

北里大学大学院海洋生命科学研究科

論文内容要旨

ゼブラフィッシュ鱗の形態形成機構に関する研究

岩崎 美樹

2018年7月

哺乳類の骨（硬骨）には内軟骨性骨と膜性骨（皮骨）がある。内軟骨性骨は、軟骨細胞により形成された軟骨組織を基礎に骨芽細胞によって形成される。その後、骨芽細胞および破骨細胞がそれぞれ骨形成および骨吸収することで、持続的に再構築されている（骨リモデリング）。一方、膜性骨は、軟骨形成を経ずに骨芽細胞により直接形成される。我々の体を支える骨の形態は、体の部位や種の違いにより多様である。骨の形態の多様性は、骨芽細胞が適切な場所で増殖し、局在することによって生じるが、哺乳類では細胞の動態を生体内で観察することが難しく、骨の3次元構造の形成機構はわかっていない。

魚類では、内軟骨性骨の存在は確かめられてはいないが、膜性骨（鱗、鰓蓋骨、鰭条骨）は透明な表皮の直下に存在することから、骨形成に関わる細胞の動態を生体内で観察することが可能である。これまで、ゼブラフィッシュの *green fluorescent protein* (GFP) トランスジェニック系統を用いた解析から、鰓蓋骨と鰭条骨における骨芽細胞の動態が観察されている。さらに、ゼブラフィッシュではヘッジホッグ (Hh) シグナルが骨形成に働くことが示されている。鰭条骨では、特定の表皮細胞がソニック・ヘッジホッグ a (*shha*) を発現し、分裂中の骨芽細胞を局在させることで鰭条骨の分岐を制御する。一方、鰓蓋骨では、特定の骨芽細胞がインディアン・ヘッジホッグ a (*ihha*) を発現して隣接する骨芽前駆細胞の分裂を制御し、鰓蓋骨を一定方向に伸長させる。しかしながら、鱗の形態形成機構についてはほとんど明らかにされていない。

本研究では、以上の背景を踏まえ、今まで知見の乏しかった膜性骨の一つである鱗の形態形成機構を解析した。第1章では、表皮細胞で発現する *Shha* が骨芽前駆細胞に働き、骨芽細胞の分化を促進し、鱗の成長を制御することを示した。さらに、*Wnt/planar cell polarity* (平面極性、PCP) シグナルが表皮細胞における *shha* の発現パターンを制御することによって鱗の成長方向を決めていることを示した。第2章では、管状構造を持つ側線鱗には骨芽細胞と破骨細胞の両方が局在し、骨リモデリングによって形態変化を引き起こすことを示した。さらに、この骨リモデリングには神経プラコード由来の感覚器（感丘）が必要であることを示した。成果の概要は以下の通りである。

1. ゼブラフィッシュ通常鱗の形態形成機構の解析

ゼブラフィッシュ鱗では、コラーゲンを主成分とする骨基質を多数の骨芽細胞が取り囲んでいる。まず、鱗で GFP を発現する既存のトランスジェニック系統 (*gSalzGFFM848:gal4;UAS:GFP, sp7p:GFP-caax*) を用いて観察を行った。その結果、鱗には

形態の異なる 2 種類の骨芽細胞、(i) 骨基質の内側表面に存在する 1 層の扁平な *central cell* と、(ii) 鱗の後縁部の成長点に沿って細長く伸長した *marginal cell* が存在することを確認した。これらの細胞は、鱗の発生初期では区別できなかったが、発生が進むにつれて次第にそれぞれ異なる形態へと変化した。鱗の成長過程で *central cell* 数は増加せず、細胞接着面が激しく仮足を伸ばしながら細胞のサイズが増大した。一方、*marginal cell* は鱗の成長に伴い、細長く変化した。細胞接着面に仮足はみられなかった。さらに、EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) 標識実験から、鱗の除去後に生じた再生鱗では *central cell* および *marginal cell* ともに細胞増殖していないことが明らかになった。この結果は、鱗の再生前に既に分裂を終えた骨芽前駆細胞が存在し、この細胞が鱗の除去を引き金に骨芽細胞に分化することを示唆する。また、鱗の後縁を覆う表皮領域では *shha* が一定間隔、一定方向に並んで三日月状に発現し、この *shha* を発現する表皮細胞はその直下にある *marginal cell* と接していた。*shha* は鱗の再生過程においても同様のパターンで発現した。そこで、再生鱗を対象にシクロパミン処理による Hh シグナル阻害実験を行ったところ、*marginal cell* は形成されず、また、骨の成長が著しく阻害された。このとき、骨芽細胞の細胞死は観察されなかったことから、*shha* は *marginal cell* の維持ではなく、細胞分化に必要であることが示された。

表皮細胞の平面極性は Wnt/PCP シグナルによって制御されることがショウジョウバエやマウスで知られている。そこで、ゼブラフィッシュにおいて Wnt/PCP シグナルの受容体 (Frizzled class receptor 3a, Fzd3a) の細胞内ドメインを除去した変異タンパク質 (dnFzd3a) を表皮特異的に発現させ、Wnt/PCP シグナルを阻害する実験を行った。その結果、*shha* の発現領域は一定方向に整列せず、ランダムな方向へ傾く異常を示した。これに伴い、鱗の成長方向にも異常がみられた。以上の結果から、(i) 表皮において Wnt/PCP シグナルが *shha* の発現パターンを制御すること、(ii) 表皮から分泌された Shha が骨芽前駆細胞に働いて *marginal cell* を分化させて鱗を一定方向に伸長させることが明らかになった。

2. ゼブラフィッシュ側線鱗の形態形成機構の解析

側線鱗の分布は魚種により異なる。ゼブラフィッシュでは、約 500 枚の鱗のうち体幹部の最も前方の 1~6 枚が側線鱗で、この側線鱗は、中央部に半円筒形の管器骨を持っている。管器骨の内腔には神経プラコード由来の感覚器 (感丘) があり、水の動きを感知する有毛細胞が存在し、側線神経が投射している。本研究では、まず、成長に伴う側線鱗の形成過程を観察した。体長 8.5~9.9 mm の稚魚では側線鱗は見られず、全ての鱗は通常鱗の形態を示し、感丘は体表面に存在した。体長約 10 mm の稚魚において、体幹部前方に位置する 1~6 個の感丘に沿って鱗の中央部の骨が隆起し始めた。体長約 15 mm になると、隆起はアーチ状の管器骨に変化するとともに、感丘直下の骨基質 (カルシウム沈着領域) が消失し、感丘は皮膚

に埋没した。さらに、魚体の成長に伴って管器骨の内径が増大し、感丘サイズも大きくなっていったことから、骨形成と骨吸収による骨リモデリングが生じていると考えられた。そこで、既存の GFP トランスジェニック系統 (*SAGFF (LF)228A:gal4;UAS:GFP, CathepsinK (ctsk):GFP*) を用いて、管器骨を構成する細胞を調べた。その結果、管器骨の骨基質の両面には、**central cell** や **marginal cell** とは異なる形態の骨芽細胞が付着していることが確認された。一方、感丘の周辺領域には多核の破骨細胞が存在し、その近傍には骨吸収を示すハウシッポ窩（カルシウムが欠失した領域）がみられた。また、破骨細胞の周辺領域は高い破骨細胞活性（酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ活性）が認められた。

管器骨形成における破骨細胞の役割を調べるために、破骨細胞の分化を制御するマクロファージコロニー刺激因子受容体 (*c-fms*) のゼブラフィッシュ突然変異体 (*c-fms/panther*) の側線鱗を観察した。*c-fms* 変異体では、管器骨周辺の破骨細胞活性が低く、管器骨の形成に異常を示した。さらに、野生型と比較して、*c-fms* 変異体の管器内径と感丘サイズは有意に小さかった。一方、*c-fms* 変異体の通常鱗の形成には異常が見られなかった。これらの結果は、通常鱗の後縁部における骨の成長には破骨細胞は関与しないが、管器骨の形成および成長には破骨細胞が必要であることを示している。すなわち、管器骨形成では、骨芽細胞と破骨細胞の両方が協調して骨リモデリングを行っていると考えられる。

次に、側線鱗の再生過程を調べた。側線鱗を除去すると、感丘は体側に残され、その領域に新たに鱗が形成された。このとき、再生した鱗で感丘の周囲に新たに管器骨が形成された。また、再生鱗を除去した場所に通常鱗を移植したところ、感丘が接する領域で骨基質が消失するとともに、その周囲に管器骨が誘導された。一方、側線鱗とともに感丘を除去したところ、通常鱗が再生され管器骨は全く誘導されなかった。以上の結果は、骨リモデリングによる管器骨の形成は、感丘組織によって制御されていることを示す。

以上、本研究により鱗の形態形成には、特定の領域（鱗の後縁部と管器骨）に骨芽細胞や破骨細胞が局在することが必要であることを示した。また、これらの細胞の分化や局在には周辺組織（表皮細胞と感丘）からの作用が不可欠であることを明らかにした。さらに、鱗の再生の際には、分裂を終えた骨芽前駆細胞が鱗の除去を引き金にして骨芽細胞が分化することを示した。また、鱗の成長は、骨芽細胞の増殖を伴わず、骨芽細胞のサイズが大きくなることによって行われていることを明らかにした。骨の形態は動物種や生体の部位により驚くほど多様であり、その結果、様々な環境への適応を可能にしている。本研究で得られた結果は、このような骨の形態の違いを生み出す発生機構の解明に大きく寄与するものである。