

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440118

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた骨リモデリング機構の解明

研究課題名(英文) Bone remodeling process for the lateral line scale in zebrafish

## 研究代表者

和田 浩則 (Wada, Hironori)

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構(新領域融合研究センター及びライフサイ・新領域融合研究センター・融合プロジェクト研究員)

研究者番号：70322708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織の維持には、骨の形成と吸収のバランスが必要である(骨リモデリング)。このバランスの異常は、骨粗鬆症などの骨の病気を引き起こすが、その仕組みはよく分かっていない。我々は、ゼブラフィッシュの鱗(骨組織)を用いて、骨の形成過程を調べた。その結果、特殊な鱗(側線鱗)にある筒状の構造(管器)が、骨リモデリングによって、絶えず成長していることを示した。さらに、側線とよばれる神経組織(感覚器)が、骨リモデリングを制御していることを明らかにした(Wada et al., 2014)。この研究成果は、神経組織と骨組織が相互作用していることを意味していて、今後、骨の病気の原因解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Bones are continuously renewed through a bone remodeling process in a homeostatic manner. Defects in the bone remodeling process cause bone diseases such as osteoporosis. To understand mechanisms of bone remodeling, we studied the development of lateral line scales in zebrafish. The lateral line canal system is located within scales (dermal bone) running under the skin. We demonstrated that canals originate from scales through a bone remodeling process. Moreover, we found that lateral line sensory organs are required for the formation of canals, suggesting the existence of mutual interactions between the neural tissue and surrounding connective tissues (Wada et al., 2014).

研究分野：発生生物学

キーワード：骨リモデリング 側線鱗 ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

骨は、骨形成（骨芽細胞）と骨吸収（破骨細胞）によって、つねにターンオーバーしている。この過程を骨リモデリングという。骨形成と骨吸収のバランスが失われると、骨粗鬆症などの骨疾患が引き起こされる。骨リモデリングは、体内で生じるので、マウスなどの哺乳類では、その仕組みを解析することは難しかった。

我々は、これまで、ゼブラフィッシュ等の小型魚類を用い、側線神経の感覚器（感丘）のパターン形成のメカニズムを解析してきた（Wada et al., 2008; 2010; 2013）。その過程で、感覚器が鱗（皮骨）にもぐり込む現象に注目した（側線鱗）。側線鱗の中に存在する感覚器（感丘）は、体表のそれとは異なり、魚の成長と共に大きくなることから、感丘と骨組織には相互作用があると考えた。

## 2. 研究の目的

骨リモデリング過程の解析の材料として、ゼブラフィッシュの側線鱗に着目した。魚類の鱗は、皮膚（真皮）に由来する骨（皮骨）であることが分かっている。これらの皮骨は、体幹部の軟骨性骨とは異なり、体表近くに（表皮の直下の真皮）に存在するため、骨の形成・吸収過程を観察することが容易である。本研究では、ゼブラフィッシュの特殊な鱗である側線鱗の発生過程を調べることによって、骨リモデリングのメカニズムを明らかにすることを目的としている。とくに、側線器官（感丘）の形成に注目し、神経組織と骨組織との相互作用の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、側線鱗という特殊な鱗に着目した。側線鱗には、中空の円筒状の骨組織（管器）の中に、側線神経の感覚器（感丘）が存在している。側線鱗の感丘（管器感丘）は、水の加速度を感知するシステムであると考えられている。

(1) はじめに、鱗のない稚魚期には体表面に存在する感丘が、魚の成長と共に、どのように鱗（皮骨）に埋没するのかを記載した。表皮細胞で特異的にクラゲ蛍光タンパク質（GFP）を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュ系統を用い、各発生段階の稚魚を、蛍光観察、及びアリザリン染色によって皮膚の構造を観察した。また、管器の中

構造を可視化するために、墨汁もしくは蛍光色素を注入し、観察した。

(2) つぎに、側線鱗における、骨芽細胞と破骨細胞の分布を、抗体染色・遺伝子発現解析によって調べた。骨芽細胞のマーカーとして、sp7 遺伝子の mRNA の発現を *in situ hybridization* によって検出した。また、骨芽細胞を特異的に染色する抗体や、骨芽細胞に特異的に GFP を発現するトランスジェニック系統を用い、鱗の形成過程を観察した。また、破骨細胞のマーカーとして、ctsk 遺伝子の発現、および、TRAP 染色による観察を行った。

(3) 破骨細胞に異常を示す突然変異体 *c-fms* は、骨リモデリング過程に異常があることが分かっている。そこで、*c-fms* 変異体成魚の側線鱗の形態を(1)(2)に用いたものと同様の手法で解析した。

(4) 骨リモデリングを引き起こすメカニズムを調べるために、鱗の再生過程・移植過程における、側線鱗の形成過程を調べた。まず、側線鱗をピンセットで取り除き、その後の変化を(1)(2)で用いた手法で解析した。また、側線鱗を除去した後の場所に、同個体の別の場所から得られた普通の鱗を差し込み、その後の変化を観察した。

(5) 最後に、神経組織が骨リモデリングに与える影響を調べるために、感丘を除去による側線鱗の再生の異常を調べた。まず側線鱗を除去した後、皮膚に残っている構造（感丘とそれに付随する側線組織、*interneuromast cell* を含んでいる）を、注射針の先で慎重に取り除いた。これらの個体を飼育し、その後の再生鱗の形態を(1)(2)で用いた手法で解析した。

## 4. 研究成果

(1) 稚魚期において、すべての感丘は体表面（表皮）にある。魚が体長約 10mm に達すると（変態期）鱗（すなわち骨組織）は、表皮の下の真皮に形成された。つまり、この初期段階では、感丘は骨の上に存在している。一方、魚が成長するにしたがって、感丘の両側の骨組織が隆起した。さらに、感丘の下の骨組織が徐々に、消失することが分かった（下図）。その結果、最終的に、中空の管状組織（管器）が生じ、感丘は鱗の中に埋没し

た。

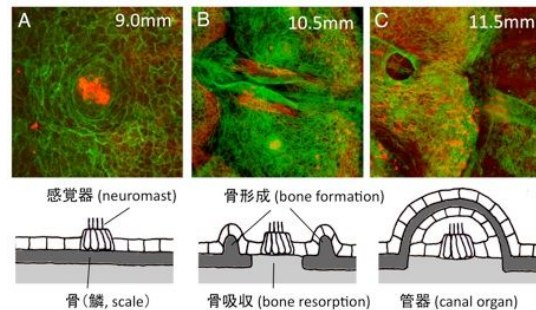
(2) 上記の観察結果から、側線鱗の形成には骨形成と骨吸収(つまり骨リモデリング)が関与していると考えられた。そこで骨芽細胞の遺伝子マーカー(s p 7 等)、破骨細胞のマーカー(ctsk、TRAP 等)の発現パターンを調べた。その結果、骨芽細胞・破骨細胞、いずれもが、側線鱗の管器に局在していることが分かった。このことは、管器が骨リモデリングによってつねに新生されていることを意味している。それを裏付ける証拠として、管器の直径が、魚の大きさに比例して増加することを示した。

(3) つぎに、側線鱗形成過程における、骨リモデリングの役割を知るために、破骨細胞の分化に異常を示す c-fms 突然変異体の鱗の形態を調べた。この変異体では、骨リモデリングに異常が見られることがすでにわかっている。c-fms 突然変異体では、側線鱗の管器の形態に顕著な異常が見られた。特に、管器の上側の骨が太くなり、融合が起きない(つまり、筒状にならない)ことが分かった。このことから、側線鱗の形成には、骨リモデリングが必要であることが示された。

(4) つぎに、側線鱗の除去実験を行った。鱗は、非常に高い再生の力を持ち、除去後5日で、元通りに再生することが知られている。側線鱗を除去したところ、再生した側線鱗もやはり管器構造を持つことがわかった。このことから、骨以外の組織が、骨リモデリングを誘導していることが考えられた。そこで、除去した側線鱗の場所に、通常の鱗を移植した。すると、移植した鱗にも骨リモデリングが生じて、管器構造をとることが分かった。つまり、側線鱗があった場所(骨以外の組織)に骨リモデリングを引き起こす要素があると考えられた。(1)の観察によって、管器は、必ず、側線神経の感覚器(感丘)の周囲で生じることから、管器が骨リモデリングを引き起こす要因であると考えた。

(5) (4)の仮説を検証するために、側線鱗を除去するさい、側線組織(感丘)も同時に取り除く実験を行った。すると、再生した鱗には、管器構造がなくなり、通常の鱗と同じ形態を示した。つまり、管器の形成(=骨リモデリング)には、側線組織(感丘)が必要であることが示された。以上の結果から、神経組織が骨組織に作用して、その形態形成

を誘導することが分かった。今後、これらの組織間の相互作用をつかさどる分子メカニズムを解明したいと考えている。



図：ゼブラフィッシュ側線鱗(管器)の形成過程(上、アリザリン染色、下、断面の模式図)

## 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)

(1) 和田浩則 (2015) 神経組織による骨リモデリングの制御(化学と生物 第53巻、第2号 76-77) (査読無し)

(2) Wada H, Kawakami K (2015). Size control during organogenesis: Development of the lateral line organs in zebrafish. *Development, Growth & Differentiation* 57: 169-178. (査読有り)

(3) Wada H, Iwasaki M, Kawakami K (2014). Development of the lateral line canal system through a bone remodeling process in zebrafish. *Dev. Biol.* 392: 1-14. (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

(1) 和田浩則 (2014) 魚類側線器官の発生と進化 第4回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting、2014年7月12日、東京慈恵医科大学(東京都・港区)

(2) Wada H, Kawakami K (2014) Development of the lateral line canal system through a bone remodeling process in zebrafish. 第47回 日本発生生物学会、2014年5月28日、愛知県産業労働センターウィングあいち(愛知県・名古屋市)

[その他]

ホームページ等

[http://w01.tp1.jp/~a680124941/Wadas\\_home\\_page/homu.html](http://w01.tp1.jp/~a680124941/Wadas_home_page/homu.html)

## 6 . 研究組織

### 研究代表者

和田 浩則 (WADA HIRONORI)  
大学共同利用機関法人 情報・システム研究  
機構 新領域融合研究センター 融合プロ  
ジェクト研究員  
研究者番号 : 70322708