

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュの膜ヒレ再生モデルを用いた、再生細胞の生存機構の解析
Title(English)	
著者(和文)	長谷川智也
Author(English)	Tomoya Hasegawa
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10421号, 授与年月日:2017年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:川上 厚志,工藤 明,桑 昭苑,立花 和則,山口 雄輝,白木 伸明
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10421号, Conferred date:2017/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 28 年度

博士論文

ゼブラフィッシュの膜ヒレ再生モデルを用いた、
再生細胞の生存機構の解析

東京工業大学大学院 生命理工学研究科

生命情報専攻 工藤・川上研究室

長谷川 智也

目次

要旨	1
背景・目的	1
方法・結果・考察	2
報文目録	5
第1章 緒言	6
1.1 組織再生	6
1.1.1 組織再生の分類	6
1.1.2 生物種間における再生能力の差	6
1.2 ゼブラフィッシュと再生	8
1.2.1 ゼブラフィッシュの生態	8
1.2.2 ゼブラフィッシュの再生能力	8
1.3 ゼブラフィッシュと遺伝学	9
1.3.1 ノックアウト、ノックダウン技術	9
1.3.2 トランスジェニック (Tg)	10
1.4 本研究の目的	11
1.5 図表	13
第2章 膜ヒレ再生不全を示す <i>cloche</i> 変異体(<i>clo</i>)の解析	15
2.1 序論	15
2.1.1 ゼブラフィッシュの膜ヒレ再生	15
2.1.2 ゼブラフィッシュの血球分化と <i>clo</i> 遺伝子	15
2.1.2 本研究の目的	16
2.2 結果	16
2.2.1 <i>clo</i> の膜ヒレ再生不全	16
2.2.2 <i>clo</i> の膜ヒレにおける再生特異的な細胞死	17
2.2.3 <i>clo</i> の細胞死の種類	19
2.2.4 血球、血管細胞の膜ヒレ再生への影響	20

2.2.5 再生細胞生存因子	21
2.3 考察.....	22
2.3.1 再生細胞の生存機構.....	22
2.3.1 再生細胞生存因子の由来.....	23
2.3.1 再生細胞生存因子の正体.....	23
2.5 図表	25
第3章 Interleukin 1b (Il1b) の膜ヒレ再生における機能	48
3.1 序論.....	48
3.1.1 炎症反応の機構.....	48
3.1.2 Il1b の機能	48
3.1.3 炎症反応と組織再生.....	49
3.1.4 本研究の目的	49
3.2 結果.....	50
3.2.1 clo における膜ヒレ再生中の <i>il1b</i> の発現	50
3.2.2 再生組織における <i>il1b</i> の発現細胞.....	51
3.2.3 clo の細胞死と Il1b シグナルの関連性.....	52
3.2.6 過剰な Il1b シグナルの細胞死と膜ヒレ再生に対する影響.....	53
3.2.4 マクロファージノックダウンの再生細胞の細胞死への影響.....	54
3.2.7 通常の Il1b シグナルの膜ヒレ再生における機能	55
3.2.8 Il1b シグナルの成魚の尾ヒレの再生に対する機能	55
3.3 考察.....	56
3.3.1 上皮細胞における <i>il1b</i> の発現の意義.....	56
3.3.2 過剰な <i>il1b</i> が引き起こす再生組織の細胞死メカニズム.....	56
3.3.3 過剰な <i>il1b</i> の発現を抑制する抗炎症機構.....	57
3.3.4 Il1b シグナルが再生関連遺伝子の発現を誘導するメカニズム.....	57
3.5 図表.....	59
第4章 結言.....	81

第5章 実験手法.....	82
第6章 参考文献.....	91
第7章 謝辞.....	107

要旨

背景・目的

多細胞生物は組織が損傷を受けた際に、損傷部位を再生することでその恒常性を維持している。このような再生メカニズムの解明は、現代の生物学において挑戦的な課題の一つである。組織再生のなかでも、硬骨魚類のヒレや有尾両生類の四肢の再生は付加再生と呼ばれ、残存組織が成長し、正常なパターンを持つ新しい構造が再形成される。付加再生原理を解明することで、全ての組織再生に共通する機構の発見と、再生医療への貢献が期待される。

硬骨魚類の一種であるゼブラフィッシュは、飼育、ゲノム編集等が容易であることから、優れたモデル生物として使用されている。加えて、高い組織再生能力を保持しており、ヒレ、心臓、脳などの複雑な構造を持つ器官も再生することができる。その中でも、尾ヒレは付加再生を解析するためのモデルとして古くから用いられている。

付加再生の過程において、2種類の特徴的な組織が誘導される。一つは傷上皮と呼ばれる、損傷部位を覆う厚い上皮組織であり、もう一つは再生芽と呼ばれる、高い増殖能を持った間葉細胞組織である。これらの組織の相互作用が再生組織における細胞増殖と形態形成を制御し、再生を可能にしている。尾ヒレの再生モデルを用いた研究によって、再生芽や傷上皮の誘導および相互作用に関与する、多数の遺伝子やシグナル伝達経路が明らかにされてきた。

従来のゼブラフィッシュの尾ヒレ再生モデルに加えて、稚魚の膜ヒレを用いた再生モデルも確立されている。膜ヒレ再生においても、傷上皮の形成と、切断に応じた間葉細胞の形態変化が見られ、成魚の再生芽に相当する細胞(再生細胞)が誘導される。さらに、再生組織における遺伝子発現の調査から、膜ヒレと尾ヒレは再生に必要なシグナル伝達を共有していることが示唆されている。膜ヒレ再生モデルは、

短時間で再生が完了すること、成魚の尾ヒレよりも組織が単純なこと、多くの個体を得るのが容易であること、致死性の変異体の解析が可能であること等の利点がある。実際に、所属研究室の先行研究によって、血球、血管組織を欠損した *cloche* 変異体(*clo*)が重篤な膜ヒレ再生不全を示すことが発見された。しかしながら、*clo* における再生不全の原因や、血球、血管組織の欠損と膜ヒレ再生不全との因果関係等は不明瞭であったため、本研究は *clo* における再生不全の原因の解析を通じて、組織再生メカニズムの一端を解明することを目的とした。

方法・結果・考察

1. *clo* の膜ヒレ再生不全表現型の解析

受精 2 日後の野生型と *clo* の膜ヒレ再生を比較すると、切断後 3 日経っても *clo* は再生がほとんど進行しなかった。再生組織における細胞死と細胞増殖を調べたところ、*clo* は細胞増殖をほとんど示さず、代わりに多くの細胞死が検出された。特に細胞死は、多くの再生関連遺伝子が発現し始めるステージにおいて誘導されていた。さらに、細胞死は主に間葉細胞で起きていたことから、*clo* の死細胞は膜ヒレの切断によって誘導された、再生細胞であることが示唆された。

次に、細胞死の原因が再生細胞内での *clo* タンパク質の欠損によるものなのか、あるいは血球、血管組織の欠損によるものなのかを明らかにするために、*clo* と同様に血球、血管組織を欠損している *tal1/scl* 変異体(*tal1*)の再生を調べた。その結果、*tal1* も *clo* と同様な再生不全表現型を示したため、血球、血管組織が膜ヒレ再生および再生細胞の生存に必要であることが明らかになった。続いて、血球、血管組織のうち、どの種類の細胞が再生細胞の生存に必要なのかを調べるために、赤血球欠損変異体、血管形成阻害剤、ミエロイド細胞をノックダウンするアンチセンスモルフオリノオリゴ(MO)を使用した。その結果、ミエロイド細胞をノックダウンした場

合のみ、再生細胞の細胞死が誘導されたため、ミエロイド細胞が再生細胞の生存に必要であることが明らかになった。このことから、ミエロイド細胞が再生細胞の生存を助ける因子、再生細胞生存因子を分泌している可能性が示唆された。

2. 再生細胞生存因子の探索

体液中に再生細胞生存因子が存在するかを調べるために、稚魚の尾部の外植体培養系を確立した。驚くべきことに、野生型の稚魚から抽出した体液を培養液中に添加すると、*tal1*の外植体における細胞死がレスキューされた。一方で、*tal1*の稚魚から抽出した体液では細胞死がレスキューされなかった。これらの結果から、ミエロイド細胞は、拡散性の再生細胞生存因子を体液中に供給することによって、再生細胞を細胞死から保護していることが示唆された。さらに、体液を熱処理しても活性を失わなかったことから、再生細胞生存因子は熱耐性のある小分子であることが示唆された。

3. interleukin 1 beta (*il1b*)と細胞死の因果関係

*clo*や*tal1*における細胞死の原因を分子レベルで明らかにするために、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、*clo*は膜ヒレ再生中に*il1b*を高発現していることがわかった。さらに、*in situ hybridization (ISH)*解析と、*il1b*レポータートランスジェニック(Tg)の観察により、*clo*は野生型よりも長い間、*il1b*を上皮細胞で発現していることが明らかになった。*il1b*は炎症促進性の分子であるため、*clo*における過剰な炎症反応が細胞死の原因であることが考えられた。実際、*il1b*の発現を*il1b MO*や、抗炎症反応作用を持つデキサメタゾンにより阻害すると、*clo*における細胞死が有意に減少した。さらに、*il1b*をヒートショックにより発現するTgを作成し、*il1b*の強制発現を行ったところ、膜ヒレ再生の阻害と細胞死が観察された。こ

これらの結果から、*clo*の細胞死は、傷害部位における *Il1b* シグナルの過剰作用に起因することが示唆された。

4. マクロファージによる *il1b* の発現抑制

ミエロイド細胞の供給する生存因子の欠損が、*clo*における細胞死の原因であることが示されていたが、ミエロイド細胞のうち、どの種類の細胞が重要な働きを担っているのかを、マクロファージおよび好中球細胞のノックダウンによって検証した。その結果、マクロファージをノックダウンした場合においてのみ、*il1b*の発現上昇と、細胞死の増加が観察された。したがって、マクロファージは何らかの分子を供給して、転写レベルで *il1b* の発現を抑制することで、再生細胞の細胞死を抑制していることが示唆された。

5. *Il1b* シグナルのヒレ再生における機能

正常な再生過程における *Il1b* シグナルの機能を明らかにするため、**MO** を用いて野生型で *il1b* ノックダウンを行い、再生過程を解析した。*il1b* のノックダウン胚は膜ヒレの再生遅延、細胞増殖の低下、再生関連遺伝子の発現低下を示した。逆に、*il1b* の過剰発現によって、再生関連遺伝子の発現上昇が見られた。これらの結果から、*il1b* は再生関連遺伝子の発現誘導を介して、再生に寄与することが示唆された。変異体の解析結果と合わせると、短時間の *il1b* の発現は膜ヒレ再生に必要なが、マクロファージによる *il1b* の発現の抑制が行われず、その発現が長時間持続した場合、再生組織の細胞死を誘導することが明らかになった。今後は、*Il1b* シグナルを制御するメカニズムの解明を通じ、自己炎症性疾患の発症機序の解明および治療法の開発への発展が期待される。

報文目録

1. Hasegawa T, Nakajima T, Ishida T, Kudo A, Kawakami A.

A diffusible signal derived from hematopoietic cells supports the survival and proliferation of regenerative cells during zebrafish fin fold regeneration.

Developmental Biology, 399(1):80-90, 2015

2. Hasegawa T, Hall CJ, Crosier PS, Abe G, Kawakami K, Kudo A, Kawakami A.

Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold.

eLIFE, (Submitted)

第1章 緒言

1.1 組織再生

1.1.1 組織再生の分類

多細胞生物は、多様な種類の細胞がそれぞれの役割を果たすことで生存しているため、細胞や組織に異常が起きた際に、個体の **Integrity** を保つための仕組みが必要である。その仕組みの1つが「再生」である。再生という言葉は様々な現象を含んでおり、生理的再生、修復再生、肥大化、再編再生に分類できる(**Figure 1.5.1 A**)[1,2]。さらに、修復再生は付加再生、組織再生、細胞再生に分類できる。付加再生という概念は、**Morgan** 博士によって初めて提唱された[3]。付加再生は、「残存組織が細胞分裂により成長し、正常なパターンをもった、新しい構造の再形成」と定義され、「再生芽(**blastema**)」と「傷上皮(**wound epidermis/wound epitherium/apical epithelial cap**)」と呼ばれる一過性的の特徴的な組織を形成することで達成される。再生芽は、損傷部位の直下に誘導される細胞集団であり、細胞増殖を繰り返し行うことで、新たな組織を構築する。再生芽はヘテロな細胞集団から構成されており、その多くは損傷部位周辺の脱分化した前駆細胞であるため、再生芽の分化能は制限されていることが示されている[4,5]。傷上皮は損傷部位を覆う肥厚した上皮組織であり、再生芽の誘導や、その増殖を促すために必要である[6,7]。様々なモデル生物の研究から、再生芽と傷上皮間でやり取りされる多数のシグナル伝達経路が明らかにされている[8,9]。付加再生と再編再生の区別の是非は意見が分かれるが[10]、本研究ではこの分類を基に再生を定義する。

1.1.2 生物種間における再生能力の差

生物種間に再生能力の差をもたらす原因は、生物学における大きな謎の一つである。プラナリアがわずかな組織片から体全体を再生できるのに対し[11]、線虫に限られた再生能力しか持たないことから示されるように[12]、生体の構造の複雑性は再生能力と関

係がないとされている。また、プラナリアの中でも全身を再生できる *Dugesia japonica* と、頭部を再生できない *Phagocata kawakatsui* が報告されており、非常に近縁な種でも再生能力に差があることが示されている[13]。脊椎動物では両生類、魚類は比較的高い再生能力を持つが、両生類の中でも、変態後のカエルやアホロートルは再生能力が減少する[14,15]。このことから、同一種内においても、発生あるいは変態に応じて再生能力は変化する。

進化学的な見地からも、再生能力の差についてアプローチされている。現在では、生物はもともと再生能力を保持していたが、進化の過程で消失したと考えられている[16]。また、四肢の再生能力と発生機構を関連付けている見解もある[17]。

付加再生能力の差を遺伝子あるいは分子レベルでアプローチすると、以下に述べるような仮説が考えられる[18]。(仮説 1)付加再生能力が高い生物は、再生に必要な遺伝子を保持している。例として、サンショウウオが持つ *Prod1* 遺伝子が挙げられる。*Prod1* 遺伝子は魚類やヒトには存在しない、四肢再生時に発現する遺伝子である。(仮説 2)生物間で保存されている遺伝子(群)が、付加再生能力が高い生物においてのみ再生時に機能する。例として、*fgf20a* 遺伝子がある。*fgf20a* 遺伝子は哺乳類にもオーソログが存在する。ゼブラフィッシュにおいて、*fgf20a* の欠損は、発生には影響を及ぼさないが、ヒレを再生することができなくなる[19]。(仮説 3)生物間で保存されている遺伝子(群)が、哺乳類では再生時に十分に活性化されないが、付加再生能力が高い生物では活性化される。例として *junba* 遺伝子が挙げられる。*junba* 遺伝子は、哺乳類とゼブラフィッシュの両方に保存されているが、リン酸化サイトの数が異なり、ゼブラフィッシュではより活性化している可能性が考えられる[20]。

以上に述べたように、生物種間に再生能力の差をもたらす原因は、様々な角度から追究されているものの未だに不明瞭である。再生能力をもたらす機構を解明することは、我々ヒトが再生能力を獲得するための大きな足がかりになるだろう。

1.2 ゼブラフィッシュと再生

1.2.1 ゼブラフィッシュの生態

ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)は南アジア、インド、バングラディッシュ、ネパール、ミャンマー、パキスタンに生息している、体長 4-5 cm のコイ目コイ科の硬骨魚類である[21]。Streisinger 博士等によって、実験動物として 1960 年代後半に使用され始め、[22]それ以来、主に遺伝学、発生生物学の分野で用いられるようになった。その要因として、ゲノムサイズが比較的小さいこと、世代時間が短いこと(2-3 ヶ月)、卵生で観察が容易であること、飼育の簡便さ、多産であること(一度で 100 個以上の卵を産む)等が挙げられる。その後、ゲノムが解読されたことにより、ヒトと約 70%の遺伝子を共有していることが明らかになり[23]、病理モデルやドラッグスクリーニングなど、用いられる研究分野はますます拡大している。

1.2.2 ゼブラフィッシュの再生能力

前述したように、ゼブラフィッシュは高い組織再生能力を持っており、ヒレ、腎臓、膵臓、肝臓、心臓、下顎、網膜、脊髄、脳、側線等の様々な器官、組織を再生できる[24-34]。特に、成魚の尾ヒレは付加再生モデルとして用いられている。

ゼブラフィッシュの尾ヒレはV字型の見た目をしており、鰭条とよばれる骨組織が、放射状に張り巡らされることによって支えられている。鰭条は一对の瓦が向かいあい、連なったような構造をしており、その内部には、繊維芽細胞、血管、色素細胞、神経細胞、グリア細胞等が存在する[35]。

ゼブラフィッシュの尾ヒレの再生過程においても、前述した再生芽と傷上皮が形成される。尾ヒレは切断されると、すぐに切断面が上皮細胞で覆われ、1日経つと傷上皮が形成される。2日後には再生芽が現れ、その再生芽が傷上皮と相互作用し、細胞増殖が

繰り返されることで、再生組織全体が伸長し、約 2 週間で再生が完了する(Figure 1.5.2 A-C)[1,25,26]。これまでの研究によって、多くの遺伝子、シグナル伝達経路のヒレ再生への機能が明らかにされている[9,36,37]。また、尾ヒレの再生芽の分化転換についても良く研究されており、再生芽の分化能は制限されていることが示唆されている[35,38,39]。しかし、一様に見える間葉細胞集団でも、遺伝子レベルでは非常にヘテロな集団であり[36]、未知の幹細胞や前駆細胞の存在も否定できない。

1.3 ゼブラフィッシュと遺伝学

1.3.1 ノックアウト、ノックダウン技術

目的遺伝子の機能を知る方法として、目的遺伝子の機能を欠損させる解析(遺伝子ノックアウト解析)は非常に強力であり、これまでに多くの知見をもたらしてきた。変異体の観察や実験結果から、原因遺伝子とその機能を解明する順遺伝学的手法に加えて、近年のゲノム編集技術の発展により、着目した遺伝子をノックアウトすることで遺伝子の機能を明らかにする、逆遺伝学的手法も目覚ましい発展を見せている。

ゼブラフィッシュの変異体の作成技術はいくつか確立されており、順遺伝学的手法として最もよく用いられている方法が、エチルニトロソウレア(ENU)を用いた手法である[40]。ENU は遺伝子の点変異を引き起こす変異原物質であり、雄の精子に変異を誘導し、交配させることで変異体を獲得することが可能である[41,42]。この手法の利点は、これまでの知見からは予想されなかった、新たな遺伝子の発見が可能なことである。

逆遺伝学的手法としては、目的遺伝子を特異的にノックアウトする方法として Targeting Induced Local Lesions In Genome (TILLING)や *Zinc-Finger Nucleases* (ZFN) が提唱されたが、変異体の作成が困難であり、あまり普及はしなかった[43,44]。次に発表されたのが *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALEN) 技術である[45,46]。TALEN は目的遺伝子配列に結合し、DNA の二重鎖切断を誘導する。切断され

た DNA 二重鎖が修復される際に、しばしば塩基の挿入または欠損がおこるので、結果としてフレームシフト変異が誘導される。TALEN は TILLING や ZFN と比較すると、容易に変異体が作成できるため、非常に便利な技術であった。しかし、程なくして Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats /CRISPR-associated protein-9 (CRISPR/Cas9) が提唱され、現在では最も簡単な方法だと考えられている [47,48]。CRISPR/Cas9 も TALEN と同様なメカニズムでフレームシフト変異を誘導するが、TALEN よりも簡便に作成することができる。CRISPR/Cas9 や TALEN は、ゲノムの相同組み換えが可能であることが報告されており、今後さらなる改良、発展が期待される [49-51]。

遺伝子のノックダウンには、アンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)が広く用いられている [52]。MO は、RNA、DNA のリボース、デオキシリボースの代わりにモルフォリン環をもつオリゴヌクレオチドであり、転写された mRNA と結合することで翻訳やスプライシングを阻害する。受精卵に MO をインジェクションすることで、数日間、目的遺伝子をノックダウンすることが可能であり、表現系を観察することでその遺伝子機能を知ることができる。以前は、作成した変異体の表現型における、原因遺伝子の特異性を、MO を用いて確認する実験が行われていたが、最近の研究により、変異体の原因遺伝子をターゲットにした MO ノックダウンが、必ずしも変異体と同じ表現型を誘導しないことが報告されたため、使用には注意が必要である [53,54]。一方で、siRNA は線虫や培養細胞で用いられる遺伝子ノックダウン技術であり、ゼブラフィッシュにおいても使用が試みられたが、成功例は少なく、マイナーな手法となっている [55]。

1.3.2 トランスジェニック(Tg)

ゼブラフィッシュの稚魚は体が半透明であり、蛍光タンパクを用いた細胞イメージングに非常に適している。成魚においても、色素を欠損した *casper* 変異体を用いること

で、ガン細胞のイメージング等が可能である[56]。ゼブラフィッシュの Tg の作成には、メダカゲノムから発見された Tol2 トランスポゾンを用いる。トランスポゾン配列をもった目的 DNA 配列を、トランスポゼースを用いてゲノム DNA に転移させることで、効率よく Tg を作成できる[57]。遺伝子発現レポーターTg を作成する際は、目的遺伝子のプロモーター数 kbp をクローニングし、その下流に蛍光タンパク配列を繋げたコンストラクトをゲノムに組み込む、プロモーターTg が主流であったが、実際の遺伝子発現はエンハンサー、サイレンサーの影響も受けるため、プロモーターTg では内在性の遺伝子発現を再現できない事態がしばしば起こる。その問題を解決するために、100 kbp ほどの長さを持ち、エンハンサー領域も含んでいることが期待できる Bacteraal Artificial Chromosome (BAC) を挿入する方法が確立されている[58,59]。

Cre/loxP システムもゼブラフィッシュで用いることができる[60]。Cre タンパクは、同方向の loxP 配列に挟まれた DNA 領域を切り取ることができ、このシステムを用いることで、細胞の永続的なラベリングや[61,62]、コンディショナルノックアウト[49]等が可能である。

細胞のアブレーション方法として、Nitroreductase/ Metronidazole (NTR/MTZ) システムが確立されている[63]。このシステムは、本来無毒な MTZ を NTR が還元することで、DNA の損傷を引き起こし、細胞死を誘導する。NTR をアブレーションさせたい細胞だけに発現させることで、目的細胞のアブレーションが可能となる。

目的遺伝子を発現させる方法としては、ヒートショックプロモーターを用いた方法[64,65]、Tet-On/Off システム[66]、Gal4/UAS システムなどが確立されている[67]。

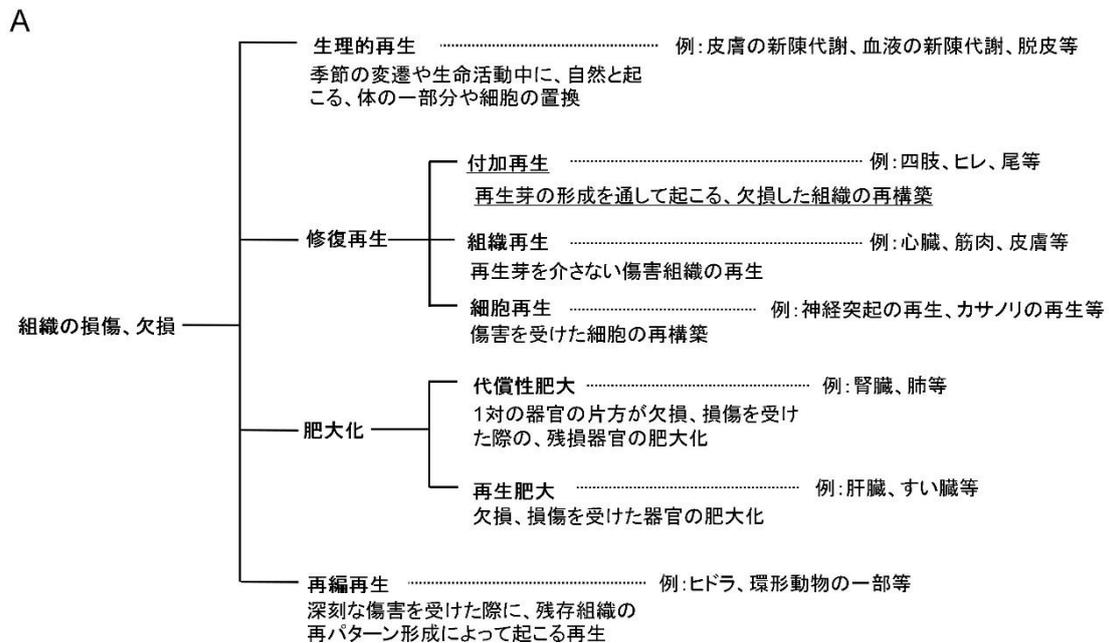
1.4 本研究の目的

多細胞生物は、組織が損傷した際に失った組織を再生することでその統合性を維持するが、そのメカニズムは不明瞭な点が数多く残されている。組織再生の根底にある機構

を解明することは、組織のパターニング、器官形成の理解を可能にし、ES 細胞や iPS 細胞を用いた再生医療への応用に大きな貢献をもたらすだろう。硬骨魚類や有尾両生類は腕、尾、ヒレ等を付加再生と呼ばれるプロセスを経て再生することができるため、ホメオスタシスの機構を解明するのに非常に有用なモデル生物である。したがって、本研究は、硬骨魚類であるゼブラフィッシュを用いて、組織再生機構の一端を解明することで、将来の再生医療の基盤となる知見を得ることを目的とした。

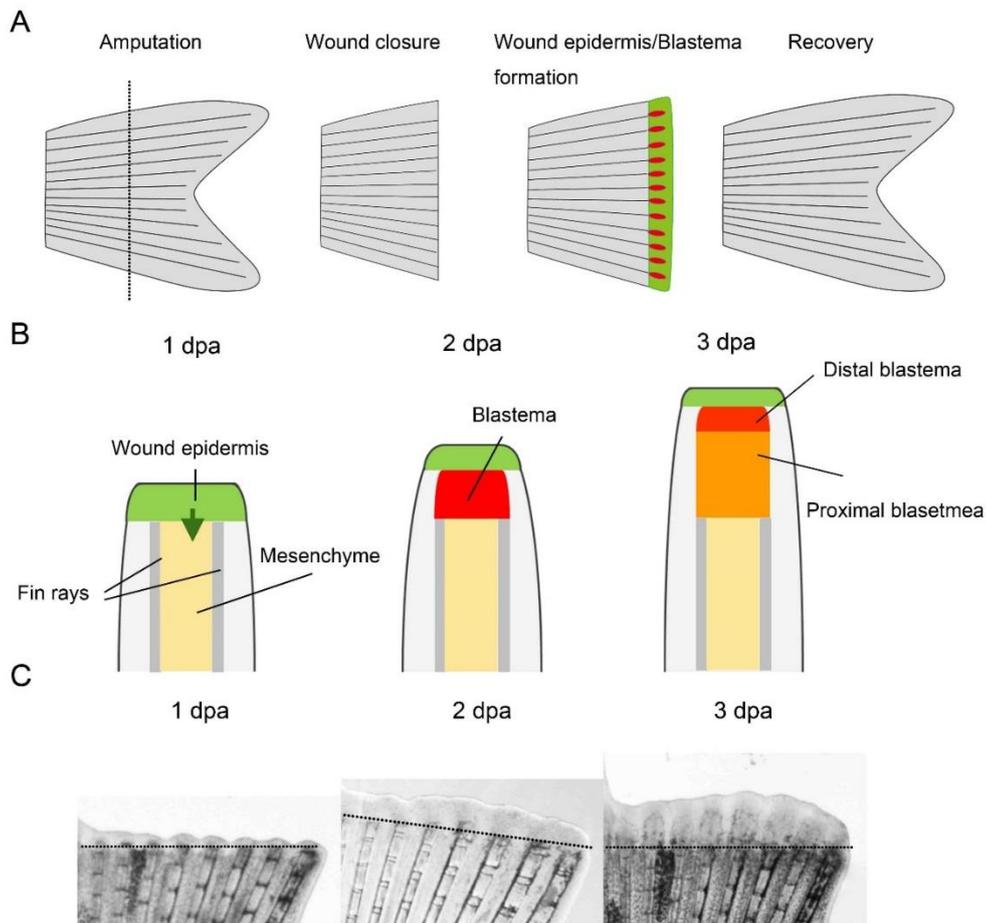
1.5 図表

Figure 1.5.1 再生の分類



(A) 文献[1,2]を参考に作成。再生現象は生理的再生、修復再生、肥大化、再編再生の4種類に分類できる。さらに、修復再生は付加再生、組織再生、細胞再生に分類でき、肥大化は代償性肥大と、再生肥大に分類できる。本研究は付加再生を対象にしている。

Figure 1.5.2 ゼブラフィッシュの尾ヒレの再生



(A) 文献[1]を参考に作成。ゼブラフィッシュの尾ヒレの再生過程の模式図。ヒレは切断されると、傷口が上皮細胞によってすばやく覆われる。その後、傷上皮と再生芽の形成が誘導され、それらの組織が相互作用することで再生が達成される。(B) 再生中の尾ヒレの断面図。切断約1日後に傷上皮が形成され、再生芽を誘導する。切断約2日後には再生芽が形成され、3日後には再生芽のなかでも、増殖が少ないDistal側と細胞分裂が活発なProximal側に分かれる。(C) 再生中の尾ヒレ。切断2日後から再生芽が確認できる。dpa, days post amputation.

第2章 膜ヒレ再生不全を示す *cloche* 変異体(*clo*)の解析

2.1 序論

2.1.1 ゼブラフィッシュの膜ヒレ再生

成魚の尾ヒレ再生モデルに加えて、稚魚の膜ヒレを用いた再生モデルも確立されている。受精2日後の稚魚の膜ヒレは2層の薄い上皮細胞の内側にアクチノトリキア、間葉細胞、神経があり、血管組織はまだ浸潤していない[68]。(Figure 2.5.1 A)が示すように、膜ヒレは切断されると、すばやく傷口が覆われ、再生のための増殖が開始する。間葉細胞はその形状を変化させ、切断前の伸長した形状から、細胞質と核が円状に変形する[68,69]。この細胞群の明確な役割は不明だが、尾ヒレの再生芽で発現する *junbb* の発現が誘導されることから[70]、成魚の再生芽に対応する組織であると考えられる。本研究では、この細胞を再生細胞と呼ぶことにする。膜ヒレ再生モデルは、短時間で再生が完了すること、成魚の尾ヒレよりも組織がシンプルなこと、多くの個体を得るのが容易である等の利点があり、膜ヒレモデルを用いた研究から、再生に必要な新たな遺伝子、シグナル伝達経路が報告されてきた[20,70-72]。しかし、最も特筆すべき利点は、致死性の変異体を用いた解析が可能なことである。ゼブラフィッシュは数十年前からエチルニトロウレア(ENU)によって作成された変異体の作成が行われており[41,73,74]、加えて、近年発達した CRISPR や TALEN 等の遺伝子改変技術を用いることで、順遺伝学、逆遺伝学ともに活用することができる。実際に、これまでの研究によって、いくつかの変異体が再生不全を示すことが報告されている[70,75]。さらに、我々の研究室の先行研究によって、*clo* が再生不全を示すことが発見されていたが、その詳細な表現型や再生不全の原因は不明であった。

2.1.2 ゼブラフィッシュの血球分化と *clo* 遺伝子

ゼブラフィッシュも哺乳類と同様、赤血球、ミエロイド細胞、リンパ球等の多様な

血液細胞を保持している(Figure 2.5.2 A)[76]。加えて、ゼブラフィッシュは卵生であり、稚魚の体が半透明で観察が容易であるため、血球形成、分化の研究に非常に適している。本研究で用いた *clo* は、血球、血管細胞を欠損した、自然発生変異体として 1995 年に報告された[77]。 *clo* の表現型解析から *clo* 遺伝子は、(Figure 2.5.2 A)が示すように、中胚葉(Mesoderm)から血管芽細胞(Hemangioblast)への分化に必要な遺伝子であることが報告されていた。 *clo* の原因遺伝子は 20 年以上不明であったが、2016 年に *npas4l* 遺伝子が *clo* の原因遺伝子であることがついに明らかにされた[78]。

2.1.2 本研究の目的

所属研究室の先行研究によって、 *clo* が膜ヒレ再生不全を示すことが発見されていたが、その原因や、血球、血管組織の欠損と膜ヒレ再生不全との関わりなどは不明であった。そこで、本研究は *clo* における再生不全の原因の究明を通じて、組織再生機構の一端を解明することを目的とした。

2.2 結果

2.2.1 *clo* の膜ヒレ再生不全

膜ヒレ再生モデルを用いたことにより、 *clo* が膜ヒレ再生不全を示すことが所属研究室の先行研究により明らかになっていた。膜ヒレ再生は約 3 日間で完了するが、 *clo* は明らかな再生不全を示し、いくつかの胚では水腫様の組織が観察された(Figure 2.5.3 A)。さらに、切断 12 時間後の胚において、TdT-mediated dUTP nickend labeling (TUNEL)染色による細胞死の検出を行ったところ、野生型は細胞死が非常に少なかったのに対し、 *clo* では多くの細胞死が観察された(Figure 2.5.3 B and C)。発生中の膜ヒレにおいては *clo*、野生型ともにほとんど細胞死を起こしていなかったことと(Figure 2.5.4 A and B)、膜ヒレにガラス針の先端で傷害を与えるだけでは、 *clo* においても細

胞死が誘導されなかったことを合わせると(Figure 2.5.5 A-C)、*clo*の細胞死は膜ヒレの切断特異的に誘導されることがわかった。また、膜ヒレ切断直後から24時間までの細胞増殖を、5-bromo-2-deoxyuridine-5-monophosphate (BrdU)の取り込みにより調べたところ、*clo*では細胞増殖がほとんど見られなかったのに対し、野生型では多くの細胞増殖が検出された(Figure 2.5.3 D and E)。切断されていない膜ヒレにおいては細胞増殖が乏しいことから(Figure 2.5.6 A and B)、野生型におけるこの細胞増殖は、膜ヒレの切断に依存的であることが示唆された。さらに、膜ヒレ以外の細胞増殖を調べたところ、*clo*、野生型ともに全身で細胞増殖が検出されたことから(Figure 2.5.7 A)、*clo*における膜ヒレでの細胞増殖の欠損は、切断後の膜ヒレ特異的であることが示唆された。これらの結果から、*clo*の再生不全は、切断後の膜ヒレにおける細胞増殖の欠損と、細胞死の増加によることが明らかになった。

これまでの*clo*の実験は、13番染色体末端を失った*clo*^{m39}を用いたため、他の遺伝子がこれまで述べた再生不全表現型の原因である可能性がある。そこで、*clo*遺伝子の再生不全表現型に対する特異性を検証するために、*clo*遺伝子の点変異体である*clo*^{a1164}を用いた。*clo*^{a1164}において、細胞死と細胞増殖を調べたところ、*clo*^{m39}と同様な細胞増殖の欠損と細胞死の増加が観察された(Figure 2.5.8 A-D)。これらのことから、*clo*^{m39}の再生不全表現型は*clo*遺伝子の欠損が原因であることが明らかになった。以降の実験では*clo*^{m39}と*clo*^{a1164}を区別することなく使用した。

2.2.2 *clo*の膜ヒレにおける再生特異的な細胞死

*clo*の再生不全は細胞死の増加だけでなく、細胞増殖の欠損も示していたことから、細胞増殖の停止そのものが細胞死を誘導している可能性も考えられた。そこで、DNA polymerase α の阻害剤であるaphidicolinを用いて、膜ヒレ再生中の野生型の細胞増殖を阻害したが、細胞死は誘導されなかった(Figure 2.5.9 A)。したがって、*clo*の細胞死

の原因は細胞増殖の欠損が直接的な要因ではなく、いくつかの要素が平行して *clo* の再生不全を引き起こしていることが示唆された。

clo における細胞死の表現型をより詳細に把握するために、細胞死の数の経時変化を調べた(Figure 2.5.10 A and B)。膜ヒレ切断直後は野生型、*clo* ともに多数の細胞死が検出されたが、野生型は時間の経過とともに細胞死の数が減少した。一方で、*clo* は切断 6 時間後にかけて一度細胞死の数が減少した後、切断 12 時間前後から再び増加した。切断 12 時間後というステージは、様々な再生関連遺伝子の発現が誘導される時期であるため、*clo* の細胞死が再生細胞でおきていることが推測された。そこで、再生関連遺伝子であり、それぞれ傷上皮と再生細胞マーカーである *junba* と *junbb* の発現を *in situ* hybridization (ISH)により調べたところ、*clo* においても *junba* と *junbb* の強い発現が検出された(Figure 2.5.11 A)。この結果から *clo* においても初期の再生反応は行われており、再生細胞が誘導されていることが明らかになった。さらに、*clo* の膜ヒレの切断の程度を変える実験を行ったところ、切断の深さに対応して多くの細胞死が誘導されることがわかった(Figure 2.5.12 A and B)。深い切断は多くの再生シグナルを誘導することが知られているため[79]、これらの結果から *clo* の細胞死は再生依存的に誘導されることが示唆された。続いて、*clo* が細胞死を起こしている細胞の種類を特定するために、TUNEL 染色を施した膜ヒレの凍結切片を作成したところ、膜ヒレの中央部分で多くの TUNEL 陽性細胞が観察されたことから、間葉細胞で細胞死が起きていることが示唆された(Figure 2.5.13 A)。さらに、間葉細胞で EGFP を発現する Tg である、Enhancer Trap line 37(ET37)[81]を用いて、EGFP の抗体染色と TUNEL 染色の二重染色を行ったところ、いくつかの EGFP 陽性かつ TUNEL 陽性の細胞が検出された(Figure 2.5.13 B)。このことから、細胞死が間葉細胞で起きていることがより強く示唆された。一方で、上皮細胞のマーカーである *tp63*[80]の抗体染色と TUNEL 染色の二重染色を行ったところ、ほとんどの TUNEL 陽性細胞は *tp63* 陰性細胞であることがわか

った(Figure 2.5.13 C)。これらの結果から、*clo*における細胞死は、膜ヒレの切断に応じて誘導された再生細胞で起こることが示唆された。

2.2.3 *clo* の細胞死の種類

次に、*clo*の再生細胞が細胞死を起こすメカニズムを調べた。細胞死はその形態から、ネクローシス、アポトーシス、オートファジーの3種類に分類される[82]。そのうち、アポトーシスは **Bcl2** によって抑制されることが報告されている[83]。そこで *egfp-zbcl2* の mRNA を *clo* の受精卵にインジェクションしたところ[84]、細胞死の数が有意に減少した(Figure 2.5.14 A and B)。この結果から、*clo*における細胞死がアポトーシスであることが示唆された。

さらに、アポトーシスの実行因子の一つである *tp53* 遺伝子の *clo* の細胞死への関与を調べるために、*tp53* と *clo* の二重変異体を作成し、TUNEL 染色を行った[85]。その結果、*tp53* の有無は、*clo* の細胞死の数に影響を与えないことが明らかになり (Figure 2.5.14 C and D)、*clo* の細胞死は *tp53* に依存しないことが示唆された。最後にアポトーシスの実行因子である活性型 **Caspase 3** の抗体染色を行った [86]。コントロールは野生型にUVを照射し、アポトーシスを誘導したものをを用いた。コントロールでは、**Caspase 3** の活性が認められたが、*clo* の膜ヒレでは、**Caspase 3** の活性化は検出されなかった(Figure 2.5.14 E)。この結果から、*clo* の細胞死は **Caspase 3** にも非依存的事であることが明らかになった。以上の結果をまとめると、*clo* の再生細胞における細胞死はアポトーシスであるが、*tp53* や **Caspase 3** に非依存的事であることが明らかになった。

続いて、*clo*における細胞死の細胞自律性を細胞移植実験で検証した。メダカの *actinb* プロモーターで *dsRed2* を発現させることで、全身で赤色蛍光を発現するドナー細胞を、ドームステージの受精卵から吸い取り、同じステージの蛍光タンパクを発

現しないホスト胚に移植した(Figure 2.5.15 A)。 *clo* 細胞を野生型に移植し、受精二日後の個体の膜ヒレを切断すると、多くの *clo* 由来の細胞が再生領域を構成しているにもかかわらず、細胞死はほとんど検出されなかった(Figure 2.5.15 B)。一方で、野生型の細胞を *clo* に移植したところ、再生領域において多くの細胞死が検出された。さらに、死細胞のうちのいくつかは、野生型由来の細胞であったため、*clo* の細胞死は細胞非自律的に誘導されることが明らかになった(Figure 2.5.15 C)。

2.2.4 血球、血管細胞の膜ヒレ再生への影響

移植実験により *clo* の細胞死の細胞非自律性が示されたことから、転写因子である *clo* 遺伝子そのものよりも、外部の環境が細胞死の原因であると考えられた。*clo* は血球、血管組織を失った変異体であるため、同様に血球、血管組織を欠損している *tal1/scf* 変異体(*tal1*)[87]を用いて、膜ヒレ再生実験を行った。その結果、*tal1*においても *clo* と同じ再生不全表現型が観察されたため(Figure 2.5.16 A-E)、血球、血管組織が膜ヒレ再生と再生細胞の生存に必要なことが示唆された。

次に、再生細胞の生存に必要な血球、血管組織の特定を試みた。(Figure 2.5.2 A)が示すように、ゼブラフィッシュは受精後 2 日目のステージで、ミエロイド細胞、血小板、リンパ球、赤血球、血管内皮細胞といった血球、血管組織を保持している。そこで、それぞれの血球、血管組織の再生細胞への関与を調べるために、赤血球の変異体である *vlad tepes* 変異体[88]、血管内皮細胞増殖因子受容体の阻害剤で、血管形成を阻害できる PTK787[89]、ミエロイド細胞の分化を阻害する *spi1b* の MO [90]、心拍を停止させる *tnnt2a* MO を用いた[91]。PTK787 の効果は、血管内皮細胞で EGFP を発現する Tg(*fli1:egfp; gata1:rfp*)を観察することで確かめられた(Figure 2.5.17 A)。*spi1b* MO の効果はミエロイド細胞の一種である、好中球を染色する Sudan black 染色によって確かめられた(Figure 2.5.17 B)。これらの各血球、血管組織をノックダウンされた

胚の膜ヒレを切断したところ、ミエロイド細胞の分化を阻害された胚においてのみ、多くの細胞死が検出された(Figure 2.5.18 A-E)。この結果から、ミエロイド細胞が再生細胞の維持に必要性であることが明らかになり、ミエロイド細胞が再生細胞の生存を助ける分子(再生細胞生存因子)を分泌している可能性が示唆された。

2.2.5 再生細胞生存因子

再生細胞生存因子を同定するために、尾部外植体の培養法を確立した。受精後 2 日目の稚魚の肛門の尾部側と、膜ヒレを同時に切断し、10% ウシ胎児血清(FBS)、10,000 units/ml penicillin G、10 mg/ml streptomycin sulfate を含んだ L-15 medium 中で、7 個体/100 μ l の密度で培養した(Figure 2.5.19 A)。この外植体における、通常の膜ヒレ再生の再現性を調べるために、野生型の外植体において TUNEL 染色を行ったところ、切断直後は多くの細胞死を示したが、時間経過とともに細胞死の数は減少した(Figure 2.5.19 B and C)。また、ISH 解析を行ったところ *junba*、*junbb* の発現が検出された(Figure 2.5.19 D)。注目すべきことに、*tal1* の外植体の細胞死を Acridine Orange 染色により検出したところ、通常の再生と同様に、多くの細胞死を示した(Figure 2.5.20 A and B)。これらの結果から、外植体は稚魚の膜ヒレ再生の初期応答を再現することが明らかになった。

ミエロイド細胞由来の再生細胞生存因子が存在することが示唆されていたので、野生型の稚魚から体液を抽出し、培養液に添加することで、その活性の評価を試みた。稚魚を L-15 medium 中で、細胞が壊れない程度にホモジェナイズし、遠心した上澄みを終濃度 1 個体/1 μ l になるように培養液に添加した。すると、野生型の体液を添加した培養液中で培養された *tal1* の外植体において、有意な細胞死の減少が見られた(Figure 2.5.20 A and B)。一方で、*tal1* の体液を培養液に添加しても、細胞死は減少しなかった。この結果から、野生型の体液中には、再生細胞生存因子が存在することが

明らかになった。

再生細胞生存因子の実態に近づくために、野生型の体液の熱処理を行った。抽出した体液を 80°C で 20 分間処理し、上澄みを培養液に添加したところ、熱処理をした後も再生細胞生存因子はその活性を保持していることが明らかになった(Figure 2.5.21 A and B)。この結果から、再生細胞生存因子は熱体性をもつ小分子であることが示唆された。

最後に、体液中の再生細胞生存因子が、再生依存的に増加するかどうかを調べるために、膜ヒレを切断して 12 時間後の野生型の体液を抽出し、その活性を測定した。その結果、膜ヒレを切断した個体群から抽出した体液と、膜ヒレを切断していない個体群から抽出した体液に活性の有意な差は見られなかった(Figure 2.5.22 A and B)。したがって、再生細胞生存因子は野生型の体液に常在する分子であることが示唆された。

2.3 考察

2.3.1 再生細胞の生存機構

再生細胞で細胞死が起こる原因として、再生細胞は通常の細胞とは異なる細胞周期を持っていることが考えられる。再生細胞は失った組織を補填するために、通常の細胞よりも活発に細胞分裂をする。通常よりも早い細胞周期を持った再生細胞は、がん細胞のような異常な細胞と見なされ、アポトーシスに対する感受性が高くなっているのかもしれない[92]。そのような状態下で再生細胞を細胞死から保護するために、再生細胞生存因子がアポトーシス誘導性のシグナルに拮抗しているのだろう。一方で、再生細胞の増殖の阻害は細胞死を誘導しないので(Figure 2.5.9 A)、再生細胞を増殖させるためのシグナルは、細胞死を抑制するシグナルとは別に存在していることが示唆された。

2.3.1 再生細胞生存因子の由来

本研究により、ミエロイド細胞が再生細胞の生存に必要であることが明らかになった。ミエロイド細胞は多様なサイトカインや成長因子を放出する。特に、M2 マクロファージは TGF-beta や VEGF 等を放出し、組織の修復を促す機能が報告されている[93]。実際に、マクロファージをロックダウンされた稚魚は、膜ヒレ再生の遅延を起こすことがわかっており[94]、加えて、成魚のマクロファージを NTR/MTZ システムを用いてアブレーションすると、尾ヒレの再生不全が起こることも明らかになっている[95]。このような先行研究結果を考慮すると、マクロファージはヒレ再生において重要な役割を持っており、本研究の再生細胞生存因子もマクロファージから分泌されている可能性が考えられる。

2.3.1 再生細胞生存因子の正体

本研究では、再生細胞生存因子を同定することはできなかったが、再生細胞生存因子が体液中に常に存在している、熱体性を持つ分子であることが示唆された。血液中の再生に寄与する分子として GDF11 が報告されている。GDF11 は若いマウスの血中に含まれており、老化したマウスに投与すると、神経発生や筋衛星細胞の活性化を促す、若返り効果があることが報告されている[97.97]。他にも再生細胞生存因子の候補として、アポトーシス抑制効果や抗炎症作用をもつ、Thymosin beta-4[98.99]、スフィンゴシン-1-リン酸[100]、グルココルチコイド[101]等が挙げられる。

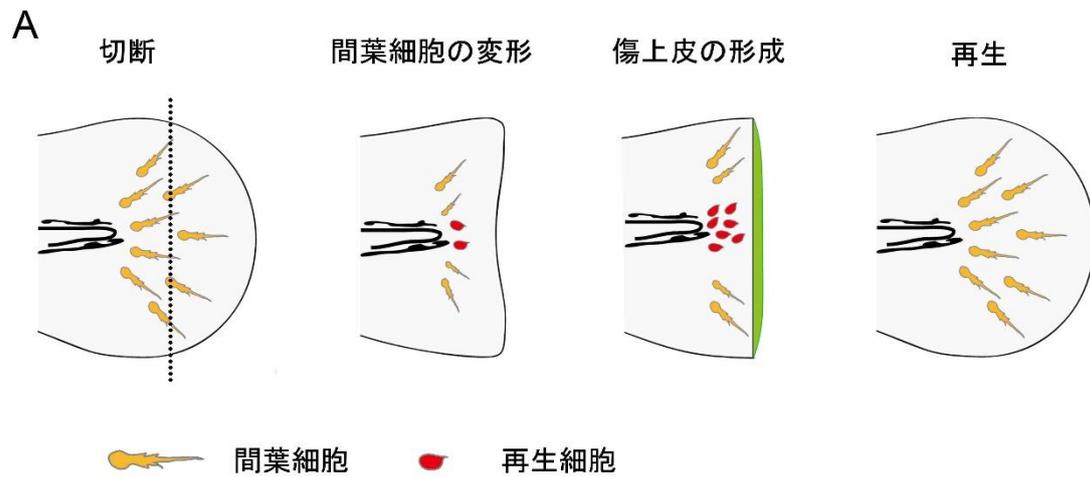
2.4 結論

血球、血管組織を欠損した *clo, tal1* が再生細胞のアポトーシスを起こすことが明らかになった。また、(Figure 2.5.23)が示すように、ミエロイド細胞由来の再生細胞生存因子が、再生細胞を細胞死から保護していることが示唆された。再生細胞生存因子の正体

は不明だが、熱体性を持つ小分子であり、野生型が体液中に常に保持している分子であることが明らかになった。本研究により、再生細胞はアポトーシス感受性が高いため、特別な生存機構を持つことで維持されていることが示唆された。

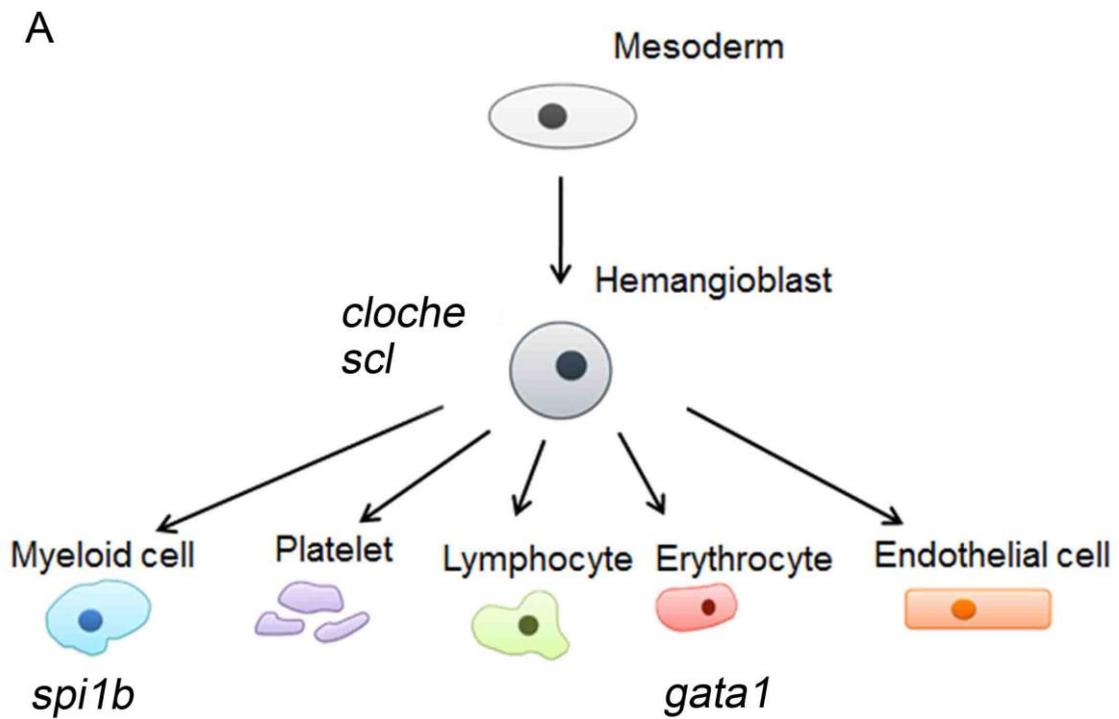
2.5 図表

Figure 2.5.1 ゼブラフィッシュの膜ヒレ再生



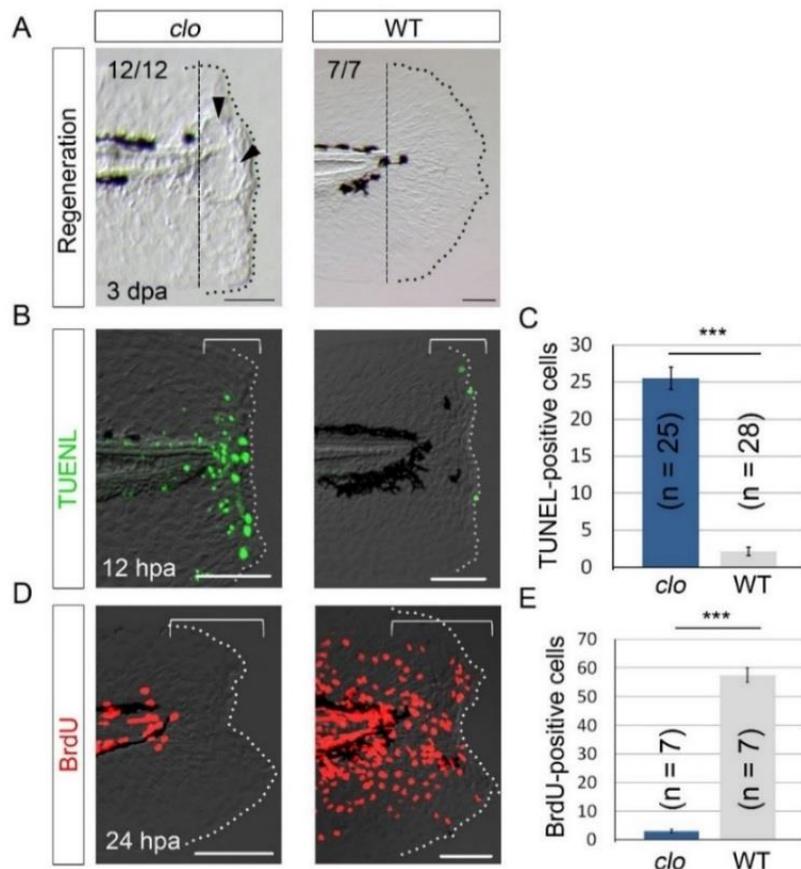
(A) 膜ヒレの再生過程を示した模式図。膜ヒレの切断後、傷口の閉鎖、間葉細胞の変形(再生細胞の誘導)、傷上皮の形成、膜ヒレ細胞の増殖を経て再生が完了する。

Figure 2.5.2 ゼブラフィッシュの血球分化



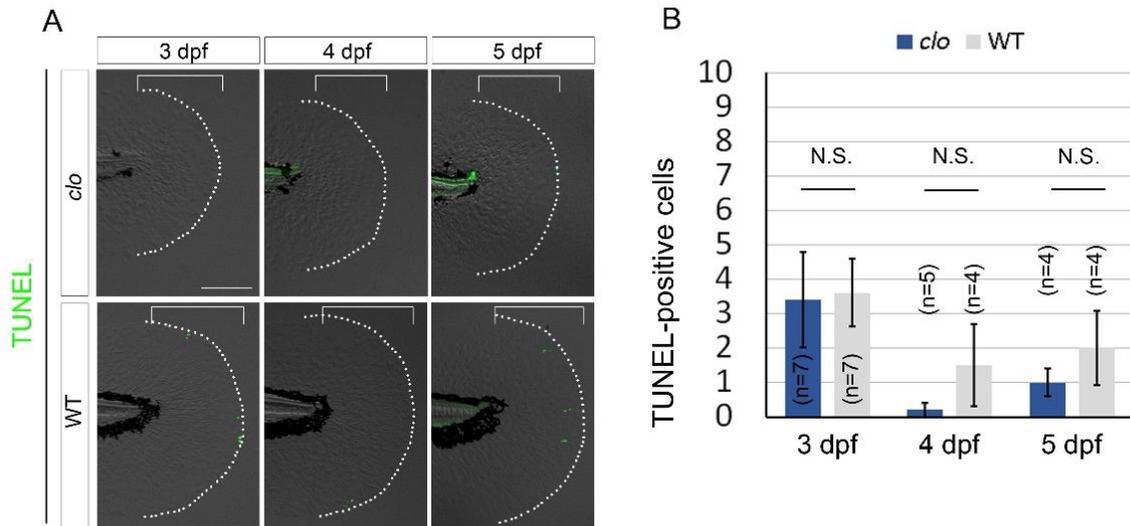
(A) 文献[76]を参考に作成。ゼブラフィッシュの血球分化の模式図。受精二日後のステージで、ミエロイド細胞、血小板、リンパ球、赤血球、血管内皮細胞といった、血球血管細胞を保持している。*clo*、*scl* 遺伝子はともに **Hemangioblast** への分化に必要な遺伝子である。また、*spi1b*、*gata1* はそれぞれミエロイド細胞、赤血球への分化に必要な遺伝子である。

Figure 2.5.3 *clo* の膜ヒレ再生不全



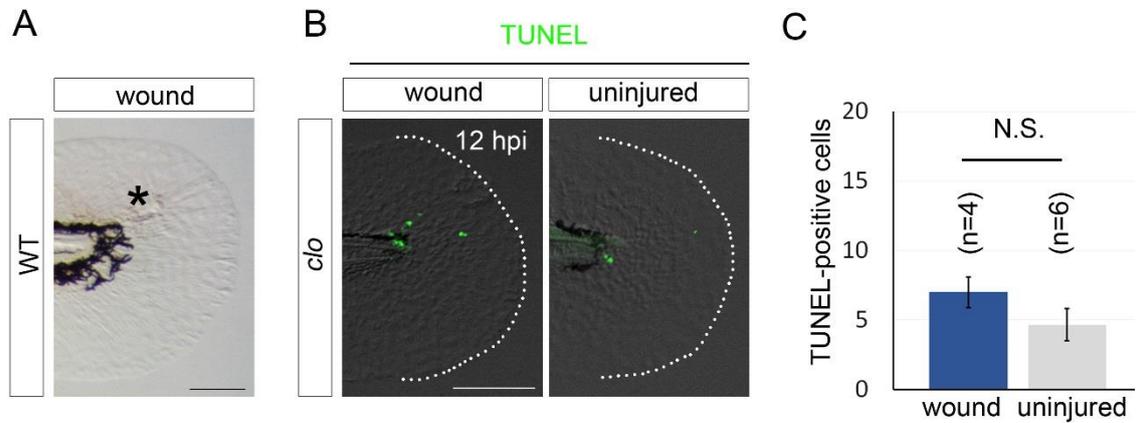
(A) 膜ヒレ再生実験。 *clo* は明らかな再生不全を示した。矢頭は *clo* の再生ヒレに特徴的な水腫様の組織を示している。(B) TUNEL 染色による細胞死の解析。野生型では数少ない細胞死しか検出されなかった一方で、 *clo* において多くの細胞死が観察された。(C) (B)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。(D) BrdU の取り込みによる細胞増殖解析。野生型では再生領域において数多くの細胞増殖が検出された一方で、 *clo* においてはほとんど細胞増殖が検出されなかった。(E) (D)の括弧で示された再生領域における細胞増殖の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。破線は膜ヒレの切断面を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. dpa, days post amputation. hpa, hours post amputation. スケールバーは 50 μm を示す。

Figure 2.5.4 発生中の膜ヒレにおける細胞死



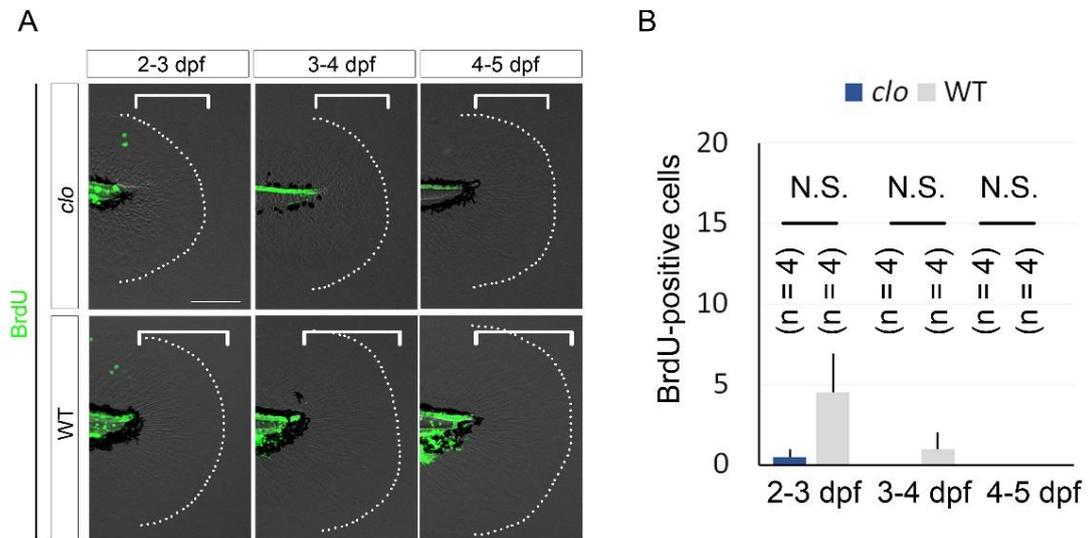
(A) *clo* と野生型における発生中の TUNEL 染色。野生型、*clo* ともに細胞死はあまり検出されなかった。スケールバーは 100 μm を示す。(B) (A)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。N.S., not significant. dpf, days post fertilization.

Figure 2.5.5 *clo* の膜ヒレ損傷時の細胞死



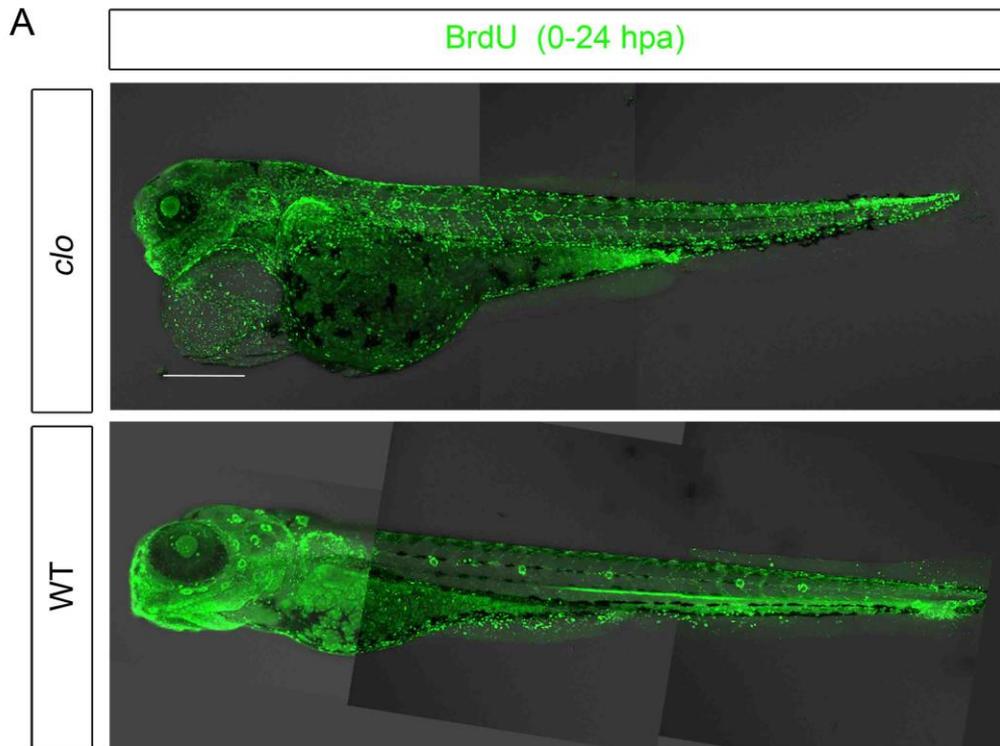
(A) 膜ヒレ損傷直後の明視野像。アスタリスクは損傷部位を示す。(B) *clo* における膜ヒレ損傷後の TUNEL 染色。膜ヒレ損傷後も細胞死の増加は検出されなかった。(C) (B)における細胞死の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。N.S., not significant, hpi, hours post injury. スケールバーは 100 μ m を示す。

Figure 2.5.6 発生中の膜ヒレにおける細胞増殖



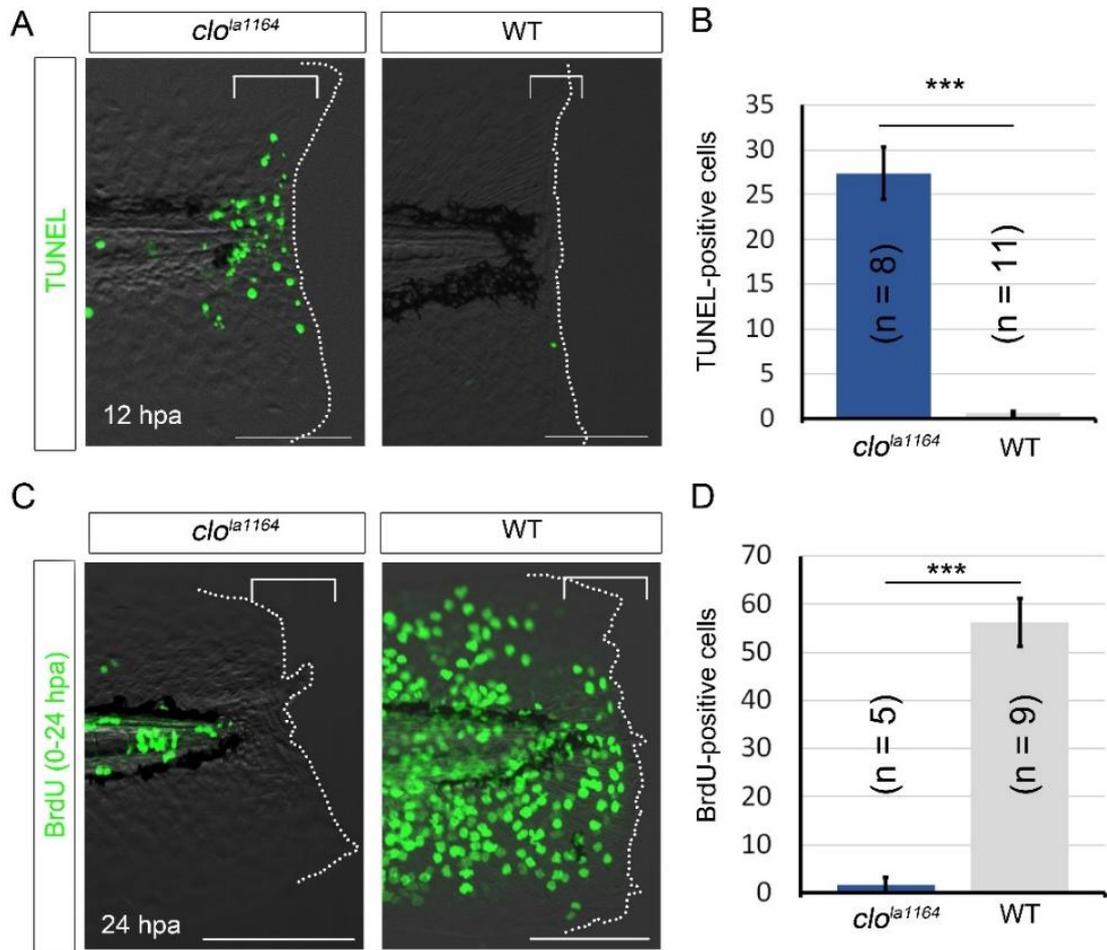
(A) BrdU の取り込みによる、発生中の膜ヒレの細胞増殖の検出。 *clo* も野生型も活発な細胞増殖は検出されなかった。スケールバーは 100 μm を示す。(B) (A)の括弧で示された領域における細胞増殖の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. dpf, days post fertilization. N.S., not significant.

Figure 2.5.7 *clo* と野生型の全身の細胞増殖



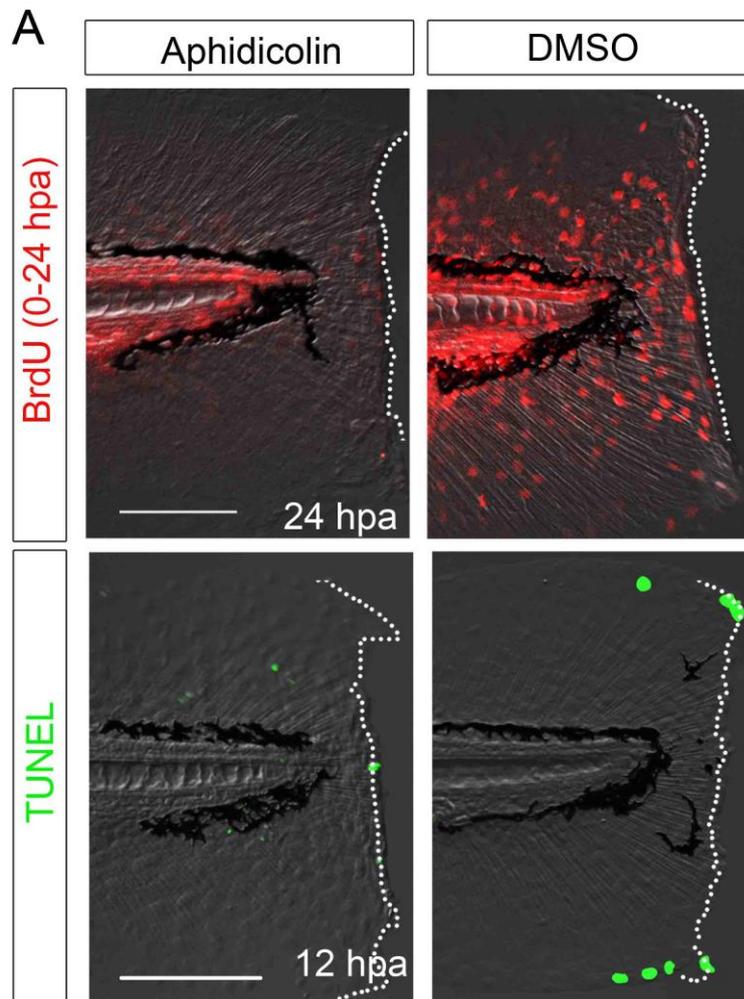
(A) (平成 22 年度卒 中島照広氏が作成) *clo* と野生型における 0-24 hpa の BrdU の取り込みによる細胞増殖の検出。*clo* においても野生型と同様に、全身で細胞増殖が検出された。スケールバーは 300 μm を示す。

Figure 2.5.8 *clo* (*la1164*)における膜ヒレ再生の表現型



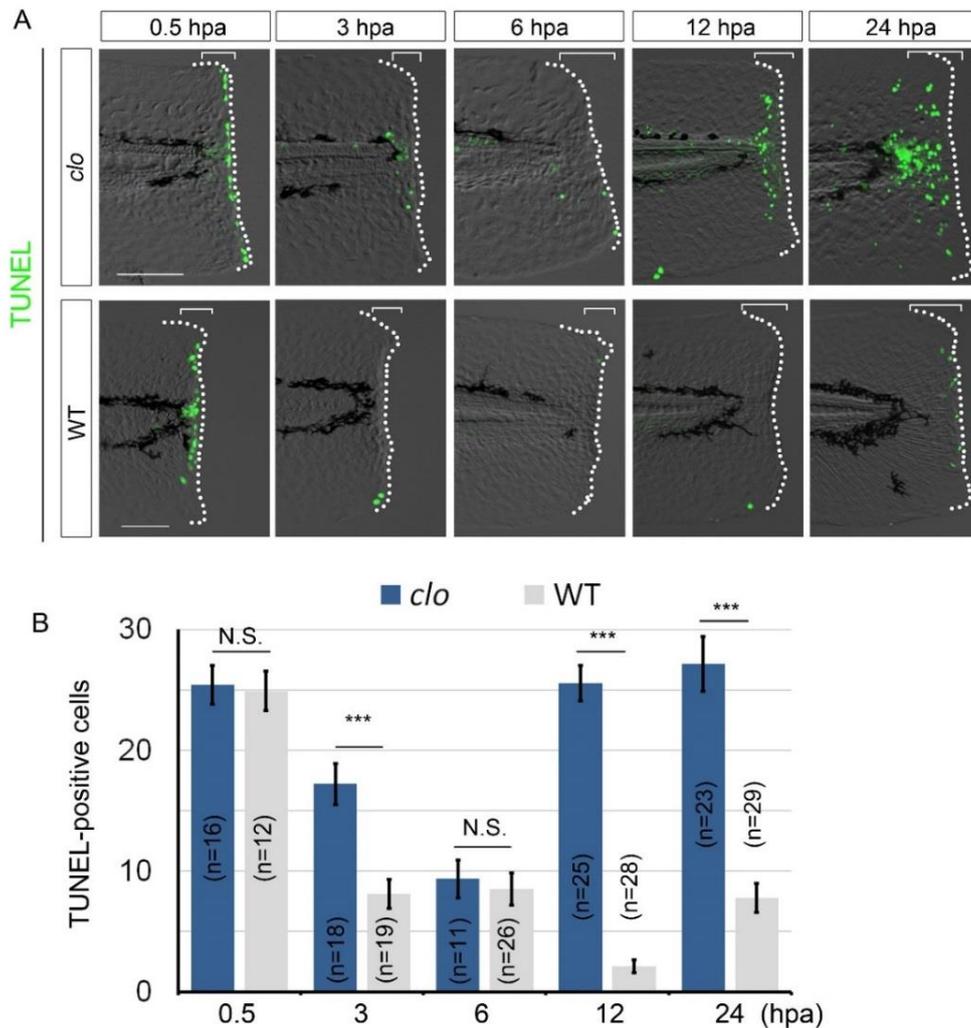
(A) *clo*^{la1164} と野生型の TUNEL 染色。野生型では数少ない細胞死しか検出されなかった一方で、*clo*^{la1164} において多くの細胞死が観察された。(B) (A)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。(C) *clo*^{la1164} と野生型の BrdU の取り込みによる細胞増殖解析。野生型では再生領域において数多くの細胞増殖が検出された一方で、*clo*^{la1164} においてはほとんど細胞増殖が検出されなかった。(D) (C)の括弧で示された再生領域における細胞増殖の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。****p* < 0.001. hpa, hours post amputation. スケールバーは 100 μ m を示す。

Figure 2.5.9 膜ヒレ再生中の細胞増殖を阻害した胚における細胞死



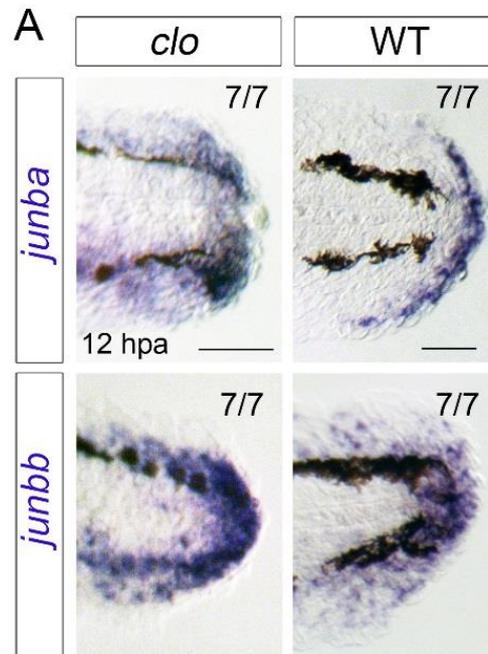
(A) 細胞増殖の阻害剤である Aphidicolin を投与した野生型における、TUNEL 染色と BrdU 染色。Aphidicolin は細胞増殖を抑制した一方で、細胞死は誘導しなかった。スケールバーは 100 μm を示す。点線は膜ヒレの輪郭を示す。hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.10 *clo* と野生型の膜ヒレ再生中における細胞死の経時変化



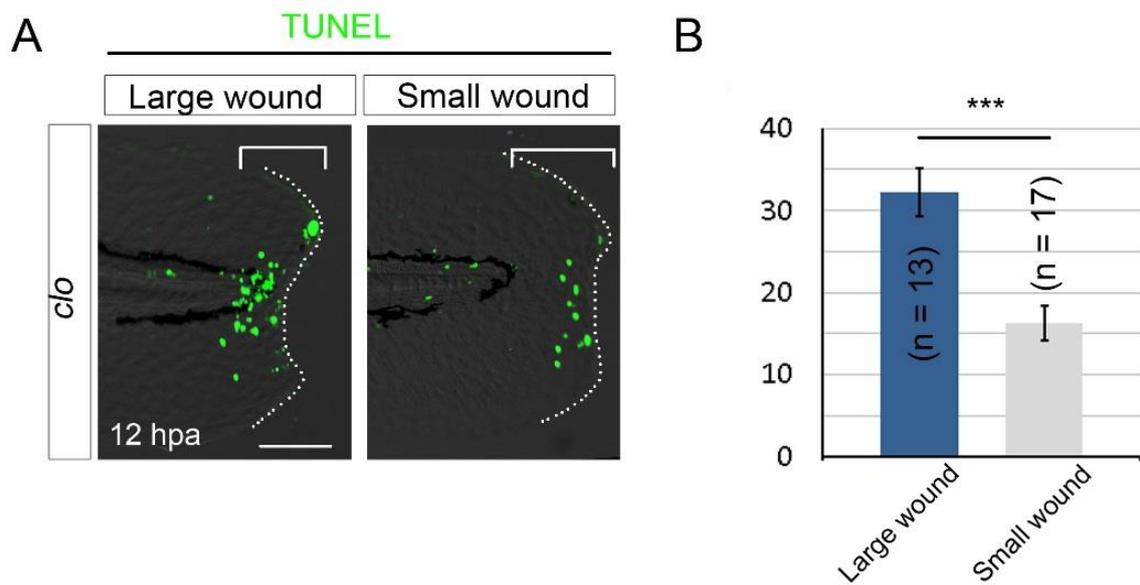
(A and B) (平成 22 年度卒 中島照広氏と共同で作成) (A) *clo* と野生型の膜ヒレ再生中の TUNEL 染色。*clo*、野生型ともに切断直後は多くの細胞死が検出されたが、野生型では時間とともに減少した。一方 *clo* においては、一度細胞死の数が減少した後、切断 12 時間前後から再び増加した。スケールバーは 100 μ m を示す。(B) (A) の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. N.S., not significant. hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.11 *clo* と野生型における再生関連遺伝子の発現



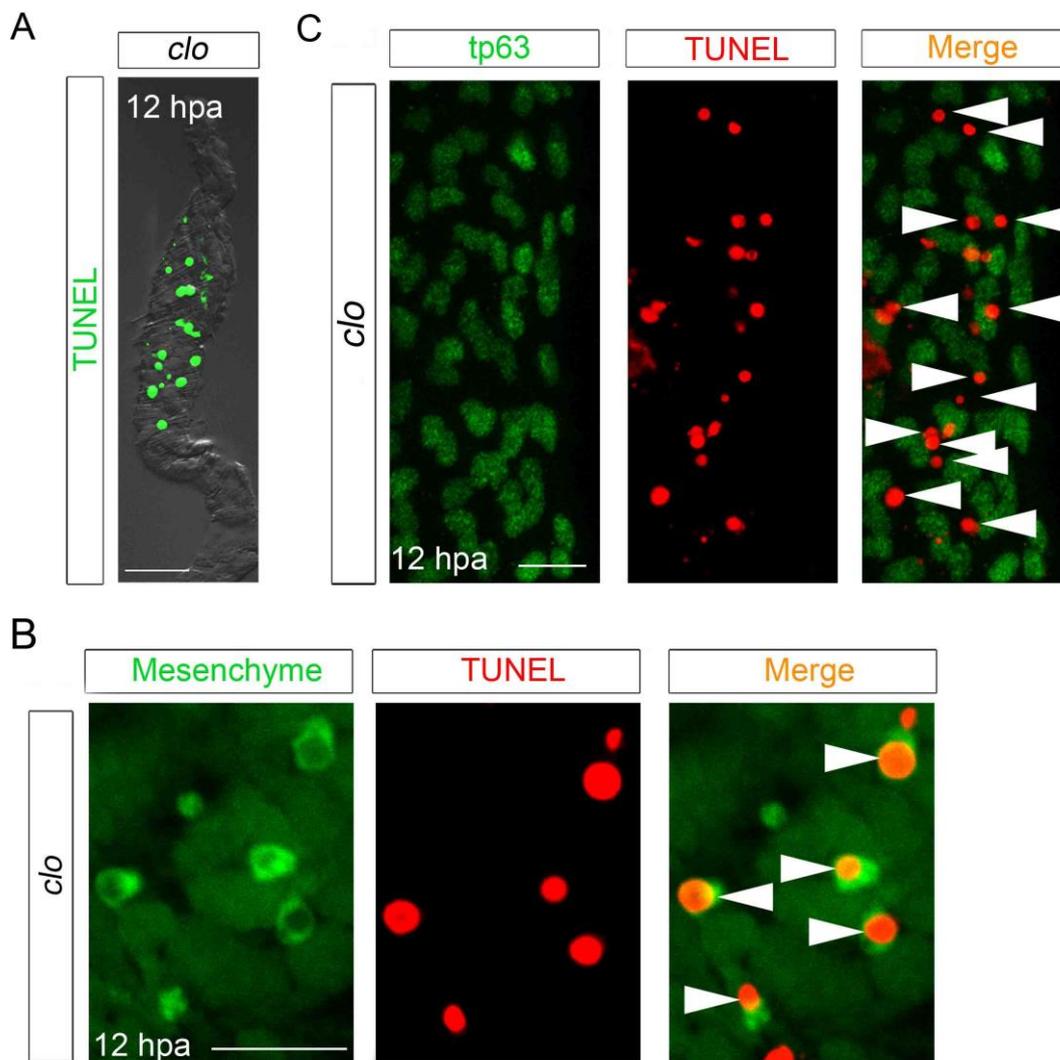
(A) *junba* と *junbb* プローブを用いた ISH 解析。 *clo* においても、それぞれ傷上皮と再生細胞マーカーである *junba*、*junbb* の強い発現が検出された。スケールバーは 50 μm を示す。hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.12 *clo* における膜ヒレ再生と細胞死の関連性の解析



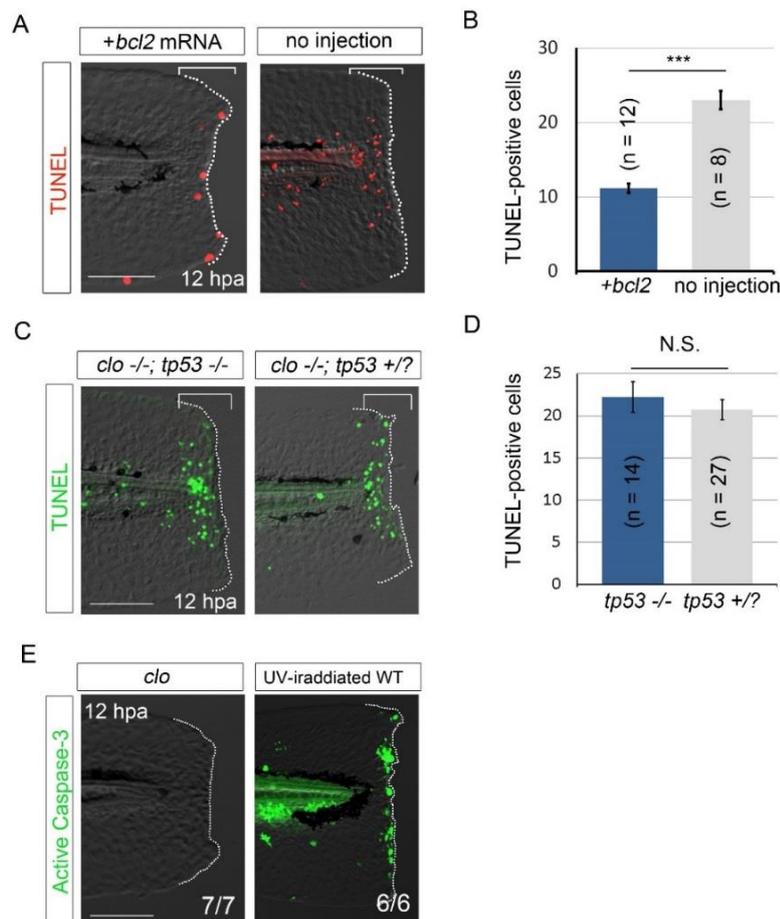
(A) *clo* の膜ヒレ再生中の TUNEL 染色。深い切断は脊索末端から切断面までの距離が 50 μm 以内のものであり、浅い切断は 50 μm 以上のものである。深く膜ヒレを切断した胚のほうが、浅く切断された胚よりも多くの細胞死を示した。スケールバーは 50 μm を示す。(B) (A)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.13 *clo* における細胞死の組織学的解析



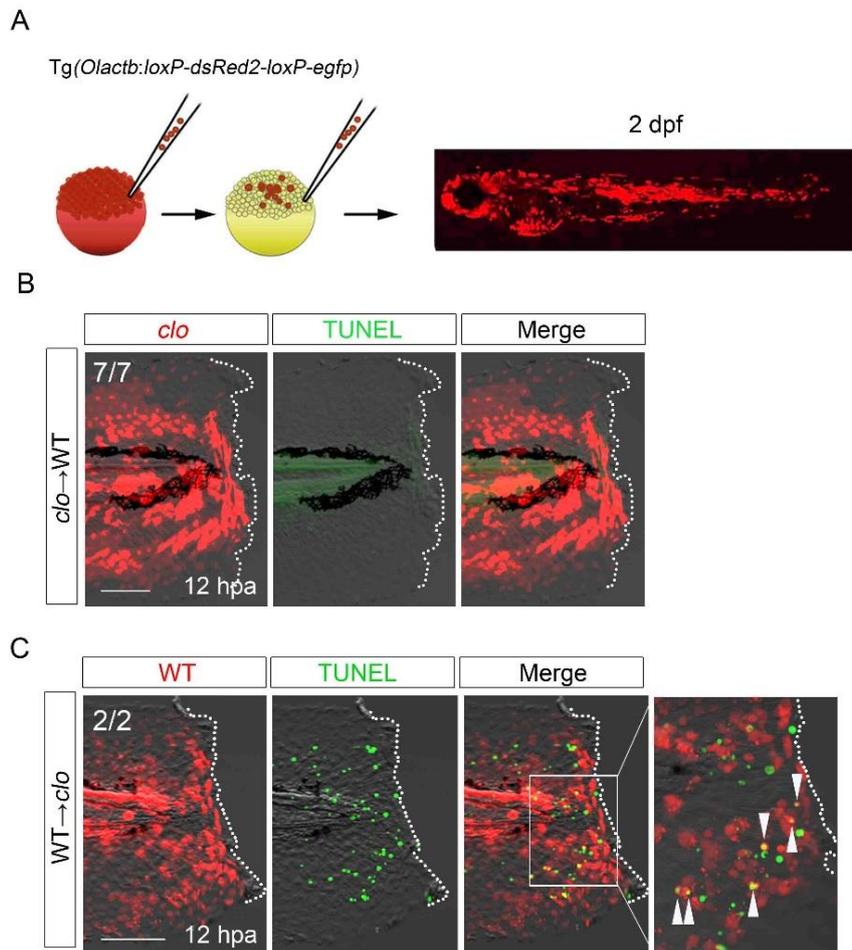
(A) TUNEL 染色を施した *clo* の膜ヒレの横断面切片。組織の中央部で細胞死が起きている。スケールバーは 50 μm を示す。(B) *clo* の膜ヒレの TUNEL 染色と tp63 の抗体染色。多くの TUNEL 陽性細胞は p63 陰性であった。白矢頭は TUNEL 陽性かつ tp63 陰性の細胞を示す。スケールバーは 10 μm を示す。(C) ET37 系統の *clo* の膜ヒレの TUNEL 染色。白矢頭は TUNEL 陽性かつ EGFP 陽性の細胞を示す。スケールバーは 10 μm を示す。hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.14 *clo* における細胞死経路の解析



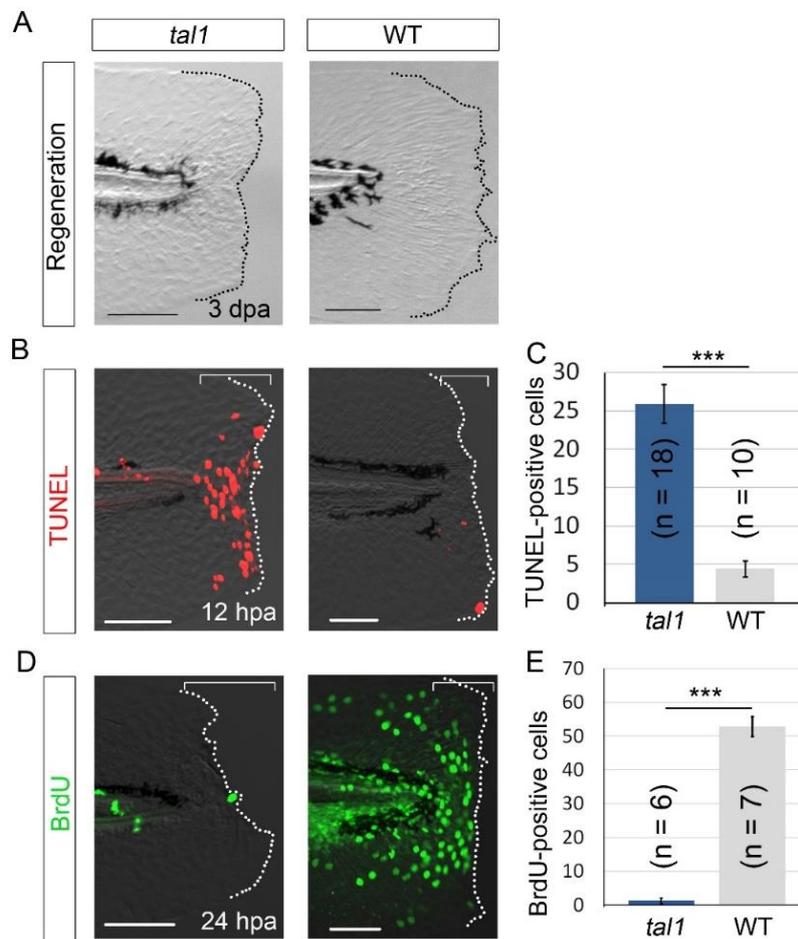
(A) *egfp-zbcl2* の mRNA をインジェクションした *clo* の TUNEL 染色。mRNA をインジェクションされた個体において、細胞死の減少が観察された。(B) (A)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。(C) (平成 22 年度卒 中島照広氏が作成) *clo* と *tp53* 変異体の二重変異体における TUNEL 染色。二重変異体においても細胞死の数に変化は見られなかった。(D) (C)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。(E) *clo* と UV を照射された野生型における活性型 Caspase 3 の抗体染色。*clo* の膜ヒレでは Caspase 3 の活性化は検出されなかった。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. N.S., not significant. hpa, hours post amputation. スケールバーは 100 μm を示す。

Figure 2.5.15 *clo* の細胞死の細胞自律性の解析



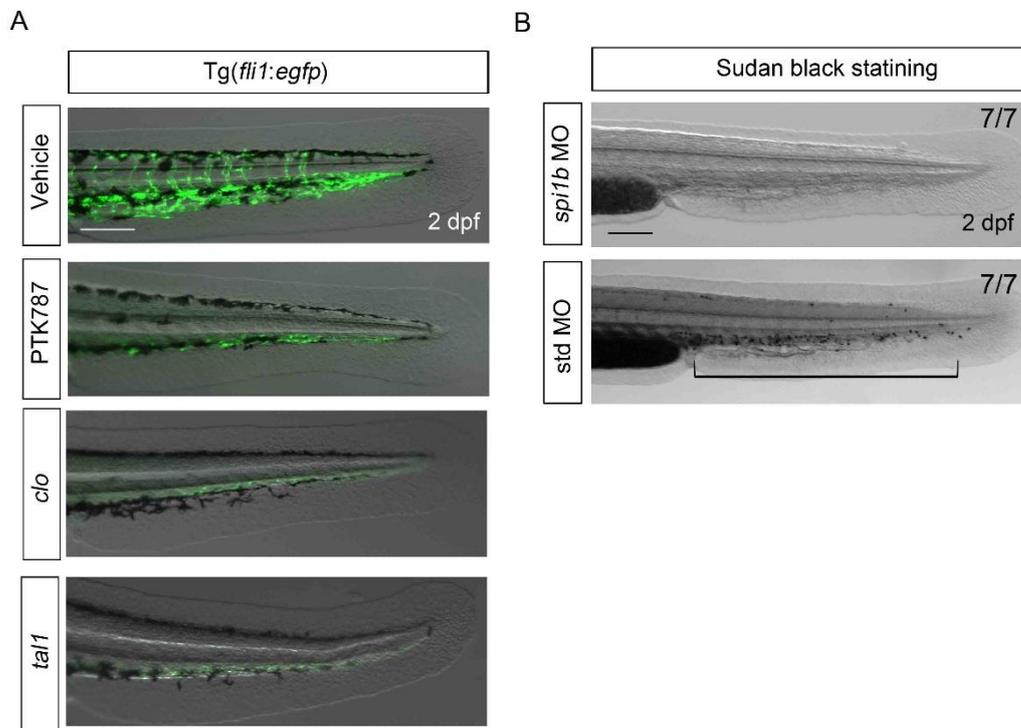
(A) 細胞移植実験の概略図。ユビキタスに DsRed2 を発現するドナー細胞を、ドームステージの受精卵から吸い取り、同じくドームステージの蛍光タンパクを発現しないホスト胚に移植した。(B) DsRed2 を発現する *clo* の細胞を野生型のホスト胚に移植した例。多くの *clo* 由来の細胞が膜ヒレに存在しているにもかかわらず、TUNEL 陽性細胞は存在しなかった。(C) DsRed2 を発現する野生型の細胞を *clo* のホスト胚に移植した例。多くの細胞死が検出され、そのうちのいくつかの細胞は DsRed2 を発現する野生型の細胞であった。白い矢頭は DsRed2 陽性かつ TUNEL 陽性の細胞を示す。点線は膜ヒレの輪郭を示す。hpa, hours post amputation. スケールバーは 100 μm を示す。

Figure 2.5.16 *tal1* の膜ヒレ再生不全



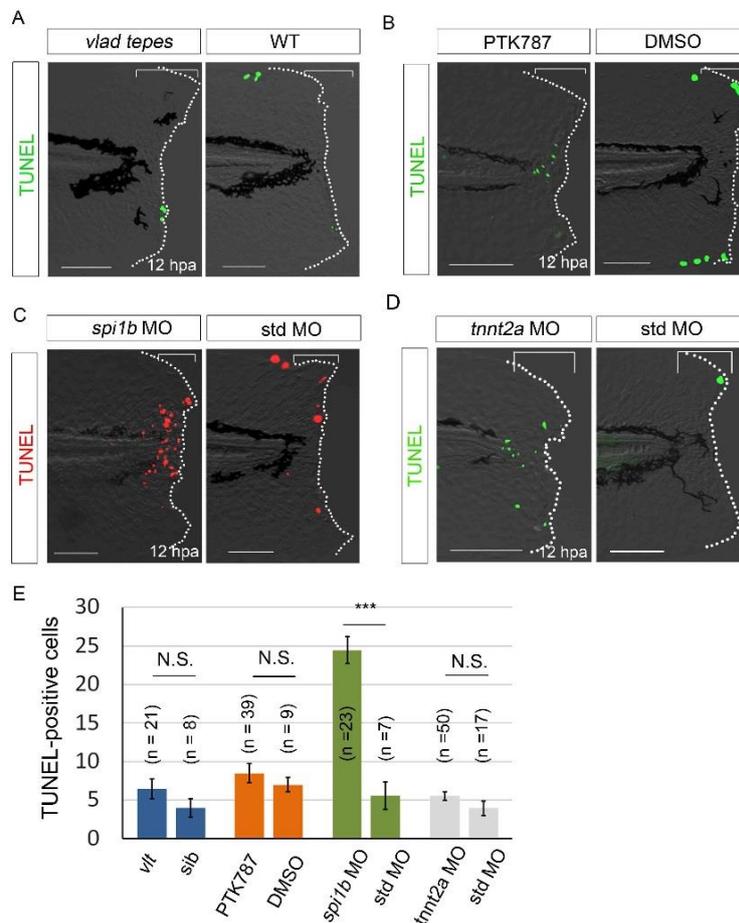
(A) 膜ヒレ再生実験。 *tal1* において明らかな再生異常が観察された。(B) TUNEL 染色による細胞死の検出。野生型では数少ない細胞死しか検出されなかった一方で、 *tal1* において多くの細胞死が観察された。(C) (B)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。(D) BrdU の取り込みによる細胞増殖解析。野生型では再生領域において数多くの細胞増殖が検出された一方で、 *tal1* においてはほとんど細胞増殖が検出されなかった。(E) (D)の括弧で示された再生領域における細胞増殖の定量解析。スケールバーは 50 μm を示す。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.17 PTK787 および *sp1b* MO の評価



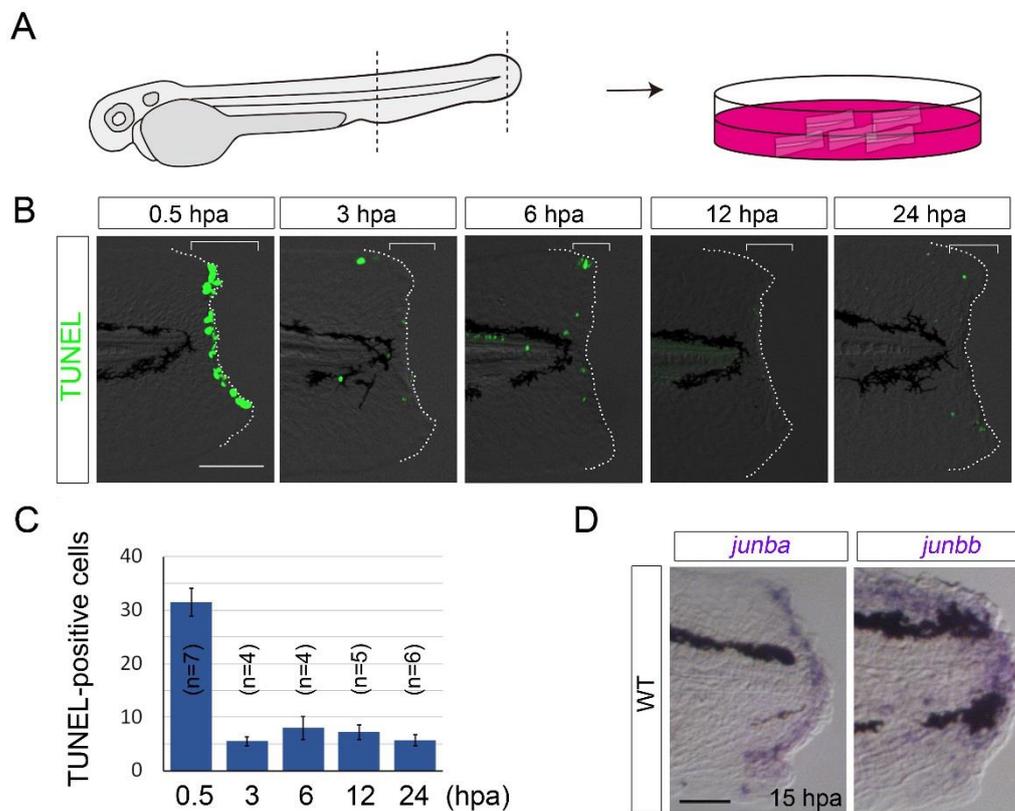
(A) *Tg(fli1:egfp)*を用いた血管形成の観察。VEGF 受容体の阻害剤である PTK787 を投与された *Tg(fli1:egfp)*は *clo* や *tal1* と同様に、血管形成が行われていないことが観察された。スケールバーは 200 μm を示す。(B) *spi1b* モルファントとコントロールモルファントの Sudan black 染色。コントロールモルファントに比べて、好中球の著しい減少が検出された。括弧は好中球が豊富な領域をしめす。スケールバーは 200 μm を示す。dpf, days post fertilization.

Figure 2.5.18 血流、血球、血管組織の膜ヒレ再生中の細胞死への影響



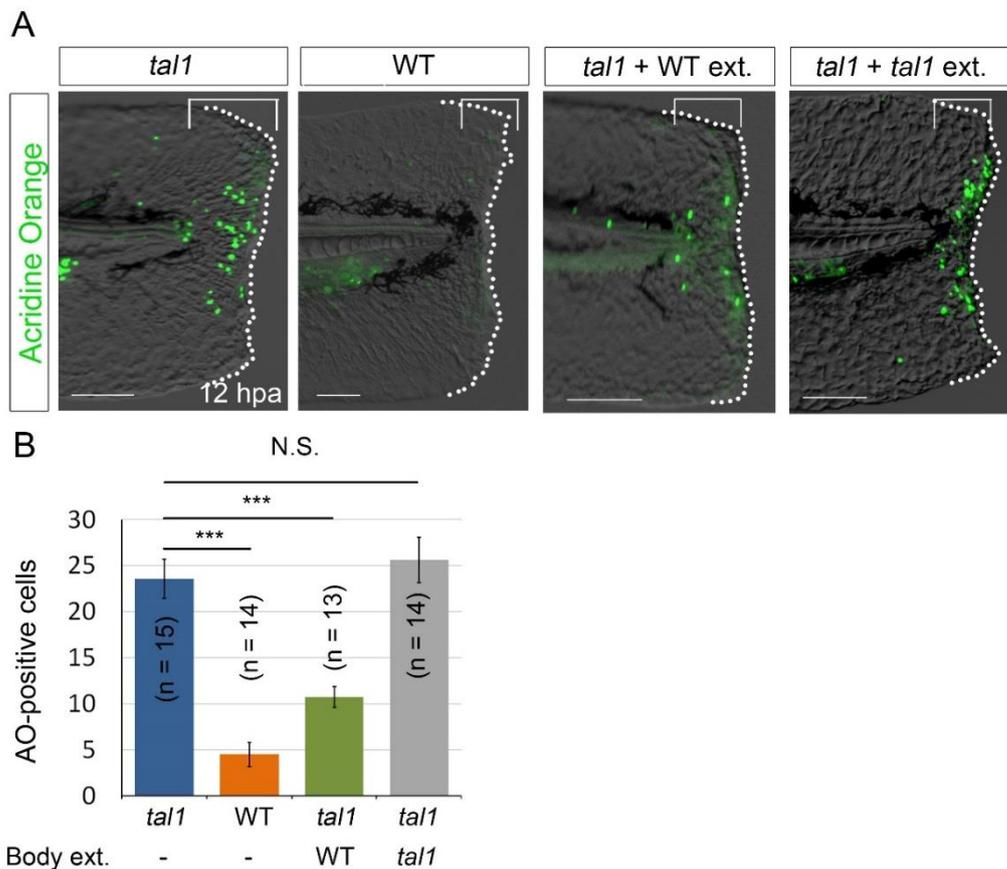
(A) *vlad tepes* 変異体と野生型の TUNEL 染色。どちらにおいても際立った細胞死は検出されなかった。(B) VEGF 受容体の阻害剤である PTK787 を投与した野生型と DMSO を投与した野生型の TUNEL 染色。どちらも多くの細胞死を示さなかった。(C) *spi1b* モルファントとコントロールモルファントの TUNEL 染色。*spi1b* モルファントにおいて、多くの細胞死が検出された。(D) *tnnt2a* モルファントとコントロールモルファントの TUNEL 染色。どちらにおいても細胞死はほとんど検出されなかった。(E) (A-D)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. N.S., not significant. hpa, hours post amputation. スケールバーは 50 μm を示す。

Figure 2.5.19 外植体における膜ヒレ再生の初期応答



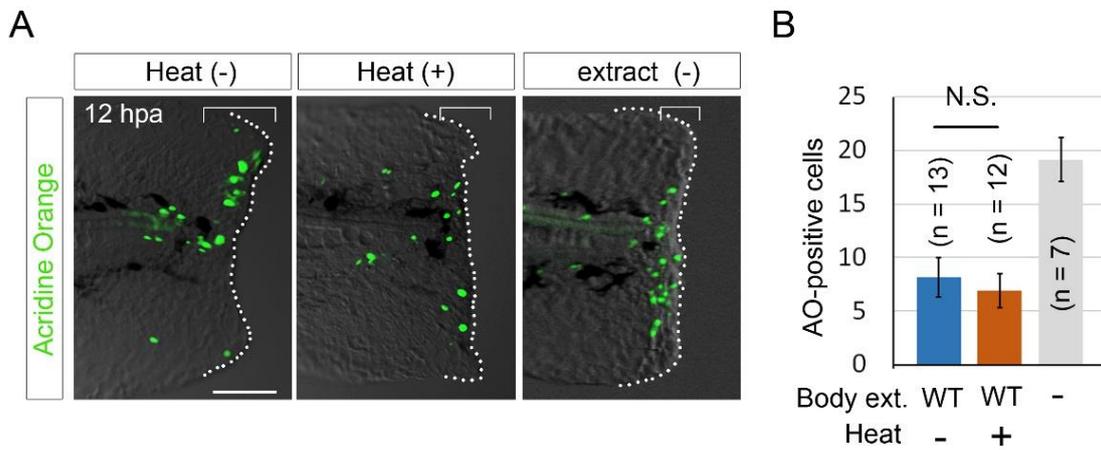
(A)外植体の培養方法の概略図。膜ヒレと肛門の尾部側を同時に切断し、ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシンを含んだ L-15 medium で培養した。(B) 野生型の外植体の TUNEL 染色。通常膜ヒレ再生と同様に、切断直後は多くの細胞死が誘導されたが、その後は細胞死の数が減少した。スケールバーは 150 μm を示す。(C) (B)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。(D) 野生型の外植体の ISH 解析。*junba*, *junbb* ともに発現が見られた。スケールバーは 50 μm を示す。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。 hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.20 体液中の再生細胞生存因子の活性評価



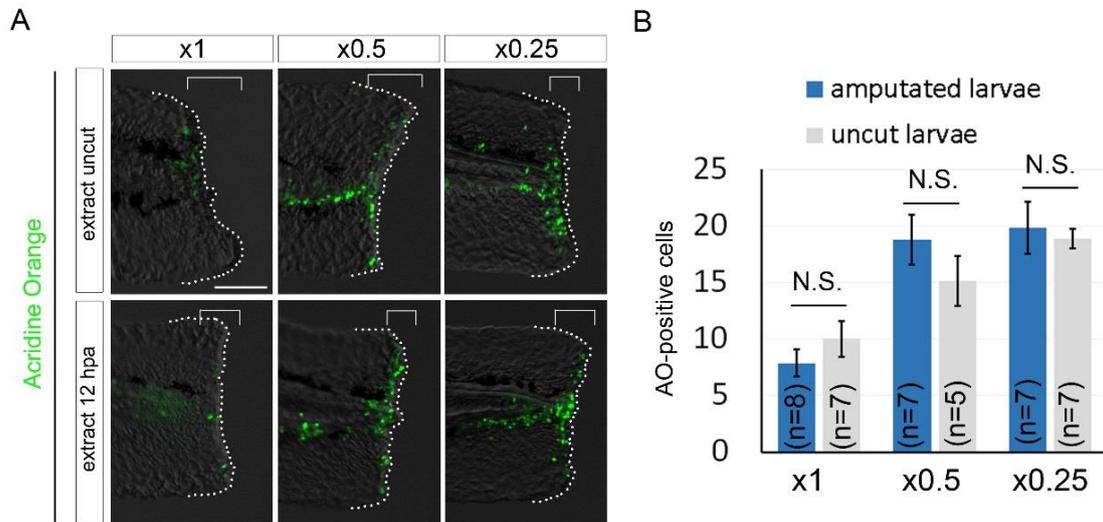
(A) *tal1* と野生型の外植体の Acridine Orange 染色。*tal1* の外植体は野生型に比べて多くの細胞死を示した。しかし、野生型の体液を培養液に加えると、*tal1* の外植体において細胞死の減少が見られた。一方で、*tal1* の体液を培養液に加えても、*tal1* の外植体の死細胞数に変化は見られなかった。スケールバーは 100 μm を示す。(B) (A)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. N.S., not significant. ext., Extract. AO, Acridine Orange. hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.21 再生細胞生存因子の熱耐性の解析



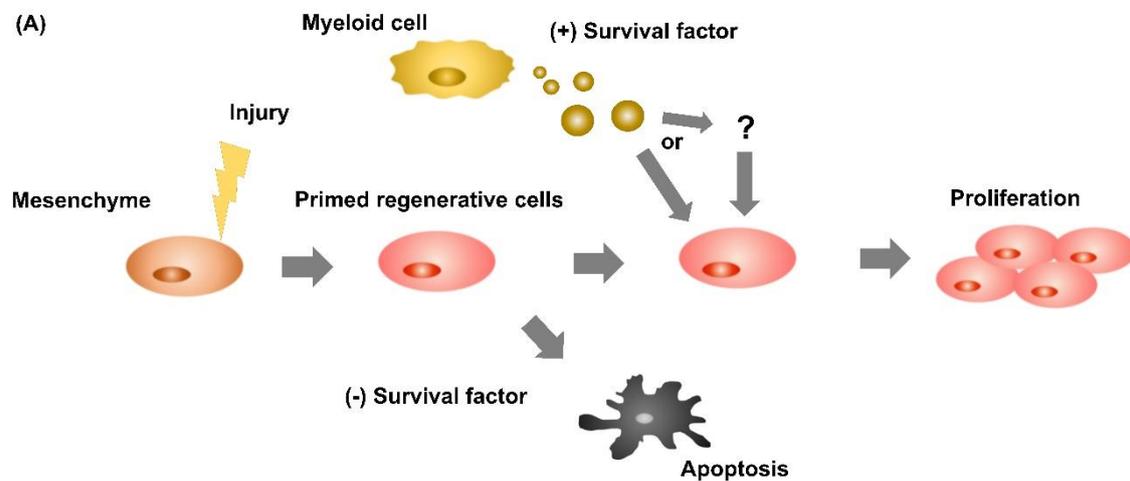
(A) *tal1* の外植体の Acridine Orange 染色。熱処理の有無に関わらず、野生型の体液を培養液に加えられた *tal1* の外植体では細胞死の減少が見られた。スケールバーは 100 μm を示す。(B) (A)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。N.S., not significant. ext., Extract. hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.22 膜ヒレ再生と再生細胞生存因子の量の関連性の解析



(A) *tal1* の外植体の Acridine Orange 染色。膜ヒレの切断の有無に関わらず、野生型由来の体液は *tal1* の外植体では細胞死をレスキューした。また、体液の濃度を薄めると細胞死をレスキューする効果が減少した。スケールバーは 100 μm を示す。(B) (A) の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。点線は膜ヒレの輪郭を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。N.S., not significant. hpa, hours post amputation.

Figure 2.5.23 まとめ



(A) 本研究結果の概略図。間葉細胞は、傷害シグナルを受けて活性化し、再生細胞になる。再生細胞はミエロイド細胞から直接的、もしくは間接的に再生細胞生存因子を受け取ることで生存、増殖することができる。もし、再生細胞生存因子を受け取ることが出来なかった場合はアポトーシスを起こす。

第3章 Interleukin 1b (Il1b) の膜ヒレ再生における機能

3.1 序論

3.1.1 炎症反応の機構

組織損傷後のサイトカインの放出に始まり、ミエロイド細胞の損傷部位への遊走、病原菌や死細胞の駆除、組織の修復という一連の反応を炎症反応と言う。ミエロイド細胞は組織が損傷を受けた後、微生物や病原体から生体を保護する機能を持つ。炎症反応を司る主要なミエロイド細胞として、好中球とマクロファージがある。組織が損傷を受けると、まず、好中球が損傷箇所に遊走し、活性酸素や抗菌ペプチドを分泌し、外敵を攻撃する[102]。少し遅れてマクロファージが遊走し、細菌の除去や死細胞の貪食を行った後、抗炎症性サイトカインや脂質メディエーターを分泌することで、炎症反応を終焉させる。さらに、VEGF や TGF 等のサイトカインの放出により組織修復を促進する。ゼブラフィッシュも哺乳類と非常に類似した炎症、免疫細胞を持っており、マクロファージ、好中球、T cell、B cell の存在が報告されている[103]。加えて、それらの細胞をイメージングする技術や、ノックダウン方法、染色方法も発展しており、ゼブラフィッシュの稚魚を用いた炎症反応分野の研究が盛んである [104,105]。

3.1.2 Il1b の機能

Il1b は炎症促進性のサイトカインであり、prostaglandin-E2 や platelet activating factor, nitric oxide の産生を通して、発熱や血管の拡張を誘導する。さらに、間葉細胞や血管内皮細胞の接着分子の発現を増大させることで、炎症性細胞や免疫細胞の浸潤を促進する [106]。Il1b はマクロファージや樹上細胞、B 細胞、NK 細胞で主に分泌される [106]。il1b はさまざまな脊椎動物間において保存されている遺伝子であり [107]、ゼブラフィッシュでも損傷、感染の際に、主にマクロファージと好中球で発現することが報告されている [108,109]。Il1b の制御不全はさまざまな炎症性疾患の原因となるため、その制御機構

はヒトやマウスで良く研究されている[110]。Il1b は不活性な前駆体として翻訳され、その後 Caspase 1 の切断によって活性型のサイトカインとなる。Caspase 1 の活性化はインフラマソームと呼ばれる酵素によって行われる。活性化 Caspase 1 は分泌型リソソーム内もしくは細胞質において、Il1b の前駆体を切断し、C 末端側が分泌される。しかし、ゼブラフィッシュの Il1b は Caspase 1 による切断配列が存在せず、Caspase a、Caspase b による切断が行われることが報告されているが、明確な活性領域は明らかになっていない[111]。

3.1.3 炎症反応と組織再生

傷の修復や組織、器官の再生に関与するシグナルとして、炎症反応が注目を集めている[112]。炎症反応の再生への影響は動物種や組織によって異なり、明確な答えは出されていない[113]。例えば、ミエロイド細胞を欠損した *pu.1* ノックアウトマウスは、通常のマウスよりも皮膚の傷修復が速く、瘢痕を作らない優れた再生能力を示したのに対し[114]、zebrafish のヒレ再生や脳の再生、axolotl の腕の再生ではマクロファージが必須であることが示唆されている[95,115,116]。zebrafish の膜ヒレ再生モデルを用いた研究も行われており、*spi1b* ノックダウン胚において、膜ヒレ再生に影響がなかったという報告がある一方で[117]、マクロファージは再生に対しプラスの影響を及ぼし、好中球はマイナスの影響を及ぼすという報告もある[94]。また、以上に述べた研究のほとんどが、細胞レベルの解析にとどまっており、具体的にどのような分子が関わっているかは不明な点が数多く残されている。

3.1.4 本研究の目的

第 2 章の研究によって、*clo* が再生細胞において細胞死を起こすのは、ミエロイド細胞を欠損していることが原因であることが明らかになった。しかしながら、どのミエロ

イド細胞が再生細胞の生存に重要で、どのような分子を介して細胞死が起きているのかは不明瞭なままであった。本研究は、*clo* の細胞死の原因を分子レベルで解析し、再生細胞の生存機構を明らかにすることを目的とした。

3.2 結果

3.2.1 *clo* における膜ヒレ再生中の *il1b* の発現

clo における細胞死の分子メカニズムを理解するために、受精二日後の野生型における、膜ヒレ切断 6 時間後の尾部組織と切断していない尾部組織、そして *clo* における、膜ヒレ切断 6 時間後の尾部組織を回収し、トランスクリプトーム解析を行った (Figure 3.5.1 A)。野生型に比べ *clo* では *junba*、*junbb*、*matrix metalloproteinase 9 (mmp9)*、*fibronectin 1b (fn1b)*、*fgf20a*[7.70]等の再生関連遺伝子が強く発現していた。さらに興味深いことに、*il1b*、*tnfb*、*ptgs2a* といった炎症関連遺伝子も、*clo* において強く発現していた。*il1b* の発現は RT-PCR でも再現性が確認された (Figure 3.5.1 B)。*il1b* の下流の遺伝子である *ptgs2a* の発現が上昇していることから [106]、*clo* において *il1b* シグナルが活性化していることが示唆された。さらに、*il1b* の発現を ISH 解析によって時空間的に解析をしたところ (Figure 3.5.2 A and B)、切断直後は野生型、*clo* ともに強い発現が見られた。とくに野生型はミエロイド様の細胞が *il1b* を発現している様子が観察された。野生型においては、切断 6 時間後以降、発現がほとんど見られなかった一方で、*clo* では切断 6 時間後でも半数以上の胚で *il1b* の発現が検出され、切断 12 時間、24 時間後の胚でも一部の胚で *il1b* の発現が検出された。これらの結果から、*clo* では通常より長い炎症反応が起きていることが示唆された。

il1b は細菌感染によっても発現が誘導されることが知られている [106]。そこで、*clo* の膜ヒレ切断後の *il1b* の発現も同様なメカニズムで起こっているのかを知るために、*Salmonella typhosa* の細胞壁の成分である lipopolysaccharide (LPS) をインジェクション

ンすることで、細菌感染モデル実験を行った(Figure 3.5.3 A)[118]。LPS をインジェクションされた野生型の胚では、全身のミエロイド様の細胞で *il1b* の発現が検出されたが、*clo* ではネガティブコントロールと同様に、*il1b* の発現は全く誘導されなかった。このことから、*clo* の膜ヒレでの *il1b* はあくまで傷害により誘導されるものであり、細菌の感染とは別経路であることが示唆された。

3.2.2 再生組織における *il1b* の発現細胞

clo はミエロイド細胞を持たないことを考慮すると、*clo* で *il1b* を発現している細胞はそれ以外の種類の細胞であると考えられる。そこで、*clo* の膜ヒレの凍結切片を作成したところ、上皮細胞で発現していることが観察された(Figure 3.5.6 A)。さらに、*il1b* の発現細胞を詳しく調べるために、bacterial artificial chromosome (BAC) clone である CH211-147H23 の *il1b* の遺伝子座の部分に *egfp-nitroreductase* 融合遺伝子を挿入したコンストラクトを作り、*il1b* のレポーターTg(*il1b:egfp*)を作成した。受精二日後のステージで観察すると、全身の上皮細胞で弱い EGFP の蛍光が見られ、胸鰭と脊索末端で比較的強い EGFP の蛍光が見られた(Figure 3.5.4 A)。この Tg における EGFP の発現が内在性の *il1b* の発現を再現しているかを調べるために、膜ヒレ切断後の *egfp* の発現を調べたところ、*il1b* の発現と同様なパターンを示した(Figure 3.5.4 B)。さらに、LPS をインジェクションすると、EGFP の蛍光がミエロイド様細胞で観察された(Figure 3.5.4 C)。この Tg を使って *clo* と野生型の膜ヒレを切断したところ、*clo* において野生型よりも長期間、強い EGFP の発現が観察された(Figure 3.5.5 A)。これらの結果から、この Tg が内在性の *il1b* の発現を再現していることが確かめられた。

il1b の発現細胞を同定するために、Tg(*il1b:egfp*)において、上皮細胞マーカーである E-cadherin と EGFP の二重抗体染色を行ったところ、EGFP と E-cadherin の局在が一致していた(Figure 3.5.6 B)。この結果から、*clo* における *il1b* 発現細胞は上皮細胞で

あることが明らかになった。

3.2.3 *clo* の細胞死と *Il1b* シグナルの関連性

il1b の発現は炎症反応を誘導し[110]、過剰な炎症反応は、直接的もしくは間接的に細胞死誘導することが知られているため[119]、*clo* における細胞死の原因が *il1b* の過剰発現によるものではないかと推測された。そこで、初めに Tg(*il1b:egfp*) を用いて、*clo* における *il1b* の発現細胞と、アポトーシス細胞の関係を調べたところ、ほとんどの *il1b* の発現細胞はアポトーシスを起こしていないことがわかった(Figure 3.5.7 A)。

次に、*il1b* が *clo* の細胞死を誘導するかを調べるために *il1b* MO を用いた。*il1b* MO の効果を調べるために、*il1b* モルファントにおいて *il1b* の RT-PCR を行ったところ、*il1b* MO はアブノーマルなバンドパターンを誘導したことから、スプライシングを阻害したことが示唆された(Figure 3.5.8 A)[109]。*il1b* モルファントと *std* モルファントで、TUNEL 染色を行ったところ、*il1b* をノックダウンされた *clo* において、細胞死の有意な減少が検出された(Figure 3.5.8 B and C)。

次に、過剰な炎症反応が *clo* の細胞死の原因であることを調べるために、合成グルココルチコイドで、抗炎症作用を持つ dexamethanose(Dex)を使用した。Dex は *il1b* の発現を抑制することが報告されており[120]、実際に、*clo* に Dex を投与したところ、著しい *il1b* の発現減少が ISH により確かめられた(Figure 3.5.9 A)。さらに、膜ヒレ再生中の胚に Dex を投与し、TUNEL 染色を行ったところ、野生型、*clo* ともに細胞死の減少が観察された(Figure 3.5.9 B and C)。これらの結果から、過剰な *il1b* シグナルと、それによって誘導される炎症反応が *clo* の細胞死の原因であることが示唆された。

3.2.6 過剰な Il1b シグナルの細胞死と膜ヒレ再生に対する影響

clo の細胞死の原因が *il1b* の過剰な発現によるものであることを、より確かなものにするために、熱誘導的に *il1b* を発現する pTol2(*hsp70l:mCherry-T2a-il1b*)コンストラクトを作成した。Il1b は不活性型として翻訳され、カスパーゼによる切断を受けて活性化されるが、ゼブラフィッシュにおける明確な切断位置および活性化経路は明らかになっていない[111]。そこで、ヒト Il1b が Caspase 1 によって切断される位置(D116)に対応する、ゼブラフィッシュの Il1b(T124)から、N 末端までの産物を活性型 Il1b と推定した(Figure 3.5.10 C)。さらに、Il1b を恒常的に分泌させるために、N 末にヒト *il1b receptor antagonist* のシグナル配列を加え、*heat shock protein 70l* プロモーターの下流に *mCherry* 配列と共に挿入した(Figure 3.5.10 A) [121,122]。このコンストラクトから得られた Tg(*hsp70l:il1b*)をヒートショックすると、*mCherry* の蛍光と、*il1b* の発現が観察された(Figure 3.5.11 B and D)。

この Tg(*hsp70l:il1b*)に対して、(Figure 3.5.11 A)に示されるプロトコルでヒートショックを行ったところ、いくつかの TUNEL 陽性細胞が、再生中の膜ヒレにおいて検出された(Figure 3.5.11 A and B)。また、12 -24 hpf の胚において(Figure 3.5.12 A)に示されるプロトコルでヒートショックを行ったところ、全身の細胞で細胞死が検出された(Figure 3.5.12 B)。これらの結果から、過剰な *il1b* の発現は細胞死を誘導することが明らかになり、*clo* の細胞死の原因が過剰な *il1b* の発現であることが強く示唆された。

次に、過剰な *il1b* が再生に与える影響を調べるために、Tg(*hsp70l:il1b*)の膜ヒレ再生実験を行った。(Figure 3.5.13 A)に示されるプロトコルでヒートショックを行ったところ、Tg(*hsp70l:il1b*)は、コントロールに比べて再生が有意に阻害された(Figure 3.5.13 A and B)。この結果から、過剰な *il1b* の発現は膜ヒレ再生を阻害することが明らかになった。

3.2.4 マクロファージノックダウンの再生細胞の細胞死への影響

ミエロイド細胞をノックダウンすると、細胞死が誘導されることが明らかになってきたため(Figure 2.5.18)、次のステップとして、どのミエロイド細胞が重要であるかを調べた。受精後二日目におけるミエロイド細胞は、主にマクロファージと好中球に分類されるため、それぞれの分化を阻害できる *irf8* MO と *csf3r* MO を用いた。まず、*csf3r* MO の効果を評価するために、Sudan black 染色を行ったところ、*csf3r* モルファントは、全てのミエロイド細胞への分化を阻害する *spi1b* モルファントと同様に、著しい好中球の減少を示した(Figure 3.5.14 A and B)。次に、*irf8* MO の効果を評価するために、マクロファージから分化するグリア細胞を ISH により検出したところ、*irf8* モルファントでは、ほぼグリア細胞が消失していた(Figure 3.5.14 C)。これらの結果から、*csf3r* MO、*irf8* MO ともに良く機能することがわかった。

これらのモルファントにおける細胞死を調べるために、TUNEL 染色を行ったところ、*spi1b* モルファントと *irf8* モルファントが多く細胞死を示した一方で、*csf3r* モルファントはコントロールと同様に、少ない細胞死しか示さなかったことから(Figure 3.5.15 A and B)、再生細胞の維持にはマクロファージが必要であることが明らかになった。

続いて、それぞれのミエロイド細胞をノックダウンされた胚における *il1b* の発現を ISH によって調べたところ、*spi1b* モルファントと *irf8* モルファントにおいて、切断 6 時間後も *clo* と同様に強い *il1b* の発現が検出された(Figure 3.5.16 A and B)。一方で *csf3r* モルファントはコントロールモルファントと同様に、短く弱い *il1b* の発現パターンを示した(Figure 3.5.16 A and B)。さらに、*spi1b* モルファントと *irf8* モルファントの *il1b* の過剰発現を *il1b* MO もしくは Dex を用いて阻害すると、細胞死がレスキューされた(Figure 3.5.17 A-C)。これらの結果から、マクロファージが *il1b* の発現の抑制に必要であることが示唆され、*irf8* モルファントが多く細胞死を示す原因も、*clo* と同

じく *il1b* の過剰発現であることが示唆された。

3.2.7 通常の *Il1b* シグナルの膜ヒレ再生における機能

これまでの実験から、*il1b* の発現は再生に対して負の影響があることが示されてきたが、炎症反応そのものは再生の開始に必要であるという報告もされてきている [116,117]。そこで、**Dex** を投与された胚の膜ヒレ再生を調べたところ、明らかな再生不全が観察された(Figure 3.5.18 A and B)。さらに、**BrdU** の取り込みによる細胞増殖を調べたところ、有意な細胞増殖の減少が見られた(Figure 3.5.18 C and D)。次に、再生不全の原因を調べるために、再生関連遺伝子の発現を調べたところ、*junba* と *fgf20a* の発現の減少が観察された(Figure 3.5.18 E)。*il1b* モルファントにおいても同じ実験を行ったところ、**Dex** を投与された胚と同様に、膜ヒレ再生の遅延、細胞増殖の低下、再生関連遺伝子の発現低下が観察された(Figure 3.5.19 A-E)。これらの結果から、炎症反応が再生に必要であることが示唆された。

続いて、**Tg(*hsp70l:il1b*)**を用いて、*il1b* を過剰に誘導したときの再生関連遺伝子の発現を調べたところ、再生関連遺伝子である *fn1b*、*junba*、*junbb* が切断されていない膜ヒレに誘導された(Figure 3.5.20 A and B)。これらの実験結果から、*il1b* シグナルは再生関連遺伝子の発現を促すことで、迅速な膜ヒレ再生に貢献していることが明らかになった。

3.2.8 *Il1b* シグナルの成魚の尾ヒレの再生に対する機能

これまでの実験は稚魚の膜ヒレを用いて行ってきたが、*il1b* シグナルの機能が尾ヒレの再生においても保存されているのかを検証した。成魚の **Tg(*hsp70l:il1b*)**を(Figure 3.5.21 A)に示されるプロトコルでヒートショックを行い、尾ヒレを再生させたところ、**Tg** において顕著な再生不全が観察された(Figure 3.5.21 B and C)。さらに、切断

5 日後の時点で TUNEL 染色を行ったところ、有意な細胞死の増加が検出された (Figure 3.5.21 D and E)。これらの結果から *il1b* シグナルの再生における役割は成魚においても保存されていることが明らかになった。

3.3 考察

3.3.1 上皮細胞における *il1b* の発現の意義

炎症応答において、ミエロイド細胞は中心的な役割を持っていることが報告されてきた。*il1b* もこれまでは、メラノーマなどの特殊な細胞を除くと、免疫、炎症細胞で分泌されると考えられてきた[106,123,124]。また、30 年前の *in vitro* の実験において、ヒトのケラチノサイトが *il1b* を発現していることが示唆されていたが、その機能性については不明であった[125]。しかし、本研究により、上皮細胞も機能的な *il1b* を発現していることが明らかになった。注目すべきことに、LPS のインジェクションは、ミエロイド細胞の *il1b* の発現を誘導した一方で、上皮細胞の発現が誘導しなかった。このことから、組織損傷による *il1b* の発現は細菌感染とは異なるメカニズムで、誘導されることが示唆された。どのようなシグナルが上皮の *il1b* の発現を誘導するのかは不明だが、死細胞から放出された分子や[126]、メカニカルストレスが発現のトリガーになっているのかもしれない[127]。

3.3.2 過剰な *il1b* が引き起こす再生組織の細胞死メカニズム

本研究により、長時間の *il1b* の発現とそれによる過剰な炎症反応が、*clo* のアポトーシスの原因であることが明らかになった。細胞死を誘導する詳細なメカニズムは不明だが、候補として Tnf シグナルが挙げられる。Tnf-alpha は Caspase 8 を通じてアポトーシスを誘導することが知られており[128]、実際、*clo* において *caspase 8* と、ゼブラフィッシュの *tnf-alpha* のホモログの一つである *tnfb* が高発現していることがトラ

ンスクリプトームによって明らかになっている(Figure 3.5.1 A)。もしくは、ER ストレスがアポトーシスの原因かもしれない。II1b をラットの β -cells もしくは MIN6 細胞に投与すると ER ストレスが上昇し、JNK 依存的なアポトーシスを誘導することが知られている[129,130]。このように、過剰な ER ストレスが clo におけるアポトーシスを誘導している可能性がある。

3.3.3 過剰な *il1b* の発現を抑制する抗炎症機構

これまでの研究においても、マクロファージが付加再生において、重要な役割を持つことは示唆されていたが[115]、その詳細な分子メカニズムは不明瞭な部分が多く残されていた。本研究により、マクロファージが *il1b* の発現を減弱し、再生細胞の生存を助けるという、ヒレ再生において決定的な役割を持っていることが明らかになった。本研究の結果と一致して、マウスや、サンショウウオにおいてもマクロファージを失った個体では *il1b* の発現が上昇することが報告されている[115,131]。このことから、マクロファージによる *il1b* の転写レベルの抑制という機能は、脊椎動物間で保存されている可能性が示唆された。どのような分子を介して、*il1b* の発現が抑制されているのかは不明だが、IL-10、Tgf β 、lipid mediator 等の、抗炎症作用をもつ分子を介して制御している可能性が考えられる[132,133]。

3.3.4 II1b シグナルが再生関連遺伝子の発現を誘導するメカニズム

本研究によって、*il1b* が迅速なヒレ再生に必要であることが示唆された。先行研究によって、*fn1b*、*junba*、*junbb* が組織損傷に応じて誘導されることが報告されていたが[70]、その上流シグナルについては不明であった。*il1b* の過剰発現 Tg およびノックダウン実験によって、*il1b* がこれらの再生関連遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。加えて、II1b シグナルの再生における機能は、稚魚の膜ヒレ再生だけで

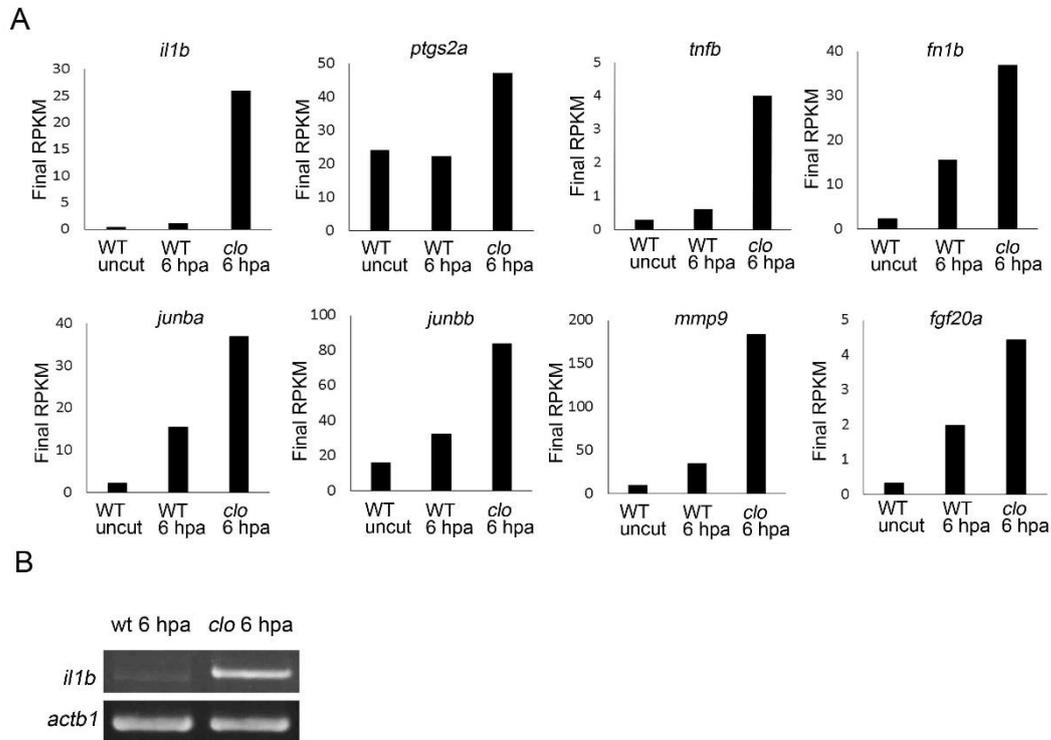
なく、成魚の尾ヒレの再生にも共通していることが明らかになった。

3.4 結論

(Figure 3.5.22 A-D)が示すように、*il1b* の過剰な発現が *clo* の細胞死の原因であり、野生型ではマクロファージによって過剰な *il1b* の発現が抑制されていることがわかった。さらに、*il1b* レポーターTg と ISH 解析により、上皮細胞が *il1b* を発現していることを明らかにした。また、*il1b* シグナルは正常なヒレ再生を、再生関連遺伝子の発現誘導を通して促進することが明らかになった。これらの結果により、ヒレ再生における、*il1b* シグナルを介した炎症反応の新たな機能が明らかになった。

3.5 図表

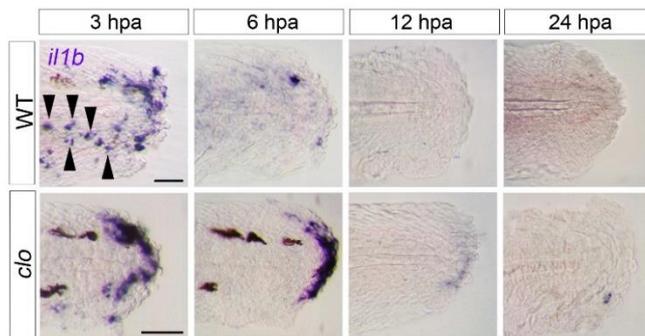
Figure 3.5.1 *clo* と野生型におけるトランスクリプトーム解析



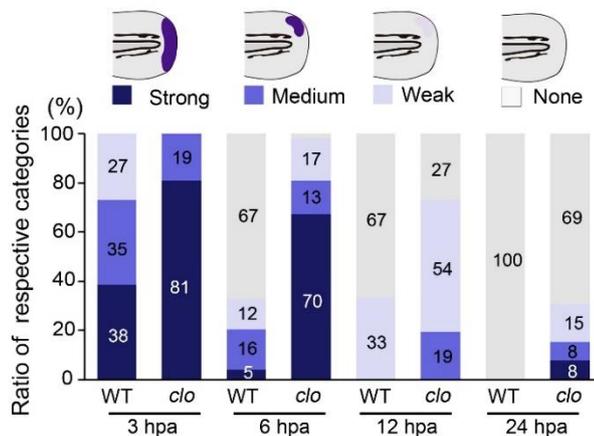
(A) 膜ヒレを切断されてない野生型、切断 6 時間後の野生型、切断 6 時間後の *clo* の尾部のトランスクリプトーム解析。再生関連遺伝子である *fn1b*, *junba*, *junbb*, *mmp9*, *fgf20a* 等が *clo* において強く発現していた。また、*il1b*, *ptgs2a*, *tnfb* 等の炎症関連遺伝子も *clo* において強く発現していた。(B) 切断 6 時間後の野生型、切断 6 時間後の *clo* の尾部の RT-PCR。hpa, hours post amputation. *actb1*, *actinb1*. Final RPKM, the reads per kilobase of exon model per million mapped.

Figure 3.5.2 *clo* と野生型における膜ヒレ再生中の *il1b* の発現

A

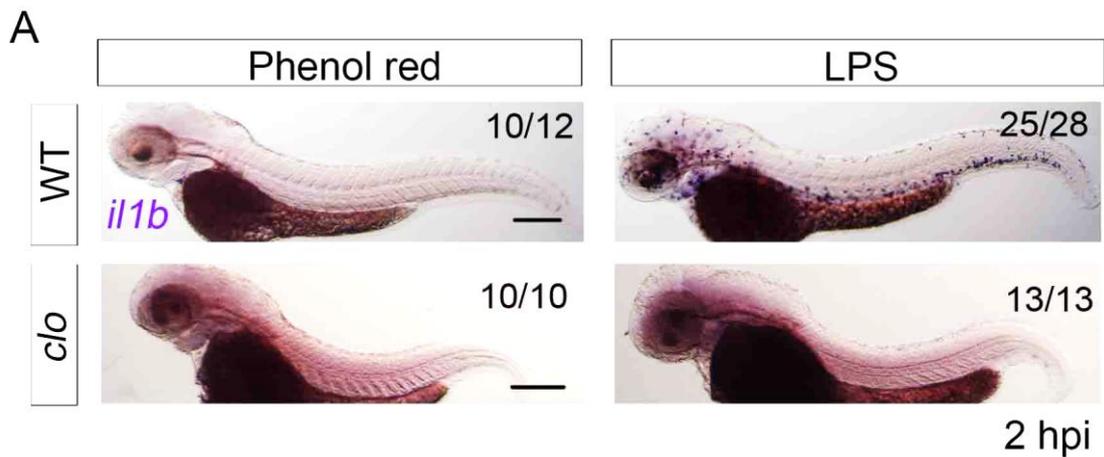


B



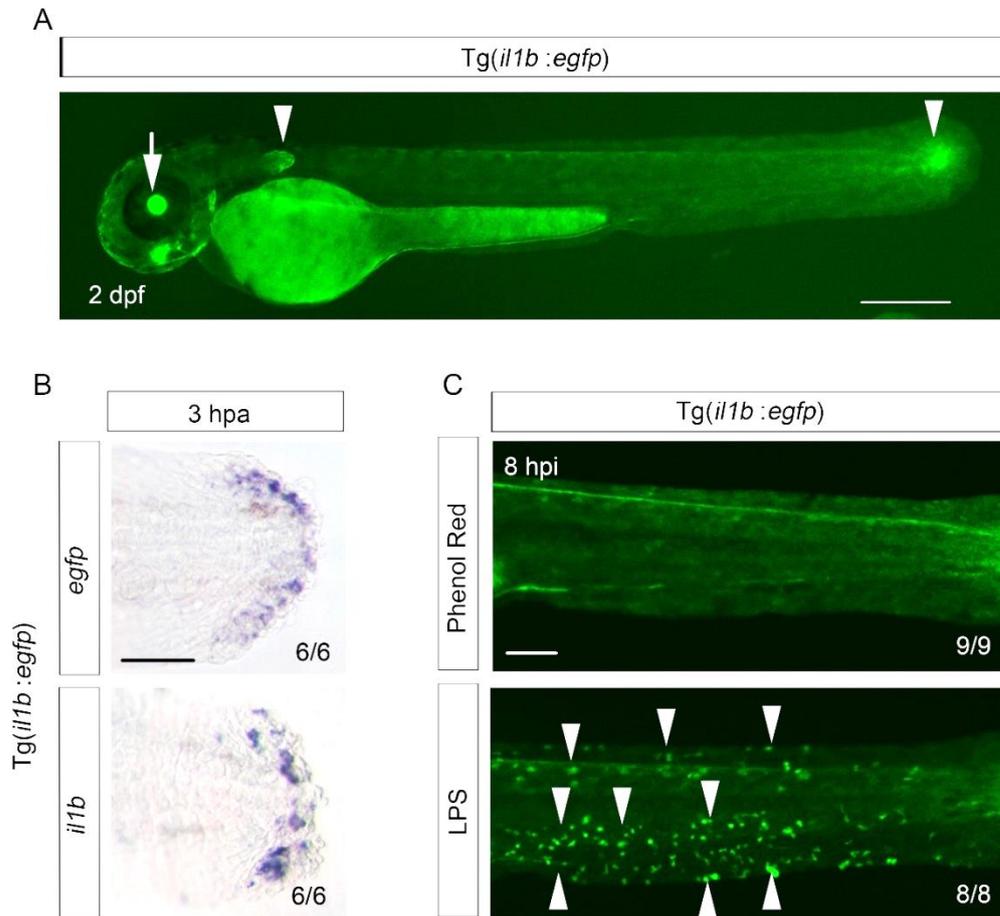
(A) *clo* と野生型の ISH 解析。野生型は、切断 3 時間後においては強い *il1b* の発現を示し、ミエロイド様細胞での発現も検出された。しかし、その後は発現が減少し、切断 12 時間後以降はほとんど検出されなかった。一方で *clo* は切断 6 時間後まで強い *il1b* の発現を維持しており、切断 12 時間後や 24 時間後の胚においても一部の胚で発現が検出された。スケールバーは 25 μm 示す。(B) (A)における ISH 解析の定量化。*il1b* の発現の強さ、領域にしたがって Strong, Medium, Weak, None の 4 つのグループに分類した。Strong は膜ヒレ全体での強い発現した胚、Medium は膜ヒレの一部で強い発現、Weak は膜ヒレの一部で弱い発現、None は発現なしを示す。3 回の独立した実験を元に作成され、それぞれのサンプル数は 13 以上である。hpa, hours post amputation.

Figure 3.5.3 *clo* と野生型における LPS 投与後の *il1b* の発現



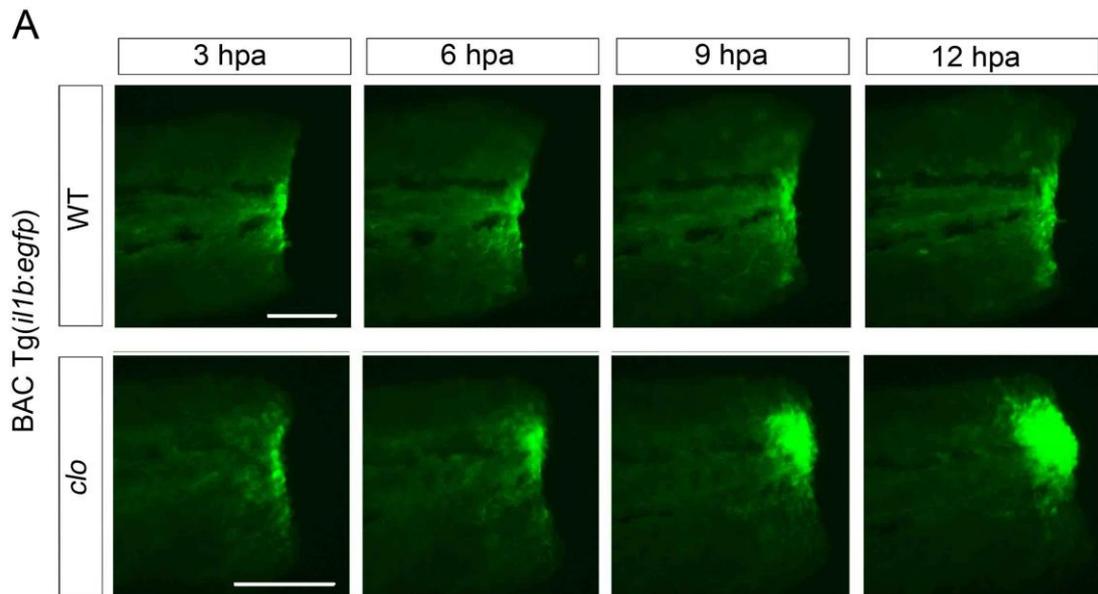
(A) LPS 投与後の *clo* と野生型の *il1b* の ISH 解析。コントロールとして用いた Phenol Red をインジェクションされた胚は、野生型も *clo* も *il1b* の発現を示さなかった一方で、LPS をインジェクションされた野生型は全身のミエロイド様細胞において *il1b* の発現が検出された。しかし、*clo* では LPS のインジェクションは *il1b* の発現を誘導しなかった。スケールバーは 200 μ m を示す。hpi, hours post injection.

Figure 3.5.4 *il1b* レポーターBAC Tg(*il1b:egfp*)の作成



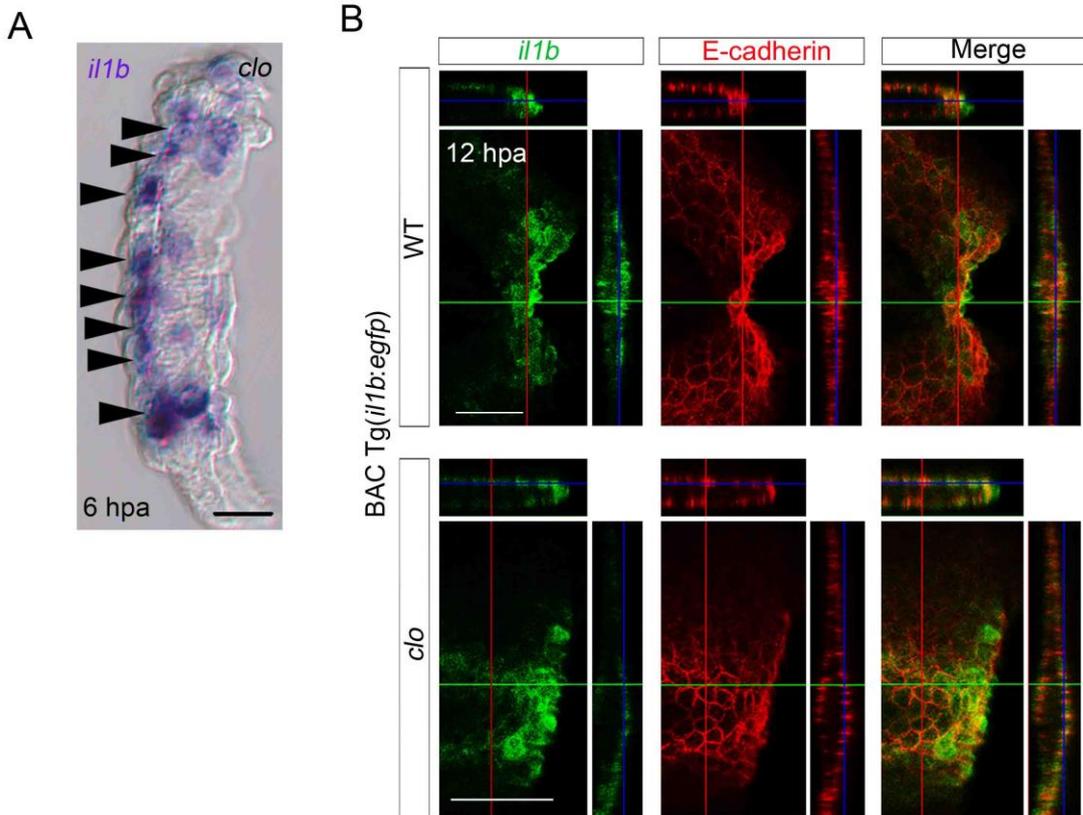
(A) Tg(*il1b:egfp*)の受精二日目胚における EGFP の発現。白矢頭は比較的強い EGFP の発現を示す胸ビレと脊索末端を示す。矢印は *crystalline alpha A* プロモーターで誘導される EGFP の発現。スケールバーは 300 μm を示す。 (B) Tg(*il1b:egfp*)の膜ヒレ切断後の ISH 解析。*egfp* と *il1b* の発現は非常に類似していた。スケールバーは 50 μm を示す。 (C) Tg(*il1b:egfp*)における LPS インジェクション後の EGFP の発現。LPS インジェクション後、全身のミエロイド様細胞において EGFP の蛍光が観察された。白矢頭は EGFP を発現しているミエロイド様細胞を示している。スケールバーは 50 μm を示す。 dpf, days post amputation. hpa, hours post amputation. hpi, hours post injection.

Figure 3.5.5 Tg(*il1b:egfp*)の膜ヒレ再生の経時観察



(A) Tg(*il1b:egfp*)の膜ヒレ再生中における EGFP の発現。野生型は切断後、EGFP の大幅な発現上昇は見られなかったが、*clo* では切断 9 時間後、12 時間後において強い EGFP の蛍光が観察された。スケールバーは 100 μ m 示す。hpa, hours post amputation.

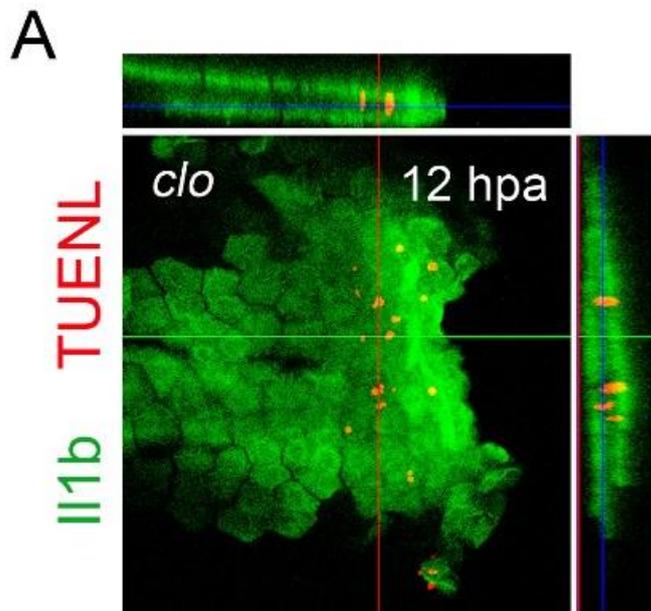
Figure 3.5.6 膜ヒレ再生注の *il1b* 陽性細胞の組織学的解析



(A) ISH を行った *clo* の膜ヒレの横断面切片。 *il1b* は上皮様細胞で発現していた。黒矢頭は *il1b* を発現している細胞を示す。スケールバーは 10 μm を示す。(B)

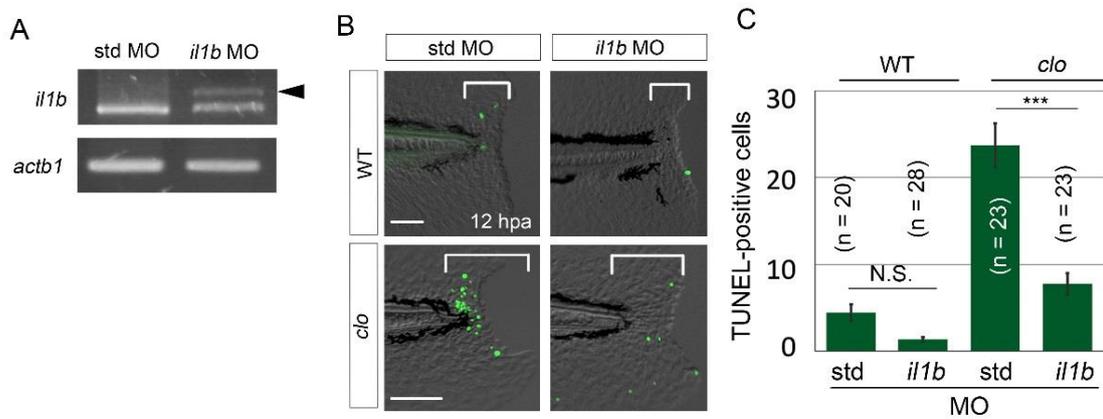
Tg(*il1b:EGFP*)における E-cadherin の抗体染色。野生型、*clo* ともに EGFP と E-cadherin の局在が一致していた。垂直および水平のラインは切片像の位置を示す。スケールバーは 50 μm を示す。hpa, hours post amputation.

Figure 3.5.7 *clo* における *il1b* 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞の位置関係



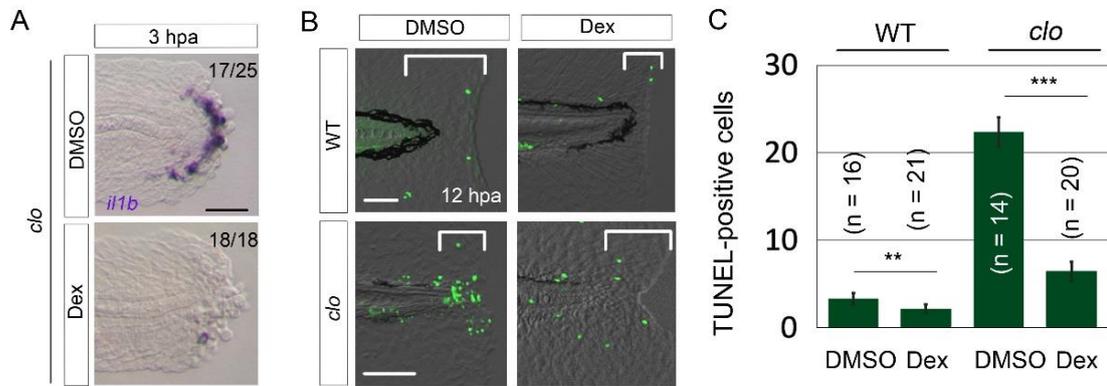
(A) Tg(*il1b:egfp*)における TUNEL 染色。*clo* の死細胞は *il1b* を発現している細胞と一致しなかった。垂直および水平のラインは切片像の位置を示す。スケールバーは 100 μm を示す。hpa, hours post amputation.

Figure3.5.8 *il1b* ノックダウンの *clo* の細胞死への影響



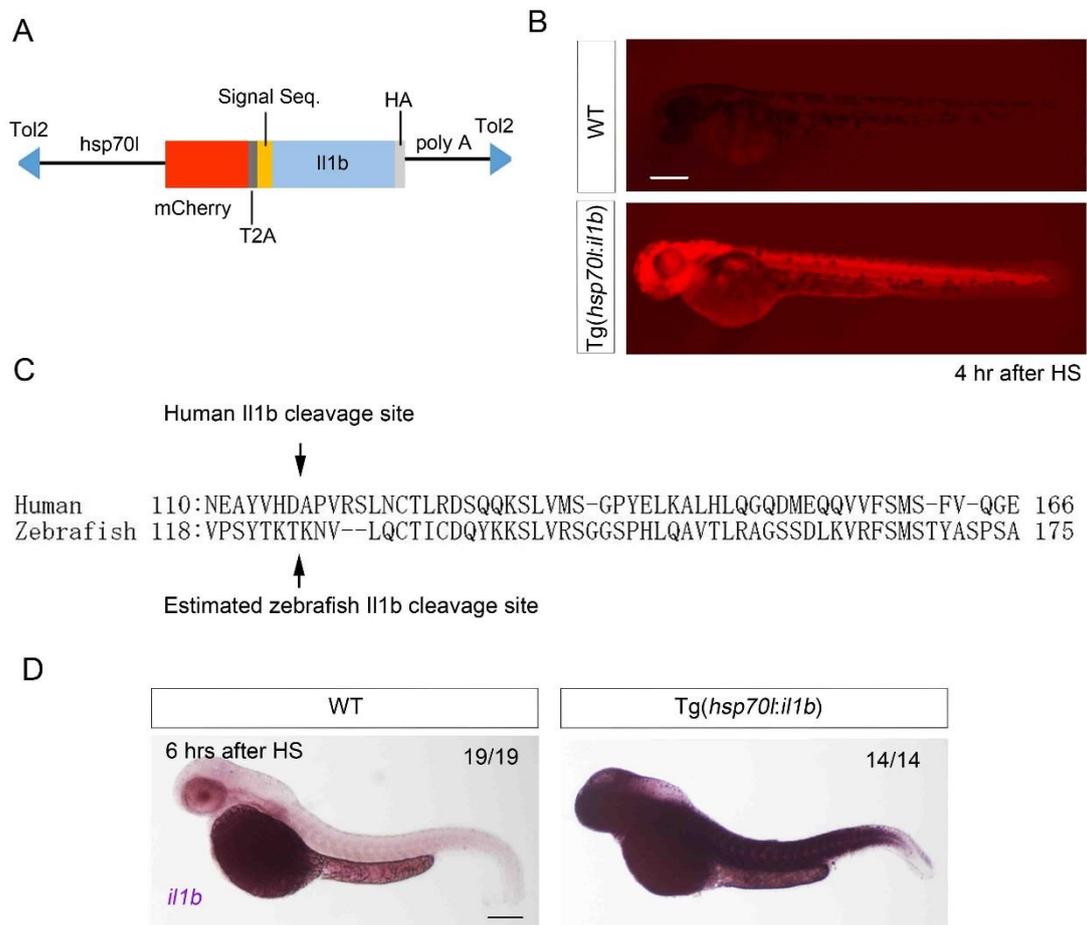
(A) *il1b* MO をインジェクションされた胚の RT-PCR 解析。*il1b* MO は *il1b* のスプライシングを阻害した。黒矢頭は異常な転写産物を示す。(B) *il1b* モルファントの TUNEL 染色。*il1b* MO は *clo* の細胞死を減少させた。スケールバーは 50 μ m を示す。(C) (B) の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. hpa, hours post amputation. N.S., not significant.

Figure3.5.9 Dex 投与の *clo* の細胞死への影響



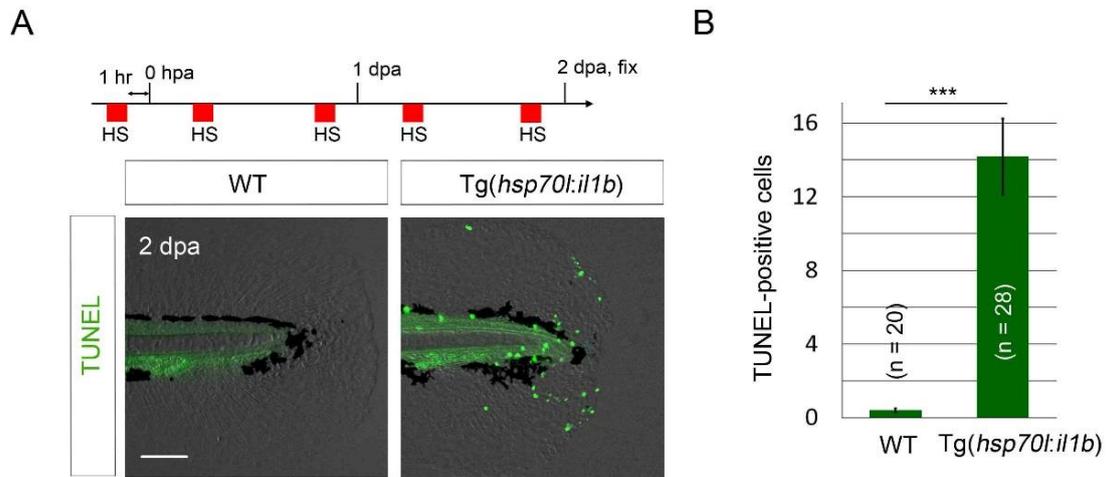
(A) Dex を投与された *clo* の ISH 解析。コントロールである DMSO を投与された *clo* は強い *il1b* の発現を示した一方で、Dex の投与は *il1b* の発現を強く抑制した。(B) Dex を投与された胚の TUNEL 染色。Dex の投与は野生型、*clo* ともに細胞死を抑制した。(C) (B) の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。**p < 0.01, ***p < 0.001. エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。スケールバーは 50 μ m を示す。

Figure3.5.10 熱誘導的に *il1b* を発現する Tg(*hsp70l:il1b*)の作成



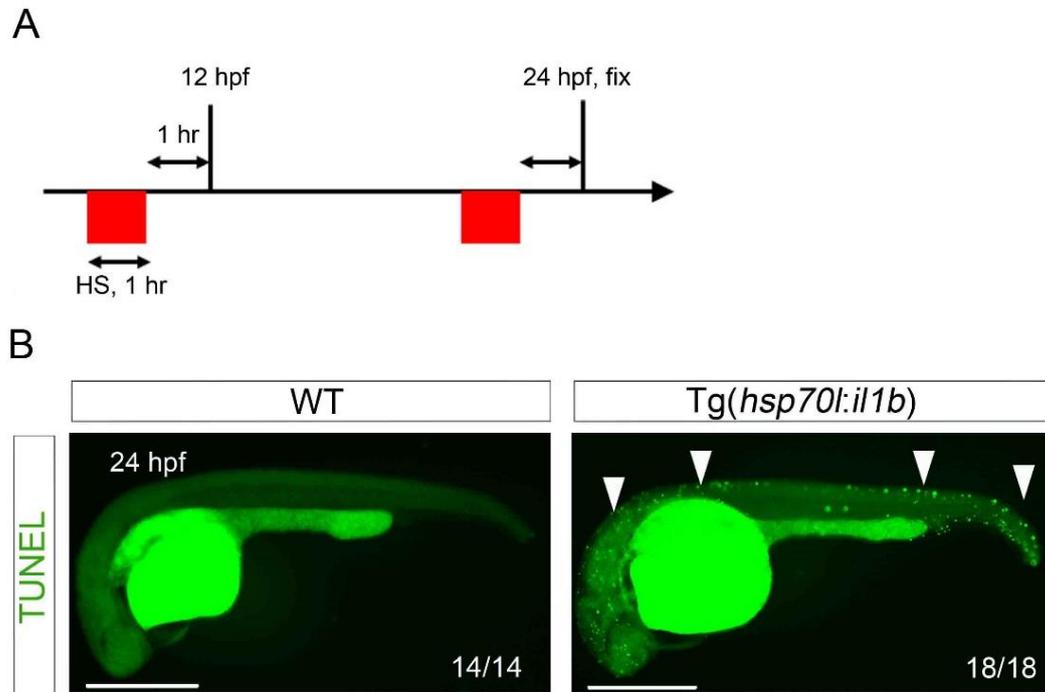
(A) Tg(*hsp70l:il1b*)を作成するためのコンストラクトの概略図。ゼブラフィッシュの *heat shock promoter 70l* の下流に *mCherry* 配列 と、ヒトの *il1bra* に由来のシグナル配列を N 末に加えたゼブラフィッシュの *il1b* 配列を挿入した。(B) Tg(*hsp70l:il1b*)にヒートショックを与えてから 4 時間後の観察。Tg(*hsp70l:il1b*)において *mCherry* の蛍光が観察された。スケールバーは 250 μ m を示す。(C)ゼブラフィッシュとヒトの *il1b* のアミノ酸配列の比較。ヒトの *il1b* は D116 で切断され活性化されることが明らかになっている。一方、ゼブラフィッシュの *il1b* は正確な切断部位が不明なため、ヒト *il1b* の切断部位に相当する T124 をゼブラフィッシュ *il1b* の推定切断部位とした。(D) ヒートショック 6 時間後における Tg(*hsp70l:il1b*)の ISH 解析。Tg(*hsp70l:il1b*)において、全身での *il1b* の発現が検出された。スケールバーは 250 μ m を示す。

Figure3.5.11 膜ヒレ再生中の *Tg(hsp70:il1b)* の細胞死



(A) *Tg(hsp70:il1b)* の TUNEL 染色。 図はヒートショックのプロトコルを示している。
Tg(hsp70:il1b) において細胞死の増加が検出された。(B) (A) の細胞死の定量解析。エ
ラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p <$
0.001.スケールバーは 100 μm を示す。HS, heat shock. dpa, days post amputation.

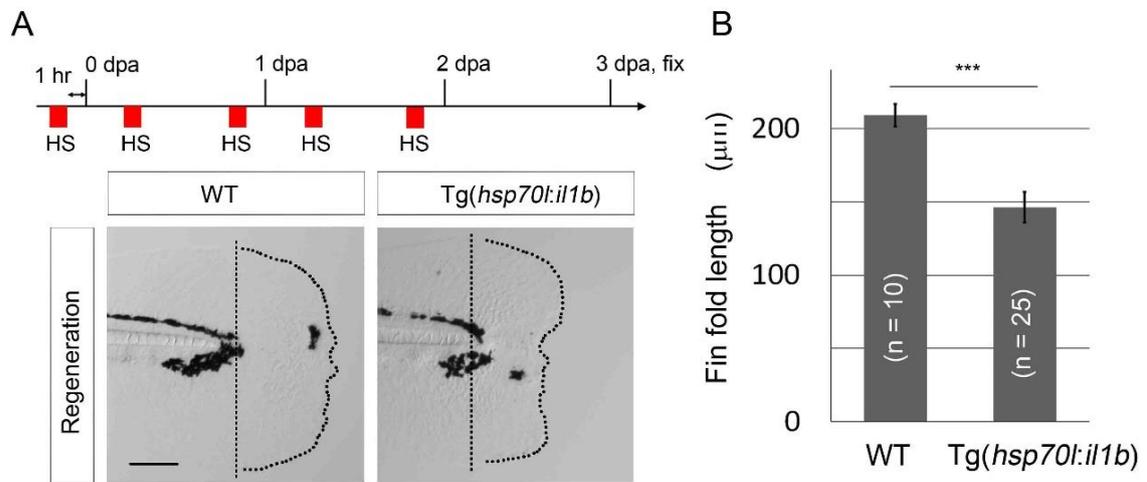
Figure3.5.12 発生中の $Tg(hsp70:il1b)$ の細胞死



(A) ヒートショックのプロトコルの模式図。一時間のヒートショックを2回行った。

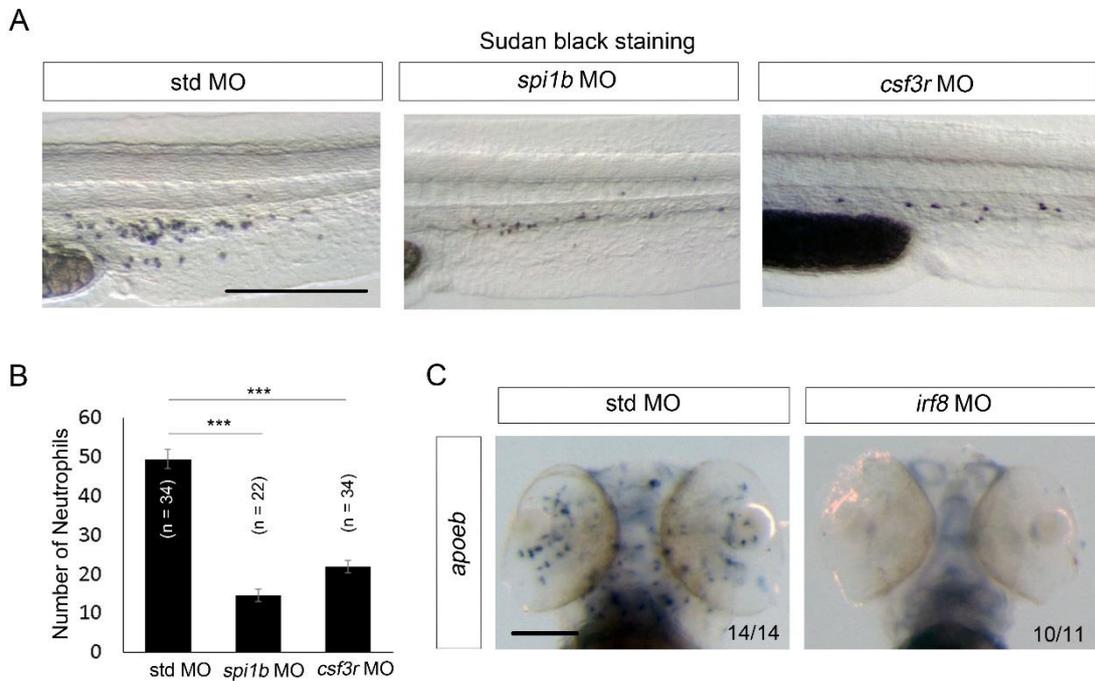
(B) 発生中の $Tg(hsp70:il1b)$ の TUNEL 染色。Tg は全身で細胞死が起きていた。スケールバーは 500 μ m を示す。HS, heat shock. dpa, days post amputation.

Figure3.5.13 Tg(*hsp70:il1b*)の膜ヒレ再生



(A) Tg(*hsp70:il1b*)の膜ヒレ再生。Tg(*hsp70:il1b*) において膜ヒレ再生の阻害が見られた。点線は膜ヒレの輪郭を、破線は切断面を示している。図はヒートショックのプロトコルを示している (B) (A)の再生した長さの定量解析。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$.スケールバーは 100 μm を示す。HS, heat shock. dpa, days post amputation.

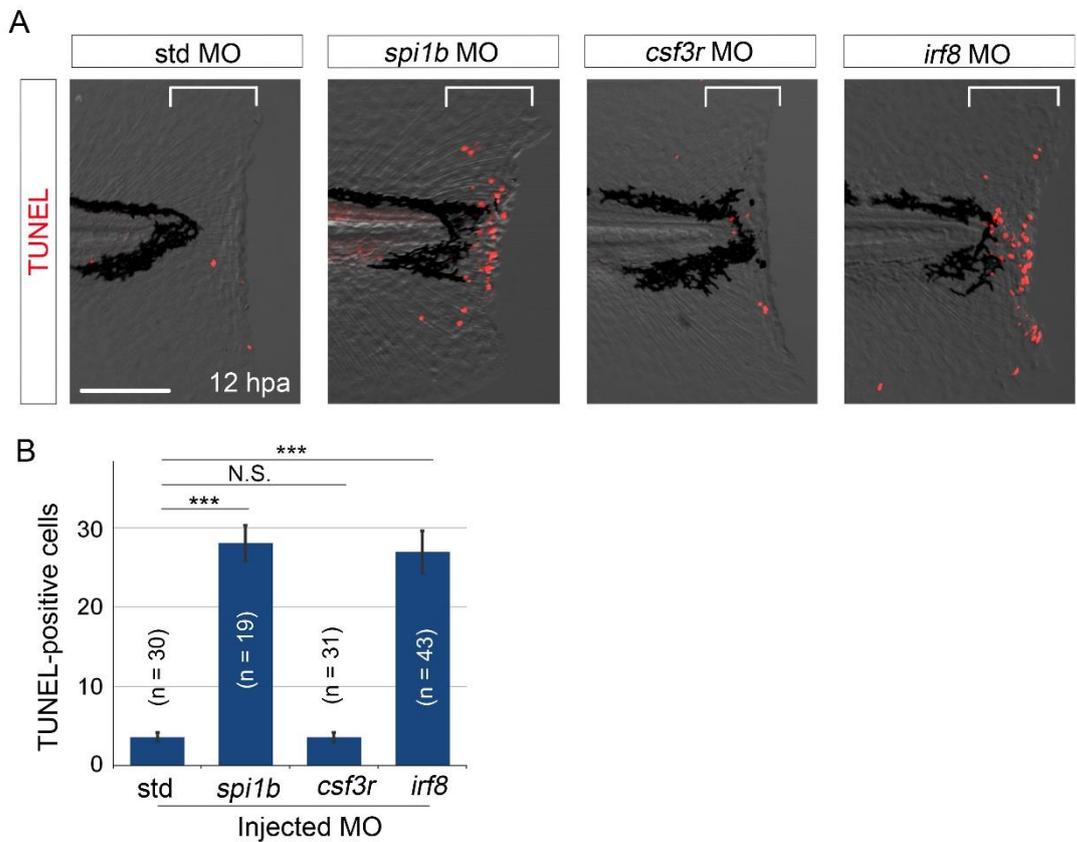
Figure3.5.14 *spi1b*, *csf3r*, *irf8* MO の活性評価



(A) *spi1b*, *csf3r* モルファントの Sudan back 染色。*spi1b* と *csf3r* モルファントは好中球数の減少を示した。スケールバーは 300 μm を示す。(B) (A)の尾部領域における好中球数の定量解析。(C) *irf8* モルファントの ISH 解析。*irf8* モルファントにおいて、グリア細胞マーカーである *apoeb* の発現が消失していた。スケールバーは 100 μm を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。

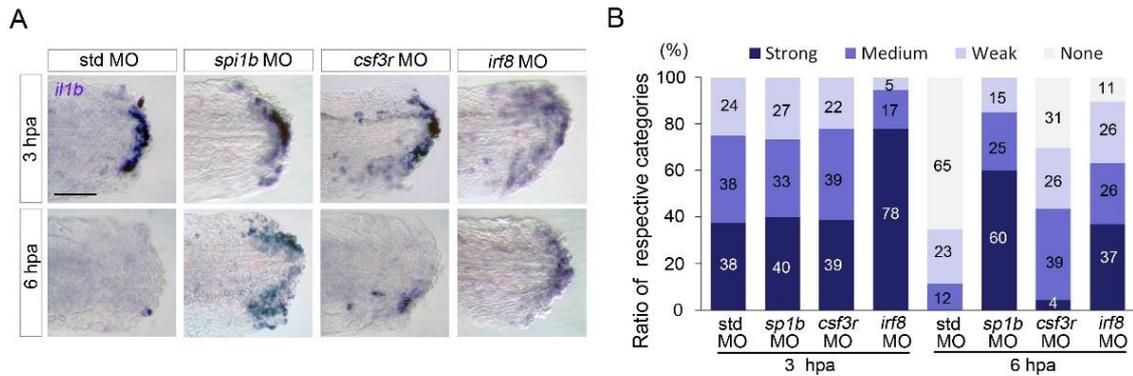
*** $p < 0.001$.

Figure3.5.15 ミエロイド細胞のノックダウンの細胞死への影響



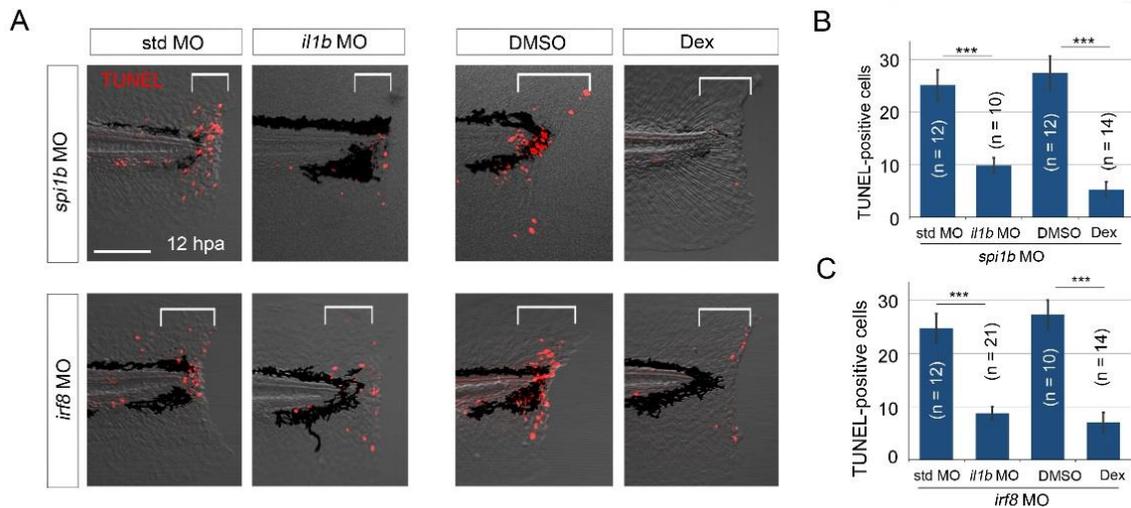
(A) *spi1b*, *csf3r*, *irf8* モルファントの TUNEL 染色。 *spi1b* モルファントと *irf8* モルファントにおいて細胞死の増加が検出された。スケールバーは 100 μ m を示す。 (B) (A) の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. N.S., not significant. hpa, hours post amputation.

Figure3.5.16 ミエロイド細胞のノックダウンの *il1b* の発現への影響



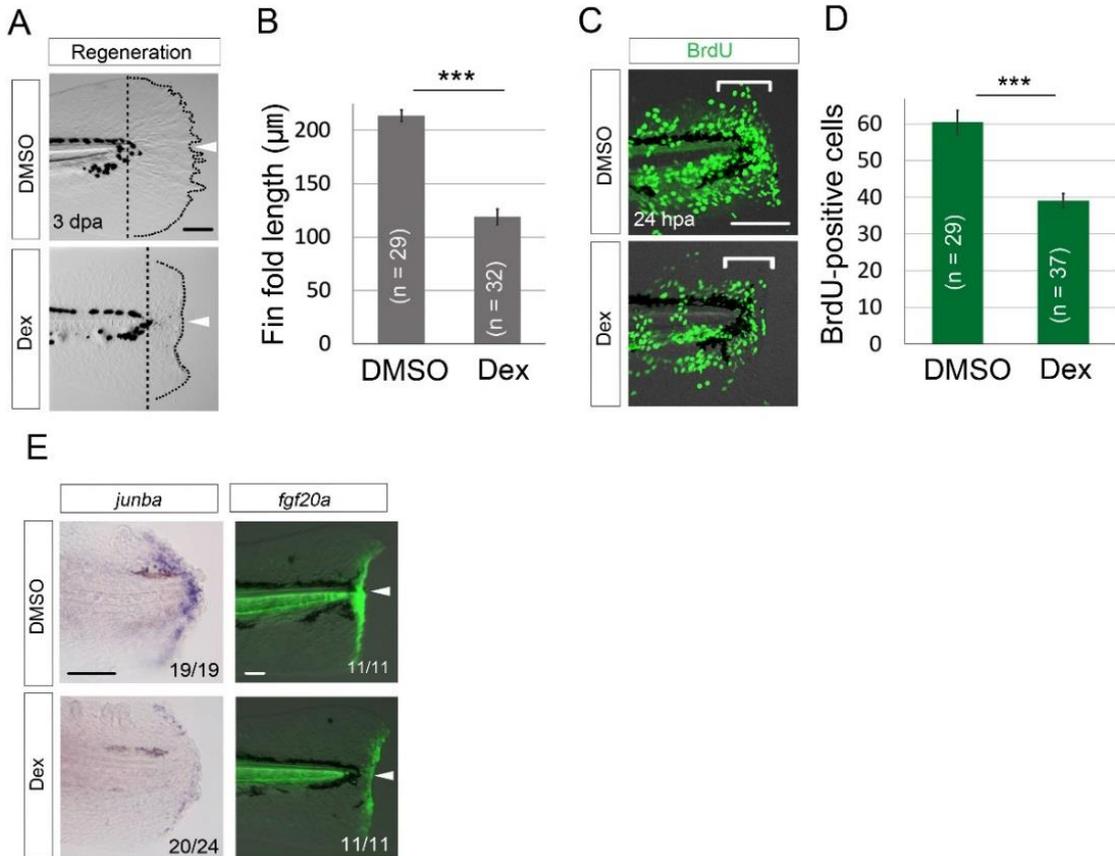
(A) *spi1b*, *csf3r*, *irf8* モルファントの ISH 解析。切断 3 時間後は、コントロールを含む全てのモルファントにおいて *il1b* の発現が検出されたが、切断 6 時間後は *spi1b* モルファントと *irf8* モルファントにおいてのみ、*il1b* の発現が検出された。スケールバーは 50 μm を示す。(B) (A)における ISH 解析の定量化。*il1b* の発現の強さ、領域に従って Strong, Medium, Weak, None の 4 つのグループに分類した。Strong は膜ヒレ全体での強い発現した胚、Medium は膜ヒレの一部で強い発現、Weak は膜ヒレの一部で弱い発現、None は発現なしを示す。2 回以上の独立した実験を元に作成され、それぞれのサンプル数は 16 以上である。hpa, hours post amputation,

Figure3.5.17 ミエロイド細胞と *il1b* のダブルノックダウン実験



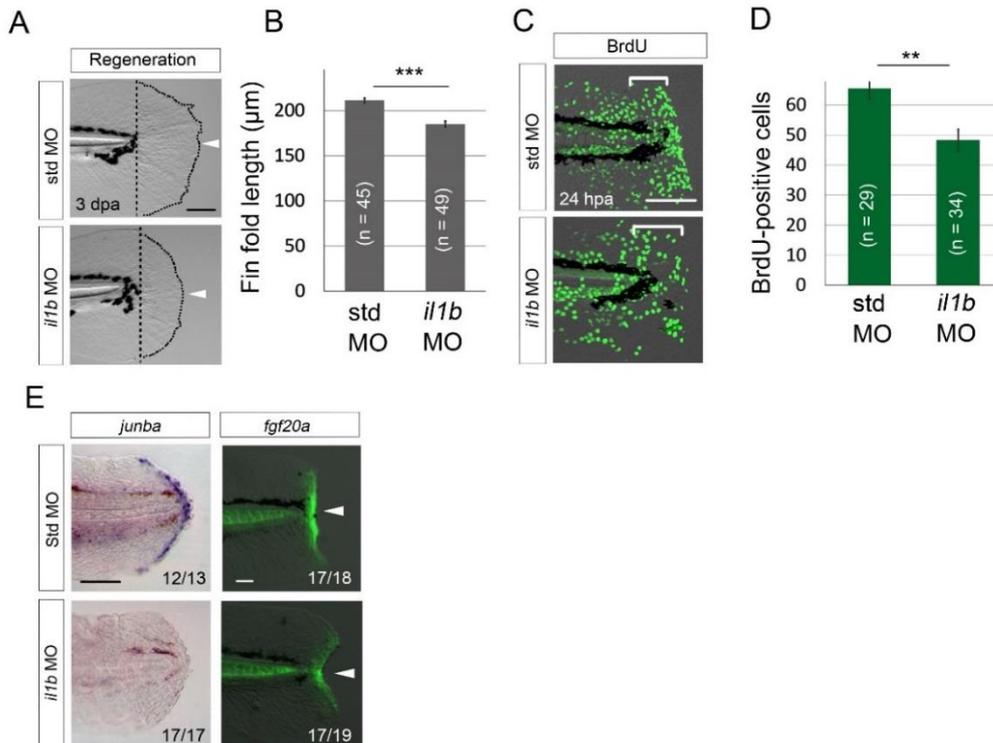
(A) *spi1b* と *irf8* モルファントの TUNEL 染色。 *spi1b* MO または *irf8* MO に加えて *il1b* MO をインジェクションされた胚では、 *std* MO をインジェクションされた胚に比べて細胞死の数が減少した。また、 *Dex* を投与された *spi1b* と *irf8* モルファントにおいても、 *DMSO* を投与された胚に比べて細胞死の数が減少した。スケールバーは 100 μ m を示す。(B) (A)の *spi1b* モルファントにおける、括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。(C) (A)の *irf8* モルファントにおける、括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. hpa, hours post amputation.

Figure3.5.18 Dex を投与された胚の膜ヒレ再生



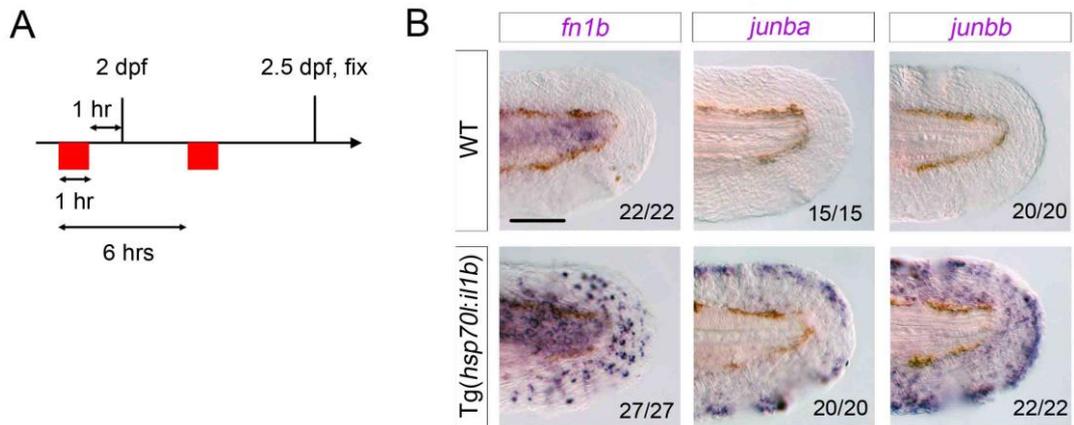
(A) Dex を投与された胚における膜ヒレ再生。Dex の投与は膜ヒレ再生を阻害した。スケールバーは 100 µm を示す。(B)(A)における再生した膜ヒレの長さの定量解析。(C) Dex を投与された胚における BrdU の取り込みによる細胞増殖の解析。BrdU の取り込みは切断後 0 時間から 24 時間まで行った。スケールバーは 50 µm を示す。(D) (C)の括弧で示された再生領域における細胞増殖の定量解析。(E) Dex を投与された胚における ISH 解析と、*fgf20a* の発現。Dex を投与された胚において *junba* の発現の著しい減少が観察された。また、*fgf20a* のレポーターTg である *HGn21A* において、Dex の投与は EGFP の減少を誘導した。スケールバーは 50 µm を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. dpa, days post amputation, hpa, hours post amputation.

Figure3.5.19 *il1b* ノックダウン胚の膜ヒレ再生



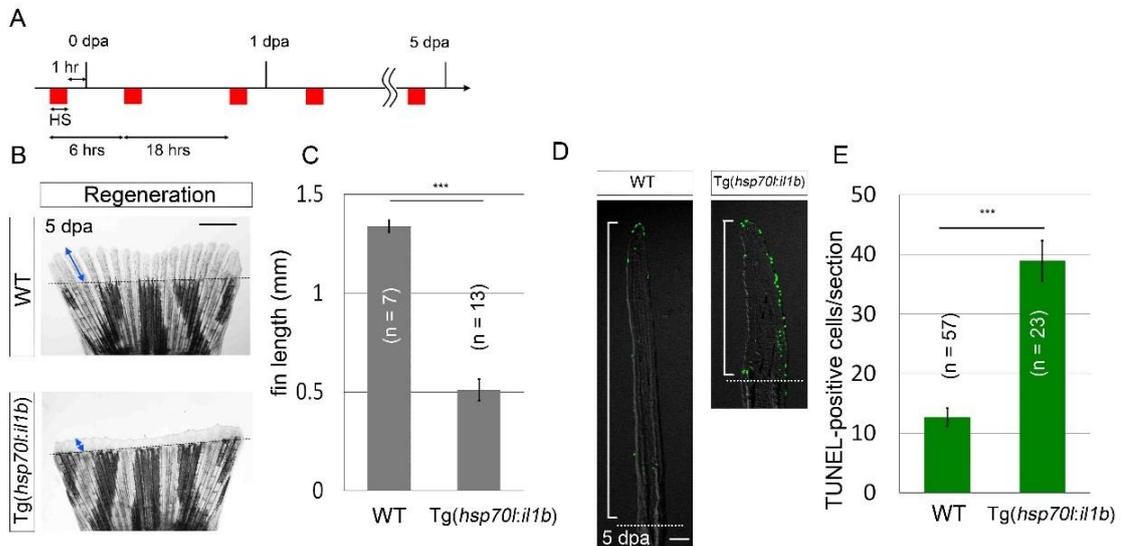
(A) *il1b* モルファントにおける膜ヒレ再生。*il1b* ノックダウンは膜ヒレ再生を遅延させた。スケールバーは $100 \mu\text{m}$ を示す。(B)(A)の再生した長さの定量解析。(C) *il1b* モルファントにおける BrdU の取り込みによる細胞増殖の解析。BrdU の取り込みは切断後 0 時間から 24 時間まで行った。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ を示す。(D) (C)の括弧で示された再生領域における細胞増殖の定量解析。(E) *il1b* モルファントにおける ISH 解析と、*fgf20a* の発現。*il1b* モルファントにおいて *Junba* の発現の著しい減少が観察された。また、*fgf20a* のレポーターTg である *HGn21A* において、*il1b* MO は EGFP の発現を減少させた。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ を示す。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's *t*-test により求めた。*** $p < 0.001$. ** $p < 0.01$, dpa, days post amputation, hpa, hours post amputation.

Figure3.5.20 Tg(*hsp70:il1b*)における再生関連遺伝子の発現



(A) Tg(*hsp70:il1b*)におけるヒートショック実験の模式図。固定前に2度ヒートショックを行った。(B) Tg(*hsp70:il1b*)におけるISH解析。膜ヒレを切断していないTg(*hsp70:il1b*)において、*fn1b*、*junba*、*junbb*の発現が誘導された。スケールバーは50 μm を示す。

Figure3.5.21 Tg(*hsp70:il1b*)における尾ヒレの再生



(A) Tg(*hsp70:il1b*)におけるヒートショック実験の模式図。一日に2度ヒートショックを行い、5 dpa の時点で観察、固定した。

(B) Tg(*hsp70:il1b*)における尾ヒレの再生。*il1b* の過剰な発現は再生を阻害した。破線は切断部位を示す。スケールバーは1 mmを示す。

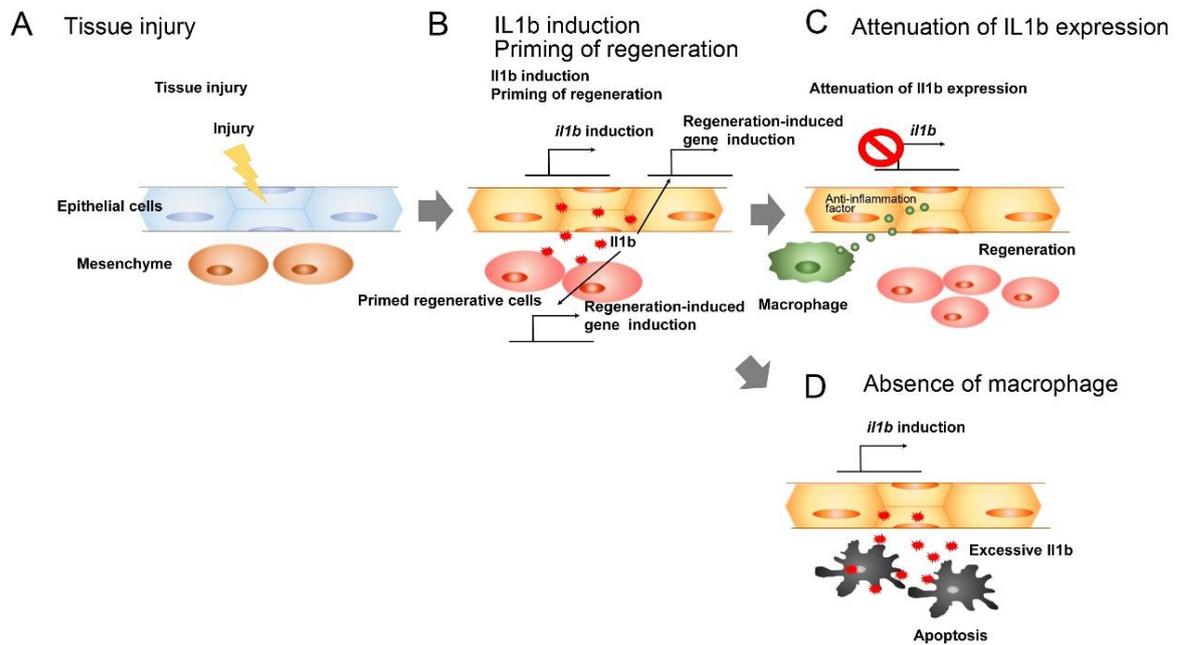
(C) (B)における再生したヒレの長さの定量解析。青い矢印が示す、端から3つ目の鰭条の再生領域を測定した。

(D) Tg(*hsp70:il1b*)における TUNEL 染色。Tg(*hsp70:il1b*)において、細胞死の増加が検出された。破線は切断部位を示す。スケールバーは50 μmを示す。

(E) (D)の括弧で示された再生領域における細胞死の定量解析。エラーバーは標準誤差を示す。統計的有意差は Student's t-test により求めた。

***p < 0.001. dpa, days post amputation,

Figure3.5.22 まとめ



(A-D) 膜ヒレ再生中のマクロファージと *il1b* の機能についての模式図。(A and B) 組織の傷害が上皮細胞における *il1b* の発現を誘導する。*il1b* は上皮細胞もしくは間葉細胞における *fn1b*, *junba*, *junbb*, *fgf20a* 等の再生関連遺伝子の発現を誘導する。(C) *il1b* の発現はマクロファージの抗炎症因子の分泌によって抑制される。(D) マクロファージが存在しない場合、*il1b* の発現が延長し、再生細胞におけるアポトーシスが誘導される。

第4章 結言

多細胞生物が持つホメオスタシス機構の解明は、現代生物学における最も大きな挑戦の一つである。組織が損傷を受けた際に、その恒常性を保つために行われる再生現象のメカニズムを明らかにすることは、生物の器官形成の理解を促し、再生医療の発展に貢献するだろう。

ゼブラフィッシュは優れた組織再生能力を持つことから、再生メカニズムを研究するためのモデル生物として広く用いられてきた。近年の目覚ましい遺伝子改変技術の進歩により、よりいっそう研究に用いられるだろう。

第2章において、*clo*の再生不全表現型の解析を行ったことで、再生細胞はアポトーシスに対する感受性が高く、維持するためには再生細胞生存因子を受け取る必要があることを明らかにした。また、その再生細胞生存因子はミエロイド細胞によって分泌され、熱耐性を持ち、常に体液中に存在することが示唆された。

第3章では、*clo*の細胞死の原因が、炎症促進性サイトカインである *il1b* の過剰な発現によるものであり、野生型では、マクロファージが何らかの分子を介して *il1b* の発現を抑制していることを明らかにした。一方で、*il1b* の発現は迅速な膜ヒレ再生に不可欠なものであり、再生関連遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。

本研究により、再生細胞が他の細胞と異なる、独自の生存機構を持つという概念が初めて提唱されたことに加え、再生における炎症反応および *Il1b* シグナルの重要性が明らかになり、組織再生機構の解明に向けて一歩前進することができた。また、*Il1b* シグナルを制御するメカニズムの解明を通じ、自己炎症性疾患の発症機序の解明および治療方法の開発への発展が期待される。

第 5 章 実験手法

ゼブラフィッシュの飼育

ゼブラフィッシュは野生型として TL 系統を用い、*clo* は Max Planck Institute の Didier Stainier 教授から分与していただいた m39 系統と、*la1164* 系統を用いた。*tal1* は Children's Hospital Boston の Leonard Zon 教授から分与していただいた t21384 系統を用いた。*vlad tepes* 変異体は筑波大学の小林麻己人講師から分与していただいた m651 系統を用いた。*Tg(fli1:egfp; gata1:rfp)* は京都大学の瀬原淳子教授から分与していただいた系統を用いた。HGn21A 系統は東北大学の阿部玄武助教から分与していただいた系統を用いた。*tp53* 変異体は Zebrafish International Resource Center から分与していただいた *zdf1* 系統を用いた。ET37 系統はシンガポールの Institute of Molecular and Cell Biology から分与していただいた系統を用いた。BAC *Tg(il1b:egfp)*、*Tg(hsp70:il1b)*、*Tg(Olactb:loxP-dsRed2-loxP-egfp)* は我々の研究室で作成された系統を用いた。

ゼブラフィッシュは再循環システムにより維持し、照明は明 14 時間、暗 10 時間の周期に調整し、28.5°C で飼育した。胚の飼育水として、egg water (0.06% artificial marine salt, 0.0002% methylene blue) を用いた。ISH や Sudan black 染色を行う際は、色素の合成を防ぐために 0.003% phenylthiourea (PTU) を含んだ egg water で受精 1 日後から飼育した。

尾ヒレ・膜ヒレの切断と膜ヒレの傷害

膜ヒレの切断には受精 2-2.5 日後の胚を用いた。尾ヒレの切断には受精後 80 日以降の成魚を用いた。0.05% Tricaine (3-amino benzoic acid ethylester; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で麻酔し、解剖用メスを用いて切断した。膜ヒレの切断は、脊索末端とその延長線上の膜ヒレ末端の間で行った。尾ヒレの切断は中央の鰭条の長さが半分

なるように行った。膜ヒレ再生領域の定量化は、脊索末端からその延長線上の膜ヒレの先端までを測定した。尾ヒレ再生領域の定量化は、尾ヒレの端から3つ目の鰭条の延長線上のヒレの先端までを測定した。膜ヒレの傷害は、直径 50 μm のガラスキャピラリーを用いて行った。

TUNEL 染色

胚を 4% paraformaldehyde (PFA)/phosphate buffered saline (PBS) に浸し、4°Cで一晩または室温で2時間固定した。固定後、0.1% Triton X-100/PBS (PBTx)で洗浄し、段階的に Methanol (MeOH)に置換した。100% MeOH に置換した胚は-30°Cで保存した。脱水した胚を PBTx に再置換し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K (ProK)/PBTx を加え、室温にて5分間転倒攪拌した。その後、PBTx で洗浄し、4% PFA で再固定を室温で20分間行った。直前に作製した 0.1% sodium citrate/0.1% Triton X-100/H₂O 溶液に置換し、氷上で15分間静置した。その後、PBTx で洗浄を行い、TUNEL 反応溶液 (labeling mix:enzyme solution = 9:1)を 40 μl 加え、37°Cで一時間半静置した。PBTx で洗浄を行った後、2.5% Triethylenediamine (DABCO)/80% glycerol に置換し、スライドガラス上にマウントし、共焦点顕微鏡(FV-1000, Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。

BrdU 染色

BrdU を終濃度 5mM になるように飼育水に溶かし、飼育した。ラベル終了後、胚を 4% PFA に浸し、4°Cで一晩または室温で2時間固定した。固定後、PBTx で洗浄し、段階的に MeOH に置換した。100% MeOH に置換した胚は、-30°Cにて保存した。脱水した胚を PBTx に置換し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ProK/PBTx を加え、室温にて5分間転倒攪拌した。その後、PBTx で洗浄し、4% PFA で再固定を室温で20分間行った。0.1% Triton

X-100/H₂O で洗浄した後、2N HCl/0.1% Triton X-100 を 37°C で 1 時間処理した。その後、胚を Blocking buffer (5% serum, 0.2% BSA) 中で 2 時間インキュベートし、anti-BrdU antibody (Roche, Basel, Switzerland) を Blocking buffer に 1000 倍希釈し、4°C で一晩反応させた。PBTx で抗 BrdU 抗体を洗浄し、その後、Alexa Fluor 488/568 antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を Blocking buffer に 1000 倍希釈し、4°C で一晩反応させた。PBTx で二次抗体溶液の洗浄を行い、2.5% DABCO/80% glycerol に置換し、スライドガラス上にマウントし、共焦点顕微鏡で観察した。

阻害剤処理

阻害剤は Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かし、-30°C にて保存した。使用時は飼育水に溶かして目的の濃度に調整した。コントロールには、DMSO を同量加えた飼育水を使用した。膜ヒレを切断する 1 時間以上前から阻害剤の投与を開始した。用いた阻害剤を以下に示す。

100µM Aphidicolin (Wako, Osaka, Japan)

5 µM PTK787 (JS Research Chemical Trading E. Kfm., Wedel, Germany)

100µM Dexamethasone (Sigma-Aldrich)

Whole-mount ISH

サンプルを 4% PFA に浸し、4°C で一晩固定した。その後、0.1% Tween 20/PBS (PBT) で洗浄し、段階的に MeOH に置換した。100% MeOH に置換した胚は -30°C で保存した。脱水した胚を段階的に PBT に置換して再水和させた後、サンプルが尾ヒレの場合は 20 分間、膜ヒレ、外植体の場合は 5 分間、2 dpf の胚の場合は 20 分間、10 µg/ml ProK/PBT で処理し、PBT で洗浄した。4% PFA を用いて再固定を室温で 20 分間行った後、PBT で洗浄した。その後、Hybridization Buffer (HB) に置換し、65-70°C

で2時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。続いて Digoxigenin (DIG)標識したアンチセンス RNA プローブ約 1 µg/ml 含む HB に置換し、65-70°Cでハイブリダイゼーションを一晩行った。その後、HB/2x Saline Sodium Citrate (SSC)混合溶液(75%, 50%, 25%)で洗浄し、続いて 2xSSC,と 0.2xSSC による洗浄を行った。以後はサンプルを室温に戻し、0.2xSSC/PBT 混合溶液(75, 50, 25%)で洗浄を行い、続けて PBT に置換した。Blocking buffer で、室温にて2時間転倒攪拌した後、Alkaline Phosphatase (AP)標識抗 DIG 抗体を Blocking buffer に1000倍希釈し、4°Cで一晩、抗体反応を行った。その後、PBT で洗浄を行い、NTMT buffer (50mM MgCl₂, 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.1% Tween20)で洗浄を行った後、450 µg/ml nitro blue tetrazolium (NBT), 175 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)/NTMT buffer に置換し、室温、遮光条件下で発色反応を行った。なお、*il1b*の染色の際は5% polyvinyl alcohol/NTMT buffer を用いた。発色後、PBTにより数回洗浄し、4% PFA に置換することで発色反応を停止した。発色後の胚は80% glycerol に置換し、光学顕微鏡を用いて観察した。

切片の作成

サンプルを20% スクロース/PBS に室温で1時間または4°Cで一晩静置した後、Tissue-Tek compound (Sakura Finetek, Torrance, CA)に包埋し、-30°Cで保存した。凍結したサンプルは、クリオスタットで10-16 µm でスライスした。

免疫染色

胚を4% PFA に浸し、4°Cで一晩または室温で2時間固定した。固定後、PBTx で洗浄し、段階的に MeOH に置換した。100% MeOH に置換した胚は、-30°Cで保存した。脱水した胚を PBTx に置換し、Blocking buffer を加え、室温にて2時間転倒攪拌した。続いて、1次抗体 anti-E-cadherin antibody (1:1000; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ), anti-p63 antibody (abcam, Cambridge, UK), anti-caspase-3 active form

antibody (Takara Bio, Tokyo, Japan), anti-dsRed antibody (Takara Bio), anti-EGFP antibody (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を Blocking buffer に 1000 倍希釈し、4°Cで一晩もしくは室温で二時間置換することで、抗体反応を行った。PBTx で一次抗体溶液の洗浄を行い、蛍光標識された二次抗体溶液(anti-rabbit Alexa488/568 (1/1000), anti-mouse Alexa488/568 (1/1000) anti-rat Alexa488)を加え、4°Cで一晩もしくは室温で2時間の抗体反応を行った。PBTx による洗浄を行った後、DABCO/80% glycerol に置換し、スライドガラス上にマウントした後、共焦点顕微鏡で観察した。

MOs、mRNA インジェクション

MOs (Gene Tools, Philomath, OR)は 0.3xDanieau buffer (17 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.12mM MgSO₄, 41.8 mM Ca(NO₃)₂, 21.5mM HEPES, pH7.6)に 1 mM の濃度にして溶かし、-30°Cで保存した。pronase (Roche)処理をして、卵膜を除去した 1-2 細胞期の受精卵にインジェクションした。インジェクション後の胚は 2 dpf まで、10,000 units/ml penicillin G と 10 mg/ml streptomycin sulfate を含む 0.3 x Niu-Twitty Solution で飼育した。

用いた MO とその配列を以下に示す。

tnnt2a MO: 5'-CATGTTTGCTCTGATCTGACACGCA-3'

irf8 MO: 5'-AATGTTTCGCTTACTTTGAAAATGG-3'

csf3r MO: 5'-ATTCAAGCACATACTCAC-TTCCATT-3'

spi1b MO: 5'-GATATACTGATACTCCATTGGTGGT-3'

il1b MO: 5'-CCCACAAACTGCA-AAATATCAGCTT-3'

std MO: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

また、mRNA (*egfp-zbcl2*)は、Harvard University の Thomas A. Look 教授からいただいた、pCS2-*egfp-zbcl2* ベクターから mMessage Machine kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて合成し、0.5 µg/µl の濃度に調整し、pronase 処理により卵膜を除去した 1-2 細胞期の受精卵にインジェクションした。

UV 照射

飼育シャーレ中の飼育水をできるだけ除き、胚に **Stratalinker® UV crosslinker** (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) で 340 mJ/cm^2 の UV を照射し、切断 12 時間後に 4% PFA で固定した。

細胞移植

受精直後の卵を、**pronase** 処理により卵殻を除去し、**10,000 units/ml penicillin G** と **10 mg/ml streptomycin sulfate** を含む **0.3xDanieau buffer** で飼育した。ドームステージまで発生が進んだところで、ドナー胚の細胞塊内に直径 **30-50 μm** ガラス針の先端を差し込み、数十の細胞を抜き取り、同じくドームステージの宿主胚へと移植した。移植後の胚は **10,000 units/ml penicillin G** と **10 mg/ml streptomycin sulfate** を含む **0.3xDanieau buffer** で飼育した。

Sudan black B 染色

胚を 4% PFA に浸し、室温で 1 時間固定した。その後、PBS で洗浄し、**0.03% Sudan black b staining reagent (Sigma-Aldrich)** を加え、室温で 20 分間反応させた。**70% エタノール** で数回洗浄した後、**PBT** に置換した。最後に **80% glycerol** に置換し、光学顕微鏡で観察した。

尾部外植体の培養と Acridine Orange 染色

L-15 medium 中で、受精後 **2-2.5** 日目の胚の肛門の尾部側と膜ヒレをメスで切断し、尾部外植体を作成した。その後、**L-15 medium** で数回洗浄した後、**10% FBS**, **10,000 units/ml penicillin G**, **10 mg/ml streptomycin sulfate** を含む **L-15**

medium で培養した。培養には 96 穴の well に 100 μ l の培養液を加え、1 well あたり 7 つの外植体を 12 時間培養した。

Acridine Orange 染色は培養液を除き、新たに 5 μ g/ml Acridine Orange (Sigma-Aldrich)/L-15 medium を加え、暗所で 30 分間、室温にて静置した。L-15 medium で 5 分間 \times 3 回洗浄した後、スライドガラス上にマウントし、共焦点顕微鏡で観察した。

胚抽出液

受精後 2-3 日の胚を集め、PBS で洗浄した後、L-15 medium を加えた。ホモジェナイザーで胚を粉碎した後、4 $^{\circ}$ C、10000rpm で 10 分間遠心を行った。上清を回収し、再び L-15 medium を加え、懸濁した。先に述べた条件でもう一度遠心を行った後、上清を回収し、先に回収したものと合わせた。回収した抽出液は細孔サイズが 0.45 μ m のフィルター(Millex; HV13, Merck Millipore, Billerica, MA)でろ過し-30 $^{\circ}$ Cで保存し、実験の際は 1 個体/ μ l の濃度で使用した。熱処理は胚抽出液を 80 $^{\circ}$ Cで 20 分間処理し、4 $^{\circ}$ C、10000rpm で 10 分間遠心を行い、その上清を培養液として使用した。

トランスクリプトーム解析

受精後 2 日目で膜ヒレを切断し、6 時間経過した野生型および *clo* の胚と、切断していない野生型の胚を用意し、肛門の尾部側を切断した組織を回収した。その後、できるだけ飼育水を除き、すばやく -80 $^{\circ}$ Cにて保存した。RNA の抽出には TRIzol (Thermo Fisher Scientific)をメーカーの説明書に従って用いて、RNA を抽出した。RNA シーケンスの解析は Takara Bio に依頼した。簡単には、TruSeq RNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, CA)を用いて、精製され断片化された PolyA+ RNA を各種 3 μ g 用意し、それぞれの cDNA を合成した。cDNA はアダプター配列と結合され、PCR (15 サイクル)を行い増幅され、シーケンス解析(Illumina HiSeq2000)に用いられた。得

られたシーケンスのリード数は WT uncut が 60927373、 WT 6 hpa が 59284653 、 clo 6 hpa が 58507894 であった。得られた配列は Bowtie software (version 0.12.7)[134]を用いて、zebrafish の Reference sequence にマッピングされた。それぞれの遺伝子発現量は ERANGE software (version 3.2)[135]を用いて、RPKM (reads per kilobase of exon model per million mapped reads)として標準化された。

RT-PCR

野生型または clo の肛門の尾部側を切断した組織から、TRIzol (Thermo Fisher Scientific)を用いて RNA を抽出し、さらに、RNeasy kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)を用いて精製した。その後、Thermoscript RT-PCR Kit (Invitrogen)をメーカーの説明書に従って用いて、cDNA を合成した。プライマーにはランダムヘキサマーを用いた。続いて、得られた cDNA を 0.1 µg/µl に調製し、-30°C で保存した。PCR には Paq5000 DNA polymerase (Agilent Technologies)を用いて増幅し、2% アガロースゲルで電気泳動をした。RT-PCR に用いたプライマーの配列を以下に示す。

actb1 forward: 5'-ATGGATGAGGAAATCGCTGCCCTGGTCGTTGACAA-3'

actb1 reverse: 5'-AGAGAGAGCACAGCCTGGATGGCCACATACATGGC-3'

il1b forward: 5'-GCAGAGGAACTTAACCAGCT-3'

il1b reverse: 5'-TGCCGGTCTCCTTCCTGA-3'

LPS インジェクション

Salmonella typhosa (Sigma-Aldrich)由来の LPS を、10 mg/ml になるように水に溶かし、-30°C で保存した。LPS (5 mg/ml) と phenol red (0.5 %)を含む溶液を、胚の心臓の空洞部分にインジェクションした。

Tg ラインの作成

Tg(*hsp70l:mCherry-2a-il1b*)を作成するためのコンストラクトは、

pT2(*hsp70l:mCherry-2a-creERt2*) [62]の *creERt2* 配列を *il1b* カセットに入れ替えることで作成した。*il1b* カセットは *il1b* 配列の 125-273 アミノ酸部分を PCR によって増幅した。human *il1b receptor antagonist* [121]のシグナル配列と HA tag 配列 をそれぞれ N 末と C 末に付加した。下のプライマー配列中の下線部がそれぞれの配列を示す。

il1b forward: 5'-

GCTAGCATGGAAATCTGCAGAGGCCTCCGCAGTCACCTAATCACTCTCCTCCTCTT
CCTGTT-CCATTCAGAGACGATCTGCAAAAACGTCTTGCAATGCACGATTTGCG – 3'

il1b reverse: 5'-

AGATCTCTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGATGCGCACTTTATCCTGCA
GCTCGA-AG– 3'

コンストラクト(250 ng/μl)は、pronase 処理をして、卵膜を除去した 1-2 細胞期の受精卵に、*transposase* mRNA (25 ng/μl)とともにインジェクションした。F0 世代の魚を WT と交配させ、得られた胚をヒートショックし、mCherry の蛍光を観察することによりスクリーニングした。

BAC Tg(*il1b:egfp*)を作成するために、*iTo12* カセットを BAC clone である CH211 147H23 に、BAC recombineering [59]によって導入した。その後、*egfp-ntr* カセット [136]を *il1b* 遺伝子の開始コドン部分に挿入した。BAC DNA (125 ng/μl)と *transposase* mRNA (25 ng/μl)の混合液 1 nl を受精卵にインジェクションした。Tg(*il1b:egfp*)は、crystalline alpha promoter によって誘導される、レンズの EGFP の発現によってスクリーニングした。

統計処理

棒グラフのデータは平均値±標準誤差で示した。統計解析はMicrosoft Excel 2013を用いて行った。統計的有意差はp<0.05を基準としてStudent's *t*-testを用いた。

第 6 章 参考文献

- 1 Kawakami, A., 2010. Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Dev Growth Differ* 52, 77-87.
- 2 Carlson, B. M., 2007. An introduction to regeneration. In *Principles of Regenerative Biology*, pp. 1–30. Academic Press, London.
- 3 Morgan, T.H., 1900. Regeneration in Planarians. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 10, 58-119.
- 4 Tanaka, E.M., Reddien, P.W., 2011. The cellular basis for animal regeneration. *Dev Cell* 21, 172-185.
- 5 Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., Tanaka, E.M., 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460, 60-65.
- 6 Campbell, L.J., Crews, C.M., 2008. Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 73-79.
- 7 Shibata, E., Yokota, Y., Horita, N., Kudo, A., Abe, G., Kawakami, K., Kawakami, A., 2016. Fgf signalling controls diverse aspects of fin regeneration. *Development*. 143, 2920-2929.
- 8 Stoick-Cooper, C.L., Moon, R.T., Weidinger, G., 2007. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes & development* 21, 1292-1315.
- 9 Wehner, D., Weidinger, G., 2015. Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin. *Trends in Genetics* 31, 336-343.
- 10 Agata, K., Saito, Y., Nakajima, E., 2007. Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Dev Growth Differ* 49, 73-78.

- 11 Newmark, P.A., Alvarado, A.S., 2002. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat Rev Genet* 3, 210-219.
- 12 Yanik, M.F., Cinar, H., Cinar, H.N., Chisholm, A.D., Jin, Y., Ben-Yakar, A., 2004. Neurosurgery: Functional regeneration after laser axotomy. *Nature* 432, 822-822.
- 13 Agata, K., Inoue, T., 2012. Survey of the differences between regenerative and non-regenerative animals. *Dev Growth Differ* 54, 143-152.
- 14 Monaghan, J.R., Stier, A.C., Michonneau, F., Smith, M.D., Pasch, B., Maden, M., Seifert, A.W., 2014. Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity. *Regeneration* 1, 2-14.
- 15 Beck, C.W., Izpisua Belmonte, J.C., Christen, B., 2009. Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Developmental dynamics* 238, 1226-1248.
- 16 Bely, A.E., 2010. Evolutionary loss of animal regeneration: pattern and process. *Integrative and comparative biology* 50, 515-527.
- 17 Frobisch, N.B., Bickelmann, C., Olori, J.C., Witzmann, F., 2015. Deep-time evolution of regeneration and preaxial polarity in tetrapod limb development. *Nature* 527, 231-234.
- 18 Poss, K.D., 2010. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet* 11, 710-722.
- 19 Whitehead, G.G., Makino, S., Lien, C.-L., Keating, M.T., 2005. *fgf20* Is Essential for Initiating Zebrafish Fin Regeneration. *Science* 310, 1957-1960.
- 20 Ishida, T., Nakajima, T., Kudo, A., Kawakami, A., 2010. Phosphorylation of Junb family proteins by the Jun N-terminal kinase supports tissue regeneration in zebrafish. *Dev Biol* 340, 468-479.

- 21 Lawrence, C., 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1-20.
- 22 Grunwald, D.J., Eisen, J.S., 2002. Headwaters of the zebrafish-emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 3, 717-724.
- 23 Howe, K. et al., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503.
- 24 Drummond, B.E., Wingert, R.A., 2016. Insights into kidney stem cell development and regeneration using zebrafish. *World Journal of Stem Cells* 8, 22-31.
- 25 Akimenko, M.A., Mari-Beffa, M., Becerra, J., Geraudie, J., 2003. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental dynamics* 226, 190-201.
- 26 Poss, K.D., Keating, M.T., Nechiporuk, A., 2003. Tales of regeneration in zebrafish. *Developmental dynamics* 226, 202-210.
- 27 Moss, J.B., Koustubhan, P., Greenman, M., Parsons, M.J., Walter, I., Moss, L.G., 2009. Regeneration of the Pancreas in Adult Zebrafish. *Diabetes* 58, 1844-1851.
- 28 Cox, A.G., Goessling, W., 2015. The lure of zebrafish in liver research: Regulation of hepatic growth in development and regeneration. *Current opinion in genetics & development* 32, 153-161.
- 29 Kikuchi, K., 2014. Advances in understanding the mechanism of zebrafish heart regeneration. *Stem Cell Research* 13, 542-555.
- 30 Wang, X., He, H., Tang, W., Zhang, X.A., Hua, X., Yan, J., 2012. Two Origins of Blastemal Progenitors Define Blastemal Regeneration of Zebrafish Lower Jaw. *PloS one* 7, e45380.
- 31 Goldman, D., 2014. Muller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat*

Rev Neurosci 15, 431-442.

32 Reimer, M.M., Sørensen, I., Kuscha, V., Frank, R.E., Liu, C., Becker, C.G., Becker, T., 2008. Motor Neuron Regeneration in Adult Zebrafish. *The Journal of Neuroscience* 28, 8510-8516.

33 Kizil, C., Kaslin, J., Kroehne, V., Brand, M., 2012. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Developmental neurobiology* 72, 429-461.

34 Chitnis, A.B., Nogare, D.D., Matsuda, M., 2012. Building the posterior lateral line system in zebrafish. *Developmental neurobiology* 72, 234-255.

35 Tu, S., Johnson, S.L., 2011. Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Dev Cell* 20, 725-732.

36 Yoshinari, N., Kawakami, A., 2011. Mature and juvenile tissue models of regeneration in small fish species. *The Biological bulletin* 221, 62-78.

37 Yin, V.P., Thomson, J.M., Thummel, R., Hyde, D.R., Hammond, S.M., Poss, K.D., 2008. Fgf-dependent depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in zebrafish. *Genes & development* 22, 728-733.

38 Knopf, F., Hammond, C., Chekuru, A., Kurth, T., Hans, S., Weber, C.W., Mahatma, G., Fisher, S., Brand, M., Schulte-Merker, S., Weidinger, G., 2011. Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Dev Cell* 20, 713-724.

39 Stewart, S., Stankunas, K., 2012. Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. *Dev Biol* 365, 339-349.

40 Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., Nüsslein-Volhard, C., 1994. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Current Biology* 4, 189-202.

41 Haffter, P. et al., 1996. The identification of genes with unique and essential

functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36.

42 Zhou, Y., Zon, L.I., 2011. Chapter 16 - The Zon Laboratory Guide to Positional Cloning in Zebrafish, in: H. William Detrich, M.W., Leonard, I.Z. (Eds.), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, pp. 287-309.

43 Foley, J.E., Yeh, J.-R.J., Maeder, M.L., Reyon, D., Sander, J.D., Peterson, R.T., Joung, J.K., 2009. Rapid Mutation of Endogenous Zebrafish Genes Using Zinc Finger Nucleases Made by Oligomerized Pool ENGINEERING (OPEN). *PloS one* 4, e4348.

44 Moens, C.B., Donn, T.M., Wolf-Saxon, E.R., Ma, T.P., 2008. Reverse genetics in zebrafish by TILLING. *Briefings in functional genomics & proteomics* 7, 454-459.

45 Ota, S., Hisano, Y., Muraki, M., Hoshijima, K., Dahlem, T.J., Grunwald, D.J., Okada, Y., Kawahara, A., 2013. Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assays. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 18, 450-458.

46 Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F., 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research* 39, e82.

47 Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346.

48 Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339, 819-823.

49 Hoshijima, K., Jurynech, Michael J., Grunwald, David J., 2016. Precise Editing of the Zebrafish Genome Made Simple and Efficient. *Developmental Cell* 36, 654-667.

- 50 Irion, U., Krauss, J., Nüsslein-Volhard, C., 2014. Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Development* 141, 4827-4830.
- 51 Zhang, Y., Huang, H., Zhang, B., Lin, S., 2016. Chapter 5 - TALEN- and CRISPR-enhanced DNA homologous recombination for gene editing in zebrafish, in: H. William Detrich, M.W., Leonard, I.Z. (Eds.), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, pp. 107-120.
- 52 Nasevicius, A., Ekker, S.C., 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature genetics* 26, 216-220.
- 53 Kok, F. O. et al., 2015. Reverse genetic screening reveals poor correlation between Morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Developmental Cell* 32, 97-108.
- 54 Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Holper, S., Kruger, M., Stainier, D.Y.R., 2015. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 524, 230-233.
- 55 Dodd, A., Chambers, S.P., Love, D.R., 2004. Short interfering RNA-mediated gene targeting in the zebrafish. *FEBS letters* 561, 89-93.
- 56 White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C.E., Zon, L.I., 2008. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* 2, 183-189.
- 57 Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., Mishina, M., 2004. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell* 7.
- 58 Suster, M.L., Sumiyama, K., Kawakami, K., 2009. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. *BMC Genomics* 10, 1-7.

- 59 Suster, M.L., Abe, G., Schouw, A., Kawakami, K., 2011. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. *Nat. Protocols* 6, 1998-2021.
- 60 Langenau, D.M., Feng, H., Berghmans, S., Kanki, J.P., Kutok, J.L., Look, A.T., 2005. Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 6068-6073.
- 61 Pan, Y.A., Freundlich, T., Weissman, T.A., Schoppik, D., Wang, X.C., Zimmerman, S., Ciruna, B., Sanes, J.R., Lichtman, J.W., Schier, A.F., 2013. Zebrabow: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development* 140, 2835-2846.
- 62 Yoshinari, N., Ando, K., Kudo, A., Kinoshita, M., Kawakami, A., 2012. Colored medaka and zebrafish: transgenics with ubiquitous and strong transgene expression driven by the medaka beta-actin promoter. *Dev Growth Differ* 54, 818-828.
- 63 Curado, S., Stainier, D.Y.R., Anderson, R.M., 2008. Nitroreductase-mediated cell/tissue ablation in zebrafish: a spatially and temporally controlled ablation method with applications in developmental and regeneration studies. *Nature protocols* 3, 948-954.
- 64 Hans, S., Freudenreich, D., Geffarth, M., Kaslin, J., Machate, A., Brand, M., 2011. Generation of a non-leaky heat shock-inducible Cre line for conditional Cre/lox strategies in zebrafish. *Developmental dynamics* 240, 108-115.
- 65 Adam, A., Bartfai, R., Lele, Z., Krone, P.H., Orban, L., 2000. Heat-inducible expression of a reporter gene detected by transient assay in zebrafish. *Experimental cell research* 256, 282-290.
- 66 Knopf, F., Schnabel, K., Haase, C., Pfeifer, K., Anastassiadis, K., Weidinger, G.,

2010. Dually inducible TetON systems for tissue-specific conditional gene expression in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 19933-19938.

67 Asakawa, K., Kawakami, K., 2008. Targeted gene expression by the Gal4-UAS system in zebrafish. *Dev Growth Differ* 50, 391-399.

68 Mateus, R., Pereira, T., Sousa, S., de Lima, J.E., Pascoal, S., Saude, L., Jacinto, A., 2012. In vivo cell and tissue dynamics underlying zebrafish fin fold regeneration. *PLoS one* 7, e51766.

69 Kawakami, A., Fukazawa, T., Takeda, H., 2004. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. *Developmental Dynamics* 231, 693-699.

70 Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A., Kawakami, A., 2009. Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Dev Biol* 325, 71-81.

71 Yoo, S.K., Freisinger, C.M., LeBert, D.C., Huttenlocher, A., 2012. Early redox, Src family kinase, and calcium signaling integrate wound responses and tissue regeneration in zebrafish. *J Cell Biol* 199, 225-234.

72 Mathew, L.K., Sengupta, S., Franzosa, J.A., Perry, J., La Du, J., Andreasen, E.A., Tanguay, R.L., 2009. Comparative expression profiling reveals an essential role for *raldh2* in epimorphic regeneration. *The Journal of biological chemistry* 284, 33642-33653.

73 Kelsh, R. N. et al., 1996. Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development* 123, 369.

74 van Eeden, F. J. et al., 1996. Genetic analysis of fin formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 255-262.

75 Rojas-Munoz, A., Rajadhyksha, S., Gilmour, D., van Bebber, F., Antos, C., Rodriguez Esteban, C., Nusslein-Volhard, C., Izpisua Belmonte, J.C., 2009. ErbB2 and

ErbB3 regulate amputation-induced proliferation and migration during vertebrate regeneration. *Dev Biol* 327, 177-190.

76 Jing, L., Zon, L.I., 2011. Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis. *Disease models & mechanisms* 4, 433-438.

77 Stainier, D.Y., Weinstein, B.M., Detrich, H.W., 3rd, Zon, L.I., Fishman, M.C., 1995. Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development* 121, 3141-3150.

78 Reischauer, S. et al., 2016. Cloche is a bHLH-PAS transcription factor that drives haemato-vascular specification. *Nature* 535, 294-298.

79 Lee, Y., Grill, S., Sanchez, A., Murphy-Ryan, M., Poss, K.D., 2005. Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development* 132, 5173-5183.

80 Slanchev, K., Carney, T.J., Stemmler, M.P., Koschorz, B., Amsterdam, A., Schwarz, H., Hammerschmidt, M., 2009. The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is required for epithelial morphogenesis and integrity during zebrafish epiboly and skin development. *PLoS genetics* 5, e1000563.

81 Zhang, J., Wagh, P., Guay, D., Sanchez-Pulido, L., Padhi, B.K., Korzh, V., Andrade-Navarro, M.A., Akimenko, M.A., 2010. Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. *Nature* 466, 234-237.

82 Kroemer, G. et al., 2008. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.

83 Mohamad, N., Gutierrez, A., Nunez, M., Cocca, C., Martin, G., Cricco, G., Medina, V., Rivera, E., Bergoc, R., 2005. Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell* 29, 149-161.

- 84 Langenau, D.M., Jette, C., Berghmans, S., Palomero, T., Kanki, J.P., Kutok, J.L., Look, A.T., 2005. Suppression of apoptosis by bcl-2 overexpression in lymphoid cells of transgenic zebrafish. *Blood* 105, 3278-3285.
- 85 Berghmans, S., Murphey, R.D., Wienholds, E., Neubergh, D., Kutok, J.L., Fletcher, C.D., Morris, J.P., Liu, T.X., Schulte-Merker, S., Kanki, J.P., Plasterk, R., Zon, L.I., Look, A.T., 2005. tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 407-412.
- 86 Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516.
- 87 Bussmann, J., Bakkers, J., Schulte-Merker, S., 2007. Early endocardial morphogenesis requires Scf/Tal1. *PLoS genetics preprint*, e140.
- 88 Lyons, S.E., Lawson, N.D., Lei, L., Bennett, P.E., Weinstein, B.M., Liu, P.P., 2002. A nonsense mutation in zebrafish gata1 causes the bloodless phenotype in vlad tepes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 5454-5459.
- 89 Chan, J., Bayliss, P.E., Wood, J.M., Roberts, T.M., 2002. Dissection of angiogenic signaling in zebrafish using a chemical genetic approach. *Cancer Cell* 1, 257-267.
- 90 Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T.X., Look, A.T., Kanki, J.P., 2005. Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell* 8, 97-108.
- 91 Sehnert, A.J., Huq, A., Weinstein, B.M., Walker, C., Fishman, M., Stainier, D.Y., 2002. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nature genetics* 31, 106-110.
- 92 Vousden, K.H., Lane, D.P., 2007. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell*

Biol 8, 275-283.

93 Koh, T.J., DiPietro, L.A., 2011. Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine* 13, e23-e23.

94 Li, L., Yan, B., Shi, Y.Q., Zhang, W.Q., Wen, Z.L., 2012. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *The Journal of biological chemistry* 287, 25353-25360.

95 Petrie, T.A., Strand, N.S., Tsung-Yang, C., Rabinowitz, J.S., Moon, R.T., 2014. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* 141, 2581-2591.

96 Katsimpardi, L., Litterman, N.K., Schein, P.A., Miller, C.M., Loffredo, F.S., Wojtkiewicz, G.R., Chen, J.W., Lee, R.T., Wagers, A.J., Rubin, L.L., 2014. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science* 344, 630-634.

97 Sinha, M. et al., 2014. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* 344, 649-652.

98 Huff, T., Müller, C.S.G., Otto, A.M., Netzker, R., Hannappel, E., 2001. β -Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33, 205-220.

99 Lin, G., Chen, Y., Slack, Jonathan M.W., 2013. Imparting Regenerative Capacity to Limbs by Progenitor Cell Transplantation. *Dev Cell* 24, 41-51.

100 Hait, N.C., Oskeritzian, C.A., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S., 2006. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 2016-2026.

101 Barnes, P.J., 2006. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize

Lecture 2005. *British Journal of Pharmacology* 148, 245-254.

102 Kolaczowska, E., Kubes, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13, 159-175.

103 Renshaw, S.A., Trede, N.S., 2012. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Disease Models and Mechanisms* 5, 38-47.

104 LeBert, D.C., Huttenlocher, A., 2014. Inflammation and wound repair. *Seminars in Immunology* 26, 315-320.

105 Keightley, M.-C., Wang, C.-H., Pazhakh, V., Lieschke, G.J., 2014. Delineating the roles of neutrophils and macrophages in zebrafish regeneration models. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 56, 92-106.

106 Dinarello, C.A., 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* 27, 519-550.

107 Ogryzko, N.V., Renshaw, S.A., Wilson, H.L., 2014. The IL-1 family in fish: Swimming through the muddy waters of inflammasome evolution. *Developmental & Comparative Immunology* 46, 53-62.

108 Ogryzko, N.V., Hoggett, E.E., Solaymani-Kohal, S., Tazzyman, S., Chico, T.J., Renshaw, S.A., Wilson, H.L., 2014a. Zebrafish tissue injury causes upregulation of interleukin-1 and caspase-dependent amplification of the inflammatory response. *Disease models & mechanisms* 7, 259-264.

109 Nguyen-Chi, M., Phan, Q.T., Gonzalez, C., Dubremetz, J.F., Levraud, J.P., Lutfalla, G., 2014. Transient infection of the zebrafish notochord with *E. coli* induces chronic inflammation. *Disease models & mechanisms* 7, 871-882.

110 Dinarello, C.A., 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117, 3720-3732.

- 111 Vojtech, L.N., Scharping, N., Woodson, J.C., Hansen, J.D., 2012. Roles of inflammatory caspases during processing of zebrafish interleukin-1beta in *Francisella noatunensis* infection. *Infection and immunity* 80, 2878-2885.
- 112 Mescher, A.L., Neff, A.W., King, M.W., 2016. Inflammation and immunity in organ regeneration. *Developmental & Comparative Immunology*.
- 113 Eming, S.A., Hammerschmidt, M., Krieg, T., Roers, A., 2009. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 517-527.
- 114 Martin, P., D'Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R., McKercher, S.R., 2003. Wound Healing in the PU.1 Null Mouse—Tissue Repair Is Not Dependent on Inflammatory Cells. *Current Biology* 13, 1122-1128.
- 115 Godwin, J.W., Pinto, A.R., Rosenthal, N.A., 2013. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 9415-9420.
- 116 Kyritsis, N., Kizil, C., Zocher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., Iltzsche, A., Brand, M., 2012. Acute Inflammation Initiates the Regenerative Response in the Adult Zebrafish Brain. *Science* 338, 1353-1356.
- 117 Mathew, L.K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E.A., Lohr, C.V., Loynes, C.A., Renshaw, S.A., Peterson, R.T., Tanguay, R.L., 2007. Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *The Journal of biological chemistry* 282, 35202-35210.
- 118 Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P.S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145-151.
- 119 Wallach, D., Kang, T.-B., Kovalenko, A., 2014. Concepts of tissue injury and cell

death in inflammation: a historical perspective. *Nat Rev Immunol* 14, 51-59.

120 Kern, J.A., Lamb, R.J., Reed, J.C., Daniele, R.P., Nowell, P.C., 1988. Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes. Posttranscriptional mechanisms. *Journal of Clinical Investigation* 81, 237-244.

121 Wingren, A.G., Björkdahl, O., Labuda, T., Björk, L., Andersson, U., Gullberg, U., Hedlund, G., Sjögren, H.-O., Kalland, T., Widegren, B., Dohlsten, M., 1996. Fusion of a Signal Sequence to the Interleukin-1 β Gene Directs the Protein from Cytoplasmic Accumulation to Extracellular Release. *Cellular Immunology* 169, 226-237.

122 Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E.A., Rickman, B., Betz, K.S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J.G., Wang, T.C., 2008. Overexpression of Interleukin-1 β Induces Gastric Inflammation and Cancer and Mobilizes Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice. *Cancer Cell* 14, 408-419.

123 Lewis, A.M., Varghese, S., Xu, H., Alexander, H.R., 2006. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine* 4, 48-48.

124 Okamoto, M., Liu, W., Luo, Y., Tanaka, A., Cai, X., Norris, D.A., Dinarello, C.A., Fujita, M., 2010. Constitutively Active Inflammasome in Human Melanoma Cells Mediating Autoinflammation via Caspase-1 Processing and Secretion of Interleukin-1 β . *The Journal of biological chemistry* 285, 6477-6488.

125 Kupper, T.S., Ballard, D.W., Chua, A.O., McGuire, J.S., Flood, P.M., Horowitz, M.C., Langdon, R., Lightfoot, L., Gubler, U., 1986. Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. *The Journal of experimental medicine* 164, 2095-2100.

- 126 Rock, K.L., Kono, H., 2008. The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology* 3, 99-126.
- 127 Kanjanamekanant, K., Luckprom, P., Pavasant, P., 2013. Mechanical stress-induced interleukin-1beta expression through adenosine triphosphate/P2X7 receptor activation in human periodontal ligament cells. *Journal of periodontal research* 48, 169-176.
- 128 Sedger, L.M., McDermott, M.F., 2014. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25, 453-472.
- 129 Eizirik, L.D., Mandrup-Poulsen, T., 2001. A choice of death – the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44, 2115-2133.
- 130 Wang, Q., Zhang, H., Zhao, B., Fei, H., 2009. IL-1beta caused pancreatic beta-cells apoptosis is mediated in part by endoplasmic reticulum stress via the induction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Molecular and cellular biochemistry* 324, 183-190.
- 131 Goren, I., Allmann, N., Yogev, N., Schürmann, C., Linke, A., Holdener, M., Waisman, A., Pfeilschifter, J., Frank, S., 2009. A Transgenic Mouse Model of Inducible Macrophage Depletion: Effects of Diphtheria Toxin-Driven Lysozyme M-Specific Cell Lineage Ablation on Wound Inflammatory, Angiogenic, and Contractive Processes. *The American Journal of Pathology* 175, 132-147.
- 132 Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E., 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8, 349-361.
- 133 Ortega-Gómez, A., Perretti, M., Soehnlein, O., 2013. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Molecular Medicine* 5, 661-674.

- 134 Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10, R25-R25.
- 135 Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Meth* 5, 621-628.
- 136 Grohmann, M., Paulmann, N., Fleischhauer, S., Vowinckel, J., Priller, J., Walther, D.J., 2009. A mammalianized synthetic nitroreductase gene for high-level expression. *BMC Cancer* 9, 1-12.

第7章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、右も左もわからない未熟な私を一から指導していただき、そんな私にも自由な研究活動の場を提供してくださった、指導教官である川上厚志准教授に心より感謝を申し上げます。また、研究についての数多くの助言をくださった工藤明教授、猪早敬二助教、昭和大学の茶谷昌宏助教に感謝いたします。特に、学部三年生の時に受講した工藤教授の講義は、私が博士を目指すきっかけを与えてくださいました。本当にありがとうございました。また、研究生活を共にした工藤・川上研究室の皆様と、その支援をしてくださった秘書の松崎由紀子さんに感謝いたします。特に、同じく博士課程を過ごした安藤和則先輩、柴田恵里さんには、あらゆる面で支えていただきました。私がこうして卒業できるのは、二人の存在があったからだと言っても過言ではありません。大変お世話になりました。さらに、私の研究テーマの前任者であった石田高志先輩と中島照広先輩に感謝いたします。お二人の先行研究があったからこそ、論文を発表することができました。

情報生命博士教育院(ACLS)の関係諸氏に深く感謝いたします。多くの研究者の方々との交流を提供して下さり、非常に励みになりました。また、ACLSからの奨励金をいただけたおかげで、研究に専念することができました。さらに、下記に述べるニュージーランド留学の費用も提供して下さり、貴重な経験を積むことが出来ました。本当にありがとうございました。

留学先である The University of Auckland の Christopher J. Hall 博士、Philip S. Crosier 教授、Kathryn E. Crosier 教授、ならびに Crosier 研究室の皆様感謝いたします。私を留学生として受け入れてくださったうえに、英語が不得意な私に対しても優しく接して下さり、有意義な研究をすることができました。最終的には共同研究という形で論文も発表することが出来ました。本当にありがとうございました。

cloche 変異体を分与してくださった Max Planck Institute の Didier Stainier 教授、*tal1*

変異体を分与して下さった Children's Hospital Boston の Leonard Zon 教授、
Tg(*fli1:egfp; gata1:rfp*) を分与して下さった京都大学の瀬原淳子教授、*vlad tepes* 変異体を分与して下さった筑波大学の小林麻己人講師、HGn21A 系統を分与して下さった東北大学の阿部玄武助教、BAC Tg 作成技術を指導して下さった国立遺伝学研究所の川上浩一教授、pCS2-EGFP-bcl2 construct 分与して下さった Harvard University の Thomas A. Look 教授、*tp53* 変異体を分与して下さった Zebrafish International Resource Center の皆様、ET37 系統を分与して下さった Institute of Molecular and Cell Biology の皆様に深く感謝いたします。

最後に、私の研究活動を理解してくださり、励ましてくれた親愛なる国井綾さんと、9年にわたる大学、大学院生活を支えて下さった両親、親族に心より感謝いたします。