

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュの骨の再生と維持における体節由来の前駆細胞による骨芽細胞の供給
Title(English)	
著者(和文)	安藤和則
Author(English)	Kazunori Ando
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10693号, 授与年月日:2017年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:川上 厚志,徳永 万喜洋,山口 雄輝,立花 和則,田中 幹子,糸 昭苑, 鈴木 崇之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10693号, Conferred date:2017/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 29 年度
博士論文

ゼブラフィッシュの骨の再生と維持における
体節由来の前駆細胞による骨芽細胞の供給

東京工業大学大学院 生命理工学研究科
生命情報専攻 川上研究室
安藤 和則

目次

目次	2
要旨	5
報文目録	6
略語表	7
第 1 章 緒言	9
1-1. 生物の再生能力	9
1-2. 再生細胞の起源	10
1-3. 骨芽細胞の再生	11
1-4. 成体や発生における骨芽細胞の供給	12
1-5. 前駆細胞による骨芽細胞の産生	13
第 2 章 ゼブラフィッシュの骨の再生と維持における体節由来の前駆細胞による骨芽細胞の供給	14
2-1. 序論	14
2-1-1. 再生メカニズムにおける分子的基盤の解析	14
2-1-2. ゼブラフィッシュの鰭の再生における <i>mmp9</i> 発現の誘導	14
2-2. 結果	16
2-2-1. トランスジェニックゼブラフィッシュによる <i>mmp9</i> (+)細胞の可視化	16
2-2-2. 石灰化組織における <i>mmp9</i> (+)細胞の局在	16
2-2-3. 再生組織における <i>mmp9</i> (+)細胞は骨芽細胞である	17
2-2-4. Cre- <i>loxP</i> 組換えによる <i>mmp9</i> (+)細胞の系譜解析	18
2-2-5. 鰭条骨のジョイントに局在する <i>mmp9</i> (+)細胞は骨芽前駆細胞(OPC)である	19
2-2-6. OPC は正常な骨再生に必要である	21
2-2-7. OPC の前駆細胞が間葉組織に存在する	22
2-2-8. OPC は発生期の体節から生じてニッチに備蓄される	23
2-2-9. OPC は骨の成長ではなく恒常性維持に寄与する	23
2-3. 考察	25
2-3-1. 生体内における骨芽前駆細胞(OPC)が同定された	25
2-3-2. OPC は再生組織の骨芽細胞の補完的な供給源である	25
2-3-3. OPC は間葉細胞によって補充される	26
2-3-4. OPC は発生期の体節に由来する	26

2-3-5. OPC は鰭条骨の恒常性維持においても骨芽細胞を供給する	27
2-3-6. OPC における Mmp9 タンパク質の機能	27
第 3 章 結言	28
第 4 章 実験手法	29
ゼブラフィッシュの系統と飼育	29
再生実験	29
トランスジェニックゼブラフィッシュの作製	29
Cre- <i>loxP</i> 組換えと細胞系譜解析	31
ジョイント細胞の移動の経時観察	31
細胞除去	31
Whole-mount <i>in situ</i> hybridization	31
抗体染色	33
TRAP 染色	34
EdU 染色	34
石灰化骨の染色と定量	35
再生芽移植	35
体節移植	36
定量および統計解析	36
第 5 章 参考文献	38
第 6 章 謝辞	43
図表	44
Figure 1. ゼブラフィッシュの尾鰭の再生	44
Figure 2. 骨芽細胞の分化経路	45
Figure 3. BAC を用いたトランスジェニックゼブラフィッシュの作製	46
Figure 4. <i>Tg(mmp9:egfp)</i> は内在性の <i>mmp9</i> の発現を再現する	47
Figure 5. 石灰化組織における <i>mmp9(+)</i> 細胞の局在	48
Figure 6. <i>mmp9(+)</i> ジョイント細胞の変化	49
Figure 7. 骨折修復時およびウロコ再生時における <i>mmp9(+)</i> 細胞の移動	50
Figure 8. 再生時における <i>mmp9(+)</i> 細胞は破骨細胞ではない	51
Figure 9. 再生組織における <i>mmp9(+)</i> 細胞の骨芽細胞への分化	52

Figure 10. Cre- <i>loxP</i> を使った細胞系譜解析	53
Figure 11. Cre- <i>loxP</i> によるジョイントの細胞の標識	54
Figure 12. TAM 非依存的な Cre- <i>loxP</i> 組換え	55
Figure 13. Cre ラベルされたジョイント細胞の再生組織への移動	56
Figure 14. ジョイント細胞は再生組織の骨芽細胞と新たなジョイント細胞になる	57
Figure 15. ジョイントの細胞の形態と骨芽系列マーカによる標識	59
Figure 16. 再生するジョイントにおける <i>mmp9</i> (+)細胞の一過的な Runx2 の発現	60
Figure 17. 再生組織におけるジョイント細胞由来の細胞の増殖	61
Figure 18. NTR と Mtz による OPC 除去	62
Figure 19. OPC 除去による再生時の骨組織の抑制	63
Figure 20. OPC 除去による再生組織の骨芽細胞数の減少	64
Figure 21. 再生組織で <i>mmp9</i> を発現する骨髄球細胞	65
Figure 22. OPC 除去による鰭の再生全体への影響	66
Figure 23. OPC 除去による再生組織への影響	67
Figure 24. OPC 除去した後の OPC の再出現	68
Figure 25. 骨芽細胞ではない前駆細胞から再生する OPC	69
Figure 26. OPC は付近の間葉細胞から再生する	70
Figure 27. 成長期の OPC は骨芽細胞も OPC 自身も生じない	72
Figure 28. 体節移植	73
Figure 29. OPC は発生期の体節に由来する	74
Figure 30. 成長期における継続的な OPC の除去	75
Figure 31. 鰭の成長期の OPC は骨形成に必ずしも必要ではない	76
Figure 32. 非再生組織における OPC の骨芽細胞への寄与	78
Figure 33. 成体における継続的な OPC の除去	79
Figure 34. 成体鰭の OPC は骨形成に必ずしも必要ではない	80
Figure 35. 哺乳類の発生と成体における骨芽細胞のソース	81
Figure 36. 生体内における OPC の局在、機能および起源	82

要旨

多細胞生物は、組織が損傷を受けると、損傷部位に失った細胞を供給し、組織の形態と機能を回復して、個体全体としての恒常性を維持しているが、一般に哺乳類の再生能力は限定的である。一方、脊椎動物の中でも、硬骨魚類や有尾両生類は驚くべき再生能力を持ち、いくつかの内臓器官をはじめ、付属肢も完全に再生できる。しかし、なぜ再生できる動物とできない動物がいるのかまだわかっていない。この疑問に答えるには、再生組織の細胞がどんな細胞に由来し、増殖、分化およびパターン形成するのかを理解する必要がある。

再生細胞の由来を検証するため、近年、再生動物における細胞系譜解析が盛んに行われている。アホロートルは肢を再生することができるが、その過程で、分化細胞が脱分化・増殖して、元の細胞と同系譜の細胞に再分化することが明らかにされた。また、ゼブラフィッシュも多様な組織を再生でき、特に鰭をモデルとした再生研究により、骨を作る骨芽細胞も、脱分化を行うことで再生組織の骨芽細胞を供給することが示された。その一方、ゼブラフィッシュの鰭再生では、既存の骨芽細胞の脱分化以外に、新規に骨芽細胞を産生する供給源の存在も示唆された。しかし、そのような骨芽細胞を産生する細胞の、アイデンティティ、性質、再生や非再生時における役割については明らかにされていなかった。

骨芽細胞によって作られる骨は、体の根幹をなす重要な組織である。骨はその頑強さを維持するために、骨芽細胞が絶えず供給され、骨組織をリニューアルし続けている。哺乳類における研究では、骨芽細胞は間葉幹細胞 (MSC) に由来し、骨芽前駆細胞 (OPC) と前骨芽細胞を経て、分化するとされている。一方、発生期の骨芽細胞は、すべての脊椎動物で、神経堤の一部や、特に体節の一部である硬節から生じることが知られている。しかし、成体における MSC や OPC の生体内における局在や機能はよくわかっておらず、また MSC や OPC の発生上の起源が神経堤や硬節とどのように関係するのか不明であった。

本研究は、ゼブラフィッシュの鰭の再生をモデルとし、その再生過程で誘導されることが示されていた遺伝子のひとつであるマトリックスメタロプロテアーゼ9 (*mmp9*) の発現細胞を解析した。トランスジェニックを作製し、再生組織における *mmp9*(+)細胞を可視化すると、予想外に、*mmp9*(+)細胞は再生前から鰭の節 (ジョイント) に局在しており、組織が損傷を負うと再生組織へ移動することがわかった。この *mmp9*(+)細胞の系譜を、Cre-*loxP* システムによる遺伝学的な細胞標識により追跡した結果、再生組織へ移動して、骨芽細胞へ分化することが明らかになった。つまり、*mmp9*(+)ジョイント細胞は骨芽細胞の前駆細胞、すなわち OPC として働くことが示された。さらに、これらの細胞は自己複製もして、新たな再生したジョイントの細胞にもなったことから、OPC は自己複製能をもつことも示された。

また、NTR を介した遺伝学的な細胞除去によって、OPC が正常な数の骨芽細胞の供給と、石灰化した鰭条骨の再生にとって重要であることが示された。従来、ゼブラフィッシュの鰭条骨の再

生において、既存の骨芽細胞が脱分化して、骨芽細胞が再生されることが報告されていたが、OPC は、骨の再生におけるもう一つの骨芽細胞の供給源であり、脱分化した骨芽細胞による再生を補完することが明らかになった。

一方、OPC は、除去されてもすぐに再生することが示された。OPC の前駆細胞が周辺の間葉細胞に存在すると考え、その系譜解析を行った結果、OPC が失われると、付近の間葉細胞から補充されることが解明できた。OPC とその間葉細胞という複数の前駆細胞プールが、骨の再生と維持を確実にする重要なメカニズムだと考えられる。

さらに、OPC の発生的起源を明らかにしようと試みた。鰭の骨芽細胞の発生的起源は体節にあることが以前に報告されていたため、OPC もまた体節に由来すると予想した。そこで、発生期の体節細胞を追跡した結果、OPC を生じたことから、OPC は発生期の体節に由来することがわかった。これにより、成体の骨芽細胞と発生期の骨芽細胞との関係が、連続したものであることがはじめて明らかになった。さらに鰭の成長期における細胞系譜解析と機能解析から、体節に由来する細胞は、成長過程で鰭のジョイントにニッチを作って休眠状態の OPC として備蓄されることがわかった。

また、成体の非再生組織における長期の細胞追跡を行うと、ジョイントに局在する OPC は、ゆっくりと骨芽細胞に分化することが示された。従って、OPC は再生時だけでなく、正常な組織が骨組織を新生する恒常性維持の際にも、骨芽細胞を供給していることが示唆された。

本研究により、ゼブラフィッシュにおいて、骨芽前駆細胞 OPC の存在、局在が明らかにでき、骨の再生と恒常性維持における働きを解明することができた。ヒトにおいても同様の骨芽前駆細胞 OPC と骨再生機構が存在することが推測され、哺乳類における同様の細胞が同定・解析されることで、さまざまな骨疾患の原因解明や、その治療へ向けた再生医療の発展が期待される。

報文目録

Ando, K., Shibata, E., Hans, S., Brand, M., and Kawakami, A. (2017). Osteoblast Production by Reserved Progenitor Cells in Zebrafish Bone Regeneration and Maintenance. *Dev. Cell* 43, 1–8.

略語表

ALC: alizarin complexone

BAC: bacterial artificial chromosome (人工細菌染色体)

BLC: bone lining cell (骨裏打ち細胞)

CreERt2: Cre recombinase with a mutated tamoxifen-responsive estrogen receptor (タモキシフェン応答性変異型エストロゲン受容体を持つ組換え酵素 Cre)

cryaa: crystalline alpha A

DABCO: 1,4-diazabicyclo-[2,2,2,] octane

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

dpa: days post amputation

dpf: days post fertilization

DsRed2: discosoma red fluorescent protein 2 (サンゴ由来赤色蛍光タンパク質)

E: eye (眼)

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

EGFP: enhanced green fluorescent protein (高感度緑色蛍光タンパク質)

Fgf: fibroblast growth factor

fn1b: fibronectin 1b

hpa: hours post amputation

ISH: *in situ* hybridization

iTol2: inverted Tol2

mmp9: matrix metalloproteinase 9

MSC: mesenchymal stem cell (間葉幹細胞)

Mtz: metronidazole (メトロニダゾール)

N.S.: not significant

N: notochord (脊索)

NT: neural tube (神経管)

NTR: nitroreductase (ニトロリダクターゼ)

OB: osteoblast (骨芽細胞)

Oactb: *Oryzias latipes* β -actin (メダカ由来の β アクチン)

OPC: osteoblast progenitor cell (骨芽前駆細胞)

PBT: phosphate buffered saline with Tween20

PBTx: phosphate buffered saline with Triton X 100

PFA: paraformaldehyde

Runx2: runt related transcription factor 2

S: somite (体節)

SEM: standard error of the mean (標本平均の標準誤差)

Sp7: specificity protein 7

TAM: 4-hydroxy tamoxifen

Tg: transgenic zebrafish

TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase (酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ)

V: vertebrae (脊椎骨)

WT: wild-type (野生型)

第 1 章 緒言

1-1. 生物の再生能力

多細胞生物は、組織が損傷を受けると、損傷部位に失った細胞を供給し、組織の形態と機能を回復して、個体全体としての恒常性を維持している。このように、成長や再パターン形成によって、失った組織や器官、付属器を元通りに戻すことを再生と呼ぶ。

しかし、損傷を受けるタイミングが、生まれて間もないステージなのか、十分に成長したあとなのかや、また組織の種類、生物の種類に応じて、損傷を受ける前の状態を回復できる能力は大きく異なる。一般的に、発生期の胚は一部を切除したり、それを他の場所に入れ換えたりしても、自己調節をして正常な胚の形態や大きさを回復する能力がある (Lewis and Rossant, 1982)。また、発生を終えた生物 (成体) においても、血液や上皮は幹細胞によって継続的に置き換わっており、損傷を受けた骨格筋も、静止していた幹細胞から新たな筋細胞が生じる (Yin et al., 2013)。しかし一方で、哺乳類の心筋や中枢神経系のニューロンのように、一度損傷すると元通りには戻らない組織もある。

一般に、哺乳類の再生能力は限定的である。例外的には、哺乳類の肝臓は、一部が切除されても再成長できる。また、骨は折れても、その間隙を新たな骨組織で埋めることができ、指は先端部であれば切断されても元に戻すことができる。しかし、哺乳類は四肢を失うほどの大きな損傷を受けると再生できない。また、心臓も、心筋梗塞などによって壊死し失われた心筋細胞は新たに供給されることはなく、傷痕として残り、そのため心機能が低下する。さらに、神経も、末梢神経の軸索や樹状突起であれば再形成できるが、末梢神経の細胞体や中枢神経を再生することはできない。

哺乳類などの脊椎動物で組織の再生能力は限定的である一方で、すぐれた再生能力をもつ生物種もいる。最もすぐれた再生能力を持つ生物は植物であり、たった 1 つの体細胞から、全能性を持つ未分化細胞塊であるカルスを経て、新しい完全な個体を生み出すことができる (Zimmerman, 1993)。これは個体を構成するすべての植物細胞が完全に分化しておらず、細胞周期を再開できることによる。一方、動物において最もすぐれた再生能力を持つのは、ヒトデやプラナリア、ヒドラであり、小さな断片から動物個体全体を再形成することができる (全身再生) (Bosch, 2007)。このような能力は出芽や分裂によって新しい完全な個体を生み出す無性生殖能に関連すると考えられる。これらの生物は、生涯にわたって、全能性を持つ幹細胞を多数保持し、幹細胞の活性化、増殖および分化を経て、全身を再生する (Aboobaker, 2011)。また、昆虫や節足動物の一部の種では、全身を再生することはできないが、失った付属肢を再生することができる。

脊椎動物でも、イモリや他の有尾両生類は驚くべき再生能力を持ち、いくつかの内臓器官をはじめ、尾や肢も完全に再生することができる (Brockes and Kumar, 2003)。また、イモリの眼のレ

ンズは、虹彩の色素上皮が分化転換することで再生することができる (Imokawa et al., 2004)。同様に、硬骨魚類もすぐれた再生能力を持っており、多くの内臓器官をはじめ、四肢や尾に相当する鰭も再生することができる。特に、ゼブラフィッシュやイモリなどでは、心室の一部を切除しても失った心筋組織を再生でき(Raya et al., 2004)、再生医学の観点から注目されている。

このように、組織の種類、生物種によって再生能力が大きく異なるが、なぜ再生できる動物とできない動物がいるのだろうか。その疑問に答えるには、再生組織をつくる細胞はどのような前駆細胞に由来し、その細胞がどのようなメカニズムによって、増殖、分化およびパターン形成するのかを理解する必要がある。

1-2. 再生細胞の起源

再生が可能となるには最低でも、成長・分化・パターン形成が可能な細胞集団を生じることが必要である。その形成過程の違いから、再生は大きく2つのタイプに区別される。1つは、再編再生と呼ばれ、細胞分裂と成長はほとんど起こらず、組織の再生は主に残存組織の再パターン形成と境界の再構築によって起こる。再編再生は、ヒドラなどの無脊椎動物のいくつかの種においてよく知られている。一方、イモリやゼブラフィッシュなどの脊椎動物では、付加再生と呼ばれるタイプの再生が起こることが知られている。脊椎動物の組織は完全に分化した様々な種類の細胞が複雑に配置されており、残存組織が大きく変化することはないが、その一部から細胞が供給されて、創傷部に正常なパターンを持った新しい構造が成長することによって、再生が起こる。したがって、付加再生における複雑な構造の形成過程がいかに進むのかを理解することで、脊椎動物における再生メカニズムを解明するための手がかりが得られると考えられる (Poss, 2010; Tanaka and Reddien, 2011; Yoshinari and Kawakami, 2011)。付加再生では重要な働きをされると考えられている2種類の細胞がある (Figure 1)。損傷後、すぐに、傷口の端から上皮細胞が移動し、創傷部を覆って、傷上皮と呼ばれる特殊な上皮組織を形成する。その直下には、再生芽と呼ばれる未分化な増殖性の再生組織が誘導され、のちに元の組織と同じ大きさと機能をもつまでに成長する (Brookes and Kumar, 2005; Kawakami, 2010)。傷上皮と再生芽という2種類の再生組織は、一見すると均一の細胞集団に見えるが、吉成らの先行研究によれば、これらの組織に発現している遺伝子は部分によって大きく異なり、いくつかの小区画に分かれたヘテロな細胞集団であることが示されている (Yoshinari et al., 2009)。これらの遺伝子発現の異なるヘテロな細胞群の間にある、複雑なシグナルのネットワークを通じて、再生組織の細胞増殖と形態形成が制御されていると考えられる (Wehner and Weidinger, 2015)。

付加再生は再編再生とは違って、残存の組織に付け加わる形で新しい構造が形成されることから、再生細胞が残存組織のどの細胞に由来するかが自明でない。したがって、損傷部付近の分化細胞が脱分化して分裂を開始するのか、特別に備蓄された休止状態の組織幹細胞があるのかなどの疑問が生じる。また、もし脱分化するとすれば、脱分化した細胞は元の細胞とは性質の異なる細胞に再分化可能なのか、つまり多分化能を持つ細胞を経て、分化転換を行うのかなども

疑問である。これらの疑問を検証するために、近年では、再生動物における細胞系譜解析が盛んに行われるようになってきた。

初期に行われた、イモリの筋管の細胞系譜の解析では、分裂をすでに終えている多核の筋管を培養して、再生している肢の再生芽の中に戻した結果、移植した筋管の大部分は再生芽で単核の細胞になっていることが示された。この標識された単核の細胞は、新たに筋だけでなく軟骨も生じたことから、イモリの四肢再生では、再生芽細胞は均質な多能性幹細胞の状態へと戻り、そこから改めて複数のタイプに再分化可能なことが示唆された (Tanaka et al., 1997)。

一方で、Kragl らによるアホロートルの再生肢を用いた最近の実験においては、再生芽細胞は多分化能状態には戻らず、由来する元の細胞と同系譜の細胞に限定された再生能力しか持たないことが示唆されている (Kragl et al., 2009)。彼らは、アホロートルの再生肢における各種組織の細胞運命を追跡するため、まず、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をすべての細胞で発現するトランスジェニックアホロートルを作製し、次にこの動物の筋や上皮などの組織片を、遺伝子導入していない同種の幼若個体の前肢に移植した。この幼若個体の前肢を移植部位で切断し、肢が再生する間、GFP(+)移植細胞の細胞運命を追跡すると、移植された筋組織から生じた再生芽細胞は、筋だけを形成することが示された。また、軟骨と上皮の細胞も、再生における分化能力が限定されており、末梢神経線維のミエリン鞘を構成するグリアであるシュワン細胞も同様だった。唯一の例外は、真皮の細胞であり、真皮の細胞は真皮と軟骨のどちらにも寄与した。彼らの研究によって、アホロートルの四肢再生過程では、細胞の完全な脱分化は起こらず、元の細胞のアイデンティティの記憶を保持した限定的な脱分化によって、増殖する細胞を生じていることが明らかになった。

1-3. 骨芽細胞の再生

硬骨魚類の一種であるゼブラフィッシュは、1980 年代に発生遺伝学モデルとして登場し、それまでショウジョウバエなどの無脊椎動物においてのみ可能であった、大規模な遺伝学的手法を脊椎動物でも適用することを可能にした。ゼブラフィッシュは、アホロートルと同様、すぐれた再生能力があり、鰭や網膜、心臓、脊髄を含む多様な組織を再生できる。それまで組織学的なアプローチが主だった再生過程の研究は、モデル生物としてのゼブラフィッシュの利点 —多産、イメージングの容易さ、多様な分子生物学的な解析手法、ケミカルバイオロジー解析の容易さなど— によって、大きく進むようになった (Yoshinari and Kawakami, 2011)。

特に鰭をモデルとした再生研究により、再生芽や傷上皮の誘導、および細胞間相互作用に関与する多数の遺伝子やシグナル伝達経路が明らかにされてきた (Wehner and Weidinger, 2015)。鰭は四肢動物の肢に相当するが、肢と異なって筋肉はなく、鰭条という骨が放射状に並んだシンプルな構造であるため、再生において細胞の局在や形態が観察しやすい。さらに組織や骨が薄く、色素も少ないため、成体組織を生きたまま、内部まで観察できる利点がある (Figure

1A)。遺伝子導入ゼブラフィッシュを使った遺伝学的な細胞標識を用いることで、再生細胞の連続的な挙動を観察することが可能になった。

鰭を構成する細胞の中でも、骨を作る骨芽細胞は、細胞の局在や形態が周囲の間葉細胞と区別しやすく、また細胞特異的なマーカーが多数知られている。近年、トランスジェニックによる再生細胞の追跡から、再生過程では、切断面付近の既存の骨芽細胞が脱分化して、再生組織の骨芽細胞に寄与する、つまり、限定的な脱分化を行うことが明らかにされた (Knopf et al., 2011; Tu and Johnson, 2011; Sousa et al., 2011; Stewart and Stankunas, 2012)。

しかし一方で、Singh らは、トランスジェニックを用いた細胞除去でほとんどすべての骨芽細胞をあらかじめ除去し、その後再生を誘導する実験を行った結果、既存の骨芽細胞がなくても正常な骨の再生が起こることを示した (Singh et al., 2012)。すなわち、この結果は、既存の骨芽細胞の脱分化以外に、新規に骨芽細胞を産生する供給源が存在することを示唆している。しかし、このような骨芽細胞を産生する細胞の、アイデンティティや性質、再生や非再生時における役割については明らかにされていなかった。

1-4. 成体や発生における骨芽細胞の供給

骨芽細胞によって作られる骨は、脊椎動物の大きな特徴の一つであり、体の根幹をなす重要な組織である。骨は脳や内臓といった重要な内部器官を保護すると同時に、体重を支えながらも手足を自由に動かすことを可能にする。それゆえ骨には常に強い力学的負荷がかかり、その負荷に耐える頑強さを維持するために、また時に骨折などの損傷から回復するため、骨組織は活発に合成・分泌され続けている。そのため、骨形成で中心的な役割を果たす骨芽細胞が、動物の生涯にわたって全身の骨組織に絶えず供給され続けている (Aubin, 2008)。

哺乳類における、主に培養などを用いた解析では、骨芽細胞は間葉幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSC) に由来し、軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞等と同一の起源を持つことが示唆されている (Owen and Friedenstein, 1988)。MSC は様々な組織に存在し、なかでも骨髄に豊富に存在すると言われている。また、骨細胞分化過程の解析から、MSC は、骨芽前駆細胞 (Osteoblast Progenitor Cell, OPC) と、前骨芽細胞を経て、骨芽細胞に分化するとされている (Figure 2)。

一方で、脊椎動物の発生期では、骨芽細胞は、神経堤の一部や、特に体節の一部である硬節から生じることが知られている (Hall, 2015a, 2015b)。神経堤細胞は、神経板の境界部に誘導され、特に頭部では、外胚葉の細胞種だけでなく、軟骨、筋肉、真皮や骨を形成する細胞のもとになる。一方、体節は、脊柱を含む胴部の軟骨、骨格筋や体の背側の皮膚の真皮となる細胞を含み得るが、一部が硬節となり、ここから生じた骨芽細胞が椎骨や肋骨を形成する。

成体における MSC や OPC は、特異的なマーカーが確立されておらず、それゆえ、生体内における性質や局在、骨の維持と再生における役割はよくわかっていない。さらに、MSC や OPC の

発生上の起源はわかっておらず、神経堤や硬節から生じる発生期の骨芽細胞との関係は全く不明であった。

1-5. 前駆細胞による骨芽細胞の産生

本研究では、ゼブラフィッシュの鰭再生をモデルとし、トランスジェニックを用いた遺伝学的な細胞標識法により、再生組織の細胞系譜の解析を行った。その結果、骨芽細胞を供給する前駆細胞 OPC を発見し、これらが骨組織のニッチに存在し、成体における骨の再生だけでなく、さらには骨組織の恒常性維持にも寄与していることを明らかにした。

ゼブラフィッシュの鰭再生過程で誘導されることが以前の研究で示されていた遺伝子のひとつ、マトリックスメタロプロテアーゼ 9 (*mmp9*) を利用して、再生過程に寄与する細胞を可視化した。すると、予想外に、この一群の細胞は、再生前から鰭の節 (ジョイント) に局在していること、組織に傷害を与えると、再生組織へ移動して、骨芽細胞へ分化することが明らかになった。さらに、これらの細胞は、自己複製もして、新たに再生したジョイントの細胞にもなった。したがって、*mmp9(+)*ジョイント細胞は骨芽前駆細胞 OPC として働き、さらにこれらは、自己複製能をもつことが示された。

さらに研究を進めると、前駆細胞は発生期の体節に由来し、個体の成長とともに、骨組織付近のニッチに休眠状態で保存されることがわかった。また、長期の細胞追跡を行うと、この前駆細胞は再生時だけでなく、骨組織がリニューアルする際にも、骨芽細胞を供給していることがわかった。

一方、OPC 自身も、ニッチにおいて一定ではなく、失われたり減ったりする毎に、付近の間葉細胞から絶えず補充されていることも解明できた。これら複数の前駆細胞プールが、骨の再生と維持を確実にする重要なメカニズムだと考えられる。

本研究によって、これまで生体内での存在や局在が明らかではなかった骨芽前駆細胞 OPC がはじめて同定でき、OPC を介した骨の維持や再生の重要な仕組みが解明された。さらに重要なことは、発生期の骨芽細胞も、成体の骨芽細胞も、同じく体節に由来し、連続した細胞系譜をもつことが明らかになった。ヒトなどの哺乳類においても同様の骨芽前駆細胞と骨再生機構が存在することは十分に予想され、このような細胞が同定、解析されることで、さまざまな骨疾患の原因解明や、その治療へ向けた再生医療の発展が期待される。

第 2 章 ゼブラフィッシュの骨の再生と維持における体節由来の前駆細胞による骨芽細胞の供給

2-1. 序論

2-1-1. 再生メカニズムにおける分子的基盤の解析

あらゆる生物は、多かれ少なかれ組織の損傷を修復する能力を持つ。したがって、損傷の程度や組織、齢、動物種に関係なく、組織の恒常性を維持するための共通の再生メカニズムが存在すると考えられる。よって、その再生メカニズムの分子的基盤が明らかにできれば、ヒトを含む哺乳類の組織・器官の再生能力向上に繋がることが期待される (Brookes and Kumar, 2005)。付加再生現象は、硬骨魚類や有尾両生類において 100 年以上前から研究されてきたが、長らく形態学的な記述にとどまってきた。しかし、近年の分子遺伝学の発展によって、再生に関わる遺伝子が次々と同定され、Fgf、Bmp、Wnt などのシグナルや、様々な分子の再生における機能も明らかになりはじめた。

従来は、成体組織が再生モデルとして用いられてきたが、近年、ゼブラフィッシュの幼魚の鰭(膜鰭)の再生もモデルとして確立された (Kawakami, 2004)。膜鰭は、組織の構造が単純で、短時間で再生が完了し、低分子化合物やモルフォリノオリゴを用いたノックダウンも容易であるのに加え (Mathew et al., 2007)、再生の過程も、成体の再生と共通の部分が多い。しかも、一度に多数の個体を得られることから、再生現象の分子基盤を網羅的に解析するのに非常に効果的である。吉成らは、膜鰭の再生モデルを用いてマイクロアレイ解析を行い、再生組織において局所的な発現を示す遺伝子を多数同定し、これらの遺伝子は成体の再生組織においても、同様に発現が誘導されることを示した (Yoshinari et al., 2009)。

2-1-2. ゼブラフィッシュの鰭の再生における *mmp9* 発現の誘導

再生時に発現上昇する遺伝子の中でも、*mmp9* は最も強く発現していた遺伝子の一つであり、その上、*mmp9(+)*細胞は再生組織に散在していた。Mmp はウシガエルのオタマジャクシにおいて、コラーゲンを分解することができるプロテアーゼとして 1962 年に発見された (Gross and Lapiere, 1962)。現在までにタンパク質構造や基質特異性がそれぞれ異なる、多数の Mmp ファミリーが同定されているが (Sternlicht and Werb, 2001)、それらの多くは共通して、不活性型として分泌され、N 末端プロペプチドドメインの切断によって活性化される。また、活性中心に金属イオンが必要であることが特徴である。中でも、Mmp9 は分泌型のゼラチナーゼとして知られ、主にコラーゲンの分解を行う (Page-McCaw et al., 2007)。

Mmp の多くは、細胞外マトリックスの分解や生理活性ペプチドの活性化など、様々な生理現象に関わっているが、組織再生にも関与することが示唆されている (Page-McCaw et al., 2007)。同様に、Mmp9 の阻害によっても、ゼブラフィッシュ及びバイモリにおける再生が阻害されることが示

されている (Bai et al., 2005; Vinarsky et al., 2005; LeBert et al., 2015)。さらに、*mmp9* のノックアウトマウスにおいては、創傷治癒および骨折修復が著しく遅れることが報告されている (Hattori et al., 2009; Colnot et al., 2003)。

2-2. 結果

2-2-1. トランスジェニックゼブラフィッシュによる *mmp9*(+)細胞の可視化

本研究では、Mmp9 タンパク質自身の働きよりも、むしろ、これを発現する細胞の再生における役割を明らかにすることを考えた。そこで、まず、再生組織における *mmp9*(+)細胞を可視化するために、高感度緑色蛍光タンパク質 (*egfp*) によって可視化するトランスジェニックゼブラフィッシュ(*Tg*) を作製した。

吉成は *mmp9* 上流 2.5 kb をクローニングして EGFP 発現 *Tg* を作製した (修士論文)。この *Tg* では、成体組織の尾鰭をメスによって切断すると、再生にตอบสนองして EGFP の発現が見られたが、これは *mmp9* の mRNA の Whole-mount *in situ* hybridization (ISH) における再生組織の内在性の発現と一致するパターンは観察されなかった。このことから、*mmp9* 上流 2.5 kb の配列では再生組織での遺伝子発現誘導を完全に再現するためには、不十分であることが示されていた。

そこで、本研究では、ゲノム上に広範囲に散在するシス制御領域が含まれるよう、100 kb から 200 kb の大きなゲノム DNA 断片を安定に維持できる人工細菌染色体 (bacterial artificial chromosome、BAC) を用い、BAC 組換え法によって *Tg* の作製を試みた (Narayanan and Chen, 2011; Suster et al., 2011; Bussmann and Schulte-Merker, 2011)。このためにまず、*mmp9* 遺伝子の前後 100 kb 以上を含む BAC クローン [CH211-269M15, BACPAC resources (Oakland, CA, USA)] の *mmp9* の翻訳開始コドンに、*egfp* 遺伝子カセットを相同組換えによって挿入した。さらに BAC DNA のゲノムへの組み込みが効率を上げるため、メダカ由来の DNA 型トランスポゾンである Tol2 配列を、BAC ベクター上に挿入した (Figure 3A)。BAC DNA は、Transposase mRNA とともにゼブラフィッシュの受精卵にインジェクションした。これら F0 のゼブラフィッシュを、子孫の EGFP 発現を指標にスクリーニングした結果、同じ EGFP 発現パターンを示す 2 系統の *Tg* が得られ、一方を *Tg(mmp9:egfp)* として確立した。

Tg(mmp9:egfp) の ISH において、*mmp9* の発現パターンと同じように、*egfp* の発現が再生組織に散在する細胞と中央部の帯状の細胞群で観察され (Figure 4)、再生組織における *mmp9* の内在性の発現を再現していることがわかった。これによって再生時の *mmp9* の活性化のライブイメージングが可能になった。

2-2-2. 石灰化組織における *mmp9*(+)細胞の局在

Tg における EGFP の発現を観察すると、予想外なことに、再生前から EGFP が発現しており、その発現細胞が鰭の骨格である鰭条のジョイントに局在するといった、独特なパターンが観察された (Figure 5A)。そこで、ISH の条件を詳細に検討してみると、再生前の鰭においても、内在性の *mmp9* は確かに発現しており (Figure 3)、鰭条のジョイントに *mmp9* を発現する細胞集団があらかじめ存在することが明らかになった。

さらに、EGFP の蛍光は鰭条以外の石灰化した組織においても観察された (Figure 5B)。EGFP(+) (*mmp9*(+)) 細胞は、頭部では、石灰化組織の隙間に沿うように分布していた。また、胴部では、脊椎棘と呼ばれる、背骨を構成する脊椎の前側から上下に伸びる棘状の骨組織の後ろ側に接するように分布していた。さらに、硬骨魚類の体の最も外側を覆っているウロコの、放射状の溝にも分布していた。これらの EGFP 発現が見られた組織は、すべて石灰化した骨を含む組織であることから、石灰化組織の形成に関連した細胞であることが示唆される。

一方、再生組織では、さらに興味深いことが観察された。尾鰭を切断した後、2-6 時間おきに 58.5 時間まで連続して観察したところ、切断面に最も近い鰭条のジョイントの EGFP (*mmp9*) 発現は、切断後 2.5 時間から再生組織に向かって移動するかのように変化し、切断後 27 時間で切断面にも見られた。また、その後、EGFP(+) (*mmp9*(+)) 細胞は、新しく再生されたジョイントに観察された (Figure 6)。

次に、別の組織の再生や修復でも、同様の EGFP (*mmp9*) の発現の変化が、起こるかをみた。第一に、鰭条の骨折における EGFP(+) (*mmp9*(+)) 細胞の挙動を観察するため、先端の直径 10-20 μm のガラスキャピラリーを用いて、鰭条の中央付近のセグメントを折った (Takeyama et al., 2014)。鰭条の骨折後 1 日で、骨折部を挟む 2 つのジョイントから、EGFP(+) (*mmp9*(+)) 細胞が骨折部位へ移動し、9 日目には骨折部を覆うように変化して、27 日後でも弱い EGFP が検出された (Figure 7A)。特にこの骨折モデルでは、周囲の組織をほとんど傷つけずに骨だけに損傷を与えた。従って、メスによって鰭を喪失した後の付加再生だけでなく、骨折修復においても同様の EGFP(+) 細胞が誘導されることが示唆された。

さらに別の石灰化組織の再生として、ウロコの再生における、EGFP(+) (*mmp9*(+)) 細胞の挙動を観察した。ピンセットを用いて胴体の左側のウロコ 10 枚程度を取り除き、再生を観察した結果、ウロコの除去後 4 日で、多数の EGFP(+) 細胞が損傷部に出現し、8 日目に、再生中のウロコの放射状の溝に多数の EGFP(+) (*mmp9*(+)) 細胞が観察された (Figure 7B)。従って、鰭条だけでなく、他の石灰化組織である鱗の再生においても、*mmp9*(+) 細胞は損傷に反応して、再生組織に出現することが示された。

2-2-3. 再生組織における *mmp9*(+) 細胞は骨芽細胞である

次に、再生組織において *mmp9*(+) 細胞がどのような細胞なのかを調べた。ゼラチナーゼである *mmp9* は細胞外マトリックスの分解や、生理活性ペプチドの活性化など様々な機能を持つことが知られているが、骨組織を吸収する細胞である破骨細胞で発現することが知られている。ゼブラフィッシュの鰭の再生組織でも、破骨細胞に発現することが以前に示唆されていた (Sharif et al., 2014)。そこで、*mmp9*(+) 細胞が破骨細胞であるかどうかを検証するため、*Tg(mmp9:egfp)* の再生組織において、破骨細胞を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、破骨細胞を同時に検出した。その結果、*Tg(mmp9:egfp)* の再生組織において、EGFP(+) (*mmp9*(+)) 細胞と一致する TRAP 陽性の細胞はほとんど検出されなかった (Figure 8)。つまり、以前の報告と異なり、再生組織のほとんどの *mmp9*(+) 細胞は、破骨細胞ではないことが示唆された。

石灰化組織付近の局在と、*mmp9(+)*細胞が鰭条の形成領域に分布していることから、再生組織における *mmp9(+)*細胞は、骨芽細胞である可能性が考えられる。そこで、骨芽系列の細胞の同定に使われる細胞表面抗原である Zns5 (Johnson and Weston, 1995) と、骨芽細胞分化の中間段階で発現が見られる転写因子である Sp7 (Li et al., 2009; Renn and Winkler, 2009) の抗体染色を行い、骨芽細胞かどうか検証を行った。その結果、多くの EGFP(+) (*mmp9(+)*) 細胞は Zns5 と Sp7 両方陽性であり (Figures 9A and 9B)、骨芽細胞であることが示された。さらに再生組織において、Zns5、Sp7 それぞれのマーカー陽性の細胞のうち、EGFP(+) (*mmp9(+)*) 細胞の割合を調べたところ、約 60%の骨芽細胞が EGFP(+) (*mmp9(+)*) 細胞であることがわかった (Figure 9C)。これらの結果から、再生組織における EGFP(+) (*mmp9(+)*) 細胞の多くは骨芽細胞であることが示唆された。

2-2-4. Cre-loxP 組換えによる *mmp9(+)*細胞の系譜解析

Tg(mmp9:egfp) による観察から、再生前から鰭条のジョイントに局在する *mmp9(+)*細胞が、鰭の切断によって再生組織に移動し、骨芽細胞に分化したのではないかと考えられた。しかし、EGFP トランスジェニックによる解析では、ジョイントの細胞が実際に移動しているのか、また移動した細胞が再生組織において骨芽細胞に分化しているのかは確実ではない。これら確かめるには、より長期的な細胞系譜解析が必要である。

次に、Cre-loxPシステムを用いた細胞系譜解析を行った。組換え酵素 Cre は、loxP という特定の配列を認識して、その配列によって挟まれた領域を除くことができる (Figure 10)。さらに今回用いた CreERT2 は、変異型エストロジェン受容体 (ERT2) ドメインを持ち、内在のエストロジェンとの結合は弱く、体内に存在しない低分子化合物である 4-hydroxy tamoxifen (TAM) に高親和性で結合して活性化する。

Cre の標的として、loxP 配列で挟まれたサンゴ由来赤色蛍光タンパク質 (Discosoma red fluorescent protein 2, DsRed2) と EGFP を、メダカ由来の β アクチンプロモーター (*Olactb*) を用いて全身で発現するようにしたレポーター *Tg* を用いた (Yoshinari et al., 2012)。これと組織特異的に CreERT2 を発現する *Tg* のダブル *Tg* を TAM 処理することで、CreERT2 を発現する細胞においてのみ、組換えが誘導され、蛍光の色が DeRed2 から EGFP に切り替わり、その子孫細胞をすべて EGFP で標識できる (Figure 10)。

Tg(mmp9:egfp) と同様に、BAC クローンの *mmp9* の翻訳開始コドンに *creERT2* 遺伝子カセットを相同組換えによって挿入し、さらに、*crystalline alpha A (cryaa)* プロモーターの制御下で発現する *egfp* を含む Tol2 カセットを挿入した (Figure 3B)。作製した組換え BAC DNA を受精卵ヘインジェクションし、それらが育った F0 魚から *Tg* のスクリーニングを行った。レンズでの EGFP 発現を持つことを指標にして、8 つの *Tg* 候補となる系統を同定した。これらから、さらに、成体における TAM 処理で、鰭における Cre 組換えの効率が最も高かった系統を *Tg(mmp9:creERT2)* として確立し、以降の細胞系譜解析に用いた。

実際に、ダブル *Tg(mmp9:creERT2; Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)* を TAM で処理すると、*Tg(mmp9:egfp)* と似たパターンで、*mmp9(+)* ジョイント細胞に EGFP の蛍光が観察され、Cre によって *mmp9(+)* 細胞を標識できたと考えられた (Figure 11)。この EGFP は徐々に強くなり、TAM 処理開始から 3 日程度で安定した。

CreERT2 の発現量が多い場合、TAM 非存在下でも組換えが起こり、Cre ラベル細胞が生じうる。そこで、このダブル *Tg* において、TAM を処理しなくても組換えを起こすか観察した。しかし、幼魚においては再生するしないに関わらず、EGFP は観察されなかった。成長過程では、鰭条のジョイントにごく少数の Cre ラベル細胞が検出され、受精後 7 か月以上経過した鰭条においては、ジョイントに少数の Cre ラベル細胞が見られた (Figure 12)。しかしながら、これらの TAM 非依存の Cre ラベル細胞の数は、TAM を処理しときに標識される細胞に比べずっと少なかった。また、鰭を切断したときの再生組織では、新たな組換えは誘導されなかった。これらのことから、TAM 非依存の自発的組換えは、本研究における細胞系譜解析の結果には影響しないと考えられる。さらに残留した TAM による新たな組換えを最小限に抑え、EGFP の蛍光を安定させるため、TAM を洗い流して少なくとも 2 日以上おいてから、Cre によって標識した *mmp9(+)* 細胞の挙動を追跡するようにした。

Cre ラベルした *mmp9(+)* ジョイント細胞を、鰭の切断直後から観察し続けた結果、Cre ラベル細胞は切断面に最も近いジョイントから移動して、切断後 27 時間で切断面に到達し、その後再生組織に分布した (Figure 13)。興味深いことに、移動してきた細胞の中には、*Tg(mmp9:egfp)* でも観察されたように (Figure 6, 矢頭)、新しく形成されたジョイントに局在する細胞が観察され (Figure 13, 矢頭)、ジョイント細胞は自己複製することも示された。以上のことから、*mmp9(+)* ジョイント細胞は、実際に、組織の損傷に応答してジョイントから移動し、再生組織に寄与して、その中には新しいジョイントの細胞もあることが明らかにできた。

2-2-5. 鰭条骨のジョイントに局在する *mmp9(+)* 細胞は骨芽前駆細胞 (OPC) である

Cre による細胞系譜解析から、*mmp9(+)* ジョイント細胞が移動し、再生組織に寄与することが示されたが、次に、再生組織に移動してきた Cre ラベル細胞が、骨芽細胞に実際に分化するのかを検証した。あらかじめジョイント細胞を Cre ラベルした *Tg* において、再生を行わせ、Zns5 と Sp7 の抗体染色によって、再生組織の骨芽細胞を標識した。その結果、再生組織に移動してきた Cre ラベル細胞の多くは Zns5 と Sp7 両方陽性であり (Figures 14A and 14B, 白矢頭)、実際に、骨芽細胞に分化することが証明できた。

近年の研究により、既存の骨芽細胞の脱分化により、骨芽細胞が再生組織に供給されることが示唆されている (Knopf et al., 2011; Tu and Johnson, 2011; Sousa et al., 2011; Stewart and Stankunas, 2012)。従って、鰭の *mmp9(+)* ジョイント細胞は、もともと骨芽細胞であった可能性も考えられる。そこで、これらが骨芽細胞かどうかを調べるため、再生前の鰭条のジョイントの Zns5 と Sp7 による抗体染色を行った。その結果、*mmp9(+)* ジョイント細胞は、Zns5 陽性であったが、一方、Sp7 は陰性であった (Figure 15)。したがって、*mmp9(+)* ジョイント細胞は、骨芽系列の

細胞である可能性が考えられるが、分化を始めた Sp7 陽性の骨芽細胞ではないことが示された。さらに、これらは樹状突起のような特徴的な形態を持っており、その点においてもなめらかで扁平な構造をしている骨芽細胞とは異なる (Figure 15B)。また、再生組織に再形成された新しいジョイントの細胞も、同じく Zns5 陽性で Sp7 陰性であることから (Figure 14B, 黄矢印)、ジョイント細胞は再生過程で自己複製することも証明された。これらの結果を踏まえると、*mmp9(+)*ジョイント細胞は、骨芽細胞ではないが、再生組織の骨芽細胞へと分化する能力を持つ前駆細胞として働いていることを示している。よって以後、*mmp9(+)*ジョイント細胞を骨芽前駆細胞 (Osteoblast Progenitor Cells, OPC) と呼ぶことにする。

次に、OPC が、再生における骨芽細胞の供給にどの程度寄与するのかを調べるため、再生組織の骨芽細胞 (Zns5 または Sp7 陽性) 全体に占める OPC 由来の細胞の割合を調べた。その結果、Zns5 または Sp7 陽性細胞のそれぞれにおいて、約 40 パーセントの細胞が OPC に由来することが示された (Figure 14C)。ただし Cre 組換えの効率が 100%よりは低いこと (標識できていない OPC) を考慮すると、骨芽細胞のうち少なくとも 40%以上が OPC に由来すると推測できる。

さらに、細胞系譜追跡の結果、OPC はもう一つ別のタイプの細胞にも分化していることがわかってきた。再生組織のジョイントではない領域でも、Zns5 陽性で Sp7 陰性の細胞が見られ、それらの細胞は骨表面に沿って分布するが直接接してはおらず、不規則かつ平たい形をしている (Figures 14D and 14E)。マウスの研究においては、骨芽系列の細胞でありながら Sp7 陰性である骨裏打ち細胞 (bone lining cells, BLC)が知られている。BLC とは、もともと、骨形成が行われなくなった骨表面を裏打ちするように存在し、分裂をしない休止状態の骨芽系列の細胞とされているが、最近の報告では、骨芽細胞を供給することも示唆されている (Matic et al., 2016)。上の細胞は、局在などから、ゼブラフィッシュにおける BLC であると考えられる。つまり、OPC は、骨芽細胞と OPC 自身、さらに BLC も生じる、複数の細胞運命を持つ前駆細胞であることが示唆される。

さらに興味深いことに、新たに再生したジョイントの細胞は、骨芽細胞マーカーである Sp7 は発現しないものの、その前段階の前骨芽細胞マーカーである Runx2 (Dallas et al., 2013) を一時的に発現することがわかった (Figure 16 上段、黄矢頭)。Runx2 は間葉幹細胞 MSC から骨芽系列の細胞へ分化するために必須な転写因子として知られている。再生するジョイントでの Runx2 発現は非常に一過的であり、再生組織に次のジョイントが形成されると、最初に再形成されたジョイント細胞は Runx2 の発現を失い、Runx2 も Sp7 も発現しない元の OPC の特徴を持つようになる (Figure 16 下段、黄矢頭)。したがって、OPC が自己複製するとき、これらは一時的に前骨芽細胞の状態になった後、再び OPC に戻ることが示唆される (Figure 2)。

さらに、OPC が前駆細胞として再生組織に多くの骨芽細胞を供給するのであれば、活発に細胞増殖をしていることが考えられる。そこで、細胞増殖の程度を調べるため、再生芽が最初に形成される切断後 24 時間から 48 時間に、EdU を取り込ませ、複製中の DNA をラベルした。この直後に再生組織を固定し、EdU と Sp7 を同時に検出すると、ジョイントに局在する Sp7 陰性の OPC も、また Sp7 陽性の骨芽細胞も、Cre ラベル細胞のうち 9 割以上で、EdU 取り込みが見ら

れた (Figure 17)。したがって、OPC は、再び OPC になるか、骨芽細胞等になるかに関わらず、再生過程で活発な細胞増殖をしていることが示された。

2-2-6. OPC は正常な骨再生に必要である

Cre を用いた細胞系譜解析から、OPC が再生組織に骨芽細胞を供給することが明らかになったが、次に、正常な骨再生にどの程度寄与しているのかを、OPC の細胞除去実験を行って検証した。

細胞除去実験には、細菌由来のニトリダクターゼ (NTR) とメトロニダゾール (Mtz) を用いた (Pisharath et al., 2007)。Mtz は無毒な小分子化合物で、通常の細胞には何ら影響を与えないが、NTR を発現する細胞においては、NTR によって代謝され、細胞毒に変化する。細胞毒は DNA に架橋を形成することで、結果として NTR(+)細胞のみが Mtz 存在下でアポトーシスを起こす (Figure 18A)。これまでの BAC を用いた *Tg* の作製と同様に組換え BAC の作製を行い、*egfp-ntr* 融合タンパク質の遺伝子カセットを、BAC クローンの *mmp9* の翻訳開始コドン直下に相同組換えによって挿入した (Figure 3A)。この BAC コンストラクトを用いて、*Tg* の作製およびスクリーニングを行った。F0 ゼブラフィッシュから EGFP-NTR を発現する独立した 3 系統が得られ、これらすべてが *Tg(mmp9:egfp)* と同じ発現を示したので、そのうち 1 系統を *Tg(mmp9:egfp-ntr)* として確立した。実際に *Tg(mmp9:egfp-ntr)* を Mtz で処理した結果、Mtz 添加から 48 時間以内に、OPC が存在することを示す鰭条のジョイントの EGFP-NTR の発現がほとんど消失した (Figure 18B)。したがって、OPC をほぼ完全に排除することが可能なことが示された。

鰭を切断する 2 日前から Mtz を処理し続けて、切断時およびそれ以降 OPC がほぼ完全に存在しない鰭を作り、OPC が存在しないことで、骨再生がどれほど影響を受けるのか調べた。再形成される鰭条の石灰化した骨は、骨に含まれるカルシウムと結合する色素 Alizarin Red によって染色した。その結果、石灰化組織が形成され始める切断後 4 日目で、OPC が除去された *Tg* における石灰化が抑制されていることがわかった (Figures 19)。さらに、再生芽が形成される切断後 2 日目の再生組織で Zns5 と Sp7 の抗体染色を行い、骨芽細胞の細胞数を定量した結果、どちらにおいても、Zns5 または Sp7 陽性の細胞数が減少することがわかった (Figures 20)。つまり、OPC の存在は、正常な数の骨芽細胞数の供給と、石灰化した鰭条骨の再生に必要であることが示された。

ただし、再生組織の *mmp9*(+)細胞はその形態と分布から骨髄球細胞と考えられる細胞なども含んでおり (Figure 21、矢印)、それらの細胞の除去が、組織の再生そのものに影響し、結果として骨再生や骨芽細胞数を抑制した可能性も考えられる。そこで、WT と OPC 除去を行った *Tg* で再生組織の面積と長さを比較したが、ほとんど両者に差は見られなかった (Figures 22)。さらに、再生過程そのものへの影響を検証するため、傷上皮と再生芽が形成されているかどうかを調べた。このため、それぞれのマーカーとされる *fibronectin (fn) 1b* (Yoshinari et al., 2009) と *msxc* (Akimenko et al., 1995) の発現を ISH によって調べたが、WT と *Tg* に変化は見られず、OPC 除去による影響はなかった (Figure 23)。したがって、OPC 除去は骨の再形成と骨芽細胞の数に

のみ影響し、再生芽と傷上皮の形成には影響しないことがわかった。以上の結果から、鰭条のジョイントに局在する OPC は正常な骨芽細胞の供給と、それを通じた骨再生に必要な役割を果たしていることが示された。

本研究による OPC の発見は、Singh らによって示された結果と一致する (Singh et al., 2012)。彼らは、既存の骨芽細胞が、脱分化によって再生組織の骨芽細胞に寄与することを示す一方で、再生前の既存の骨芽細胞を NTR によって除去しても、再生組織における十分な数の骨芽細胞の誘導や正常な骨の再生が起こることを示していた。この結果は、脱分化によらない別の骨芽細胞の供給源の存在を示唆したが、それがどんなソースであり、どのように骨芽細胞を供給するかは不明であった。本研究の結果より、OPC は骨芽細胞の脱分化以外のもう一つの骨芽細胞供給源であることが判明した。

2-2-7. OPC の前駆細胞が間葉組織に存在する

OPC 除去実験から、OPC が骨芽細胞の供給で重要な役割を担っていることが示されたが、Mtz を除くと、すぐに OPC が再形成されることも観察された。OPC は Mtz 処理によって 2 日でほぼ完全に除去できるが、新たな OPC が Mtz を除いてから 4 日で現れ始めた (Figure 24)。これは、*mmp9(-)* の前駆細胞から、OPC が再生されることを示唆している。

そのような OPC の前駆細胞を同定するため、2 つの可能性を検証した。まず周囲の骨芽細胞が脱分化して、OPC を生じる可能性を検証した。骨芽細胞を短期的に追跡するため、*sp7* 遺伝子のプロモーターの制御下で赤色蛍光タンパク質 mCherry を発現する Tg を作製し、ダブル Tg(*sp7:mcherry; mmp9:egfp-ntr*) とした。Mtz で、この Tg の OPC をほぼ完全に除いたあと、Mtz を除いて、ジョイントに EGFP(+)/mCherry(+)細胞が現れるか観察した。その結果、再生した OPC は、いずれも EGFP(+)/mCherry(-)であり (Figure 25、矢頭、n = 15 /15 ジョイント、合計 5 匹)、骨芽細胞由来の OPC と考えられる EGFP(+)/mCherry(+)細胞は現れなかった。したがって、*sp7* 陽性の骨芽細胞からは OPC を生じないことが示唆された。

次に、骨芽細胞以外の OPC 供給細胞として、間葉細胞が OPC を生じるか検証した。鰭条の間葉細胞を追跡するために、再生芽移植を利用した (Yoshinari et al., 2012; Shibata et al., 2016, 2017)。ドナーの切断後 2 日目の再生芽を取り出し、同じステージのホストの再生芽領域に移植して再生を完了させると、ホストの組織に定着した移植細胞は、95%以上間葉細胞になることが以前の研究で示されている (Shibata et al., 2016)。すなわち、再生芽移植によって、ホストの間葉細胞をドナーの間葉に導入することが可能である。ここで、ドナーとして用いたのは、ダブル Tg(*mmp9:egfp; Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp*) であり、この Tg では、DsRed2 が全身で常に発現し、かつ OPC が EGFP を発現する。ホストには、Tg(*mmp9:egfp-ntr*) を用いた。このような Tg に Mtz を作用させると、ホストの OPC が除去されて、もしドナー由来の細胞から OPC が再形成されるなら、ジョイントに EGFP(+)/DsRed2(+)が出現するはずである (Figure 26A)。

十分な数の間葉細胞の置換に成功した個体を選び、Mtz の処理を続けてホスト細胞から OPC が再生できないようにした。その結果、ジョイント OPC が除去された後、EGFP(+)/DsRed2(+)

細胞が出現してくることが観察された (Figures 26B and 26C、矢頭)。つまり、移植した間葉細胞から OPC を生じることが示された。*mmp9(-)*の前駆細胞は鰭条の間葉組織に存在し、ここから OPC が補充されることが示唆された。

2-2-8. OPC は発生期の体節から生じてニッチに備蓄される

さらに、成長や発生における OPC の起源を検証した。第一に、鰭が成長するとき、初期に形成された OPC が、骨芽細胞を供給すると同時に、自己複製して次々に新たな OPC を生じるかどうかを解析した。このため、OPC を、2-3 列のジョイントが形成された受精後 25 日で Cre ラベルして、その後、24 日にわたって追跡した。この結果、最初に形成された OPC の子孫細胞は、その後、新たに形成された鰭の領域では、ジョイントの OPC にも骨芽細胞にも寄与しなかった (Figure 27)。したがって、鰭の成長期には、OPC は、すでにある OPC の自己複製ではなく、OPC でない前駆細胞に由来することが示唆された。

さらに、OPC の発生的起源を明らかにするため、発生期の体節細胞を追跡し、体節から OPC を生じるか検証した。メダカの体節移植の研究から、体節は、外骨格に属する鰭条とウロコの骨芽細胞を生じることが、以前に報告されている (Shimada et al., 2013)。したがって、骨芽細胞の前駆細胞である OPC も体節から生じることが期待された。この実験では、ドナーには、上の再生芽移植と同様に、DsRed2 を全身で常に発現し、かつ OPC のみが EGFP を発現するダブル *Tg(mmp9:egfp; Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)* を用いた。ドナーの体節は、受精後 1 日で取り出して、同じステージの WT のホストの同じ前後レベルの体節部分に移植し (Figure 28A)、その後、受精後 42 日まで移植細胞を追跡した。その結果、DsRed2(+)細胞は、鰭条 (Figures 29A-29C)やウロコ (Figure 29D) などの外骨格の骨表面において観察され、ゼブラフィッシュもメダカと同様に、体節が外骨格の骨芽細胞を生じることが示された。さらに、鰭条のジョイントには、EGFP(+)/DsRed2(+)細胞が現れ、移植した体節由来の細胞から OPC が生じることが示された。移植した細胞は、前後の体節領域にはみ出すことはほとんどなく (Figures 28B and 28C)、鰭条には多数の EGFP(+)の細胞、すなわち OPC を生じたことから (n = 5 匹)、OPC が体節以外の細胞の混入である可能性はほとんどないと考えられる。したがって、OPC は発生期の体節を起源とすることが示された。

2-2-9. OPC は骨の成長ではなく恒常性維持に寄与する

次に、鰭の成長と維持における OPC の機能を検証した。鰭の成長期の骨形成で、OPC が必要かを調べるため、OPC 除去を、鰭の著しい成長が起こる受精後 20 日から 28 日に行った。対照 *Tg(sp7:mcherry)* とダブル *Tg(sp7:mcherry; mmp9:egfp-ntr)* に対して、Mtz 処理を 2 日ごとに 15 時間行い、ほとんどの OPC が除去される状態を維持した。次の Mtz 処理を始める直前に、毎回 OPC がほとんど再生していないことを確認した (Figure 30)。その後、両者の骨を Alizarin Red で染色して比較したが、有意な差は見られなかった (Figures 31A and 31B)。また、*sp7* 陽性の骨芽細胞も定量したが、骨芽細胞数にも両方で差は検出されなかった (Figures 31C

and 31D)。したがって、成長期においては、骨芽細胞供給や骨形成にとって、OPC は必ずしも必須ではないことが示唆された。

さらに、成体の非再生組織で、OPC が骨組織や骨芽細胞のターンオーバーへの寄与を調べた。このため、成体の齶で、OPC を Cre ラベルし、そのまま長期の細胞系譜解析を行った。骨芽細胞は、上と同様に、*Tg(sp7:mcherry)* によって同定した。4 ヶ月齢の成体において、OPC を Cre ラベルし、114 日追跡した。その結果、ジョイントにあった OPC の子孫細胞は、ジョイント間の齶条骨表面に沿って分布するようになり (Figure 32A)、そのうち、20%ほどは *sp7* 陽性の骨芽細胞であることがわかった (Figures 32B and 32C)。残りの 80%は、*sp7* 陰性であるが、ジョイント間に分布し、先に述べた BLC と考えられる。また、TAM 非依存的な自発的な組換えは、同齢の成体において、ジョイント以外では見られなかった (Figure 12)。これらの結果から、OPC は、成体の骨組織の恒常性維持において、骨芽細胞と BLC を常時生み出していることが示された。

さらに、OPC が成体の骨組織の恒常性に、どの程度重要な役割を担っているか検証するため、長期的な OPC 除去実験を行った。ここでは、対照 *Tg(sp7:mcherry)* とダブル *Tg(sp7:mcherry; mmp9:egfp-ntr)* を、3 ヶ月齢からはじめて、40 日間、Mtz 処理を続け、ほとんどの OPC が除去される状態を維持した。次の Mtz 処理を始める直前に、毎回 OPC がほとんど再生していないことを確認した (Figure 33)。その後、両者の骨を Alizarin Red で染色して、石灰化組織を比較した結果、有意な差は見られなかった (Figures 34A and 34B)。また、*sp7* 陽性の骨芽細胞を定量した結果でも、両者に差が検出されなかった (Figures 34C and 34D)。したがって、成体の非再生組織における OPC は、骨芽細胞のソースとして寄与しているが、成長期の場合と同様に、必ずしも必須ではないことが示唆される。この結果は、成体での骨組織のターンオーバーは非常にゆっくりで OPC 除去の影響が検出できないか、または、*mmp9(-)*の間葉細胞も直接骨芽細胞を生み出すことができるなどの可能性が考えられる。

2-3. 考察

2-3-1. 生体内における骨芽前駆細胞(OPC)が同定された

哺乳類の骨髄における骨芽細胞の前駆細胞は、その存在が示唆されてから長らく研究されておる。最近の研究において、骨の伸長の中心となる骨髄の成長板において骨芽細胞を含む複数の細胞種に分化できる多能性幹細胞が単離され、その性質が明らかにされつつある(Chan et al., 2015; Yue et al., 2016; Worthley et al., 2015; Bianco et al., 2015)。しかし生体内における実体は未だに不明である。本研究では、ゼブラフィッシュの鰭の再生過程で誘導されることが示されていた *mmp9* (Yoshinari et al., 2009) の発現細胞を解析することで、それらが再生時に骨芽細胞に分化する能力を持った前駆細胞、すなわち骨芽前駆細胞 OPC であることが示された (Figure 14)。さらに OPC は、自己複製能をもつことが示された。

しかし本研究では、哺乳類で知られていることが、ゼブラフィッシュの OPC においても成り立つのかどうかまでは言及できていない。哺乳類の間葉幹細胞は自己複製する回数に制限はなく、骨芽細胞以外の細胞にも分化誘導できるが、ゼブラフィッシュの OPC が自己複製しつづけるのか、また軟骨細胞や脂肪細胞、筋芽細胞への分化誘導シグナルによって、骨芽細胞以外に分化できるのかわからない。それを明らかにするには、ゼブラフィッシュにおける OPC の細胞培養を可能にする必要がある。一方で、哺乳類においては、骨組織のジョイントに MSC や OPC が局在するのか、*mmp9* の発現によって標識できるのか調べることで哺乳類の OPC が同定されることが期待される。

2-3-2. OPC は再生組織の骨芽細胞の補完的な供給源である

アホロートルの細胞系譜解析から、再生組織の細胞は、分化細胞が脱分化・増殖することで生じることが示唆され (Kragl et al., 2009)、ゼブラフィッシュにおいても、骨芽細胞が脱分化し、再生組織に骨芽細胞を供給することが報告されていた (Knopf et al., 2011; Tu and Johnson, 2011; Sousa et al., 2011; Stewart and Stankunas, 2012)。その一方、幹細胞や前駆細胞の関与は、特異的なマーカーが見つかっていなかったため、言及されてこなかった。これに対し、本研究において、再生関連遺伝子の発現細胞を、Cre-*loxP* システムによる細胞系譜解析と NTR を介した細胞除去により、OPC は、脱分化した骨芽細胞と機能を補完しあうもう一つの骨芽細胞のソースであることが示された。このことは、骨芽細胞をあらかじめ除去しても再生組織に骨芽細胞が現れ、正常な骨再生が起こったことと一致する (Singh et al., 2012)。これにより、これまで生体内での存在が明らかでなかった骨芽前駆細胞 OPC を介した骨の維持や再生の重要な仕組みが解明された。OPC と脱分化した骨芽細胞の 2 つだけが、骨芽細胞のソースなのか、この 2 つ以外にも主要なソースがあるのかは言及できなかったが、OPC と骨芽細胞を同時に細胞除去することで、明らかにできるだろう。

2-3-3. OPC は間葉細胞によって補充される

間葉幹細胞は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞および筋細胞に分化できる多能性幹細胞と考えられており、OPC にも骨芽細胞への中間段階として分化することが示唆されてきた (Kassem and Bianco, 2015)。本研究において、再生芽移植による間葉細胞の追跡から、OPC は間葉細胞によって補充されることが明らかになり、哺乳類と同様に、OPC の前駆細胞もしくは多能性幹細胞が存在し、OPC を生じることが示唆された。

また、アホロートルの細胞系譜解析では、多くの細胞種は限定された分化能しか持たないことが示されていたが、真皮細胞が、真皮細胞だけでなく軟骨細胞にも分化するという、複数の分化能を持った細胞も示されていた (Kragl et al., 2009)。本研究においても、間葉細胞が OPC という骨芽系列の細胞に分化することは、アホロートルの真皮細胞と似た、複数の分化能を持っている可能性が示された。

さらに、OPC と間葉細胞という、二段階の前駆細胞プールによって、ゼブラフィッシュの骨芽細胞が供給されていることが示され、これによって供給源が枯渇することなく、骨の確実な再生と恒常性維持が可能になっていると考えられる。この間葉細胞にアプローチするには、まずゼブラフィッシュですでに知られている間葉細胞のマーカ―や、哺乳類の MSC など知られるマーカ―を用いた系譜解析を行う必要があるだろう。また、発生期の体節に存在すると予想される、成長期の骨芽細胞と OPC の共通の前駆細胞を解析することも、成体の間葉細胞へのアプローチとして有用だと考えられる。

2-3-4. OPC は発生期の体節に由来する

脊椎動物の発生期の骨芽細胞は、主に体節の一部である硬節から生じると考えられている (Hall, 2015b)。哺乳類の四肢の軸となる骨は、体節に由来する骨芽細胞によって形成され、その後、骨の内部に血管が侵入し、骨髄間葉細胞が付随してくる。この細胞が新たな骨芽細胞に分化し、発生を終えた後の骨の伸長を促すと考えられている (Aubin, 2008)。そのため、発生期と成体における骨芽細胞は由来が異なるかのように考えられてきた (Figure 35)。本研究において同定された OPC は、体節細胞の追跡から、その発生的起源が体節であることが明らかになった (Figure 29)。したがって、成体の骨芽細胞のソースが、発生期の骨芽細胞のソースに由来することがわかった。このことは、哺乳類においても、成体の骨芽細胞が、発生期の骨芽細胞から連続した細胞系譜をもつことが予想される。

だが、体節のうちどの部分から OPC が生じるのか、またその細胞運命の決定がいつ起こるのかわかっていない。OPC や骨芽細胞を生じる細胞をより厳密に同定するには、まず、体節や硬節で発現し、骨芽系列の細胞の分化決定に関わるとされる、Sox9 や Pax1、Twist などを用いた細胞系譜の解析が必要である。異なるマーカ―同士、また異なる時点での Cre ラベルを比較することで、OPC だけでなく、間葉細胞やさらに多分化能をもった MSC の存在が明らかになり、さらに生体内における細胞運命の樹形図が描けることが期待される。

2-3-5. OPC は鰭条骨の恒常性維持においても骨芽細胞を供給する

脊椎動物の骨は、その頑強さを維持するために、骨芽細胞が絶えず供給され、骨組織を常時リニューアルし続けていると考えられている (Aubin, 2008)。本研究において長期の細胞追跡を行うと、OPC は再生だけでなく、成体の骨組織の恒常性維持においても骨芽細胞を供給することが示された (Figure 32)。しかし、再生とは異なり、恒常性維持における OPC からの骨芽細胞の供給は、必ずしも必要ではないことが示唆された (Figure 34)。再生では、鰭の切断という大規模な骨組織と骨芽細胞の喪失に対して、供給しなければならない骨芽細胞の数が多いため、OPC による骨芽細胞の供給が重要になるが、それに比べ、通常の骨組織のターンオーバーは、非常にゆっくりだと推測され、OPC 除去の影響が検出できないと考えられる。また、OPC を補充する *mmp9(-)*の間葉細胞も、OPC を介さずに直接骨芽細胞を生み出すことができる可能性も考えられる。その詳細を明らかにするには、複数の骨芽細胞の供給源を同時に系譜を解析したり、細胞除去実験を行ったりすることが必要だと考えられる。

2-3-6. OPC における Mmp9 タンパク質の機能

分泌型のメタロプロテアーゼである Mmp9 は細胞外マトリックスや様々なシグナル分子を分解して、多様な働きをするが、骨組織における Mmp9 は一般的に軟骨マトリックスを分解し、骨基質のリモデリングと沈着を促進すると考えられてきた (Colnot et al., 2003; Page-McCaw et al., 2007)。しかし、Mmp9 が骨芽前駆細胞 OPC を標識するという発見は、Mmp9 が上記の働きとは異なる役割を担っているのか、もしくは細胞外マトリックスのリモデリングといった既知の働きが OPC の機能に重要なのかかもしれない。それを明らかにするには、Mmp の活性は全般的に、多段階の厳密な制御を受けていることから、まず Mmp9 がいつ分泌され、どこで活性化して基質を分解しているのかを知る必要がある。その上で、OPC 以外の Mmp9 の働きに影響を与えずに、OPC の Mmp9 の活性のみをコンディショナルにノックアウトもしくはノックダウンするような解析が必要である。

第3章 結言

本研究の細胞系譜解析から、Figure 36 に示すような、骨の再生メカニズムとこれに関わる細胞の系譜が解明できた。哺乳類の培養などを用いた研究から、骨芽細胞の前駆細胞の存在が長らく示唆されていたが、その実体は不明であった。本研究による骨芽前駆細胞 (OPC) の同定により、生体内における骨芽細胞の前駆細胞の正体ははじめて明らかにできた。さらに驚くべきことに、OPC は、石灰化組織にニッチ (ジョイント) を形成して存在することが明らかになった。

従来、ゼブラフィッシュの鰭条骨の再生において、既存の骨芽細胞の脱分化によって骨芽細胞が再生されることが報告されていたが、本研究により、OPC は骨の再生におけるもう一つの骨芽細胞の重要な供給源であることがわかった。

また、発生期における骨組織の形成は、体節の硬節に由来する細胞によって行われることがよく知られているが、哺乳類の多くの骨は、発生が進むと、骨の内部に侵入する血管に付随してきた骨髄間葉細胞が新たな骨芽細胞を生じ、骨の伸長を促すと考えられてきた。そのため、発生期と成体における骨芽細胞は由来が異なるかのように考えられてきたが、本研究の成果によりはじめて、発生から成体における骨芽系列の細胞の連続性が明らかになった。

このように、OPC は発生期の体節に由来し、成長とともに、ニッチを作って休眠状態で備蓄されることなど、骨芽細胞系譜と分化の重要な仕組みが解明できた。また、OPC 自身も、間葉細胞から補充されることがわかり、これら複数の前駆細胞プールが、骨の再生と維持を確実にする重要なメカニズムだと考えられる。さらに同様な細胞やメカニズムが哺乳類においても存在することが考えられ、今後の再生医療における重要な標的となることが期待される。

第 4 章 実験手法

ゼブラフィッシュの系統と飼育

野生型ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) として *Tupfel long fin* 系統を用いた。 *Tg(mmp9:egfp)*、 *Tg(mmp9:creERT2)*、 *Tg(mmp9:egfp-ntr)*、 *Tg(sp7:mcherry)*、 *Tg(Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)* (Yoshinari et al., 2012)、 *Tg(Olactb:loxP-bfp-loxP-egfp)* は我々の研究室で作成された。ゼブラフィッシュは再循環システムにより維持し、明 14 時間、暗 10 時間の周期、28.5°C で飼育した。胚の飼育水として、egg water (0.06% artificial sea salt, 0.0001% methylene blue) を用いた。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行った。すべての外科的な操作は、0.002% ethyl 3-aminobenzoate methanesulphonate (tricaine、Sigma-Aldrich、St. Louis, MO) 麻酔の下で行い、苦痛を最小限に抑えるようにした。

再生実験

成体での再生実験は 3 から 12 ヶ月のゼブラフィッシュを用いて行った。鰭の切断では、魚を 0.002% tricaine の飼育水で麻酔してから、尾鰭の根元と先端のほぼ中央を解剖用メスで切断した。骨折解析においては、先端の直径を 10-20 μm に調整したガラスキャピラリーを用いて、鰭条の中央付近のセグメントをつつくことで、骨折させた (Takeyama et al., 2014)。ウロコ再生においては、ピンセットを用いて胴体の左側のウロコ 10 枚程度を取り除いた。

トランスジェニックゼブラフィッシュの作製

mmp9 Tg を作製するため、BAC DNA を BAC 組換え法に従って修飾した (Narayanan and Chen, 2011; Suster et al., 2011; Bussmann and Schulte-Merker, 2011)。 *mmp9* 遺伝子を含む BAC クローン (CH211-269M15) を BACPAC resources (Oakland, CA, USA) から取り寄せた。

この BAC に相同組換えが誘導できるよう、BAC DNA を単離し、ヒートショックによって組換え酵素を発現する大腸菌 SW102 にエレクトロポレーション法によって導入した。同時に、ポリアデニル化配列とカナマイシン耐性遺伝子を持った、*egfp*、 *creERT2* (Hans et al., 2011) または *egfp-ntr* (Grohmann et al., 2009) の遺伝子カセットを持つプラスミドを用意した。 *mmp9* の翻訳開始コドンの前後の配列と相同な配列 70 bp ずつを加えたプライマーを用いて、遺伝子カセットを増幅した。これにより末端に相同組換え用の配列が加わった遺伝子カセットを、BAC DNA を持った SW102 にエレクトロポレーション法によって導入し、ヒートショックによって産生された相同組換え酵素によって、BAC の *mmp9* の翻訳開始点に挿入した。さらに、ゼブラフィッシュゲノムへのトランスジェネシスの効率を上げるため、アンピシリン耐性遺伝子を持つ inverted Tol2 (iTol2、メダカ由来のトランスポゾン) カセットを、上記の遺伝子カセットの導入方法と同じように、今度は BAC ベクターの

領域に挿入した (Suster et al., 2011)。creERt2 に関して、それ自体の発現を蛍光で見分けることができないため、crystalline alpha A (cryaa) プロモーターの制御下で発現する egfp をもつ iTol2 カセットを用いた。ntr はヒトのコドンに最適化された、Escherichia coli のニトリリダクターゼをコードするものを用いた (Grohmann et al., 2009)。

これらの修飾された BAC DNA は PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen) を用いて精製し、1 細胞期のゼブラフィッシュ胚に 125 ng/μl で、25 ng/μl の transposase mRNA とともにインジェクションした。インジェクションを行った founder は成体まで育てた後、WT と掛け合わせて、F1 世代で EGFP 発現があるかを調べ、Tg(mmp9:egfp)と Tg(mmp9:egfp-ntr)についてそれぞれ 2 系統と 3 系統を得た。これらの系統同士の EGFP 発現が全く同じだったので、それぞれの内の 1 系統を選び、Tg ラインとして確立した。Tg(mmp9:creERt2) については、F1 世代の眼のレンズに EGFP 発現を持つ幼魚を選んだ。それが成体になってから TAM を処理して、Cre 組換えが起こるか調べた。レンズ EGFP 発現があったのは 8 系統あり、その中で最も Cre-loxP の組換え効率の高かった系統を Tg ラインとして確立した。

Tg(sp7:mcherry) は我々の研究室で作製した。メダカ由来の sp7 遺伝子の上流 5 kb のプロモーター領域をサブクローニングしたプラスミドを東京工業大学の猪早敬二先生からいただいた。これを、Sfi および Agel の制限酵素サイトを加えたプライマーで 5 kb を増幅してサブクローニングした。これと pTol2(ef1a:egfp) ベクターを Sfi および Agel で切断し、ライゲーションを行い、ef1a プロモーター領域と sp7 プロモーター領域を入れ換えた。続いて同様な過程で mcherry 配列を Agel および ClaI の制限酵素サイトを介して、egfp 配列と入れ換えた。このプラスミド DNA は 1 細胞期の胚に 25 ng/μl で 25 ng/μl transposase mRNA とともにインジェクションした。インジェクションを行った founder は成体まで育て、WT と掛け合わせて、F1 世代で mCherry 発現があるかを調べ、3 系統を得た。鰭条骨表面に特異的で強い mCherry 発現を持つ系統を選び、Tg ラインとして確立した。

これらの Tg 作製に使用したプライマーは以下の通りである。小文字は PCR 産物に付加する配列を示しており、下線は BAC コンストラクト作製時の相同組換えに用いた相同領域である。

iTol2 fw: 5'-tgaagatccttctatagtcacacctaataatgacgacgcccagggcgcccccCCCTGCTCGAGCCGGGCCCA-3'

iTol2 rv: 5'-gtctcctctgtatgtactgtttttgacgactctgcccgttgcgactcctcccATTATGATCCTCTAGATCAG-3'

mmp9 egfp cassette fw : 5'-gtttctccagatttcttctgaatttacttttatattgacgactcaaaaATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3'

mmp9 creERt2 cassette fw: 5'-gtttctccagatttcttctgaatttacttttatattgacgactcaaaaATGTCCAATTTACTGACCGTACA-3'

mmp9 cassette rv: 5'-caggctctcaacgagcaggtgcccagaaccagaaacgccaggaactccaagCAATTCAGAAGAAGTCTGCA-3'

SfiI sp7 promoter fw: 5'-ggccagatgggcccTGTGTACTTTAGAGGGAGGTTCTGATG-3'

Agel sp7 promoter rv: 5'-accggtCGGGACAGTTTGAAGAAGTCG-3'

Agel mcherry fw: 5'-ggatccACCGTCCGACCATGGTGAGCAAGGGCG -3'

ClaI mcherry rv: 5'-atcatgatTTACTTGTACAGCTCGTCCAT -3'

Cre-loxP 組換えと細胞系譜解析

Tg(mmp9:creERT2) と *Tg(Olactb:loxp-dsred2-loxp-egfp)* (Yoshinari et al., 2012) または *Tg(Olactb:loxp-bfp-loxp-egfp)* と掛け合わせたダブル *Tg* を、TAM を添加した egg water に入れて、Cre-loxP の組換えを誘導した。ほとんどの実験では、5 μ M TAM で 12 時間処理したあと、通常の飼育水で 10 分 3 回洗い流し、TAM が残留しないようにした。さらに洗浄後、少なくとも 2 日おいて EGFP 発現が安定してから、細胞系譜解析を始めた。鰭の成長初期に *mmp9(+)*細胞をラベルするときは、TAM で 4 日処理し、ラベルされる細胞がなるべく最大になるようにした。

ジョイント細胞の移動の経時観察

ライブイメージングのため、鰭を切断した *Tg(mmp9:egfp)* は 0.002% tricaine の飼育水で麻酔してから、2%アガロースの台におき、周囲の水分をできるだけ除いた。そこに一度溶かしてから 35°C 程度まで下げた、1.5% 低融点アガロースゲルで、魚の周囲を包埋して、ゲルが固まるのを待った。これにより鰭が動かず、高倍率の観察が可能になる。ゲルが固まったら、飼育水を少量足して、鰭が浸るようにし、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, Olympus) の 60 倍の水浸対物レンズを、水面に浸して観察して、画像を取得した。その後すぐに飼育水に戻して麻酔から回復させた。この操作を 2-6 時間ごとに繰り返し、58.5 時間続けた。

細胞除去

細胞除去は、NTR と Mtz を用いた。NTR 発現細胞のアポトーシスは、*Tg(mmp9:egfp-ntr)* を 1 匹あたり 100 ml の 5 mM Mtz (Sigma-Aldrich または Tokyo Chemical Industry) の egg water に入れて誘導した。処理の間は、28.5°C の暗室で維持し、Mtz の入った飼育水は毎日新しいものと交換した。飼育水を交換する際、魚は通常の飼育水に移し、ブラインシュリンプを与え、3-6 時間おいた。

長期の細胞除去における Mtz 処理は、成長期である受精後 20 日から 28 日の魚に対しては 2 日ごとに、成魚である 3 ヶ月齢以降の魚に対しては 4 日ごとに、12-18 時間行った。EGFP の蛍光は毎回の Mtz 処理の直前に確認したが、EGFP-NTR (+)細胞はほとんど観察されなかった。解析のための鰭の固定は最後の Mtz 処理の直後に行った。

Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization (ISH) は以下の通りに行った。*Tg(mmp9:egfp)*、*Tg(mmp9:egfp-ntr)*、または WT の切断前もしくは切断後 2 日目の鰭を 4% PFA / PBS に浸し、室温 1 時間もしくは、4°C で一晩固定した。その後、0.1% Tween 20 / PBS (PBT) ですばやく 2 回洗浄し、MeOH に 10 分 6 回置換し、-30°C で 3 時間以上保存した。脱水した鰭を段階的に PBT

に置換して再水和させ、20 分間、10 µg/ml Proteinase K/PBT で処理し、4% PFA で室温 20 分再固定した。Hybridization Buffer (HB) に置換し、65°C で 2 時間もしくは一晩 pre-hybridization を行った。

Hybridization buffer

- 50% formamide
- 5xSSC (pH 7.0)
- 500 µg/ml torula (yeast) RNA
- 50 µg/ml heparin
- 0.1% Tween 20
- 9mM citric acid to pH 6.0-6.5

さらに Digoxigenin (DIG) 標識したアンチセンス RNA プローブ 1 µg/ml 含む HB に置換し、hybridization を一晩もしくは二晩行った。65°C のまま段階的に SSC に置き換え、室温に戻してから、段階的に PBT に置換した。Blocking buffer (5% serum、0.2% BSA / PBT) に室温で 2 時間置換し、1/1000 Alkaline Phosphatase (AP) 標識抗 DIG 抗体 / Blocking buffer に置換し、4°C で一晩置いた。NTMT buffer で 5 分 3 回洗浄した後、発色液に置換し、室温で遮光して発色反応を行った。

NTMT buffer および発色液の組成は以下の通りである。

NTMT buffer

- 50mM MgCl₂
- 0.1M Tris-HCl
- 0.1M NaCl
- 0.1% Tween20 / dH₂O

発色液

- 450 µg/ml nitro blue tetrazolium
- 175 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate / NTMT buffer

3 時間前後で鱗が適度に発色したあと、PBT で 3 分 5 回洗浄後、4% PFA に置換することで発色反応を止め、80% glycerol に置換して、光学顕微鏡で 4-60 倍の対物レンズで観察した。

RNA プローブ作製にあたり、*mmp9* のコード配列の一部を以下のプライマーを用いて PCR による増幅を行った。

mmp9 fw: 5'-GATGCCCTGATGTATCCCAT-3'

mmp9 rv: 5'-ACTTCACATAACCGACTCGG-3'

PCR 産物は *pCR4* vector (Clontech) にクローニングした。*egfp* プロローブは *pCS2* ベクターに *egfp* を持つ *pCS2-egfp* から合成した。

抗体染色

Whole の鱗を 4% PFA に浸し、室温 1 時間固定し、0.1% Triton-X 100 / PBS (PBTx) で洗浄後、MeOH に置換してから、-30°C で 3 時間以上保存した。Blocking buffer (5% serum、0.2% BSA / PBTx) に置換し、室温 2 時間おいた。Blocking buffer で希釈した一次抗体に置換し、室温で 2 時間もしくは、4°C で一晩おいた。

用いた一次抗体は次の通りである。

- 1/100 マウス由来 Zns5 抗体 (Zebrafish International Resource Center)
- 20 ng/ml ウサギ由来抗 Sp7 抗体 (A-13、Santa Cruz Biotechnology)
- 100 ng/ml マウス由来抗 Runx2 抗体 (27-K、Santa Cruz Biotechnology)
- 1/1000 ラット由来抗 EGFP 抗体 (Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)

PBTx で一次抗体を 15 分ずつ 8 回洗い流し、Blocking buffer で希釈した、蛍光標識された二次抗体と核染色剤で置換し、室温で 2 時間もしくは、4°C で一晩おいた。

用いた二次抗体と核染色剤は次の通りである。

- 1/1000 Alexa488 標識抗マウス抗体 (Invitrogen)
- 1/1000 Alexa568 標識抗マウス抗体 (Invitrogen)
- 1/1000 Alexa405 標識抗ウサギ抗体 (Life technologies)
- 1/1000 Alexa488 標識抗ラット抗体 (Invitrogen)
- 0.1 µg/ml 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI、Invitrogen)
- 1 µg/ml TO-PRO-3 (Invitrogen)

PBTx で 15 分ずつ 8 回洗い流し、2.5 mg/ml DABCO を含んだ 80% glycerol に室温で 1 時間かけ置換して、スライドガラスとカバーガラスで鱗を押さえて、波打たないようにした。それを共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000、Olympus もしくは LSM 780、Carl Zeiss) の 20-60 倍の対物レンズで観察した。

切片における抗体染色は次の通りである。鱗もしくは胚を 4% PFA に浸し、室温 1 時間固定し、0.1% Triton-X 100 / PBS (PBTx) で洗浄後、MeOH に置換してから、-30°C で 3 時間以上保存した。20% スクロース / PBS に置換し、室温で 1 時間または 4°C で一晩静置した後、Tissue-Tek compound (Sakura Finetek、Torrance、CA、USA) に包埋し、-30°C で保存した。凍結したサンプルは、クリオスタットで 16 µm でスライスした。dH₂O で 10 分洗浄し、Tissue-Tek compound を除いた。Blocking buffer で希釈した一次抗体をスライドガラス上に添加し、それが乾かないように濡れたキムタオルと一緒に湿箱に入れ、室温で 2 時間もしくは、4°C で一晩おいた。PBTx で抗体を 10 分ずつ 3 回洗い流し、上記の Blocking buffer で希釈した蛍光標識された二次抗体 と核染色剤をスライドガラス上に添加し、湿箱の中で室温で 2 時間もしくは、4°C で一晩おいた。PBTx で抗体を 10 分ずつ 3 回洗い流し、2.5 mg/ml DABCO を含んだ 80% glycerol に室温で 1 時間かけ置換して、スライドガラスとカバーガラスでマウントした。それを共焦点レーザー

一顕微鏡 (FV-1000、Olympus もしくは LSM 780, Carl Zeiss) の 20-60 倍の対物レンズで観察した。

TRAP 染色

骨を吸収する破骨細胞を標識する TRAP 染色は次の通りに行った。*Tg(mmp9:egfp)*の切断後 2 日目の鰭を 4% PFA に浸し、室温 1 時間固定した。PBTx で 5 分 5 回洗浄後、MeOH に 10 分 6 回置換してから、-30°C で 3 時間以上保存した。TRAP 染色液 に置換し、遮光して室温 1 時間おいた。

TRAP 染色液の組成は以下の通りである。

- 0.2 M 酢酸
- 0.2 M 酢酸ナトリウム
- 0.02% Naphthol As MX phosphatase (Sigma)
- 0.06% Fast Red Violet LB Salt (Sigma) / dH₂O

PBTx で 5 分 5 回洗浄後、2.5 mg/ml DABCO を含んだ 80% glycerol に置換し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000、Olympus) で 20 倍の対物レンズで観察した。

EdU 染色

細胞増殖のマーカーとして、複製中の DNA を Click-iT EdU Imaging Kit (Life Technologies) を用いて標識した。魚を鰭切断後 24-48 時間の 24 時間 28.5°C で、50 μM EdU の egg water に入れ、直後に回収した鰭を 4% PFA に浸し、室温 1 時間固定した。PBTx ですばやく 2 回洗浄後、MeOH に 10 分 6 回置換してから、-30°C で 3 時間以上保存した。PBTx で 5 分 5 回洗浄後、250 μl / 1.5 ml microtube の Reaction cocktail に置換した。

Reaction cocktail

1xClick-iT reaction buffer	860 μl
CuSO ₄	40 μl
Alexa Fluor azide	2.5 μl
1xbuffer additive	100 μl
Total	1 ml

室温 30 分おいてから、PBTx で十分に洗浄した。EdU 反応液で退色した EGFP を Alexa488 によって再度緑色蛍光で観察できるようにし、かつ骨芽細胞と OPC を区別するため Sp7 の抗体染色を行った。2.5 mg/ml DABCO を含んだ 80% glycerol に置換して、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 780, Carl Zeiss) で 40 倍の対物レンズで観察した。

石灰化骨の染色と定量

鰭は鰭を 4% PFA に浸し、室温 1 時間固定し、50% エタノールで室温 30 分置換した後、0.01% Alizarin red (A5533、Sigma-Aldrich)、0.5% 水酸化カリウムに一晩置換した。1.5% 過酸化水素水、1% 水酸化カリウム で室温 20 分漂白した後、80% glycerol に置換して、光学顕微鏡で観察した。

Alizarin Complexone (ALC、Dojin Chemical) の染色 においては、0.005% ALC の egg water に、魚を 12 時間入れ、通常の飼育水で 10 分 3 回洗い流した後、0.002% tricaine の飼育水で麻酔し、実体顕微鏡下 (Leica) で観察した。

再生組織の石灰化した領域の面積の定量に関しては、鰭の画像を実体顕微鏡の明視野の下、明るさや倍率といった条件が変わらないようにした上で撮影し、ImageJ 1.49 を用いて以下のように画像処理した。まず、鰭の切断面より上の組織を polygon selections によって範囲指定し、それ以外の領域を Clear outside で削除した。次に、残った再生組織の領域に対し Threshold color を適用し、Color space を RGB に変更した。これによって Red-Green-Blue の 3 色の閾値を選択できるので、下限は 0 のままで、上限をそれぞれ 190-110-150 にした。実際に選択された領域が、石灰化組織から大きく外れていないことを確認し、Measure を選択して面積を平方 mm で定量した。ピクセルから mm への単位の変換に関しては、同時に撮影しておいた 1 mm の定規をピクセルで長さを測り、Set Scale にあらかじめ登録しておいた。

再生芽移植

再生芽移植は、以前記述された方法に従って行った (Yoshinari et al., 2012; Shibata et al., 2016; Shibata et al., 2017)。この研究では、ドナーとして全身で常に DsRed2 を発現し、OPC で EGFP を発現するダブル *Tg(mmp9:egfp; Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)* を、ホストとして OPC を除去できる *Tg(mmp9:egfp-ntr)* を用いた。

以下、ゼブラフィッシュの麻酔や手術、再生芽の摘出および移植の操作を、ゼブラフィッシュの移植手術をする上で、細胞や組織にダメージが少なくなるよう調整した Niu-Twitty Solution を用いて行った。

Niu-Twitty Solution (pH 7.6)

NaCl	17.4 mM	
KCl	0.21 mM	
MgSO ₄	0.12 mM	
Ca(NO ₃) ₂	0.18 mM	
HEPES	1.5 mM	/dH ₂ O

2 日前にあらかじめ尾鰭を切断しておいたドナーを 0.002% tricaine の Niu-Twitty Solution で麻酔し、尾鰭の再生組織を、切断面に沿って解剖用メスで切り取った。ドナーの再生組織は、組

織や細胞が壁面にくっつかないよう、ガラスのシャーレに移した。直径 30 ゲージの注射針を 2 本用いて、再生芽から傷上皮を引きはがし、単離された再生芽を適切な大きさに切り分けた。ドナーと同様 2 日前にあらかじめ尾鰭を切断しておいたホストを 0.002% tricaine の Niu-Twitty Solution で麻酔した。Injection に用いるマニピュレーターと先端の直径が 20-30 μm のガラスキャピラリーを用いて、ホストの傷上皮に穴をあけつつ、ドナーの再生芽片を押し込んだ。移植細胞がホストの組織に定着した個体を用いて、間葉細胞の追跡実験を行った。

体節移植

体節移植は以前メダカで記述された方法に従って行った (Shimada et al., 2013)。全身で常に DsRed2 を発現し、OPC で EGFP を発現するダブル *Tg(mmp9:egfp; Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)* をドナーとして用い、WT をホストとして用いた。受精した卵は 23 度のインキュベーターに入れ、翌日の日中に移植可能な 15-30 体節ほどのステージなるように調節した。

ドナーの胚をプロナーゼによって卵膜を除去してから、組織や細胞が壁面にくっつかないようガラスシャーレの中で、0.002% tricaine の Niu-Twitty Solution で麻酔した。直径 30 ゲージの注射針を 2 本用いて、卵黄と頭部の表皮をつかんで、体節が傷つかないように剥いだ。体節を含む内部組織を、別のガラスシャーレの 2.5% パンクレアチン溶液に入れ、先端の直径が 10 μm 未満のガラスキャピラリーを用いて、10 分以内に体節を 1 つ 1 つのブロックに分けた。単離した体節を Niu-Twitty Solution に戻し、ホスト胚への移植に使った。

ホスト胚は 0.002% tricaine の Niu-Twitty Solution で麻酔してから、カバーガラス上に移し、周囲の水分を胚がつぶれたり乾いたりしない程度に除いた。一度融解させた 1% 低融点アガロースを 35°C ほどにしてから、ホスト胚に数滴たらし、表面張力でドーム状になるようにした。アガロースが固まる前に、ホスト胚の背側がカバーガラスに接するようにしてから、アガロースが固まるのを待った。別のシャーレの中央に飼育水などを入れずに、ホスト胚の入ったドーム状のアガロースを逆さまにして置いた。これにより、ホスト胚の背側の一部がアガロースの上面から露出する。胚が乾かないよう、0.002% tricaine の Niu-Twitty Solution を数滴たらし、移植操作を行った。Injection に用いるマニピュレーターと先端の直径が 10-20 μm のガラスキャピラリーを用いて、ホスト胚の体節付近の表皮に穴をあけ、体節を取り出した。先端の直径が 20-30 μm のガラスキャピラリーに換えて、ドナーの体節のブロックを押し込んだ。移植細胞がホストの組織に定着した個体を用いて、体節細胞の追跡実験を行った。

定量および統計解析

すべての実験において、同じ親から生まれた魚は、異なる処理をするグループにランダムに振り分けた。動物が実験の途中で死なない限りは、解析から除外しなかった。全ての実験において、適切な数のサンプルを使って少なくとも 2 回同じ実験を行った。サンプルサイズは、以前の文献や

実験のタイプに基づいて選び、その数を図の説明で示している。発現パターンに対しては、少なくとも 6 匹使って検証した。統計解析は、Microsoft Excel 2013 を用いて行った。すべての統計は mean \pm standard error of the mean (SEM) で示し、Student's *t*-tests (two-tailed) を適用し、正規性と等分散であることを確認した。また、サンプルサイズ、統計テストおよび P 値は図の中か、図の説明に示してある。P 値が 0.05 以上のとき、有意差なし、すなわち Not Significant (N.S.) とした。

第 5 章 参考文献

- Aboobaker, A.A. (2011). Planarian stem cells: A simple paradigm for regeneration. *Trends Cell Biol.* 21, 304–311.
- Akimenko, M. A., Johnson, S. L., Westerfield, M., and Ekker, M. (1995). Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development* 121, 347–357.
- Aubin, J. E. (2008). Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In *Principles of Bone Biology*, Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., and Martin, T. J., eds. (Cambridge: Academic Press), pp. 85–107.
- Bai, S., Thummel, R., Godwin, A.R., Nagase, H., Itoh, Y., Li, L., Evans, R., McDermott, J., Seiki, M., and Sarras, M.P. (2005). Matrix metalloproteinase expression and function during fin regeneration in zebrafish: Analysis of MT1-MMP, MMP2 and TIMP2. *Matrix Biol.* 24, 247–260.
- Bianco, P., and Robey, P.G. (2015). Skeletal stem cells. *Development* 142, 1023–1027.
- Bosch, T.C.G. (2007). Why polyps regenerate and we don't: Towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Dev. Biol.* 303, 421–433.
- Brockes, J.P., and Kumar, A. (2005). Appendage Regeneration in Adult Vertebrates and Implications for Regenerative Medicine. *Science* 310, 1919–1923.
- Brockes, J.P., and Kumar, A. (2003). Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Growth, Form Comput.* 3, 92–106.
- Bussmann, J., and Schulte-Merker, S. (2011). Rapid BAC selection for *tol2*-mediated transgenesis in zebrafish. *Development* 138, 4327–4332.
- Chan, C.K.F., Seo, E.Y., Chen, J.Y., Lo, D., McArdle, A., Sinha, R., Tevlin, R., Seita, J., Vincent-Tompkins, J., Wearda, T., et al. (2015). Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell* 160, 285–298.
- Colnot, C., Thompson, Z., Miclau, T., Werb, Z., and Helms, J. a (2003). Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 130, 4123–4133.
- Dallas, S. L., Prideaux, M., and Bonewald, L. F. (2013), The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. *Endocr. Rev.* 34, 658–690.
- Grohmann, M., Paulmann, N., Fleischhauer, S., Vowinkel, J., Priller, J., and Walther, D. J. (2009). A mammalianized synthetic nitroreductase gene for high-level expression. *BMC Cancer* 9, 301.
- Gross, J., and Lapiere, C.M. (1962). Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: a Tissue Culture Assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48, 1014–1022.

- Hall, B. K. (2015a). Skeletal Origins: Neural Crest Cells. In *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology* (Cambridge: Academic Press), pp. 281–298.
- Hall, B. K. (2015b). Skeletal Origins: Somitic Mesoderm, Vertebrae, Pectoral and Pelvic Girdles. In *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology* (Cambridge: Academic Press), pp. 261–279.
- Hans, S., Freudenreich, D., Geffarth, M., Kaslin, J., Machate, A., and Brand, M. (2011). Generation of a non-leaky heat shock-inducible Cre line for conditional Cre/lox strategies in zebrafish. *Dev. Dyn.* *240*, 108–115.
- Hattori, N., Mochizuki, S., Kishi, K., Nakajima, T., Takaishi, H., D'Armiento, J., and Okada, Y. (2009). MMP-13 Plays a Role in Keratinocyte Migration, Angiogenesis, and Contraction in Mouse Skin Wound Healing. *Am. J. Pathol.* *175*, 533–546.
- Imokawa, Y., Simon, A., and Brockes, J.P. (2004). A critical role for thrombin in vertebrate lens regeneration. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *359*, 765–776.
- Johnson, S.L., and Weston, J.A. (1995). Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in zebrafish fin regeneration. *Genetics* *141*, 1583–1595.
- Kassem, M., and Bianco, P. (2015). Skeletal stem cells in space and time. *Cell* *160*, 17–19.
- Kawakami, A., Fukazawa, T., and Takeda, H. (2004). Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. *Dev. Dyn.* *231*, 693–699.
- Kawakami, A. (2010) Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Develop. Growth Differ.* *52*, 77–87.
- Knopf, F., Hammond C., Chekuru, A., Kurth, T., Hans, S., Weber, C. W., Mahatma, G., Fisher, S., Brand, M., Schulte-Merker, S., et al. (2011). Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Dev. Cell* *20*, 713–724.
- Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., and Tanaka, E.M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* *460*, 60–65.
- LeBert, D.C., Squirrell, J.M., Rindy, J., Broadbridge, E., Lui, Y., Zakrzewska, A., Eliceiri, K.W., Meijer, A.H., and Huttenlocher, A. (2015). Matrix metalloproteinase 9 modulates collagen matrices and wound repair. *Development* *142*, 2136–2146.
- Lewis, N.E., and Rossant, J. (1982). Mechanism of size regulation in mouse embryo aggregates. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *72*, 169–181.
- Li, N., Felber, K., Elks, P., Croucher, P., and Roehl, H.H. (2009). Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation. *Dev. Dyn.* *238*, 459–466.

- Mathew, L.K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E.A., Löhr, C. V., Loynes, C.A., Renshaw, S.A., Peterson, R.T., and Tanguay, R.L. (2007). Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *J. Biol. Chem.* 282, 35202–35210.
- Matic, I. Matthews, B. G., Wang, X., Dymont, N. A., Worthley, D. L., Rowe, D. W., Grcevic, D., and Kalajzic, I. (2016). Quiescent bone lining cells are a major source of osteoblasts during adulthood. *Stem Cells* 34, 2930–2942.
- Narayanan, K., and Chen, Q. (2011). Bacterial artificial chromosome mutagenesis using recombineering. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 971296.
- Owen, M., and Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 136, 42–60.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 221–233.
- Pisharath, H., Rhee J. M., Swanson, M. A., Leach, S. D., Parsons, M. J. (2007) Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using E. coli nitroreductase. *Mech. Dev.* 124, 218–229.
- Poss, K. D. (2010). Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat. Rev. Genet.* 11, 710–722.
- Raya, A., Consiglio, A., Kawakami, Y., Rodriguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J.C., Raya, Á., Consiglio, A., Kawakami, Y., Rodriguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J.C., et al. (2004). The zebrafish as a model of heart regeneration. *Cloning Stem Cells* 6, 345–351.
- Renn, J., and Winkler, C. (2009). Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. *Dev. Dyn.* 238, 241–248.
- Sharif, F., de Bakker, M. A. G., and Richardson, M. K. (2014). Osteoclast-like cells in early zebrafish embryos. *Cell J.* 16, 211–224.
- Shibata, E., Ando, K., and Kawakami, A. (2017). Transplantation of mesenchymal cells including the blastema in regenerating zebrafish fin. *Bio-protocol* 7, e2109.
- Shibata, E., Yokota, Y., Horita, N., Kudo, A., Abe, G., Kawakami, K., and Kawakami, A. (2016). Fgf signalling controls diverse aspects of fin regeneration. *Development* 143, 2920–2929.
- Shimada, A., Kawanishi, T., Kaneko, T., Yoshihara, H., Yano, T., Inohaya, K., Kinoshita, M., Kamei, Y., Tamura, K., and Takeda, H. (2013). Trunk exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nat. Commun.* 4, 1639.
- Singh, S. P., Holdway, J. E., and Poss, K. D. (2012). Regeneration of amputated zebrafish fin rays from de novo osteoblasts. *Dev. Cell* 22, 879–886.

- Sousa, S., Afonso, N., Bensimon-Brito, A., Fonseca, M., Simões, M., Leon, J., Roehl, H., Cancela, M. L., and Jacinto, A. (2011). Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development* 138, 3897–3905.
- Stewart, S., and Stankunas, K. (2012). Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. *Dev. Biol.* 365, 339–349.
- Sternlicht, M., and Werb, Z. (2001). How Matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu REv Cell Biol* 463–516.
- Suster, M. L., Abe, G., Schouw, A., and Kawakami, K. (2011). Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. *Nat. Protoc.* 6, 1998–2021.
- Takeyama, K., Chatani, M., Takano, Y., and Kudo, A. (2014). In-vivo imaging of the fracture healing in medaka revealed two types of osteoclasts before and after the callus formation by osteoblasts. *Dev. Biol.* 394, 292–304.
- Tanaka, E.M., and Reddien, P.W. (2011). The Cellular Basis for Animal Regeneration. *Dev. Cell* 21, 172–185.
- Tanaka, E.M., Gann, A.A.F., Gates, P.B., and Brockes, J.P. (1997). Newt myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J. Cell Biol.* 136, 155–165.
- Tu, S., and Johnson, S.L. (2011). Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Dev. Cell* 20, 725–732.
- Vinarsky, V., Atkinson, D.L., Stevenson, T.J., Keating, M.T., and Odelberg, S.J. (2005). Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function. *Dev. Biol.* 279, 86–98.
- Wehner, D., and Weidinger, G. (2015). Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin. *Trends Genet.* 31, 336–343.
- Worthley, D.L., Churchill, M., Compton, J.T., Taylor, Y., Rao, M., Si, Y., Levin, D., Schwartz, M.G., Uygur, A., Hayakawa, Y., et al. (2015). Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell* 160, 269–284.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.
- Yoshinari, N., and Kawakami, A. (2011). Mature and juvenile tissue models of regeneration in small fish species. *Biol. Bull.* 221, 62–78.
- Yoshinari, N., Ando, K., Kudo, A., Kinoshita, M., and Kawakami, A. (2012). Colored medaka and zebrafish: Transgenics with ubiquitous and strong transgene expression driven by the medaka β -actin promoter. *Dev. Growth Differ.* 54, 818–828.
- Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A., and Kawakami, A. (2009). Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Dev. Biol.* 325, 71–81.

- Yue, Zhou, Shimada, Zhao, and Morrison (2016). Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell* 18, 1.
- Zimmerman, J.L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5, 1411–1423.

第 6 章 謝辞

ToI2 BAC システムを提供して頂きました国立遺伝学研究所の川上浩一先生に感謝します。体節移植の詳細なプロトコールを提供して下さった東京大学の島田敦子先生と武田洋幸先生に感謝します。細胞除去法に関するサジェスチョンおよびディスカッションして下さった Johns Hopkins Medicine の Micheal John Parsons 先生に感謝します。

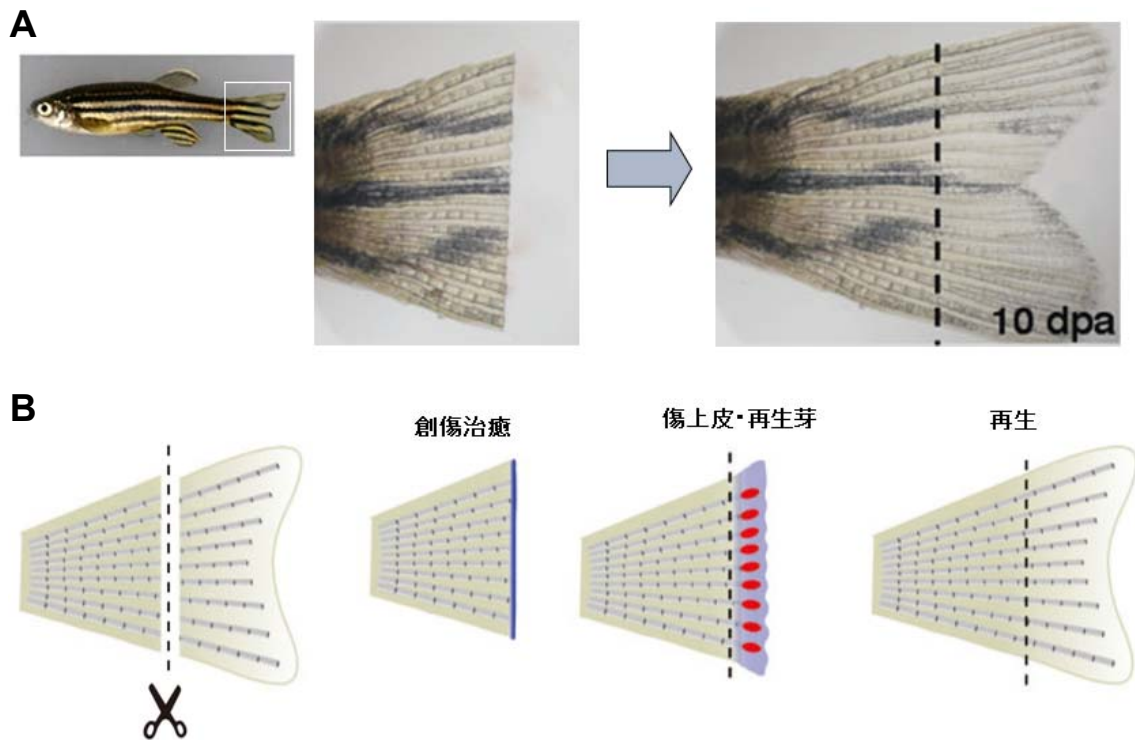
Cre-*loxP* システムを提供して下さった、原著論文の共同研究者でもある DFG-Center for Regenerative Therapies Dresden の Stefan Hans 先生と Micheal Brand 先生、さらにそのシステムを共に川上研究室において効率化した柴田恵里さんに感謝します。

有意義なディスカッションをして下さった昭和大学の茶谷昌宏先生、東京工業大学の猪早敬二先生と工藤明先生に感謝します。国際的・学際的な交流と勉強の機会の提供に加え経済的援助をして下さった情報生命博士教育院の皆様に感謝します。同じ研究室で切磋琢磨して下さった工藤川上研究室の皆様に感謝します。

あらゆる側面から研究生活をサポートして下さった指導教員の川上厚志先生に感謝します。

図表

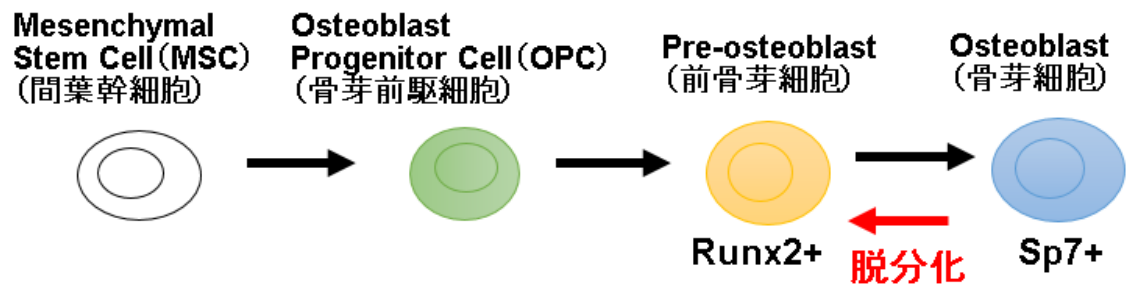
Figure 1. ゼブラフィッシュの尾鱗の再生



(A) ゼブラフィッシュと尾鱗の再生。ゼブラフィッシュ (左) の鱗はその半分が失われても (中央)、切断後 10 日でほぼ完全に元の大きさと機能を回復する (右)。点線: 鱗切断箇所。dpa: days post amputation.

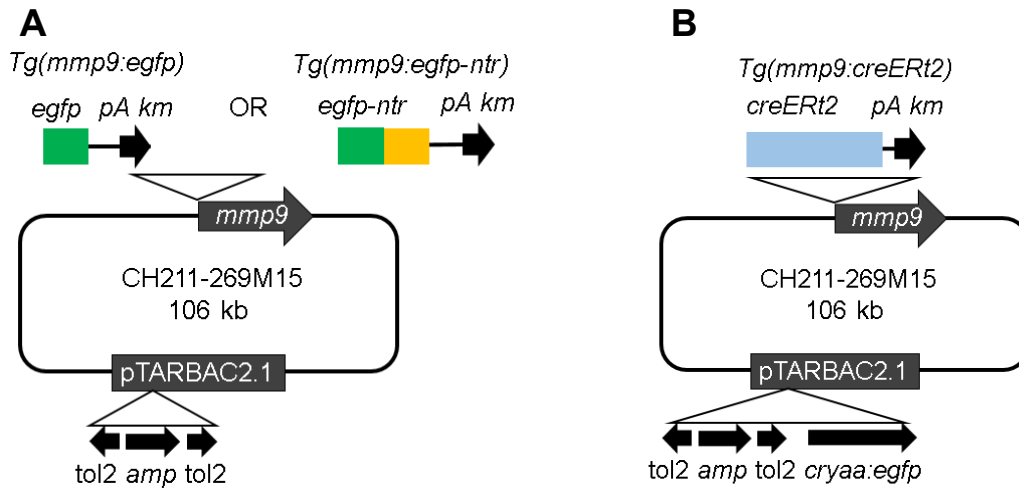
(B) 再生過程の模式図。切断後すぐに、表皮の創傷治癒が起こり、続く切断後 2 日目に傷上皮とその内側に再生芽 (赤) が形成され、その後、それらの再生組織が細胞増殖と形態形成することによって新たな鱗が作られる。鱗の構造は、鱗条という放射状に並んだ骨 (灰色) によって支えられている。点線: 鱗切断箇所。

Figure 2. 骨芽細胞の分化経路



骨芽細胞の分化経路の模式図。哺乳類の培養系の研究から、骨芽細胞は MSC から OPC と前骨芽細胞を経て分化するとされている。しかし、生体での分化経路についてはまだよくわかっていない。ゼブラフィッシュの鰭の再生における骨芽細胞は、脱分化した骨芽細胞が増殖して、再生組織に骨芽細胞を供給することが示されている。

Figure 3. BAC を用いたトランスジェニックゼブラフィッシュの作製

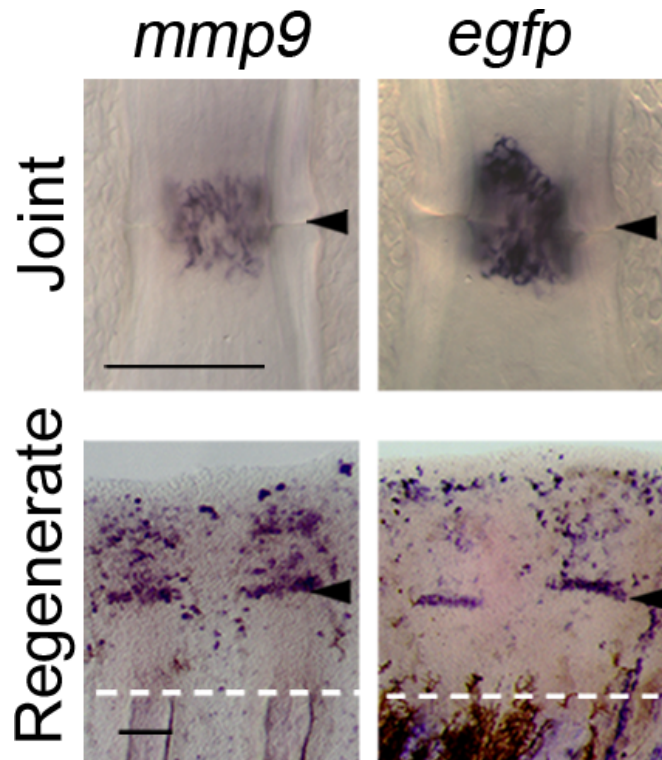


(A) *Tg(mmp9:egfp)* および *Tg(mmp9:egfp-ntr)* の作製に用いた BAC コンストラクトの模式図。*mmp9* 遺伝子の前後 100kb を超えるゲノム DNA を保持する BAC クローン [CH211-269M15, BACPAC resources (Oakland, CA, USA)] の *mmp9* 遺伝子の翻訳開始点に、*egfp* もしくは *egfp-ntr* 遺伝子を挿入し、BAC ベクターの中にトランスジェネシスの効率を上げるための *tol2* カセットを挿入した。

(B) *Tg(mmp9:creERT2)* の作製に用いた BAC コンストラクトの模式図。*mmp9* 遺伝子の翻訳開始点に、*creERT2* 遺伝子を挿入し、スクリーニングがしやすいように *crystalline alpha A:egfp* (*cryaa:egfp*) を持つ *tol2* カセットを挿入した。

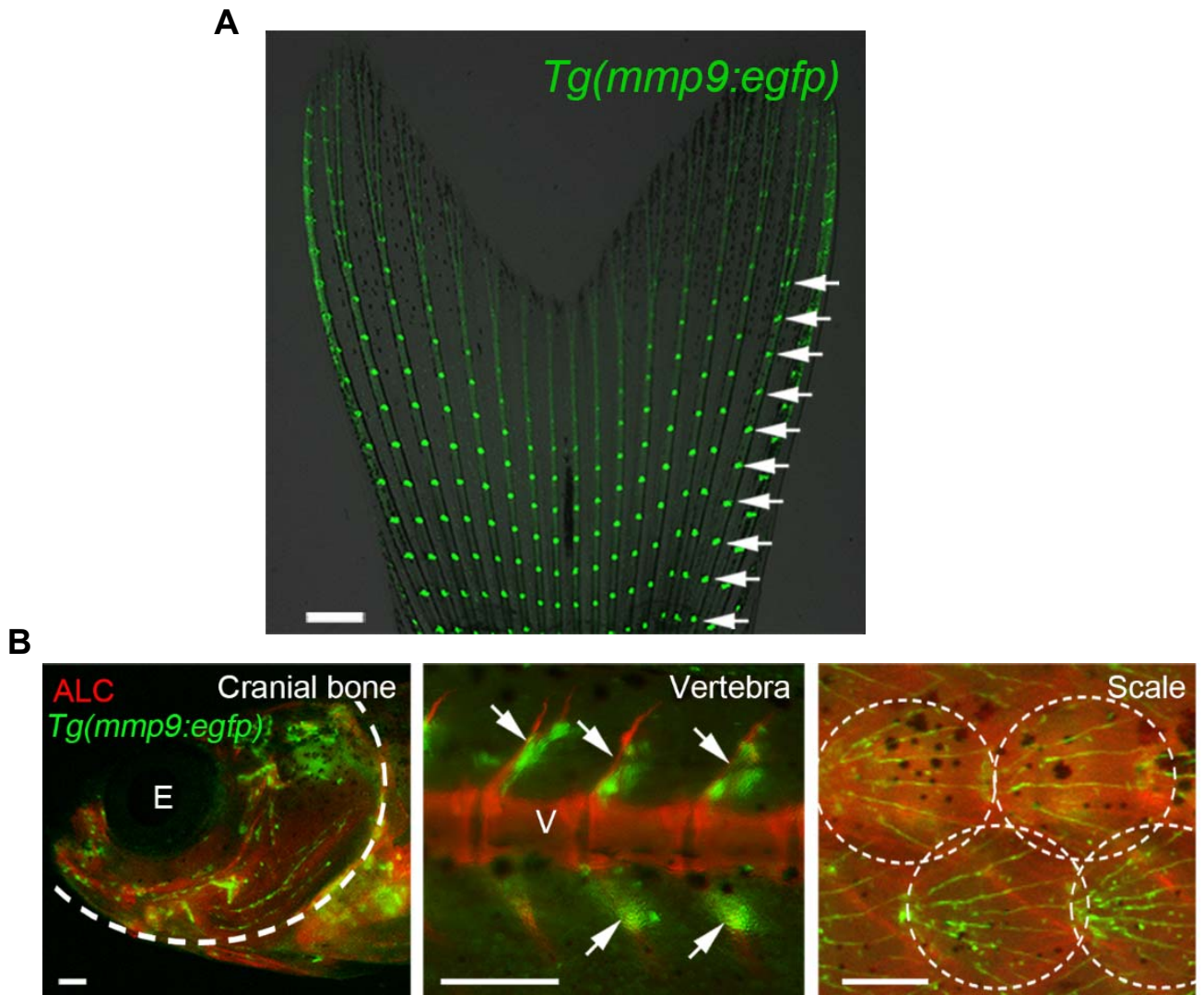
pA:SV40 由来のポリアデニル化シグナル配列。km:カナマイシン耐性遺伝子。amp:アンピシリン遺伝子。

Figure 4. *Tg(mmp9:egfp)*は内在性の *mmp9* の発現を再現する



Tg(mmp9:egfp) の尾鰭の非再生組織と切断後 2 日目の再生組織における *mmp9* と *egfp* の ISH の実体顕微鏡像。*mmp9* の発現が非再生組織のジョイントに局在し、再生組織では新しく形成されるジョイントに帯状に局在し、かつ先端部において散在するパターンを示す。*egfp* の発現もほとんど同じであることから、*Tg* は内在性の *mmp9* の発現を再現していることが示される。矢頭：非再生組織および再生組織におけるジョイント。スケールバー：100 μm 。点線：切断部分。

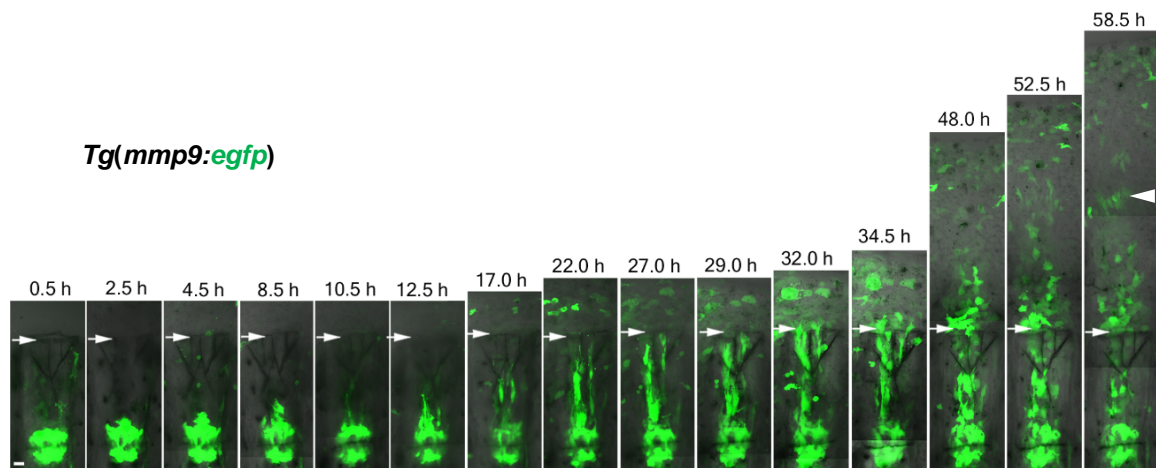
Figure 5. 石灰化組織における *mmp9(+)*細胞の局在



(A) *Tg(mmp9:egfp)* の尾鰭における EGFP の発現。EGFP の蛍光は非再生時の鰭における鰭条のジョイント (矢印) に局在していた。スケールバー:500 μm 。

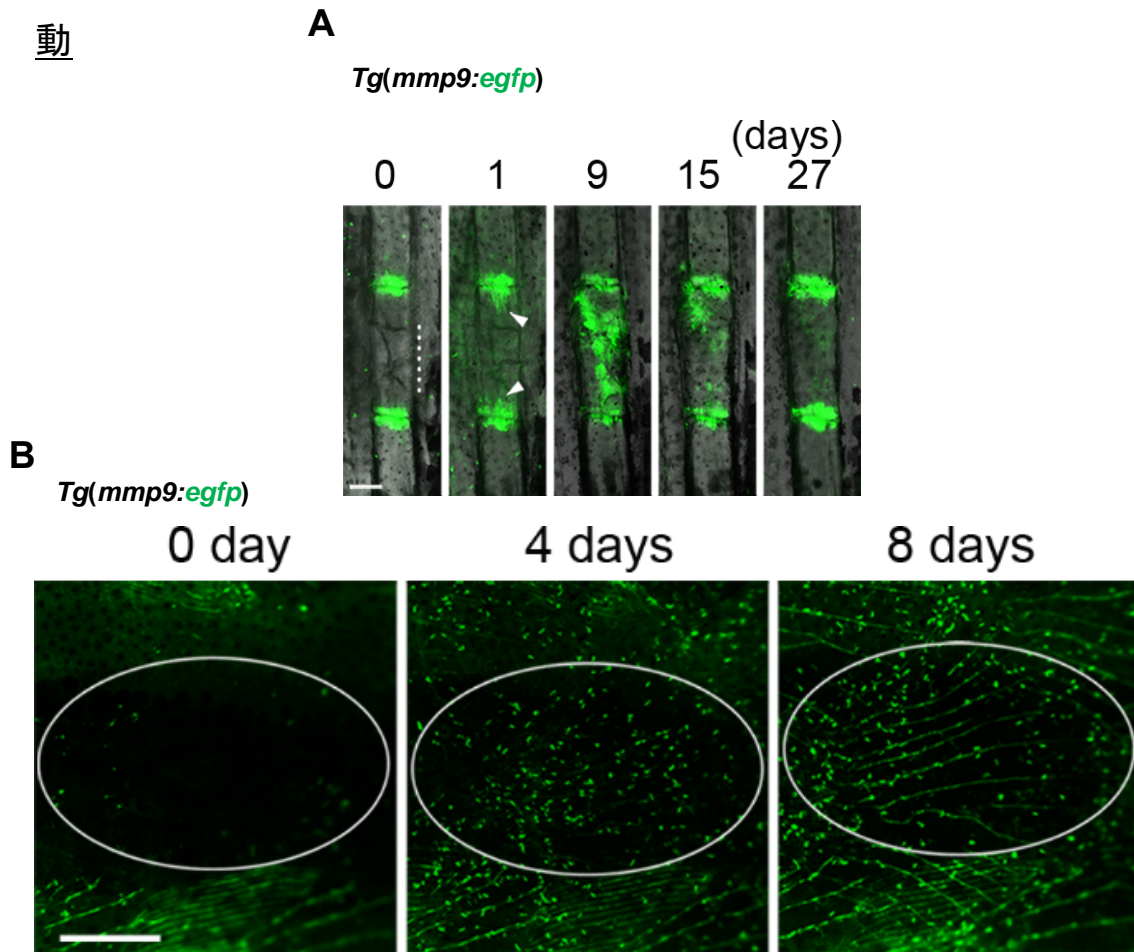
(B) *Tg(mmp9:egfp)* における全身の石灰化組織の Alizarin Complexone (ALC) 染色。EGFP(+)細胞は頭蓋骨の隙間 (左図、点線) や、脊椎骨の前側から上下に伸びる骨である脊椎棘 (中央図、矢印)、体表を覆うウロコ (右図、点線) の放射状に延びる溝に局在していた。E:眼、V:脊椎骨。スケールバー:200 μm 。

Figure 6. *mmp9(+)* ジョイント細胞の変化



Tg(mmp9:egfp) の鰭の再生時におけるジョイントの EGFP(+) (*mmp9(+)*) 細胞の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片の経時観察。切断面に最も近い鰭条のジョイントの EGFP(+) (*mmp9(+)*) 細胞が、切断後 2.5 時間で再生組織に向かって移動を開始し、切断後 27 時間で切断面に到達し、切断後 58.5 時間で鰭条の形成領域とジョイントの細胞 (矢頭) になる様子が観察された。スケールバー: 10 μm 。矢印: 鰭切断箇所。

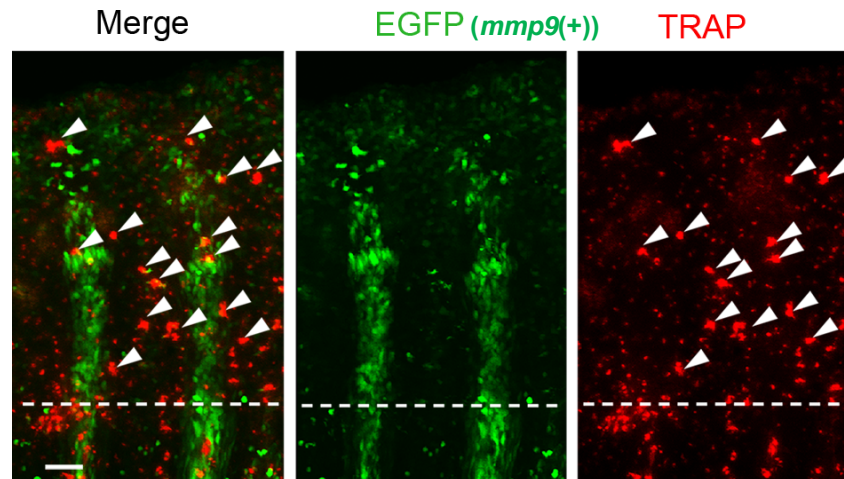
Figure 7. 骨折修復時およびウロコ再生時における *mmp9(+)*細胞の移動



(A) *Tg(mmp9:egfp)* における骨折箇所への EGFP(+)(*mmp9(+)*) 細胞の凝集。再生鰭におけるのと同様に、ジョイントに局在する *mmp9(+)*細胞が現れ、基部側と先端側のジョイント (矢頭) から骨折部 (点線) へと移動して覆った。骨折修復後、ジョイント間の EGFP(+)(*mmp9(+)*) 細胞は消失した。スケールバー、100 μm 。

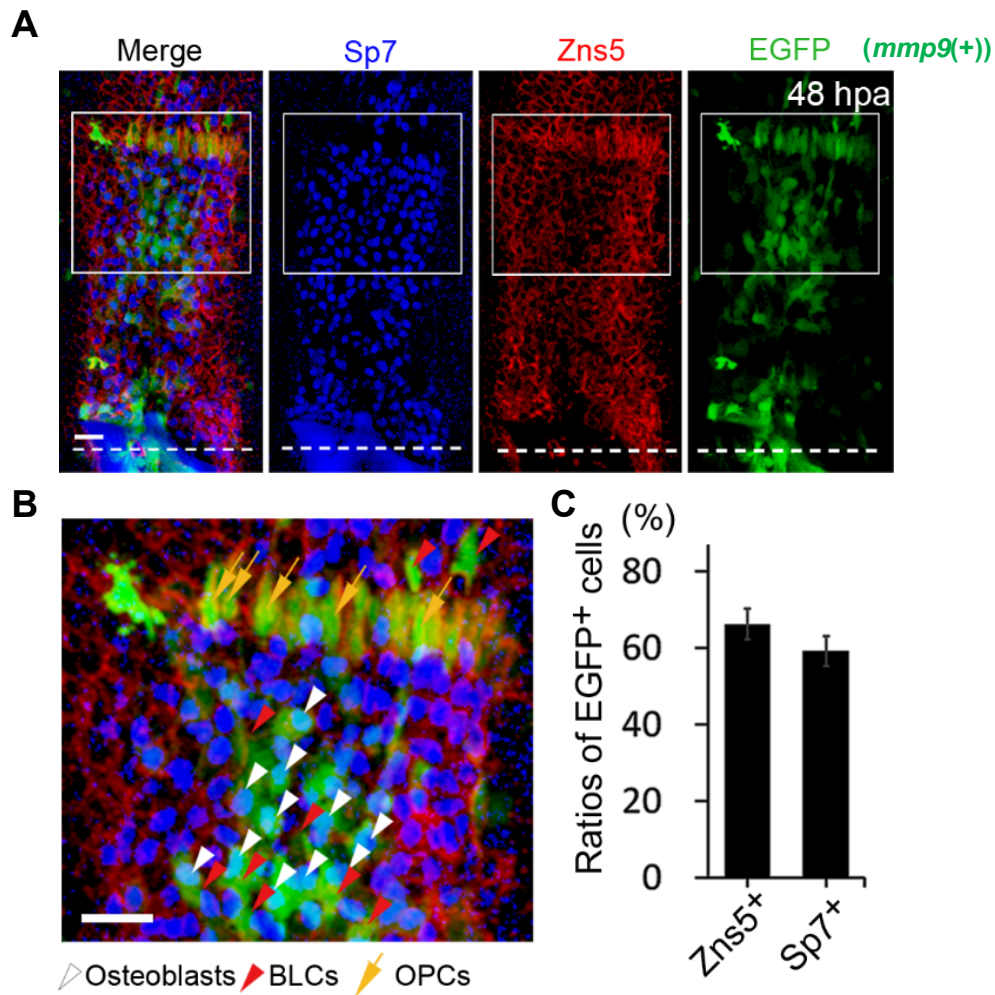
(B) *Tg(mmp9:egfp)* におけるウロコの再生時における EGFP(+)(*mmp9(+)*) 細胞の移動。胴部側面から 10 枚程度のウロコを取り除いた後 (左)、EGFP(+)(*mmp9(+)*) 細胞が 4 日で、ウロコの形成予定領域 (円) に多数現れ (中央)、8 日で再形成されたウロコの細胞に寄与した (右)。スケールバー: 200 μm 。

Figure 8. 再生時における *mmp9*(+)細胞は破骨細胞ではない



Tg(mmp9:egfp) の鰭の再生組織における酒石酸抵抗性ホスファターゼ (TRAP) 染色による破骨細胞の標識。EGFP(+) (*mmp9*(+)) 細胞は TRAP 陽性の破骨細胞 (矢頭) とほとんど一致しなかったことから、再生時の EGFP(+) (*mmp9*(+)) 細胞は破骨細胞ではないことが示唆される。スケールバー: 100 μ m。点線: 鰭切断箇所。

Figure 9. 再生組織における *mmp9*(+)細胞の骨芽細胞への分化

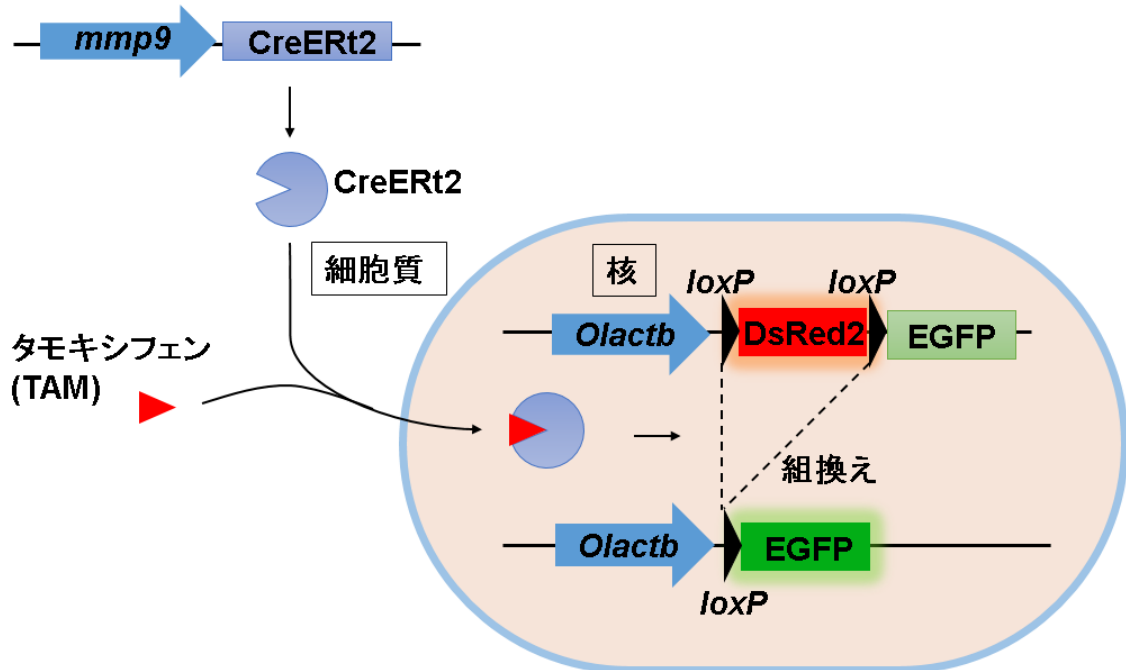


(A) *Tg(mmp9:egfp)* の切断後 2 日目における Sp7 および Zns5 の抗体染色の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片。Cre ラベルした細胞系譜解析でも示したように (Figures 2A-2C)、再生組織中の多くの EGFP(+)細胞が Sp7 または Zns5 陽性であり、*mmp9*(+)細胞は再生組織の骨芽細胞に分化していると考えられる。スケールバー: 10 μ m。点線: 鱗切断面所。

(B) (A) の四角で囲った領域の拡大像。EGFP(+)細胞は Sp7 陽性の骨芽細胞 (白矢頭)、Sp7 陰性の BLCs (赤矢頭)、および再生するジョイントの Sp7 陰性の OPC (黄矢印) を含んでいた。スケールバー: 10 μ m。

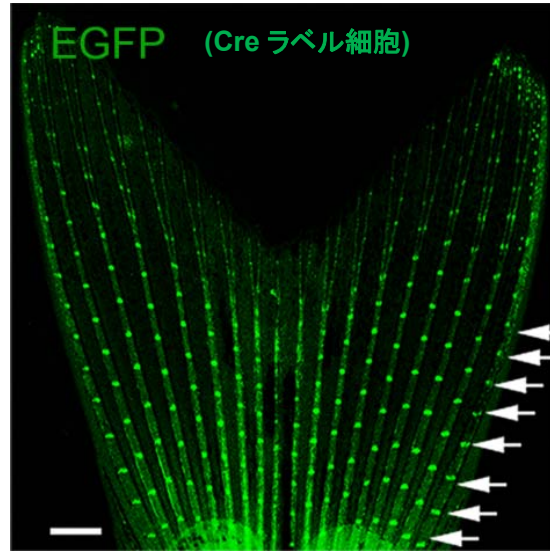
(C) (A) の Zns5 陽性、もしくは Sp7 陽性細胞全体における EGFP(+)細胞の割合。共焦点レーザー顕微鏡による光学切片は z-stacks として撮影し、個別の細胞と染色は前後の光学切片を見ながら判別した。約 60% の Zns5 陽性、もしくは Sp7 陽性細胞は *mmp9*(+)ジョイント細胞に由来すると思われる。棒グラフは mean \pm SEM を示している。n = 20 鱗条 (合計 4 匹)。

Figure 10. Cre-loxPを使った細胞系譜解析



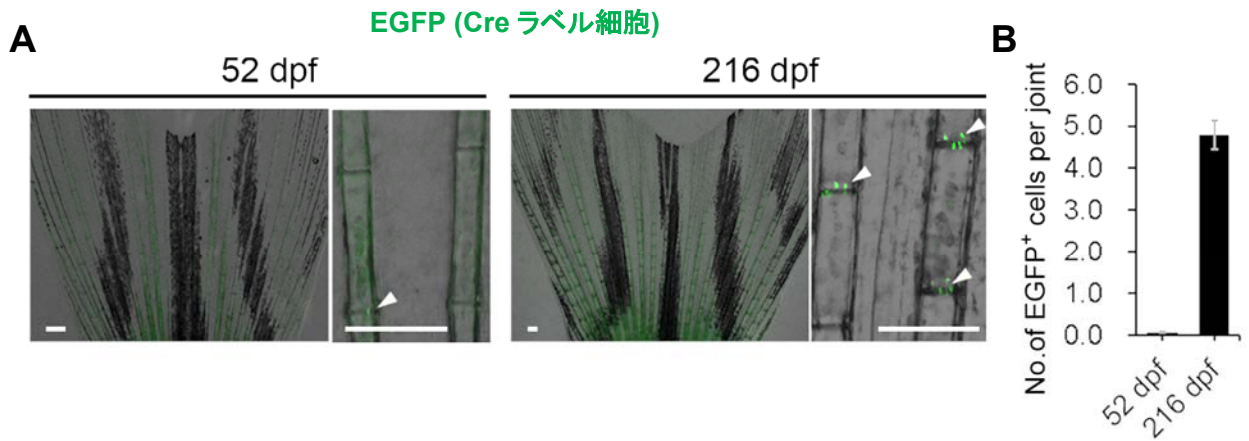
Cre-loxP による *mmp9*(+)細胞の標識についての模式図。組換え酵素 Cre は、*loxP* という特定の配列を認識して、その配列によって挟まれた領域を除くことができる。CreERT2 は、変異型 ER ドメインを持ち、低分子化合物である TAM に高親和性で応答して活性化する。*Tg(mmp9:creERT2; Oactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)*において TAM を処理すると、*mmp9*(+)細胞においてのみ *loxP* 配列で挟まれた *DsRed2* が除かれ、EGFP が発現する (Yoshinari, 2012)。したがって、任意の時点における *mmp9*(+)細胞とその子孫を長期的に追跡できる。*Oactb*: 全身性の発現を誘導できるメダカ由来の β アクチンプロモーター。

Figure 11. Cre-loxPによるジョイントの細胞の標識



Cre-loxP を用いた *mmp9*(+)細胞の標識。 *Tg(mmp9:CreERT2; Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)* を 5 μ M の TAM で 12 時間処理したあと洗い流し、TAM 処理開始から 3 日の時点で、鰭条のジョイントにおいて安定した EGFP の発現が観察された (矢印)。スケールバー: 500 μ m。

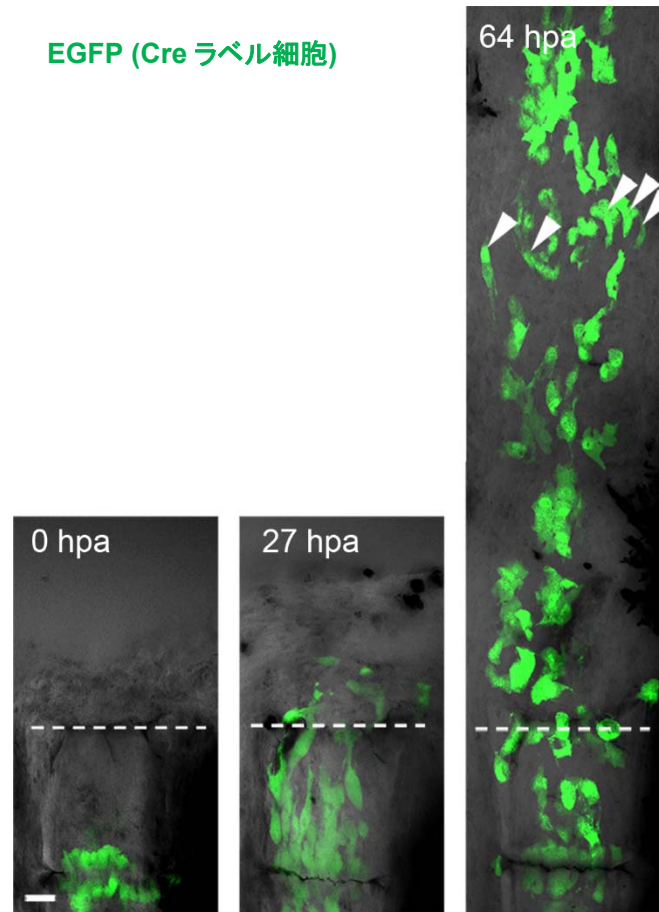
Figure 12. TAM 非依存的な Cre-loxP 組換え



(A) TAM 非依存的な Cre 組換えによる EGFP の発現。成長過程の 52 dpf で、鰭条のジョイントにごくわずかに EGFP が検出され始め (左、矢頭)、7 か月齢を超えた個体では、鰭条のジョイントに少しの Cre ラベル細胞が観察されが (右、矢頭)、ジョイント以外における骨芽細胞や BLC は全く観察されなかった。

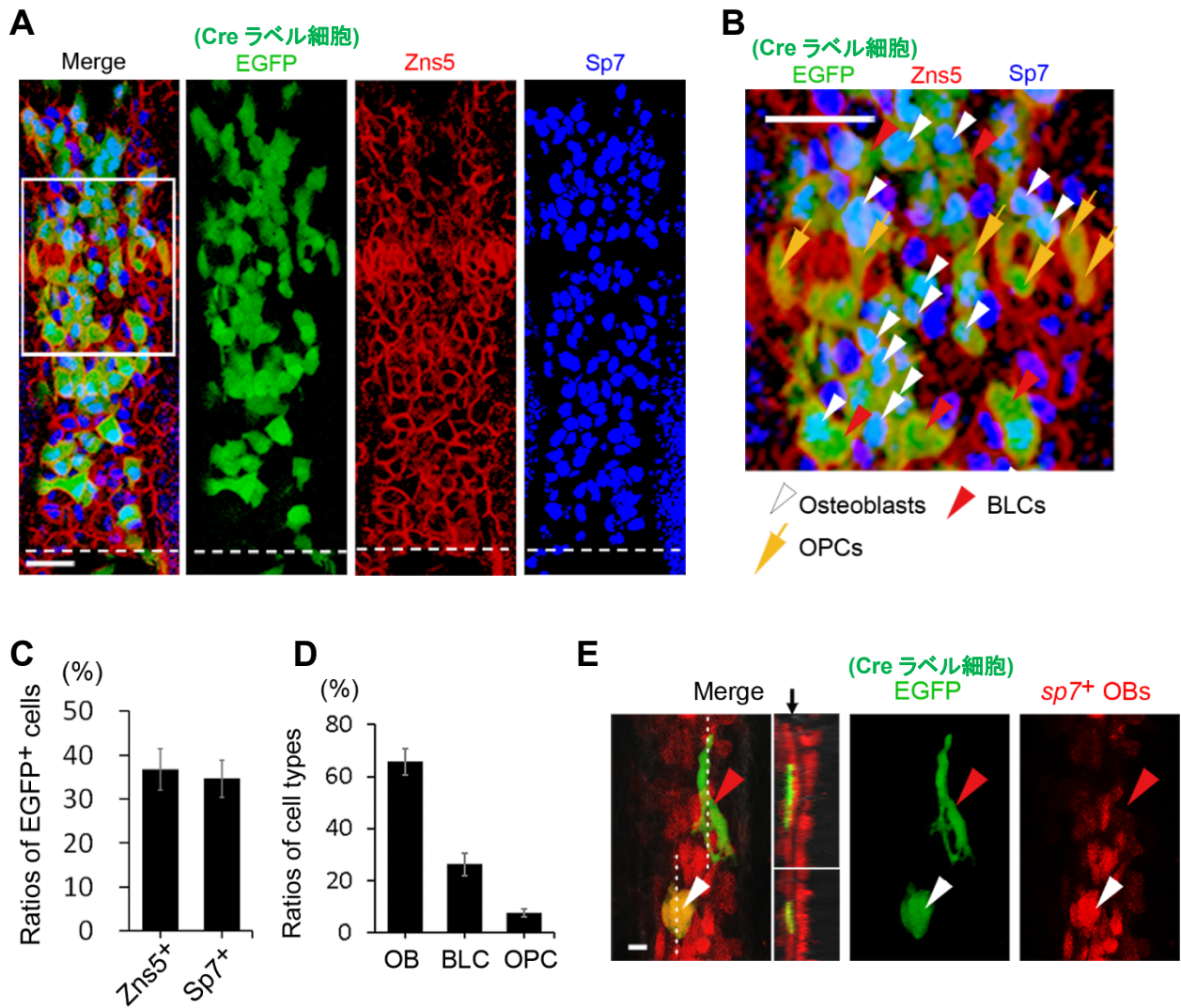
(B) (A) の Cre ラベル細胞の定量。52 dpf では、ジョイント当たり 0.06 細胞 (n = 1134 ジョイント、計 6 匹) で、216 dpf では 4.8 細胞観察された (n = 69 ジョイント、計 7 匹)。しかし、TAM を処理しときに標識される細胞に比べずっと少ないため、細胞系譜解析に影響しないと考えられる。スケールバー: 200 μ m。dpf: days post fertilization。棒グラフは mean \pm SEM で示した。

Figure 13. Cre ラベルされたジョイント細胞の再生組織への移動



Cre によって標識されたジョイントの細胞の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片の経時観察。標識された細胞は、*Tg(mmp9:egfp)* と同様に、切断面に最も近いジョイントから移動して、切断後 27 時間で切断面に到達し、その後新たに形成されたジョイントを含む再生組織に寄与した。スケールバー: 10 μm 。点線: 鰭切断箇所。

Figure 14. ジョイント細胞は再生組織の骨芽細胞と新たなジョイント細胞になる



(A) Cre によって標識されたジョイント細胞に由来する再生細胞の Zns5 と Sp7 による抗体染色の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片。切断後 2 日目において、ジョイント細胞に由来する細胞の多くは、Zns5 と Sp7 両方陽性の骨芽細胞になっていることがわかる。スケールバー: 20 μ m。点線: 鱗切断箇所。

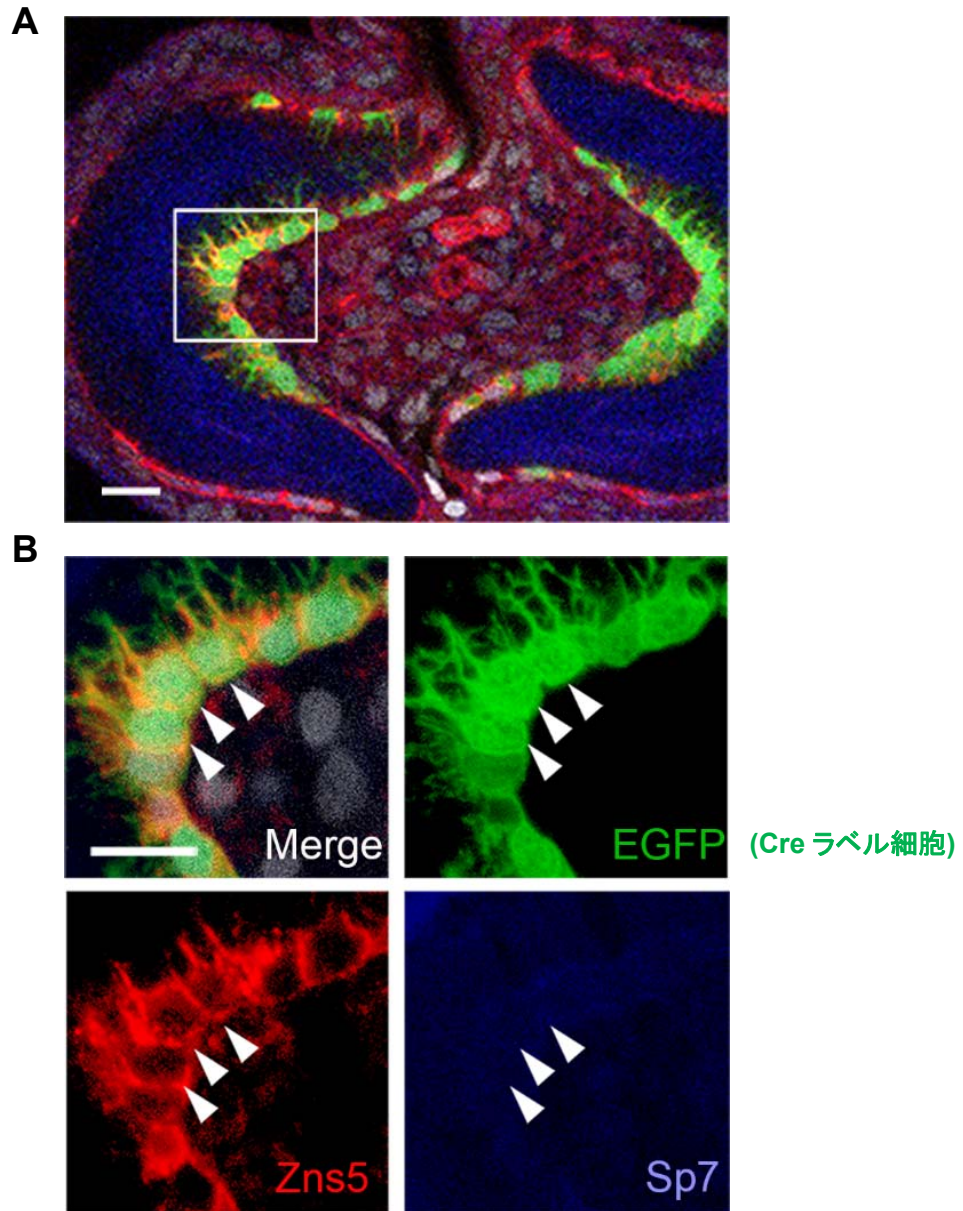
(B) (A) の四角の拡大図。ジョイントに由来する Cre ラベル細胞の多くは、Zns5 と Sp7 両方陽性の骨芽細胞 (白矢頭) になるが、BLC (赤矢頭) や OPC (黄矢印) にもなる。スケールバー: 20 μ m。

(C) (A) における全体の骨芽細胞に対する EGFP(+)細胞の割合。Zns5、Sp7 ともに再生組織全体の 40%近い細胞がジョイントの細胞に由来することがわかった。n = 20 鰭条 (計 5 匹)。棒グラフは mean ± SEM で示した。

(D) (A) においてジョイント細胞に由来する細胞全体に対する骨芽細胞 (OB)、BLC および OPC の割合。60%以上が骨芽細胞になっているが、少なくない割合で、BLC や OPC という前駆細胞も維持していることがわかる。棒グラフは mean ± SEM で示した。n = 15 鰭条 (計 5 匹)。BLC と OPC は局在と形態で区別した。OPC は基部先端部軸に沿って伸びた形状をして、ジョイントに局在すること、BLC は扁平で不規則な形態をし、ジョイント以外に存在することを指標に区別した。

(E) 鰭切断後 4 日目における *Tg(sp7:mcherry)* を持つ Cre ラベル細胞の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片。OPC に由来する BLC と骨芽細胞の形態や局在が明確に分かれていることがわかる。点線: 右の光学切片像の部位。矢印: 成長している骨、赤矢頭: BLC、白矢頭: 骨芽細胞。スケールバー: 10 μ m。

Figure 15. ジョイントの細胞の形態と骨芽系列マーカによる標識



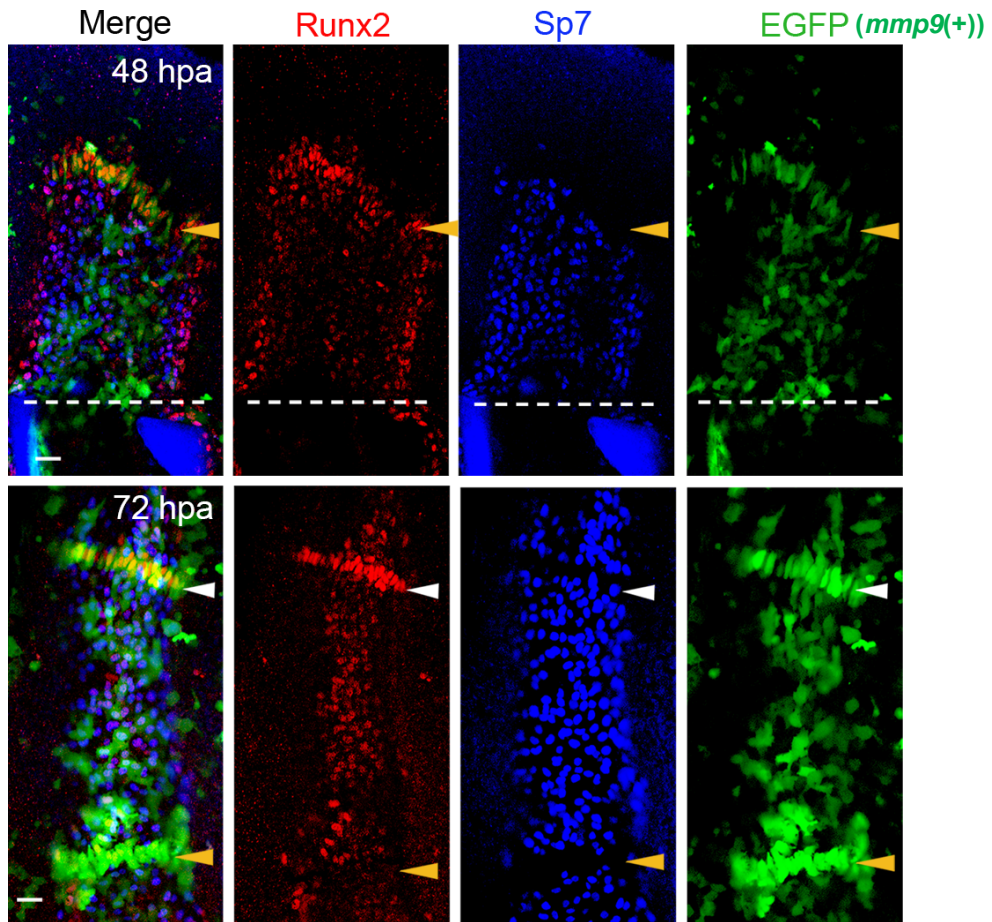
(A) 鰭条のジョイント部分の横断切片における Cre によって標識されたジョイント細胞の Zns5 と Sp7 による抗体染色。

(B) (A) の四角の拡大図。 *mmp9*(+)細胞は、再生前の鰭条のジョイントにおいて、骨芽系列の細胞表面マーカーである Zns5 陽性だが、骨芽細胞分化のマーカーである Sp7 陰性であり、また樹状突起のような特徴的な形態をしていることから、分化した骨芽細胞としての特徴を持っておらず、未分化な骨芽系列の細胞であることが示唆される。ジョイント細胞において Sp7 が陰性であることは、Figure 25 においても観察される。

核:TO-RPO-3。スケールバー:10 μ m。

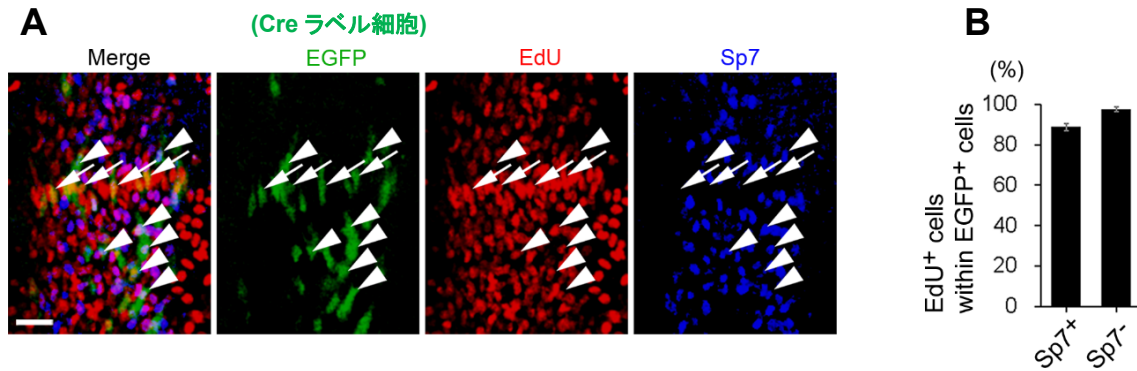
Figure 16. 再生するジョイントにおける *mmp9(+)*細胞の一過的な Runx2

の発現



Tg(mmp9:egfp) の切断後 48 時間 (上段) および 72 時間 (下段) における Runx2 と Sp7 の抗体染色の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片。再生組織の先頭に形成されたジョイントに局在する細胞は Runx2 を強く発現する (上段、黄矢頭) が、次のジョイントが形成されるころには発現を失い、Runx2 も Sp7 も発現しない (下段、黄矢頭)。一方、新たに再生したジョイントの細胞では Runx2 の発現が始まる (下段、白矢頭)。OPC は、一過的に前骨芽細胞の状態を経由してから、自己複製することを示している。スケールバー: 10 μ m。点線: 鰭切断箇所。

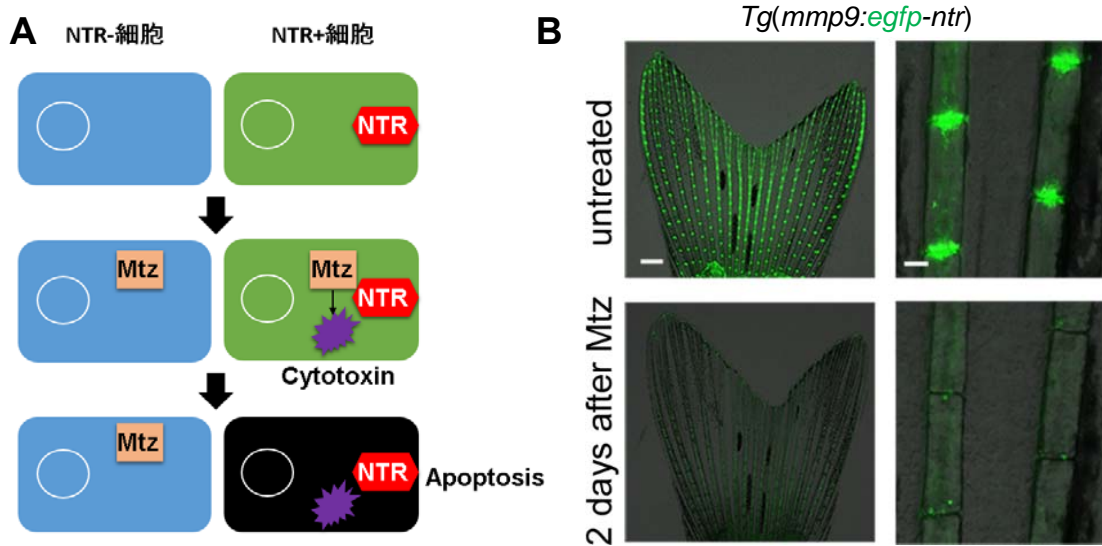
Figure 17. 再生組織におけるジョイント細胞由来の細胞の増殖



(A) 切断前に Cre によって標識されたジョイントの細胞に由来する増殖細胞の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片。切断後 24 時間から 48 時間に、細胞周期の S 期マーカーである EdU を取り込ませ、その直後に再生組織を固定し、EdU と Sp7 を標識した。スケールバー: 10 μ m。

(B) 再生組織におけるジョイント細胞由来の EdU 陽性細胞の定量。Sp7 陽性の骨芽細胞 (A、矢頭) も Sp7 陰性の OPC (A、矢印) も 90% 以上のジョイント細胞由来の細胞が再生組織において細胞増殖した。棒グラフは mean \pm SEM で示した。n = 14 鰭条、計 4 匹。

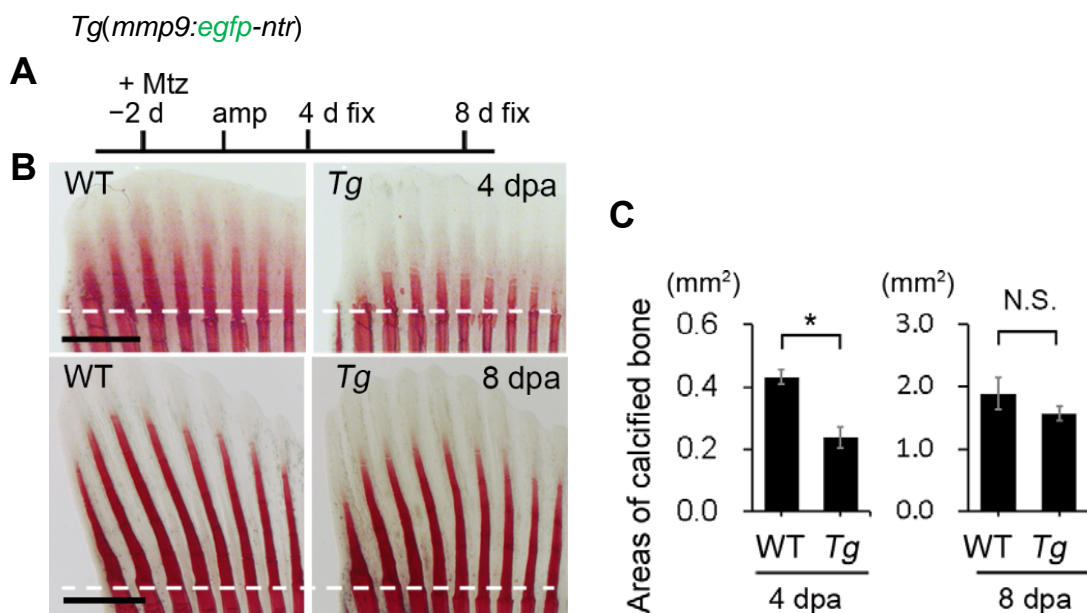
Figure 18. NTR と Mtz による OPC 除去



(A) NTR と Mtz による細胞除去の模式図。無毒な Mtz は通常の細胞には影響を与えず、NTR を発現する細胞においてのみ代謝されて細胞毒に変化し、DNA に架橋を形成することで、アポトーシスを誘導する。

(B) *Tg(mmp9:egfp-ntr)* における Mtz 処理による OPC 除去。5 mM の Mtz を処理し続けると、2 日でほぼすべての OPC を除去できた。スケールバー: 500 μm (左)、50 μm (右)。

Figure 19. OPC 除去による再生時の骨組織の抑制



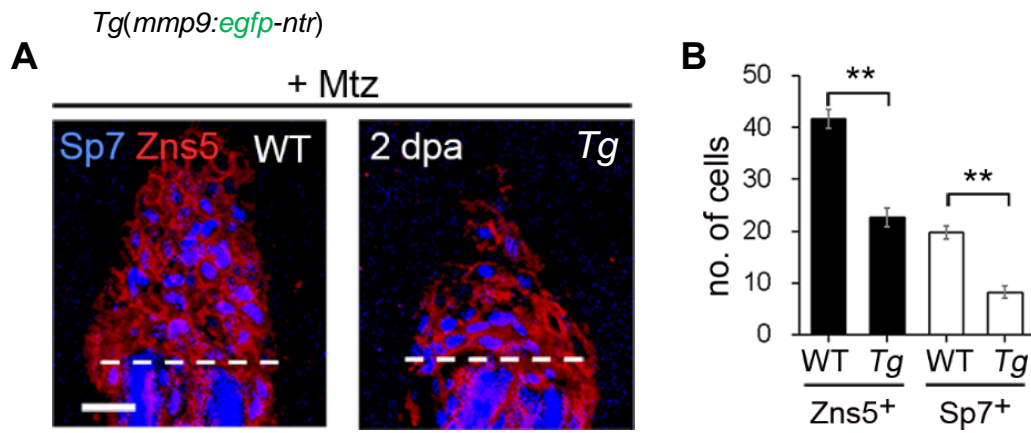
(A) Mtz の処理と再生組織の固定の条件。

(B) OPC を除去した *Tg(mmp9:egfp-ntr)* と WT の Alizarin Red による石灰化組織の染色。切断後 4 日目において、OPC が除去された *Tg* の石灰化組織は WT に比べ著しく抑制された(上段)。一方、切断後 8 日目においては、*Tg* の石灰化組織が WT のそれと大差なくなっている(下段)。したがって、OPC 以外の骨芽細胞ソースが補完していることが示される。

dpa: days post amputation。スケールバー: 500 μ m。点線: 緒切断箇所。

(C) (B) の石灰化組織の面積の定量。OPC 除去によって、再生組織の石灰化組織の面積が 4 dpa において 2 分の 1 に抑えられた。一方 8 dpa では変化が小さくなっていることがわかる。棒グラフは mean \pm SEM で示した。* $p < 0.01$ 。4 dpa と 8 dpa において WT と *Tg* それぞれ $n = 5$ 匹ずつ。N.S.: not significant。

Figure 20. OPC 除去による再生組織の骨芽細胞数の減少

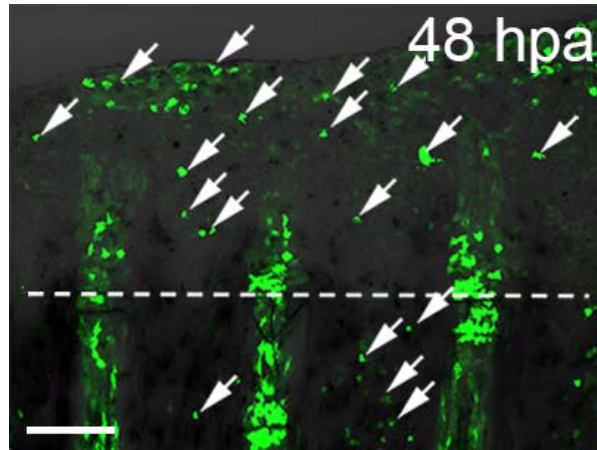


(A) OPC を除去した *Tg(mmp9:egfp-ntr)* と WT の Zns5 と Sp7 による骨芽細胞の抗体染色の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片。スケールバー: 10 μ m。点線: 鰭切断箇所。

(B) (A) の Zns5 と Sp7 それぞれの陽性細胞数の定量。棒グラフは mean \pm SEM で示した。**p < 0.001。WT と *Tg* それぞれ n = 5 匹ずつ。

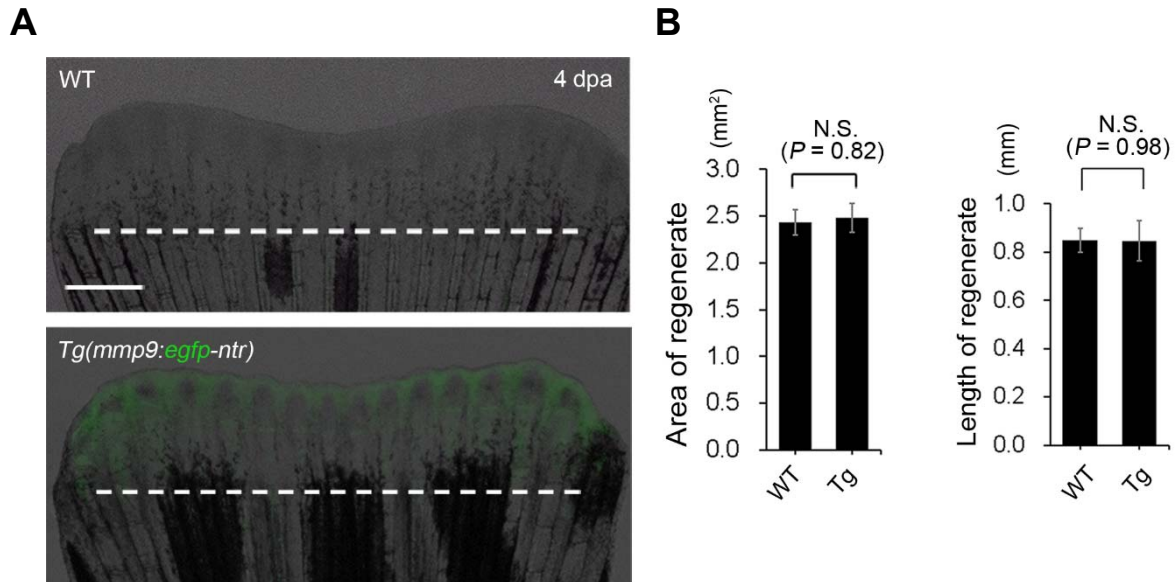
Figure 21. 再生組織で *mmp9* を発現する骨髄球細胞

Tg(mmp9:egfp)



Tg(mmp9:egfp) における切断後 48 時間の再生組織の *mmp9* を発現する骨髄球細胞。EGFP 蛍光が、新しい鰭条の形成領域に以外に、再生組織に散在するように観察され、これらは骨髄球細胞であると考えられる。スケールバー：100 μm 。点線：鰭切断箇所。hpa：hours post amputation。

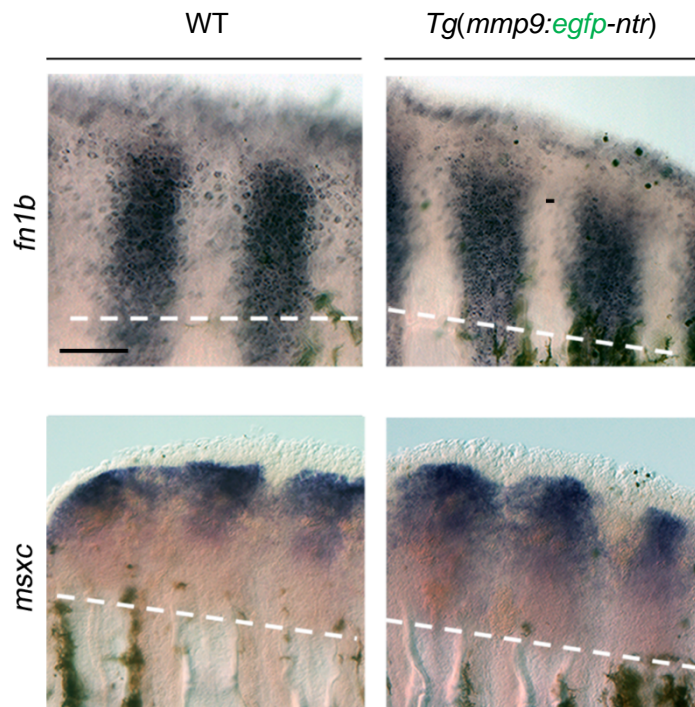
Figure 22. OPC 除去による鰭の再生全体への影響



(A) Mtz を処理した 4dpa における WT と *Tg(mmp9:egfp-ntr)* の再生組織の全体像。明視野と緑の蛍光フィルターを重ね合わせて撮影した。弱い EGFP の蛍光が見られるが、OPC と骨髄球細胞が絶えず再生しようとしているからだと考えられる。切断面より基部側を含む他のジョイントの OPC はほとんど除去されている。スケールバー: 500 μ m。点線: 鰭切断箇所。

(B) (A) の再生組織の面積と長さの定量。OPC 除去は、再生組織の面積 (左) や長さ (右) にほとんど影響しない。棒グラフは mean \pm SEM で示した。**p < 0.001。WT と *Tg* それぞれ n = 5 匹ずつ。N.S.: not significant。

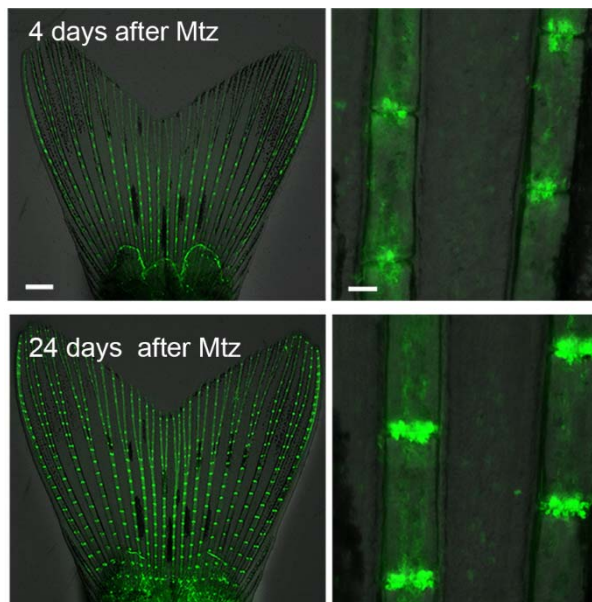
Figure 23. OPC 除去による再生組織への影響



Mtz を処理して OPC を除去した WT と *Tg(mmp9:egfp-ntr)* の切断後 2 日目再生組織における傷上皮マーカーである *fn1b* と再生芽マーカーである *msxc* の ISH 解析。OPC が除去されても傷上皮 (上段) と再生芽 (下段) の形成に影響はなかった。スケールバー: 100 μm 。点線: 鰭切断箇所。

Figure 24. OPC 除去した後の OPC の再出現

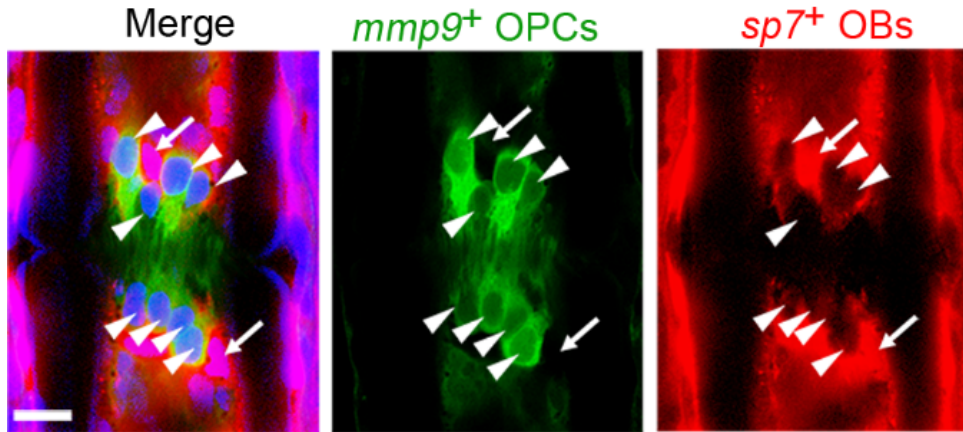
Tg(mmp9:egfp-ntr)



Tg(mmp9:egfp-ntr) において OPC を除去したジョイントに再び現れる OPC。右の写真はいずれも左の写真の一部を拡大したものである。Mtz を洗い流した後、4 日ですでにジョイントの EGFP を発現する再生 OPC が観察される。24 日でほぼ完全に OPC の細胞集団が再生した。スケールバー: 500 μm (左)、50 μm (右)。

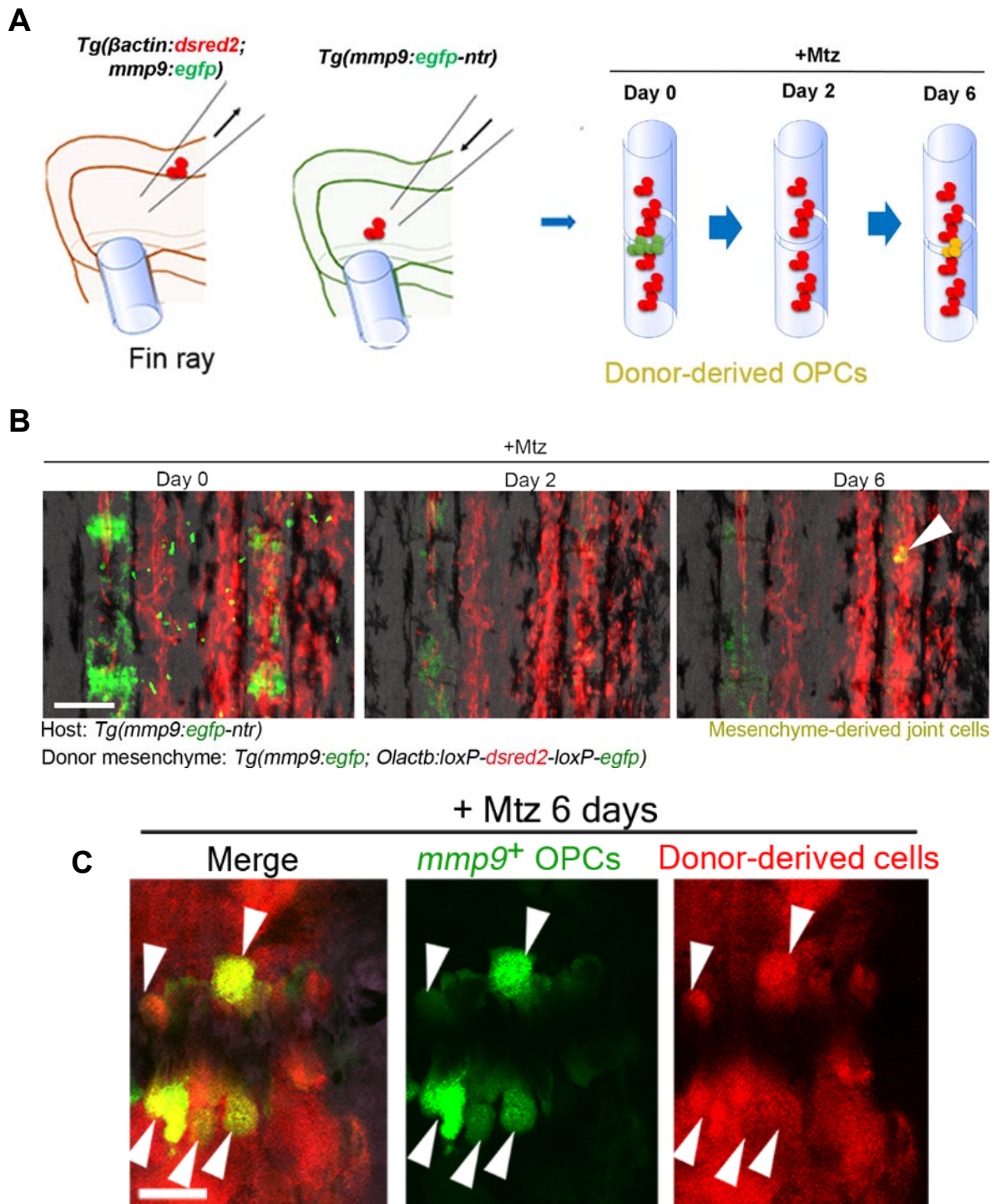
Figure 25. 骨芽細胞ではない前駆細胞から再生する OPC

Tg(sp7:mcherry; mmp9:egfp-ntr)



骨芽細胞ではない前駆細胞による OPC の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片。ダブル *Tg(sp7:mcherry; mmp9:egfp-ntr)* において *sp7* 陽性の骨芽細胞が OPC に寄与するなら、EGFP(+)/mCherry(+)となり黄色の蛍光で観察されるはずだが、OPC 除去後、Mtz を除いてジョイントに再生する OPC はいずれも EGFP(+)/mCherry(-)であることから (n = 15 /15 ジョイント、合計 5 匹の魚)、骨芽細胞は OPC を生じないことを示している。矢印、隣接する骨芽細胞。スケールバー:10 μ m。核:DAPI。

Figure 26. OPC は付近の間葉細胞から再生する



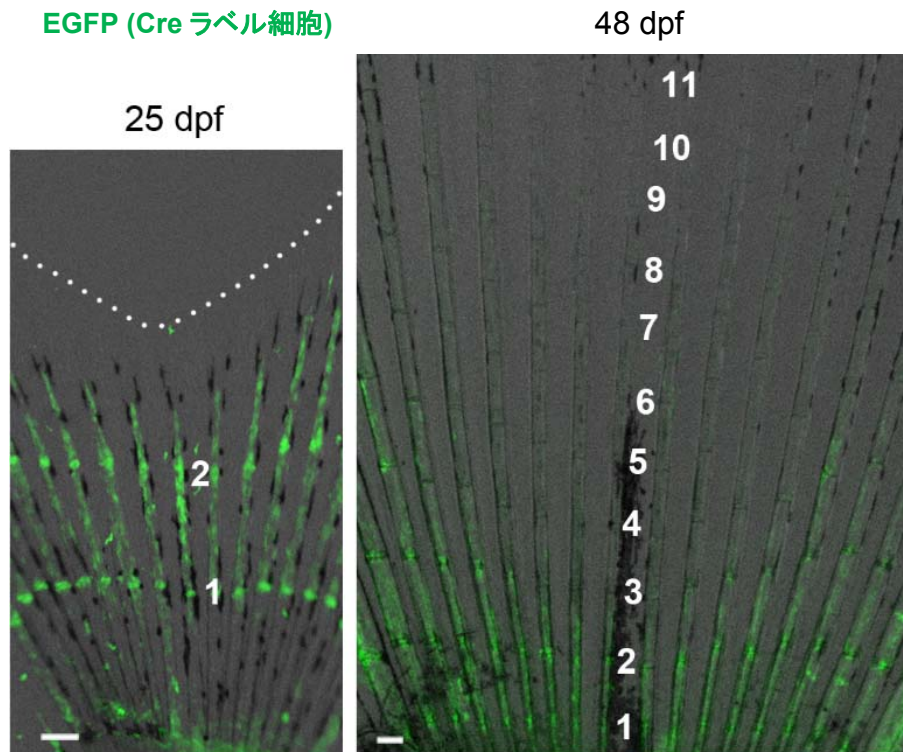
(A) 再生芽移植と宿主 OPC の除去の模式図。鰭の切断後 2 日目の再生芽の一部を取り出して、別の個体の再生芽領域に入れ、再生を完了させる。定着した移植細胞のうち、95%以上の移植細胞は、間葉細胞になる (Shibata et al., 2016)。移植後 8 日目で Mtz 処理を開始し宿主

OPC を除去し続けたままにし、移植細胞に由来する OPC (EGFP(+)/DsRed2(+)) の蛍光が観察できるかどうかを検証した。 *Tg(Olactb:dsred2)* は *Tg(Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)* を短縮した表記である。

(B) 移植した間葉細胞からの OPC への寄与。移植後 8 日目、つまり Mtz 処理を開始する Day 0 において、移植した間葉細胞 (赤) とホストの OPC (緑) が観察される。Mtz 処理 2 日目の Day 2 において、ホストの OPC の EGFP 蛍光がほとんど観察されないことがわかる。Mtz 処理を続けて 6 日目の Day 6 で、移植細胞に由来する OPC (EGFP(+)/DsRed2(+)) が観察された。矢頭、DsRed2(+) 間葉細胞に由来する再形成された OPC。n = 24 ジョイント、計 5 匹の魚。スケールバー: 100 μm 。

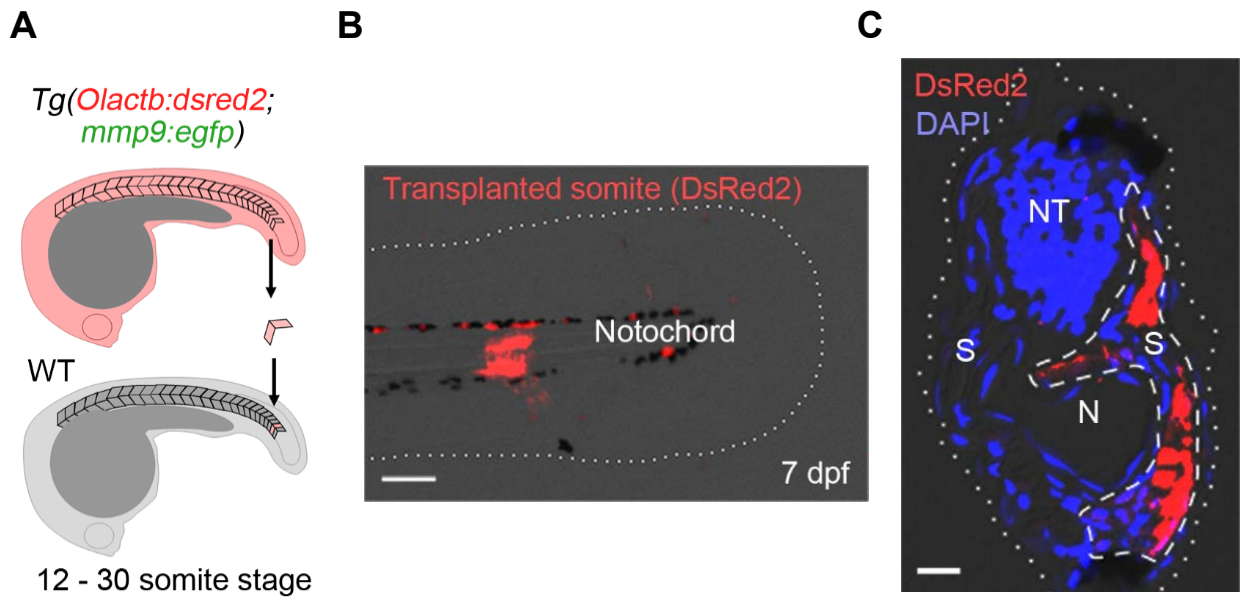
(C) (B) の Day 6 の矢頭の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片。矢頭で示す OPC (EGFP(+)) が確かに移植細胞であることを示す DsRed2(+) であることがわかる。スケールバー: 10 μm 。

Figure 27. 成長期の OPC は骨芽細胞も OPC 自身も生じない



Creによる標識された成長期の OPC の細胞系譜解析。ジョイントが 2-3 列形成される 25 dpf に Cre で標識された OPC は、成長過程で新しい骨芽細胞や OPC を生じるかどうかを検証した。24 日後 OPC の子孫細胞は新たに形成された鰭条の骨芽細胞も、そのジョイントの OPC も生じなかった ($n = 9 / 9$ 匹)。成長期の OPC は *mmp9* を発現しない前駆細胞に由来することが示唆される。数字: 根元からのジョイントの数。スケールバー: 100 μm 。dpf: days post fertilization。

Figure 28. 体節移植

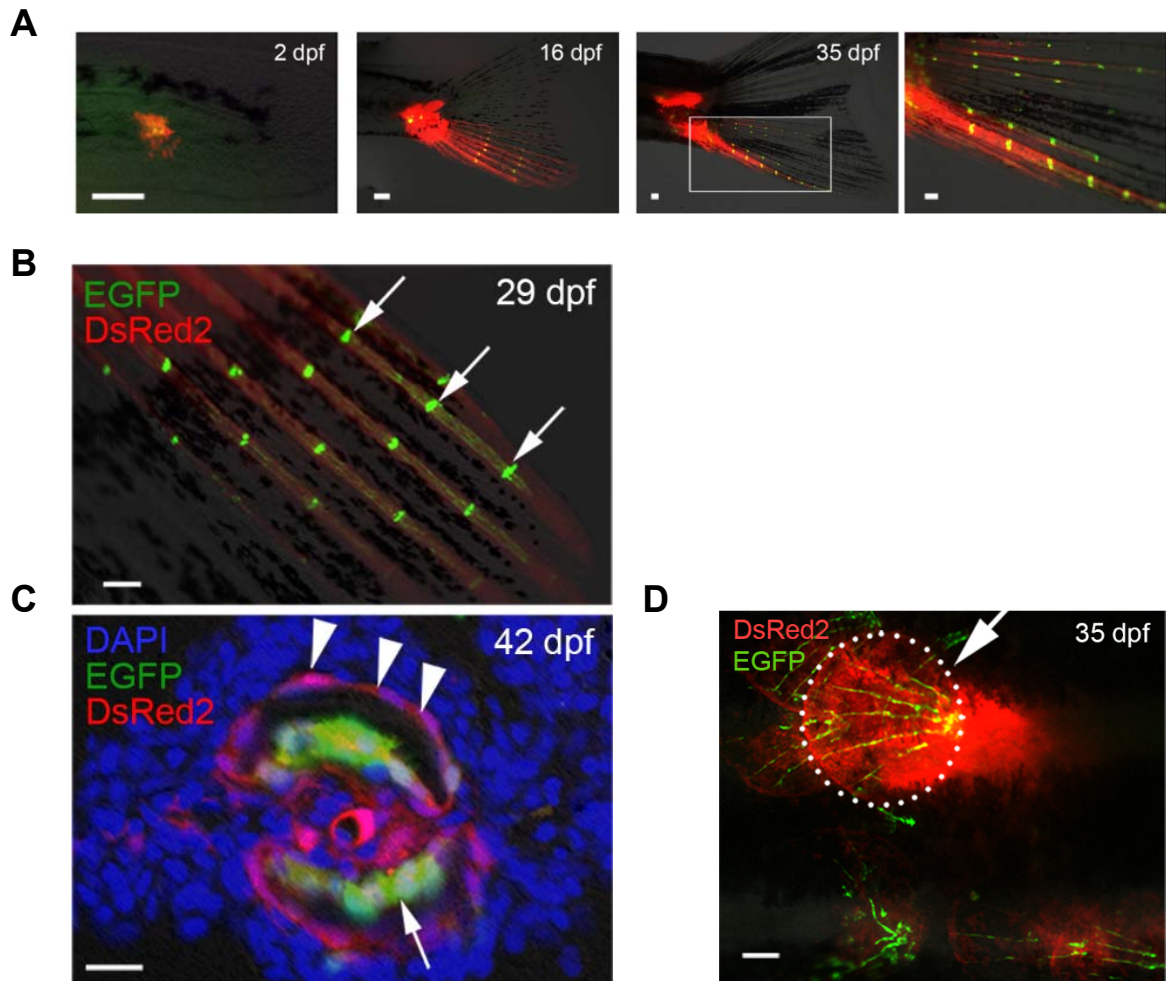


(A) 体節移植の模式図。12-30 体節期に、尾部から 1-2 個目の体節をドナー *Tg(mmp9:egfp; Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)* から取り出し、ホストの WT の尾部から 1-2 個目に挿入する。メダカの研究から、体節から外骨格に属する鰭条の骨芽細胞とウロコの骨芽細胞が生じることが報告されている (Shimada et al., 2013)。 *Tg(Olactb:dsred2)* は *Tg(Olactb:loxP-dsred2-loxP-egfp)* を短縮した表記である。

(B) 移植に成功した胚の 7 dpf の様子。移植細胞 (赤) が体節部分に限局し、一部が鰭条形成領域に移動し始めていることがわかる。スケールバー：100 μm 。

(C) (B) の横断切片における抗体染色。移植細胞 (赤) がほぼ体節領域に限局している。体節以外の細胞の混入はほとんど見られない。スケールバー：10 μm 。核:DAPI。NT:神経管、S:体節、N:脊索。

Figure 29. OPC は発生期の体節に由来する



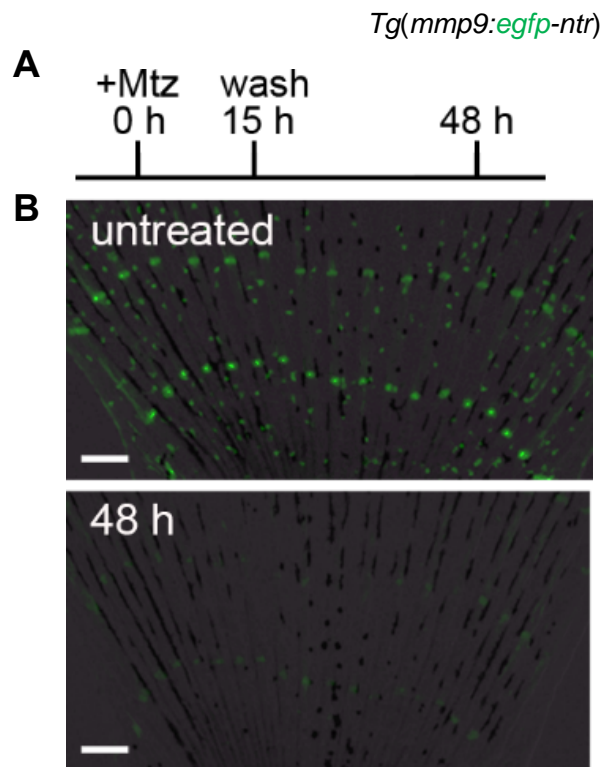
(A) 移植した体節細胞の追跡。体節に由来する細胞が、2 dpf で腹側に移動し、16 dpf では尾鰭の腹側の鰭条に寄与し、35 dpf でジョイントにおいて EGFP を発現する OPC を生じることが示された。右端の写真は中央右の写真の四角の拡大図である。移植細胞が鰭の鰭条に寄与した 5 匹のうち 5 匹において、OPC が生じることが観察され、再現性が高いことがわかる。スケールバー: 100 μ m。

(B) 移植細胞が鰭条に寄与した鰭の全体像。移植細胞から OPC が生じている (矢印)。

(C) 移植細胞が OPC を生じたジョイントの横断切片における抗体染色。メダカによる以前の研究と同様に (Shimada et al., 2013)、体節に由来する細胞 (DsRed2(+))は鰭条の間葉細胞と骨芽細胞もしくは BLC(矢頭)に寄与すると同時に OPC(矢印)を生じている。核: DAPI。

(D) 体節に由来する細胞のウロコの *mmp9*(+)細胞への寄与。体節に由来する細胞は、移植した部位から離れずに、その表面にあるウロコの *mmp9*(+)細胞に寄与した。スケールバー: 100 μ m。dpf: days post fertilization。

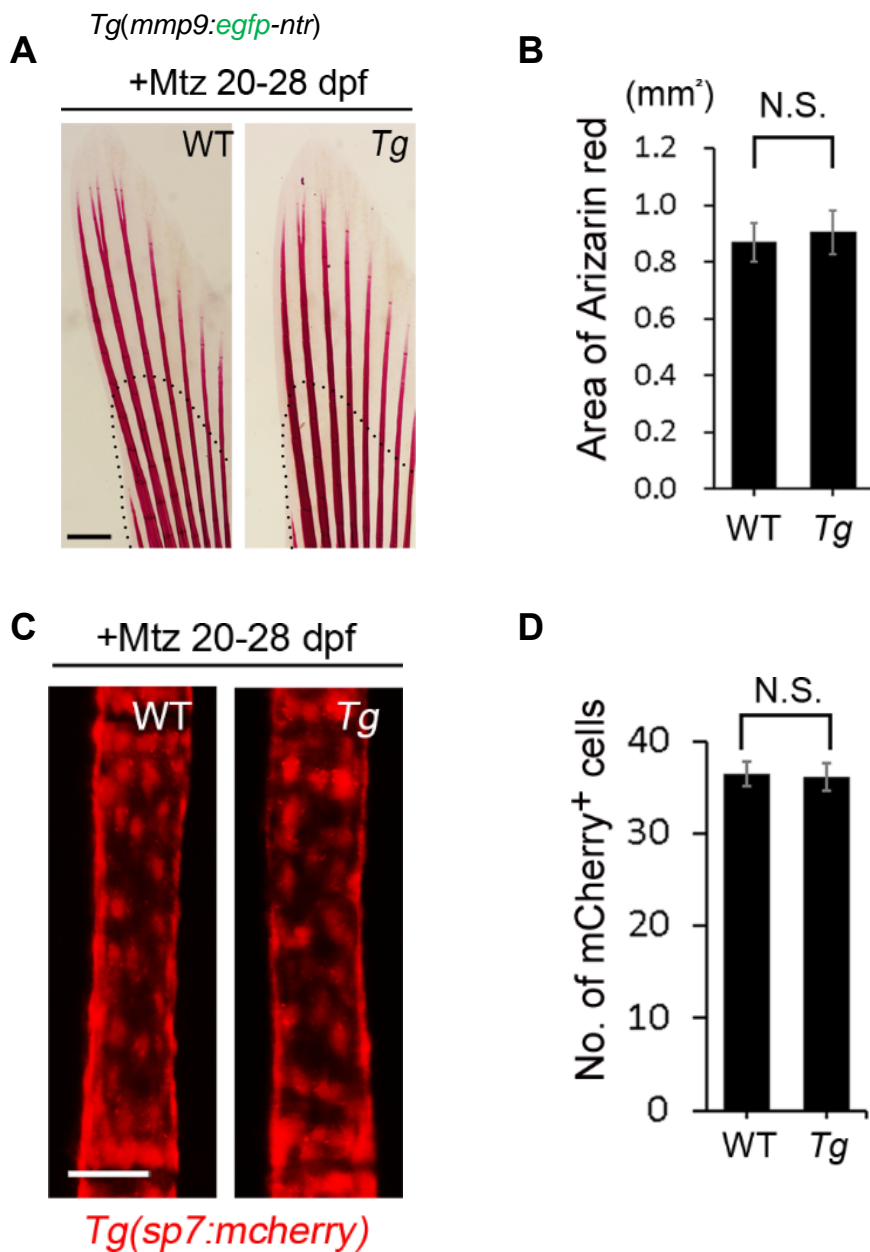
Figure 30. 成長期における継続的な OPC の除去



(A) 成長期の個体における Mtz の処理と洗いのサイクル。鰭が急激に成長する受精後 20 日から 28 日にかけて、2 日ごとに約 15 時間、5 mM の Mtz で繰り返し処理することで、ほぼすべての OPC が除かれ続けるようにした。

(B) (A) の通りに Mtz を処理したとき、次の Mtz 処理までに再生する OPC。Mtz 処理開始直前 (上段) で見られる OPC が、次の Mtz 処理直前の 48 時間までにほぼ再生していない (下段)。除去した細胞からみられる弱い EGFP の蛍光は見られるが、強い EGFP の蛍光を持つ OPC はほとんど観察されない。スケールバー: 100 μ m。

Figure 31. 鰭の成長期の OPC は骨形成に必ずしも必要ではない



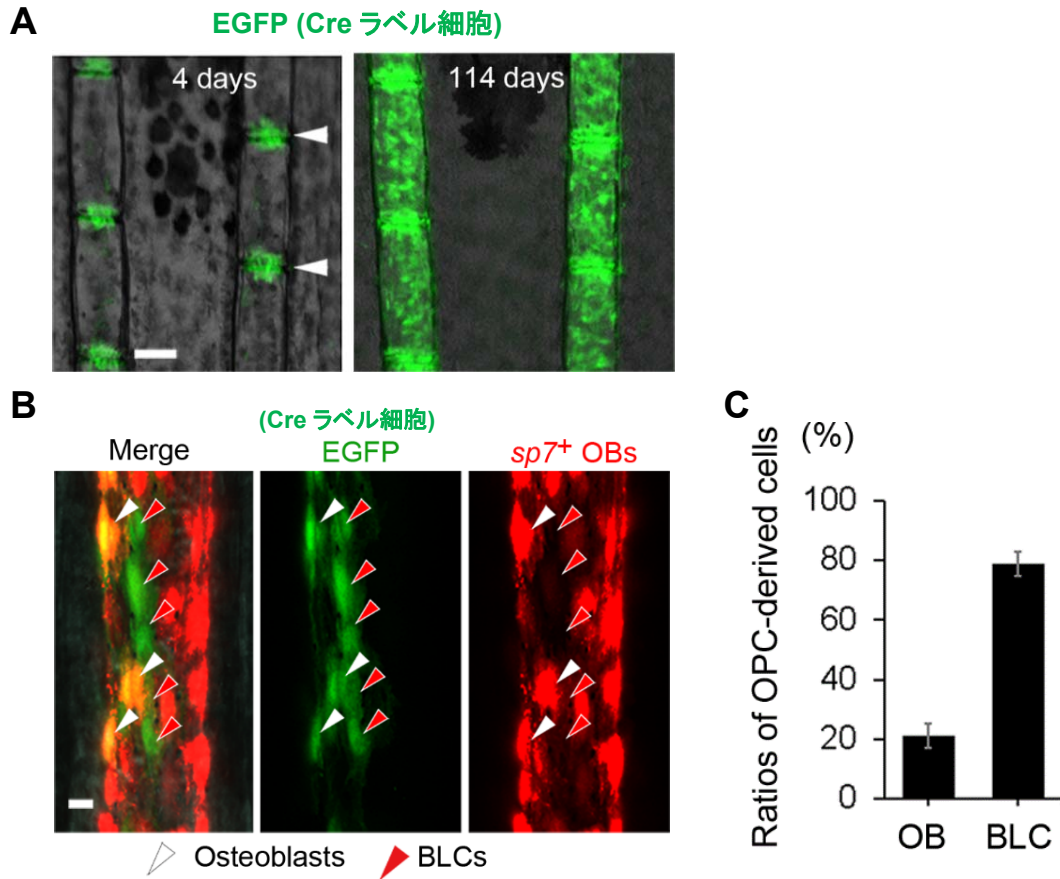
(A) Figure 31 のやり方で Mtz で処理した成長期の鰭における石灰化組織の Alizarin Red 染色による標識。最後の Mtz 処理を終えた直後の WT と *Tg* に固定・染色した。点線は受精後 20 日における大まかな大きさを示している。スケールバー: 200 μm 。

(B) (A) の染色された石灰化組織の面積の定量。WT と *Tg* の石灰化組織の大きさに有意な差は検出されなかった。棒グラフは mean \pm SEM で示した。WT と *Tg* それぞれ n = 10 匹と 6 匹。N.S.: not significant。

(C) Figure 31 のやり方で Mtz で処理した成長期の鰭における *sp7* 陽性の骨芽細胞の実体顕微鏡像。Mtz 処理は *Tg(sp7:mcherry)* とダブル *Tg(sp7:mcherry; mmp9:egfp-ntr)* に対して行った。スケールバー: 50 μm 。

(D) (C) における骨芽細胞数の定量。WT と *Tg* の *sp7* 陽性の骨芽細胞の数に有意な差は見られなかった。棒グラフは mean \pm SEM で示した。WT と *Tg* それぞれ N = 10 匹と 6 匹。N.S.: not significant。

Figure 32. 非再生組織における OPC の骨芽細胞への寄与

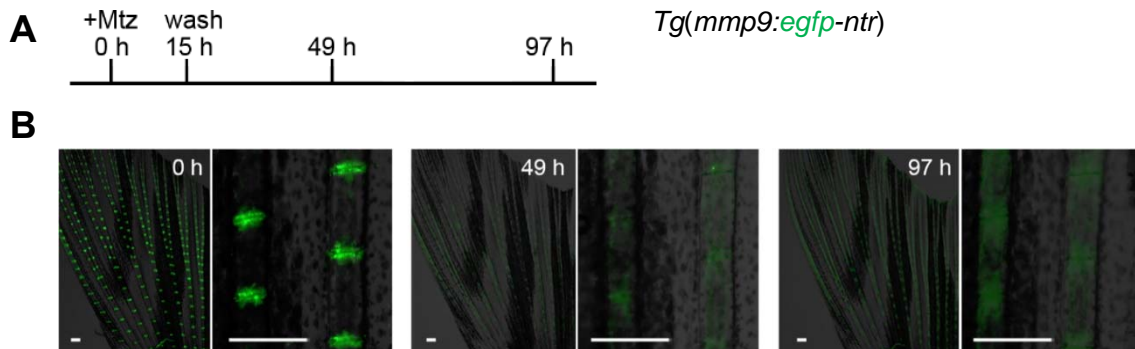


(A) Cre によって標識された OPC の非再生組織における長期的な追跡。4 か月齢の個体を TAM 処理したあと 4 日目における鰭条のジョイントに Cre ラベル細胞が局在しているが (左図、矢頭)、114 日目ではジョイントとジョイントの間の骨表面に、多数の子孫細胞が分布していることがわかる。スケールバー：100 μ m。

(B) 非再生組織における Cre によって標識された OPC に由来する子孫細胞の共焦点レーザー顕微鏡による光学切片。OPC の子孫細胞が *Tg(sp7:mcherry)* によって標識される骨芽細胞 (白矢頭) と *sp7* 陰性の BLC になっていることがわかる。スケールバー：10 μ m。

(C) (B) の骨芽細胞と BLC の割合。それぞれの個体において、鰭の中央部にある一つのセグメント内の細胞をカウントし、割合を出した。棒グラフは mean \pm SEM で示した。(n = 5 匹)。

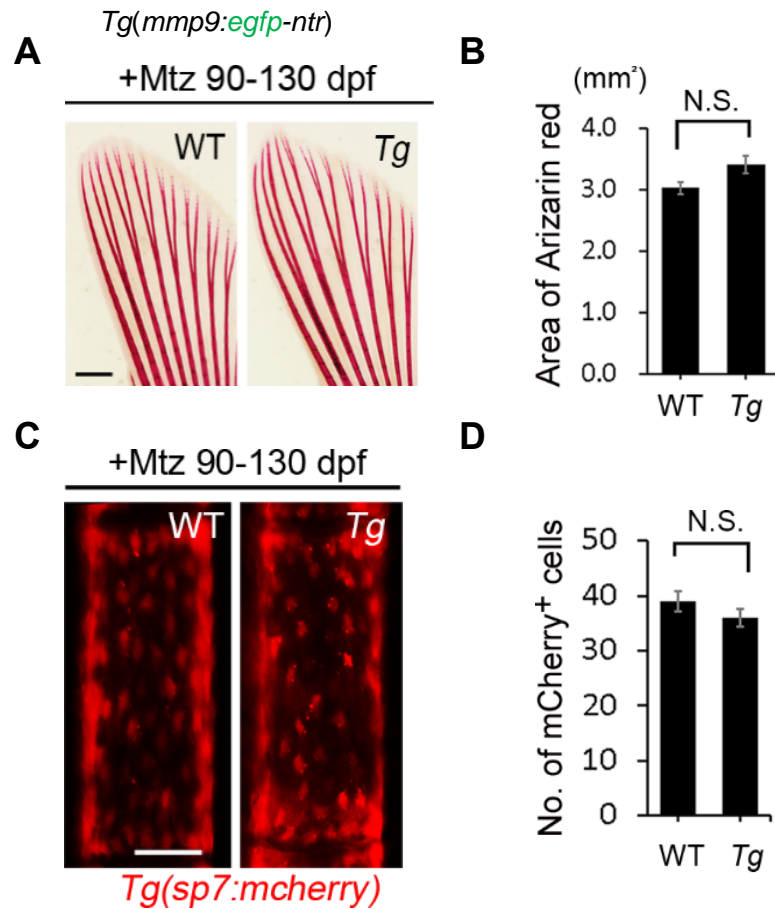
Figure 33. 成体における継続的な OPC の除去



(A) 成体における Mtz の処理と洗いのサイクル。成体として十分に成長した 3 ヶ月齢の個体を 4 日ごとに約 15 時間、5 mM の Mtz で繰り返し処理することで、ほぼすべての OPC が除かれ続けるようにした。

(B) (A) の通りに Mtz を処理したとき、次の Mtz 処理までに再生する OPC。Mtz 処理開始 0 時間、49 時間および 97 時間において、同じ個体の同じ部分を撮影した。それぞれの時間の全体像の右に一部の拡大図を並べた。0 時間で見られた OPC は 47 時間でほぼ完全に除去されており、次に Mtz 処理開始直前の 97 時間では、除去された細胞から漏れている弱い EGFP は観察されるものの、強い EGFP の蛍光を持った OPC はほとんど観察されなかった。スケールバー: 200 μm 。

Figure 34. 成体鰭の OPC は骨形成に必ずしも必要ではない



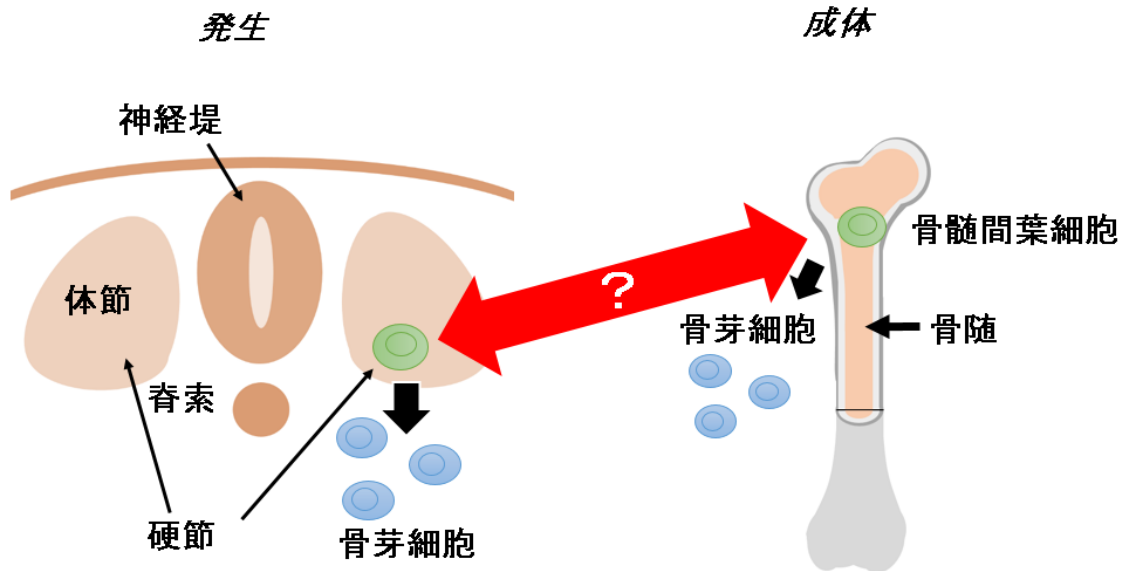
(A) Figure 34 のやり方で Mtz で処理した成体の鰭における石灰化組織の Alizarin Red 染色による標識。最後の Mtz 処理を終えた直後の WT と *Tg* に固定・染色した。スケールバー: 500 μ m。

(B) (A) の染色された石灰化組織の面積の定量。WT と *Tg* の石灰化組織の大きさに有意な差は検出されなかった。棒グラフは mean \pm SEM で示した。WT と *Tg* それぞれ n = 5 匹ずつ。N.S.: not significant。

(C) Figure 34 のやり方で Mtz で処理した成長期の鰭における *sp7* 陽性の骨芽細胞の実体顕微鏡像。Mtz 処理は *Tg(sp7:mcherry)* とダブル *Tg(sp7:mcherry; mmp9:egfp-ntr)* に対して行った。スケールバー: 50 μ m。

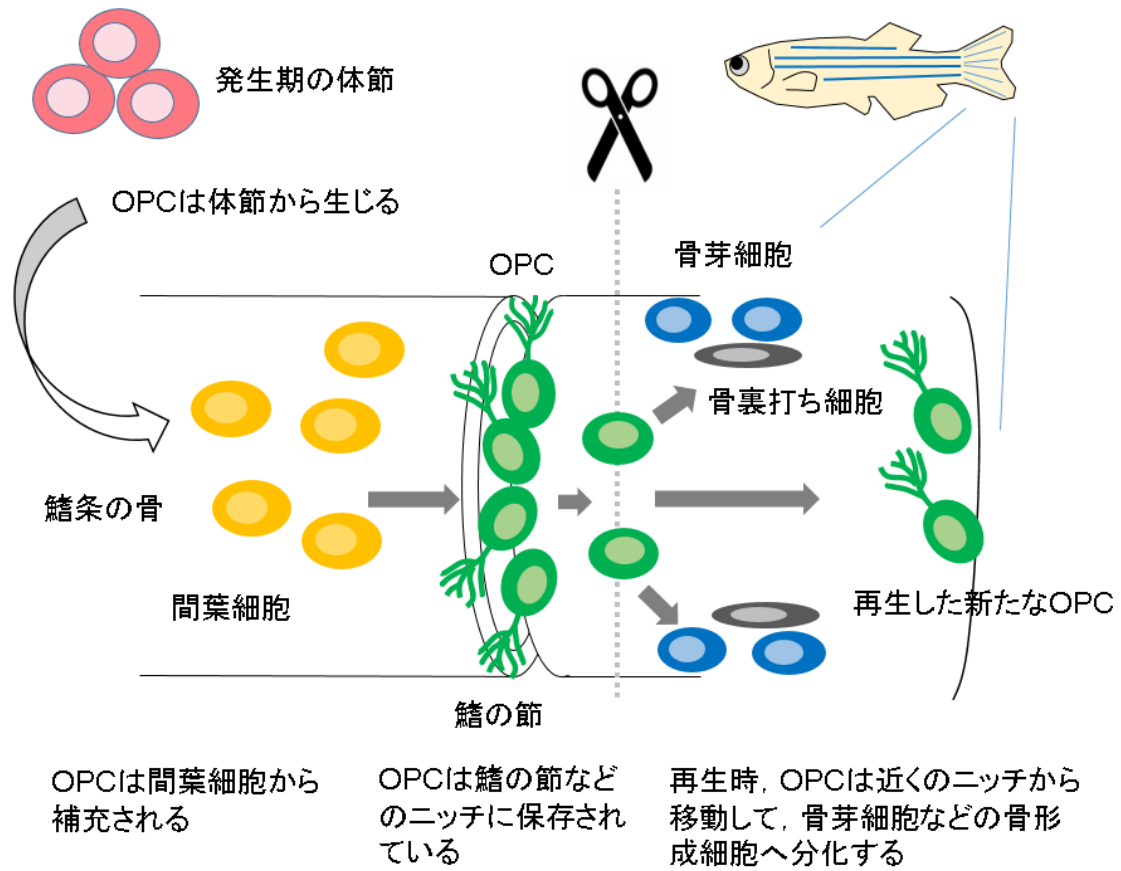
(D) (C) における骨芽細胞数の定量。WT と *Tg* の *sp7* 陽性の骨芽細胞の数に有意な差は見られなかった。棒グラフは mean \pm SEM で示した。WT と *Tg* それぞれ n = 5 匹ずつ。N.S.: not significant。

Figure 35. 哺乳類の発生と成体における骨芽細胞のソース



脊椎動物における発生期と成体における骨芽細胞のソース。哺乳類成体の骨組織においては、骨髄や骨膜に存在する間葉幹細胞 MSC が、骨芽前駆細胞をを経て、骨芽細胞を生み出すと考えられている (Aubin, 2008)。しかし、それらの生体内における、性質や局在、また骨の新生と再生における役割、さらに成体の骨髓間葉細胞の発生的起源についてはよくわかっていない。一方、脊椎動物の発生期の骨芽細胞は、体節の一部である硬節と神経堤の一部の細胞から生じることはよく知られているが (Hall, 2015a; Hall, 2015b)、これらが成体の MSC や OPC の起源であるか否かは明らかにされていない。

Figure 36. 生体内における OPC の局在、機能および起源



本研究のまとめ。骨芽前駆細胞 (OPC) を、生体内において同定することができた。また、鰭の再生時において OPC が、既存の骨芽細胞の脱分化によらない、新たな骨芽細胞の重要な供給源であることがわかった。さらに OPC は発生期の体節に由来し、間葉細胞を経て、骨組織のニッチに備蓄されることがわかった。