は、ECM の分解を促進し、その結果、溝条におけるカルシウムの沈着を防ぎ、鱗の柔軟性を保つ働きがあると考えられた。

##### 【舌顎骨のリモデリング】

ゼブラフィッシュの舌顎骨は、胚発生期では、軟骨細胞により構成され、その後、周囲が骨化し、硬骨に置き換わる(Fig.3-A, DeLaurier, 2018)。初期胚(受精後4日)では、mmp9:GFP は舌顎骨孔を通り抜ける顔面神経軸索を構成するシュワン細胞で発現した(Fig.3B, C)。舌顎骨孔は、軟骨細胞の肥大に伴い孔の直径が拡大した(Fig.4A-A')。一方、シュワン細胞を欠損する系統(ErbB-/-)では、孔の拡大がみられなかった(Fig.4B-B')。この際、孔を取り囲む軟骨細胞が過剰に肥大した(Fig.4-C, C')。これらの結果から、シュワン細胞が分泌する mmp9 が軟骨細胞の ECM を分解し、軟骨細胞のリモデリングが生じることで、孔の直径が大きくなることが考えられた。

その後、舌顎骨が骨化し始めると(Fig.3.A)、舌顎骨孔はさらに拡大した(Fig.1b, Fig.3A)。このとき、mmp9:GFP は舌顎骨孔の周囲に隣接する破骨細胞で発現した(Fig.1b)。次に、破骨細胞が低形成の突然変異体(csfr-/-)を解析した結果、舌顎骨孔の直径の拡大が阻害され、骨形成に異常がみられた(Fig.5.)。この結果から、骨化した舌顎骨の形態形成には、破骨細胞による骨リモデリングが必要であることが明らかとなった。

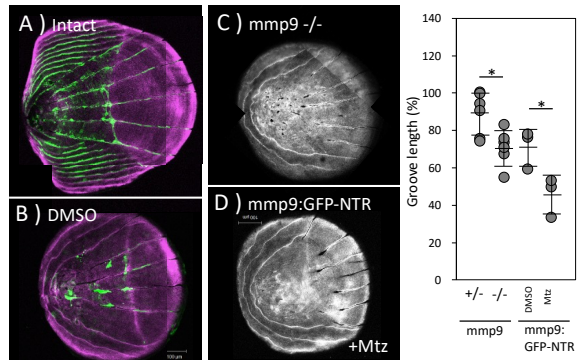


Fig.2. Mmp9 (-/-)突然変異体および mmp9:GFP-NTR を Mtz 処理し、mmp9:GFP 陽性細胞を除去した際の再生鱗. B) control. C) mmp9 (-/-)変異体. D) Mtz 処理し mmp9:GFP 陽性細胞を除去。

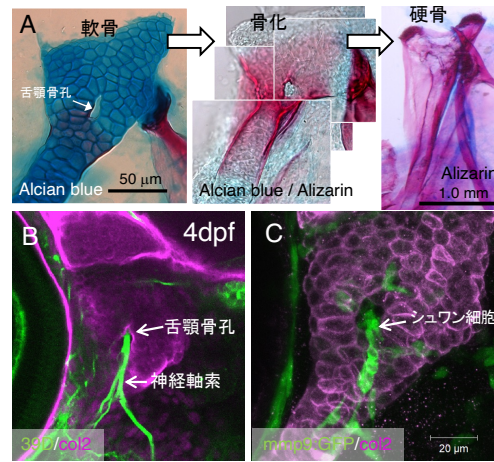


Fig.3. ゼブラフィッシュ舌顎骨の形態. A)舌顎骨の形態変化. B) 舌顎骨孔を通り抜ける神経軸索. C)神経軸索を構成するシュワン細胞で mmp9:GFP が発現する。

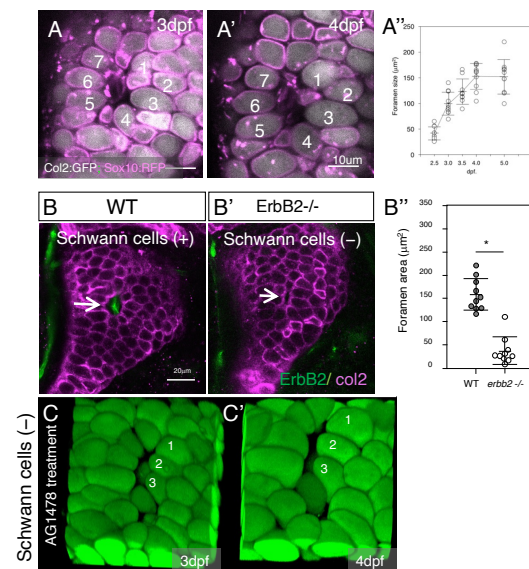


Fig.4. 初期胚における舌顎骨孔のサイズ変化. A-A') 発生に伴い舌顎骨孔は拡大する. B-B') シュワン細胞を除去すると舌顎骨孔のサイズは縮小する. C, C') シュワン細胞が欠損すると軟骨細胞は過剰に肥大する。

以上の結果から、*mmp9* は発生初期と成長期では異なる役割を持つことが示された。(1) 発生初期では、舌顎骨孔を通る神経軸索のシュワン細胞で発現し、周囲の軟骨細胞をリモデリングする。(2)成長期では、骨化した舌顎骨孔にある破骨細胞で発現し、骨表面を分解することにより軸索が通る孔が拡大する。

本研究により、骨と軟骨の形態形成において、異なる細胞が同じ分子を使って周囲の ECM を分解する役割を担うことが示された。今後、*mmp9* の機能解析をすすめ、分解する基質を特定し、そのときに生じる周囲の細胞の動態を解析することで、これまで知られていなかった骨の形態形成メカニズムが解明できると考えられる。

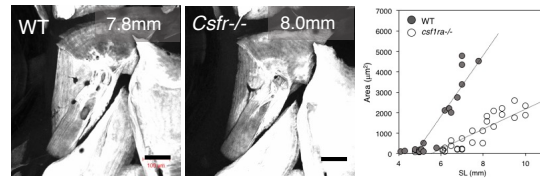


Fig.5.突然変異体 *Csfr-/-*における舌顎骨の形態.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kon Tetsuo, Omori Yoshihiro, Fukuta Kentaro, Wada Hironori, Watanabe Masakatsu, Chen Zelin, Iwasaki Miki, Mishina Tappei, Matsuzaki Shin-ichiro S., Yoshihara Daiki, Arakawa Jumpei, Kawakami Koichi, Toyoda Atsushi, Burgess Shawn M., Noguchi Hideki, Furukawa Takahisa	4. 巻 30
2. 論文標題 The Genetic Basis of Morphological Diversity in Domesticated Goldfish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2260 ~ 2274.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.04.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki Miki, Yokoi Hayato, Suzuki Tohru, Kawakami Koichi, Wada Hironori	4. 巻 249
2. 論文標題 Development of the anterior lateral line system through local tissue tissue interactions in the zebrafish head	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.225	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 -

1. 著者名 Iwasaki M, Wada H	4. 巻 84
2. 論文標題 Regulation of scale morphogenesis through Wnt/PCP signaling in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 293-294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.84.293	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎美樹、川上浩一、和田浩則
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ舌顎骨のリモデリング
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎美樹、川上浩一、和田浩則
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの鱗を構成する多様な細胞の形態的観察
3. 学会等名 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎美樹、川上浩一、和田浩則
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの鱗は形態の異なる多様な骨芽細胞で構成される
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019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
---------	---------