

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュ尾鰭における発生・成長・再生を通じた間葉細胞の系譜解析
Title(English)	
著者(和文)	小宮広滉
Author(English)	Hiroaki Komiya
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12664号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:川上 厚志,田中 幹子,白木 伸明,立花 和則,野々村 恵子
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12664号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和5年度 博士論文

ゼブラフィッシュ尾鰭における
発生・成長・再生を通じた間葉細胞の系譜解析

東京工業大学

生命理工学院 川上研究室

小宮 広滉

目次

第1章	序 論	5
1.1	多細胞化と再生能力	5
1.2	生物のもつ再生能力	5
1.3	モデル生物としてのゼブラフィッシュ	6
1.4	ゼブラフィッシュ尾鰭の構造と再生	7
1.5	器官再生と位置情報	7
1.6	器官再生と細胞系譜	8
1.7	骨と骨芽細胞	9
1.8	ゼブラフィッシュ骨芽細胞の系譜解析	10
1.9	本研究の目的と結果の概要	11
第2章	実験の材料と手法	12
2.1	ゼブラフィッシュの系統	12
2.2	ゼブラフィッシュの飼育と尾鰭切断	13
2.3	トランスジェニックゼブラフィッシュの作製	13
2.4	Cre-loxP システムによる遺伝子組換え	14
2.5	イメージングとタイムラプス細胞系譜追跡	14
2.6	NTR/MTZ システムによる細胞除去	15
2.7	Whole-mount <i>in situ</i> hybridization	15
2.8	凍結切片の作製	16
2.9	免疫蛍光染色	17
2.10	組織分散と蛍光活性化セルソーティング	17
2.11	RNA-seq とデータ解析	18
第3章	結 果	19
3.1	<i>Tg(sox9a:Cre-ERT2)</i> の作製	19
3.2	<i>Tg(sox9a:Cre-ERT2)</i> は体節細胞を標識できる	19
3.3	成魚尾鰭を構成する細胞は <i>sox9a</i> 陽性体節細胞に由来する	20
3.4	<i>sox9a:Cre</i> 標識細胞の大部分は膜鰭の間葉細胞になる	21
3.5	膜鰭の間葉細胞は成魚尾鰭にならない一過的な細胞である	21
3.6	膜鰭基部に位置する少数の細胞が成魚尾鰭を形成する	22
3.7	成魚尾鰭の鰭条を形成する間葉細胞の系譜は3種類ある	22
3.8	骨芽系譜の間葉細胞は鰭条の伸長に伴って骨芽細胞を産生する	24

3.9	骨芽系譜/非骨芽系譜の間葉細胞の RNA-seq プロファイリング	24
3.10	非骨芽系譜の間葉細胞は軟骨関連のプロファイルをもつ	25
3.11	骨芽系譜/軟骨芽系譜は鰭再生後も元の系譜を維持する	26
3.12	骨芽前駆細胞は骨芽系間葉細胞 (OMP) によって供給される	27
第4章	考 察	28
4.1	sox9a:Cre 標識組織と sox9a 発現組織の関係	28
4.2	膜鰭間葉細胞の役割	28
4.3	混合系譜の間葉細胞について	29
4.4	体節における系譜の決定メカニズム	30
4.5	骨芽系間葉細胞と軟骨芽系間葉細胞	30
第5章	結 論	32
謝 辞		33
参考文献		34
図 表		42
図 1	ゼブラフィッシュの発生過程	42
図 2	ゼブラフィッシュ成魚尾鰭の構造	43
図 3	ゼブラフィッシュ幼生膜鰭の構造	44
図 4	ゼブラフィッシュ尾鰭の再生過程	45
図 5	ゼブラフィッシュ尾鰭における骨芽前駆細胞 (OPC)	46
図 6	ゼブラフィッシュ成魚尾鰭を形成する間葉細胞の系譜	48
図 7	Cre-loxP システムによる細胞標識	49
図 8	<i>In situ</i> hybridization による体節における sox9a の発現パターン	50
図 9	1 dpf 尾部における <i>Tg(sox9a:Cre)</i> の標識パターン	51
図 10	1 dpf 尾部における sox9a:Cre 標識部位の解析	52
図 11	sox9a:Cre 標識細胞の成魚尾鰭への寄与	53
図 12	sox9a:Cre 標識細胞の尾鰭以外の組織への寄与	54
図 13	TAM 処理時期による標識効率の変化	55
図 14	5 dpf 以降に sox9a:Cre で標識した細胞の成魚尾鰭への寄与	56
図 15	2 dpf 尾部における sox9a:Cre 標識細胞の分化組織の解析	57
図 16	sox9a:Cre で標識された膜鰭間葉細胞の鰭形成過程における消失過程	58
図 17	胚期に sox9a:Cre で標識された間葉細胞の成魚尾鰭形成過程	59

図 18	成魚尾鰭における鰭条標識タイプと間葉細胞系譜.....	60
図 19	TAM 処理時期と間葉細胞系譜の出現率変化.....	61
図 20	骨芽系譜間葉細胞の鰭条形成過程.....	62
図 21	非骨芽系譜間葉細胞の鰭条形成過程.....	63
図 22	標識された鰭条からの細胞分散.....	64
図 23	骨芽系譜間葉細胞 (OMP) と非骨芽系譜間葉細胞 (non-OMP) の分取.....	65
図 24	セルソーターにおけるゲートの設定と細胞分取スキーム.....	66
図 25	OMP, non-OMP, 骨芽細胞に濃縮された遺伝子のヒートマップ.....	68
図 26	OMP, non-OMP (CMP), 骨芽細胞の gene ontology (GO) 解析.....	69
図 27	鰭再生前後における骨芽系譜, 軟骨芽系譜の解析.....	70
図 28	NTR/MTZ システムによる細胞除去.....	71
図 29	骨芽系譜の標識細胞と骨芽前駆細胞 (OPC) の局在.....	72
図 30	骨芽系譜, 軟骨芽系譜における OPC の除去と再生.....	73
図 31	尾鰭形成過程におけるアクチノトリキアと鰭条を形成する間葉細胞の解析.....	75
図 32	体節 (硬節) 分化に関わる主なシグナル.....	76
図 33	ゼブラフィッシュにおける間葉細胞の系譜.....	77

第1章 序論

1.1 多細胞化と再生能力

地球 46 億年の歴史において、最初の生き物である単細胞生物の出現は比較的早く、今から 36–38 億年前だと考えられている。はじめて多細胞生物が生まれたのは約 10 億年前だと考えられており ([Knoll and Nowak, 2017](#))、物質から生命が誕生するまでにかかった時間の倍以上の時間をかけて、単細胞生物は多細胞化を果たしたことになる。現在に至るまでの生物多様性の歴史をみると、この多細胞化というイベントが、どれだけ種の繁栄に重要なものであったかが分かる。

この多細胞化を経て、生物は細胞ごとに役割分担し、機能を特化できるようになった。そして、単細胞に比べて高次な機能を獲得することで、あらゆる環境の変化に対して個体の恒常性を維持できるようになった。多細胞化によって得た機能の最たる例は再生能力である。すべての多細胞生物は、怪我をしたことがない人がいない（ヘソの緒の切断から始まる）ように、傷害を受けた細胞や古くなった細胞を新しい細胞に置き換える（再生する）ことで、一つの個体としてより長く生き残ることを実現している。しかし、あらゆる多細胞生物が身体をどこでも再生できるわけではなく、再生能力は生物種などによって程度が異なる。一般的に再生能力は、ヒトなどの高等生物に近づくほど低くなると言われている ([Poss, 2010](#))。つまり、元来の生物がもっていた再生能力は、生物進化の過程において淘汰されてしまったと考えられる。もしヒトの祖先動物が再生能力をもっていたのであれば、眠ってしまった再生能力を再活性化させるだけで、失われた手足を元通りに再生できるようになるかもしれない。

1.2 生物のもつ再生能力

再生能力を知るためには、まず再生できる生物を調べることが基本である。数多くいる生物の中で、植物は特に優れた再生能力を持っており、適切な環境に置くことで一つの体細胞から新しい個体を生みだすことができる ([Steward et al., 1958](#); [Vasil and Hildebrandt, 1965](#))。動物では、扁形動物のプラナリアや刺胞動物のヒドラ、棘皮動物のヒトデが高い再生能力を持っており、体の一部から全身を再生させることができる ([Handberg-Thorsager et al., 2008](#); [Vogg et al., 2019](#); [Wolff and Hinman, 2021](#))。しかし、ヒトデと同じ棘皮動物であるウニは、比較的再生能力は低いことが知られている ([Medina-Feliciano and García-Arrarás, 2021](#))。節足動物では、不完全変態する昆虫のゴキブリやコオロギ、甲殻類のエビやカニが肢を再生できる。これら動物の再生は脱皮が鍵であり、一生脱皮でき、肢を再生できるエビやカニに対して、脱皮をしない成虫のゴキブリやコオロギは、肢を再生できなくなる ([Mariappan et al., 2000](#); [Bando et al., 2018](#))。脊椎動物では、爬虫類のトカゲが尻尾を再生できると言われているが、再生した尾には骨ではなく軟骨でできた管が形成されるだけであり、完全な再生とはいえない ([Lozito and Tuan, 2017](#))。無尾両生類のカエルも、変態前のオタマジャクシのときは肢を再生できるが、変態後に肢を切断するとスパイクと呼ばれる棒状の軟骨組織が伸びてくるに留まる ([Suzuki et al., 2006](#))。一方で、有尾両生類のイモリやアホロートル（ウーパールーパー）は高い再生能力を持っており、肢や尾だけでなく脳、眼、顎、心臓などを損傷しても再生することができる ([Joven et al., 2019](#))。哺乳類であるマウスやヒトの再生能力は極めて限定的であり、指

先や肝臓などの限られた部分しか再生できない ([Johnson and Lehoczy, 2022](#))。しかし、怪我をすると瘢痕 (scar) が残ってしまうヒトの不完全な皮膚再生とは異なり、同じ哺乳類であるトゲネズミは大きな皮膚損傷に対して瘢痕を残さずに再生できることが知られている ([Madena and Varholick, 2020](#))。本研究で使用している硬骨魚類のゼブラフィッシュは、有尾両生類と同等の高い再生能力をもっており、鰭のほかに脳、眼、心臓、腎臓など様々な器官を再生できる ([Marques et al., 2019](#))。

このように、近縁の生物種でも再生能力に差があること、同一種でも再生できる場所とできない場所があること、発生が進むと再生できなくなったりすることが知られているが、再生メカニズムには未だに多くの謎が残っている。例えば、なぜ生物・組織によって再生能力は異なるのか、再生した部分の細胞はどこから来たのか、再生の開始・調節・終了を制御するシグナルは何か、元の形や大きさを細胞はどうやって知なのか、など次々と疑問が浮かんでくる。もし、これらの問いにすべて答えることができれば、再生医療の更なる発展が期待でき、我々ヒトでも、失われた組織を自由自在に元に戻せる日が来るかもしれない。

1.3 モデル生物としてのゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、インド原産の熱帯に生息する体長約 5 cm の淡水魚であり、前述のように優れた再生能力をもつほか、モデル生物としても優れた点をもつ。まず、①飼育や繁殖が容易な点であり、週に一度の掛け合わせで数百個の卵を産むため、化合物のハイスループットスクリーニングなども可能である ([Lessman, 2011](#))。また、②胚が透明で、個体の発生は体外で進み、器官形成が約 1 日と早期に完了すること、③約 17 億塩基対のゲノムが決定されており、ヒトの遺伝子と 70–80% が相同であること ([Howe et al., 2013](#)) が挙げられる。さらに、④誘発突然変異体スクリーニングにより同定された変異体が多く存在し ([Driever et al., 1996](#))、遺伝子組換えによる逆遺伝学的な手法も容易であること ([Kawakami et al., 2004](#))、⑤世代時間が 2–3 か月と短いこと (アフリカツメガエルは 1–2 年) なども特徴として挙げられる。鰭については、⑥ヒトの肢の相同器官とされていること ([Nakamura et al., 2016](#))、⑦ヒトに比べて組織が単純であり、観察やアクセスがしやすいこと、⑧比較的短時間である 2 週間ほどで再生できること (イモリの肢は 2 か月以上) が挙げられる。従って、発生生物学や実験発生学だけでなく、近年めざましく発展している分子生物学や生化学、遺伝学など、多くの分野を横断して解析が可能なゼブラフィッシュは、他の生物に類を見ない優れた解析モデルといえる。

ゼブラフィッシュの発生過程については、ここでは、胚 (embryo)、幼生 (larva)、稚魚 (juvenile)、成魚 (adult) に分けて記述する (図 1)。受精してから孵化するまでを胚期といい、受精卵は直径 1 mm ほどであり、胚は受精後 2–3 日 (days post fertilization, dpf) で卵膜 (chorion) から孵化する。幼生期は、鰭条と呼ばれる鰭の支持体が生え揃うまでを指し、受精後約 2 週間から生えはじめる鰭条は 1 か月ほどで生え揃う。また、幼生尾部において鰭条は、腹側に位置する特定の領域から形成される。そこから次世代を産める成魚になるまでを稚魚期といい、途中で鱗 (scale) が生え、体長はおよそ 1 cm から 5 cm にまで成長する。成魚の寿命は 3–5 年ほどだと言われている。

1.4 ゼブラフィッシュ尾鰭の構造と再生

ゼブラフィッシュ成魚の尾鰭 (caudal fin) は、前述の通り、体外で発生が進み、生涯を通じて透明であることから、個体の発生・再生過程において細胞を追跡するのに適している。また、尾鰭は滑らかに湾入した V 字形をしており、放射状に伸びた骨組織である鰭条 (fin ray) によって支えられている (図 2) ([Tu and Johnson, 2011](#))。鰭条は、尾鰭に 16–18 本あり、鰭条を拡大して観察すると規則的に節 (joint) が存在し、鰭の先端に向かって数回分岐していることが分かる。鰭条の断面をみると、弧を描いた形の hemiray が向かい合わせになっており、間葉 (mesenchyme) が隙間を充たし、それらを上皮 (epidermis) が覆っている。鰭条の中心には動脈 (artery) が通っており、鰭条間 (inter-ray) 領域に静脈 (vein) が通っている (図 2)。幼生期の膜鰭 (fin fold) は、尾鰭より単純な構造をしており、上皮と間葉の間には鰭条骨の代わりに、主にコラーゲン繊維からなるアクチノトリキア (actinotrichia) が放射状に伸びて膜鰭を支えている (図 3) ([Kuroda et al., 2018](#))。

鰭の再生過程は大きく分けて、①傷上皮 (wound epidermis) の形成 ②再生芽 (blastema) の形成 ③再生芽細胞の増殖とパターン形成の 3 つのステップからなる (図 4)。鰭の切断後、まず 1 日で傷口を上皮が覆い、肥厚化した特殊な組織である傷上皮になる。2 日目には、傷上皮の誘導により、増殖性の細胞集団である再生芽が形成される。その後、再生芽細胞が増殖しながら鰭のパターンを再形成し、2 週間ほどで鰭は元通りになる ([Yoshinari and Kawakami, 2011](#))。このように、再生芽の細胞を増殖させながら残存組織に新たな組織を付け加えていくような再生様式を付加再生 (epimorphosis) といい、イモリやアホロートルの肢の再生も同じ様式である。対して、プラナリアやヒドラの再生は、形態調節 (morphallaxis) と呼ばれ、残存組織の細胞が脱分化を経て、断片を小さな個体に再編成した後、成長して元の大きさに戻るといった再生様式である。ほかにも、ラットの肝臓再生では主に代償性肥大 (compensatory hypertrophy) という再生様式がとられる。これは残存細胞一つ一つが、肥大することで器官としての機能を補う (代償する) 再生様式である。

1.5 器官再生と位置情報

器官・組織の再生において重要なことの一つは、細胞がそれぞれ自分の位置情報 (positional information)、つまりは、住所を把握することである。もし、手をつくる細胞が手と腕の住所を勘違いすると、腕の途中から手が生えてきてしまうことが考えられる。そうならないように細胞は常に自分の置かれている位置を把握し、適した順番で、適した組織を作る必要がある。その位置情報を定める方法としては、直接的な細胞同士の接触のほか、間接的なモルフォゲン (morphogen) による濃度勾配が知られている ([Huizar et al., 2020](#))。例えば、拡散性のあるモルフォゲンが組織の片側から分泌され、もう一方ではモルフォゲンを分解する分子が分泌されているとする。すると、その間にはモルフォゲンの濃度勾配が形成され、細胞はそのモルフォゲンの濃度に対応した位置を知ることができる。

位置情報の存在については、ゴキブリの肢の逆挿入再生やイモリの肢移植による過剰肢形成の実験 ([Bryant et al., 1977](#)) などから示唆されている。さらに、アホロートル (*Ambystoma mexicanum*) 四肢の先端側再生芽を基部側切断面に移植する実験から、細胞は元の位置情報にある程度記憶していることも分かっている ([Nacu et al., 2013](#))。一方で、ゼブラフィッシュの尾鰭を用

いて、先端側再生芽を基部側切断面に移植した実験では、再生した鰭条全体に移植細胞由来の蛍光が観察された ([Shibata et al., 2018a](#))。つまり、ゼブラフィッシュの尾鰭の基部から先端にかけて位置情報は記憶されない、もしくは再生芽移植でリセットされるほど弱いことが示唆された。

1.6 器官再生と細胞系譜

細胞の位置情報が分かったとして、どの細胞が増殖して再生部分を形成していくのかは決まっているのだろうか。有性生殖をおこなう生物の多くは、一細胞の受精卵から発生し、細胞の分裂と分化を経て、成体まで成長する。このような細胞の分裂と分化、一連の流れをまとめたものは細胞系譜 (cell lineage) と呼ばれ、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) では受精卵から成体に至るまで細胞 959 個すべての系譜が明らかになっている ([Sulston et al., 1983](#))。ゼブラフィッシュの鰭再生も同じく、細胞の分裂と分化を経て進んでいくが、多能性をもつ幹細胞が鰭のどこかに存在し、その細胞が自己増殖しつつ各細胞に分化することで鰭を再生しているのか、それとも、残存組織の細胞が、同種の細胞をそれぞれ独立に供給することで鰭を再生しているのだろうか。これらの疑問に答えるには、何らかの方法で他の細胞と区別し、鰭再生を通じて細胞を追跡する必要がある。

Tu らは *Tol2* 転移システムを利用して、ゼブラフィッシュ初期胚の細胞をランダムに緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識した ([Tu and Johnson, 2011](#))。 *Tol2* 転移システムは、ミナミメダカ (*Oryzias latipes*) 由来の DNA 型トランスポゾン *Tol2* を利用したシステムであり、 *Tol2* の両端にある数百 bp のシス調節配列に挟まれた部分は、ゲノム上のランダムな位置に挿入される ([Kawakami et al., 2004](#))。Tu らは、 *Tol2* 配列の間に全身の細胞で GFP 発現を誘導する配列を組み込んだプラスミドを作製し、transposase mRNA とともにゼブラフィッシュ初期胚に注入した。組み換えられた (標識された) 細胞では GFP が発現しつづけるため、細胞が絶えるまでは他の細胞と識別できる。初期胚で GFP 標識された細胞は、成魚尾鰭において様々な種類の細胞クローンを形成していた。さらに、鰭再生を通じてそれらクローンの種類が変わるのか調べたところ、上皮細胞は上皮細胞、繊維芽細胞は繊維芽細胞、骨を作る骨芽細胞は骨芽細胞のみを生じていた。つまり、通常の鰭再生では、多能性をもつ幹細胞が再生組織の細胞を全部生みだすわけではなく、既存の細胞が同種の細胞を生みだすこと、また、上皮細胞が繊維芽細胞になったり、繊維芽細胞が骨芽細胞になったり、分化転換 (trans-differentiation) することではなく、細胞の運命 (fate) は制限されていることが示唆された。

Kragl らは、全身で GFP を発現しているアホロートルの肢から採取した様々な組織を、通常の個体に移植することで、肢再生時に移植した細胞がどの細胞種に寄与するのかを調べた ([Kragl et al., 2009](#))。表皮 (epidermis) や筋肉 (muscle) を移植した場合、再生肢の表皮、もしくは筋肉のみで GFP 蛍光が観察され、Tu らの結果と同じく、再生時に細胞は同種の細胞だけを再生した。つまり、移植した細胞は元いた組織のアイデンティティに制限されることを示している。ただし、例外的にアホロートルの真皮 (dermis) は若干の柔軟性が見られ、筋肉には寄与しなかったが、真皮と軟骨の両方に寄与した。このことは、真皮と軟骨は同じ側板中胚葉由来であり、再生芽において共通の前駆細胞または組織幹細胞を経由する可能性があることを示唆している。

1.7 骨と骨芽細胞

人体において最大の器官は骨であり（総体重の 15–20%，約 10 kg），幼児では 270 個，大人は 206 個の骨が存在する。骨の機能としては，身体の支持・運動，内臓の保護，造血，聴覚，カルシウムやマグネシウムの貯蔵，血中 pH の緩衝，内分泌などがあり（[Florencio-Silva et al., 2015](#)），物理的機能のほかにも生理的機能など，幅広い役割を持つ重要な器官である。ヒトでは，骨の再生は指先や骨折部分の接着・修復に限られ，骨を大きく欠損すると再生することはできない。しかし，アホロートルやイモリは肢を欠損しても再生でき，ゼブラフィッシュも鰭を再生できる。従って，これらの動物は骨再生研究の重要なモデルとなる。

骨の起源は，今から約 5 億年前に出現した甲冑魚（甲皮類，ostracodermi）に遡るとされ，その名の通り，全身や頭部に鎧のように皮骨（dermal bone）を発達させて身を守っていた。その皮骨の元となるカルシウム分は海水中に豊富に存在しており，そこで甲冑魚は，体内で過剰となったカルシウム分を，エネルギー源であるリン酸と結合して真皮に沈着させることで，排泄と防御を同時に実現したとされている（[後藤, 1997](#)）。このように，直接骨を形成する方式は膜性骨化（intramembranous ossification）といい，間葉細胞が骨芽細胞に分化して骨化を進める。ヒトでも頭骨や鎖骨などで観察することができる。椎骨や四肢骨などでは，内軟骨性骨化（endochondral ossification）といい，間葉細胞が軟骨細胞に分化し，軟骨原基を形成したところに骨芽細胞が侵入して，軟骨細胞と置換しつつ徐々に骨化していく方法がとられている。膜性骨化では薄く平たい骨を作ることを特徴としているため応用性が低かったが，進化の過程で柔軟に形を変えられる軟骨組織を鋳型に骨化することで太く長い骨を作れるようになり，それを軸に海中から陸上に進出する原動力になったと考えられている（[後藤, 1997](#)）。

骨芽細胞（osteoblast）は骨を形成できる唯一の細胞であり，成熟した骨芽細胞は単核で有糸分裂像をもたず（[楠原, 1978](#)），寿命は数ヶ月程度であると考えられている（[Mizoguchi and Ono, 2021](#)）。骨芽細胞は，骨の表面に存在し，リン酸（ PO_4 ）とカルシウム（Ca）をヒドロキシアパタイト（hydroxyapatite）の形で I 型コラーゲン（type I collagen）が主成分のコラーゲン繊維に沈着，結晶化させて骨化を進める。その後，骨芽細胞はアポトーシスするか，活動を停止した休止骨芽細胞（bone lining cell, BLC）（[小澤, 1998](#)）になるか，骨基質に埋もれ骨細胞（osteocyte）となる（[Mizoguchi and Ono, 2021](#)）。

骨芽細胞は，骨を分解（吸収）する破骨細胞（osteoclast）とともに，常に骨を代謝・リモデリングしており（[Berendsen and Olsen, 2015](#)），骨を形作るときだけでなく恒常的に補充される必要がある。その骨芽細胞の供給源としては，休止骨芽細胞 BLC の再活性化，骨芽細胞の脱分化（de-differentiation），骨髄間質細胞（bone marrow stromal cell）からの分化（[Charbord, 2010](#)）が挙げられる。骨芽細胞の脱分化は，骨芽細胞が一旦脱分化して増殖能を取り戻し，分裂しながら骨芽細胞に再分化（re-differentiation）することで骨芽細胞を供給する経路である（[Knopf et al., 2011](#)）。最近では，軟骨の成長板（growth plate）に存在する骨格幹細胞（skeletal stem cell）が骨芽細胞に分化できること（[Mizuhashi et al., 2018](#); [Hallett et al., 2019](#)），軟骨膜細胞（perichondrial cell）や肥大軟骨細胞（hypertrophic chondrocyte）

が骨芽細胞に分化転換できることも示されており ([Maes et al., 2010](#); [Yang et al., 2014](#); [Giovannone et al., 2019](#)), 骨芽細胞の新たな供給源とされている。個体発生における骨芽細胞の起源としては, 外胚葉由来の神経堤 (neural crest) や中胚葉由来の硬節 (sclerotome), 側板中胚葉 (lateral plate mesoderm) が知られており ([Tani et al., 2021](#)), 神経堤は頭部骨格, 硬節は椎骨, 側板中胚葉は四肢骨の形成に寄与するとされている。このように, 骨芽細胞には複数の供給源・起源があることから, 硬い骨を作る能力は比較的柔軟に獲得できる形質だと考えられる。

1.8 ゼブラフィッシュ骨芽細胞の系譜解析

ゼブラフィッシュは生涯を通じて身体が透明で観察しやすく, 遺伝子組換え体 (transgenic zebrafish, Tg) の作製も容易であることから, 細胞を追跡して系譜を解析するのに適している ([Shibata et al., 2018b](#))。そこで Knopf らは, Tg を用いて, 尾鰭が再生する際の骨芽細胞はどこから供給されるのか調査した ([Knopf et al., 2011](#))。使用した Tg は骨芽細胞で差次的に発現する 3 つの遺伝子 *runx2* (*cbfa1*), *osterix* (*sp7*), *osteocalcin* (*bglap*) の制御下に蛍光タンパク質のコード配列を導入したものであり, 遺伝子の発現変動を蛍光強度でモニターできる。マウスにおいて *Runx2* (*Runt-related transcription factor 2*) は前骨芽細胞 (preosteoblast) のマーカー, *Osterix* は骨芽細胞の中期分化マーカー, *Osteocalcin* は後期分化マーカーとされている ([山田・林, 2006](#))。作製された Tg の尾鰭を観察すると, マウスと同様に *runx2* はほとんど発現していなかったが, *osteocalcin* は強く発現していた ([Knopf et al., 2011](#))。次に鰭を切断すると, *osteocalcin* の発現は徐々に低下していったのに対し, *runx2* の発現は切断後 2 日目から急上昇した。さらに, 骨芽細胞で DNA 合成 (有糸分裂) が観察されたこと, 骨芽細胞の追跡によって骨芽細胞は骨芽細胞のみを生み出したことから, 骨芽細胞はその系統を維持したまま一時的に脱分化して増殖し, 再生鰭の新たな骨芽細胞を生み出すことが示された。

それでは, 細胞の運命は完全に制限されているのだろうか。そうであれば既存の骨芽細胞をすべて取り除いた状態で鰭を切断した場合, 骨ならびに鰭は再生できなくなると考えられる。そこで Singh らは, NTR/MTZ システムを用いて, 鰭条骨の *osterix* (*sp7*) 陽性骨芽細胞を遺伝学的に除去した後に, 鰭を切断した。すると, 骨芽細胞が除去された鰭であっても再生が進んだだけでなく, 対照群と同じ速度で再生した。さらに, 鰭の残存部分に骨芽細胞がないにもかかわらず, 再生部分には骨芽細胞がどこからともなく出現していた ([Singh et al., 2012](#))。すなわち, 既存の骨芽細胞の脱分化以外に骨芽細胞を供給できる細胞の存在が示唆された。NTR/MTZ システムは, 還元酵素 NTR (nitroreductase) が無毒な低分子化合物 MTZ (metronidazole) を細胞毒性のある物質に変えることで細胞を特異的に除去 (ablation) するシステムである。

Singh らによって示唆された骨芽細胞の供給源の一つとして, 骨芽前駆細胞 (osteoblast progenitor cell, OPC) が Ando らによって同定された ([Ando et al., 2017](#)) (図 5)。非切断時の OPC は, 鰭条関節 (joint) に局在する *matrix metalloproteinase 9* (*mmp9*) 陽性, *sp7* 陰性の細胞である。鰭再生時には, 切断面近くの関節にいる OPC が自己増殖して, 再生部分の鰭条関節を形成しつつ, 新たに *sp7* 陽性の骨芽細胞や休止骨芽細胞 (BLC) を産生していた。また,

再生芽（間葉）移植実験から、OPC は除去しても近くの間葉細胞（mesenchymal cell）によって補充されること、体節移植実験から鰭条の OPC や骨芽細胞、間葉細胞は体節に由来することが明らかになった（[Ando et al., 2017](#)）。以上のことから、OPC や間葉細胞は鰭条に維持されており、骨芽細胞の産生を支えていることが示された。

1.9 本研究の目的と結果の概要

マウスの研究によって、骨格の重要な構成成分である骨芽細胞や軟骨細胞は、骨格幹細胞（SSC）や骨髄間質細胞（BMSC）などの間葉細胞によって供給されることが分かっている。ゼブラフィッシュにおいても、骨芽細胞が骨芽前駆細胞（OPC）や付近の間葉細胞によって供給されることが分かっている。しかし、これら骨格の細胞を供給する間葉細胞の起源や系譜関係について、個体の発生過程を通じた一貫した解析はできていない。そこで本研究では、ゼブラフィッシュ尾鰭を形成する間葉細胞について生涯を通じて追跡し、間葉細胞、骨芽細胞、軟骨細胞の系譜関係を一貫して解析することを目的とした（図 6）。

その結果、本研究では、以下の点を明らかにした。

- ①鰭を形成する間葉細胞には、3 つの系譜、骨芽系譜、軟骨芽系譜、混合系譜が存在すること
- ②骨芽細胞産生にコミットした骨芽系間葉細胞（osteogenic mesenchymal progenitor, OMP）、および軟骨芽細胞産生にコミットした軟骨芽系間葉細胞（chondrogenic mesenchymal progenitor, CMP）が存在すること
- ③骨芽系譜、軟骨芽系譜の運命は受精後 1 日までに決定しはじめ、鰭再生を含めた生涯を通じて互いに変わらず維持され続けること

骨と軟骨の産生にそれぞれコミットされた間葉細胞 OMP と CMP は、骨格組織の形成と維持、再生を協調して司る組織幹細胞であると考えられる。これらは、骨・軟骨再生の研究において重要な標的となることが期待できる。

第2章 実験の材料と手法

2.1 ゼブラフィッシュの系統

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の野生型として、当研究室で 10 年以上にわたり継代されている Tübingen 由来の系統を使用した。遺伝子組換えゼブラフィッシュ (Tg) は以下のものを使用した。

TgBAC(mmp9:EGFP-NTR)^{tyt207} は, *matrix metalloproteinase 9 (mmp9)* 遺伝子を含む細菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) の CH211-269M15 に, EGFP-NTR 融合タンパク質をコードした配列 ([Grohmann et al., 2009](#)) とメダカ由来トランスポソンの *Tol2* 配列を組み込み, transposase mRNA とともに受精卵に注入して作製された ([Ando et al., 2017](#))。以後 *Tg(mmp9:NTR)* とする。この Tg は *mmp9* 陽性細胞 (主に骨芽前駆細胞 OPC) を選択的に除去できる。EGFP (Enhanced green fluorescent protein) はオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) から発見された緑色蛍光タンパク質 (GFP) を改変して得られた蛍光タンパク質である ([Zhang et al., 1996](#))。NTR (nitroreductase) は, 大腸菌 (*Escherichia coli*) で発現している芳香族ニトロ化合物の還元酵素であり, プロドラッグ metronidazole (MTZ) を細胞毒性のある物質に代謝する ([Bridgewater et al., 1995](#))。

Tg(Ola.Sp7:mCherry)^{tyt209} は, ミナミメダカ (*Oryzias latipes*) 由来の *Sp7 (Osterix)* プロモーターの制御下で mCherry を発現する Tg であり, 骨芽細胞で赤色蛍光を発する ([Ando et al., 2017](#))。以後 *Tg(sp7:mCherry)* とする。mCherry はイソギンチャクモドキ (*Discosoma sp.*) から発見された DsRed を改変して得られた赤色蛍光タンパク質である ([Shaner et al., 2004](#))。

Tg(Ola.Actb:LOXP-TagBFP-LOXP-EGFP)^{tyt211} は, メダカ由来 β -actin プロモーターの制御下で TagBFP を発現する Tg であり, 未組換え個体ではほぼすべての細胞で青色蛍光を持つ ([Ando et al., 2017](#); [Yoshinari et al., 2012](#))。DNA 組換え酵素 Cre によって順向きの *loxP* 配列に挟まれた *TagBFP* は切り取られ, 以降は下流の *EGFP* を転写・翻訳, 緑色蛍光を発するようになる。以後 *Tg(actb:BSG)* とする。TagBFP はサンゴイソギンチャク (*Entacmaea quadricolor*) から発見された eqFP578 を改変して作られた青色蛍光タンパク質である ([Subach et al., 2008](#))。

Tg(actb2:LOXP-TagBFP-LOXP-DsRedExpress)^{sd27} は, *Tg(actb:BSG)* と同様に, ほぼすべての細胞で青色蛍光を発するが, Cre で組み換えられた細胞は DsRed-Express の赤色蛍光を発する ([Kobayashi et al., 2014](#))。以後 *Tg(actb2:BSR)* とする。Zebrafish International Resource Center (ZIRC) から取り寄せた。DsRed-Express は DsRed を改変して得られた赤色蛍光タンパク質である ([Bevis and Glick, 2002](#))。

Tg(cryaa:EGFP, sox9a:Cre-ERT2) は, 眼の水晶体で緑色蛍光を発する *crystallin alpha A (cryaa)* :EGFP 配列と, *SRY-box transcription factor 9a (sox9a)* プロモーターの制御下で融合タンパク Cre-ERT2 ([Feil et al., 1997](#)) を発現する配列を組み込んだ Tg であり, 未組換え個体は眼でのみ緑色蛍光を発する。*lox* 配列をもつレポーター Tg と掛け合わせて組換えを誘導することで, 特定の細胞において遺伝子発現を変えることができる。以後 *Tg(sox9a:Cre)* とする。組換え効率の低い Tg を *Tg1 (tyt229)*, 組換え効率の高い Tg を *Tg2 (tyt230)* とする ([Komiya et al., 2024](#))。

2.2 ゼブラフィッシュの飼育と尾鰭切断

ゼブラフィッシュは明 14 時間, 暗 10 時間の照明周期, 水温 28.5℃の循環濾過システムで飼育した。受精後 2 週間までは飼育水に egg water (60 mg/L artificial sea salt, 0.5 mg/L methylene blue in water) を使用し, 餌はブラインシュリンプの破碎液で培養したゾウリムシと粉餌 (Gemma Micro ZF 75) を適宜与えた。以後, 特に言及しない限り, 試薬は Milli-Q 水 (Merck) に溶かした。受精後 2 週間以降は循環濾過システムに設置し, 2 日間エアレーションして孵化させたブラインシュリンプを朝夜 2 回与えた。成魚は昼に粉餌 (Gemma Micro ZF 300) を追加で与えた。

尾鰭の切断は受精後 2-10 か月のゼブラフィッシュ成魚を用いた。150 mg/L tricaine (3-aminobenzoic acid ethyl ester, 東京化成工業) in egg water に移し, しばらくして反射が消失したのを確認してから, 解剖用メスを用いて尾鰭を切断した。その後, 飼育水に移して鰓呼吸が再開したのを確認後, 循環濾過システムに戻して尾鰭を再生させた。すべての動物実験は東京工業大学における実験動物に関する指針に則っておこなった。

2.3 トランスジェニックゼブラフィッシュの作製

Tg1(sox9a:Cre-ERT2) は以下の手順で作製した。*sox9a* 遺伝子を含む BAC CH73-314D5 を鋳型として, *sox9a* の開始コドンから上流 5 kb を *Sfi* I, *Fse* I サイトを付けて PCR で増幅した。この PCR 産物を pCR Blunt II-TOPO ベクター (Invitrogen) に挿入し, コンピテントセル DH5α (Takara) に形質転換後, プレートに播いて目的配列をもったコロニーをスクリーニングした。スクリーニングしたコロニーは培養後, QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミド精製し, インサート部分を上記の制限酵素で切り出した。切り出されたインサートは *pT2(cryaa:EGFP, hsp70l:Cre-ERT2)* (*tyt232Tg*, 未発表) の *hsp70l* プロモーター配列と置換し, *pT2(cryaa:EGFP, sox9a:Cre-ERT2)* コンストラクトを作製した。*Tg2(sox9a:Cre)* は *Sfi* I, *Fse* I サイトではなく, *Sfi* I, *Sfi* I' サイトを付けて BAC から PCR された。以降は同様にコンストラクトを作製した。*pT2* はミナミメダカ (*Oryzias latipes*) 由来の DNA 型トランスポゾン *Tol2* の両端部分を組み込んだプラスミドベクターであり, *Tol2* 配列の間に組み込んだ配列は transposase によってゲノム上のランダムな位置に挿入される。

作製したコンストラクトは, 35 ng/μL の濃度で注入液に加えられ, 野生型の 1-2 細胞期受精卵に顕微注入された。注入液の組成は, 0.2 M KCl, 5 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 25 ng/μl transposase mRNA, 0.25% phenol red である。コンストラクトの注入前に, 採卵した卵を 10 mg/mL pronase (actinase E, 科研製薬) を適量加えた egg water に移し, 28℃でしばらく保温した。卵膜 (chorion) が柔らかくなったことを確認した後, egg water 入りの洗瓶を用いて水替えしつつ, 水流で卵膜を取り除いた。

コンストラクト注入胚は founder 0 (F0) 候補として, PS/E3 buffer (1 × penicillin-streptomycin solution, 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄) を入れたガラスディッシュで 3 日間飼育し, 以降は通常通り飼育した。F0 候補は, 野生型と掛け合わせて得られた胚を 2 日間飼育した後, *cryaa:EGFP* を遺伝子導入マーカーとして眼に緑色蛍光をもつ

F1 をスクリーニングした。F0 は挿入遺伝子をモザイクにもち、生殖系列 (germline) に遺伝子が導入された場合のみ、次世代に受け継がれる。つまり、F1 からは全身に挿入遺伝子をもっていることが予想される。さらに、F1 とレポーターTg を掛け合わせて得られた F2 胚に組換えを誘導し、安定してよく組み換わる系統を継代した。実験には遺伝子を安定に保持、発現する F2 以降を用いた。

以下に使用したプライマーを記載した。制限酵素の認識配列は大文字、相同配列は小文字で示してある。*Sfi* I と *Sfi* I' は同じ制限酵素で切断されるが、下線部の配列が異なるために出現する粘着末端も異なる。F, forward primer. R, reverse primer.

Sfi I *sox9a* promoter F: 5'-GGCCAGATGGGCCaaccggagcaccagaggaaac-3'

Fse I *sox9a* promoter R: 5'-GGCCGGCCgcgaacaccgtagatggacgatctcag-3'

Sfi I' *sox9a* promoter R: 5'-GGCCCATATGGCCgcgaacaccgtagatggacgat-3'

2.4 Cre-loxP システムによる遺伝子組換え

Cre-loxP システムとは、バクテリオファージ P1 由来の DNA 組換え酵素 Cre とその認識配列 *loxP* (34 bp) によって生じる遺伝子組換え反応であり (図 7), 元はファージが大腸菌内でファージゲノムを環状化するために使用されるシステムである (Abremski and Hoess, 1984)。Cre によって、順向きの *loxP* 部位に挟まれた配列は環状に切り出されるが、逆向きの場合は挟まれた配列の向きが可逆的に反転する。

本研究で使用したレポーター Tg (*Ola.Actb:LOXP-TagBFP-LOXP-EGFP*) は、メダカ由来 β -actin プロモーターの制御下に、順向きの *loxP* で挟まれた *TagBFP* が存在し、ほぼすべての細胞で *TagBFP* が発現して青色蛍光をもつ (Ando et al., 2017; Yoshinari et al., 2012)。Cre Tg と掛けて組換えを誘導すると、*loxP* 部位に挟まれた *TagBFP* のコード配列がほぼ不可逆的に切り出され、代わりに下流にある *EGFP* が転写・翻訳されるようになる。以降、 β -actin プロモーターによって *EGFP* が発現されつづけるため、細胞の増殖・分化後も細胞が絶えるまで緑色蛍光によって追跡でき、細胞系譜を解析することができる (図 7)。本研究では、Cre によってレポータータンパク質の発現が *TagBFP* から *EGFP* に切り替わり、以後 *EGFP* が発現し続けることを *EGFP* 標識 (label) されたという。

Cre Tg で使用した融合タンパク質 Cre-ERT2 (Feil et al., 1997) は、DNA 組換え酵素 Cre と核内受容体 Ert2 (t2 変異をもった estrogen receptor) からなり、内在性の estrogen による非特異的活性化が抑えられている。代わりに、外部から投与する tamoxifen 依存的に ERT2 が活性化し、Cre とともに核内に移行することで遺伝子を組み換えることができる。

操作としては、まず Cre Tg とレポーターTg を掛け合わせ、Cre と *loxP* の両遺伝子を併せもつ受精後 0 日胚を用意した。その後、5 μ M 4-hydroxytamoxifen (TAM, Sigma) in egg water に胚を入れて、1 日間組換えを誘導した。翌日、容器に pronase を適量加えてしばらく保温し、卵膜を消化した。柔らかくなった卵膜を水替えて除去しつつ、同時に TAM の洗浄もおこなった。

2.5 イメージングとタイムラプス細胞系譜追跡

3D ライブイメージングでは、麻酔後の魚を 2%アガロースで作製した台に乗せ、1.5%低融点アガロ

ースを滴下して封入した。サンプルが乾かないよう麻醉液でゲル表面を覆い、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM780, Zeiss) の 40×水浸レンズを使用して観察した。撮影は Z-stack という手法を用い、焦点面を変えて積み重ねた約 50–60 枚 (厚さ 50–60 μm) の画像データを取得した。その後、最大値投影 (maximum intensity projection) 法を用いて、三次元的に被写体を再構築した。細胞の位置と形状は、合成した光学切片 (optical section) 像を使用して解析した。ソフトウェアは ZEN 2.3 (Zeiss) を使用した。固定したサンプルの場合は、サンプルをスライドガラスに置いて 80% glycerol とカバーガラスで封入してから、20×対物レンズで Z-stack 撮影した。この際、サンプルがつぶれないようにビニールテープで適度な厚さの足場を作り、カバーガラスを載せた。

切片の撮影には共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, Olympus) の 20×対物レンズを使用した。一つのサンプルから得られた複数枚の切片はすべて観察し、代表的なものを撮影・掲載した。ソフトは FV10-ASW 4.2 viewer (Olympus) を使用した。

タイムラプス細胞追跡や特に記載がない場合は、蛍光実体顕微鏡 (M205FA, Leica) を使用した。1 dpf から稚魚期までは、麻醉後に 2%アガロース台に乗せ、数滴の麻醉液とカバーガラスで簡易的に封入して撮影した。成魚は麻醉後に 2%アガロース台に乗せてそのまま撮影した。2, 3 dpf の魚は、1 dpf から 30 mg/L 1-Phenylthiourea (PTU, Nacalai) in egg water で飼育し、色素の合成を阻害した。ソフトは LAS X 3.7.0.20979 (Leica) を使用した。

2.6 NTR/MTZ システムによる細胞除去

NTR/MTZ システムは、大腸菌 (*Escherichia coli*) で発現している芳香族ニトロ化合物の還元酵素 nitroreductase (NTR, *nfsB* 遺伝子) が、プロドラッグ metronidazole (MTZ) を細胞毒性のある物質に代謝するシステムである ([Bridgewater et al., 1995](#))。本研究で使用した *TgBAC(mmp9:EGFP-NTR)* は、*mmp9* プロモーターの制御下で EGFP と NTR の融合タンパク質が発現しており、MTZ 処理によって EGFP の緑色蛍光をもった細胞 (主に骨芽前駆細胞 OPC) の細胞死が誘導され、遺伝学的に除去される ([Ando et al., 2017](#))。

Tg(mmp9:NTR) をもつ成魚を 5mM MTZ (東京化成工業) in E3 に移し、暗所で保管した。除去が完了するまで MTZ 溶液は 2 日おきに再調製された。水替えの合間に餌としてブラインシュリンプを与えた。MTZ 処理後、何度か水替えをおこない、MTZ の残留を抑えた。

2.7 Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization (ISH) は、主に Thisse らの方法に則っておこなった ([Thisse and Thisse, 2008](#))。体節期のサンプルは 22℃で一晩保温し、発生を遅らせて採集した。1 dpf のサンプルは、PTU 入りの飼育水で一晩飼育し、色素の合成を阻害してから採集した。この時、PTU は原腸形成後 (受精後 10 時間以降) に使用した。卵膜は pronase を使用して除いた。サンプルは 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma) in PBS を用いて 4℃で一晩固定した。PBS (phosphate-buffered saline) の組成は 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.76 mM KH₂PO₄ である。その後、PBT (0.1% Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan

monolaurate) in PBS) で洗浄, MeOH で脱水後, -20°C で保存した。

次に, 脱水したサンプルを段階的に PBT で再加水し, $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ proteinase K (Roche) in PBT で処理, 4% PFA in PBS で再固定後, PBT で洗浄した。続いて, hybridization buffer (HB) に置換して 70°C で 2 時間保温し, $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ digoxigenin (DIG) 標識 RNA probe in HB に置換, 70°C で一晩 hybridization した。HB の組成は 50% formamide (Gibco), $5\times\text{SSC}$ (saline sodium citrate, 0.75 M NaCl , $75\text{ mM sodium citrate}$), $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ torula yeast RNA (Sigma), $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ heparin (Sigma), 0.1% Tween 20, 9 mM citric acid である。

RNA probe の作製では, 組織から抽出した total RNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型として, 目的配列の下流に T7 プロモーター配列を付けて PCR で増幅した。その後, DIG 標識 UTP を含む DIG RNA Labeling Mix (Roche) と T7 RNA polymerase (Takara) を使用して *in vitro* 転写し, DIG 標識 RNA probe を作製した。

翌日, hybridization を終えたサンプルを 70°C のまま, $2\times\text{SSC}$ に段階的に置換し, さらに $0.2\times\text{SSC}$ に置換した。その後, 常温に戻してから PBT に段階的に置換, 洗浄した。次に, blocking buffer (BB, 2 mg/mL bovine serum albumin, 5% sheep serum in PBT) で 2 時間処理し, BB で 4000 倍希釈した alkaline phosphatase 標識抗 DIG 抗体 (Roche) に置換して 4°C で一晩反応させた。翌日, サンプルを PBT で洗浄した後, NTMT buffer (0.1 M NaCl , $0.1\text{ M tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl}$, 50 mM MgCl_2 , 0.1% Tween 20) に置換した。その後, NBT-BCIP 発色液 ($450\text{ }\mu\text{g/mL}$ nitro blue tetrazolium chloride (NBT, Roche), $175\text{ }\mu\text{g/mL}$ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP, Roche) in NTMT) に置換して発色を開始した。発色を終えたサンプルを PBT で洗浄, 4% PFA in PBT で再固定, 80% glycerol に置換し, プレパラートを作製, 観察した。

DIG 標識 RNA probe の作製に使用したプライマーは以下の通りである。T7 プロモーター配列は大文字, 相同配列は小文字で示してある。F, forward primer. R, reverse primer.

sox9a probe F: 5'-atgaatctcctcgaccctacctaagatgacgga-3'

T7 *sox9a* probe R: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGggtctggacagctgcgtgtacaccg-3'

2.8 凍結切片の作製

0–1 dpf に組換えを誘導したトリプル *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7mCherry)* の内, 尾鰭に EGFP 蛍光をもつ個体を成魚まで育てた。その後, 成魚尾鰭を麻酔下で切り取り, 4% PFA in PBS に入れて 4°C で一晩固定した。翌日, サンプルを PBT で洗浄, MeOH で脱水, PBT で段階的に再加水し, 0.45 M EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) in PBS に入れて 4°C で一晩脱灰した。サンプルを PBS で洗浄し, 20% sucrose in PBS で 1 時間処理した。続けて, Tissue-Tek O.C.T. Compound (サクラファインテックジャパン) に包埋し, -20°C で凍結した。凍結包埋したサンプルを, cryostat (Leica CM3050 S) を用いて, $10\text{--}16\text{ }\mu\text{m}$ の厚さの切片にした。作製した切片の包埋剤を PBS で洗浄し, PBS で 1000 倍希釈した DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen) で対比染色した。PBS で洗浄後, 80% glycerol を滴下, カバーガラスを乗せて観察

した。

2.9 免疫蛍光染色

ダブル *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)* を 0–1dpf に組換えを誘導した後, pronase で卵膜を除き, 30 mg/L PTU in egg water で一晚発生を進めた。得られた 2 dpf 胚を 4% PFA in PBS に入れて 2 時間固定し, PBTx (0.1% Triton X-100 (polyethylene glycol tert-octylphenyl ether) in PBS) で洗浄, MeOH で脱水脱脂, PBTx で段階的に再加水した。続いて, PBTx で作製した blocking buffer で 2 時間処理し, 同 BB で 1000 倍に希釈したマウス抗ミオシン重鎖抗体 (MF20, Invitrogen) と 2 時間反応させた。PBTx で洗浄し, BB で 1000 倍に希釈したヤギ抗マウス抗体 (Alexa Fluor 568) (Invitrogen) と DAPI で 4℃で一晚反応させた。アクチノトリキアの染色には 500 倍希釈したマウス抗 COL2 抗体 (II-II6B3, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)) と 500 倍希釈したヤギ抗マウス抗体 (Alexa Fluor 647) (Invitrogen) を使用した。抗体反応後, PBTx で洗浄してから, サンプルの尾部を切り取り, スライドガラスに並べて 80% glycerol を滴下, カバーガラスを乗せて観察した。この際, サンプルがつぶれないようにビニールテープで適度な厚さの足場を作り, カバーガラスを載せた。

2.10 組織分散と蛍光活性化セルソーティング

トリプル *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を用いて, 0–1 dpf に TAM で組換えを誘導した。尾鰭に EGFP 蛍光が見られた個体を成魚まで育て, 実体顕微鏡下で骨芽系譜の標識鰭条と非骨芽 (軟骨芽) 系譜の標識鰭条を識別した。いずれかの標識鰭条を尾鰭にもつ個体を識別し, 尾鰭を切断した。2 週間後, 再生部分の尾鰭を再度切り取り, L-15 培地中で柄付き針を使用しながら, 標識の入っている鰭条を 1 本ずつに切り分けた。切り分けた鰭条はさらに 4–5 等分し, 新しい L-15 培地を入れた 1.5 mL tube に, 系譜ごとに 10–20 本分収集した。L-15 培地の組成は, 1× Leibovitz's L-15 medium, 2 mg/mL bovine serum albumin, 1×penicillin-streptomycin solution である。

集めた鰭条は 0.5% collagenase (Sigma) in L-15 に入れ, 37℃で 1 時間消化した。消化中は 5 分おきに容器をタッピングして液を混ぜた。消化液には近赤外蛍光をもつ死細胞核染色試薬 RedDot2 (Biotium) を添加した。鰭条の消化後, 40 μm メッシュのセルストレーナー (Greiner) に通して鰭条骨や細胞塊を濾過し, 骨芽系譜または非骨芽 (軟骨芽) 系譜の細胞懸濁液を得た。

得られた細胞懸濁液はセルソーター (SH800, Sony) にセットし, 標準的なプロセスによって細胞を分取した。骨芽系譜からは EGFP⁺/mCherry⁺骨芽細胞と EGFP⁺/mCherry⁻骨芽系間葉細胞 (OMP) を, 非骨芽系譜からは EGFP⁺/mCherry⁻非骨芽系 (軟骨芽系) 間葉細胞 (non-OMP, CMP) を分取した。細胞を分取する際は, サンプルチューブ, コレクションチューブともに 5℃に設定し, 100 μm のソーティングチップを使用した。チャンネルは, FSC/BSC/PerCP-Cy5.5 (RedDot2) /FITC (EGFP) /PI (mCherry) を使用し, 多次元的にゲートを設定することで死細胞や細胞片 (debris), 無蛍光細胞を可能な限り除いた。FSC (forward-scattered light, 前方散乱光) は

細胞のサイズ, BSC (back-scattered light, 後方散乱光) は細胞内部の複雑さを主に表すパラメーターである。細胞を分取する前に, *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)* および *Tg(sp7:mCherry)* を用いて, EGFP および mCherry 蛍光の補正をそれぞれおこなった。サンプリングは独立して 2 回実施した。

2.11 RNA-seq とデータ解析

約 30,000 細胞 (events, 検出粒子) を直接 lysis buffer に収集し, RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) を使用して RNA 抽出した。抽出した RNA の品質は 2100 Bioanalyzer (Agilent) を使用して RNA integrity number (RIN) で評価した。基準を満たした RNA サンプルについて, RNA-seq 解析を生物技研 (<https://gikenbio.com>) に委託した。SMART-Seq HT Kit (Takara) を使用して cDNA を合成し, Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) を使用してライブラリを調製した。MGIEasy Circularization Kit (MGI Tech) を使用して DNA を環状化し, DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Kit (MGI Tech) を使用して DNA nanoball を作製した。続いて DNBSEQ-G400 (MGI Tech) を使用して配列を決定した。Hisat2 (ver.2.1.0) を使用してリードをゼブラフィッシュの参照ゲノム配列 (*Danio rerio* GRCz11) にマッピングし, featureCounts (ver.2.0.3) を使用してリード数をカウントした。

RNA-seq の raw data (全 75811 transcripts) には, mRNA 以外に tRNA や rRNA, microRNA などの ncRNA が含まれていたため, mRNA のみを残した (57106 transcripts)。次に, 遺伝子の transcript variant の内, 最も発現量の多いものを残した (26415 transcripts)。さらに, 発現量が少ない transcripts (transcripts per million (TPM) が平均 10 未満) を除いた。残った 4846 transcript から non-OMP/OMP の発現量比が 5 倍以上あるもの (52 transcripts), もしくは OMP/non-OMP の発現量比が 3 倍以上あるもの (96 transcripts) を残してフィルタリングした。さらに, 骨芽細胞/(OMP と non-OMP の平均) の発現量比が 5 倍以上の 79 transcripts も加え, 最終的に 227 個の遺伝子を OMP, non-OMP, 骨芽細胞の発現変動遺伝子 (differentially expressed gene) として同定した。RNA-seq の raw data は, Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) からダウンロードできる (accession number: GSE251757)。ヒートマップは, 遺伝子ごとに計算された z-score を用いて作製した。この際, 遺伝子の発現量 (TPM) が 0 のものは 0.01 に変換して対数を取り, そこから遺伝子の平均発現量を引いた。さらに, 計算後の値を遺伝子の標準偏差 (standard deviation) で割って z-score を算出した。

Gene ontology (GO) 解析は, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/>) ([Huang et al., 2009](#); [Sherman et al., 2022](#)) を用いて, 上記の濃縮された 227 遺伝子についてグループごとに実施した。アノテーションのカテゴリーには Biological Process を使用し, 結果は Functional Annotation Chart で出力した。ランク付けは false discovery rate (FDR) を用いておこない, 対数をとった FDR にマイナスを掛けて並び替え, 上位 5 つの項目 (term) を図に掲載した。

第3章 結果

3.1 *Tg(sox9a:Cre-ERT2)* の作製

ゼブラフィッシュは遺伝子組換え体 (Tg) の作製が容易であり、鱗は生涯透明でアクセスや観察がしやすいことから、細胞系譜の解析に適している ([Shibata et al., 2018b](#))。メダカやゼブラフィッシュの体節移植実験から、成魚の尾鰭は、個体の発生初期に現れる体節 (somite) に由来することが示されている ([Shimada et al., 2013](#); [Ando et al., 2017](#))。本研究では、ゼブラフィッシュの体節細胞を標識して骨芽細胞・軟骨細胞の系譜を調べるために、ゼブラフィッシュの体節で発現しており ([Yan et al., 2005](#))、骨・軟骨形成に関与している可能性の高い遺伝子である *SRY-box transcription factor 9a* (*sox9a*) に注目した (図 8)。マウス *Sox9* は肢芽 (limb bud) の骨軟骨前駆細胞 (osteo-chondroprogenitor) で発現し、骨芽細胞や軟骨細胞を産生すること ([Akiyama et al., 2005](#))、さらに軟骨細胞に分化する際の分化マーカーであること ([Ng et al., 1997](#)) が知られている。また、*Sox9* を肢芽で特異的に欠失させた場合、四肢が完全に欠損することが示されており ([Akiyama et al., 2002](#))、骨・軟骨細胞の系譜に深く関わっていることが予想される。一方で、マウス *Sox9* の相同遺伝子として、ゼブラフィッシュには *sox9a* と *sox9b* が存在する。ゼブラフィッシュの *sox9a/b* 遺伝子は発現パターンに違いはあるものの、どちらも咽頭弓 (pharyngeal arch) (将来の下顎や鰓) や胸鰭 (pectoral fin)、耳胞 (otic vesicle) で発現するのに加えて、*sox9a* は体節 (somite) で強く発現し、*sox9b* は神経堤 (neural crest) で強く発現する ([Yan et al., 2005](#))。

我々は、尾鰭を形成する間葉細胞を標識するために、体節で発現するゼブラフィッシュ *sox9a* の翻訳開始地点から上流 5 kb のプロモーター領域を使用して、*sox9a* プロモーターの制御下で融合タンパク質 Cre-ERT2 ([Feil et al., 1997](#)) を発現する *Tg(cryaa:EGFP, sox9a:Cre-ERT2)* (以後 *Tg(sox9a:Cre)*) を 2 系統 *Tg1*, *Tg2* 作製した ([Komiya et al., 2024](#))。Cre は *loxP* 部位を組み換える酵素であり、ERT2 は TAM 依存的に核内に移行する核内受容体である。作製した Tg はレポーター *Tg(Ola.Actb:LOXP-TagBFP-LOXP-EGFP)* (以後 *Tg(actb:BSG)*) と掛け合わせ、二重に挿入遺伝子をもつダブル *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)* を作製した。得られたダブル Tg は、組換え誘導分子 4-hydroxytamoxifen (TAM) によって組換えを誘導され、EGFP 蛍光が多く観察できた (標識細胞数が多い) 系統をそれぞれ継代した。実験には、挿入された遺伝子を安定に保持、発現する F2 以降を用いた。

3.2 *Tg(sox9a:Cre-ERT2)* は体節細胞を標識できる

体節細胞を標識し、成魚尾鰭を形成する間葉細胞の系譜を解析するため、作製したダブル *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)* に受精後約 8 時間から TAM 処理を開始し、1 日間組換えを誘導した。*sox9a* が主に発現する体節期は受精後 10–30 時間である。得られた受精後 1 日 (days post fertilization, dpf) 胚について pronase 処理して卵膜 (chorion) を除去し、乾燥しないようにアガロースゲルで作った台に置いて蛍光顕微鏡で観察した。その結果、作製した 2 つの *Tg(sox9a:Cre)* において、*Tg2* (*tyt230*) は *Tg1* (*tyt229*) に比べて多くの EGFP 標識細胞が観察された (図 9)。

つまり、*Tg2* は *Tg1* より標識効率が高いことが分かった。

sox9a 陽性の体節細胞で発現が誘導される Cre-ERT2 は、組換え誘導分子 TAM によって核内に移行し、レポーター-Tg の *loxP* 部位を組み換えることで、 β -*actin* プロモーターの制御下で発現する遺伝子を *TagBFP* から *EGFP* に変える。この EGFP 発現は、*sox9a* ではなく β -*actin* によって制御されているため、細胞が増殖や分化を経て *sox9a* を発現しなくなった後も継続される。本研究ではこれを細胞が EGFP で標識 (label) されると表記する。つまり、標識された細胞は絶えるまで緑色の EGFP 蛍光を発するため、個体の発生を通じて細胞を追跡することができる。

sox9a は体節で主に発現するとされているが、*sox9a:Cre* で標識された細胞は体節細胞であるかを調べた。0 dpf から TAM 処理したダブル Tg の 1 dpf 胚を用意し、pronase 処理して卵膜を除去した。麻酔後アガロースゲルの台に乗せ、上から低融点アガロースを垂らして封入した。乾かないように麻酔液の入った飼育水でゲル表面を覆い、共焦点レーザー顕微鏡の 40×水浸レンズを使って、生きたまま Z-stack 撮影した。Z-stack では、焦点面を変えて撮影した画像を積み重ね (stack)、解析ソフト上で被写体を三次元的に再構築できる。再構築した画像の光学切片 (optical section) 像を見ると尾部の体節領域において多くの EGFP 標識細胞が観察された (図 10)。つまり、目的の体節細胞を標識できており、新たに作製した Tg は適切に動いていることが分かった。また、体軸付近の神経管・脊索領域においても EGFP 蛍光が見られたことから、*sox9a* は体節 (沿軸中胚葉) だけでなく、発生的にさらに前の段階で発現していることが示唆された。

3.3 成魚尾鰭を構成する細胞は *sox9a* 陽性体節細胞に由来する

メダカやゼブラフィッシュの体節を移植して成魚での寄与先を調べた実験では、移植された体節細胞は成魚の尾鰭に寄与することが示されている ([Shimada et al., 2013](#); [Ando et al., 2017](#))。そこで、今回新たに作製した *Tg(sox9a:Cre)* で標識した体節細胞は、成魚の尾鰭を形成するのかを調べた。ダブル *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)* を用いて 0–1 dpf に組換え誘導し、成魚まで育てた後に尾鰭における EGFP 蛍光を観察した。その結果、EGFP 蛍光は成魚尾鰭の鰭条に沿って筋状に観察された (図 11)。つまり、体節期に標識した細胞の子孫細胞が成魚尾鰭を形成したこと、鰭を形成する細胞は *sox9a* 陽性の体節細胞に由来することが分かった。標識細胞の尾鰭への寄与度合い (尾鰭 1 枚あたりの標識鰭条数) に関しては、組換え効率の高い *Tg2 (tyt230)* は 11.6 本 (n = 197 本/17 匹) であり、*Tg1 (tyt229)* の 2.5 本 (n = 99 本/40 匹) よりも高かった。このことから、*sox9a* 陽性の体節細胞が尾鰭の形成に大きく寄与することが示唆された。

体節は様々な組織を形成することが知られているが、*sox9a:Cre* で標識された細胞が体のどこに寄与するのかを調べた。成魚の尾鰭 (caudal fin) 以外の組織については、顎 (jaw) や鱗 (scale)、胸鰭 (pectoral fin)、背鰭 (dorsal fin)、臀鰭 (anal fin) などの骨格のほか、体幹筋 (trunk muscle)、生殖細胞 (germ cell) などで標識された EGFP 蛍光が観察された (図 12)。従って、*sox9a:Cre* で標識された細胞は、尾鰭以外にも幅広い組織に寄与することが分かった。

Tg1 と *Tg2* の両方 Tg とも、非特異的な組換えによる EGFP 蛍光は観察されず (幼生 30 匹、成魚 12 匹)、これらの Tg は細胞系譜の追跡に有用であることが分かった。1, 2, 3 dpf のダブル Tg を用

意し、それぞれ 2 時間だけ TAM 処理したところ、成魚で標識鰭条をもっている個体が 9 割の確率で見られた。しかし、5 dpf 以降に組換えを誘導した場合、高効率の系統であっても、標識鰭条をもつ個体の割合は低下し、成魚では組換えによる EGFP 蛍光はまったく観察されなかった (図 13)。また、5 dpf 以降に TAM 処理した場合は、標識細胞が鰭に寄与したすべての魚において、背側および腹側に位置する数本の鰭条のみで EGFP 蛍光が見られた (図 14)。つまり、鰭の中央に位置する短い鰭条を形成する体節細胞は、長い鰭条を形成する体節細胞より早く *sox9a* の発現が低下することが示唆された。ここで、*sox9a* の発現は体節期 (受精後 10–30 時間) 以降、急速に低下するが、1 dpf 以降もしばらくは *sox9a:Cre* で標識できる。この要因としては、Cre が分解されるまで時間差があることや、発生の遅い個体で標識されている可能性が考えられる。

3.4 *sox9a:Cre* 標識細胞の大部分は膜鰭の間葉細胞になる

EGFP 標識された細胞の系譜を詳細に解析するにあたり、体節期に標識された EGFP 陽性細胞が幼生期に何になるのかを調べた。ここで、組換え効率が高い Tg を使用した場合は、隣接した細胞が別々に標識される可能性が高く、一細胞に由来するクローンと区別できない。従って、以後の細胞系譜の解析には、低効率で組換えをおこす Tg1 (*tyt229*) を使用した。また、一部の増殖性の細胞が標識されると割合の評価に影響が出るため、細胞増殖による影響が比較的少ない 2 dpf において標識細胞が寄与した組織を評価した。ダブル Tg1(*sox9a:Cre; actb:BSG*) を用いて 0–1 dpf に組換えを誘導し、1–2 dpf は 1-phenylthiourea (PTU) 処理によって色素合成を阻害した。色素は 1 dpf から合成されはじめる。2 dpf に pronase 処理して卵膜を除去した。その後、組換えによる EGFP 蛍光をもっている個体をランダムに選び、paraformaldehyde (PFA) で 2 時間室温で固定した。続けて、抗ミオシン重鎖抗体 (anti-myosin heavy chain antibody, MF20) で筋肉を染め、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で核を染色した。染色したサンプルは共焦点レーザー顕微鏡で三次元的に観察・解析した。

その結果、標識された細胞の 87% が間葉細胞であり ($n = 405$ 細胞/11 匹)、その多くは、幼生の膜鰭 (fin fold) の間葉細胞に特徴的な、体軸から外側方向に樹状の突起を伸ばす形態 ([Feitosa et al., 2012](#)) をしていた (図 15)。他には少数だが、多角形状をした上皮 (epidermis) や神経管 (neural tube)、脊索 (notochord)、下索 (hypochord) (将来の血管)、MF20 陽性の筋肉 (muscle) で EGFP 蛍光が見られた。つまり、標識された体節細胞の多くは間葉細胞、特に膜鰭の間葉細胞になることが分かった。

3.5 膜鰭の間葉細胞は成魚尾鰭にならない一過的な細胞である

sox9a 陽性細胞の主要な運命の一つが膜鰭の間葉細胞であることが分かったが、膜鰭の間葉細胞が成魚の尾鰭を形成するのかわかっていた。膜鰭は尾鰭を含む正中鰭の由来であるという報告がある一方で ([Miyamoto et al., 2022](#))、5 dpf の膜鰭に存在する細胞からは尾鰭は形成されないという報告もあり ([Lee et al., 2013a](#); [Lee et al., 2013b](#))、尾鰭を形成する細胞の由来については分かっていない。そこで、上記のダブル Tg に Tg(*Ola.Sp7:mCherry*) (以後 Tg(*sp7:mCherry*)) を掛け合

わせ、トリプル *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を得た。そして、鰭条の形成前後において、体節細胞に由来する膜鰭間葉細胞の成魚尾鰭への寄与を調べた。*Tg(sp7:mCherry)* は骨芽細胞で赤色蛍光を発する *Tg* であり、ここでは成魚尾鰭を構成する鰭条のマーカースとして使用した。

上記トリプル *Tg* を用いて 0–1 dpf に組換えを誘導し、組換えによる EGFP 蛍光が見られた個体を 2 dpf に選別した。その後、ランダムに 10–20 匹を選び、個体を識別しながら尾部における鰭条形成過程を数日おきに観察した。その結果、6 dpf において膜鰭領域に位置していた EGFP 陽性の膜鰭間葉細胞は、成長が進むにつれて徐々に膜鰭の端に移動していき、20 dpf には増殖することなく膜鰭の端に消失していった ($n = 15$ 匹) (図 16)。14 dpf には鰭条 (骨芽細胞) のマーカである *sp7* に制御された *mCherry* が発現していたが、緑色の EGFP 蛍光は赤色の *mCherry* 蛍光とも重なっていなかった。つまり、膜鰭の間葉細胞が子孫細胞を残さずに絶えたことを意味し、幼生膜鰭の間葉細胞は成魚尾鰭を形成しないことが明らかになった。膜鰭間葉細胞の消失は観察したすべての個体で見られたことから、個体を取り扱う際の傷害による影響などではなく、生物的にプログラムされた細胞死 (apoptosis) であると考えられる。

3.6 膜鰭基部に位置する少数の細胞が成魚尾鰭を形成する

幼生期の膜鰭間葉細胞は成魚尾鰭を形成しないことを明らかにしたが、図 11 で挙げた成魚尾鰭の例では一部の鰭条で EGFP 蛍光が観察されている (図 11)。つまり、体節期に標識された細胞の内のどれかが成魚尾鰭を形成していることになる。そこで、生涯透明であり細胞追跡に適しているゼブラフィッシュを用いて、標識細胞を尾鰭の発生を通じて追跡し、尾鰭を形成する細胞の由来を解析した。トリプル *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を用いて 0–1 dpf に組換えを誘導し、1 dpf に組換えによる EGFP 蛍光が観察された個体を 10–20 匹ランダムに選択した。その後、選択した個体を識別しながら標識細胞を毎日、もしくは数日おきに成魚になるまで撮影・追跡した。そして、最終的に尾鰭に標識をもった個体において、尾鰭を形成した標識細胞がどこにいたのか、撮影した尾鰭発生過程の写真を遡ることで解析した。その結果、膜鰭間葉細胞ではない一部の間葉細胞が、一定の方向に向かって増殖を繰り返し、最終的に成魚尾鰭の鰭条を形成していることが分かった (図 17)。この鰭条形成細胞は、2–3 dpf の時期までは動かず膜鰭の基部に位置していたが、6 dpf あたりから膜鰭の端に向かって増殖を始めた。14 dpf には、増殖する EGFP 陽性の標識細胞に近接して骨芽細胞の赤色蛍光が観察された。17 dpf 以降も EGFP の緑色蛍光は消えることなく増殖し、成魚尾鰭の鰭条を形成した。つまり、*sox9a* 陽性体節細胞に由来する間葉細胞の内、膜鰭の基部に位置する 1 個から数個の細胞が、クローナルに増殖して一本の鰭条に寄与することが明らかになった。また、鰭を形成する細胞は、体節期に組換えを誘導して EGFP 標識したことから、どこの鰭条に寄与するかという細胞の運命は、標識をおこなった体節期の時点ですでに決まっていることが示唆された。

3.7 成魚尾鰭の鰭条を形成する間葉細胞の系譜は 3 種類ある

成魚尾鰭の鰭条は、主に上皮や骨、間葉で構成されているが (図 2)、尾鰭に観察された EGFP 標識細胞は、鰭条中のどの組織に位置しているのかを調べた。トリプル *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG;*

sp7:mCherry) を用いて 0–1 dpf に TAM 処理し、組換えによる EGFP 蛍光が観察された個体を成魚まで育てた。その後、麻酔下で尾鰭を切り取り、切り取った尾鰭を PFA で固定した。固定された鰭は PFA を洗浄後、脱灰処理によって骨組織を柔らかくし、Tissue-Tek に包埋して cryostat で切片にした。切片のプレパラートを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、成魚尾鰭の鰭条を形成する体節由来の間葉細胞系譜には 3 種類あることが分かった (図 18)。

第一の間葉細胞系譜は、骨芽細胞や骨芽前駆細胞 (osteoblast progenitor cell, OPC) など骨系の細胞を生み出す骨芽系譜 (osteogenic lineage) である。この系譜の標識をもつ鰭条の切片を見ると、鰭条骨 (fin ray bone) の周りに EGFP 標識細胞が局在しており、多くが骨芽細胞マーカーである *sp7* の制御下で mCherry を発現していた (図 18)。さらに、鰭条を横から見ると、*sp7* 陰性の休止骨芽細胞 (bone lining cell, BLC) や、同じく *sp7* 陰性であり鰭条関節 (joint) に局在している OPC ([Ando et al., 2017](#)) でも EGFP 蛍光が観察された。わずかながら、鰭条間の領域に位置する間葉細胞でも EGFP 蛍光が見られた。第二の系譜は、それら骨系の細胞を一切生み出さない非骨芽系譜 (non-osteogenic lineage) である。この系譜では、EGFP 標識細胞の局在が骨芽系譜とまったく異なり、鰭条内部 (intra-ray) や鰭条間 (inter-ray) 領域の間葉細胞でのみ EGFP 蛍光が見られた (図 18)。第三の系譜は、骨芽系譜と非骨芽系譜を合わせたような EGFP 標識が観察される混合系譜 (mixed lineage) である。この系譜では、鰭条骨周囲の骨芽細胞と鰭条内部の間葉細胞の両方で EGFP 標識が見られた (図 18)。

また、これら 3 系譜の割合を調べた、すなわち、*sox9a:Cre* によって標識された間葉細胞はどの系譜にコミットする可能性が高いのかを調べた。合計 76 本の標識された鰭条について、切片を作製して標識の系譜を解析したところ、骨芽系譜は 29% (22 本)、非骨芽系譜は 30% (23 本)、混合系譜は 41% (31 本) であった (図 18)。つまり、どの系譜も同程度の割合で観察されたことから、*sox9a:Cre* で標識された間葉細胞は、標識をおこなった体節期において特定の系譜にコミットされているわけではないことが示唆された。また、成魚において骨芽系譜と非骨芽系譜、ならびに 2 つの系譜の特徴を併せもつ混合系譜が観察できたことから、*sox9a* 陽性の体節細胞に由来した成魚尾鰭を形成する間葉細胞の運命は、標識をおこなった体節期に分岐しはじめることが示唆された。

ここで、混合系譜の標識鰭条は、骨芽系譜と非骨芽系譜に分かれる前の細胞が標識されたために出現したと考えられるが、体節期のどこかのタイミングで系譜が完全に分岐するのだろうか。つまり、標識するタイミングを遅らせることで、混合系譜をなくすことができるかを調べた。20 体節期 (受精後 18 時間)、30 体節期 (受精後 24 時間) の上記 Tg において、2 時間だけ TAM 処理して組換えを誘導した (図 19)。20 体節期 (somite stage) は体節を形成している段階であり、30 体節期は新規の体節形成がほぼ終わっている段階である。組換えを誘導した個体を成魚まで飼育し、尾鰭における 3 つの間葉細胞系譜の出現率を調べた結果、20 体節期に組換えを誘導した場合は、混合系譜が 38% ($n = 20/53$ 本)、30 体節期では 48% ($n = 28/58$ 本) の割合で観察された (図 19)。つまり、体節形成がほぼ終わっている 30 体節期に組換えを誘導しても、混合系譜の標識鰭条が観察されたことから、体節期に骨芽系譜と非骨芽系譜の分岐が始まるが、体節期中 (受精後 1 日まで) に分岐が完了するわけではないことが分かった。

3.8 骨芽系譜の間葉細胞は鰭条の伸長に伴って骨芽細胞を産生する

次に、骨芽系譜と非骨芽系譜が、幼生期から稚魚期にかけてどのように鰭条を形成していくのかを調べた。鰭条の形成には細胞の増殖と移動、および分化が必要であるが、鰭条を形成する細胞がどこで増殖し、どのように移動していつ骨芽細胞に分化するのかはよく分かっていない。すなわち、骨芽系譜の間葉細胞が鰭条内 (intra-ray) の間葉領域で増殖した後に、鰭条骨形成領域に移動し、骨芽細胞に分化して骨化をおこなうのか、最初から鰭条骨形成領域で増殖・分化するのかを調べた。トリプル *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を用いて 0–1 dpf に組換えを誘導し、6 dpf において幼生尾部で盛んに増殖する間葉細胞をもつ個体を選別した。その後、14 dpf 以降の鰭条が伸長していく過程を共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元的に追跡した。最後に、個体を識別したまま成魚まで飼育し、骨芽系譜、非骨芽系譜、混合系譜のどれであったかを確認した。

骨芽系譜では、*sp7:mCherry* 陽性の骨芽細胞が現れはじめた 17 dpf 時点において、EGFP 標識細胞に骨芽細胞の赤色蛍光は見られなかったが、両者とも鰭条骨の形成領域に近接して位置していた (図 20)。20 dpf には、増殖を続ける一部の EGFP 標識細胞で *mCherry* の赤色蛍光が発現しはじめ、骨芽細胞に分化したことが明らかになった。さらに、初めて形成された鰭条関節 (joint) でも EGFP 蛍光が見られた。つまり、*sp7⁺* 骨芽細胞と *sp7⁻* 骨芽前駆細胞 (OPC) を生み出したことが分かった。Ando らが、*TgBAC(mmp9:Cre-ERT2)* を用いて、鰭条伸長期における *mmp9* 陽性の OPC を追跡した実験では、鰭条の伸長に伴って新たに形成された関節部分に、基部側関節にいる OPC は寄与しないことが明らかになっている (Ando et al., 2017)。つまり、鰭条の伸長と同時に、増殖しながら骨芽細胞や OPC に分化する *sp7* 陰性の間葉細胞は、OPC とは異なる骨芽細胞の新たな供給源であることが分かった。この細胞を骨芽系間葉細胞 (osteogenic mesenchymal progenitor, OMP) と名付けた。

一方で非骨芽系譜では、17 dpf に骨芽細胞が現れた後、20 dpf で鰭条が伸長しつつけていても、標識細胞は間葉領域に留まって増殖しており、以降も骨芽細胞の赤色蛍光と重なることはなかった (図 21)。成魚において系譜を確認したときにも、標識細胞と骨芽細胞の重なりは見られなかった。つまり、非骨芽系譜の間葉細胞は、個体の発生過程において骨芽細胞にまったく寄与しない細胞集団であることが分かった。

3.9 骨芽系譜/非骨芽系譜の間葉細胞の RNA-seq プロファイリング

骨芽系の細胞を産生する骨芽系間葉細胞 (OMP) に対して、まったく骨芽細胞を産生しない非骨芽系譜の間葉細胞 (non-OMP) のプロファイルを調べるために、セルソーターを使用して RNA-seq 解析をおこなった。トリプル *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を 0–1 dpf に TAM 処理し、尾鰭に EGFP 蛍光をもつ個体を成魚まで育てた。骨芽系譜または非骨芽系譜の標識をもつ鰭条は蛍光実体顕微鏡下で識別した。具体的には、鰭条関節 (joint) 部分に蛍光をもつ、かつ鰭条の背腹側どちらかに偏って標識がみられる鰭条を骨芽系譜の標識をもつ鰭条とした (図 18)。一方で鰭条関節に標識をもたず、鰭条全体に標識が散在しているもの非骨芽系譜の標識をもつ鰭条とした。切断後 14 日の尾鰭を再切断し、L-15 培地下で 1 本ずつ鰭条を切り分けて系譜ごとに収集した。集めた

鰭条を collagenase で消化し、セルストレーナーを通して細胞レベルに分散した (図 22)。その後、セルソーター (SH800, Sony) を用いて、骨芽系譜の細胞懸濁液からは EGFP⁺/mCherry⁻OMP と EGFP⁺/mCherry⁺骨芽細胞を、非骨芽系譜からは EGFP⁺/mCherry⁻non-OMP をそれぞれ回収した (図 23)。細胞分取の際、FSC/BSC/RedDot2/EGFP/mCherry チャンネルを使用して多次元的にゲートを設定し、死細胞や細胞片 (debris)、無蛍光細胞などを可能な限り除いた (図 24)。FSC/BSC グラフでは、目的の細胞集団が密集している領域にゲートを設定した。次に FSC/RedDot2 のグラフでは、RedDot2 陽性であり、FSC が小さい (細胞体が小さい) 細胞集団 (図 24, 赤矢印) を除いて、目的の細胞集団である EGFP 蛍光または mCherry 蛍光をもつ細胞を含むようにゲートを設定した。mCherry 陽性の細胞集団が RedDot2 陽性である理由としては、mCherry 蛍光が RedDot2 (PerCP-Cy5.5) チャンネルに漏れこんでいることが大きな要因だと考えられる。非骨芽系譜の EGFP/mCherry プロットにおいて、右上の細胞集団、つまり標識された骨芽細胞が少し見られた理由としては、標識された鰭条の識別ミスのほか、非骨芽系譜の間葉細胞の一部は骨芽細胞を生み出している可能性が示唆される。サンプリングは独立して 2 回実施した。

収集した OMP, non-OMP, 骨芽細胞を RNA 精製し、基準を満たした RNA サンプルについて生物技研 (<https://gikenbio.com>) に RNA-seq 解析を委託した。cDNA 合成を経てライブラリーを調製し、DNBSEQ-G400 (MGI Tech) で配列を決定した。配列は Hisat2 でゼブラフィッシュゲノム (*Danio rerio* GRCz11) にマッピングされ、featureCounts でリード数をカウントした。

RNA-seq の raw data (全 75811 transcripts) から、ncRNA や transcript variant を除き、さらに、発現量が少ない transcript (transcripts per million (TPM) が平均 10 未満) も除いた。残った 4846 transcripts において、系譜間で発現量比が 5 倍、もしくは 3 倍以上の差があるものを残してフィルタリングし、最終的に、227 個の遺伝子を OMP, non-OMP, 骨芽細胞の発現変動遺伝子 (differentially expressed gene) として同定した (図 25)。ヒートマップは遺伝子ごとに算出された z-score を用いて作製した。同定した 227 遺伝子の内、52 個の遺伝子は non-OMP で特異的に発現していた一方で、OMP では 96 個の遺伝子が濃縮されていた。OMP で濃縮されていた 96 遺伝子の内、82 遺伝子は OMP で特異的に発現しており、残りの 14 遺伝子は OMP と骨芽細胞の両方で濃縮されていた。Non-OMP に濃縮された遺伝子の内、骨芽細胞でも強く発現する遺伝子は無かった。これらのデータセットは骨芽細胞で特異的に発現する 79 個の遺伝子と比較した。

3.10 非骨芽系譜の間葉細胞は軟骨関連のプロファイルをもつ

続いて、OMP と non-OMP に濃縮された遺伝子から、細胞集団のプロファイルを調べた。まず、non-OMP のみ、OMP のみ、OMP と骨芽細胞、骨芽細胞のみ、でそれぞれ濃縮された 52 個、82 個、14 個、79 個の遺伝子を Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/>) に追加し、gene ontology (GO) 解析を実施した。その際、アノテーションのカテゴリーは Biological Process を使用した。その結果、OMP は“細胞外マトリクス形成”、“骨発生”に関する項目が濃縮されており、non-OMP は“軟骨発生”に関する項目が特に濃縮されていた (図 26)。骨芽細胞では“細胞外マトリクス形成”、“骨化”など骨形成に

関する項目が濃縮されていた。つまり、OMP は骨芽細胞などの骨系の細胞を産生する間葉細胞、non-OMP は軟骨芽細胞などの軟骨系の細胞を産生する間葉細胞であることが示唆された。

次に、各細胞集団で濃縮された遺伝子を詳細に確認した。OMP と骨芽細胞で濃縮された 14 個の遺伝子には、以下の骨産生に関連する遺伝子が含まれていた (図 25)。 *secreted phosphoprotein 1 (spp1)*, *superoxide dismutase 3b (sod3b)*, *biglycan a (bgna)*, *bone gamma-carboxyglutamate protein (bglap)*, *collagen type X alpha 1a/b (col10a1a/b)* ([Brown et al., 2009](#); [Matthiesen et al., 2021](#); [Miguez, 2020](#); [Knopf et al., 2011](#); [Debiais-Thibaud et al., 2019](#))。さらに、OMP 特異的発現遺伝子 (82 遺伝子) には、 *chemokine ligand 25b (ccl25b)*, *upper zone of growth plate and cartilage matrix associated a (ucmaa)*, *periostin b (postnb)*, *proteoglycan 4a/b (prg4a/b)* が含まれていた ([Yano et al., 2005](#); [Stock et al., 2017](#); [Horiuchi et al., 1999](#); [Askary et al., 2016](#))。いずれも骨芽細胞の分化に機能することが示されており、OMP は骨芽細胞産生にコミットした間葉前駆細胞集団であることが確認された。

対照的に non-OMP で特異的に発現した 52 遺伝子には、魚類に特徴的なアクチノトリキアを構成する非コラーゲン成分の *actinodin 1/2 (and1/2)* が含まれていた ([König et al., 2018](#)) (図 25)。さらに、 *cartilage intermediate layer protein (cilp)*, *hyaluronan and proteoglycan link protein 1a (hapln1a)*, *transforming growth factor beta-induced (tgfb1)*, *dermatopontin (dpt)*, *versican b (vcamb)* など、軟骨芽細胞・軟骨細胞に特徴的な遺伝子も含まれていた ([Mori et al., 2006](#); [Govindan and Iovine, 2014](#); [Hirate et al., 2003](#); [Tan et al., 2013](#); [Kang et al., 2004](#))。加えて、軟骨細胞分化に必須とされる *sox9a* も高発現していた ([Akiyama et al., 2002](#); [Yan et al., 2002](#))。従って、明らかに軟骨形成の特徴を持っていることから、軟骨細胞産生にコミットしたこの間葉細胞集団を軟骨芽系間葉細胞 (chondrogenic mesenchymal progenitor, CMP) と名付けた。以降、非骨芽系譜は軟骨芽系譜 (chondrogenic lineage) とする。ただし、セルソーターを用いて OMP として収集した細胞には、*sp7* 陰性の骨芽前駆細胞 (OPC) や休止骨芽細胞 (BLC) が含まれていることが考えられる。また、non-OMP として収集した細胞には、CMP の他に、軟骨芽細胞のマーカーがないため分離できなかった軟骨細胞、軟骨芽細胞も含まれていると考えられる。

3.11 骨芽系譜/軟骨芽系譜は鰭再生後も元の系譜を維持する

ゼブラフィッシュやアホロートルの再生過程における細胞系譜の研究では、ほとんどの細胞はそれら自身の分化アイデンティティが変化することはないが、アホロートルでは、軟骨や真皮の細胞で一定の柔軟性をもつ可能性が示唆されている。 ([Kragl et al., 2009](#))。そこで、本研究では、新たに同定した間葉細胞 OMP と CMP が、魚類と有尾両生類に特徴的な付属器再生を通じて、そのアイデンティティを変えるか (分化転換するか) どうかを調べた。つまり、鰭再生を経て、OMP が間葉領域にいる軟骨細胞を生み出す、もしくは CMP が骨周辺の骨芽細胞を生み出すかを解析した。

0-1 dpf に組換えを誘導したトリプル *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* のうち、鰭

に EGFP 標識が入っている個体を成魚まで育てた。次に、鰭を切断して切片を作製し、系譜を確認した後、2 週間後に再度切片を作製して系譜を確認した。その結果、再生した鰭でも骨芽系譜の標識をもっていた鰭条は変わらず骨芽系譜の標識をもっており (図 27)、再生部分の OPC や骨芽細胞でも、切断前と同様に EGFP 蛍光が観察された (データ示さず)。軟骨芽系譜の場合も軟骨芽系譜のままであり、鰭条骨の周りに EGFP 蛍光が見られることはなく、鰭条の間葉領域のみで EGFP 蛍光が見られた (図 27)。つまり、OMP と CMP は鰭再生を経ても互いに分化転換しないことが明らかになった。また、再生を含む生涯を通じて、鰭条に間葉前駆細胞プールとして維持されており、骨芽細胞や軟骨芽細胞をそれぞれ供給することが明らかになった。

3.12 骨芽前駆細胞は骨芽系間葉細胞 (OMP) によって供給される

Ando らは、鰭条関節 (joint) に局在する骨芽前駆細胞 (OPC) が遺伝的に除去された場合、近の間葉細胞が OPC を補充することを示した ([Ando et al., 2017](#))。しかし、成魚尾鰭の鰭条に存在し、OPC を補充する間葉細胞の正体については不明なままである。そこで、*TgBAC(mmp9:EGFP-NTR)* (以後 *Tg(mmp9:NTR)*) を用いて、OPC を遺伝学的に除去し、不足した OPC を OMP もしくは CMP が補充できるかを調べた。*Tg(mmp9:NTR)* は、*mmp9* プロモーターの制御下で融合タンパク EGFP-NTR を発現する Tg である。NTR (nitroreductase) は、プロドラッグ metronidazole (MTZ) を細胞毒性のある物質に代謝する ([Bridgewater et al., 1995](#))。つまり、MTZ 処理によって OPC を特異的に除去できる (図 28)。また、*Tg(mmp9:NTR)* の緑色蛍光と被らないように、標識細胞で DsRed-Express の赤色蛍光を発する新たなレポーター *Tg(actb2:LOXP-TagBFP-LOXP-DsRedExpress)* (以後 *Tg(actb2:BSR)*) を使用した ([Kobayashi et al., 2014](#))。

トリプル *Tg2(sox9a:Cre; actb2:BSR; mmp9:NTR)* を用いて、0–1 dpf に組換えを誘導し、尾鰭に DsRed 蛍光が見られる個体を成魚まで育てた。まず、骨芽系譜の標識細胞と OPC の重なりを確認したところ、DsRed 標識細胞の一部で OPC の緑色蛍光が観察された (図 29)。つまり、鰭条形成過程において骨芽系間葉細胞 (osteogenic mesenchymal progenitor, OMP) は OPC を産生し、成魚においても維持されることが分かった。

続いて、尾鰭に骨芽系譜または軟骨芽系譜の標識をもつ個体を MTZ で処理し、OPC の遺伝学的除去を誘導した (図 30)。MTZ 処理前に観察された鰭条関節の EGFP 蛍光は、4 日間の MTZ 処理によって完全に消失した、つまり、OPC 除去が完了したため MTZ 処理を中止し、OPC の再生を開始した。再生開始から 7 日後には大部分の OPC が再生され、19 日後に OPC はほぼ完全に再生した (図 30)。再生された EGFP 陽性の OPC について DsRed 蛍光との重なりを調べると、骨芽系譜の OPC でのみ赤色蛍光が観察され、軟骨芽系譜の OPC には赤色蛍光は観察されなかった (図 30)。つまり、骨芽系譜の DsRed 標識細胞が OPC に分化したことが示された。Ando らは、*sp7*⁺ 骨芽細胞を短期的に追跡する実験によって、*sp7*⁺ 骨芽細胞から *sp7*⁺ OPC は生じないことを示している ([Ando et al., 2017](#))。従って、今回 OPC を補充した骨芽系譜の細胞は、骨芽細胞ではなく、*sp7*⁺ 骨芽系間葉細胞 (OMP) であることが示唆された。

第4章 考察

4.1 *sox9a:Cre* 標識組織と *sox9a* 発現組織の関係

本研究によって、*sox9a:Cre* で標識した体節細胞が増殖・分化を経て、成魚の尾鰭を形成することが分かった (図 17)。尾鰭 (caudal fin) だけでなく体全体を見ると、他にも多くの組織に寄与しており、顎 (jaw)、鱗 (scale)、胸鰭 (pectoral fin)、背鰭 (dorsal fin)、臀鰭 (anal fin)、体幹筋 (trunk muscle)、生殖細胞 (germ cell) などで EGFP 蛍光が観察された (図 12)。顎は、1 dpf では咽頭弓 (pharyngeal arch) として観察され、そこでも *sox9a* は発現している (Yan et al., 2005)。従って、TAM による組換え誘導により標識されたと考えられる。鱗は、真皮 (dermis) から発生し、真皮は体節組織の一種である皮節 (dermatome) に由来するとされている (Sire et al., 1997; Olivera-Martinez et al., 2004)。同様に、体幹筋も筋節 (myotome) に由来することが知られている (Stickney et al., 2000)。また、尾鰭を含む正中鰭 (median fin) は、沿軸中胚葉 (paraxial mesoderm) (体節) 由来とされていることから (Shimada et al., 2013; Ando et al., 2017)、正中鰭の骨組織は、体節の硬節 (sclerotome) に由来すると考えられる。つまり、皮節・筋節・硬節から発生する組織で EGFP 蛍光が観察されたことは、*sox9a:Cre* は体節細胞を広く標識できたことを意味している。また、生殖細胞も中胚葉に由来し、胚発生の早い時期に系譜が決定するとされている (Aramaki et al., 2013)。つまり、*sox9a* は始原生殖細胞 (primordial germ cell) でも発現することが示唆された。さらに、胸鰭などの対鰭 (paired fins) は、主に側板中胚葉 (lateral plate mesoderm) 由来であること (Tzung et al., 2023)、外胚葉由来とされる神経管 (neural tube) でも EGFP 蛍光が観察されたことから (図 15)、*sox9a* は体節期よりも前の段階で発現していることが示唆された。

ここで、*Tg1* によって標識された細胞について考えてみると、*sox9a* プロモーターによって制御されており、*sox9a* の発現が高い細胞で Cre も多く発現することが推測される。また、Cre-*loxP* システムを考えると、Cre は酵素であるため少しでも存在すれば、DNA は組み換わると考えられる。今回使用した *Tg1(sox9a:Cre)* は低効率であり、多くの細胞を標識することはできない。つまり、*Tg1* で標識された細胞は Cre が特に発現していた細胞、すなわち *sox9a* の発現が特に高かった細胞であると考えられる。

4.2 膜鰭間葉細胞の役割

sox9a:Cre で体節期に標識された間葉細胞の大部分は、膜鰭 (fin fold) の間葉細胞になり、幼生期に消滅することを示した (図 16)。このことは、成魚尾鰭と幼生膜鰭を形成する間葉細胞は別系譜であり、膜鰭の間葉細胞が続けて、成魚の尾鰭を形成するわけではないことを意味している。それでは、最終的に消失する膜鰭間葉細胞にはどのような意味があるのだろうか。知られている膜鰭間葉細胞の主な役割として、アクチノトリキアの形成が挙げられる。

アクチノトリキア (actinotrichia) は、コラーゲン繊維が主成分の組織であり (図 3)、上皮の基底細胞 (basal cell) と膜鰭の間葉細胞が協調して形成していると考えられている (Lalonde et al., 2016)。アクチノトリキアには大きく2つの役割があると考えられ、一つ目は、幼生期の遊泳能力の確保

である。骨や歯など硬組織の形成に必須なカルシウム分の沈着と結晶化には比較的長い時間がかかる。つまり、成体の骨や歯を準備している間に代わりとなる組織がなければ、食べることも、動くこともままならない状態になる。ヒトでも永久歯の前に簡易的な歯である乳歯が生えて、一時的に摂食の問題を解決するように、簡単に形成できる軟骨を主成分としたアクチノトリキアを膜鰭の支持体として形成することで、幼生期の遊泳能力の問題を一時的に解消していると考えられる。二つ目は、成魚の鰭条骨を形成する際の足場の役割である。アクチノトリキアは上皮と膜鰭間葉細胞の間に形成され、鰭条骨は上皮とアクチノトリキアの間に形成される (Duran et al., 2015)。つまり、外側から上皮、鰭条骨、アクチノトリキア、間葉の順番になる。鰭条形成の際、鰭条の形成方向とアクチノトリキアの繊維方向は同じであり (図 31)、また、*collagen type I alpha 1a (col1a1a)* 変異体の *chihuahua (chi)* ではアクチノトリキアの形成不全、ならびに成魚の鰭条の形成異常を起こすことが知られている (Durán et al., 2011)。さらに、鰭条が形成されるにつれてアクチノトリキアは次第に消失していくが、成魚の鰭再生過程において、鰭条形成部位に再形成されることも分かっている (Durán et al., 2011)。つまり、アクチノトリキアは骨芽細胞が正しく骨形成をおこなうのに必要であることが分かり、骨芽細胞、もしくは骨系の細胞はアクチノトリキアを足場として移動し、骨を形成していることが推測される。

以上のことから、膜鰭間葉細胞はアクチノトリキアの形成を通じて、成魚の尾鰭の発生と成長を陰ながらに支えていると考えられる。また、膜鰭間葉細胞を成魚でも継続して使用できない理由としては、胚性の細胞は幹細胞性をもたないためだと考えられる。

4.3 混合系譜の間葉細胞について

Tg(sox9a:Cre) を用いて体節細胞を標識することで、成魚の尾鰭に寄与する間葉細胞系譜には、骨芽系譜、軟骨芽系譜、混合系譜の3つの系譜があることを示した。混合系譜は、骨芽系譜と軟骨芽系譜に分かれる前の細胞で *sox9a:Cre* 標識されたために出現したと考えられるが、いつ骨芽系譜と軟骨芽系譜への分岐が完了するのかは不明である。ここで、もし TAM 処理の時期を遅らせると、系譜が骨芽系譜と軟骨芽系譜に分岐した後の間葉細胞を標識することができ、混合系譜の標識が観察されなくなることが予想される。しかし、体節形成がほぼ完了している 30 体節期に TAM 処理をしたとしても3つの系譜、軟骨芽系譜、混合系譜、骨芽系譜の標識をもつ鰭条が見られた (図 19)。つまり、体節期に系譜が完全に分岐し終わるわけではなく、骨芽系譜と非骨芽系譜のどちらにもなりうるバイポテンシャルな混合系譜間葉細胞として尾鰭を形成していることが示唆された。ただし、近接した骨芽系譜、軟骨芽系譜の間葉細胞の両方が別々に標識されて一本の鰭条に寄与した、もしくは、体節期以降に系譜が分岐している可能性が考えられる。前者に関しては、組換え効率の低い *Tg1(sox9a:Cre)^{tyt229}* を使用しているため、尾鰭で標識された鰭条の本数も平均 2.5 本と低く、近接した異なる系譜をもった間葉細胞の両方が別々に標識される可能性は低いと考えられる。後者に関しては、体節期から鰭条形成の間に系譜が分岐しているとする、成魚の尾鰭において骨芽系の細胞をすべて除去した場合、新たに骨芽細胞を補充できなくなる、すなわち鰭が再生できなくなると考えられる。しかし現状、骨芽系の細胞には、骨芽細胞や休止骨芽細胞 (bone lining cell, BLC)、骨芽前駆細胞 (osteoblast progenitor cell, OPC) に加えて、今回発見した骨芽系間葉細胞 (OMP) も

あり、骨芽系の細胞をすべて取り除くことは難しいことが予想される。混合系譜の分岐時期を調べる他の方法としては、single cell RNA-seq (scRNA-seq) と再生芽移植が考えられる。scRNA-seq では、成魚尾鰭において scRNA-seq をすることで一細胞レベルで RNA の発現を調べ、その RNA プロファイルの移り変わりから疑似的に細胞系譜を解析することができる。つまり、骨芽細胞と軟骨芽細胞になりうるバイポテンシャルな混合系譜間葉細胞が存在するか調べることができると考えられる。再生芽（間葉）移植では、混合系譜の標識をもつ鰭条の再生芽を、同一個体の標識が入っていない再生芽に移植して調べる。移植された再生芽のほとんどは間葉細胞であることが知られているため、移植された混合系譜の再生芽が、鰭再生過程において骨芽細胞を生み出すかどうかを観察することで、成魚尾鰭における混合系譜間葉細胞の運命が制限されているのかを調べることができると考えられる。

4.4 体節における系譜の決定メカニズム

本研究では、体節細胞が骨芽系譜、軟骨芽系譜、混合系譜の間葉細胞に運命を分けて成魚尾鰭を形成することを明らかにした。体節細胞において系譜が分岐するメカニズムとしては、体節が皮節・筋節・硬節に分化する際に関わるシグナル伝達によるものが考えられる。初期発生における分化メカニズムの解析については *in vivo*（生体内）や *in vitro*（培養細胞）で多くの研究がなされており、体節分化に必要なシグナルとしては、sonic hedgehog (Shh) や bone morphogenetic protein (BMP), Wnt がよく知られている ([Nakajima et al., 2018](#); [Tani et al., 2020](#)) (図 32)。特に、尾鰭を形成している可能性が高い硬節に関わるシグナルについては、神経管の底板 (floor plate) や脊索 (notochord) から分泌される Shh が硬節の形成に重要とされており、Shh シグナルの下流で働く *Gli2/3* が欠失している場合、硬節で発現する *Pax1/9* の発現が大きく低下し、*Sox9* も検出できなくなることが分かっている ([Buttitta et al., 2003](#))。また、脊索や背側の体節から分泌される Noggin が BMP4 を阻害し、硬節の特定化 (specification) に関わっていることも分かっている ([McMahon et al., 1998](#))。Wnt は神経管の蓋板 (roof plate) や上皮から分泌され、脊索や底板から分泌される Shh と協調して、体節のパターニングに関与していることも分かっている ([Cairns et al., 2008](#))。つまり、これらのシグナルが硬節のパターニング、および間葉細胞系譜の決定に関与している可能性が考えられる。

4.5 骨芽系間葉細胞と軟骨芽系間葉細胞

細胞のライブイメージング追跡によって、骨芽細胞や骨芽前駆細胞 (OPC) などの骨芽系の細胞を生み出す骨芽系間葉細胞 (osteogenic mesenchymal progenitor, OMP) の存在が明らかになった。OMP は鰭条形成過程において、自己増殖しながら骨芽細胞や OPC を生み出し、鰭条形成後も鰭条に維持されて OPC の補充を担っていることが示唆された。Ando らの研究では、鰭条の伸長に伴って新たに形成された関節部分には、基部側関節にいる OPC は寄与しないこと、OPC を遺伝学的に除去した場合は付近の間葉細胞から補充されることを示している ([Ando et al., 2017](#))。しかし、そのような間葉細胞の正体は分かっておらず、本研究によって新たに OMP が発見された。*Sp7* 陰性で骨芽細胞を生み出す能力を持つ細胞として、休止骨芽細胞 (BLC) も考えられるが、BLC は骨形

成能を失った細胞内小器官の乏しい細胞とされ (小澤, 1998), おそらく増殖能も高くないと思われる。さらに, 鰭条を伸長 (骨形成) しなければならない時期に休止した骨芽細胞がいる可能性も低いと考えられる。また, 足りなくなった OPC を補充する細胞としても BLC が考えられるが, Ando らの研究によって *sp7* 陽性の骨芽細胞から OPC は生じないこと, 分化した骨芽細胞は増殖能をもたないこと (楠原, 1978), 再生芽 (間葉) 移植によって間葉細胞から OPC が生じることを明らかにしており, その可能性は低いと考えられる。つまり, OMP は OPC や骨芽細胞を供給する新たな細胞集団であることが示唆された。

OMPと同時に, RNA-seq のプロファイリング解析によって, 骨芽細胞を一切生み出さない軟骨芽間葉細胞 (chondrogenic mesenchymal progenitor, CMP) も明らかになった。CMP は, 鰭条形成過程でも, 鰭条の伸長に伴って増殖はするものの, 間葉領域に留まっており, 骨芽細胞は一切生み出さない系譜である。鰭条形成後も間葉領域に維持されており, RNA-seq のプロファイリング解析によって軟骨形成に関わる多くの遺伝子が発現していたことから, 軟骨産生にコミットした間葉細胞, CMP であることが分かった。ただし, 非骨芽系譜の間葉細胞として収集した細胞には, CMP の他に, 軟骨芽細胞のマーカーがなく分離できなかった軟骨芽細胞, 軟骨細胞も含まれていると考えられる。

いくつかの研究では骨芽細胞と軟骨芽細胞が分化転換する可能性が示唆されている一方で, 今回の研究において OMP と CMP が分化転換しなかったのは, 通常の鰭再生において骨芽細胞産生は様々な供給源によって支えられており, CMP から分化転換する必要性がなかったからだと考えられる。分化転換の研究が多く行われている *in vitro* の実験では, 細胞周囲の環境が生体内に比べて疎であるため, 恒常性維持のために分化転換が強く働くと考えられる。従って, ゼブラフィッシュにおいても, 尾鰭を何度も切断・再生させる実験によって, 慢性的に不足した骨芽細胞または軟骨芽細胞を別の細胞が分化転換によって供給する可能性も考えられる。

第5章 結 論

本研究では、生涯透明であるゼブラフィッシュの尾鰭において、発生過程を通じて細胞を追跡し、結果が確定した後に遡って解析するという手法を使用した。その結果、*sox9a* 陽性体節細胞に由来する間葉細胞には、幼生期に膜鰭で消滅する間葉細胞も含めて、4 つの系譜があることを明らかにした(図 33)。成魚の尾鰭を形成する 3 つの間葉細胞系譜の内、1 つ目は骨芽系譜であり、鰭条骨の周りに局在して、骨芽細胞や骨芽前駆細胞 (osteoblast progenitor cell, OPC)、休止骨芽細胞 (bone lining cell, BLC) など骨芽系の細胞を生み出していた。2 つ目は軟骨芽系譜であり、骨芽細胞を生み出すことなく鰭条の間葉領域に位置しており、RNA-seq によると軟骨関連のプロファイルを明確に持っていた。3 つ目の系譜は混合系譜であり、骨芽系譜と軟骨芽系譜の両方の特徴を持っていた。これら間葉細胞の系譜は標識をおこなった体節期の細胞に由来するため、間葉細胞の系譜は体節期に決まりはじめることが明らかになった。

さらに、細胞のライブイメージング追跡によって、骨芽細胞や OPC の新たな供給源として、骨芽系間葉細胞 (osteogenic mesenchymal progenitor, OMP) を発見した。また、非骨芽系譜の間葉細胞の RNA-seq 解析により、軟骨細胞や軟骨芽細胞を生み出すとされる軟骨芽系間葉細胞 (chondrogenic mesenchymal progenitor, CMP) を明らかにした。骨芽系譜、軟骨芽系譜の標識は、鰭再生を経ても変化しなかったことから、OMP と CMP は鰭再生を経ても分化転換しないこと、OMP と CMP は成魚尾鰭の鰭条に間葉前駆細胞プールとして維持されていることを明らかにした。

骨芽前駆細胞 (OPC) を遺伝学的に除去した実験では、骨芽系間葉細胞 (OMP) が OPC を補充する間葉細胞であることを示した。このことから、OMP や CMP の間葉系前駆細胞は、生涯を通じて骨芽細胞や軟骨芽細胞をそれぞれ供給しており、骨格組織の恒常性を常にサポートする役割があると考えられる。これらの間葉前駆細胞は、再生医療などにおける骨格組織再生の重要な標的となるだろう。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、数多くのご指導ご鞭撻を頂いた川上厚志先生に深く感謝を申し上げます。原著論文の共同著者として、セルソーターの使用方法からデータの解析まで様々なディスカッション、アドバイスをしてくださった東京工業大学の木村宏先生、佐藤優子先生に感謝申し上げます。研究に関するディスカッション、アドバイスを頂いた東京工業大学の猪早敬二先生に感謝申し上げます。RNA-seq 解析をしていただいた生物技研に感謝申し上げます。コンストラクト DNA のシーケンス解析をしていただいた東京工業大学のオープンファシリティーセンターのバイオ部門の方々、共焦点レーザー顕微鏡の管理をしていただいたバイオサイエンス統合支援センターの方々に感謝申し上げます。機器の使用方法を教えていただいた東京工業大学の藤田研究室の村川直柔さん、木村研究室の前島大樹さんに感謝申し上げます。研究室生活を支えてくれた川上研究室の先輩、後輩の皆様に感謝いたします。最後に、この場を借りて今まで育て支えてきてくれた両親に心から感謝いたします。

小宮 広滉

参考文献

- Abremski, K., & Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *The Journal of biological chemistry*, 259(3), 1509–1514. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)43437-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43437-5)
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., & de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development*, 16(21), 2813–2828. <https://doi.org/10.1101/gad.1017802>
- Akiyama, H., Kim, J. E., Nakashima, K., Balmes, G., Iwai, N., Deng, J. M., Zhang, Z., Martin, J. F., Behringer, R. R., Nakamura, T., & de Crombrughe, B. (2005). Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14665–14670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504750102>
- Ando, K., Shibata, E., Hans, S., Brand, M., & Kawakami, A. (2017). Osteoblast Production by Reserved Progenitor Cells in Zebrafish Bone Regeneration and Maintenance. *Developmental cell*, 43(5), 643–650.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.10.015>
- Aramaki, S., Hayashi, K., Kurimoto, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Kato, Y., Shirahige, K., & Saitou, M. (2013). A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Developmental cell*, 27(5), 516–529. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.001>
- Askary, A., Smeeton, J., Paul, S., Schindler, S., Braasch, I., Ellis, N. A., Postlethwait, J., Miller, C. T., & Crump, J. G. (2016). Ancient origin of lubricated joints in bony vertebrates. *eLife*, 5, e16415. <https://doi.org/10.7554/eLife.16415>
- Bando, T., Mito, T., Hamada, Y., Ishimaru, Y., Noji, S., & Ohuchi, H. (2018). Molecular mechanisms of limb regeneration: insights from regenerating legs of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *The International journal of developmental biology*, 62(6-7-8), 559–569. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180048ho>
- Berendsen, A. D., & Olsen, B. R. (2015). Bone development. *Bone*, 80, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.035>
- Bevis, B. J., & Glick, B. S. (2002). Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nature biotechnology*, 20(1), 83–87. <https://doi.org/10.1038/nbt0102-83>
- Bridgewater, J. A., Springer, C. J., Knox, R. J., Minton, N. P., Michael, N. P., & Collins, M. K. (1995). Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB1954. *European journal of cancer*, 31A(13-14), 2362–2370. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00436-x](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00436-x)
- Brown, A. M., Fisher, S., & Iovine, M. K. (2009). Osteoblast maturation occurs in overlapping proximal-distal compartments during fin regeneration in zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 238(11), 2922–2928. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22114>
- Bryant, P. J., Bryant, S. V., & French, V. (1977). Biological Regeneration and Pattern Formation. *Scientific American*, 237(1), 66–81. <http://www.jstor.org/stable/24954048>
- Buttitta, L., Mo, R., Hui, C. C., & Fan, C. M. (2003). Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development*, 130(25), 6233–6243. <https://doi.org/10.1242/dev.00851>

- Cairns, D. M., Sato, M. E., Lee, P. G., Lassar, A. B., & Zeng, L. (2008). A gradient of Shh establishes mutually repressing somitic cell fates induced by Nkx3.2 and Pax3. *Developmental biology*, 323(2), 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.08.024>
- Charbord P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human gene therapy*, 21(9), 1045–1056. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.115>
- Debiais-Thibaud, M., Simion, P., Ventéo, S., Muñoz, D., Marcellini, S., Mazan, S., & Haitina, T. (2019). Skeletal Mineralization in Association with Type X Collagen Expression Is an Ancestral Feature for Jawed Vertebrates. *Molecular biology and evolution*, 36(10), 2265–2276. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz145>
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., & Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 123, 37–46. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.37>
- Duran, I., Ruiz-Sánchez, J., Santamaría, J. A., & Marí-Beffa, M. (2015). Holmgren's principle of delamination during fin skeletogenesis. *Mechanisms of development*, 135, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2014.11.002>
- Durán, I., Marí-Beffa, M., Santamaría, J. A., Becerra, J., & Santos-Ruiz, L. (2011). Actinotrichia collagens and their role in fin formation. *Developmental biology*, 354(1), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.014>
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications*, 237(3), 752–757. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7124>
- Feitosa, N. M., Zhang, J., Carney, T. J., Metzger, M., Korzh, V., Bloch, W., & Hammerschmidt, M. (2012). Hemicentin 2 and Fibulin 1 are required for epidermal-dermal junction formation and fin mesenchymal cell migration during zebrafish development. *Developmental biology*, 369(2), 235–248. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.023>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international*, 2015, 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Giovannone, D., Paul, S., Schindler, S., Arata, C., Farmer, D. T., Patel, P., Smeeton, J., & Crump, J. G. (2019). Programmed conversion of hypertrophic chondrocytes into osteoblasts and marrow adipocytes within zebrafish bones. *eLife*, 8, e42736. <https://doi.org/10.7554/eLife.42736>
- Govindan, J., & Iovine, M. K. (2014). Hapln1a is required for connexin43-dependent growth and patterning in the regenerating fin skeleton. *PloS one*, 9(2), e88574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088574>
- Grohmann, M., Paulmann, N., Fleischhauer, S., Vowinkel, J., Priller, J., & Walther, D. J. (2009). A mammalianized synthetic nitroreductase gene for high-level expression. *BMC cancer*, 9, 301. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-301>
- Hallett, S. A., Ono, W., & Ono, N. (2019). Growth Plate Chondrocytes: Skeletal Development, Growth and Beyond. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6009. <https://doi.org/10.3390/ijms20236009>
- Handberg-Thorsager, M., Fernandez, E., & Salo, E. (2008). Stem cells and regeneration in planarians. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 6374–6394. <https://doi.org/10.2741/3160>

- Hirate, Y., Okamoto, H., & Yamasu, K. (2003). Structure of the zebrafish fasciclin I-related extracellular matrix protein (betaig-h3) and its characteristic expression during embryogenesis. *Gene expression patterns*, 3(3), 331–336. [https://doi.org/10.1016/s1567-133x\(03\)00035-8](https://doi.org/10.1016/s1567-133x(03)00035-8)
- Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., Toyama, Y., Bonewald, L. F., & Kudo, A. (1999). Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(7), 1239–1249. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.7.1239>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., Chow, W., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Huang, daW., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Huizar, F., Soundarrajan, D., Paravitorghabeh, R., & Zartman, J. (2020). Interplay between morphogen-directed positional information systems and physiological signaling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 249(3), 328–341. <https://doi.org/10.1002/dvdy.140>
- Johnson, G. L., & Lehoczy, J. A. (2022). Mammalian Digit Tip Regeneration: Moving from Phenomenon to Molecular Mechanism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 14(1), a040857. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040857>
- Joven, A., Elewa, A., & Simon, A. (2019). Model systems for regeneration: salamanders. *Development*, 146(14), dev167700. <https://doi.org/10.1242/dev.167700>
- Kang, J. S., Oohashi, T., Kawakami, Y., Bekku, Y., Izpisua Belmonte, J. C., & Ninomiya, Y. (2004). Characterization of dermacan, a novel zebrafish lectican gene, expressed in dermal bones. *Mechanisms of development*, 121(3), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.01.007>
- 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. *Developmental cell*, 7(1), 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.06.005>
- Knoll, A. H., & Nowak, M. A. (2017). The timetable of evolution. *Science advances*, 3(5), e1603076. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1603076>
- 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. *Developmental cell*, 20(5), 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.014>
- Kobayashi, I., Kobayashi-Sun, J., Kim, A. D., Pouget, C., Fujita, N., Suda, T., & Traver, D. (2014). Jam1a-Jam2a interactions regulate haematopoietic stem cell fate through Notch signalling. *Nature*, 512(7514), 319–323. <https://doi.org/10.1038/nature13623>
- Komiya, H., Sato, Y., Kimura, H., & Kawakami, A. (2024). Independent mesenchymal progenitor pools respectively produce and maintain osteogenic and chondrogenic cells in

zebrafish. *Development, growth & differentiation*, 66(2), 161–171.
<https://doi.org/10.1111/dgd.12908>

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(7251), 60–65. <https://doi.org/10.1038/nature08152>

Kuroda, J., Iwane, A. H., & Kondo, S. (2018). Roles of basal keratinocytes in actinotrichia formation. *Mechanisms of development*, 153, 54–63.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.08.010>

König, D., Page, L., Chassot, B., & Jaźwińska, A. (2018). Dynamics of actinotrichia regeneration in the adult zebrafish fin. *Developmental biology*, 433(2), 416–432.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.024>

Lalonde, R. L., Moses, D., Zhang, J., Cornell, N., Ekker, M., & Akimenko, M. A. (2016). Differential actinodin1 regulation in zebrafish and mouse appendages. *Developmental biology*, 417(1), 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.019>

Lee, R. T., Knapik, E. W., Thiery, J. P., & Carney, T. J. (2013b). An exclusively mesodermal origin of fin mesenchyme demonstrates that zebrafish trunk neural crest does not generate ectomesenchyme. *Development*, 140(14), 2923–2932. <https://doi.org/10.1242/dev.093534>

Lee, R. T., Thiery, J. P., & Carney, T. J. (2013a). Dermal fin rays and scales derive from mesoderm, not neural crest. *Current biology*, 23(9), R336–R337.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.055>

Lessman C. A. (2011). The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 93(3), 268–280. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20212>

Lozito, T. P., & Tuan, R. S. (2017). Lizard tail regeneration as an instructive model of enhanced healing capabilities in an adult amniote. *Connective tissue research*, 58(2), 145–154.
<https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1215444>

Maden, M., & Varholick, J. A. (2020). Model systems for regeneration: the spiny mouse, *Acomys cahirinus*. *Development*, 147(4), dev167718. <https://doi.org/10.1242/dev.167718>

Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M. K., Torrekens, S., Roth, S. I., Mackem, S., Carmeliet, G., & Kronenberg, H. M. (2010). Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Developmental cell*, 19(2), 329–344. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.010>

Mariappan, P., Balasundaram, C., & Schmitz, B. (2000). Decapod crustacean chelipeds: an overview. *Journal of biosciences*, 25(3), 301–313. <https://doi.org/10.1007/BF02703939>

Marques, I. J., Lupi, E., & Mercader, N. (2019). Model systems for regeneration: zebrafish. *Development*, 146(18), dev167692. <https://doi.org/10.1242/dev.167692>

Matthiesen, C. L., Hu, L., Torslev, A. S., Poulsen, E. T., Larsen, U. G., Kjaer-Sorensen, K., Thomsen, J. S., Brüel, A., Enghild, J. J., Oxvig, C., & Petersen, S. V. (2021). Superoxide dismutase 3 is expressed in bone tissue and required for normal bone homeostasis and mineralization. *Free radical biology & medicine*, 164, 399–409.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.027>

McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M., & McMahon, A. P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes & development*, 12(10), 1438–1452.

<https://doi.org/10.1101/gad.12.10.1438>

Medina-Feliciano, J. G., & García-Arrarás, J. E. (2021). Regeneration in Echinoderms: Molecular Advancements. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 768641. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.768641>

Miguez P. A. (2020). Evidence of biglycan structure-function in bone homeostasis and aging. *Connective tissue research*, 61(1), 19–33. <https://doi.org/10.1080/03008207.2019.1669577>

Miyamoto, K., Kawakami, K., Tamura, K., & Abe, G. (2022). Developmental independence of median fins from the larval fin fold revises their evolutionary origin. *Scientific reports*, 12(1), 7521. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11180-1>

Mizoguchi, T., & Ono, N. (2021). The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 36(8), 1432–1447. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4410>

Mizuhashi, K., Ono, W., Matsushita, Y., Sakagami, N., Takahashi, A., Saunders, T. L., Nagasawa, T., Kronenberg, H. M., & Ono, N. (2018). Resting zone of the growth plate houses a unique class of skeletal stem cells. *Nature*, 563(7730), 254–258. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0662-5>

Mori, M., Nakajima, M., Mikami, Y., Seki, S., Takigawa, M., Kubo, T., & Ikegawa, S. (2006). Transcriptional regulation of the cartilage intermediate layer protein (CILP) gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 341(1), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.159>

Nacu, E., Glausch, M., Le, H. Q., Damanik, F. F., Schuez, M., Knapp, D., Khattak, S., Richter, T., & Tanaka, E. M. (2013). Connective tissue cells, but not muscle cells, are involved in establishing the proximo-distal outcome of limb regeneration in the axolotl. *Development*, 140(3), 513–518. <https://doi.org/10.1242/dev.081752>

Nakajima, T., Shibata, M., Nishio, M., Nagata, S., Alev, C., Sakurai, H., Toguchida, J., & Ikeya, M. (2018). Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells. *Development*, 145(16), dev165431. <https://doi.org/10.1242/dev.165431>

Nakamura, T., Gehrke, A. R., Lemberg, J., Szymaszek, J., & Shubin, N. H. (2016). Digits and fin rays share common developmental histories. *Nature*, 537(7619), 225–228. <https://doi.org/10.1038/nature19322>

Ng, L. J., Wheatley, S., Muscat, G. E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D. M., Tam, P. P., Cheah, K. S., & Koopman, P. (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental biology*, 183(1), 108–121. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.8487>

Olivera-Martinez, I., Thélu, J., & Dhouailly, D. (2004). Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *The International journal of developmental biology*, 48(2-3), 93–101. <https://doi.org/10.1387/ijdb.15272374>

Poss K. D. (2010). Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nature reviews. Genetics*, 11(10), 710–722. <https://doi.org/10.1038/nrg2879>

Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12), 1567–1572. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>

- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic acids research*, 50(W1), W216–W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
- Shibata, E., Ando, K., Murase, E., & Kawakami, A. (2018b). Heterogeneous fates and dynamic rearrangement of regenerative epidermis-derived cells during zebrafish fin regeneration. *Development*, 145(8), dev162016. <https://doi.org/10.1242/dev.162016>
- Shibata, E., Liu, Z., Kawasaki, T., Sakai, N., & Kawakami, A. (2018a). Robust and local positional information within a fin ray directs fin length during zebrafish regeneration. *Development, growth & differentiation*, 60(6), 354–364. <https://doi.org/10.1111/dgd.12558>
- 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(16), 2920–2929. <https://doi.org/10.1242/dev.140699>
- Shimada, A., Kawanishi, T., Kaneko, T., Yoshihara, H., Yano, T., Inohaya, K., Kinoshita, M., Kamei, Y., Tamura, K., & Takeda, H. (2013). Trunk exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nature communications*, 4, 1639. <https://doi.org/10.1038/ncomms2643>
- Singh, S. P., Holdway, J. E., & Poss, K. D. (2012). Regeneration of amputated zebrafish fin rays from de novo osteoblasts. *Developmental cell*, 22(4), 879–886. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.03.006>
- Sire, J. Y., Allizard, F., Babiari, O., Bourguignon, J., & Quilhac, A. (1997). Scale development in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of anatomy*, 190 (Pt 4)(Pt 4), 545–561. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19040545.x>
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. (1958). Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany*, 45(10), 705–708. <https://doi.org/10.2307/2439728>
- Stickney, H. L., Barresi, M. J., & Devoto, S. H. (2000). Somite development in zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 219(3), 287–303. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999<::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A)
- Stock, M., Menges, S., Eitzinger, N., Geßlein, M., Botschner, R., Wormser, L., Distler, A., Schlötzer-Schrehardt, U., Dietel, K., Distler, J., Beyer, C., Gelse, K., Engelke, K., Koenders, M. I., van den Berg, W., von der Mark, K., & Schett, G. (2017). A Dual Role of Upper Zone of Growth Plate and Cartilage Matrix-Associated Protein in Human and Mouse Osteoarthritic Cartilage: Inhibition of Aggrecanases and Promotion of Bone Turnover. *Arthritis & rheumatology*, 69(6), 1233–1245. <https://doi.org/10.1002/art.40042>
- Subach, O. M., Gundorov, I. S., Yoshimura, M., Subach, F. V., Zhang, J., Grünwald, D., Souslova, E. A., Chudakov, D. M., & Verkhusha, V. V. (2008). Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe. *Chemistry & biology*, 15(10), 1116–1124. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.08.006>
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 100(1), 64–119. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)
- Suzuki, M., Yakushiji, N., Nakada, Y., Satoh, A., Ide, H., & Tamura, K. (2006). Limb regeneration in *Xenopus laevis* froglet. *The Scientific World Journal*, 6 Suppl 1, 26–37. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.325>

- Tan, Y., Iimura, K., Sato, T., Ura, K., & Takagi, Y. (2013). Spatiotemporal expression of the dermatopontin gene in zebrafish *Danio rerio*. *Gene*, 516(2), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.11.074>
- Tani, S., Chung, U. I., Ohba, S., & Hojo, H. (2020). Understanding paraxial mesoderm development and sclerotome specification for skeletal repair. *Experimental & molecular medicine*, 52(8), 1166–1177. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0482-1>
- Tani, S., Okada, H., Chung, U. I., Ohba, S., & Hojo, H. (2021). The Progress of Stem Cell Technology for Skeletal Regeneration. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1404. <https://doi.org/10.3390/ijms22031404>
- Thisse, C., & Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature protocols*, 3(1), 59–69. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.514>
- Tu, S., & Johnson, S. L. (2011). Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Developmental cell*, 20(5), 725–732. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.013>
- Tzung, K. W., Lalonde, R. L., Prummel, K. D., Mahabaleswar, H., Moran, H. R., Stundl, J., Cass, A. N., Le, Y., Lea, R., Dorey, K., Tomecka, M. J., Zhang, C., Brombacher, E. C., White, W. T., Roehl, H. H., Tulenko, F. J., Winkler, C., Currie, P. D., Amaya, E., Davis, M. C., ... Carney, T. J. (2023). A median fin derived from the lateral plate mesoderm and the origin of paired fins. *Nature*, 618(7965), 543–549. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06100-w>
- Vasil, V., & Hildebrandt, A. C. (1965). Differentiation of Tobacco Plants from Single, Isolated Cells in Microcultures. *Science*, 150(3698), 889–892. <https://doi.org/10.1126/science.150.3698.889>
- Vogg, M. C., Galliot, B., & Tsiairis, C. D. (2019). Model systems for regeneration: *Hydra*. *Development*, 146(21), dev177212. <https://doi.org/10.1242/dev.177212>
- Wolff, A., & Hinman, V. (2021). The Use of Larval Sea Stars and Sea Urchins in the Discovery of Shared Mechanisms of Metazoan Whole-Body Regeneration. *Genes*, 12(7), 1063. <https://doi.org/10.3390/genes12071063>
- Yan, Y. L., Miller, C. T., Nissen, R. M., Singer, A., Liu, D., Kirn, A., Draper, B., Willoughby, J., Morcos, P. A., Amsterdam, A., Chung, B. C., Westerfield, M., Haffter, P., Hopkins, N., Kimmel, C., & Postlethwait, J. H. (2002). A zebrafish *sox9* gene required for cartilage morphogenesis. *Development*, 129(21), 5065–5079. <https://doi.org/10.1242/dev.129.21.5065>
- Yan, Y. L., Willoughby, J., Liu, D., Crump, J. G., Wilson, C., Miller, C. T., Singer, A., Kimmel, C., Westerfield, M., & Postlethwait, J. H. (2005). A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish *sox9* co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development. *Development*, 132(5), 1069–1083. <https://doi.org/10.1242/dev.01674>
- Yang, L., Tsang, K. Y., Tang, H. C., Chan, D., & Cheah, K. S. (2014). Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), 12097–12102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302703111>
- Yano, S., Mentaverri, R., Kanuparthi, D., Bandyopadhyay, S., Rivera, A., Brown, E. M., & Chattopadhyay, N. (2005). Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology*, 146(5), 2324–2335. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0065>
- Yoshinari, N., & Kawakami, A. (2011). Mature and juvenile tissue models of regeneration in small fish species. *The Biological bulletin*, 221(1), 62–78. <https://doi.org/10.1086/BBLv221n1p62>

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 β -actin promoter. *Development, growth & differentiation*, 54(9), 818–828. <https://doi.org/10.1111/dgd.12013>

Zhang, G., Gurtu, V., & Kain, S. R. (1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 227(3), 707–711. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1573>

後藤仁敏 (1997). 骨の起源と進化(<特集> 人類の起源). *バイオメカニズム学会誌*, 21(4), 157–162. <https://doi.org/10.3951/sobim.21.157>

山田志津香, 林善彦 (2006). 骨芽細胞分化と骨形成に関する転写因子とシグナル伝達機構. *生体医工学*, 44(4), 490–495. <https://doi.org/10.11239/jsmbe.44.490>

小澤英浩 (1998). 骨改造現象の微細形態学的見解. *日本補綴歯科学会雑誌*, 42(3), 359–368. <https://doi.org/10.2186/jjps.42.359>

楠原征治 (1978). 骨の形成と吸収に関する研究. *日本畜産学会報*, 49(12), 843–852. <https://doi.org/10.2508/chikusan.49.843>

図 表

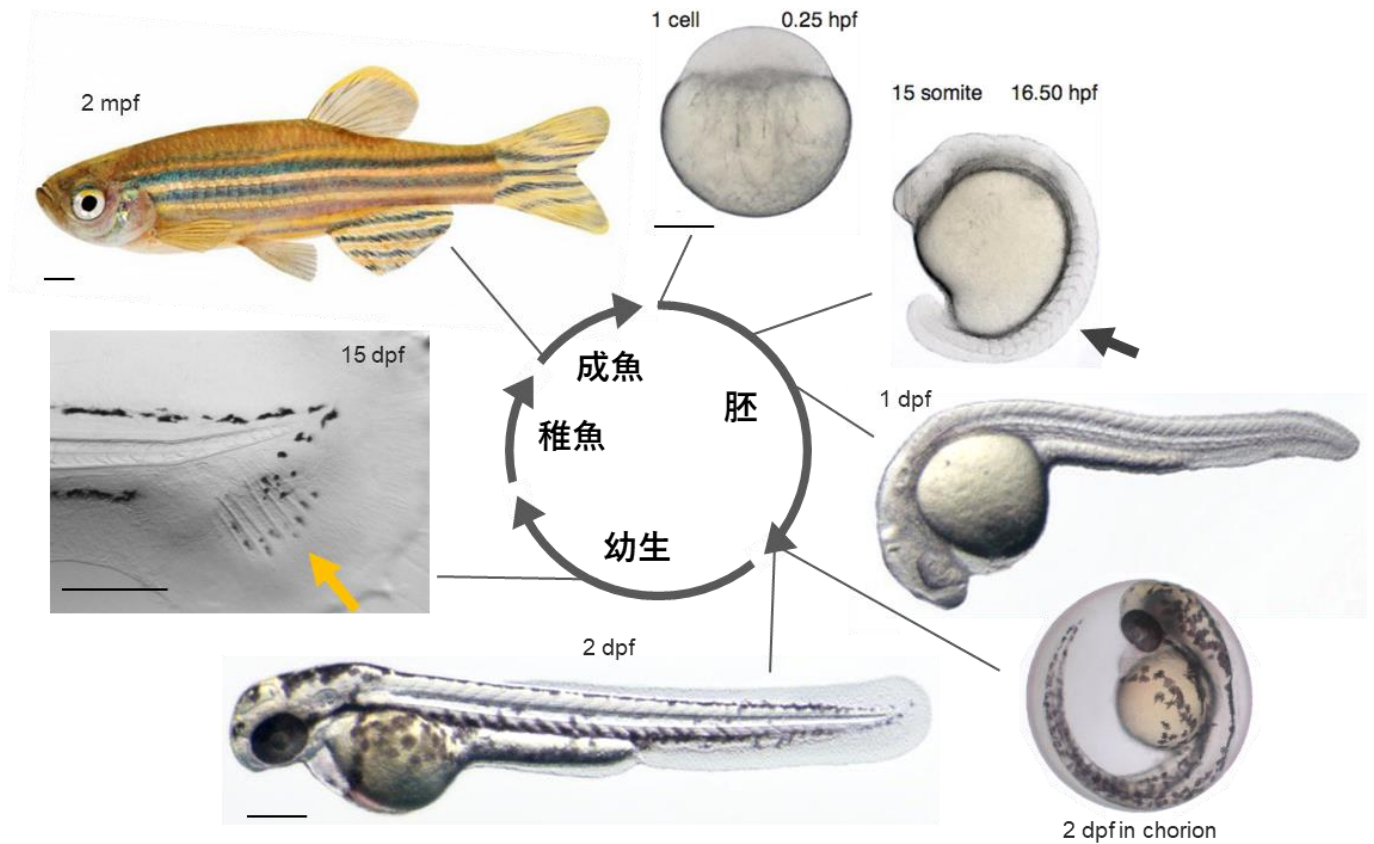


図1 ゼブラフィッシュの発生過程

ゼブラフィッシュのライフサイクル。ライフサイクルは大きく、胚 (embryo)、幼生 (larva)、稚魚 (juvenile)、成魚 (adult) に分けられる。受精してから孵化するまでが胚期であり、直径 1 mm ほどの受精卵は、受精後 2–3 日 (days post fertilization, dpf) で卵膜 (chorion) から孵化する。体節 (somite) (黒矢印) は受精後 10–30 時間 (hours post fertilization, hpf) に形成される。その体節を形成する期間を特に体節期とよぶ。幼生期は、孵化後から鰭条と呼ばれる鰭の支持体 (黄矢印) が生え揃うまでを指し、鰭条は受精後約 2 週間から生え始め、1 か月ほどで生え揃う。そこから次世代を産める成魚になるまでを稚魚期といい、途中で鱗 (scale) が生え、体長はおおよそ 1 cm から 5 cm にまで成長する。成魚の寿命は 5 年ほどと言われている。mpf, months post fertilization. Scale bars, 250 μ m.

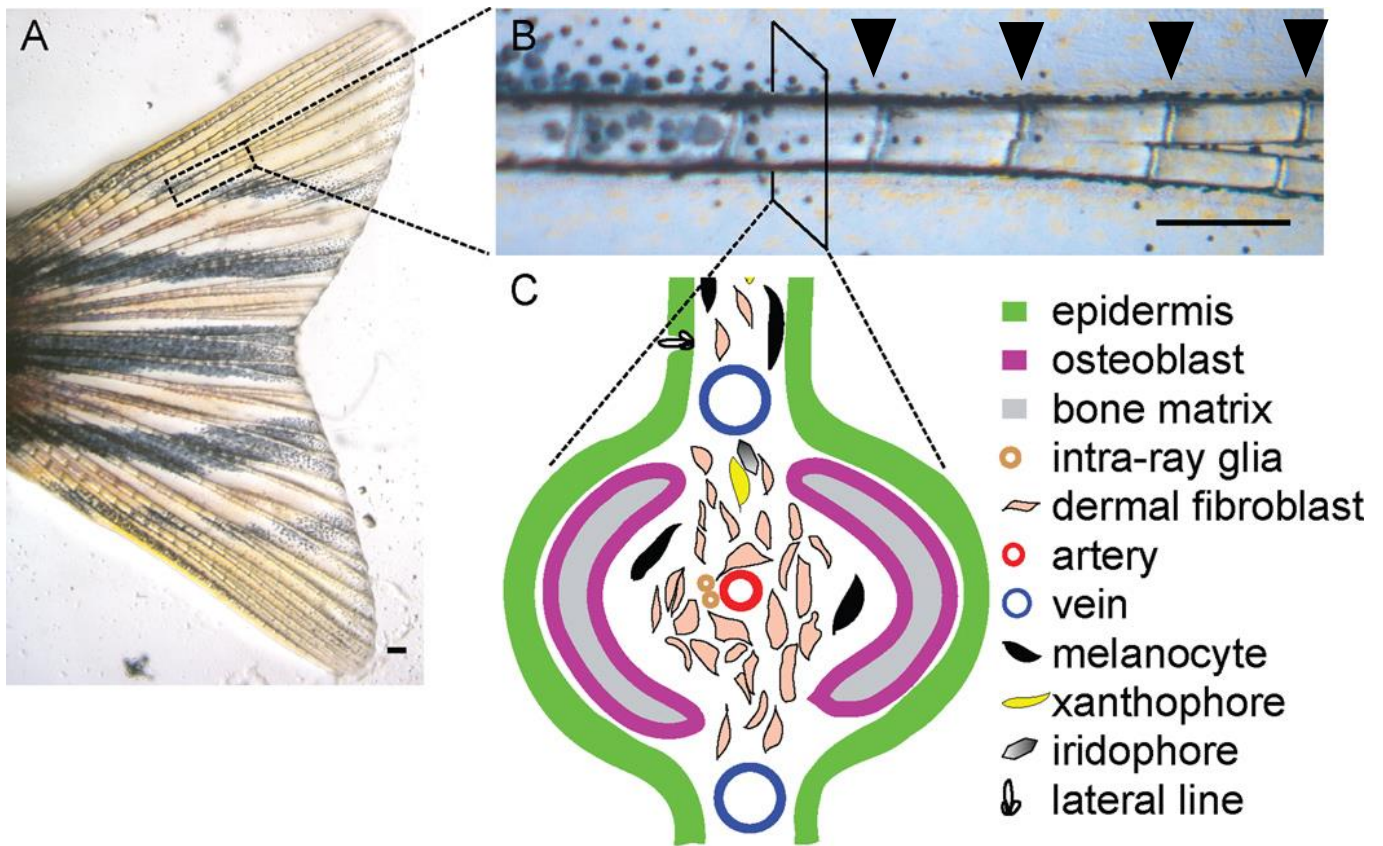


図2 ゼブラフィッシュ成魚尾鰭の構造

(A) ゼブラフィッシュ成魚の尾鰭 (caudal fin) の全体写真。滑らかに湾入した V 字形をしており、放射状に伸びた骨組織である鰭条によって支えられている。何種かの色素を持つが、鰭の裏まで透けて見える。(B) 鰭条 (fin ray) の拡大写真。鰭条は尾鰭に 16–18 本存在する。鰭条を拡大して見ると規則的に節 (joint, 黒三角) が存在し、鰭の先端に向かって数回分岐している。(C) 鰭条の断面図。弧を描いた形の hemiray (灰色) が向かい合わせになっており、その周りを骨芽細胞 (osteoblast, 紫色) が囲っている。鰭条の間には線維芽 (間葉) 細胞 (fibroblast, mesenchymal cell, ピンク色) が存在し、それらを上皮 (epidermis, 緑色) が覆っている。鰭条の中心には動脈 (artery, 赤色) が通っており、鰭条間 (inter-ray) 領域に静脈 (vein, 青色) が通っている。Scale bars, 250 μ m. [Tu and Johnson, 2011](#) から引用。

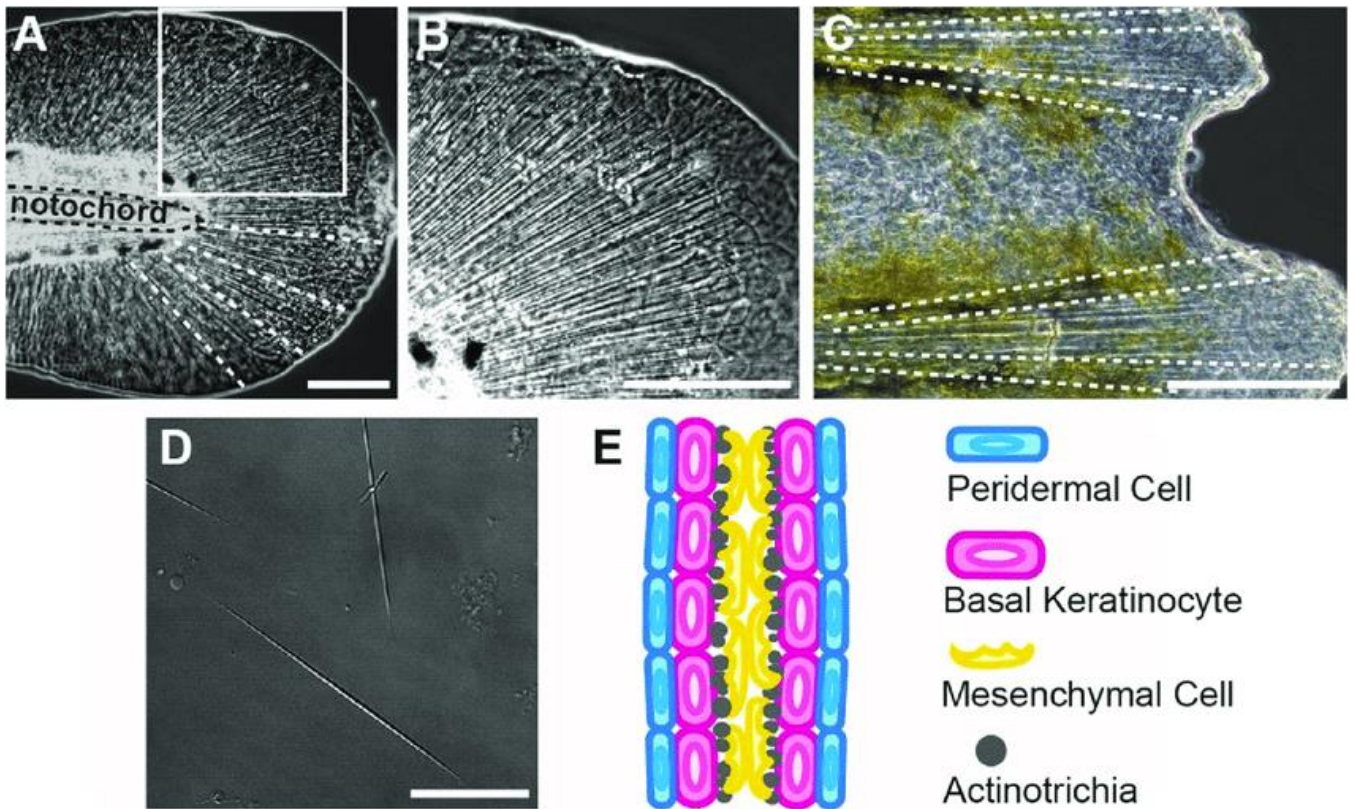
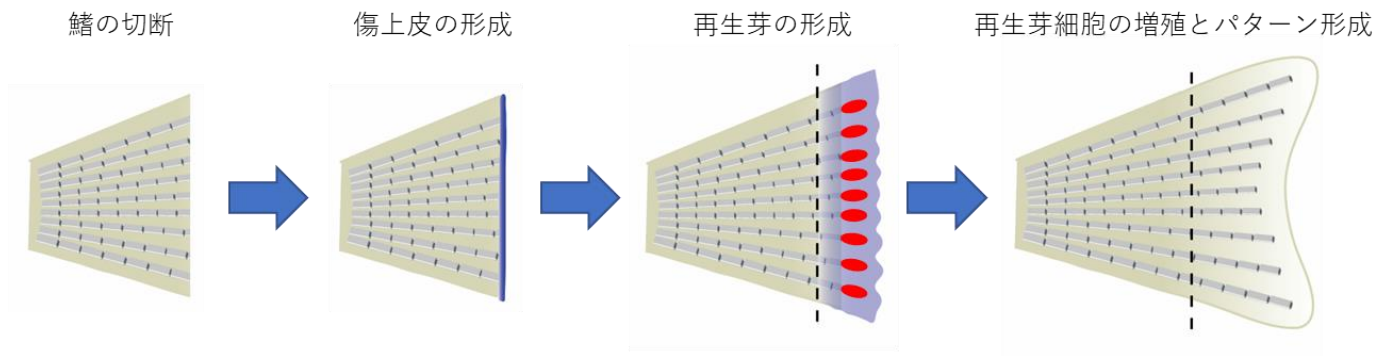


図3 ゼブラフィッシュ幼生膜鰭の構造

(A) 3 dpf 膜鰭 (fin fold) の位相コントラスト像。体軸にある脊索 (notochord) から放射状にアクチノトリキア (actinotrichia, 白破線) が伸びている。(B) (A) の拡大写真。(C) 成魚尾鰭の先端の写真。鰭条の先端からも放射状にアクチノトリキア (白破線) が伸びている。(D) 幼生膜鰭から分離したアクチノトリキアの共焦点画像。針状のアクチノトリキアが観察できる。(E) 幼生膜鰭の断面図。上皮細胞 (シアン, マゼンタ) と間葉細胞 (黄色) の間に複数本のアクチノトリキア (黒丸) が存在する。Scale bars, (A–C) 100 μ m, (D) 50 μ m. [Kuroda et al., 2018](#) から引用。

A



B

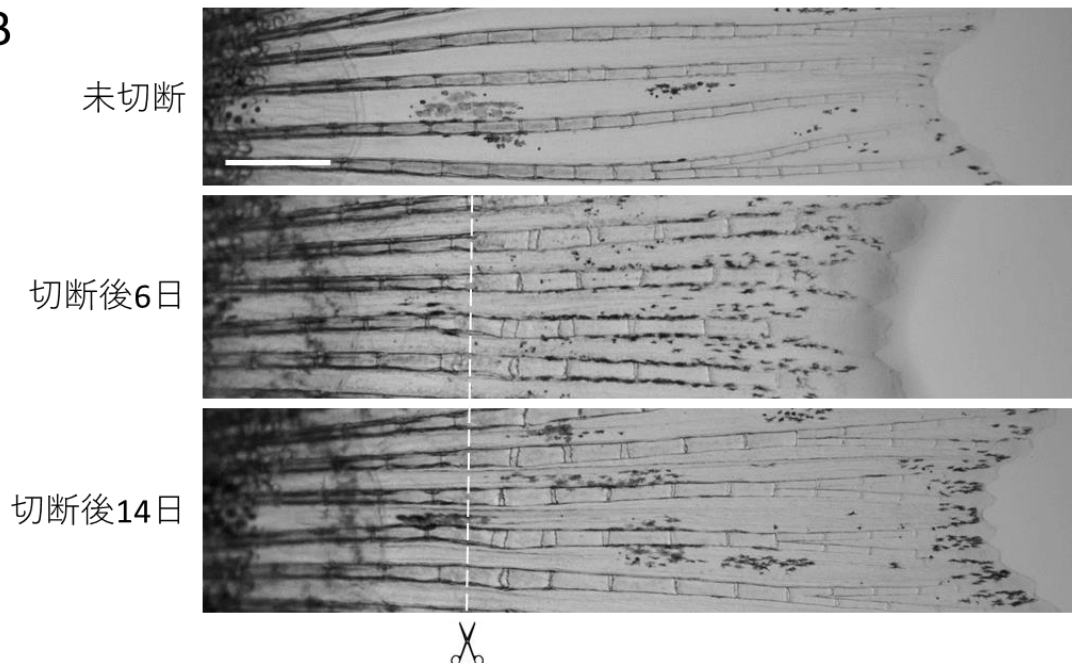


図4 ゼブラフィッシュ尾鰭の再生過程

(A) ゼブラフィッシュ尾鰭における再生過程の模式図。鰭は切断後 1 日で上皮が傷口を覆い、肥厚化した特殊な組織である傷上皮 (wound epidermis, 濃青色) を形成する。2 日目には傷上皮の誘導により、増殖性の細胞集団である再生芽 (blastema, 赤色) が形成される。その後、再生芽細胞が増殖しながら鰭のパターンを再形成し、2 週間ほどで鰭は元通りになる。破線、切断部位。(B) ゼブラフィッシュ尾鰭の再生過程における実体写真。尾鰭は切断後 6 日 (中段) には未切断鰭 (上段) と大体同じ長さまで再生していた。切断後 14 日 (下段) には尾鰭のパターニングが完了していた。破線、切断部位。Scale bar, 500 μ m.

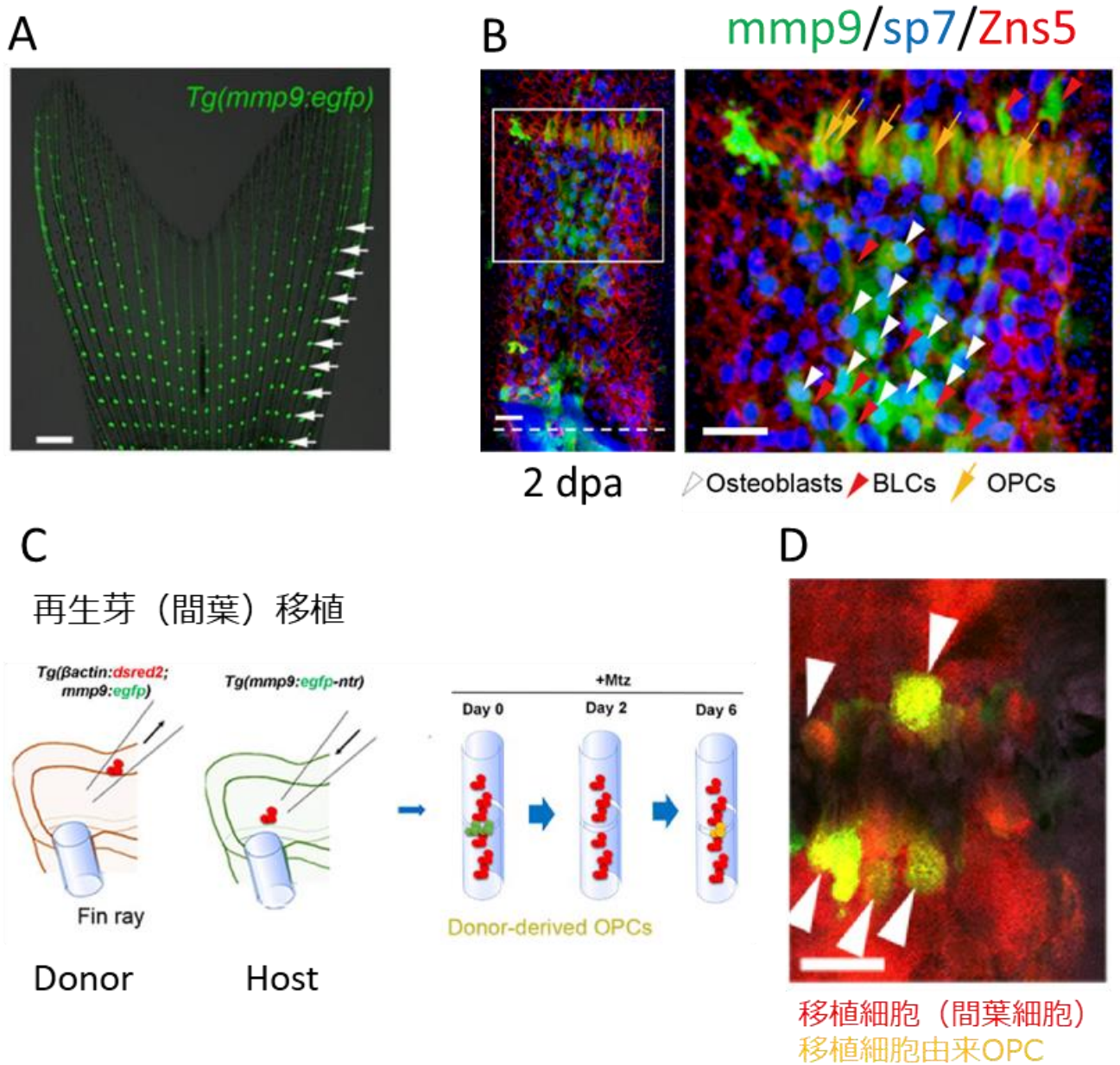


図5 ゼブラフィッシュ尾鰭における骨芽前駆細胞（OPC）

(A) *Tg(mmp9:EGFP)* の尾鰭におけるEGFPの発現。EGFP 蛍光は鰭条関節（joint, 白矢印）に局在して見られた。EGFP 蛍光は骨芽前駆細胞（osteoblast progenitor cell, OPC）を表す。

(B) *Tg(mmp9:EGFP)* の切断後2日（days post amputation, dpa）鰭における抗体染色写真とその拡大写真。共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影された。再生鰭において、緑色のEGFP 蛍光をもつ細胞はSp7（青色）を発現していた。つまり、非再生鰭でSp7⁻だったOPC（緑色）が、再生鰭でSp7⁺骨芽細胞に分化したことを表す（白三角）。EGFPの緑色蛍光は、再生されたSp7⁻/Zns5⁺ OPC（黄矢印）や同じくSp7⁻/Zns5⁺休止骨芽細胞（bone lining cell, BLC）（赤三

角)でも見られた。Zns5, 汎骨芽細胞マーカー。破線, 切断部位。(C) 再生芽(間葉)移植と OPC 除去の模式図。Donar の 2 dpa 再生芽を Host の 2 dpa 再生芽に移植し, 鰭を再生させた。定着した移植細胞のほとんどは間葉細胞になる ([Shibata et al., 2016](#))。移植後 8 日目から Metronidazole (MTZ) 処理を開始し, Host 側の OPC のみを除去しつづけた。Donar 由来の OPC は MTZ 処理による細胞除去を受けない。*Tg(β actin:dsred2)* はほぼすべての細胞で DsRed2 の赤色蛍光をもつ。(D) 移植した細胞からの OPC への分化。共焦点レーザー顕微鏡で撮影。6 日間の MTZ 処理により, 移植細胞(赤色)に由来する DsRed2⁺/EGFP⁺ OPC (黄色)が観察された(白三角)。Scale bars, (A) 500 μ m, (B,D) 10 μ m. [Ando et al., 2017](#) から引用。

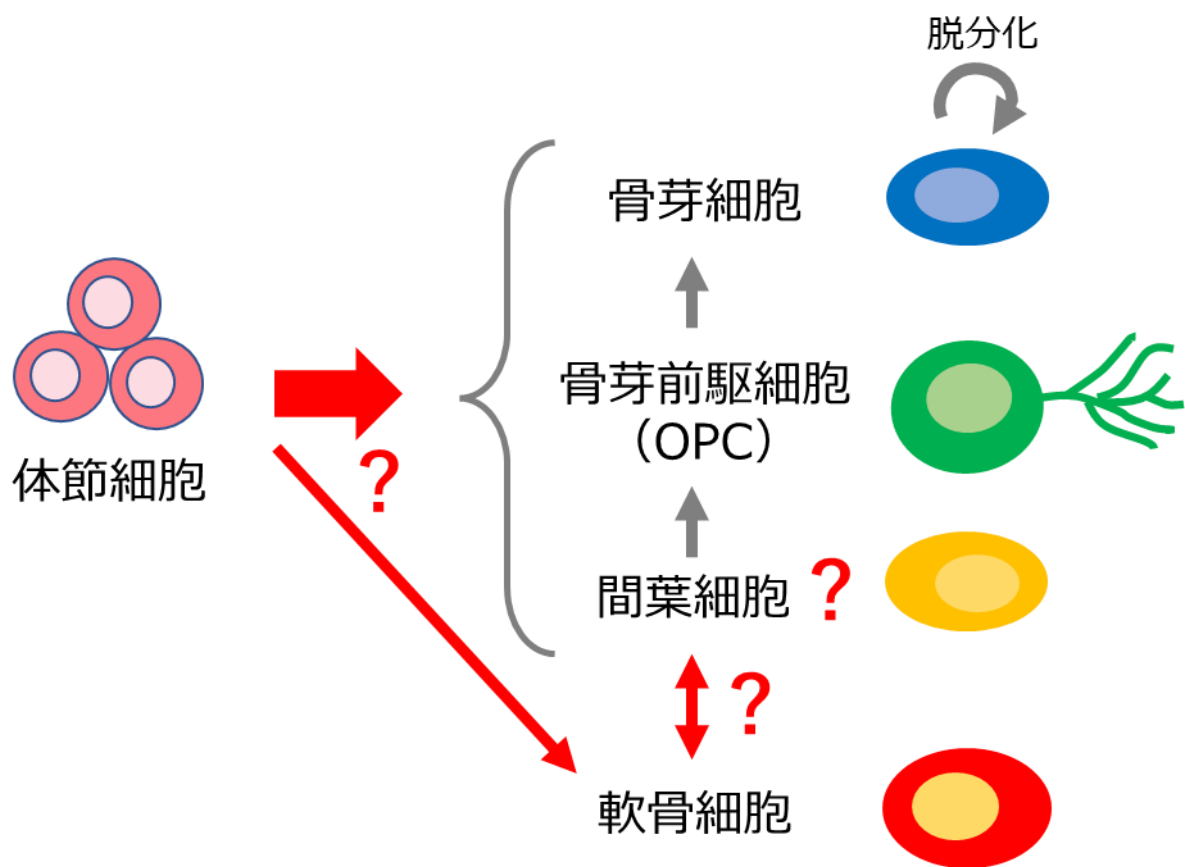


図6 ゼブラフィッシュ成魚尾鰭を形成する間葉細胞の系譜

成魚尾鰭の骨芽細胞の供給経路と起源の模式図。鰭再生において、骨芽細胞は、自身の脱分化による骨芽細胞供給のほか、骨芽前駆細胞（OPC）からも供給される。さらに OPC は間葉細胞によって補充される。また、尾鰭を形成する骨芽細胞、OPC、間葉細胞は体節に由来することが明らかになっている ([Shimada et al., 2013](#); [Ando et al., 2017](#))。しかし、OPC や骨芽細胞を補充する間葉細胞の正体や、骨格の重要な構成要素である軟骨細胞とのかかわり、それら骨格を形成する細胞が体節細胞からいつ運命が決定され、どのように骨格を形成していくのかは分かっていない。

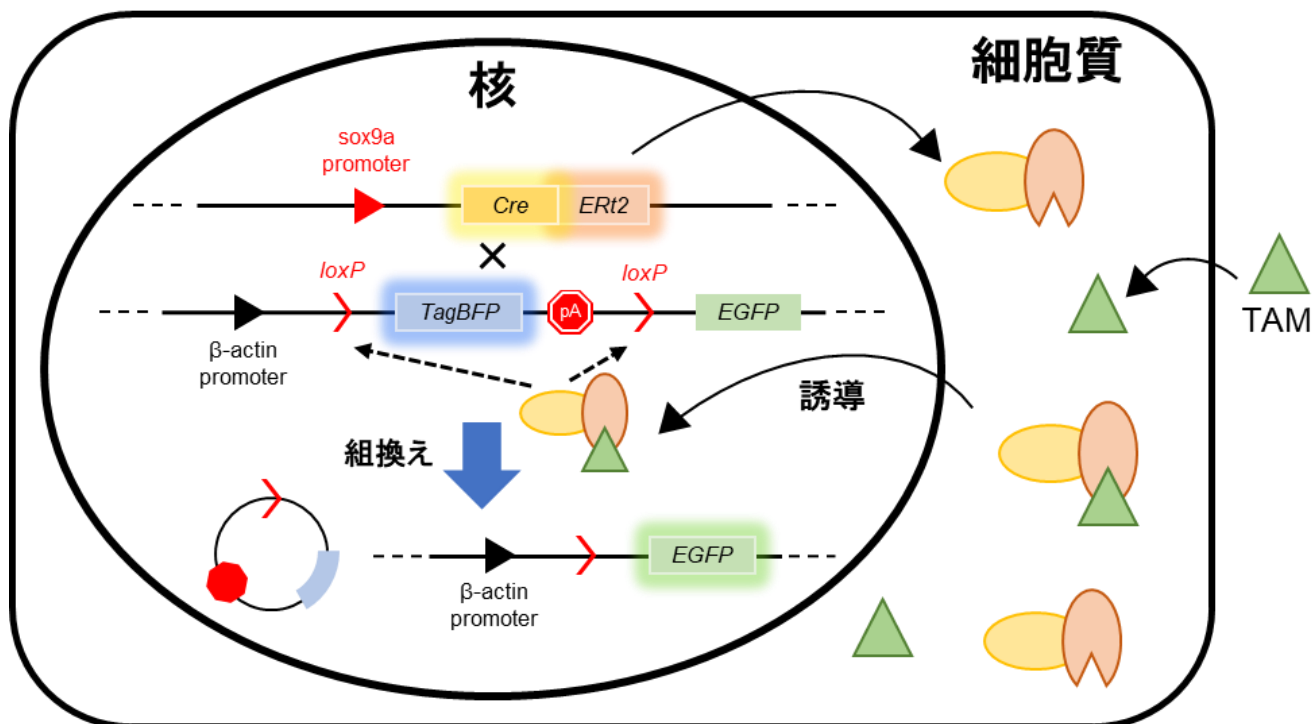


図7 Cre-*loxP* システムによる細胞標識

Cre-*loxP* システムによる細胞標識の模式図。 *Tg(sox9a:Cre-ERT2)* と *Tg(actb:loxP-TagBFP-loxP-EGFP)* を掛け合わせた。 *sox9a* プロモーター下で発現した Cre-ERT2 は 4-hydroxytamoxifen (TAM) 存在下で核内に移行し、 *loxP* 部位を組み換える。以降、 *sox9a* ではなく、 *β-actin* プロモーターによって EGFP が発現されつづけるため、細胞の増殖・分化後も細胞が絶えるまで緑色蛍光によって追跡できる。 Cre, 遺伝子組換え酵素。 ERT2, TAM 選択的エストロゲン受容体。 pA, poly-A tail。

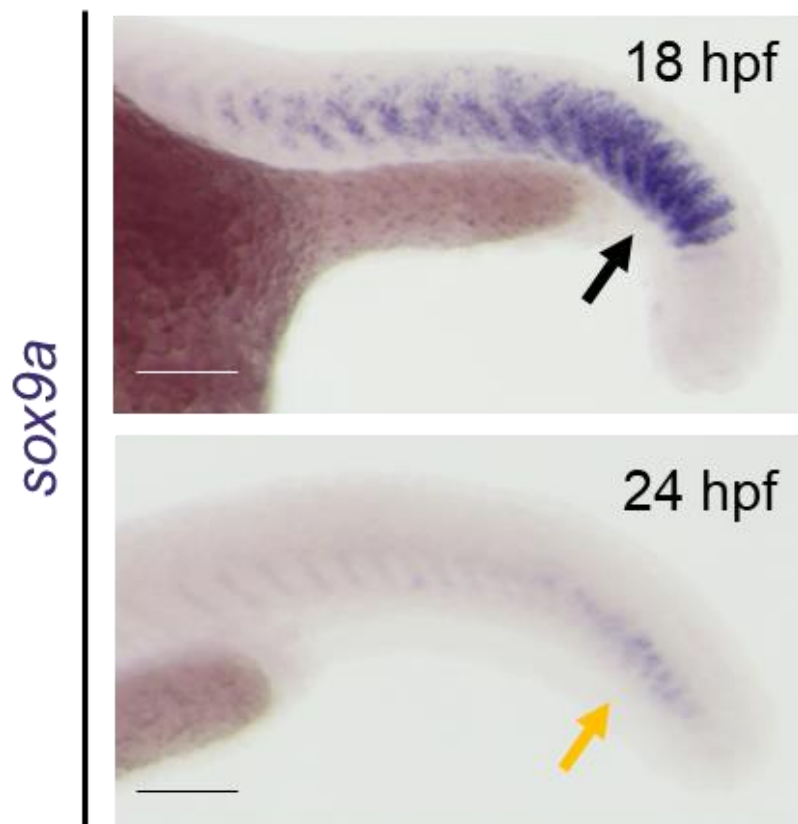


図8 *In situ* hybridization による体節における *sox9a* の発現パターン

Whole-mount *in situ* hybridization による体節期の *sox9a* mRNA 発現の可視化。体節期の受精後 18 時間 (hpf) (上) には体節領域で *sox9a* の発現 (紫色, 黒矢印) が確認できる。一方で, 体節形成がほぼ終わっている 24 hpf (下) には *sox9a* の発現がほとんど見られなくなっている (黄矢印)。Scale bars, 100 μ m.

Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)

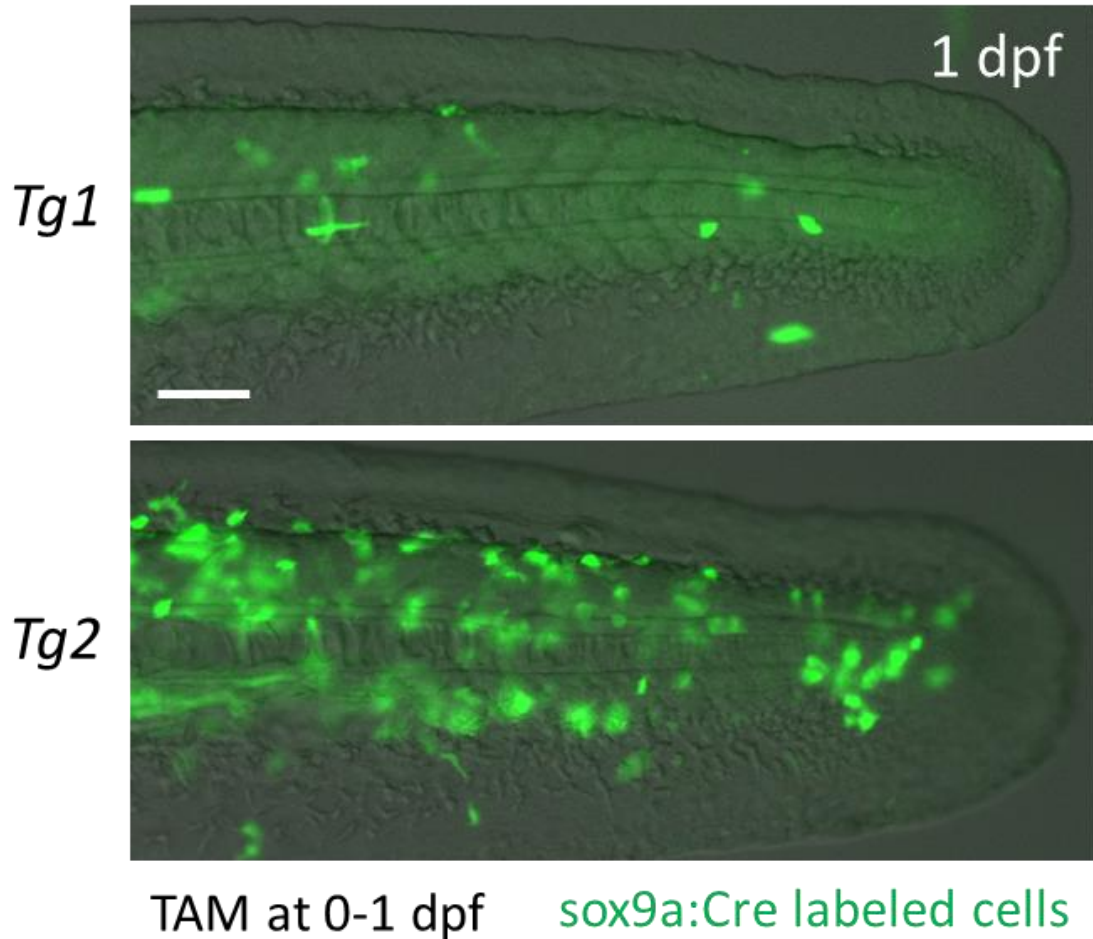


図9 1 dpf 尾部における *Tg(sox9a:Cre)* の標識パターン

組み換えた *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)* の 1 dpf 尾部の蛍光写真。TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf に起こった。作製した 2 系統の Cre Tg において、*Tg2* (下) は *Tg1* (上) より標識効率が高く、多くの EGFP 標識細胞 (緑色) が見られた。代表的な写真を掲載した。Scale bar, 50 μ m.

Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)

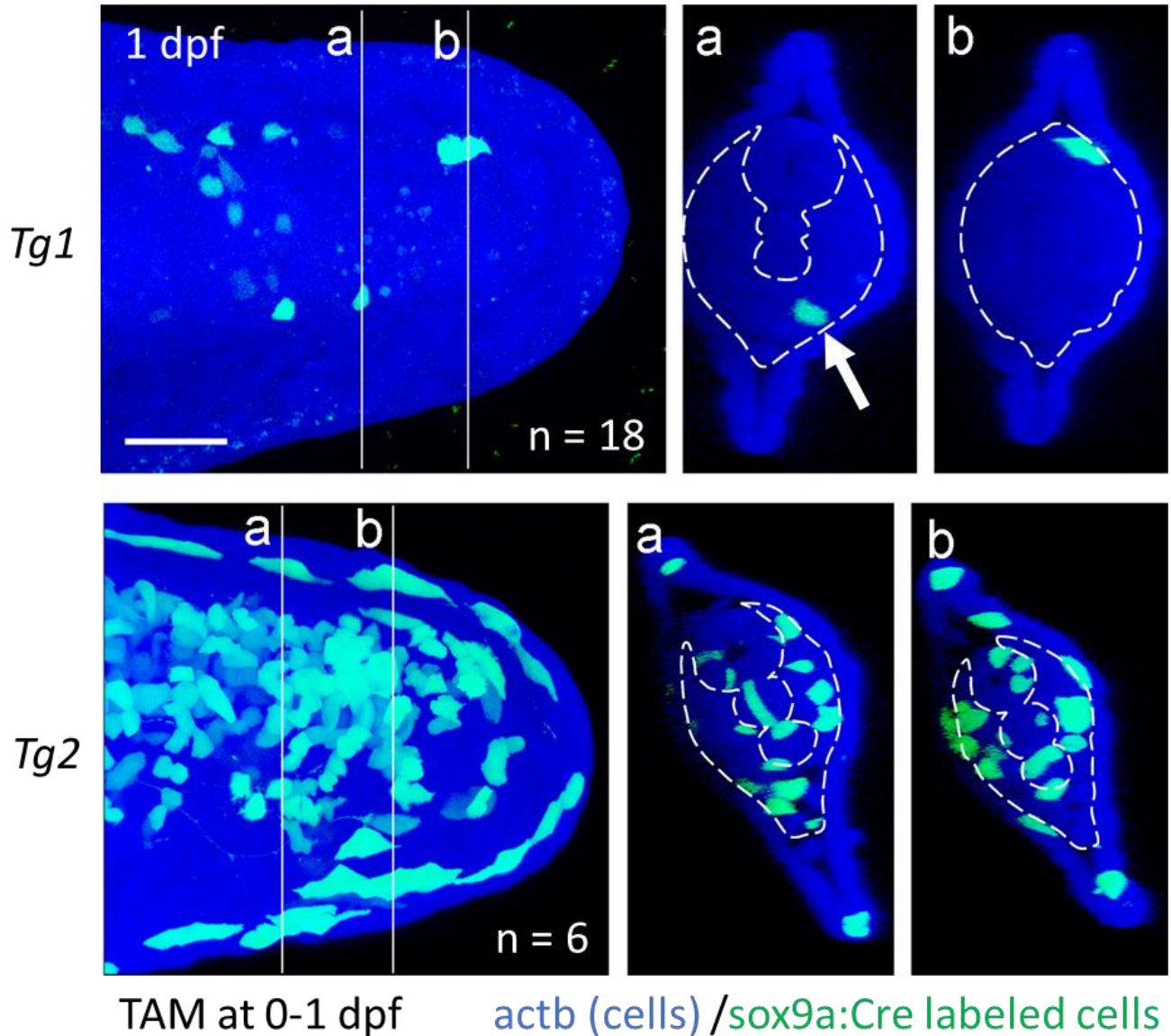


図10 1 dpf 尾部における *sox9a:Cre* 標識部位の解析

組み換えた *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)* の 1 dpf 尾部における Z-stack 像。最大値投影 (maximum intensity projection) 法で三次元的に再構築された画像 (左) とその断面 a, b における光学切片 (optical section) 像 (右)。*Tg2* (下) は *Tg1* (上) より多くの細胞が標識されていた (緑色)。どちらも体節領域 (白破線) で EGFP 蛍光が観察された (白矢印)。つまり、体節細胞を標識できたことを意味する。TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf におこなった。Actb, ほぼすべての細胞で TagBFP を発現している (青色)。調べたサンプル数は図中に記載した。Scale bar, 50 μ m.

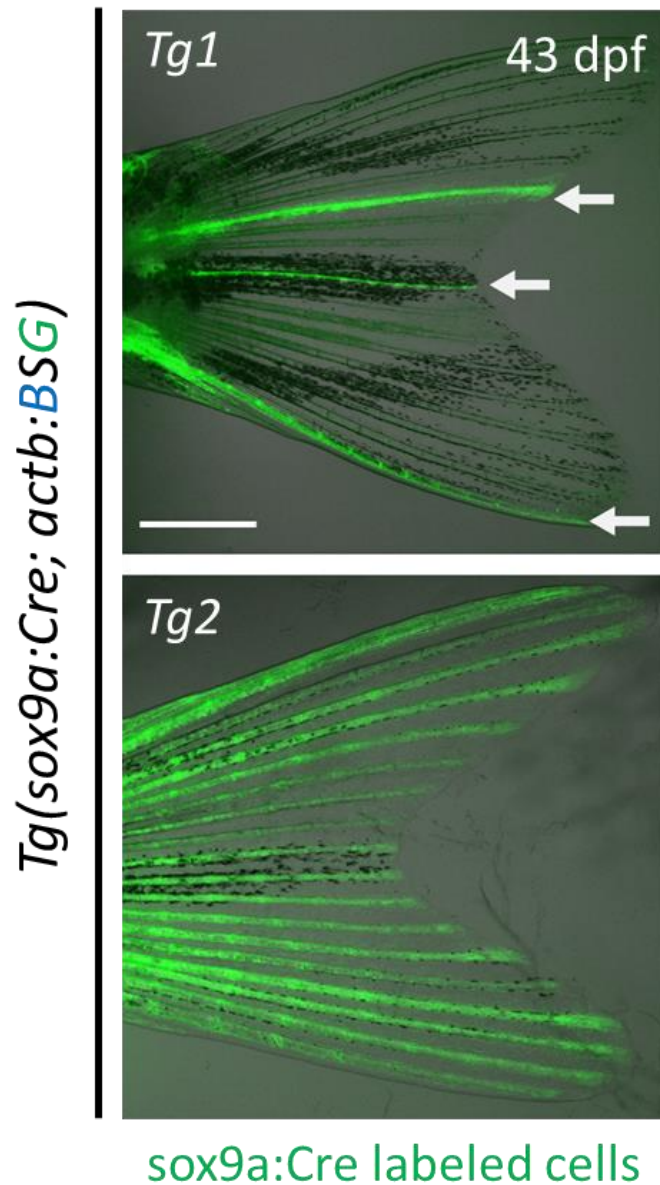
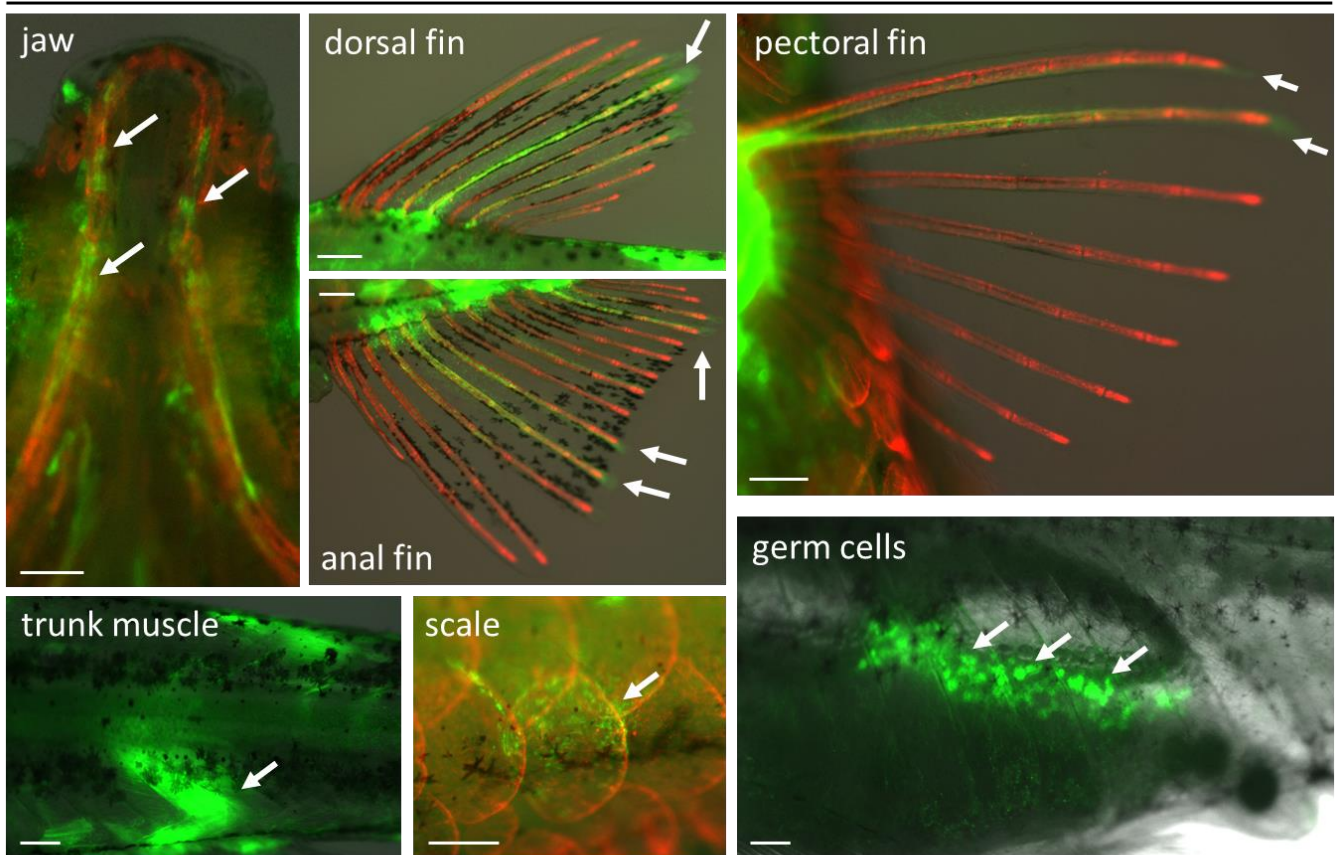


図11 *sox9a:Cre* 標識細胞の成魚尾鰭への寄与

組み換えた *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG)* の 43 dpf 尾鰭における写真。*Tg2* (下) は *Tg1* (上, 白矢印) より多くの鰭条が標識されていた (緑色)。標識された鰭条の平均本数は, *Tg2* は 11.6 本 (197 本/17 匹), *Tg1* は 2.5 本 (99 本/40 匹) であった。つまり, 体節期の標識効率が成魚尾鰭の鰭条の標識効率と関係していることが示唆される。TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf におこなった。Scale bar, 500 μ m.



TAM at 0-1 dpf

sp7 (osteoblasts) / sox9a:Cre labeled cells

図12 sox9a:Cre 標識細胞の尾鰭以外の組織への寄与

組み換えた *Tg(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* の 43 dpf における尾鰭以外の組織での写真。顎 (jaw), 背鰭 (dorsal fin), 臀鰭 (anal fin), 胸鰭 (pectoral fin), 鱗 (scale), 体幹筋 (trunk muscle), 生殖細胞 (germ cell) などで EGFP 標識が観察された (白矢印)。つまり, *sox9a:Cre* で標識された細胞は, 尾鰭以外にも幅広い組織に寄与することが分かる。TAM 処理による組織換え誘導は 0-1 dpf におこなった。sp7, 骨芽細胞 (osteoblast) のマーカー (赤色)。Scale bars, 200 μ m.

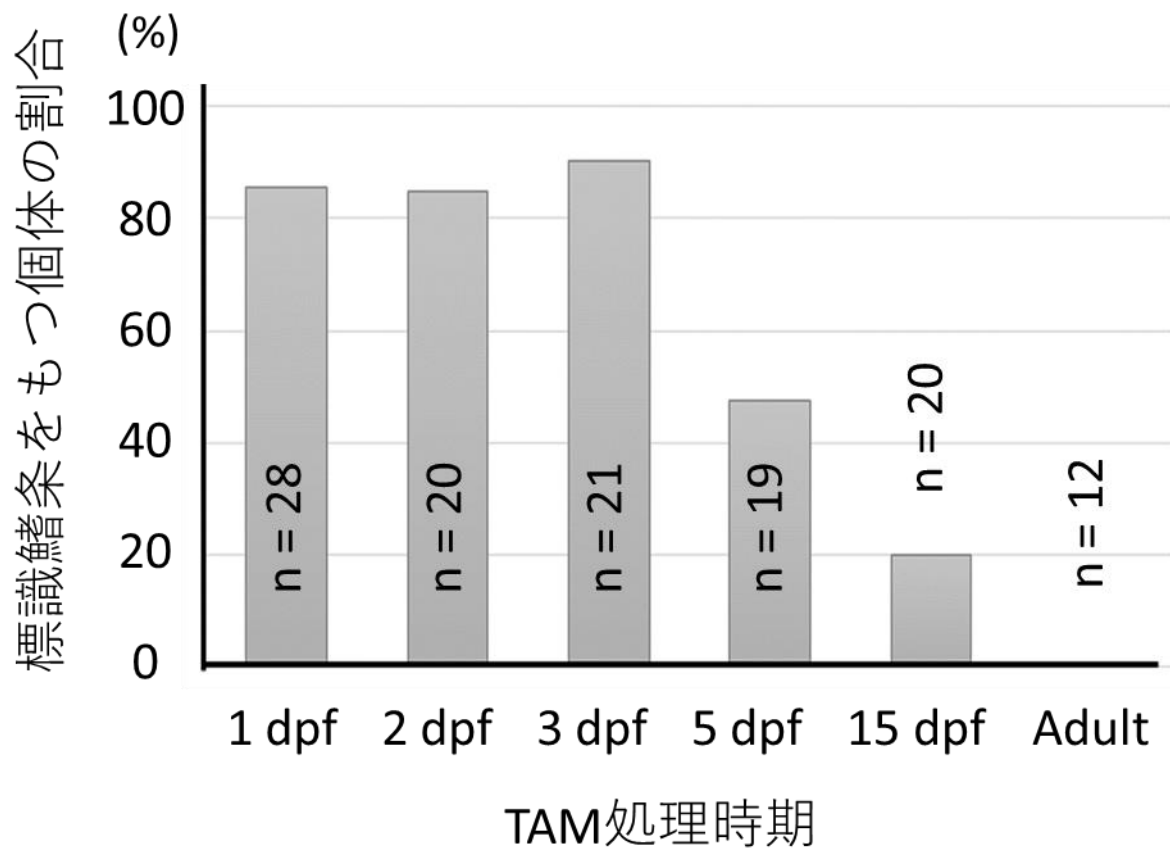
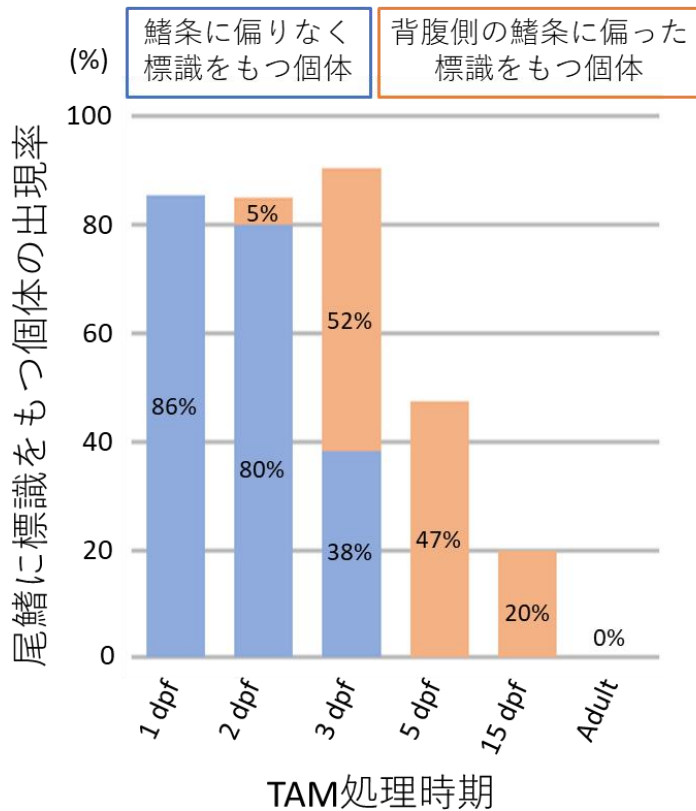


図13 TAM 処理時期による標識効率の変化

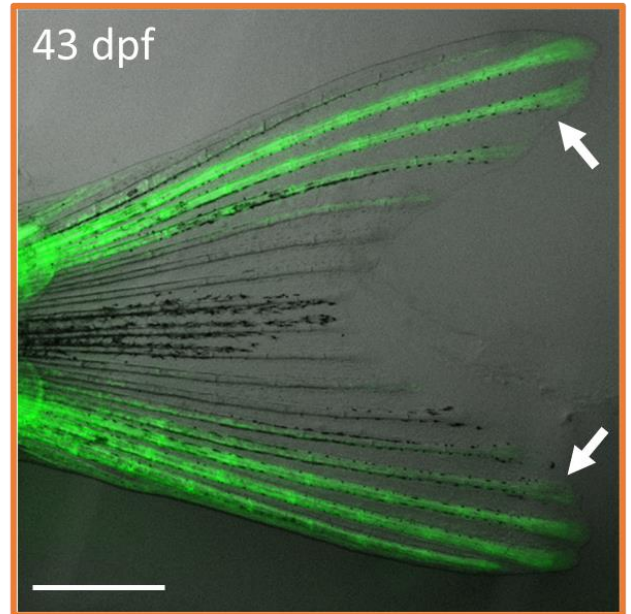
TAM 処理時期による尾鰭に標識鰭条をもつ個体の割合。高効率な *Tg2(sox9a:Cre; actb:BSG)* を使用した。TAM 処理による組換え誘導は各時点から 2 時間おこなった。標識鰭条をもつ個体の割合は、1 dpf は 86%、2 dpf は 85%、3 dpf は 90%、5 dpf は 47%、15 dpf は 20%、成魚では 0%であった。*sox9a* の発現は体節期 (1 dpf) 以降急速に低下するが、1 dpf 以降もしばらくは *sox9a:Cre* で標識できた要因としては、Cre が分解されるまで時間差があることや、発生が遅い個体が *sox9a* を発現していて標識された可能性が考えられる。調べたサンプル数は図中に記載した。

A



B

Tg2(sox9a:Cre; actb:BSG)

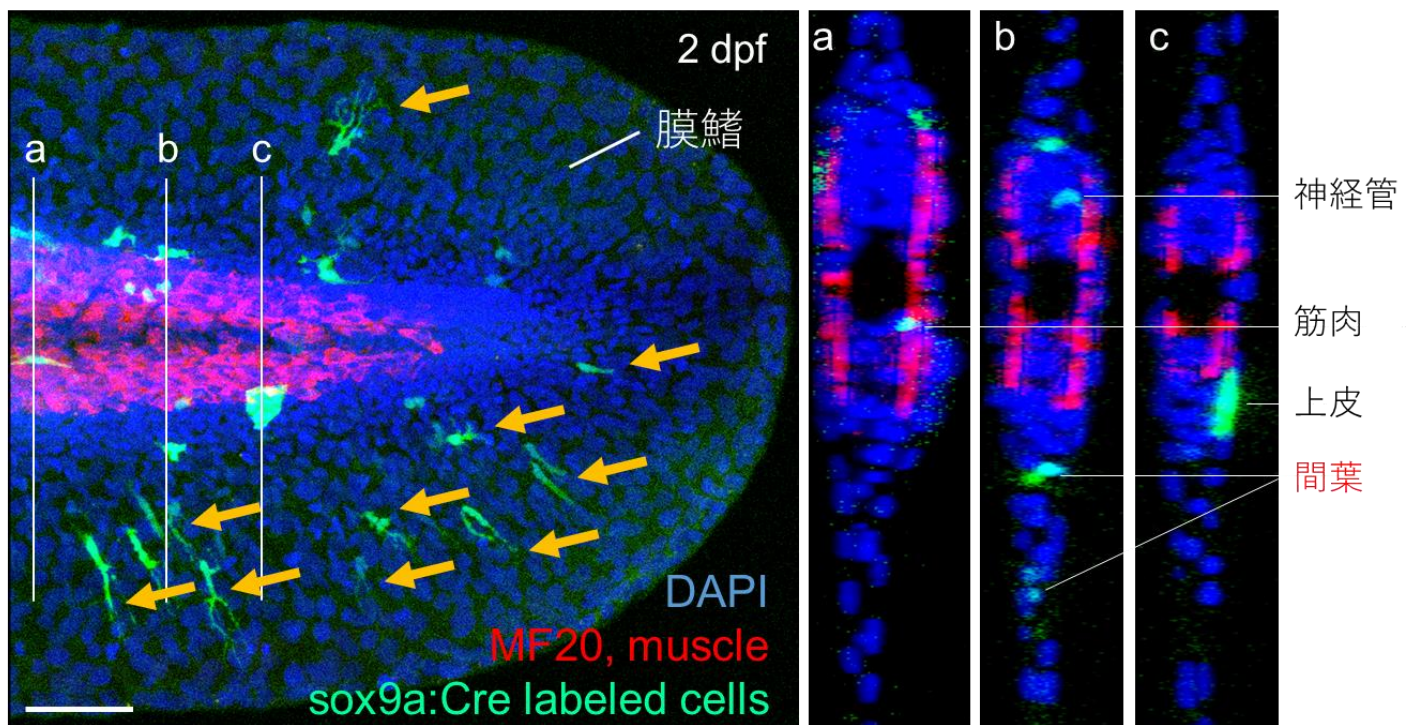


TAM at 7 dpf
sox9a:Cre labeled cells

図14 5 dpf 以降に *sox9a:Cre* で標識した細胞の成魚尾鰭への寄与

(A) 尾鰭に標識をもつ個体の出現率。図 13 について尾鰭の標識の入り方に注目して色分けした。TAM 処理は各ステージで 2 時間のみおこなった。1, 2 dpf に組換えを誘導した場合は、尾鰭に標識をもつほとんどの個体で背腹側の鰭条に偏ることなく標識がみられた。一方で、5 dpf 以降に組換えを誘導した場合、尾鰭に標識をもつすべての個体で背腹側の鰭条のみが標識されていた。(B) 組み換えした *Tg2(sox9a:Cre; actb:BSG)* の 43 dpf 尾鰭における写真。TAM 処理による組換え誘導は 7 dpf に 2 時間おこなった。背側および腹側に位置する数本の鰭条のみで EGFP の緑色蛍光が見られた (白矢印)。つまり、鰭の中央に位置する短い鰭条を形成する体節細胞は、長い鰭条を形成する体節細胞よりも早く *sox9a* の発現が低下することが示唆された。Scale bar, 500 μ m.

A

Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG)

B

2 dpf 尾部における標識細胞の系譜

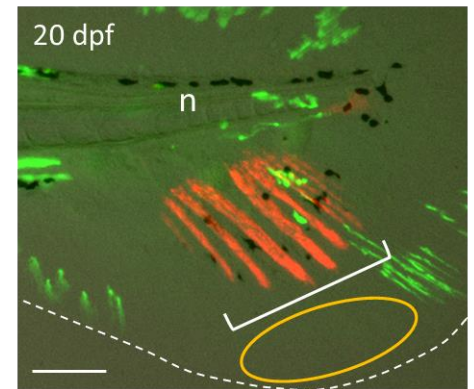
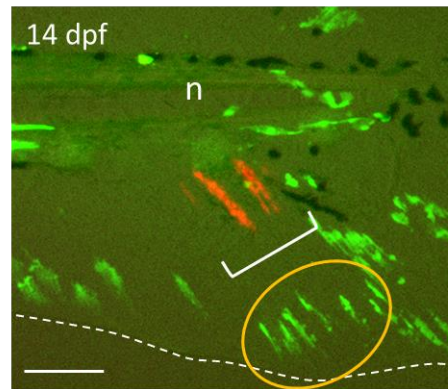
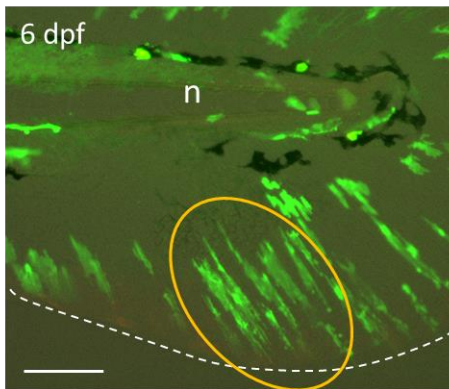
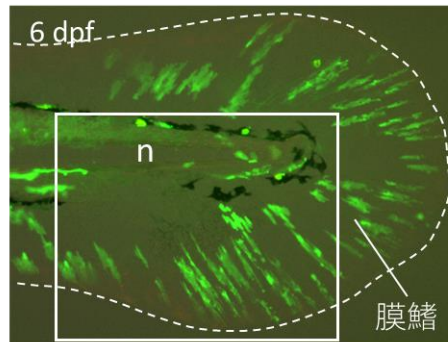


n = 405 cells (11 fish)

図15 2 dpf 尾部における sox9a:Cre 標識細胞の分化組織の解析

(A) 組み換えた *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG)* の 2 dpf 尾部における抗体染色後の Z-stack 像。最大値投影 (MIP) 法で三次元的に再構築した画像 (左) とその断面 a, b, c における光学切片像 (右)。膜鰭領域で EGFP 蛍光をもった標識細胞は (黄矢印), 外側に樹状突起を伸ばした典型的な膜鰭間葉細胞の形態 ([Feitosa et al., 2012](#)) をしていた。DAPI, 核。MF20, 抗ミオシン重鎖抗体 (筋肉)。Scale bar, 50 μ m. (B) 2 dpf 尾部における標識組織の割合。標識された細胞の 87%は膜鰭間葉細胞を含む間葉細胞であった。他には, 少数であるが上皮 (epidermis) や神経管 (neural tube), 脊索 (notochord), 下索 (hypochord), 筋肉 (muscle) で EGFP 標識が見られた。TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf におこなった。n = 405 EGFP 陽性細胞 (11 匹)。

*Tg1(sox9a:Cre;
actb:BSG;
sp7:mCherry)*



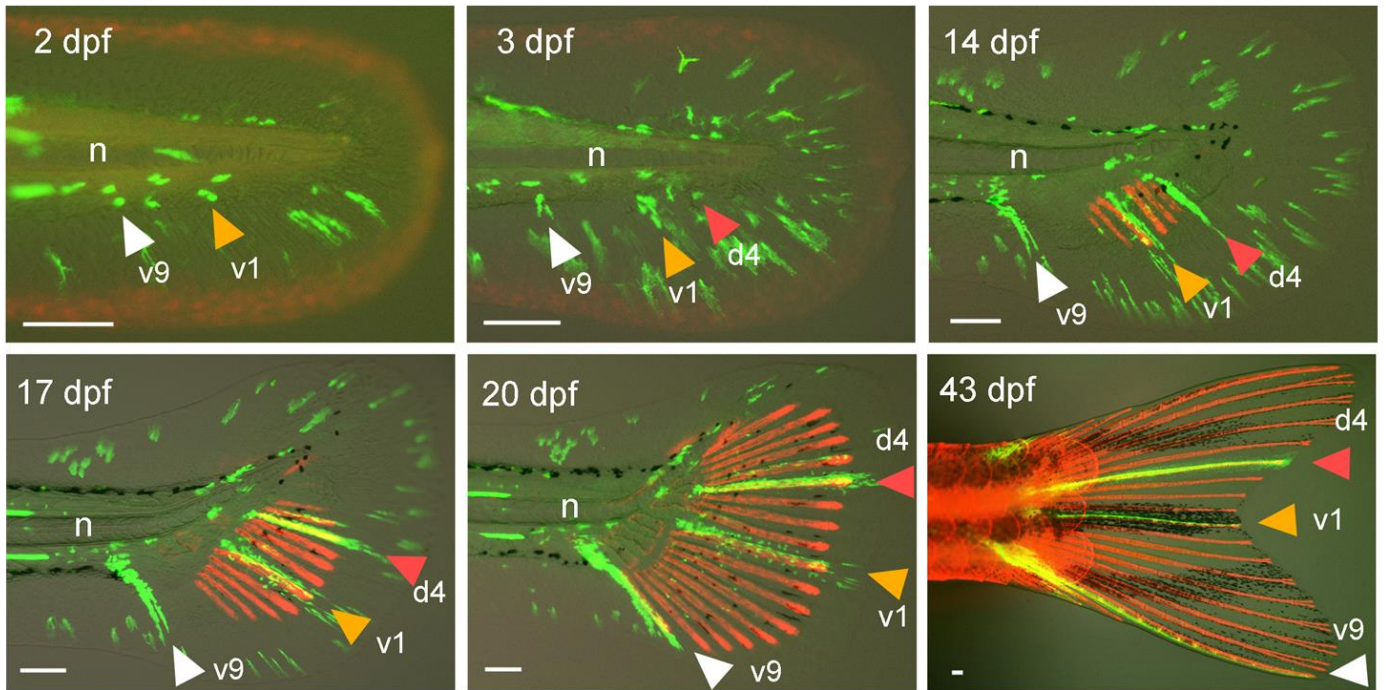
TAM at 0-1 dpf

sp7 (osteoblasts) /sox9a:Cre labeled cells

図16 sox9a:Cre で標識された膜鰭間葉細胞の鰭形成過程における消失過程

膜鰭間葉細胞の消失過程におけるタイムラプス写真。6 dpf において、膜鰭間葉細胞の多くは EGFP 標識されていた (上)。鰭条 (骨芽細胞, 赤色) が形成される過程 (下) で、膜鰭間葉細胞 (黄円) は徐々に膜鰭の端に移動し、20 dpf には完全に消失した。つまり、膜鰭間葉細胞が絶えたことを意味し、膜鰭間葉細胞は成魚尾鰭を形成しないことが分かった。*Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を使用し、TAM 処理による組換え誘導は 0-1 dpf におこなった。破線, 膜鰭。白括弧, 鰭条の形成領域。n, 脊索。n = 15. Scale bars, 100 μ m.

Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)



TAM at 0-1 dpf

sp7 (osteoblasts) / *sox9a:Cre* labeled cells

図17 胚期に *sox9a:Cre* で標識された間葉細胞の成魚尾鰭形成過程

成魚尾鰭の形成過程におけるタイムラプス写真。2-3 dpf において膜鰭の基部に位置する 1 つまたは少数の細胞（白，黄，赤三角）が，膜鰭の端に向かって増殖し，43 dpf には成魚の鰭条（骨芽細胞，赤色）を形成した。14 dpf から，増殖している標識細胞と隣接して *sp7* 陽性の骨芽細胞（赤色）が見られた。TAM 処理による組換え誘導は 0-1 dpf におこなった。つまり，成魚尾鰭に寄与する運命は，標識をおこなった体節期の時点ですでに決まっていることが示唆された。*Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を使用した。v9，腹側 9 番目の鰭条。v1，腹側 1 番目の鰭条。d4，背側 4 番目の鰭条。n，脊索。n = 15. Scale bars, 100 μ m.

Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)

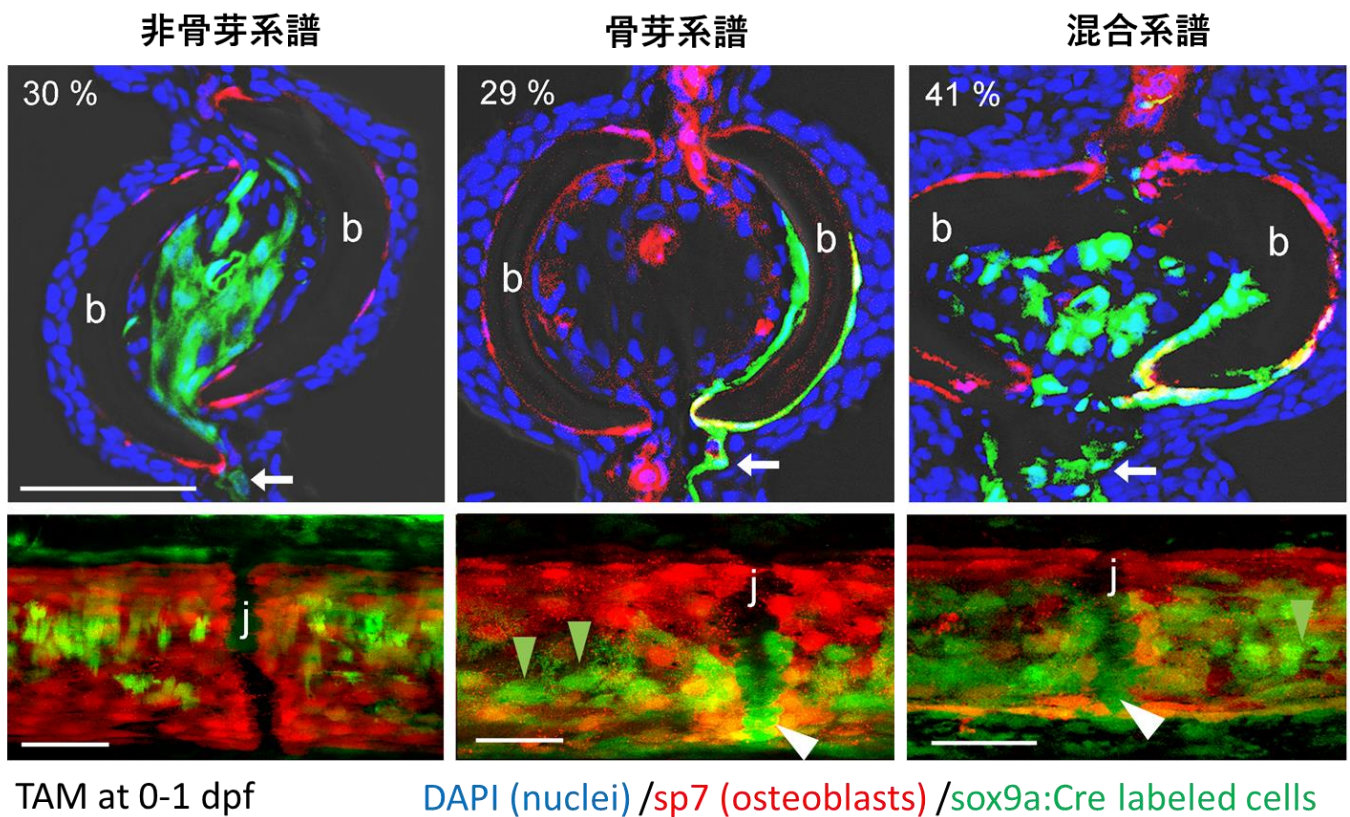


図18 成魚尾鰭における鰭条標識タイプと間葉細胞系譜

成魚における標識が見られた鰭条の横断切片写真（上）と側面の Z-stack 像（下）。共焦点レーザー顕微鏡で撮影された。非骨芽系譜（左）では、EGFP 標識細胞（緑色）は鰭条および鰭条間（白矢印）の間葉領域で見られた（左上）。鰭条関節では見られなかった（左下）。骨芽系譜（中央）では、EGFP 標識細胞は鰭条骨に沿って観察され（中央上）、一部鰭条間領域でも見られた（白矢印）。標識細胞の大部分は *sp7* 陽性の骨芽細胞（赤色）と重なっており、鰭条関節の骨芽前駆細胞（OPC, 白三角）や休止骨芽細胞（BLC, 緑三角）でも EGFP 蛍光が観察された（中央下）。混合系譜（右）では、非骨芽系譜と骨芽系譜を合わせたような標識が見られた。鰭条の間葉領域や鰭条骨の周辺、一部鰭条間（白矢印）で EGFP 蛍光が観察された（右上）。また、OPC（白三角）や BLC（緑三角）でも EGFP 蛍光が観察された（右下）。標識鰭条 76 本について系譜の出現率を調べたところ、非骨芽系譜は 30%（23 本）、骨芽系譜は 29%（22 本）、混合系譜は 41%（31 本）であった。*Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を使用し、TAM 処理による組換え誘導は 0-1 dpf におこなった。b, 鰭条骨。j, 鰭条関節。DAPI, 核。Scale bars, 50 μm.

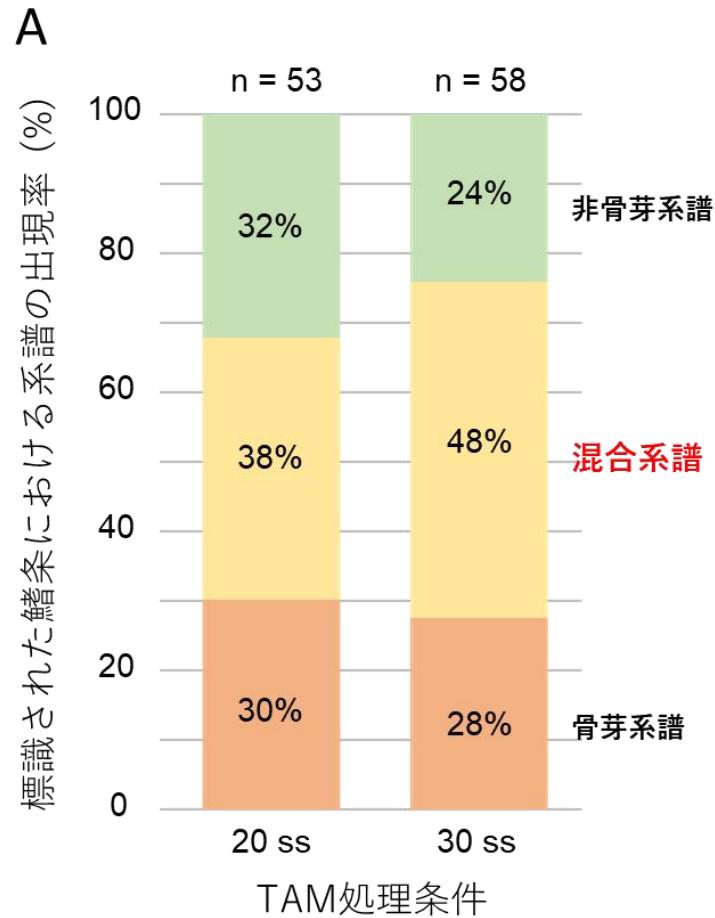


図19 TAM 処理時期と間葉細胞系譜の出現率変化

(A) TAM 処理時期と標識鰭条にみられた系譜の割合。20 体節期 (somite stage, ss) (受精後約 18 時間) と 30 体節期 (受精後約 24 時間) に TAM 処理を 2 時間おこなった。体節形成がほぼ終わっている 30 体節期においても、混合系譜が 48% の割合で観察された。つまり、混合系譜は体節期に骨芽系譜と非骨芽系譜に分岐するわけではなく、混合系譜という尾鰭を形成する間葉細胞系譜の 1 つであることが示唆された。 *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を使用した。調べた EGFP 陽性の鰭条数は図中に示した。(B) 20 体節期 (左) と 30 体節期 (右) のゼブラフィッシュ胚。

骨芽系譜

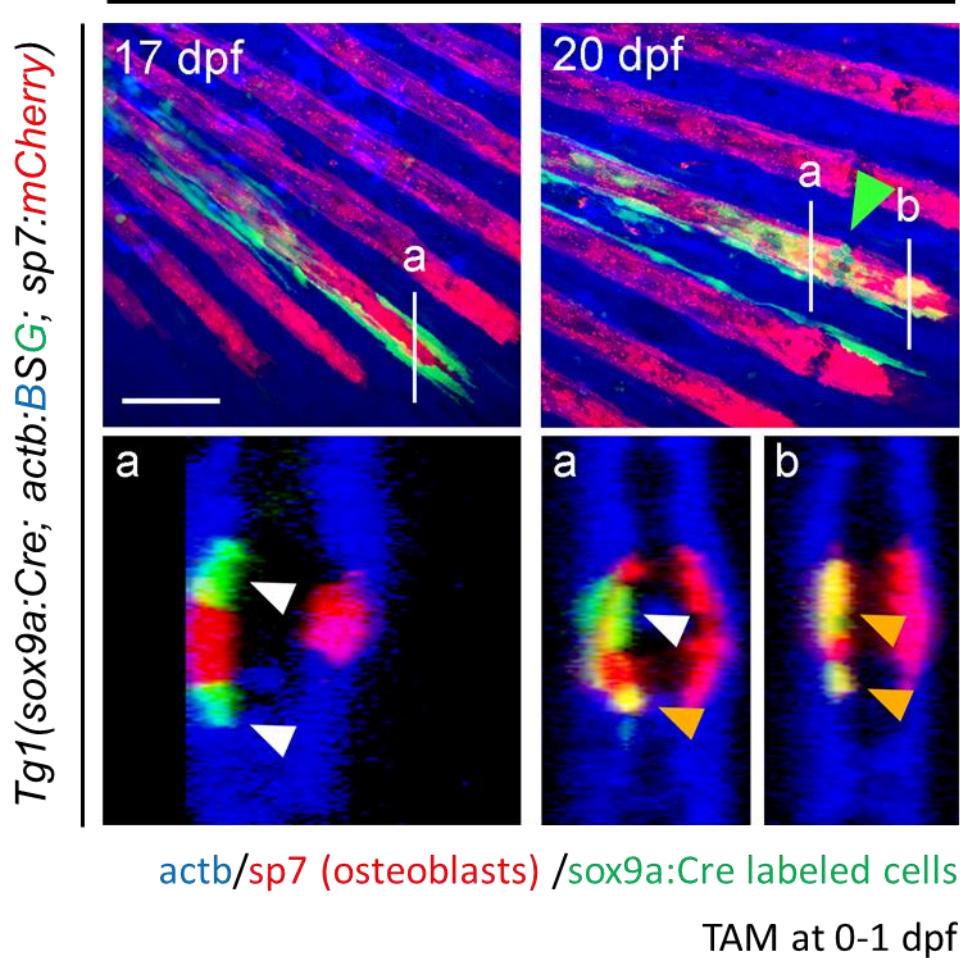


図20 骨芽系譜間葉細胞の鰭条形成過程

骨芽系譜の標識をもつ鰭条の形成過程。共焦点レーザー顕微鏡を用いて Z-stack 撮影され、三次元的に再構築された画像（上）とその断面 a または a, b における光学切片像（下）。17 dpf（左）では、増殖している EGFP 標識細胞は、鰭条骨の形成領域に位置していたが（左下）、まだ mCherry 蛍光を持っていなかった（白三角）。20 dpf（右）になると、標識細胞の一部で mCherry 蛍光が見られ（黄三角）、sp7 陽性の骨芽細胞（赤色）に分化したことが分かった（右下）。また、初めて形成された鰭条関節でも EGFP 標識が見られたことから（緑三角）、sp7 陰性の OPC に分化したことも明らかになった。従って、標識細胞が増殖しつつ OPC の出現よりも前に骨芽細胞に分化したこと、基部側の OPC は増殖せず先端側の鰭条形成に寄与しないことから、骨系細胞の産生にコミットした増殖性の間葉細胞を骨芽系間葉細胞（osteogenic mesenchymal progenitor, OMP）とした。Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry) を使用し、TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf におこなった。Actb, ほぼすべての細胞で TagBFP を発現している（青色）。n = 3. Scale bar, 50 μm.

非骨芽系譜

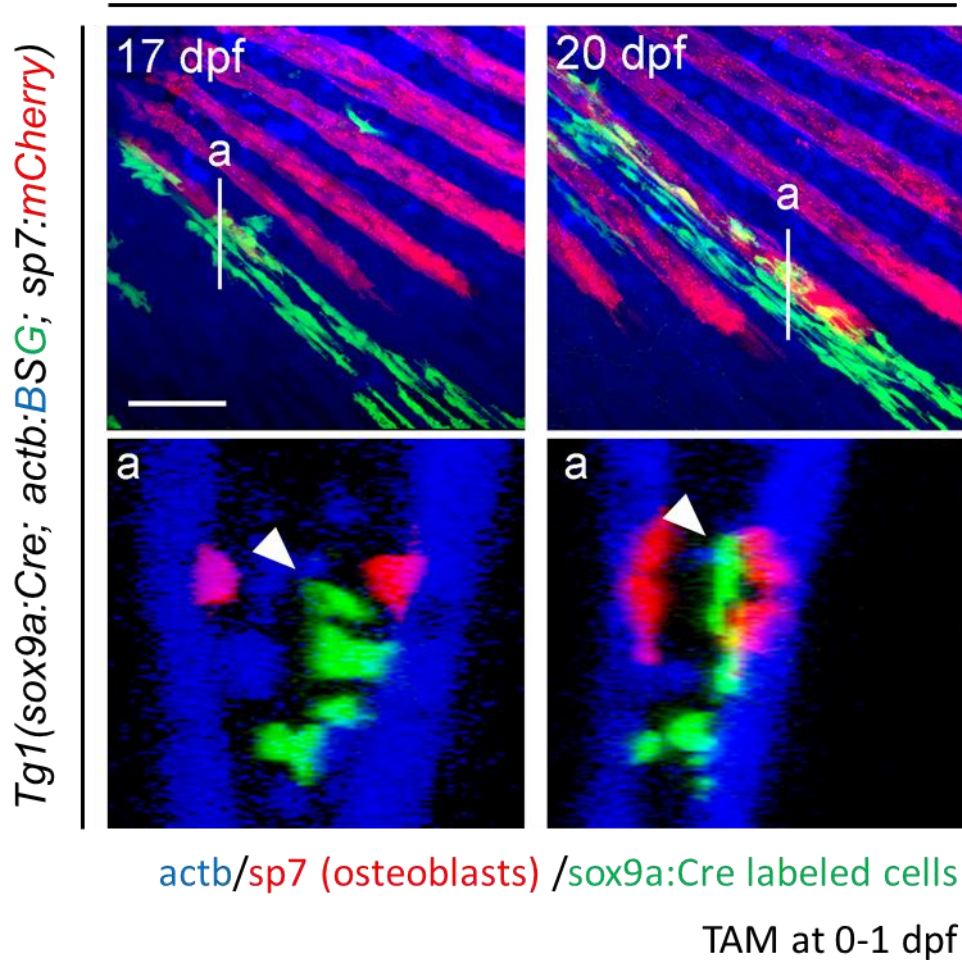


図21 非骨芽系譜間葉細胞の鰭条形成過程

非骨芽系譜の標識をもつ鰭条の形成過程。共焦点レーザー顕微鏡を用いて Z-stack 撮影され、三次元的に再構築された画像（上）とその断面 a における光学切片像（下）。17 dpf（左）では、増殖している EGFP 標識細胞は、鰭条間葉領域に位置しており（左下）、sp7 陽性の骨芽細胞（赤色）と重なっていなかった（白三角）。20 dpf（右）においても変わらず鰭条間葉領域に位置し、骨芽細胞を生み出すことはなかった（右下）。*Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を使用し、TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf におこなった。Actb, ほぼすべての細胞で TagBFP を発現している（青色）。n = 3. Scale bar, 50 μm.

Tg(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)

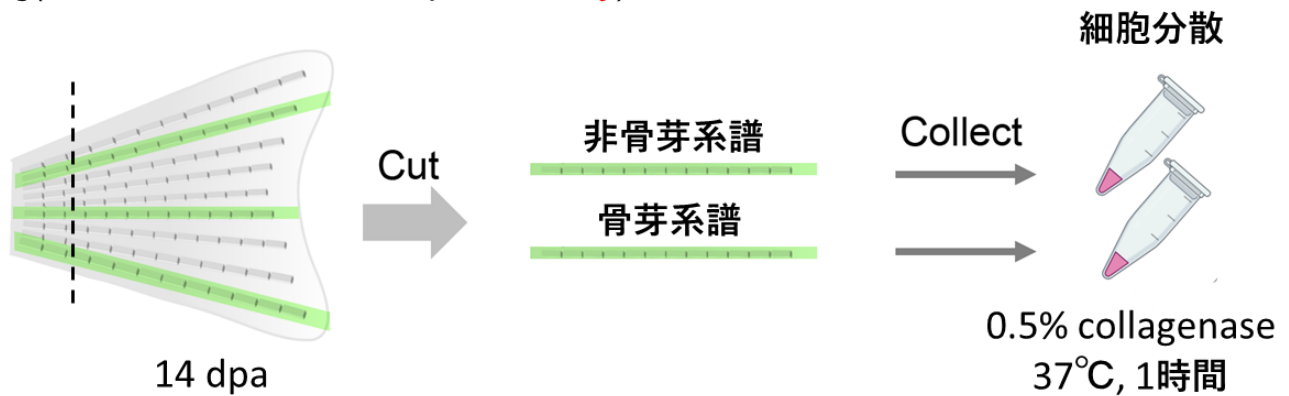


図22 標識された鰭条からの細胞分散

非骨芽系譜，骨芽系譜の標識をもつ鰭条からの細胞分散スキーム。 *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を用いて 0–1 dpf に TAM 処理し組換えを誘導した。成魚まで育てて，蛍光実体顕微鏡下で鰭条の標識タイプを識別した。尾鰭は切断後 14 日 (days post amputation, dpa) を用い，L-15 培地中で標識鰭条を 1 本に切り分けた。切り分けた鰭条をさらに 4–5 等分し，10–20 本分収集した。集めた鰭条を 0.5% collagenase で 37°C，1 時間消化した。消化中は 5 分おきに容器をタッピングして液を混ぜた。消化液には近赤外蛍光をもつ死細胞核染色試薬 RedDot2 を添加した。鰭条を消化後，40 μm メッシュのセルストレーナーに通し，非骨芽系譜，骨芽系譜の細胞懸濁液を得た。

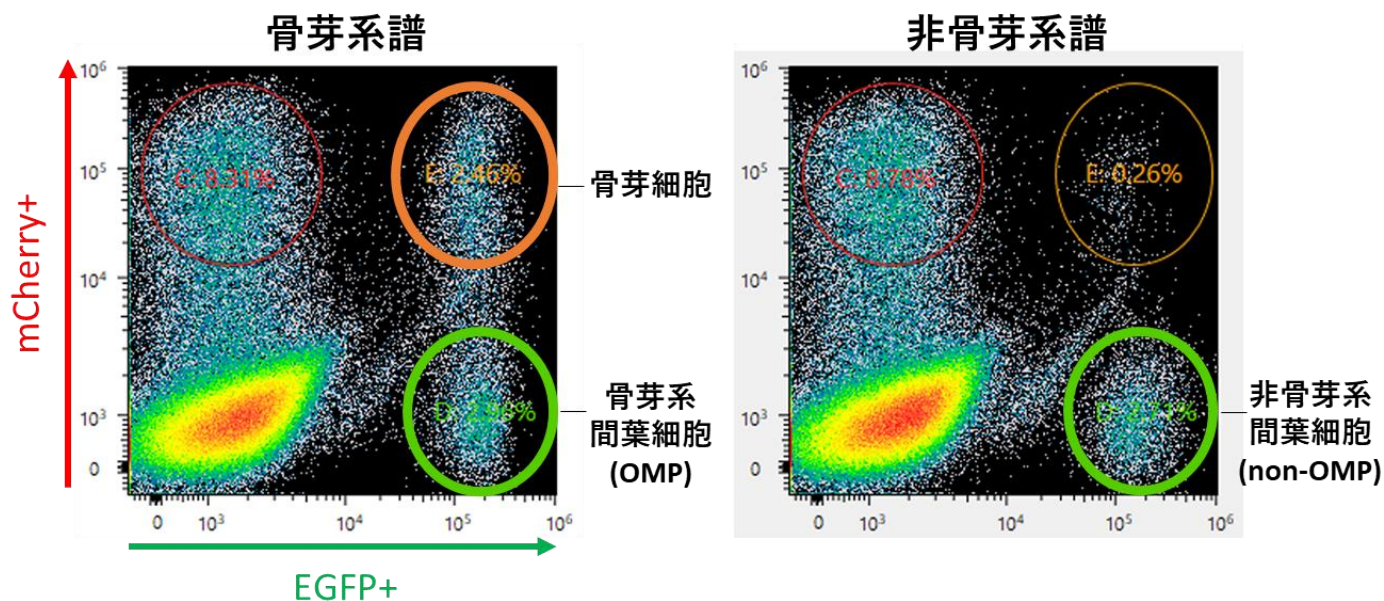


図23 骨芽系譜間葉細胞 (OMP) と非骨芽系譜間葉細胞 (non-OMP) の分取

セルソーターにおける骨芽系譜 (左) 非骨芽系譜 (右) のプロット。0-1 dpf に組換えを誘導した *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* の 14 dpa 鰭から標識鰭条を採取し、細胞を分散してセルソーターで解析した。骨芽系譜からは、EGFP⁺/mCherry⁺骨芽細胞 (左, 橙円) と EGFP⁺/mCherry⁻骨芽系間葉細胞 (OMP) (左, 緑円) を, 非骨芽系譜からは EGFP⁺/mCherry⁻非骨芽系間葉細胞 (non-OMP) (右, 緑円) を分取した。プロット右側は EGFP が強く発現しており, 上側は mCherry が強く発現していることを示している。プロット左下の集団は蛍光を持たない細胞集団である。細胞集団密度は, 赤色が一番高く, 黄色, 緑色, 青色, 白色に近づくにつれて低くなる。500,000 events (細胞) のみをプロットに表示した。軸には biexponential (双指数関数) スケールを用いた。OMP として収集した細胞には, *sp7* 陰性の骨芽前駆細胞 (OPC) や休止骨芽細胞 (BLC) が含まれていると考えられる。

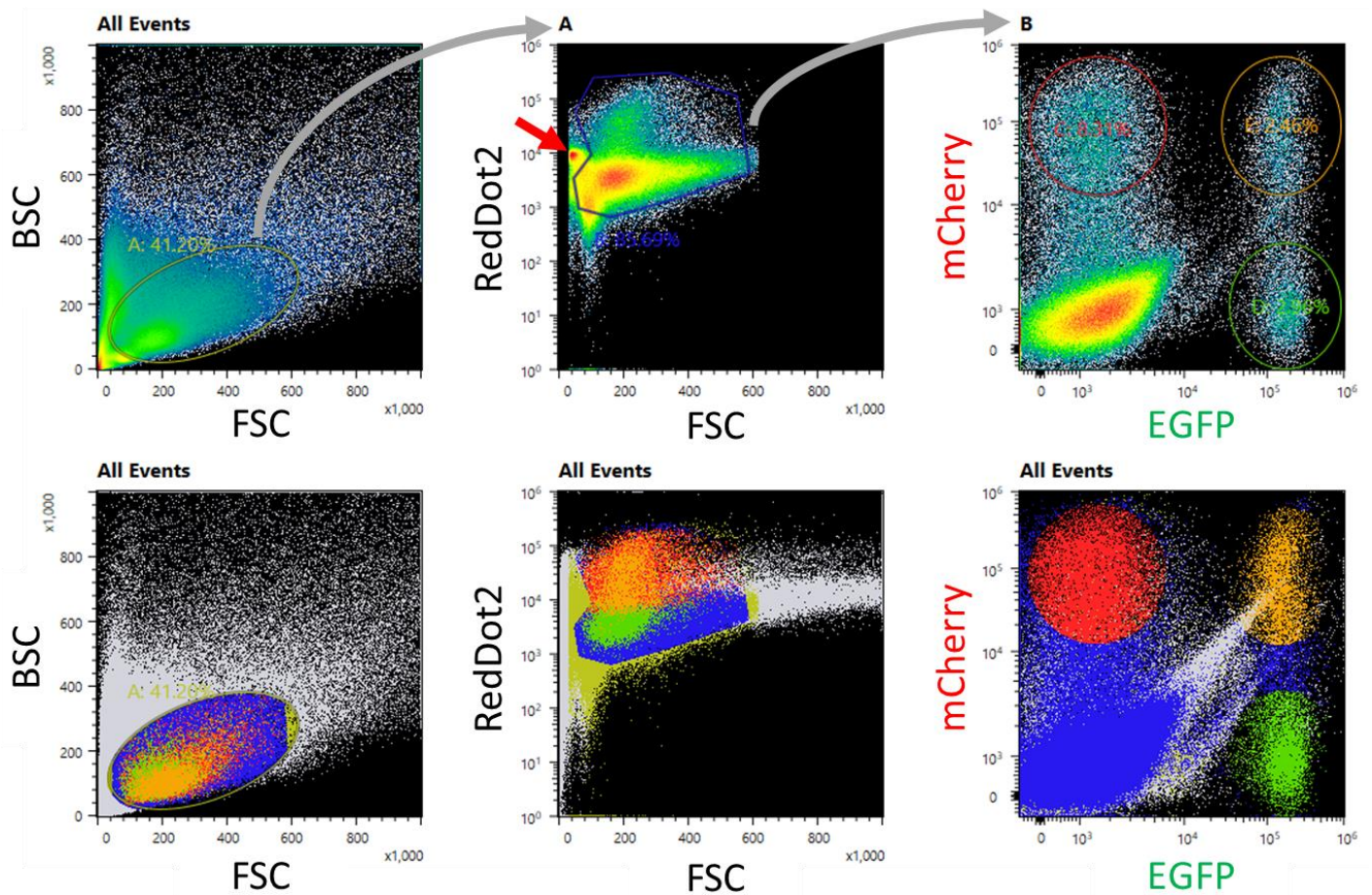


図24 セルソーターにおけるゲートの設定と細胞分取スキーム

セルソーターを用いた骨芽系譜における詳細な細胞分取過程。density plot (上) では細胞集団の密度が分かり、dot plot (下) ではゲートを設定した細胞集団が、異なるチャンネル上でどこに分布しているかをみることができる。最初、FSC/BSC チャンネルを用いて、ゲート A (黄土色) の領域内の細胞を選び、FSC/RedDot2 グラフに再プロットした。続けてゲート B (青色) を設定し、EGFP/mCherry グラフに再プロットした。最後に、目的の細胞のゲートを設定して細胞を分取した。死細胞や細胞片 (debris)、無蛍光細胞を可能な限り除いた。dot plot (下) で細胞の分布を確認しながら、これらのゲートを設定した。dot plot (下) のドットの色は、density plot (上) で設定したゲートの色と同じである。細胞集団密度は、赤色が一番高く、黄色、緑色、青色、白色になるほど低くなる。500,000 events (細胞) のみをプロットに表示した。FSC (forward-scattered light, 前方散乱光) は細胞のサイズ、BSC (back-scattered light, 後方散乱光) は細胞内部の複雑さを主に表す。RedDot2, 近赤外蛍光をもつ死細胞核染色試薬。赤矢印, RedDot2 陽性細胞。

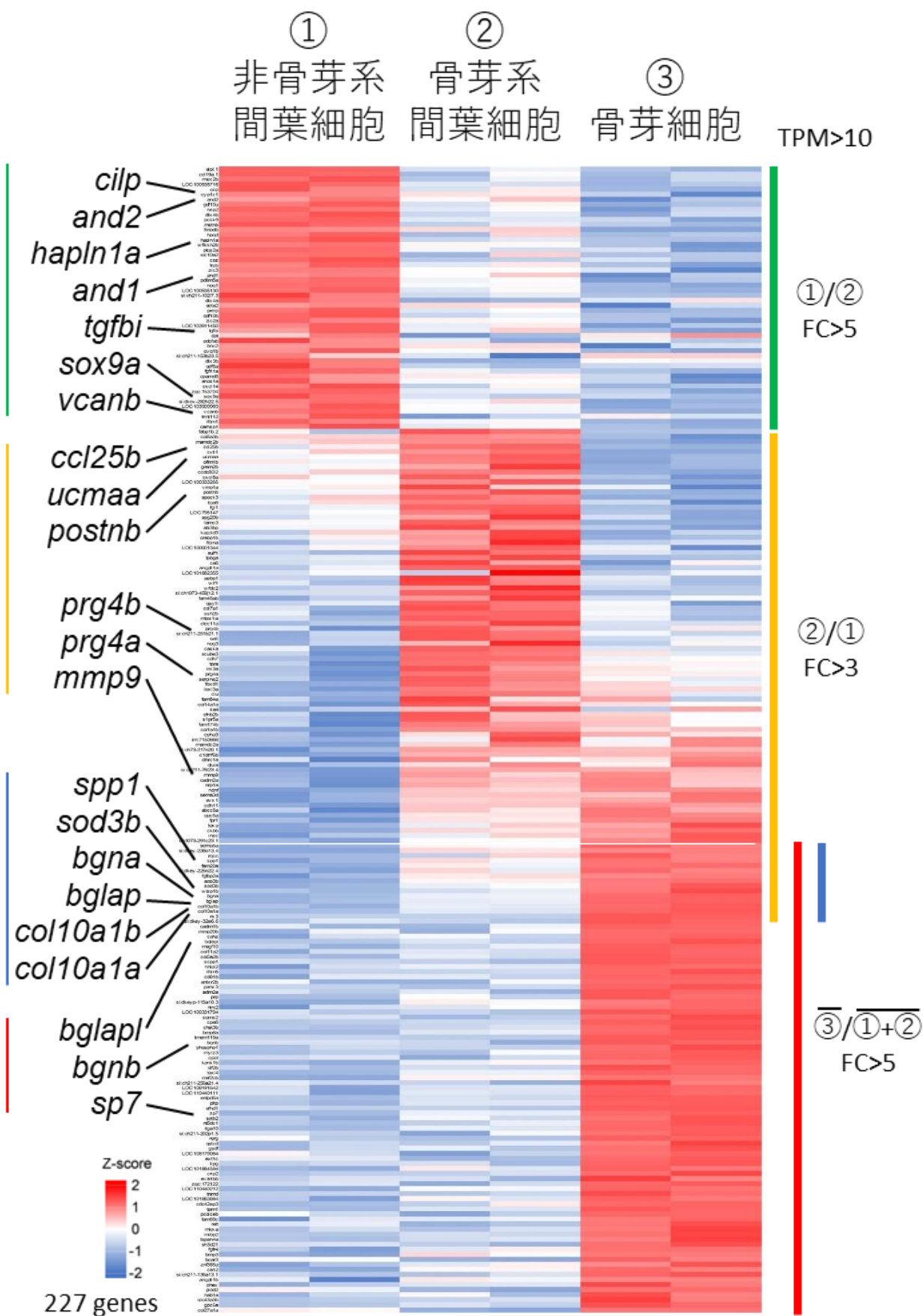


図25 OMP, non-OMP, 骨芽細胞に濃縮された遺伝子のヒートマップ

OMP, non-OMP, 骨芽細胞における遺伝子発現のヒートマップ。遺伝子のフィルタリング条件は図中に示した。OMP, non-OMP, 骨芽細胞の発現変動遺伝子として計 227 個の遺伝子を同定した。その内, non-OMP で特異的に発現する遺伝子は 52 個 (緑線), OMP で特異的に発現する遺伝子は 82 個 (黄線単色), OMP と骨芽細胞で濃縮された遺伝子は 14 個 (青線), 骨芽細胞で特異的に発現する遺伝子は 79 個であった (赤線単色)。ヒートマップは, 各遺伝子ごとに算出した z-score を用いて作製した。グループに特徴的な遺伝子を図左側に示している。non-OMP では軟骨形成に関わる遺伝子が濃縮しており, OMP では骨形成に関わる遺伝子が濃縮していた。従って, non-OMP を軟骨芽間葉細胞 (chondrogenic mesenchymal progenitor, CMP) とした。サンプリングは独立して 2 回実施した。FC, fold change.

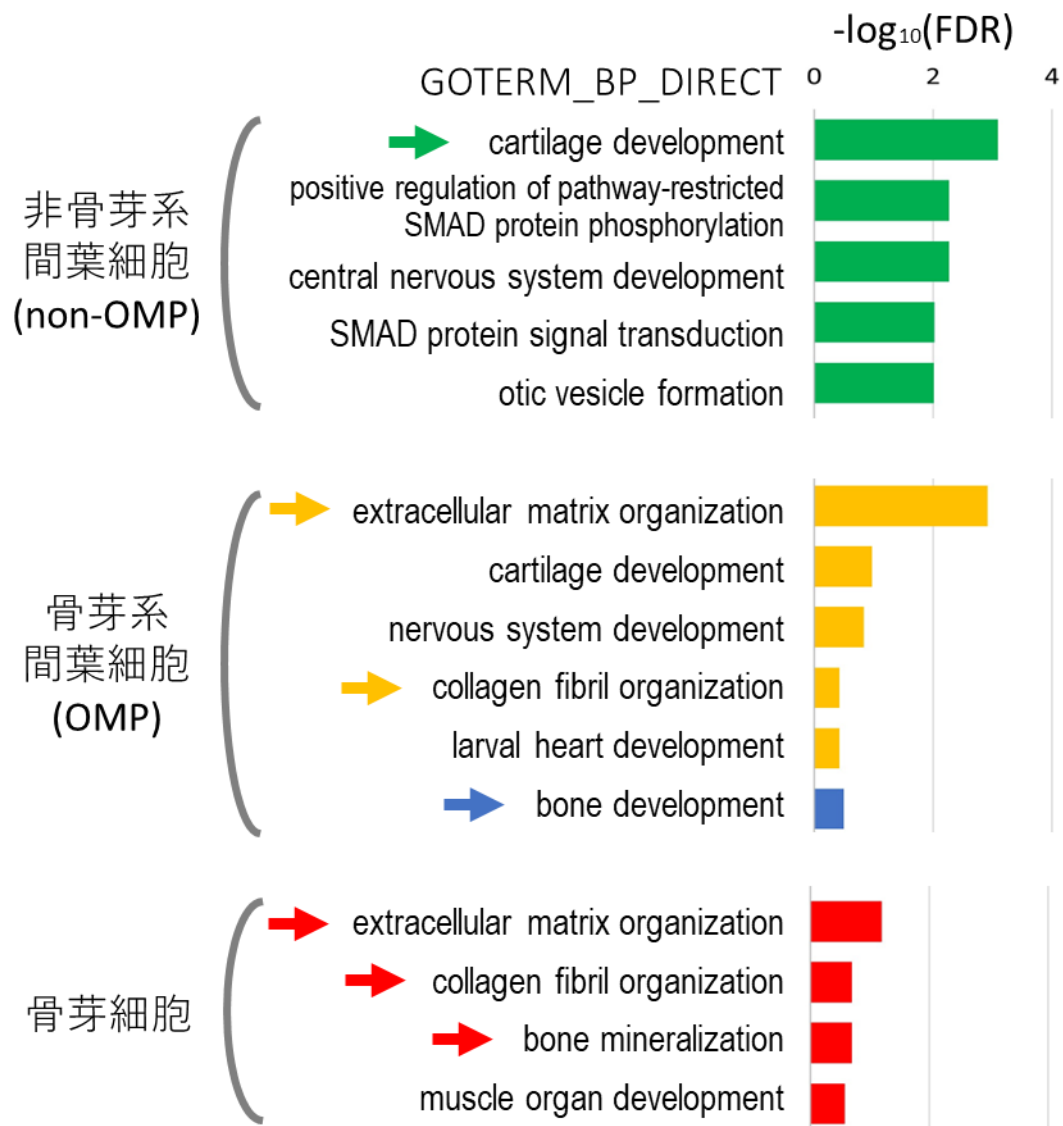


図26 OMP, non-OMP (CMP), 骨芽細胞の gene ontology (GO) 解析

OMP, non-OMP (CMP), 骨芽細胞で濃縮された遺伝子の Gene ontology (GO) 解析。non-OMP (CMP) のみ (緑色), OMP のみ (黄色), OMPと骨芽細胞 (青色), 骨芽細胞のみ (赤色) で濃縮された 52, 82, 14, 79 個の遺伝子をそれぞれ DAVID に追加し, GO 解析をおこなった。non-OMP では軟骨発生に関する遺伝子が濃縮していた (緑矢印)。OMP では細胞外マトリクス形成 (黄矢印), 骨発生 (青矢印) に関する遺伝子が濃縮していた。同様に, 骨芽細胞でも細胞外マトリクス形成と骨化に関する遺伝子が濃縮していた (赤矢印)。アノテーションのカテゴリーは Biological Process を使用し, Functional Annotation Chart で出力した。ランク付けは false discovery rate (FDR) を用いておこない, 上位 5 つの項目 (term) を図に掲載した。

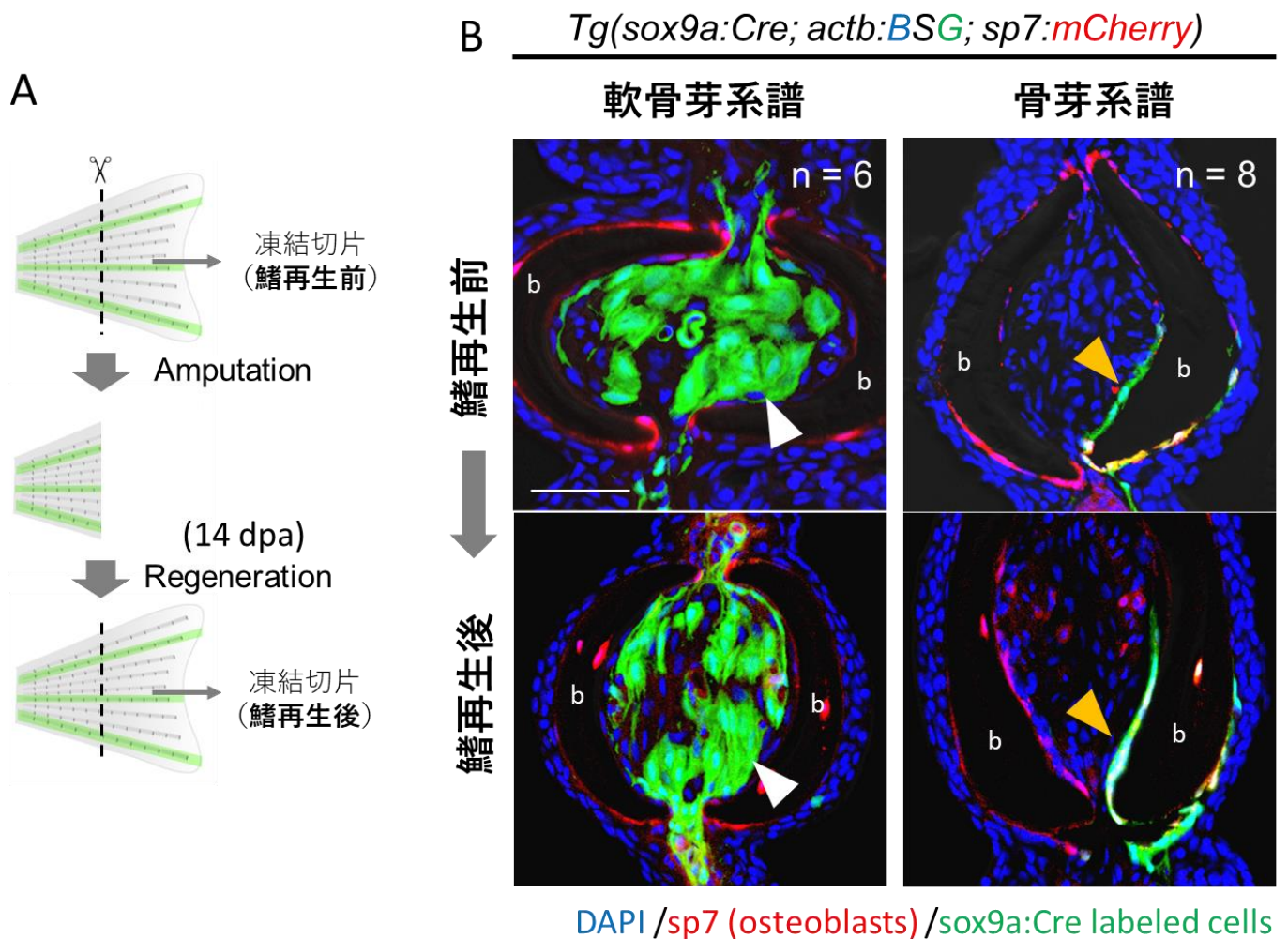
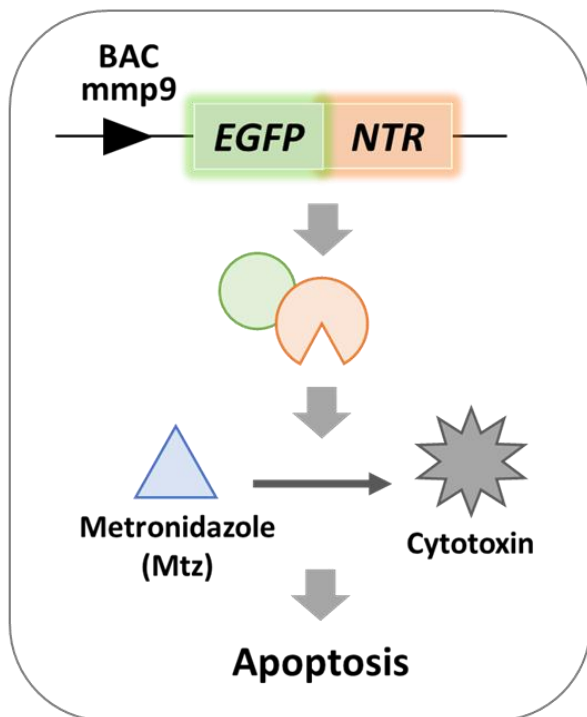


図27 鰭再生前後における骨芽系譜、軟骨芽系譜の解析

(A) 鰭再生前後における間葉細胞系譜の追跡スキーム。組み換えた *Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* の成魚の内、標識鰭条をもつ個体の鰭を切り取り、凍結切片を作製して系譜を識別した (鰭再生前)。2 週間後、鰭を再度切断し、切片を作製して系譜を確認した (鰭再生後)。dpa, days post fertilization. (B) 軟骨芽系譜 (左) と骨芽系譜 (右) の鰭再生前後における横断切片像。軟骨芽系譜 (左) では、鰭再生前 (上) に鰭条間葉領域で EGFP 標識が見られ、鰭再生後 (下) も同じように間葉領域で標識が見られた (白三角)。骨芽系譜 (右) では、鰭再生前 (上) に鰭条骨周辺で EGFP 標識が見られ、鰭再生後 (下) も同じ分布で鰭条骨周辺に標識が見られた (黄三角)。つまり、CMP と OMP は鰭再生を経ても分化転換して、それぞれ骨芽細胞や軟骨芽細胞を生み出さないことが分かった。TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf におこった。サンプル数は図中に示した。b, 鰭条骨。DAPI, 核。Scale bar, 25 μ m.

A



B

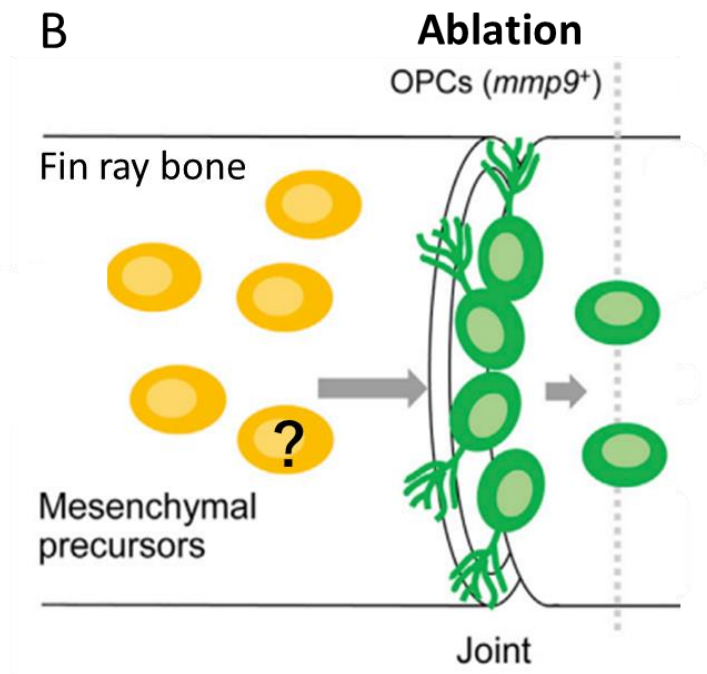
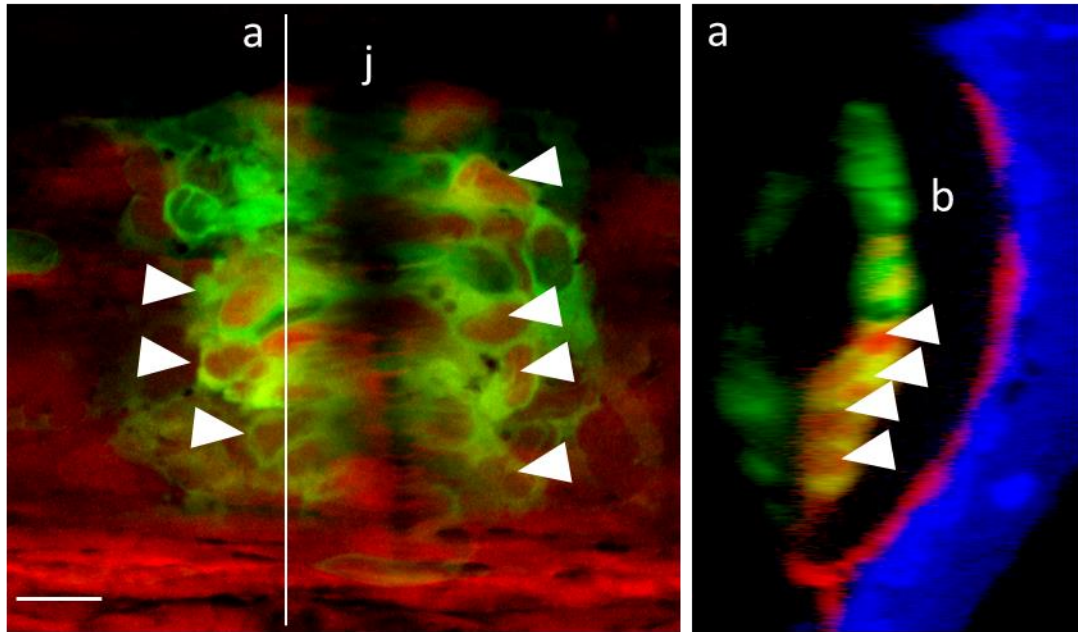


図28 NTR/MTZ システムによる細胞除去

(A) NTR/MTZ システムによる細胞除去の模式図。使用した *TgBAC(mmp9:EGFP-NTR)* は、*mmp9* プロモーターの制御下で、EGFPとNTRの融合タンパク質が発現している。NTRはMTZを細胞毒性のある物質に変換することで細胞死が誘導される。つまり、MTZ処理によってEGFPの緑色蛍光をもった細胞（主に骨芽前駆細胞 OPC）で細胞死が誘導、遺伝学的に除去される。BAC, 細菌人工染色体。NTR, nitroreductase. MTZ, metronidazole. (B) 鰭条での間葉細胞による OPC 補充スキーム。再生芽（間葉）移植により、OPCの除去後、近くにいる間葉細胞が OPC を補充することが分かっている ([Ando et al., 2017](#))。しかし、OPCを補充する間葉前駆細胞はどこに存在し、どのような性質をもっているのかは分かっていない。

Tg2(sox9a:Cre; actb2:BSR; mmp9:NTR)



actb2/mmp9 (OPCs) / *sox9a:Cre* labeled cells (骨芽系譜)

図29 骨芽系譜の標識細胞と骨芽前駆細胞 (OPC) の局在

Tg2(sox9a:Cre; actb2:BSR; mmp9:NTR) の成魚尾鰭における Z-stack 像 (左) と a における光学切片像 (右)。鰭条関節において、骨芽系譜 (赤色) の一部の細胞で、EGFP 蛍光が見られた (白三角)。つまり、鰭条形成過程において骨芽系譜間葉細胞 (OMP) は OPC (緑色) を生み出すことが確認できた。TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf におこなった。Actb2, ほぼすべての細胞で TagBFP を発現している (青色)。j, 鰭条関節。b, 鰭条骨。n = 3. Scale bar, 10 μm.

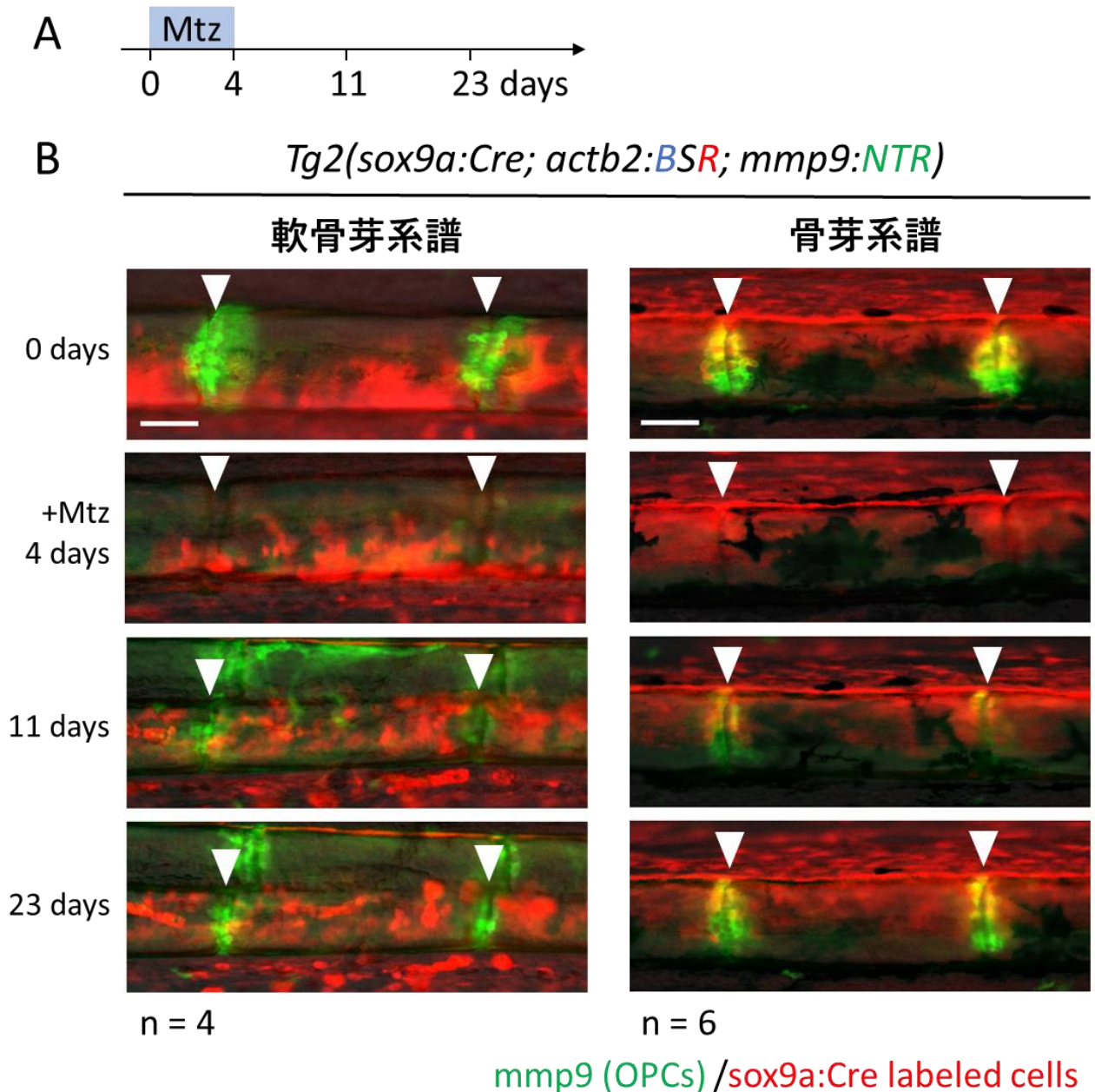
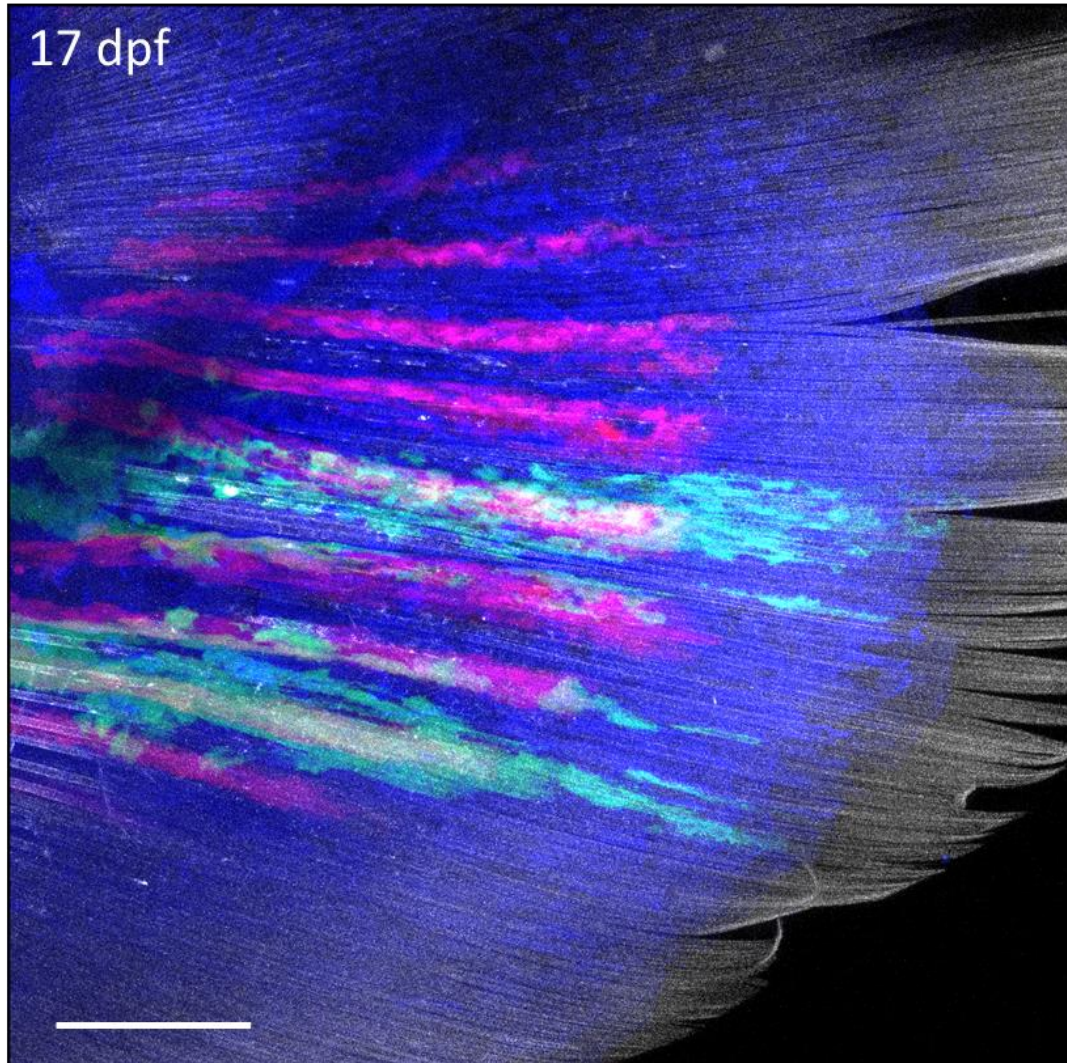


図30 骨芽系譜，軟骨芽系譜における OPC の除去と再生

(A) MTZ 処理と観察のスキーム。MTZ 処理は 4 日間おこない、2 日間の処理後に MTZ 溶液を再調製した。MTZ 処理後、何度か水替えをおこない、MTZ の残留を抑えた。MTZ 処理開始から 0, 4, 11, 23 日後に観察した。(B) 軟骨芽系譜，骨芽系譜の標識細胞による OPC の再生過程。MTZ 処理前は鰭条関節（白三角）で EGFP 蛍光（*mmp9* 陽性 OPC，緑色）が観察された（一番上の段）。4 日間の MTZ 処理によって EGFP 蛍光は消失した（上から二段目）。つまり、OPC 除去が完了したため、MTZ 処理をやめて OPC の再生を開始した。再生開始から 7 日後には大部分の OPC が再生され（下から 2 段目）、19 日後には OPC はほぼ完全に再生した（一番下の段）。OPC 再生後、

骨芽系譜の OPC の一部で赤色蛍光が発現していた（一番下の段，右，白三角）。軟骨芽系譜の OPC には赤色蛍光は観察されなかった（一番下の段，左）。つまり，赤色蛍光を持った骨芽系譜の標識細胞が OPC に分化したことを意味する。OPC は *sp7* 陽性の骨芽細胞からは生じない ([Ando et al., 2017](#)) ことから，OPC を補充した骨芽系譜の細胞は骨芽細胞ではなく，*sp7* 陰性の骨芽系間葉細胞（OMP）であることが示唆された。*Tg2(sox9a:Cre; actb2:BSR; mmp9:NTR)* を使用し，TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf におこなった。調べたサンプル数は図中に示した。Scale bars, 50 μ m.

Tg(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)



COL2 (actinotrichia) / *actb* (cells) /
sp7 (osteoblasts) / *sox9a:Cre* labeled cells

図31 尾鰭形成過程におけるアクチノトリキアと鰭条を形成する間葉細胞の解析

17 dpf 尾部における抗体染色後の Z-stack 像。EGFP 陽性の標識細胞 (緑色) と mCherry 陽性の骨芽細胞 (赤色) の伸長方向は、アクチノトリキア (白色) の線維方向とほぼ一致している。*Tg1(sox9a:Cre; actb:BSG; sp7:mCherry)* を使用し、TAM 処理による組換え誘導は 0–1 dpf におこなった。*actb*, ほぼすべての細胞で TagBFP を発現している (青色)。COL2, II-II6B3 抗体 (アクチノトリキア)。Scale bar, 50 μ m.

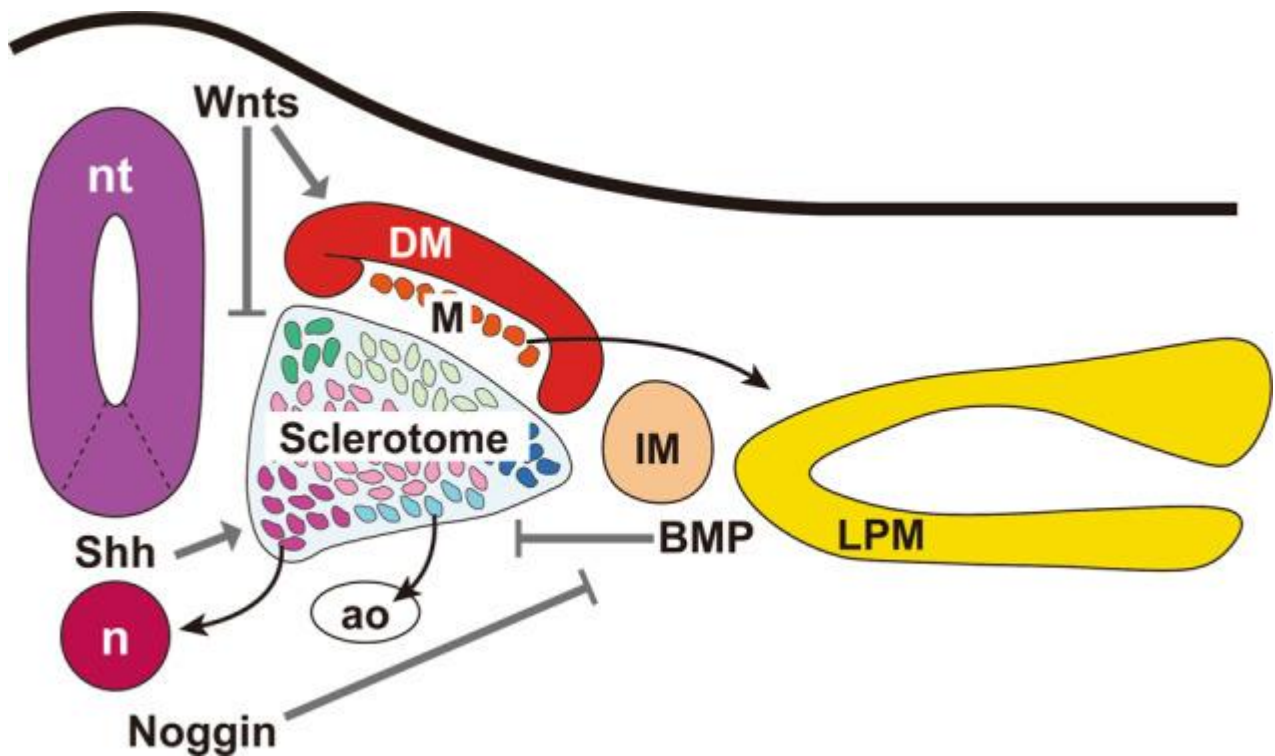


図32 体節（硬節）分化に関わる主なシグナル

体軸断面における硬節分化に関わるシグナルの模式図。硬節のパターニングの際に間葉細胞系譜が決定することが考えられる。硬節形成（分化）に関わるシグナルは，sonic hedgehog (Shh) や bone morphogenetic protein (BMP)，Wnt がよく知られている。Shh は，神経管の底板 (floor plate) や脊索 (notochord) から分泌される。Shh シグナルの下流で働く *Gli2/3* が欠失している場合，硬節で発現する *Pax1/9* の発現が大きく低下し，*Sox9* も検出できなくなる。Noggin は脊索や背側の体節から分泌され，BMP4 を阻害し，硬節の特定化 (specification) に関わっている。Wnt は神経管の蓋板 (roof plate) や上皮から分泌され，脊索や底板から分泌される Shh と協調して，体節のパターニングに関与している。つまり，これらのシグナルが硬節のパターニング，および間葉細胞系譜の決定に関与している可能性が考えられる。nt，神経管。n，脊索。ao，背側大動脈。DM，皮筋節。M，筋節。IM，中間中胚葉。LPM，側板中胚葉。[Tani et al., 2020](#) から引用。

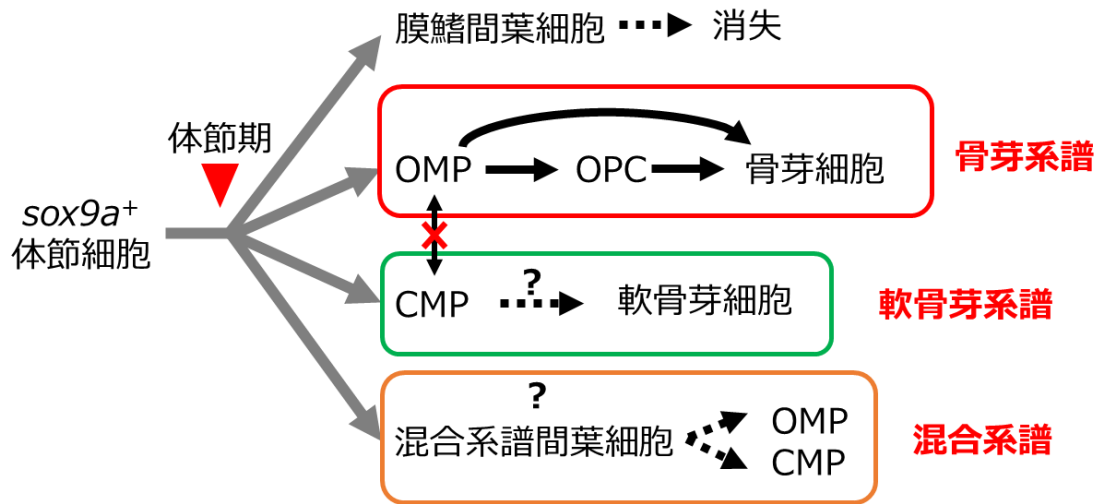


図33 ゼブラフィッシュにおける間葉細胞の系譜

sox9a 陽性の体節細胞と成魚尾鰭を形成する間葉細胞系譜のまとめ。sox9a 陽性体節細胞に由来する間葉細胞には、幼生期に膜鰭で消滅する間葉細胞も含めて、4 つの系譜があることを明らかにした。成魚の尾鰭を形成する 3 つの間葉細胞系譜の内、1 つ目は骨芽系譜であり、鰭条骨の周りに局在して、骨芽細胞や骨芽前駆細胞 (OPC)、休止骨芽細胞 (BLC) など骨芽系の細胞を生み出していた。2 つ目は軟骨芽系譜であり、骨芽細胞を生み出すことなく鰭条の間葉領域に位置しており、RNA-seq によると軟骨形成のプロファイルを明確に持っていた。3 つ目は混合系譜であり、骨芽細胞と間葉領域の細胞が標識され、骨芽系譜と軟骨芽系譜の両方の特徴を持っていた。これら間葉細胞の系譜は標識をおこなった体節期の細胞に由来するため、間葉細胞の系譜は体節期に決まりはじめることが明らかになった。さらに、細胞のライブイメージング追跡、OPC 除去実験によって、骨芽細胞と OPC の新たな供給源として骨芽系間葉細胞 (OMP) を発見した。また、RNA-seq 解析によって軟骨細胞や軟骨芽細胞を生み出すとされる軟骨芽系間葉細胞 (CMP) も明らかにした。これら OMP と CMP は、鰭再生を経ても分化転換しないことから、それぞれ骨芽産生、軟骨芽産生にコミットし、成魚尾鰭の鰭条に間葉前駆細胞プールとして維持されていることを明らかにした。しかし、CMP は軟骨芽細胞を生み出しているのか、混合系譜の間葉細胞はどのような性質をもつのかは不明である。