

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	組織の付加再生における傷上皮の細胞系譜と機能に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	柴田恵里
Author(English)	Eri Shibata
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10744号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:川上 厚志,桑 昭苑,立花 和則,田中 幹子,山口 雄輝
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10744号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 29 年度 学位論文

組織の付加再生における
傷上皮の細胞系譜と機能に関する研究

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

柴田 恵里

目次

要旨	3
略語表	6
第一章 緒論	7
1.1 組織再生とは	7
1.1.1 種間の再生能力の差	7
1.1.2 付加再生の仕組み	8
1.1.3 ゼブラフィッシュの再生能力と尾ひれの構造	8
1.2 皮膚の構造と役割	9
1.2.1 哺乳類と魚類の表皮	9
1.2.2 傷上皮の構造と役割	10
1.3 本研究の目的	11
1.4 図表および図表の説明	12
第二章 傷上皮細胞の系譜解析	15
2.1 背景と目的	15
2.1.1 再生細胞の系譜	15
2.1.2 Cre- <i>loxP</i> システムによる細胞種特異的な組換えと系譜解析	15
2.1.3 本研究の目的	16
2.2 結果	17
2.2.1 <i>fn1b</i> は傷上皮で広範囲に発現する	17
2.2.2 トランスジェニックゼブラフィッシュによる <i>fn1b</i> 発現細胞の可視化	17
2.2.3 Cre- <i>loxP</i> システムを用いた <i>fn1b</i> ⁺ 傷上皮細胞の系譜解析	18
2.2.4 傷上皮形成初期の <i>fn1b</i> ⁺ 細胞は5日程度で消失する	19
2.2.5 傷上皮形成後期に出現する <i>fn1b</i> ⁺ 細胞には消失するものと再生後もひれに残るものがある	20
2.2.6 1細胞レベルでの <i>fn1b</i> ⁺ 傷上皮細胞の運命追跡	21
2.2.7 切断面から遠い基底層細胞が再生後の皮膚に寄与する	21
2.2.8 中間層の細胞と表層の細胞は再生中に基底層細胞へ脱分化しない	22
2.2.9 ひれ全体の表皮細胞が細胞増殖することで、再生後の皮膚が供給される	23
2.3 考察	25
2.3.1 傷上皮マーカーとしての <i>fn1b</i>	25
2.3.2 傷上皮細胞は主に鰭条間の表皮に由来する	25
2.3.3 <i>fn1b</i> ⁺ 傷上皮に由来する表皮細胞の多くは再生中に失われる	26
2.3.4 広範囲の表皮で細胞増殖が起こり、表皮組織を再構築する	27
2.3.5 再生中に中間層細胞や表層細胞の脱分化は起こらない	27

2.4 図表および図表の説明	28
第三章 傷上皮細胞の機能解析	55
3.1 背景と目的	55
3.1.1 傷上皮による再生芽誘導	55
3.1.2 再生関連シグナルの解析	55
3.1.3 本研究の目的	56
3.2 結果	57
3.2.1 <i>fgf20</i> は最も早く傷上皮に発現する Fgf リガンドである	57
3.2.2 <i>fgf3</i> , <i>fgf10a</i> は先端再生芽で発現する	58
3.2.3 再生芽移植による間葉細胞特異的なシグナルノックダウン	58
3.2.4 再生初期の Fgf シグナルは間葉細胞に直接働き再生芽形成を誘導する	59
3.2.5 <i>fgf20a</i> の過剰発現は再生芽マーカー遺伝子の発現を誘導する	59
3.2.6 再生芽の Fgf シグナルは再生芽の増殖に必要である	60
3.2.7 Fgf3 シグナルは再生芽の細胞増殖を促進する	61
3.2.8 <i>fgf20a</i> は <i>fgf3</i> を介して再生芽の細胞増殖を促進する	62
3.3 考察	63
3.3.1 傷上皮細胞は Fgf20a を介して再生芽形成を誘導する	63
3.3.2 再生芽に発現する <i>fgf3</i> は再生芽細胞の増殖を促す	63
3.3.3 鰭条の中の間葉系細胞が Fgf シグナルのターゲットである	64
3.4 図表および図表の説明	65
第四章 結論	81
第五章 実験材料と方法	82
参考文献	89
研究業績	95
謝辞	96

要旨

【背景・目的】

ヒトをはじめとする哺乳類は限られた再生能力しか持たないが、有尾両生類であるイモリや硬骨魚類であるゼブラフィッシュは、失った四肢やひれを元通りのサイズまで機能的に再生することができる。この大規模な組織損傷を修復するプロセスは付加再生と呼ばれ、多くの研究者を魅了してきた。付加再生できる生き物とできない生き物の違いは何なのだろうか？これは現代生物学の最も挑戦的な課題の一つである。ゼブラフィッシュを用いた近年の分子生物学的な解析から、再生中の組織はヘテロな細胞の集団であり、細胞ごとに遺伝子発現や役割が異なることが示唆されてきている。様々な細胞種が複雑に関与しあって進行する再生の仕組みを明らかにするためには、1) 再生にかかわる細胞の由来や再生後の運命の解析、2)再生にかかわるシグナルの解析、などが必要である。

付加再生のプロセスでは、四肢やひれを切断すると表皮細胞が傷口をふさぐように遊走し、厚みを帯びて傷上皮と呼ばれる特殊な上皮を形成する。続いて、傷上皮の直下に再生芽と呼ばれる増殖性の細胞群が形成され、失われた組織を再構築することで再生が進行する。イモリの四肢再生の実験から、傷上皮の形成を阻害すると再生が進行しないことが示されており、傷上皮は、再生にとって必須の役割を果たす重要な組織だと考えられる。しかし、その重要性にかかわらず、傷上皮細胞の由来、再生後の細胞運命や、傷上皮が再生において果たす役割に関してはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、組織再生における傷上皮の細胞系譜と機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

第一部 傷上皮細胞の系譜解析

当研究室の先行研究により、ゼブラフィッシュのひれ再生中に発現誘導される遺伝子群が明らかにされた(Yoshinari et al., 2009)。本研究では、その中でも再生組織の表皮細胞で発現する *fibronectin (fn) 1b* 遺伝子に着目した。*in situ hybridization* によって mRNA 発現解析を行い、*fn1b* は傷上皮の細胞のマーカー遺伝子として有用であることを示した。

次に、*fn1b* 遺伝子とその近傍のゲノム領域を保持する Bacterial Artificial Chromosome (BAC) ベクターを用いて EGFP 発現トランスジェニック (Tg) を作製した。これにより、再生時の *fn1b* の内在性の発現を再現することに成功し、傷上皮形成過程のライブイメージングから、傷上皮細胞が主に鱗条（ひれの骨組織）間の表皮組織に由来することを示した。

さらに長期の細胞追跡を行うために、同じ BAC を用いて Cre 組換え酵素を発現する Tg を作製し、Cre-*loxP* システムによる傷上皮細胞の永続的な標識を行った。再生中の *fn1b*⁺ 傷上皮細胞の子孫細胞は、再生完了後のひれに残り、皮膚の一部となることを初めて示した。しかし一方で、*fn1b*⁺ 傷上皮細胞の多くは再生中から再生後にかけて、広範囲に及ぶ表皮シートの移動によって、ひれの先端へ押し出され消えてしまうことも明らかになった。以上の

結果から、*fn1b*⁺傷上皮細胞は創傷治癒において傷口を一時的にふさぎ、さらに再生後の皮膚にも貢献するが、長期にわたって再生完了後の表皮になるものは*fn1b*⁺傷上皮細胞の一部であることが示された。

さらに、ひれ先端部から徐々に失われる表皮がどのように補充されるかを明らかにするため、EdU 取り込みによる細胞増殖の解析を行った。その結果、定常（非再生）状態の表皮組織と比べ、再生中のひれの表皮組織では、切断部から遠く離れた基部側の領域でも細胞増殖が増加していることが明らかになった。つまり、再生組織ではひれの後端から徐々に表皮細胞が失われるが、これはひれ全体の表皮細胞の増殖によって補われるということが示唆された。以上の研究から、傷上皮細胞の由来・運命を含めた細胞系譜が判明し、再生後の表皮の再編成の仕組みも明らかになった。

第二部 傷上皮細胞の機能解析

第二に、本研究では、組織再生における傷上皮の機能について研究を行った。まず、エンハンサートラップ Tg のライブラリから、傷上皮基底層で発現が誘導される HGn21A 系統を同定した。この Tg では *fibroblast growth factor (fgf) 20a* 遺伝子の上流 1.6 kb の領域に EGFP カセットが挿入されており、*fgf20a* 遺伝子の発現を EGFP の発現によって再現していた。RT-PCR によって解析したところ、*fgf20a* は Fgf リガンドの中で最も早く、再生開始後の非常に早いステージから傷上皮基底層に発現しているリガンドのひとつであることが明らかになった。先行研究においては、Fgf シグナルはひれ再生に必須であることや (Poss et al., 2000), *fgf20a* の変異体で再生芽形成が起こらないことが示されていた (Whitehead et al., 2005)。従って、本研究により、*fgf20a* は、最も早期に傷上皮が発現する、再生芽形成を誘導する因子であることが示唆された。

次に、Fgf シグナルの再生における機能を検証するために、ドミナントネガティブ型 Fgf 受容体を誘導発現できる Tg の間葉細胞を、野生型の鰭条に移植によって導入し、ひれの間葉細胞で Fgf シグナルを阻害する系を新たに確立した。再生初期に、移植した間葉細胞で Fgf シグナルを阻害した結果、移植された間葉細胞は再生芽形成に寄与しなかった。このことから、傷上皮が発現する Fgf シグナル（主に Fgf20a と考えられる）は、間葉細胞に直接作用して、これらを再生芽へと誘導していることが示唆された。

さらに、再生芽誘導における Fgf20a の機能を解析するため、*fgf20a* の発現を誘導できる Tg を作製して gain-of-function 実験を行った。ひれ再生中に *fgf20a* 遺伝子を強制発現した結果、再生芽の先端細胞（先端再生芽）のマーカである *junbl* 遺伝子の発現領域が基部側へと大きく広がった。このことから、Fgf20a シグナルは実際に先端再生芽細胞の誘導をすることが示された。

さらに、本研究では、傷上皮の Fgf20a シグナルが再生芽の増殖にも関わっていることを示した。再生組織から上皮を除去しコラーゲンゲルに包埋した外植体を用い、外植体で *fgf20a* の強制発現を行った。その結果、先端再生芽マーカ *junbl* の発現が維持され、細胞増

殖も亢進した。また、同様の細胞増殖亢進は、再生芽細胞に発現する *fgf3* の強制発現によっても起こった。以上のことから、傷上皮の発する Fgf20a シグナルは、間葉細胞に作用して再生芽の誘導を行うとともに、先端再生芽の維持や再生芽の Fgf3 シグナルを介して細胞増殖の制御に関与していることが示された。

【考察・展望】

本研究により、付加再生で重要な役割を果たすと考えられてきた傷上皮細胞の系譜と Fgf20a シグナルを介した間葉細胞への作用機構が明らかになった。傷上皮における *fgf20a* の発現細胞は先端部の傷上皮基底層のみに限局し、*fn1b* が広範囲の傷上皮に発現するのは対照的である。*fn1b*⁺細胞と *fgf20a*⁺細胞は異なる細胞集団と考えられるため、*fgf20a*⁺傷上皮細胞の由来や細胞運命の解明が期待される。また、上皮組織の細胞系譜の解析により、新たに興味深い点がいくつか見つかった。特に、傷口から遠く離れた領域まで細胞増殖のシグナルが伝播することはこれまで知られていなかった。上皮細胞の分裂制御メカニズムの解明は、再生や恒常性維持の仕組みを明らかにする上で重要な課題である。さらに今後、傷上皮の誘導自身にかかわるシグナルやメカニズムが明らかになることによって、生物が本来持つ内在性の再生、修復力を使った再生医療への発展が期待される。

【報文目録】

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.

Shibata, E., Ando, K. and Kawakami, A. (2017). Transplantation of Mesenchymal Cells Including the Blastema in Regenerating Zebrafish Fin. *BIO-PROTOCOL* 7, 1–7.

Ando, K., Shibata, E., Hans, S., Brand, M., and Kawakami, A. (2017). Osteoblast Production by Reserved Progenitor Cells in Zebrafish Bone Regeneration and Maintenance. *Developmental Cell* 43, 643–650.

Shibata, E., Ando, K., Murase, E. and Kawakami, A. Heterogeneous fates and dynamic rearrangement of wound epidermis derived cells during and after zebrafish fin regeneration. (Submitted)

【参考文献】

Poss, K. D., Shen, J., Nechiporuk, A., McMahon, G., Thisse, B., Thisse, C. and Keating, M. T. (2000). Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev. Biol.* 222, 347–358.

Whitehead, G. G., Makino, S., Lien, C.-L. and Keating, M. T. (2005). Fgf20 Is Essential for Initiating Zebrafish Fin Regeneration. *Science* 310, 1957–1960.

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.

略語表

BAC: bacterial artificial chlomosome (細菌人工染色体)

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ジェ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: day(s) post amputation

dpt: days post transplantation

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

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

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

ER: estrogen receptor

Fgf: fibroblast growth factor

Fn1b: fibronectin 1b

hpa: hour(s) post amputation

HS: heat shock

ICI: fulvestrant

ISH: *in situ* hybridization

Krt4: keratin 4

N.S.: not significant

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

PBT: phosphate buffered saline with Tween20

PBTx: phosphate buffered saline with Triton X 100

PFA: paraformaldehyde

ROS: reactive oxygen species (活性酸素種)

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

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

TAM: 4-hydroxy tamoxifen (タモキシフェン)

Tg: transgenic (トランスジェニック)

Tricaine: 3-aminobenzoic acid ethyl ester

TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labelling

WT: wild-type (野生型)

第一章 緒論

1.1 組織再生とは

1.1.1 種間の再生能力の差

地球上に存在するすべての生き物には、目まぐるしい外界環境の変化（塩濃度変化, pH 変化, 温度変化等）に対して生体内の環境を保つための恒常性維持機構が備わっている。恒常性維持機構の最も顕著な例の一つが、外界から受けた傷害に対し、損失した部位をもと通りに回復する組織再生である。しかしながら、どれだけの規模の組織の損傷を再生できるかは、その生物種や組織によって大きく異なる (Fig. 1-1)。

哺乳類の場合、大きな損傷を受けたときの組織再生能力は多くの組織で限定的であるが、動物の中には驚異的な再生能力を持つものが存在する。中でもよく知られているのは、扁形動物門ウズムシ綱ウズムシ目に属するプラナリアである。プラナリアは、体を 10 以上の断片に分断されてもすべての断片から完全な一個体を再生することができる。極端な例では、たった 1 つの細胞から個体を再生できたという報告もある (Wagner et al., 2011)。

さらに面白いことに、プラナリアの仲間のすべてがこの驚くべき再生能力を持っているわけではない。プラナリアの仲間のうち、*Dugesia japonica* という種では全身を再生することができるが、*Phagocata kawakatsui* という種では頭を再生することができない (Fig. 1-1 A) (Frank R. Lillie, 1901; Sikes and Newmark, 2013)。イトミミズの仲間にも頭部の再生が可能な種と不可能な種が存在することが知られており、再生能力を進化系統樹と合わせて解析した研究からは、再生能力は進化的に獲得した形質ではなく徐々に失っていった形質であることが示唆されている (Bely, 2010; Bely and Sikes, 2010)。このことから、本来、多細胞生物は共通して高い組織再生能力を持っていたことが考えられる。

また、脊椎動物の中でも、イモリやアホロートルなどの有尾両生類は四肢を切断しても完全に再生できるのに対し、無尾両生類のカエルは四肢を切断されるとスパイクと呼ばれるパターンを失った軟骨塊のみを再生することが知られている (Fig. 1-1 B) (Brockes, 1997; Dent, 1962)。このように、近縁種の、見た目や構造が類似している相同器官であっても再生の成否が分かれることがあり、この差がなぜ生じているのかは非常に興味深い。

私たちヒトをはじめとする哺乳類は、上に述べた生物と比べればさらに再生能力が低いですが、組織についての小さな傷であれば修復することができる。さらに、日々摩耗する皮膚や消化器官などでは常に新たな細胞が生み出され、活発に細胞の入れ替わり（細胞新生）も起きている。また、若齢の個体はより高い再生能力を持ち、生後間もない新生児マウスでは、

心筋など、成体のマウスでは再生できない組織を再生できることが知られている (Fig. 1-1 C) (Porrello et al., 2011)。以上のように、種や個体によって差はあるが、多細胞生物はみな多かれ少なかれ再生能力を持ち、組織の恒常性を維持している。再生能力の高い生き物の組織再生過程を解明し、これを哺乳類でも再現することができれば、通常は再生できない組織の内在性の再生能力を高めるような新たな再生医療への展開が期待される。

1.1.2 付加再生の仕組み

組織再生は、大きく分けて、形態調節 (morphallaxis)、代償再生 (compensatory regeneration)、付加再生 (epimorphic regeneration) の3つに分類される (Gilbert, 2000)。形態調節は、残存組織を再構成し、なくなった組織を補う再生様式である。主にヒドラやプラナリアなどの無脊椎動物で見られる。細胞増殖をあまり伴わないため、再生完了直後は小さな個体となり、その後成長によって元通りのサイズまで回復する。代償再生は、分化した細胞がその機能を保ちつつ分裂し再生する様式で、哺乳類の肝臓の再生などでみられる。この再生過程では未分化な細胞群は現れない。

これらに対して、付加再生は、残存部位に新たな組織を付け足すように補う再生様式である。主に両生類の四肢再生や、魚類のひれなどの付属器官の再生で見られる。このプロセスでは、まず傷口を覆うように周辺の表皮細胞が遊走し、厚みを帯びた傷上皮と呼ばれる特殊な上皮構造を形成する。続いて、傷上皮直下に、未分化な増殖能を持つ細胞集団が形成される。この細胞集団は再生芽と呼ばれ、再生芽細胞が増殖・分化して失われた組織を再び作り出す。本研究で扱うゼブラフィッシュの尾ひれは、付加再生によって再生する。付加再生のメカニズムの解析を通して、多細胞生物、特に脊椎動物に共通する組織再生の基本原理や制御機構の解明が期待される。

1.1.3 ゼブラフィッシュの再生能力と尾ひれの構造

前述の様に、両生類 (特にイモリなどの有尾両生類) は様々な組織を再生することができるため、組織再生の研究に広く用いられてきた (Brockes, 1997)。しかし、有尾両生類は世代時間が長いので、分子生物学的・遺伝学的な解析を行うのは容易ではない。

ゼブラフィッシュは、両生類に比べ、様々な利点を持つモデル生物である。ゼブラフィッシュは、尾や四肢の相同器官と考えられるひれをはじめとして、心臓、網膜、脳、脊髄、鱗など、多様な組織を再生することができる (Becker et al., 1997; Bereiter-Hahn and Zylberberg, 1993; Bernhardt et al., 1996; Broussonet, 1786; Kroehne et al., 2011; Morgan, 1901; Poss et al., 2002)。

また、トランスジェニック (Tg) や変異体の作製手段が確立されていることをはじめ、全ゲノム解読によってほとんどの遺伝子が明らかになっており、組織再生過程を遺伝学的・分子生物学的に解析することのできる優れた系である。なかでも尾ひれは、①比較的少数の細胞種からなるシンプルな構造を持つ組織であること、②透明で生きたままの観察が容易であること、③両生類の四肢などと比べ短期間で再生が完了することなどの理由から、組織再生研究のモデルとして広く使われてきた(Kawakami, 2010; Pfefferli and Jazwińska, 2015)。

ゼブラフィッシュの尾ひれは、背側と腹側が長く中心が短い V 字型の形状をしており、鰭条と呼ばれる骨組織が根元から放射状に伸びている (Fig. 1-2 A)。鰭条は中空の竹筒を縦に半分に割って向い合せたような構造をしており、一对の鰭条の内側には間葉細胞、血管、色素細胞、神経線維などが存在している。鰭条と鰭条の間の鰭条間組織は、骨組織がないために非常に薄い組織であるが、表皮間には数層の間葉細胞や色素細胞などが存在している。

ゼブラフィッシュの尾ひれの再生過程では、切断後すぐに表皮細胞が傷口を覆い、1日後までに傷上皮が完成する。2日目には、残存の間葉組織の細胞から再生芽が形成され (Fig. 1-2 B)、さらに再生芽が増殖・分化することにより、約 14 日でほぼ元のサイズまで再生する (Fig. 1-2 A)。再生組織は一見一様に見えるが、遺伝子発現で見れば非常にヘテロな集団であることがこれまでの研究で示されている(Kawakami, 2010; Lee et al., 2009; Yoshinari et al., 2009)。再生の全容の解明のためには、ヘテロな再生組織の個々の細胞が再生過程でどのように振る舞い、そこにどのようなシグナルの授受が関わっているのかを明らかにすることが重要な課題である。

1.2 皮膚の構造と役割

1.2.1 哺乳類と魚類の表皮

皮膚は、外界環境の変化、病原体、化学物質や乾燥などに対して、生体内の環境を保つためのバリアとして働いており、生体内で最も大きな器官ともいわれている。多くの生物で皮膚構造は類似しているものの、各々の生物の生息環境によって、その特徴は少し異なる。

哺乳類をはじめとする陸生動物は、生体内の水分の蒸発を防ぐため、発達した角質層を獲得した。細胞の角質化は、ケラチンタンパク質の蓄積によっておこる。哺乳類の皮膚は四層構造になっており、深部から順に、幹細胞を含む基底層(basal layer)、有棘層(spinous layer)、顆粒層(Granular layer)、角質層(statum corneum)の順で積み重なっている(Fuchs, 2008; Solanas

and Benitah, 2013) (Fig. 1-3 A)。基底層から細胞が離れ、有棘層細胞になった段階から分化が始まり、表層に近づくにつれて分化が進み、一番表層の角質層は最終分化状態といえる。哺乳類における研究によれば、基底層に存在する表皮幹細胞は、非対称分裂によって、表皮幹細胞と transient amplifying cell (TAC) を生み出し、TAC は数回分裂して分化細胞を生み出すといわれている。基底層を離れるとケラチンの蓄積等の分化プロセスが始まってしまうため、哺乳類の表皮では基底層細胞のみが分裂能を有している。表皮幹細胞の分裂によって新たな TAC 細胞が供給され、表層から分化細胞が剥がれ落ち消失することにより、表皮組織の細胞の入れ替わりが起こり、恒常性が保たれている(Fuchs, 2008)。

ゼブラフィッシュの表皮は、基底層(basal layer)、中間層(suprabasal layer)、表層(surface layer)からなり、基本構造は哺乳類の表皮とよく似ている(Rakers et al., 2010; Rakers et al., 2013) (Fig. 1-3 B)。また、最近の研究によれば、ゼブラフィッシュの表皮の形成過程も哺乳類のものによく似ており、基底層に存在する幹細胞が、中間層・表層の分化細胞を生み出すことが示されている (Lee et al., 2014)。

一方で、水棲動物である魚類の表皮は、哺乳類とは異なる特徴ももっている。例えば魚類の表皮は明瞭な角質層を持たず、その代わり表面は粘膜層でおおわれている。また、哺乳類の表皮では基底層細胞だけが分裂能を有しているが、魚類では中間層細胞も分裂することが示唆されている(Le Guellec et al., 2004)。

以上のように、一部の相違はあるが、魚類のひれを含む表皮の組織構造や形成過程は、哺乳類の表皮のものとはほぼ共通している。特に、魚類のひれの表皮は、基底層から表層に至るすべての表皮細胞の蛍光ライブイメージングを比較的容易に行うことができる利点があり、表皮組織の細胞新生や再生を観察するための有用なモデルとなりうる。

1.2.2 傷上皮の構造と役割

前述の様に、付加再生の過程では、傷を覆った表皮が厚みを帯びて傷上皮と呼ばれる特殊な構造を作る。両生類の四肢再生においては、傷上皮は、15 層ほどの厚みのある構造と、マトリックスメタロプロテアーゼ、FGF、コラーゲンなどの特徴的な分子の発現によって定義されている(Campbell and Crews, 2008)。

傷上皮形成が再生にとって必須な役割を持つことは、イモリの肢再生で、様々な手段で傷上皮形成を阻害実験によって示されてきた。例えば、四肢切断直後に切断面を腹腔内に挿入したり、傷を覆うように表皮を移植したりして、創傷治癒と傷上皮形成が起こらないようにすると、四肢の再生が進行しない(Goss, 1956; Mescher, 1976; Tassava and Garling, 1979)。また、

毎日繰り返し傷上皮を除去すると、再生が阻害・または遅延する(Thornton, 1957)。以上の観察は、傷上皮が正常な組織再生に必須であり、傷上皮と再生芽の相互作用が再生の開始に必要なことを示唆している。最近では、ゼブラフィッシュのひれ再生において、傷上皮のソニックヘッジホッグシグナルが骨芽細胞のリクルートに関わっていることなども示唆されており(Armstrong et al., 2017), 傷上皮が傷口をふさぐバリアとしての機能だけでなく、組織再生において重要な役割を果たしていることを示す証拠が増えてきている。しかしながら、傷上皮の細胞系譜や、再生における具体的な役割については不明な点が多い。傷上皮細胞の役割を解明すること、そして傷上皮細胞の由来や再生後の分化運命を解明することは、付属器官の付加再生メカニズムや組織恒常性の原理を解明する上で重要な課題である(Yoshinari and Kawakami, 2011)。

1.3 本研究の目的

付加再生における傷上皮の重要性は古くから知られていたが、その細胞系譜や、組織再生における具体的な役割については明らかになっていない。本研究では、脊椎動物の中でも強力な再生能力を有し、遺伝学的解析に優れたゼブラフィッシュをモデルとして、尾ひれ再生中の傷上皮の細胞系譜および機能を明らかにすることを目的とした。傷上皮がどのように組織再生に関わっているのか明らかにできれば、組織再生の誘導の仕組みおよび組織のパターニングのメカニズム解明につながるだけでなく、再生医療の発展にもつながることが期待される。

1.4 図表および図表の説明

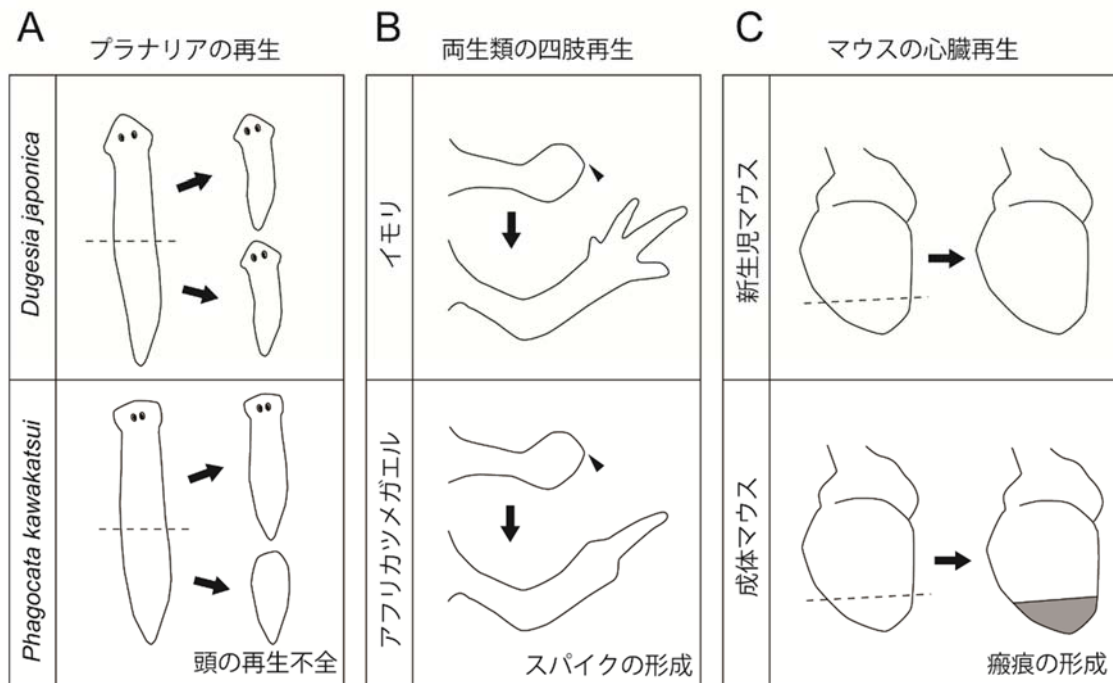


Fig. 1-1 再生能力は、生物種や個体の年齢によって異なる

- (A) プラナリアの再生。頭側と尾側の半分に切断された後、*Dugesia japonica* はどちらの断片からも全身を再生することができるのに対し、*Phagocata kawakatsui* は尾側断片から頭部を再生できない。
- (B) 両生類の四肢再生。有尾両生類であるイモリは、四肢を切断されても指まで完全に再生することができるが、無尾両生類であるアフリカツメガエルは、パターンニングを失った軟骨塊（スパイク）のみを再生する。
- (C) マウスの心臓再生。新生児マウスでは心房を切除しても心筋を再生することができるが、成体のマウスでは心筋は再生せず、代わりに瘢痕形成が起こって心機能が低下する。

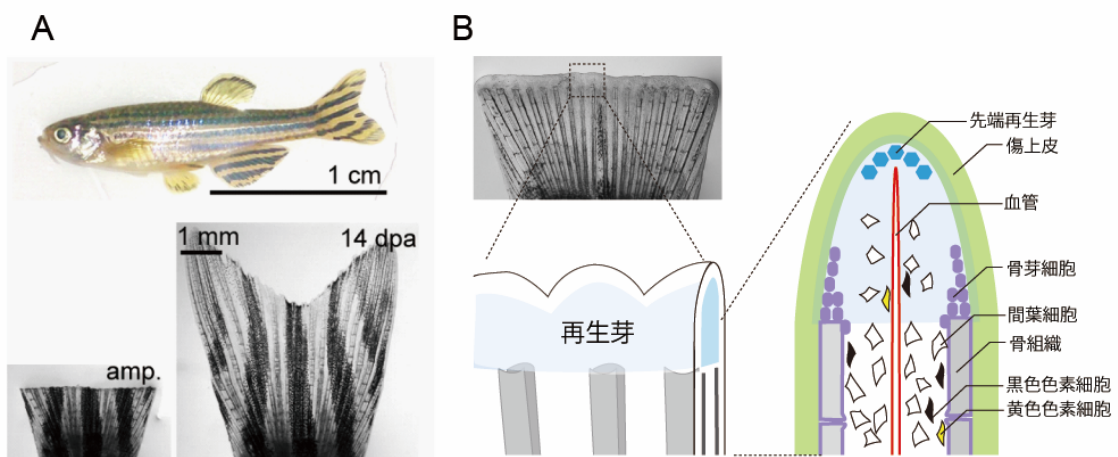


Fig. 1-2 ゼブラフィッシュの尾ひれは 14 日ほどで再生する

- (A) ゼブラフィッシュの、切断直後の尾ひれ (amp., 左) と 14 日後の尾ひれ (14 dpa, 右)。尾ひれには放射状に鰭条 (骨組織) が存在している。切断後 14 日でほぼ完全に再生が完了する。
- (B) 2 dpa の尾ひれとその構造を示す模式図。2 dpa には再生芽が形成される。再生ひれは、右側の縦断面の模式図に示すような多様な細胞・組織で構成されている。

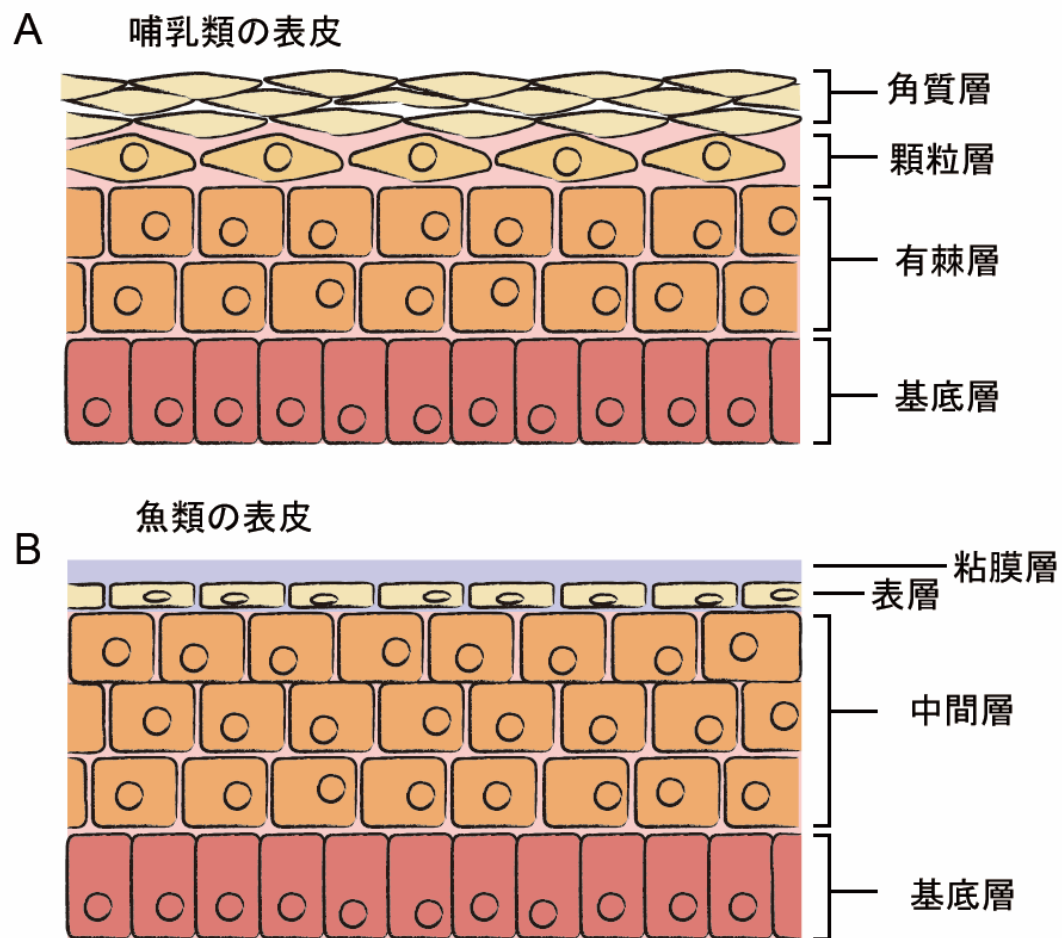


Fig. 1-3 哺乳類と魚類の表皮構造

- (A) 哺乳類の表皮。深部から順に、基底層、有棘層、顆粒層、角質層からなる。
- (B) 魚類の表皮。深部から順に、基底層、中間層、表層からなる。表面は角質ではなく粘膜でおおわれている。

第二章 傷上皮細胞の系譜解析

2.1 背景と目的

2.1.1 再生細胞の系譜

近年の研究によって、再生組織の細胞は予想以上にヘテロな細胞集団であり、細胞群ごとに分布や遺伝子発現、役割が異なっていることが示唆されてきた(Yoshinari et al., 2009)。再生にかかわるシグナル経路の解析と同時に、多様な再生細胞がどの組織に由来するのか、そして再生後どのような組織になるのかを明らかにすることは、再生メカニズムの解明にとって重要な課題である。

近年、いくつかの研究で、ゼブラフィッシュの尾ひれ再生における細胞系譜の解析が試みられている。Tuらは、Tol2トランスポゾンシステムによりEGFPをモザイク状に発現するゼブラフィッシュを作製して、細胞系譜解析を行った(Tu and Johnson, 2011)。彼らは、全身の多種の細胞で活性を持つEF1 α プロモーターの下流にEGFPを配置したコンストラクトを受精卵にインジェクションし、ひれでモザイク状にEGFPを発現するゼブラフィッシュを作製した。このひれを切断し、その細胞群の再生後の運命を追跡する方法によって、彼らは、表皮は再生後も表皮に、骨芽細胞は再生後も骨芽細胞に、間葉細胞は再生後も間葉細胞に、血管は再生後も血管になることを観察した。すなわち、ゼブラフィッシュのひれ再生においては細胞の分化運命は再生前後で固定されていて、細胞タイプの分化転換は起こらないことを示した。また、Stewartらは発生中のひれでCre-loxP組換えを起こしランダムに細胞をラベルする手法を用いて、Tuらと同様の結論を示した(Stewart and Stankunas, 2012)。

以上の研究から、ゼブラフィッシュひれ再生においては再生前後で細胞の運命は変化しないことが示唆されたが、どちらの報告でも再生以前にあらかじめラベルした細胞の再生後の運命を観察しているため、再生時特異的な構造である再生芽や傷上皮などの構成細胞がどのような組織に由来し、それらは再生後にどのような細胞運命をたどるかは明らかでない。また、上の報告では、細胞のラベルをランダムに行っているため、狙った細胞のみをラベルすることは困難であり、複数の種類の細胞が混在している可能性もある。つまり、再生組織の細胞の系譜を解析するには、傷上皮や再生芽で特異的に発現する遺伝子をマーカーとし、Tgを用いた遺伝学的なラベルを行うことが望ましい。

2.1.2 Cre-loxPシステムによる細胞種特異的な組換えと系譜解析

Cre-loxPシステムは近年の細胞系譜解析によく使われる手法である。Creタンパク質はバ

クテリオファージ P1 由来の部位特異的組換え酵素であり、*loxP* 配列と呼ばれる短い特定の DNA 配列を認識して組換えを起こし、2つの *loxP* 配列に挟まれた領域をとり除くことができる (Sternberg, 1981)。Cre-*loxP* 組換え後に、ユビキタスなプロモーター制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター Tg を用いれば、Cre 組換えの起こった細胞とその子孫細胞を永続的に標識・追跡することが可能である。

薬剤で Cre-*loxP* 組換えを誘導する場合には、CreERt2 が用いられる。CreERt2 は、Cre とエストロゲンレセプター (ER) との融合タンパク質であり、エストロゲンまたはそのアナログの存在下で組換えが誘導される。さらに ERt2 には2か所に変異 (t2 変異) が導入されており、ERt2 は内在性のエストロゲンには低いアフィニティでしか結合しないが、生体内に存在しない小分子の tamoxifen や 4-hydroxy tamoxifen (TAM) には高いアフィニティで結合する (Feil et al., 1997)。この改変によって Cre の組換え活性は TAM の投与によって任意に誘導することができ、狙ったタイミングで細胞をラベルすることができる。

2.1.3 本研究の目的

イモリの四肢再生では、傷上皮形成を阻害すると再生は進行しないことから、傷上皮細胞が再生芽形成を誘導することが示唆されてきた (Goss, 1956; Thornton, 1957; Mescher, 1976; Tassava and Garling, 1979; reviewed by Campbell and Crews, 2008)。傷上皮は、傷口をふさぐバリアとしての機能に加え、組織再生においてさらに重要な働きを果たしていると考えられる。しかしながら、傷上皮を形成する細胞の由来や、再生完了後の細胞系譜に関しては明らかになっていなかった。そこで、本研究では、再生のカギといえる傷上皮細胞の由来と運命を解析することを第一の目的とした。このため、再生時特異的に傷上皮で発現する *fibronectin (fn) 1b* 遺伝子を用いて CreERt2 発現 Tg を作製し、Cre-*loxP* システムを用いて傷上皮のラベルおよび細胞系譜解析を行った。

2.2 結果

2.2.1 *fn1b* は傷上皮で広範囲に発現する

当研究室の先行研究から、再生中のひれで発現上昇する遺伝子群が明らかになっており、中でも *fn1b* は再生中のひれの表皮で発現上昇することが示されていた (Yoshinari et al., 2009)。そこで、本研究では *fn1b* に着目し、Whole mount *in situ* hybridization (ISH) により再生中の発現を詳細に検証した。0.5 day(s) post amputation (dpa) では、*fn1b* は切断面よりも基部側の領域を含む再生組織全体で強く発現していた (Fig. 2-1)。2 日目以後は、主に再生組織の鰭条間の領域で発現が見られた。さらに詳細に発現を見るため、組織切片を作製して観察したところ、*fn1b* の発現は主に再生組織の表皮細胞でみられることが明らかになった (Fig. 2.1)。以上のことから、*fn1b* は、傷上皮形成初期から傷上皮に発現しており、すべての傷上皮細胞ではないかもしれないが、広範囲の傷上皮細胞をラベルするために使うことのできる良いマーカー遺伝子であることが示唆された。

2.2.2 トランスジェニックゼブラフィッシュによる *fn1b* 発現細胞の可視化

次に、*fn1b* 発現細胞を可視化するため、高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 発現トランスジェニック (Tg) ゼブラフィッシュ、Tg(*fn1b:egfp*) の作製を行った。本研究の先行研究ではいくつかの Tg 作製が試みられており、再生関連遺伝子の発現を完全に再現するためには数 kb のプロモーター領域では不十分であることが明らかになっていた。そこで、プロモーター領域だけでなく、ゲノム上に広範囲に存在すると考えられるエンハンサー領域を含むよう、Bacterial Artificial Chromosome (BAC) を用いて Tg を作製した (Fig. 2-2A)。本研究では、ゼブラフィッシュ *fn1b* 遺伝子上流を含む、約 57 kb のゲノム断片が含まれている BAC クローンを用いた。

BAC ベクター上の *fn1b* 遺伝子の翻訳開始コドンに、*egfp* カセットを相同組換えによって挿入した。さらに、ゲノムへの挿入効率を上げるため、メダカ由来のトランスポゾン配列である *tol2* 配列を BAC ベクター上に挿入した。1 細胞期の受精卵に BAC コンストラクトとトランスポゼース mRNA をインジェクションし、その胚を育て、F0 世代を得た。F0 世代同士を掛け合わせ、得られた胚から EGFP の発現を指標にスクリーニングを行い、F1 世代を得た。得られた Tg は 3 世代以上、野生型と交配させ、Tg(*fn1b:egfp*) として確立した。

このようにして確立した Tg(*fn1b:egfp*) では、成魚の切断前のひれにも、全体的にごく弱く蛍光が観察された (Fig. 2-2B)。しかし、ひれを切断して再生を誘導すると、0.5 dpa で、形成中の傷上皮に EGFP の蛍光が検出されはじめた (Fig. 2-3A)。1 dpa 以降は、ISH で検出し

た内在性の *fn1b* 遺伝子発現とほぼ一致して、EGFP 蛍光が傷上皮細胞で見られた (Fig. 2-3A)。ISH での検出に比べ、EGFP 蛍光の発現開始は多少遅れていたが、これは EGFP タンパク質の成熟に時間がかかるためだと考えられる。その後、EGFP 蛍光は4日目をピークに徐々に減衰していき、6日目には鰭条間組織にわずかに見えるだけになった (Fig. 2-3B)。1 dpa のひれの組織切片を作製し、表皮マーカーである抗 E-cadherin 抗体によって免疫染色した結果、EGFP を発現する細胞は、内在性の *fn1b* 発現と同様、主に傷上皮細胞であることが確かめられた (Fig. 2-3C)。また、この Tg では、切断面より基部側の鰭条の内側の間葉細胞にも EGFP 発現が認められた (Fig. 2-3A)。ISH 条件を検討し、ハイブリダイゼーション時間を延長した結果、鰭条の内側の部分でも *fn1b* 発現が見られた (Fig. 2-3D)。このことから、鰭条の内側の EGFP 発現も内在性の発現を再現していることが示された。この細胞は発現場所や形態から容易に傷上皮細胞と区別できるため、以後はアスタリスクで示す。

さらに興味深いことに、2 dpa で Tg(*fn1b:egfp*)のひれを観察すると、いくつかのひれでは、鰭条間の EGFP⁺細胞が隣の鰭条に覆いかぶさるように分布する様子が観察された (Fig. 2-4A)。そこで、24 hours post amputation (hpa) から 30 hpa まで、5分おきに6時間のタイムラプスイメージングを行って、EGFP 発現の経時変化を詳細に観察した。その結果、EGFP⁺細胞の分布が鰭条間の領域から隣の鰭条の先端へ移動して広がっていくことが示唆された (Fig. 2-4B)。以上の Tg(*fn1b:egfp*)における観察から、傷上皮細胞は主に鰭条間上皮細胞に由来し、移動して傷上皮を形成することが示唆された。

2.2.3 Cre-loxPシステムを用いた *fn1b*⁺傷上皮細胞の系譜解析

Tg(*fn1b:egfp*)によって *fn1b*⁺傷上皮細胞のライブイメージングが可能になり、再生過程に *fn1b*⁺細胞の分布が大きく変化することが明らかになった。しかし、この変化が *fn1b* の発現パターンの変化によるものなのか、それとも *fn1b*⁺細胞の移動によるものなのか、あるいはその両方なのかは完全には結論できない。これを検証するには、細胞をラベルして追跡する系の確立が必須である。そこで本研究では、Cre-loxP 部位特異的組換えシステムを用いた *fn1b*⁺細胞の追跡を行った。本研究では、Cre 組換え酵素の標的である *loxP* 配列を持つレポーターとして、当研究室の先行研究で作成された Tg(*Olactb:loxP-dsRed2-loxP-egfp*)を用いた。この Tg は、メダカ由来βアクチンプロモーター (*Olactb*)、*loxP* 配列で挟まれたサンゴ由来赤色蛍光タンパク質 (*dsRed2*) と *egfp* の配列を持ち、組換え前は全身のほとんどの細胞で DsRed2 タンパク質を発現するが、組換え細胞では EGFP タンパク質が発現し、いったん組換えを起こした細胞は EGFP を永続的に発現し続ける (Fig. 2-5 A,B) (Yoshinbari et al. 2012)。

Tg(*fn1b:egfp*)と同様に、前述の BAC クローンを用いて、Cre リコンビナーゼ発現 Tg,

Tg(*fn1b:creERT2*)を作製した (Fig. 2-6A)。BAC ベクター上の *fn1b* 遺伝子の翻訳開始コドン部位に、*creERT2* カセットを相同組換えによって挿入し、先ほどと同様に *tol2* 配列を BAC ベクター上に挿入した。さらに、キャリアを容易に同定するため、目のレンズに発現する遺伝子である *crystalline alpha A (cryaa)* のプロモーター下に *egfp* 配列を含むカセットも、ベクター上に挿入した。1 細胞期の受精卵に BAC コンストラクトとトランスポゼース mRNA をインジェクションし、その胚を育て、F0 世代を得た。F0 世代同士を掛け合わせ、得られた胚のレンズでの EGFP 発現を指標にスクリーニングを行い、F1 世代を得た。得られた Tg は 3 世代以上、野生型と交配させ、Tg(*fn1b:creERT2*)として確立した。

次に、この Tg と、レポーターTg(*Olactb:loxP-dsRed2-loxP-egfp*)とのダブル Tg を作製した。このダブル Tg では、TAM を投与しない条件下ではほとんど組換え細胞は観察されなかったが (Fig. 2-6B)、ひれ切断後、1 μ M TAM を含む飼育水で処理すると、処理開始後 24 時間程度で、Cre 組換えによる EGFP 発現細胞が観察され始めた (Fig. 2-7A)。ラベルされた細胞の分布は、ISH および Tg(*fn1b:egfp*)で観察された *fn1b*⁺細胞の分布と一致していた。さらに、組換えによってラベルされる細胞は傷上皮の基底層から表層まで一様に分布し、ラベルされる細胞の種類に偏りはなかった (Fig. 2-7B)。Tg(*fn1b:creERT2*)の作製により、*fn1b*⁺傷上皮細胞を Cre-*loxP* 組換えにより永続ラベルできる系が確立した。

2.2.2 で述べた通り、Tg(*fn1b:egfp*)における観察から、鰭条間の表皮細胞が隣接する鰭条に覆いかぶさるように移動する可能性が示された。これが細胞の移動によるのかを検証するため、細胞の Cre 標識と追跡を行った。0–24 hpa の間、1 μ M の TAM を投与して Cre 組換えによる細胞ラベルを誘導し、24 hpa から 48 hpa まで 1 時間おきにライブイメージングを行った結果、はじめに鰭条間の領域に存在した EGFP⁺細胞が徐々に鰭条に覆いかぶさるように移動して傷上皮を形成していることが明らかになった (Fig. 2-8)。以上のことから、傷上皮が実際に鰭条間の表皮細胞に由来し、この細胞の先端および側方への移動によって、傷上皮が形成されることが明らかになった。

2.2.4 傷上皮形成初期の *fn1b*⁺細胞は 5 日程度で消失する

次に、*fn1b*⁺細胞の細胞運命を詳細に追跡するため、再生の各ステージで TAM をパルス投与し、それぞれの再生ステージでラベルされた傷上皮細胞の追跡を行った。

まず、ひれ切断後 9-10 時間 (傷上皮形成の初期) に 0.1 μ M の TAM を投与して組換えを誘導した。TAM 投与から 24 時間以降にラベル細胞が再生組織先端の表皮に局在しているのが見え始めた (Fig. 2-9A)。これらのラベル細胞は、再生が進むにつれ先端側に移動して扁平な形状になり、5 dpa までにほぼすべて消えてしまった (Fig. 2-9A,B)。TdT-mediated dUTP

nick end labelling (TUNEL) 染色により細胞死を検出したところ、ラベル後 3 日目の時点でラベル細胞の多くは TUNEL 陽性であり (Fig 2-10), 傷上皮由来の細胞は細胞死によって失われたことが示された。先行研究によって, 表皮細胞の分裂は切断後 24 時間まではほとんど認められないことが報告されている (Nechiporuk and Keating, 2002; Poleo et al., 2001)。したがって, 傷上皮形成初期の *fn1b*⁺細胞は, 増殖することなく傷口に動員され, 傷口を一時的に覆って初期の傷上皮を形成するが, すぐに続くステージで細胞死によって失われることが明らかになった。

2.2.5 傷上皮形成後期に出現する *fn1b*⁺細胞には消失するものと再生後もひれに残るものがある

次に, 0.1 μM の TAM をひれ切断後 24-25 時間で投与し, 傷上皮形成後期のステージで *fn1b* を発現する細胞で組換えを誘導した。先ほどと同様に, TAM 投与 24 時間後にラベル細胞が観察され始めたが, 傷上皮形成初期のラベルとは異なり, ラベル細胞は鱗条間の表皮細胞に多く局在していた (Fig 2-11)。また, 細胞運命も傷上皮形成初期のラベル細胞とは異なり, 再生後の表皮組織に残った (Fig 2-11)。傷上皮形成の初期と後期で, *fn1b* を発現する細胞のタイプは異なり, 再生過程での細胞運命も異なることが明らかになった。

さらに, これらのラベルされた傷上皮細胞とその子孫細胞の追跡を続けると, ラベル細胞は増殖し, それぞれ細胞のコロニーを形成していった。再生が進むにつれ, 個々のコロニーに含まれる細胞数は増え, 1 コロニー当たりの面積も大きくなったが, コロニー自体の数は逆に減少していった。しかし, 最終的にすべてのラベル細胞が消えてしまうわけではなく, 再生がほぼ完了する 14 日後以降もひれに残るコロニーも存在した (Fig 2-11)。

そこで次に, *fn1b*⁺傷上皮細胞が, 再生後の皮膚へどのように寄与するかを調べるために, ひれ切断後 2 日から 5 日まで濃度 1 μM で TAM を投与し, できるだけ広範囲に多くの *fn1b*⁺細胞をラベルし追跡を行った (Fig 2-12A)。その結果, ひれ切断後 1 週間目までにはひれの先端付近に小さいラベル細胞のコロニーが数多く形成されるが, 2 週目以降は次第に数が減っていた。ImageJ を用いてコロニーの面積と数を定量すると, コロニーの数はひれ切断後 1 週目から 3 週目までにおおよそ 20% まで減少し, 代わりに 1 つ 1 つのコロニーが大きく成長して, 3 週目でのコロニーの平均面積は 1 週目の約 6.5 倍になっていることが明らかになった (Fig 2-12B,C)。3 週間以降も, ひれに残り続けたコロニーの数はゆっくりと減少していったが, 一部のコロニーは 4 カ月以上もひれの表皮に残り続けた (Fig 2-12D)。以上のことから, 傷上皮形成後のステージに見られる *fn1b*⁺傷上皮細胞には, 再生中に消失する運命をたどるものと, 再生した皮膚に長期に寄与するものの 2 通りの細胞系譜が存在する

ことが明らかになった。

2.2.6 1細胞レベルでの *fn1b*⁺傷上皮細胞の運命追跡

以上の細胞追跡から、*fn1b*⁺傷上皮細胞の一部は再生後の皮膚になるが、かなりの部分は再生中に消失してしまうことが明らかになった。次に、この細胞運命の違いがどのように生じているのかを検証するために、1細胞レベルで *fn1b*⁺傷上皮細胞の運命追跡を行った。

上記の TAM を用いた Cre ラベルでは、多数の *fn1b*⁺傷上皮細胞が一度にラベルされ、1細胞ごとの追跡を行うことは困難であった。そこで、疎に細胞ラベルを行うため、TAM の代わりに別の ER 拮抗剤である fulvestrant (ICI) を用いた。ICI は ER に結合すると活性化と同時に ER の分解を引き起こす (Robertson, 2001)。このため、CreERt2 の組換え活性が低下し、低頻度の組換えを誘導することが期待された。

実際に、Tg(*fn1b:creERt2*; *Olaclb:loxP-dsRed2-loxP-egfp*) のひれを切断し、2–3 dpa の 24 時間、2.5 μM の ICI を溶かした飼育水で飼育し組換えを誘導すると、実際に個々のラベル細胞が接しない程度の、低頻度の細胞ラベルを行うことができた (Fig. 2-13)。

2.2.7 切断面から遠い基底層細胞が再生後の皮膚に寄与する

ICI 投与による低頻度ラベルを行って、EGFP がはっきりと見え始める 5 dpa で、隣り合うラベル細胞と接触していない EGFP⁺細胞コロニーをランダムに選び、蛍光実体顕微鏡下で毎日観察して個々のコロニーを追跡した。さらに 1 日おきに共焦点顕微鏡で 3 次元画像を取得して、それぞれのコロニーに含まれる細胞数や細胞タイプも観察した (Table.1, Fig.2-14)。この結果を、(Fig. 2-15) に模式的に示した。得られた結果は基本的には TAM を用いたラベルで得られた結果と一致しており、ラベル細胞の中には再生完了までに消えてしまうものと再生完了後も残り続けるものの 2 種類が存在した。5 dpa の段階では、表層の細胞のみからなる細胞集団は 1 つだけ (2.4%) であり、68.3% (26/41) は基底層細胞のみ、29.3% (14/41) は中間層細胞のみからなる細胞集団だった。

再生完了 (15 dpa) までの各コロニーの運命を解析すると、再生完了 (15 dpa) までに消えてしまうものの割合は 65.9% (27/41) であり、再生完了後の表皮に残ったものは 34.1% (14/41) であった。

再生が進むにつれ、中間層細胞のみのコロニーは分裂しながら表層の細胞を生み出し、最終的に表層のみのコロニーになって消えてしまうケースが見られた (Table. 1 に示すコロニー #8, #15, #17, #34 等)。

また、基底層細胞のみからなるコロニーも、同様に分裂し、分化細胞である中間層細胞・

表層の細胞を生み出したが、これらは 15 dpa の時点でも基底層細胞を保持しているものが多く見られた (Table. 1 に示すコロニー#1, #6, #11 等) (Fig. 2-15, 2-16 A)。実際、15 dpa でひれに残っているコロニーの中で、基底層細胞を含んでいるものの割合は 93.3% (15 個中の 14 個) だった。すなわち、再生後のひれ表皮に寄与するのは主に傷上皮の基底層細胞であり、傷上皮の中間層・表層の細胞の子孫の多くは 15 dpa までに失われることが示された。

一方、基底層細胞を含むコロニーでも、再生中に消えてしまうものも多数あった (Table. 1 に示すコロニー#2, #4, #5, #10 等)。特に、ラベルされたコロニー全体の動きをみると、これらが全体にひれの先端側に向かって動き、先端に至ると消失しているように見えた (Fig. 2-15)。実際に、観察した全コロニーを、再生中に失われたものと、再生後もひれに残るものとに分けて、5 dpa でのひれ先端部分からの距離を定量すると、5 dpa でひれの先端に近いコロニーは、再生中に失われていることが示された (Fig. 2-16 B)。以上の結果をまとめると、ひれの表皮全体が先端側に徐々に移動し、これによって傷上皮に由来する再生表皮細胞の多く (約 70%) は先端側から徐々に失われ、ひれの先端から遠い部分にいる子孫細胞だけが再生後の皮膚に寄与することが明らかになった。

2.2.8 中間層の細胞と表層の細胞は再生中に基底層細胞へ脱分化しない

これまでの結果から、再生後も長期に維持される表皮細胞クローンを作り出すには、通常の皮膚の細胞新生と同様に、基底層細胞が必要であることが示唆された。通常の皮膚組織では、細胞の分化は深部から表層への一方通行のプロセスであり、分化した中間層細胞や表層細胞が基底層細胞を生じることはないと考えられている。ところが、イモリの四肢再生・およびゼブラフィッシュのひれ再生においては、分化した細胞が脱分化を起こし、再生組織の細胞の供給源となることが複数報告されている (Geurtzen et al., 2014; Knopf et al., 2011; Sandoval-Guzmán et al., 2014)。したがって、表皮の再生においても、基底層細胞以外の細胞が脱分化によって基底層細胞になり、子孫細胞を生み出している可能性も考えられる。そこで、中間層細胞や表層細胞が脱分化する可能性を検証するため、あらかじめ中間層細胞と表層の細胞を *Cre-loxP* システムにより標識し、ひれ切断後の細胞系譜を追跡した。

先行研究から、*keratin 4 (krt4)* 遺伝子は再生ひれの表皮の中間層・表層細胞で発現することが報告されている (Wehner et al., 2014)。そこで、*krt4* 遺伝子上流の 4 kb のプロモーターの下流で *gal4* 遺伝子を発現する *Tg(krt4:gal4)* と、UAS 配列の下流に EGFP をつないだ *Tg(UAS:GFP)* を掛け合わせてダブル *Tg(krt4:gal4; UAS:GFP)* とし、これを用いて非再生時のひれにおける EGFP の発現を観察した。Tg のひれを共焦点顕微鏡で観察したところ、確かに基底層細胞を除く表皮細胞で EGFP 蛍光が見られ (Fig. 2-17 A,B), *krt4* 4 kb プロモーター

を用いれば、再生前にひれの中間層と表層の細胞をラベルできることが分かった。

そこで、*krt44* kb プロモーターを用いて Tg(*krt4:creERt2*)を作製し、Tg(*Olactb:loxP-dsRed2-loxP-egfp*)と掛け合わせた。このダブル Tg を 1 μ M の TAM を溶かした飼育水で 24 時間飼育し、組換えを誘導した (Fig. 2-18 A, B)。共焦点顕微鏡の z-stack 画像から再構成した光学切片像を観察すると、ラベルされた細胞のほとんどは、期待通り中間層と表層に分布していた (Fig. 2-18 C)。また、TAM を与えない条件下では、再生時も、非再生時でも組換え細胞は検出されなかった (Fig. 2-18 D)。以上のことから、実際に、主に中間層細胞と表層の細胞を Cre ラベルできることが示された。また、ラベル細胞はわずかに基底層細胞にも見られた (2.7%)。

次に、Cre ラベルしたひれを切断して、再生領域におけるラベル中間層・表層細胞の運命を追跡した (Fig. 2-19 A)。その結果、ほとんどのラベル細胞は、再生中の表皮の中間層及び表層に見られた (Fig. 2-19 B)。ラベル細胞はわずかに基底層細胞にも見られたが、その割合は 1.7%で、切断前に少数ラベルされた基底層細胞の割合と変わらなかった (Fig. 2-19 C)。したがって、中間層・表層細胞の多くが再生中に脱分化して基底層細胞になることはないことが示された。

2.2.9 ひれ全体の表皮細胞が細胞増殖することで、再生後の皮膚が供給される

ここまでの運命追跡の結果、意外なことに、*fn1b*⁺傷上皮細胞の多くが、再生中にひれの後端に向かって移動して失われることが示された。これだけの数の表皮細胞が再生中に失われるとすると、再生後の表皮に貢献する細胞は、どこから供給されるのだろうか？ これを明らかにするために、再生中のひれでの細胞増殖を EdU 取り込みによって調べた (Fig. 2-20 A)。

その結果、非再生状態のひれ表皮では、EdU 陽性細胞はわずかしか観察されなかったが (Fig. 2-20 B)、傷上皮由来細胞の多くが失われる時期である 10 dpa のひれの表皮では、EdU 陽性細胞の数が顕著に増加していた (Fig. 2-20 C-F)。また、EdU 陽性細胞のひれの中での分布を調べるため、切断部付近、切断部分より先端側の領域、切断部より基部側の 3 つの領域で、EdU 陽性細胞の数を比べたところ、どの領域でもほぼ同じ数の EdU 陽性細胞が観察された (Fig. 2-20 F)。このことから、再生後の表皮に貢献する細胞は、ひれの基部側の領域を含む、全体的な細胞増殖の誘導によって供給されていることが示唆された。また、共焦点顕微鏡により z-stack 像を取得し EdU 陽性細胞の種類を調べたところ、再生時にはどの領域でも、基底層細胞も中間層細胞も同様に盛んに分裂していた (Fig. 2-20 C-F)。

以上のことから、傷上皮由来の細胞は再生した表皮にいったんは寄与するが、これらの細

胞は再生中に表皮シートがひれ先端側へ全体的に移動することによって徐々に先端から失われることが示された。そして、この失われた傷上皮由来細胞と相補的に、基部側の領域も含めた広範囲の領域の基底細胞・中間層細胞の細胞分裂が起こり、表皮細胞の再構築が起こっていることが明らかになった。

2.3 考察

傷上皮が再生の開始や制御を担う重要な組織であることは古くから知られていたが、傷上皮細胞の由来や再生後の運命に関しては解明されていなかった。本研究では、再生組織の表皮細胞に誘導される *fn1b* 遺伝子を傷上皮のマーカーとして、傷上皮の細胞系譜を追跡することに成功した。その結果、傷上皮細胞は主に鰭条間の表皮からリクルートされ、一部は再生後の表皮組織を作るが、多くは一過的に組織修復に関与した後、再生中に消えてしまい、再生完了後の表皮には一部しか残らないことを明らかにした。また、再生中の表皮細胞は、表皮シート全体が先端側へ移動するようにして先端側から徐々に失われ、これを補うように基部側の領域も含めた全体的な細胞増殖が起こり、新たな表皮細胞が供給されていることを明らかにした。本研究により、傷上皮の細胞起源、そしてヘテロな細胞運命、さらに再生中後期にかけた表皮のダイナミックな再編機構が明らかになった。

2.3.1 傷上皮マーカーとしての *fn1b*

本研究では、*fn1b* を傷上皮マーカー遺伝子として用いた。両生類の四肢再生においては、傷上皮は 15 層ほどの厚みを帯びた層構造と、マトリックスメタロプロテアーゼや FGF、コラーゲンなどの発現などによって定義されている (Campbell and Crews, 2008)。ゼブラフィッシュのひれでは、傷上皮に発現する遺伝子群として *Insulin growth factor receptor 1* (Chablais and Jazwinska, 2010), *laminin beta 1a* (Chen et al., 2015), *lymphoid enhancer-binding factor 1*, *sonic hedgehog*, *wnt5b*, *pea3* (Lee et al., 2009) などが報告されているが、これらの遺伝子の発現は主に基底層など、傷上皮の一部のみで見られる。今回我々が用いた *fn1b* は傷上皮細胞の基底層・中間層・表層のすべての層で発現しており、多くの傷上皮細胞をラベルすることができる良い傷上皮マーカーであると考えられる。しかし、再生時の発現からわかるように、*fn1b* の発現は鰭条間の領域で強く、場所によって発現強度に偏りがあり、Cre 組換えによってラベルされる細胞にも偏りがある可能性がある。本研究室での先行研究から、*juncb* 遺伝子も傷上皮で再生の非常に早いステージから発現上昇することが明らかになっており (Yoshinari et al., 2009), *juncb* 遺伝子もまた良い傷上皮マーカーになるかもしれない。

2.3.2 傷上皮細胞は主に鰭条間の表皮に由来する

本研究の Tg(*fn1b:egfp*) と Tg(*fn1b:creERT2*) を用いたライブイメージングにより、鰭条間の表皮細胞が移動して切断面を覆い、傷上皮を形成していることが明らかになった。以前の研究では、蛍光色素 Dil を表皮にインジェクションしてひれを切断し、表皮細胞の短期追跡を

行った実験から、切断面からかなり基部側の領域の表皮が遊走してきて傷上皮を形成することが報告されていた(Poleo et al., 2001)。これまで、表皮が実際に移動して傷上皮を形成する過程を直接示した研究は無く、本研究によって鰭条間表皮の傷上皮への寄与が初めて明らかになった。また、Cre-loxP 組換えにより表層の細胞のみをラベルできる *Skinbow Tg* を用いた最近の研究からは、創傷治癒時には、鰭条間の表層細胞のほうが鰭条の上の表層細胞より移動度が高いことが示されている(Chen et al., 2016)。このことは、鰭条間の表皮細胞が創傷治癒と傷上皮形成にかかわっているという本研究の観察と一致している。また、ひれ再生初期には、鰭条間の表皮が主に細胞分裂し、鰭条の表皮では細胞分裂があまり見られないという報告もある(Gauron et al., 2013)。以上のことから、ひれの表皮細胞は一様に見えるが、鰭条と鰭条間で異なった性質を持つヘテロな細胞から構成され、特に、鰭条間の領域がニッチとなって表皮幹細胞の多くが維持されている可能性も考えられる。これを明らかにするためには、鰭条の表皮で発現する遺伝子マーカーの探索と、それを用いた細胞系譜解析を合わせて行う必要がある。鰭条の領域と鰭条間の領域で基底膜構成成分を比較し、幹細胞ニッチに関わる細胞間マトリクスなどを探索するのも有効な手段だろう。

2.3.3 *fn1b*⁺傷上皮に由来する表皮細胞の多くは再生中に失われる

本研究の運命追跡により、傷上皮形成初期の段階(9–10 hpa)に *fn1b* を発現する傷上皮細胞は、5 dpa までに細胞死によって消えてしまうことが明らかになった。このことから、初期 *fn1b*⁺傷上皮細胞は、ひれ切断後速やかに傷口を覆う役割を果たすが、再生後の表皮には寄与しないことが明らかになった。以前の研究では、ひれ切断後の創傷治癒時に傷口付近の表皮細胞が細胞死を起こすことが示されており(Gauron et al., 2013)、本研究の観察と一致している。また、この報告では、傷上皮での細胞死を阻害すると再生自体も阻害されることを示しており、細胞死によって失われる初期 *fn1b*⁺傷上皮細胞は、単に傷口をカバーするだけでなく、再生において何らかの別の役割をもつ可能性も考えられる。

さらに、本研究では、後のステージで TAM 投与によって細胞ラベルを行うと、後期 *fn1b*⁺傷上皮細胞は再生後のひれの表皮となることを初めて明らかにした。しかし、予想外なことに、いったん再生した表皮を形成した傷上皮由来細胞の多くは、再生が進むとともにひれの先端側へ移動して消失することが明らかになった。ラベル細胞の経時的な観察から、再生組織の表皮シートが全体的に先端側へ移動している様子が観察された。以前の研究でも、Kaede タンパク質を用いて傷上皮基底層の短期トレーシングを行った結果から、表皮基底層細胞が徐々に先端側へ遊走することが示唆されていたが(Armstrong et al., 2017)、本研究における長期の細胞トレーシングによって表皮細胞シート全体の振る舞いが初めて明らかにな

った。

2.3.4 広範囲の表皮で細胞増殖が起こり、表皮組織を再構築する

本研究では、実際に傷上皮が再生後の表皮に寄与できることを初めて示したが、さらに興味深いのは、先にも述べた通り、すべての傷上皮細胞がひれに残り続けるわけではなく、ひれ末端に近い細胞は先端に移動して消えてしまうことである。このようにして失われる表皮細胞は、何らかの方法で補われる必要がある。それには、失われる後部の表皮に隣接した領域での局所的な細胞増殖が考えられるが、予想に反して、EdU 取り込みによる増殖細胞の解析からは、先端から失われる表皮細胞を補う細胞増殖の活性化はひれの表皮全体で起こっていることが示された。

付加再生において、もっとも盛んに細胞増殖を行う先端部の再生芽領域では、間葉細胞が主に分裂している。基部側の細胞はすぐに分裂が低下して、細胞分裂には先端から基部側にかけての勾配が生じている。しかし、今回明らかになったように、表皮細胞においては、細胞増殖がひれの全体で活性化されていた。このような細胞増殖の活性化メカニズムとしては、表皮のシートが引っ張られるために生じるメカニカルストレスによる細胞増殖誘導や (Evans et al., 2013), 傷害シグナル自体が遠くまで拡散する性質を持つ可能性などが考えられる。今回、再生表皮でみられたような、切断面から遠く離れた基部側の領域まで細胞増殖シグナルが届く仕組みの解明も今後の課題である。

2.3.5 再生中に中間層細胞や表層細胞の脱分化は起こらない

さらに本研究では、中間層細胞と表層細胞をラベルし、再生中にこれらの細胞が基底層細胞に脱分化しないことも示した。これまでの研究によれば、イモリの四肢再生における筋肉の再生や、ゼブラフィッシュ尾ひれ再生における骨芽細胞の再生など、既存の組織の脱分化が増殖可能な細胞を生み出す例もいくつか報告されている (Geurtzen et al., 2014; Knopf et al., 2011; Sandoval-Guzmán et al., 2014)。しかし、ひれの表皮の再生においては、表層及び中間層の細胞が、少なくとも大規模に脱分化しているとは考えられなかった。また、1細胞レベルの運命追跡の結果からは、基底層細胞も中間層細胞も多くの場合、再生時に増殖していたが、これらは短期間で増殖を止めて、細胞のターンオーバーによって表皮から失われてしまった。従って、長期的にひれに残り続ける表皮の再生には基底層細胞が必要であり、基底層の自己再生が必須なことが示唆された。今後、再生時や非再生時における、表皮基底層細胞の自己複製と分化がどのように制御されているのか、解明が期待される。

2.4 図表および図表の説明

Table. 1 傷上皮に由来するラベル細胞コロニーの運命追跡

	消失したコロニー
	基底層・表層細胞を含むコロニー
	表層細胞のみを含むコロニー
	中間層・表層細胞を含むコロニー
	中間層細胞のみを含むコロニー
	基底層・中間層・表層細胞を含むコロニー
	基底層・中間層細胞を含むコロニー
	基底層細胞のみを含むコロニー

fish #	colony #	Cell type	Days post amputation					
			5 dpa	7 dpa	9 dpa	11 dpa	13 dpa	15 dpa
1	1	Surface (表層)	0	0	8	0	1	4
		Sprabasal (中間層)	0	9	12	13	8	9
		Basal (基底層)	4	2	10	10	12	13
		Distance from edge (μm)	1210	1310	1510	1690	2010	2290
2	2	Surface	0	0				
		Sprabasal	0	0				
		Basal	2	5				
		Distance from edge (μm)	741	293				
3	3	Surface	0	0	0			
		Sprabasal	0	1	6			
		Basal	2	4	0			
		Distance from edge (μm)	756	535	132			
4	4	Surface	0	0				
		Sprabasal	0	0				
		Basal	2	3				
		Distance from edge (μm)	460	95				
5	5	Surface	0	0				
		Sprabasal	0	0				
		Basal	3	4				

		Distance from edge (μm)	429	52			
	6	Surface	0	0	0	0	6 7
		Sprabasal	0	0	8	18	25 26
		Basal	2	17	20	15	13 4
		Distance from edge (μm)	1320	1610	1770	2080	2330 2530
2	7	Surface	0	0	7	0	
		Sprabasal	0	3	0	0	
		Basal	2	3	5	9	
		Distance from edge (μm)	868	646	363	297	
	8	Surface	0	10			
		Sprabasal	4	0			
		Basal	0	0			
		Distance from edge (μm)	962	680			
	9	Surface	0	0	0	1	
		Sprabasal	0	3	0	0	
		Basal	2	3	6	5	
		Distance from edge (μm)	727	488	177	41	
	10	Surface	0				
		Sprabasal	0				
		Basal	2				
		Distance from edge (μm)	710				
	11	Surface	0	0	3	14	3 2
		Sprabasal	0	2	10	29	11 8
		Basal	4	10	14	23	32 20
		Distance from edge (μm)	990	709	567	389	239 93
	12	Surface	0	0	0	0	0 0
		Sprabasal	0	0	0	0	0 0
		Basal	1	8	11	13	17 17
		Distance from edge (μm)	1270	1300	1610	2190	2650 2810
	13	Surface	0	0	0	0	0 0
		Sprabasal	0	0	0	0	0 0
		Basal	1	3	7	8	8 9
		Distance from edge (μm)	728	937	1110	1390	1660 1940
3	14	Surface	0	0			
		Sprabasal	0	2			
		Basal	2	4			

		Distance from edge (μm)	783	460				
	15	Surface	0	6				
		Sprabasal	5	0				
		Basal	0	0				
		Distance from edge (μm)	896	397				
	16	Surface	0	0				
		Sprabasal	0	8				
		Basal	2	2				
		Distance from edge (μm)	928	520				
	17	Surface	0	4				
		Sprabasal	2	0				
		Basal	0	0				
		Distance from edge (μm)	1150	571				
	18	Surface	0					
		Sprabasal	2					
		Basal	0					
		Distance from edge (μm)	663					
4	19	Surface	0	0				
		Sprabasal	0	2				
		Basal	2	5				
		Distance from edge (μm)	593	220				
	20	Surface	0	0	3	8	12	4
		Sprabasal	0	4	4	4	11	0
		Basal	2	4	4	6	4	4
		Distance from edge (μm)	867	456	323	233	256	147
	21	Surface	0					
		Sprabasal	2					
		Basal	0					
		Distance from edge (μm)	528					
	22	Surface	0	0	0			
		Sprabasal	0	1	3			
		Basal	1	1	0			
		Distance from edge (μm)	698	330	206			
	23	Surface	0	0	10	10	2	0
		Sprabasal	0	10	14	12	9	0
		Basal	4	8	16	18	4	0

		Distance from edge (μm)	777	403	222	140	64	0
5	24	Surface	0	0	0	0	0	0
		Sprabasal	0	0	1	8	0	2
		Basal	2	4	5	13	12	11
		Distance from edge (μm)	968	1170	1630	1500	1740	1964
	25	Surface	0	0	0	0	7	0
		Sprabasal	0	0	0	6	2	13
		Basal	2	4	5	9	14	18
		Distance from edge (μm)	1010	1140	1210	773	781	915
	26	Surface	0	0	0	12	23	31
		Sprabasal	0	2	13	27	24	29
		Basal	7	11	28	37	63	42
		Distance from edge (μm)	846	900	763	718	530	427
	27	Surface	0	0	0	4	9	16
		Sprabasal	0	0	3	10	16	26
		Basal	5	16	36	51	45	53
		Distance from edge (μm)	637	551	518	211	149	117
6	28	Surface	0	0	22	22	17	18
		Sprabasal	3	18	34	41	24	0
		Basal	0	0	0	0	0	0
		Distance from edge (μm)	793	933	1120	1120	884	651
	29	Surface	0	0	0	0	0	3
		Sprabasal	0	0	6	2	5	3
		Basal	3	7	6	15	18	20
		Distance from edge (μm)	976	1230	1650	1870	1980	1960
	30	Surface	0	0	0	0	0	0
		Sprabasal	0	0	0	0	0	0
		Basal	2	5	6	7	5	5
		Distance from edge (μm)	966	1230	1690	1870	2060	2040
	31	Surface	0	0	0	0	0	4
		Sprabasal	0	0	0	6	11	8
		Basal	4	8	22	23	20	22
		Distance from edge (μm)	1240	1470	1750	2000	2240	2050
7	32	Surface	0	0	0	25	>60	>60
		Sprabasal	0	0	21	>60	>60	>60

	Basal	8	19	37	>60	>60	>60
	Distance from edge (μm)	817	934	854	728	817	652
33	Surface	0	0	14	24		
	Sprabasal	7	12	15	9		
	Basal	0	0	0	0		
	Distance from edge (μm)	805	750	505	162		
34	Surface	0	0	1	2		
	Sprabasal	5	7	17	0		
	Basal	0	0	0	0		
	Distance from edge (μm)	588	481	360	0		
35	Surface	0					
	Sprabasal	0					
	Basal	1					
	Distance from edge (μm)	576	450				
36	Surface	0					
	Sprabasal	2					
	Basal	0					
	Distance from edge (μm)	687					
8 37	Surface	0					
	Sprabasal	3					
	Basal	0					
	Distance from edge (μm)	543					
38	Surface	0	7	2			
	Sprabasal	8	5	0			
	Basal	0	0	0			
	Distance from edge (μm)	463	228	19.7			
9 39	Surface	0	0	0	0	0	
	Sprabasal	0	0	0	0	0	
	Basal	5	15	17	10	4	
	Distance from edge (μm)	420	368	107	42.7	7	
10 40	Surface	0	3				
	Sprabasal	3	4				
	Basal	0	0				
	Distance from edge (μm)	231	141				
41	Surface	2					
	Sprabasal	0					

Basal	0
Distance from edge (μm)	345

Fig. 2-15 で示した，傷上皮由来細胞の 1 細胞レベルの細胞運命追跡の結果。10 匹の魚を用いて計 41 クローンの運命を追跡し，5 dpa から 15 dpa まで，2 日おきに，各クローンに含まれる表層・中間層・基底層細胞の数と，クローンの中心からひれの後端までの距離を記録した。各クローンに含まれる細胞種によってクローンをクラス分けし，色分けして示した。

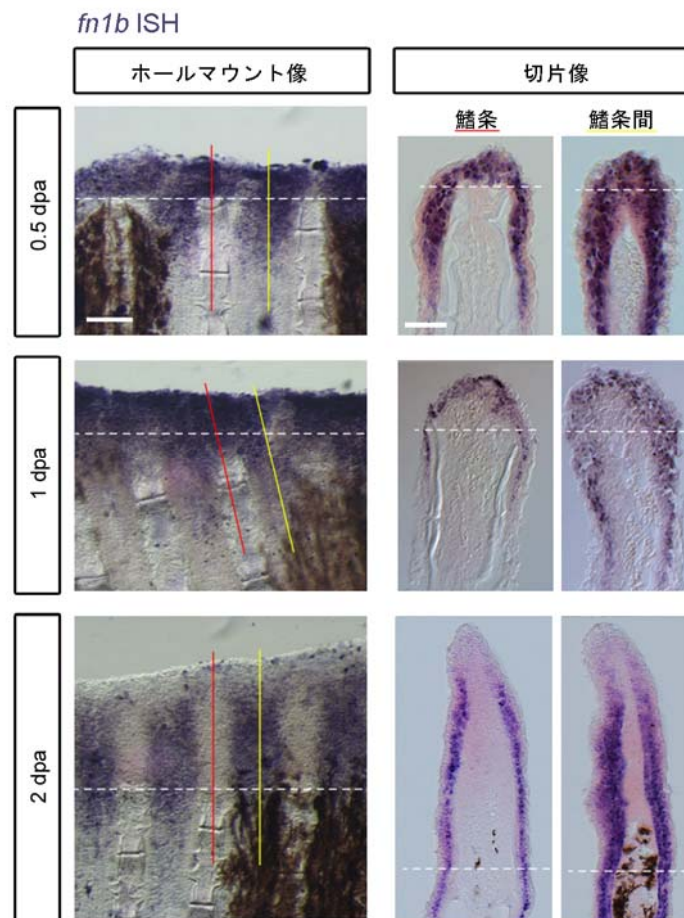


Fig. 2-1 *fn1b* は傷上皮で広範囲に発現する

再生中のひれの、*fn1b* プローブによる ISH 解析。左がホールマウント像で、右が切片像。ホールマウント像の赤線の位置の断面図が鰭条切片で、黄線の位置での断面図が鰭条間切片である。上から順に、0.5, 1, 2 dpa の再生ひれでの結果を示した。白破線はひれの切断箇所を示している。スケールバーは、それぞれ 100 μm (左), 50 μm (右)。

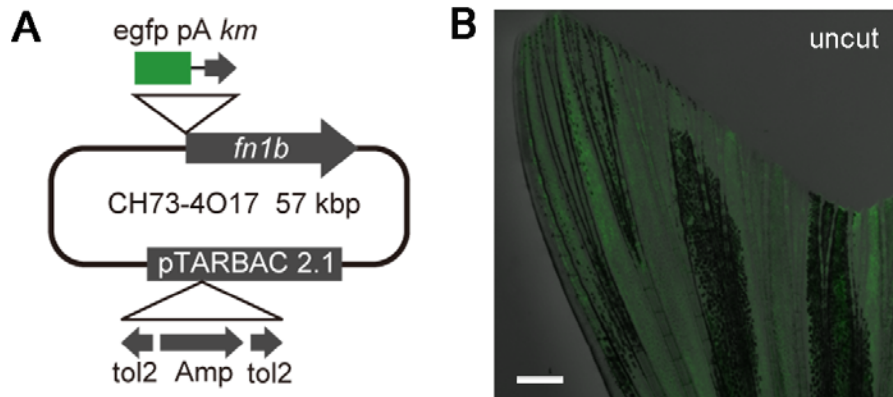


Fig. 2-2 BAC Tg(*fn1b:egfp*) の作製

- (A) Tg(*fn1b:egfp*)の作製に用いた BAC コンストラクト。*fn1b* 遺伝子の一部を含むおよそ 57 kb のゲノム領域を保持する BAC クローン, CH73-4O17 を用いた。*fn1b* の翻訳開始点に, 相同組換えによって *egfp* カセットを挿入した。BAC ベクター (pTARBAC 2.1) 上には, ゲノムへの挿入効率を上げるために *tol2* カセットを挿入した。pA: 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: アンピシリン耐性遺伝子。
- (B) 得られた Tg(*fn1b:egfp*)ゼブラフィッシュの, 非再生時のひれにおける EGFP の発現。全体に薄く EGFP の蛍光が見られた。スケールバーは 500 μm 。

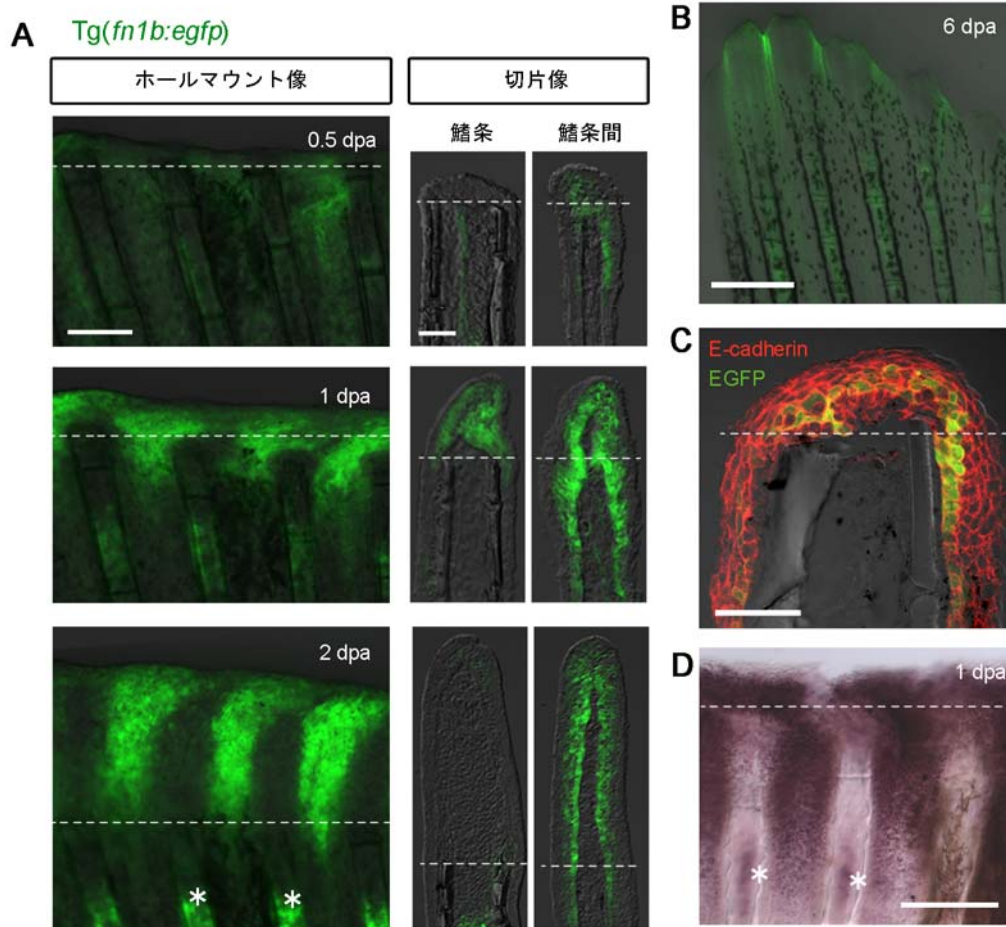


Fig. 2-3 *Tg(fn1b:egfp)*は再生時の内在性の発現を再現している

- (A) *Tg(fn1b:egfp)*の再生ひれにおけるEGFP発現。左がホールマウント像で、右は鳍条切片と鳍条間切片。上から順に、0.5, 1, 2 dpaの再生ひれでの結果が示されている。破線はひれの切断面。スケールバーは、それぞれ100 μm (左), 50 μm (右)。アスタリスクは間葉細胞でのEGFP発現。
- (B) *Tg(fn1b:egfp)*の6 dpaの再生ひれにおけるEGFP発現。EGFP蛍光が鳍条間の組織にわずかにみられる。スケールバーは500 μm 。
- (C) *Tg(fn1b:egfp)*の1 dpaの再生ひれの切片における、免疫染色によるEGFP (緑) と E-cadherin (赤, 表皮マーカー) の検出。破線はひれの切断面。スケールバーは50 μm 。
- (D) 野生型の1 dpaのひれにおけるISHによる*fn1b*発現の検出。鳍条の内側の内在性の発現も検出された。破線はひれの切断面。スケールバーは100 μm 。

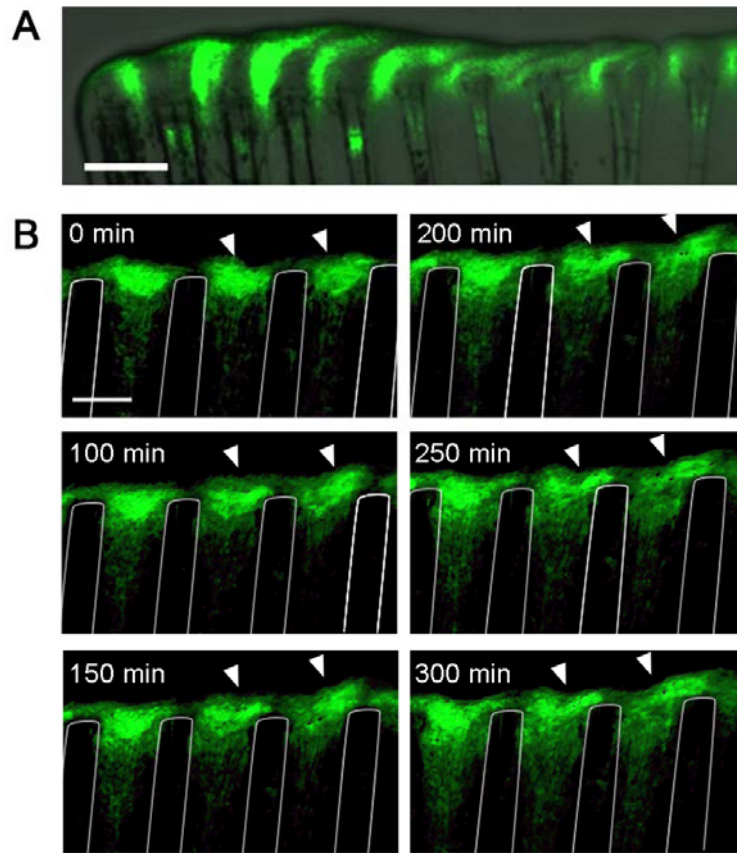


Fig 2-4 EGFP 発現領域は鰭条間から隣接する鰭条へ広がる

- (A) *Tg(fn1b:egfp)* の 2 dpa の再生ひれにおける EGFP 発現。EGFP 蛍光は鰭条間で強く、ボーダー状の発現パターンを示しているが、先端部分では隣り合う鰭条に覆いかぶさるように発現が広がる。スケールバーは 500 μm 。
- (B) *Tg(fn1b:egfp)* の再生ひれにおける、タイムラプスイメージング。24 hpa から 30 hpa まで、5 分おきに 6 時間の観察を行った。イメージング開始直後 (0 min), 100, 150, 200, 250, 300 分後の写真を示している。EGFP⁺細胞の分布が鰭条間の領域から隣の鰭条の先端へ広がっていくことが観察された (白矢頭)。スケールバーは 100 μm 。

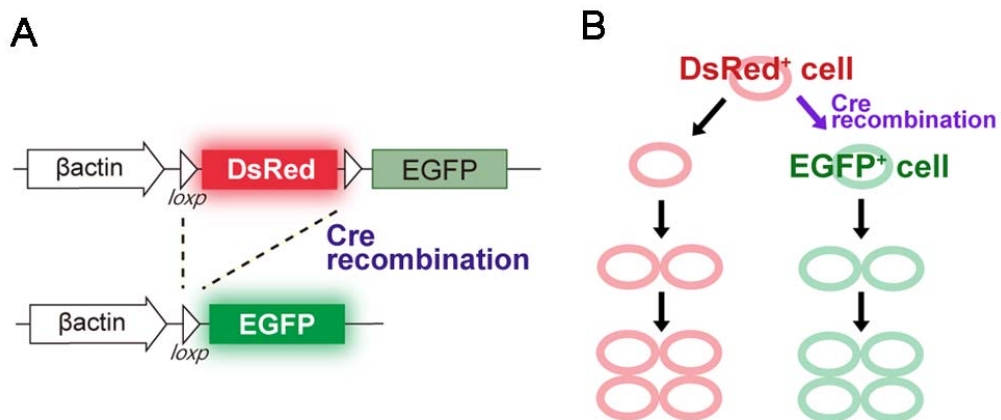


Fig. 2-5 Cre 組換えによる細胞系譜解析

- (A) 本研究で用いた *loxP* レポーターライン。組換えが起こる前は，メダカ由来の β actin プロモーターの制御下で，DsRed タンパク質が発現するが，Cre 組換えが起こると，EGFP タンパク質が発現するようになる。
- (B) Cre 組換えによる細胞系譜解析。一度 Cre 組換えが起こった細胞では，その子孫細胞を含め，永続的に EGFP を発現し続けるので，細胞の系譜を追跡することができる。

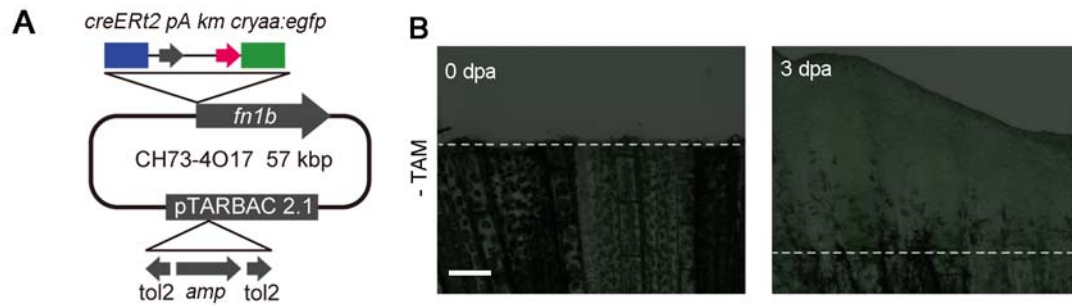


Fig. 2-6 BAC Tg(*fn1b:creERT2*)の作製

- (A) Tg(*fn1b:creERT2*)の作製に用いた BAC コンストラクト。BAC クローン, CH73-4017 の *fn1b* の翻訳開始点に, 相同組換えによって *creERT2* カセット, *cryaa:egfp* カセットを挿入した。BAC ベクター (pTARBAC 2.1) 上には, ゲノムへの導入効率を上げるために *tol2* カセットを挿入した。pA: 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: アンピシリン耐性遺伝子。
- (B) Tg(*fn1b:creERT2; Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp*)における TAM 非存在下での組換え。Tg ひれを切断しても, TAM 非存在下ではほとんど組換え細胞は観察されなかった。白破線はひれの切断面。スケールバーは 100 μm 。

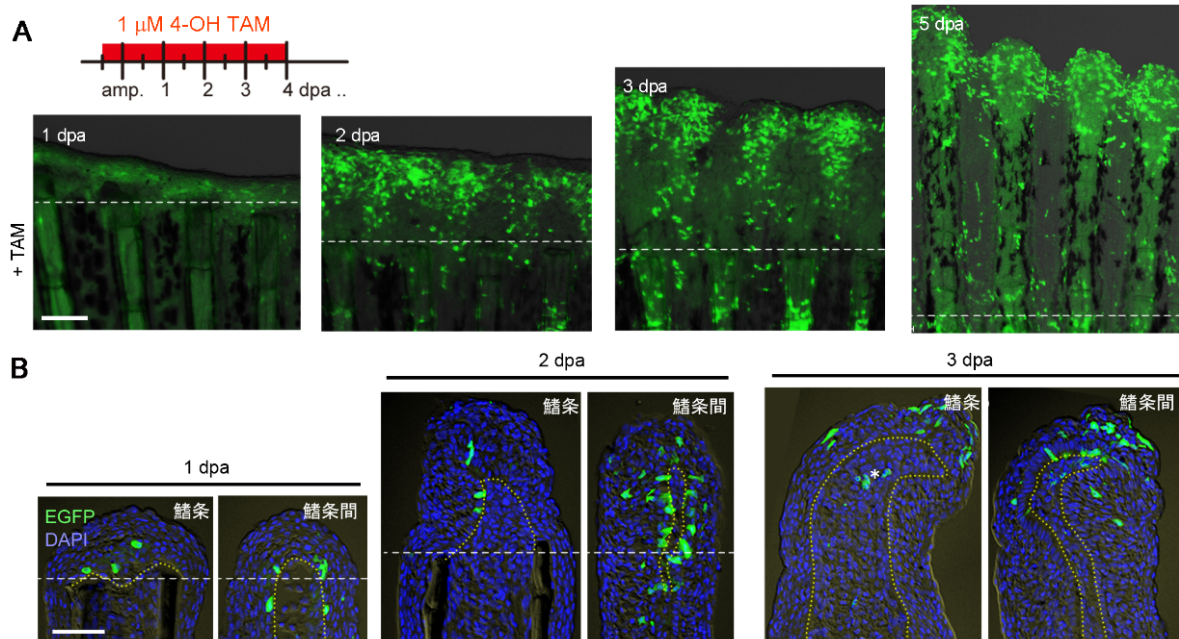


Fig. 2-7 Cre-loxP 組換えによる傷上皮細胞の標識

- (A) *Tg(fn1b:creERT2; Rlactb:loxP-dsRed-loxP-egfp)*における傷上皮細胞の Cre 標識。1 μM の TAM を、ひれ切断 12 時間前から 4 dpa まで、飼育水に投与した。白破線はひれの切断面。スケールバーは 100 μm 。
- (B) 上記の方法でラベルした 1, 2, 3 dpa の再生ひれの切片像。各々、左側が鰭条切片，右側が鰭条間切片。EGFP は抗 EGFP 抗体で染色，核は DAPI で染色した。白破線はひれの切断面。黄破線は表皮と間葉の境界を示している。スケールバーは 50 μm 。

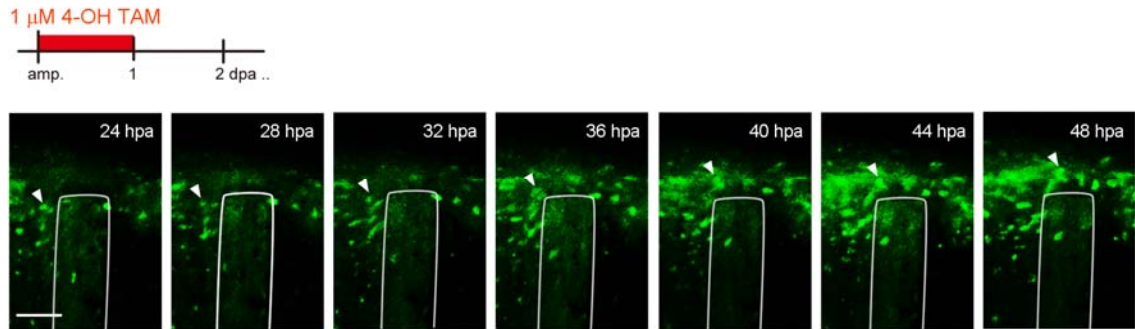


Fig. 2-8 鰭条間の表皮細胞が移動して傷上皮を形成する

*Tg(fn1b:creERT2; Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp)*の再生ひれにおける Cre 標識細胞のタイムラプス画像。切断直後から 1 dpa (24 hpa) まで、 $1 \mu\text{M}$ の TAM で処理したひれを、1 dpa (24 hpa) から 1 時間おきに 24 時間観察した。写真は 4 時間おきのものである。24 hpa で鰭条間の領域見え始めた EGFP^+ 細胞 (白矢頭) が、先端に移動すると同時に、鰭条に覆いかぶさるように側方にも移動している。白線は鰭条の位置と形を示している。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ 。

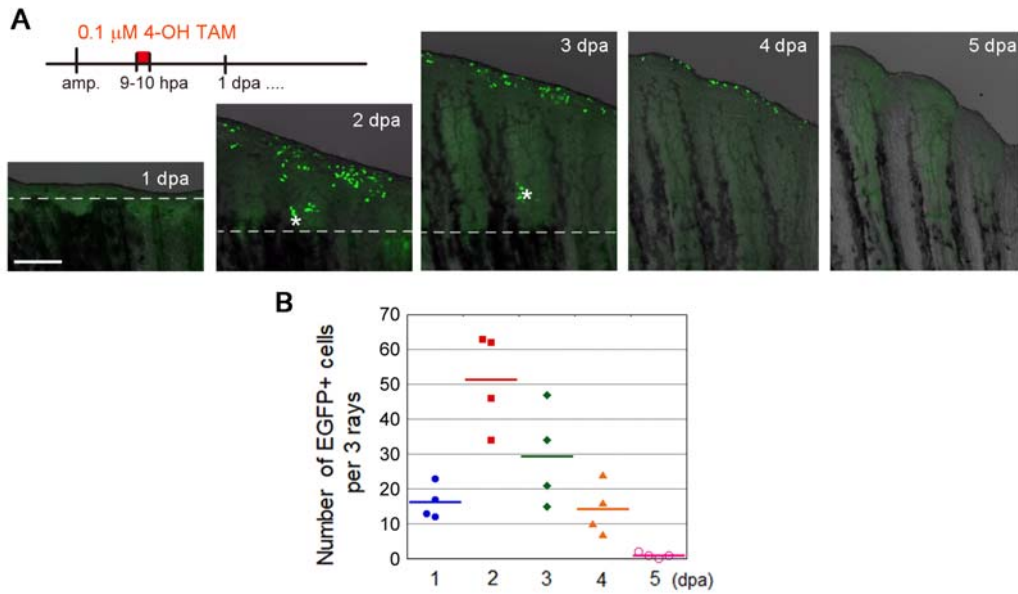


Fig. 2-9 初期 $fn1b^+$ 細胞は5 dpa までに消失する

- (A) 初期 (9-10 hpa) $fn1b^+$ 細胞の細胞運命のトラッキング。Tg(*fn1b:creERT2*; *Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp*)のひれ切断後、0.1 μM の TAM を含む飼育水で飼育し、ひれ再生初期に $fn1b$ を発現する傷上皮細胞をラベルした。1 dpa から弱く EGFP⁺細胞が観察されはじめ、2 dpa には傷上皮で EGFP⁺細胞が多数観察されるが、その数は徐々に減少し5 dpa までにほぼすべてが消失した。白破線はひれの切断面。アスタリスクはラベルされた間葉細胞。スケールバーは 100 μm 。
- (B) ラベルされた EGFP⁺細胞数の変化。3 鰭条当たりの EGFP⁺細胞の個数をカウントした。N = 4 匹。それぞれの横線は平均値を示している。

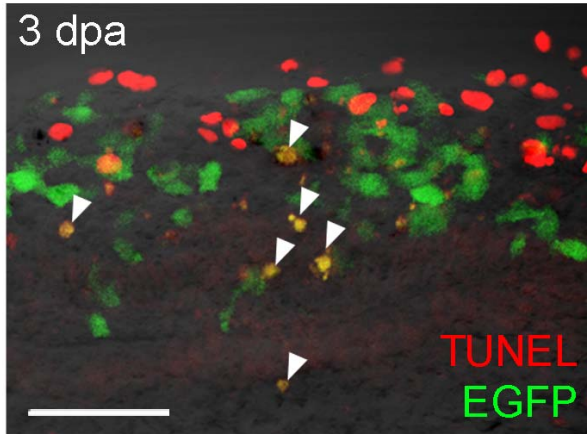


Fig. 2-10 初期 *fn1b*⁺細胞は細胞死により消失する

*Tg(fn1b:creERT2; Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp)*の再生ひれにおける EGFP⁺細胞と TUNEL 染色による細胞死の検出。ひれ切断後、9-10 hpa で 0.1 μM の TAM を含む飼育水で飼育してラベルしたひれを、3 dpa で固定し、TUNEL 染色（赤）によって細胞死を検出した。EGFP は抗 EGFP 抗体で染色した（緑）。多数の EGFP⁺かつ TUNEL⁺細胞が観察される。白矢頭は、EGFP、TUNEL 共陽性の細胞。スケールバーは 50 μm。

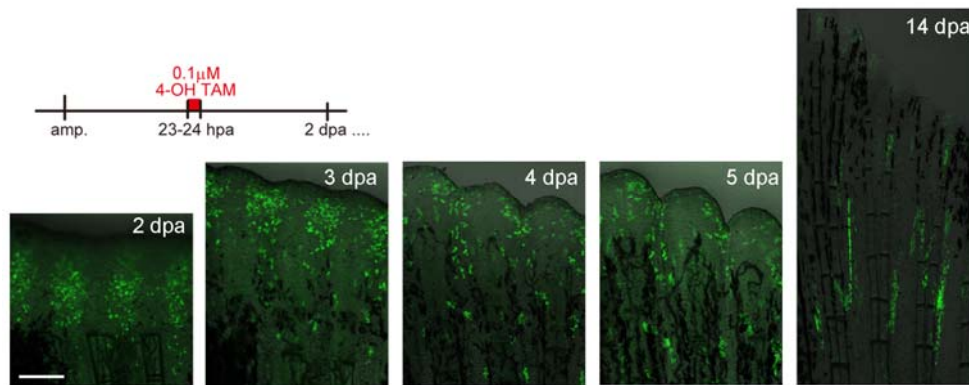


Fig. 2-11 後発の *fn1b*⁺細胞は再生後もひれの皮膚に残る

Tg(*fn1b:creERT2; Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp*)の再生ひれにおける Cre ラベル EGFP⁺細胞。ひれ切断後，傷上皮形成の後期ステージ（23-24 hpa）で 0.1 μM の TAM を含む飼育水で飼育し，*fn1b* を発現する細胞をラベルした。2 dpa から，鰭条間の表皮に EGFP⁺細胞が観察されはじめた。ラベル細胞は 5 dpa を超えてひれに残り，14 dpa でひれ表皮に寄与していた。白破線はひれの切断面。スケールバーは 100 μm。

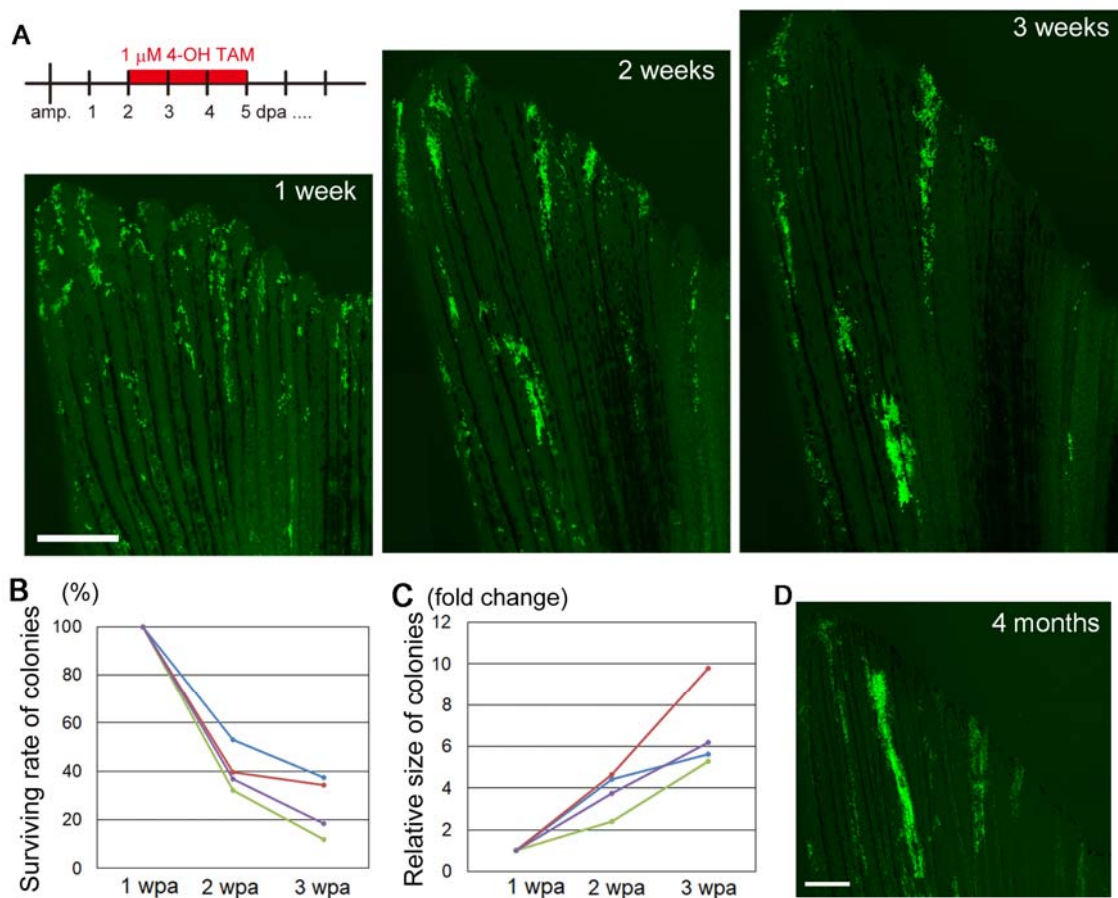


Fig. 2-12 *fn1b*⁺傷上皮由来細胞には、再生後の皮膚になるものと、再生中に消えるものの2種類がある

- (A) *Tg(fn1b:creERT2; Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp)* における Cre ラベル細胞の運命追跡。ひれ切断後、2–5 dpa で 1 μ M の TAM を含む飼育水で飼育し、*fn1b*⁺傷上皮由来細胞をラベルした。ラベル後 1 週目では小さなラベル細胞集団が多く見えるが、ラベル後 3 週目には細胞集団の数が減り、代わりに 1 集団当たりの面積が大きくなった。スケールバーは 500 μ m。
- (B) (A)におけるラベルされた細胞コロニー数の変化。ひれ切断後 1, 2, 3 週間目のひれのコロニー数を、1 週目のコロニー数を 100 として表した。N = 4 匹。
- (C) (A)におけるラベルされた細胞コロニーのサイズの変化。ひれ切断後 1, 2, 3 週間目のひれの 1 コロニー当たりの平均サイズ変化を、1 週目の平均サイズを 1 として表した。N = 4 匹。
- (D) ラベル後 4 カ月における Cre ラベル細胞。一部のラベル細胞は、4 カ月以上の長期にひれの表皮に残っていた。スケールバーは 500 μ m。

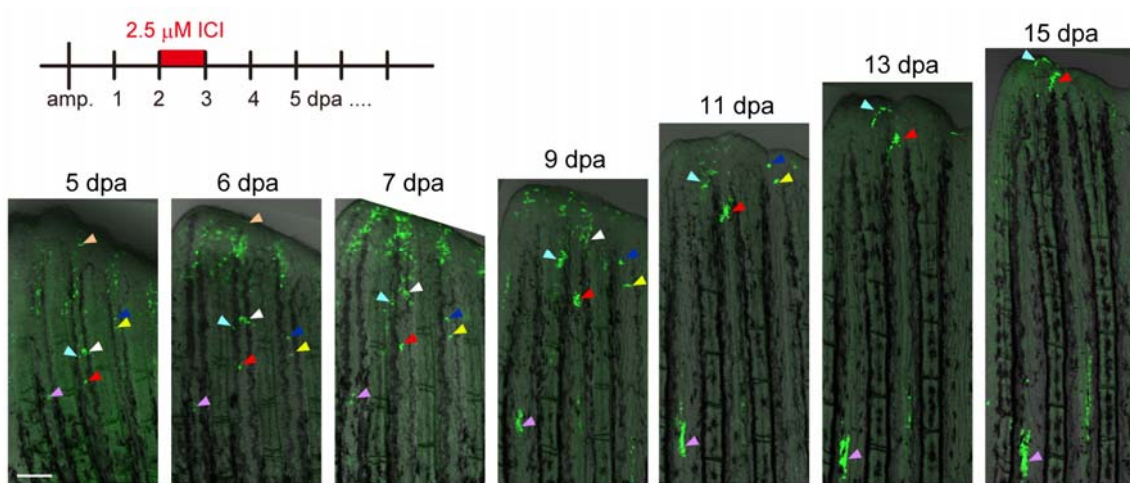


Fig. 2-13 1細胞レベルでの *fn1b*⁺傷上皮細胞の追跡

*Tg(fn1b:creERT2; Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp)*のひれ再生組織における低頻度の Cre ラベル。ひれ切断後、2–3 dpa で 2.5 μM の ICI を含む飼育水で飼育し、*fn1b*⁺傷上皮由来細胞を疎にラベルすることができた。色付きの矢頭で示しているのは、1細胞から生じたと考えられるラベル細胞コロニーである。薄橙色の矢頭で示すラベル細胞コロニーが 7 dpa で消失するのをはじめとして、多くのコロニーが徐々に先端側へ移動して消えてしまう一方、桃色で示したラベル細胞コロニーはひれの表皮に残り続けた。スケールバーは 200 μm。

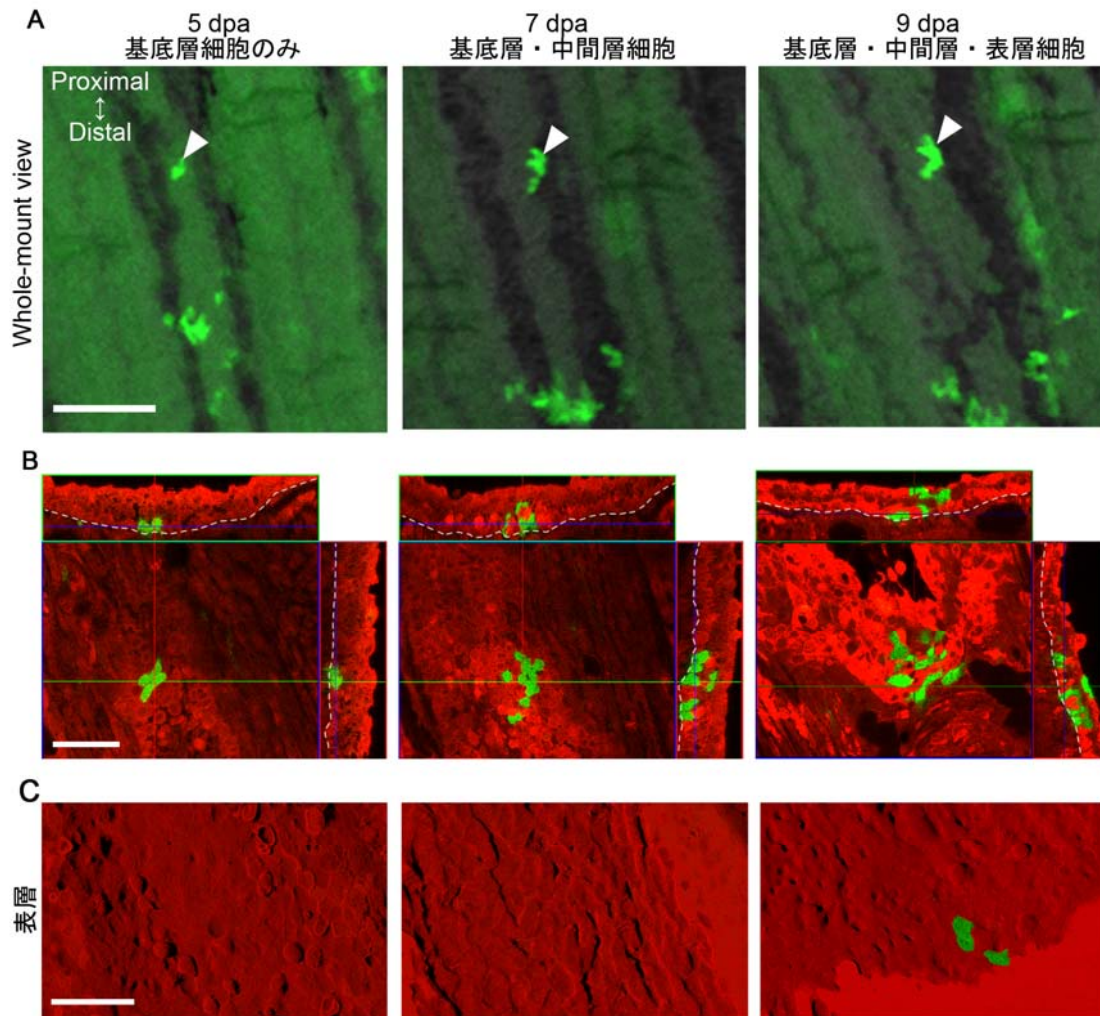


Fig. 2-14 表皮細胞クローンの追跡と細胞タイプの同定

- (A) 1 細胞の傷上皮細胞に由来すると考えられる細胞クローンの再生過程における追跡。Table 1 に示したクローンのうち、No.11 のクローン (白矢頭)。実体顕微鏡で、5, 7, 9 dpa でホールマウントで撮影した。画面上方向がひれの基部側、下側がひれの先端側。スケールバーは 100 μm 。
- (B) 共焦点顕微鏡での z-stack イメージから再構成した光学切片による表皮細胞タイプの同定。No.11 のクローン。5, 7, 9 dpa での撮影結果を示した。白破線は表皮と中間層の境界線。5 dpa では基底層細胞のみが見られるが、7 dpa では中間層細胞が、9 dpa では表層の細胞が見られる。スケールバーは 50 μm 。
- (C) (B)の共焦点画像における、表皮の表層の EGFP⁺細胞の分布。5 dpa, 7 dpa では表層細胞は見られず、9 dpa で表層細胞が初めて出現した。深部の基底層, 中間層細胞から表層細胞が生じたことを示している。スケールバーは 50 μm 。

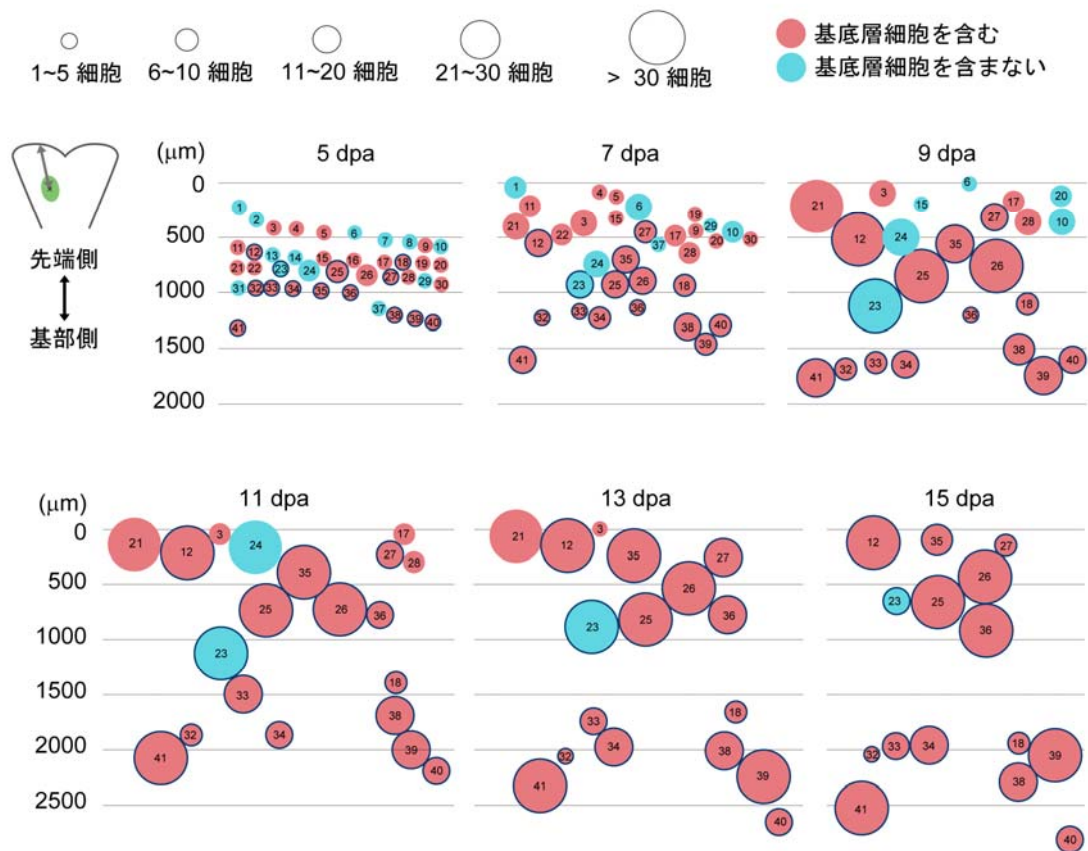


Fig. 2-15 再生中に表皮全体が先端側へと移動する

Tg(fn1b:creERT2; Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp) のにおける表皮細胞クローンのサイズ，構成細胞，先端からの距離を模式的に示した。ひれ切断後，2-3 dpa で 2.5 μM の ICI を含む飼育水で飼育し，1 細胞レベルで傷上皮をラベルし，追跡した。10 匹の魚を用い，合計 41 個のコロニーをラベル，追跡した。5 dpa で各コロニーのひれの先端からの距離を測定し，先端に近いものから順に番号をふった。各円の位置は，コロニーの，ひれの先端からの距離 (0 がひれの先端) を示している。各円の大きさは，コロニーに含まれる細胞数を示している。また，基底層細胞を含んでいるコロニーは赤色で，基底層細胞を含んでいないコロニーは青色で示した。また，15 dpa までひれに残ったコロニーは，太い紺色の円周で示した。

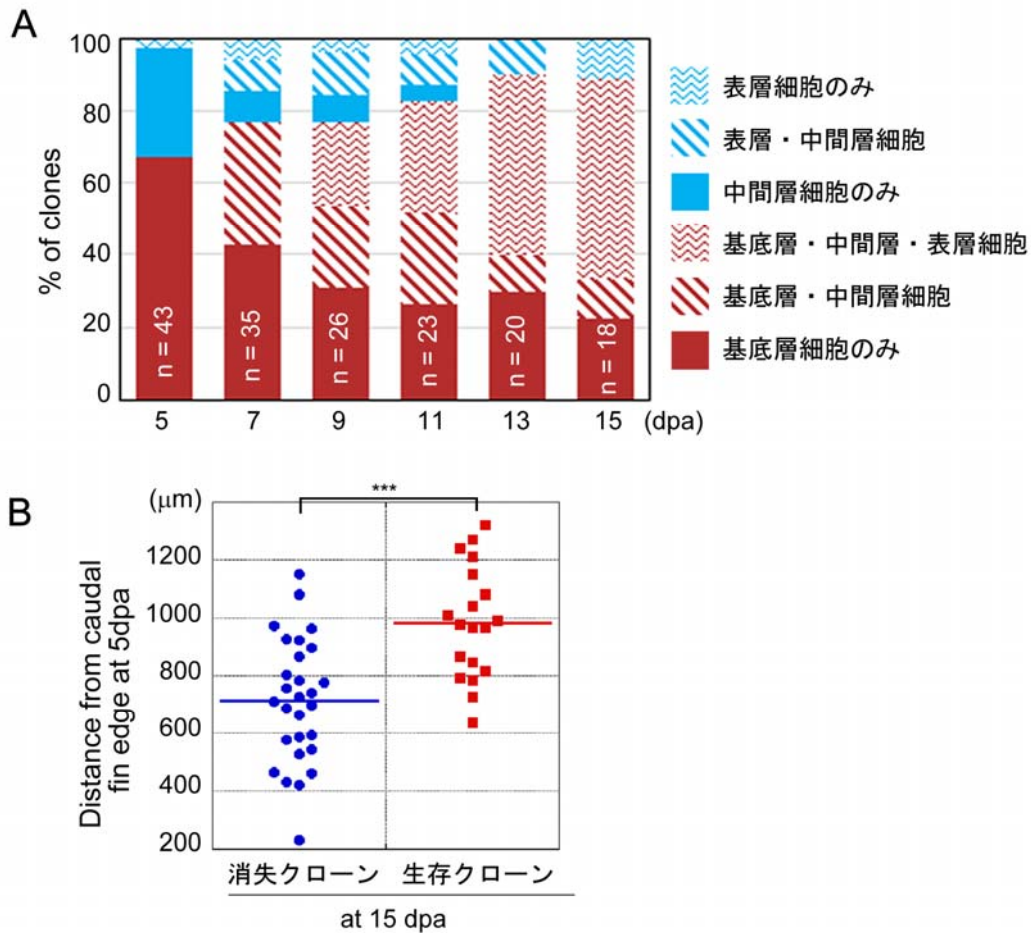


Fig. 2-16 基部側の傷上皮基底層細胞が、再生中に増殖し分化細胞を生み出す

- (A) クローンを構成する細胞種による表皮クローンの種類とそれらの割合。1細胞レベルで傷上皮細胞をラベル・追跡し、共焦点顕微鏡で得られた z-stack 画像から、各クローンに含まれる細胞種を記録し、構成する表皮細胞種によって 6 つのタイプに分類し、それぞれの割合を示した。5 dpa では、基底層細胞のみからなるクローンと、中間層細胞のみからなるクローンが多くみられるが、15 dpa では基底層・中間層・表層の細胞すべてを含むクローンが過半数を占めている。
- (B) 15 dpa までに消失するクローンと、生存するクローン、5 dpa でのひれ先端からの距離。消失したクローンは、生存しているクローンに比べ、ひれ先端に近い位置にある特に、1 個体の中では、消失するものと残るものの先端からの位置に、明瞭な境界が存在したそれぞれのバーは平均値。N=19 (生存クローン), 29 (消失クローン)。*** $p < 0.00005$ 。

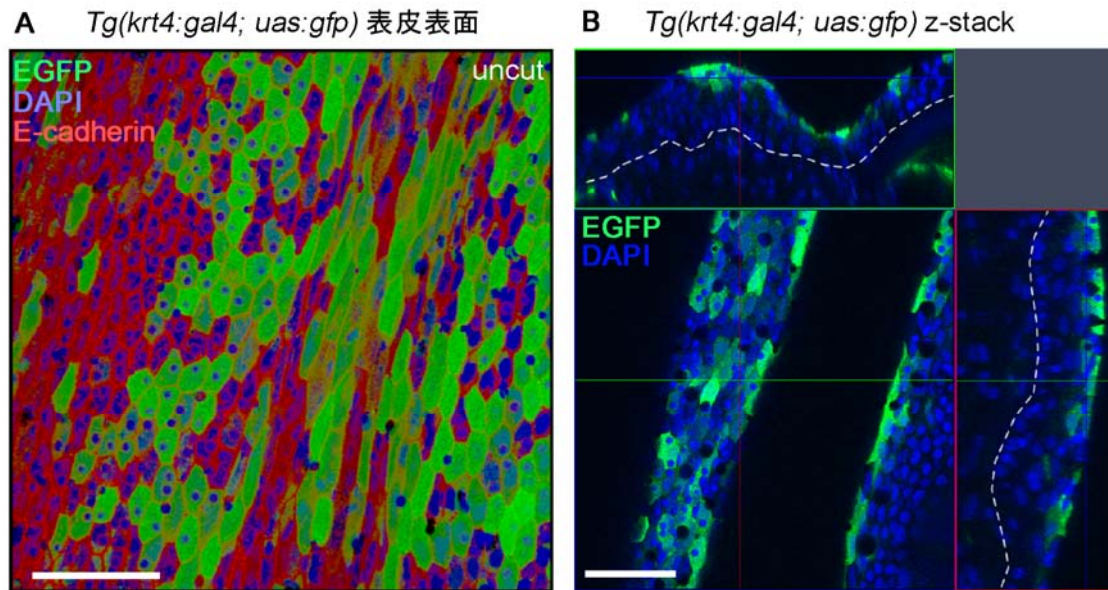


Fig. 2-17 *krt4* は表皮中間層細胞と表層細胞に発現する

- (A) 非再生時の *Tg(krt4:gal4; uas:gfp)* のひれにおける E-cadherin (赤, 表皮マーカー), EGFP (緑) の免疫染色による検出。共焦点顕微鏡で観察した結果, 多くの EGFP⁺細胞が E-cadherin 陽性だった。核は DAPI によって染色した。スケールバーは 50 μm。
- (B) 非再生時の *Tg(krt4:gal4; uas:gfp)* のひれにおける EGFP (緑) の免疫染色。共焦点顕微鏡による光学切片像と, z-stack 像から再構成した断面図 (上および右の写真)。上は緑線での横断面, 右は赤線での縦断面を示している。核は DAPI によって染色した。白破線は, 表皮と間葉の境界線。スケールバーは 50 μm。

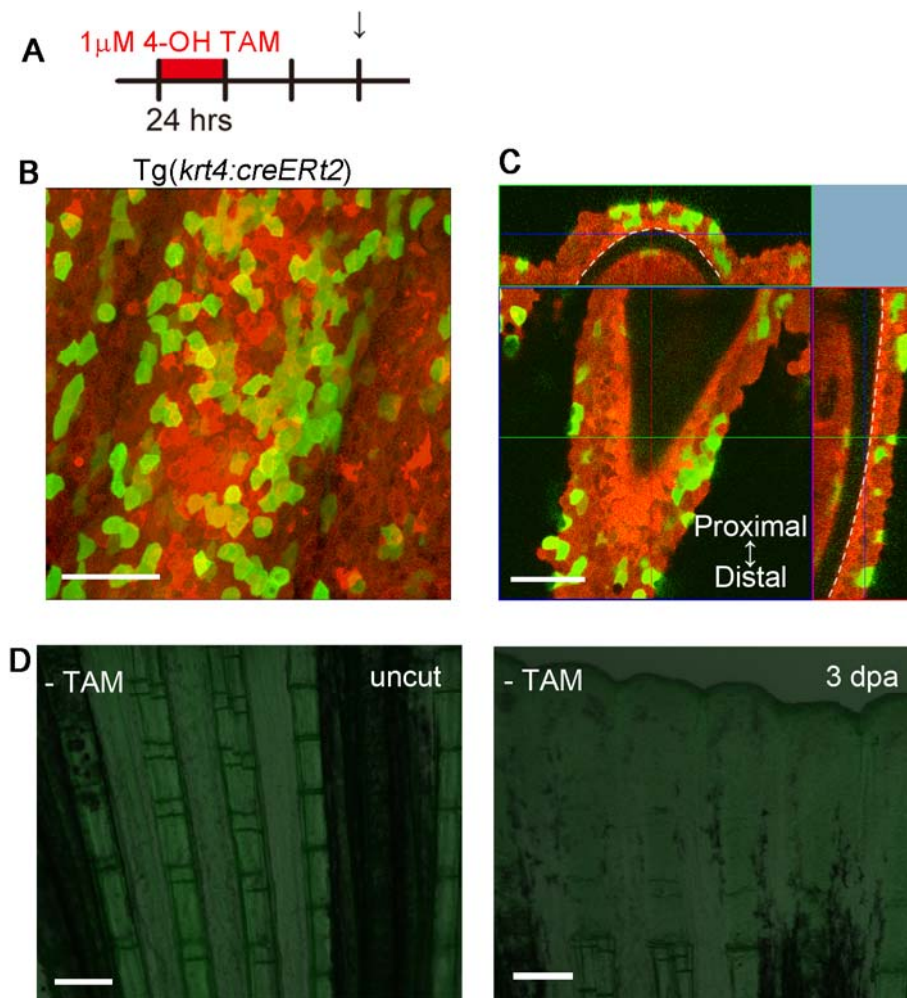


Fig. 2-18 *Tg(krt4:creERT2)*による中間層・表層細胞の Cre ラベルに成功した

- (A) Cre ラベル実験の手順。非再生状態のひれを、 $1 \mu\text{M}$ TAM で 24 時間処理し、細胞の Cre ラベルを誘導した。TAM を除いて 2 日後 (矢印) に観察した。
- (B) Cre ラベルした *Tg(krt4:creERT2; Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp)* のひれの表層付近の、共焦点顕微鏡画像。ひれの表層に多数の EGFP⁺細胞が見られる。画面上側がひれの基部側で、下側が先端側。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ 。
- (C) (B) の共焦点顕微鏡による光学切片像と、z-stack から再構築した組織横断面。多くのラベル細胞が、表皮の中間層と表層細胞に見られる。白破線は表皮と間葉の境界線。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ 。
- (D) *Tg(krt4:creERT2; Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp)* の非再生ひれ (左, uncut) と再生ひれ (右, 3 dpa) における、TAM を与えない場合の組換え。いずれも、組換え細胞はほとんど見られない。スケールバーは $200 \mu\text{m}$ 。

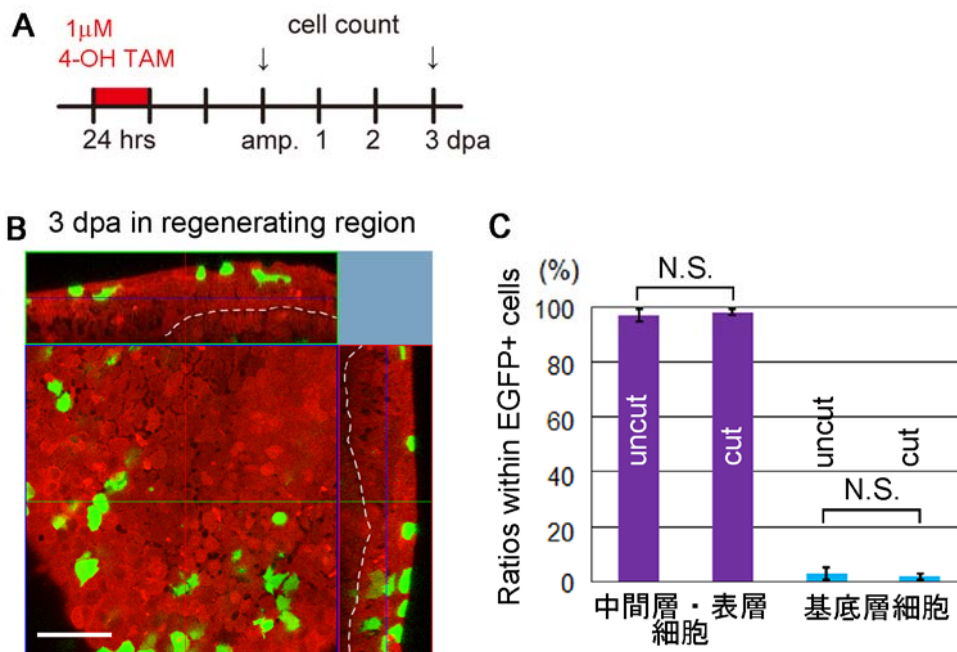


Fig. 2-19 中間層細胞と表層細胞は、再生中に基底層細胞へ脱分化しない

- (A) 中間層・表層細胞の Cre ラベルと再生における系譜追跡実験の手順。非再生ひれを、1 μ M TAM で 24 時間処理し、細胞のラベルを誘導した。TAM を除いてから 2 日後 (矢印) に共焦点顕微鏡で観察し、細胞数の定量を行った。その後、ひれを切断し、3 dpa (矢印) で再び共焦点顕微鏡で観察・細胞数の定量を行った。
- (B) *Tg(krt4:creERT2; Olfactb:loxP-dsRed-loxP-egfp)* における Cre ラベル細胞の運命。3 dpa の再生領域を共焦点顕微鏡で観察した。共焦点顕微鏡による光学切片像と、z-stack から再構築した組織横断面。ラベル細胞のほとんどは再生組織の表皮の中間層細胞と表層細胞に見られた。白破線は表皮と間葉の境界線。スケールバーは 50 μ m。
- (C) 切断直前 (uncut) と 3 dpa (cut) のひれにおける、Cre ラベル細胞が中間層・表層または基底層に含まれる割合。Uncut のひれでは、中間層細胞と表層に存在する細胞の割合は、全ラベル細胞中の 97.3% を占めており、その後、3 dpa の組織でも 98.3% を占め、再生の開始によって割合が大きく変動しなかった。つまり、再生によって、中間層・表層細胞の多数が基底層細胞へ脱分化することはないことを意味している。N.S. は有意差なし ($p = 0.69$) を示している。

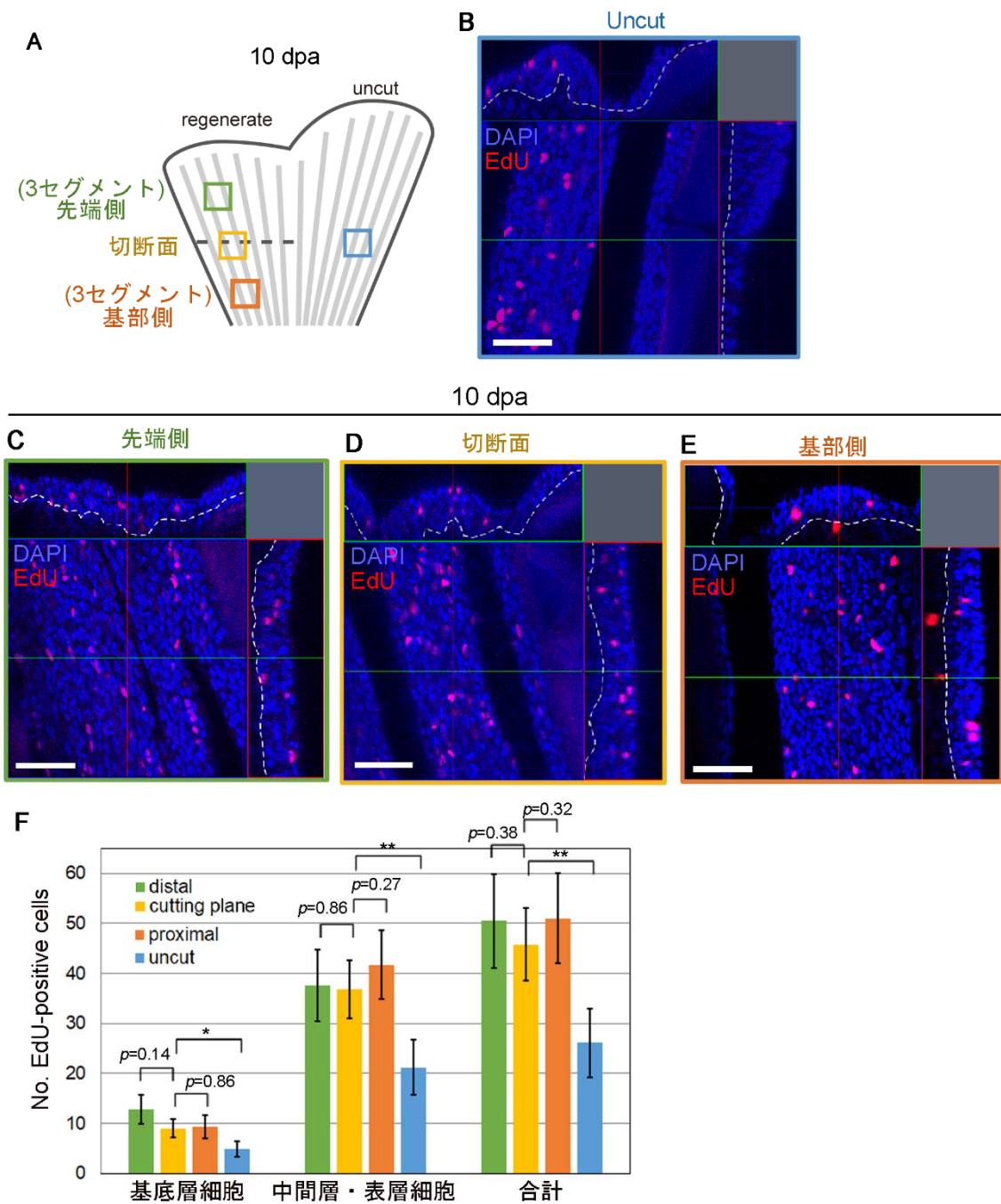


Fig. 2-20 ひれ全体の表皮細胞で細胞増殖が活性化される

(A) EdU 取り込み細胞数の定量方法。ひれの背側半分のみを切断し、腹側半分はコントロール (uncut) とした。10 dpa で6時間、EdU を取り込ませ、その後固定し、EdU 染色を行った。定量の際は、切断面の位置 (黄四角)、切断面から3セグメント分先端側の位置 (緑四角)、切断面から3セグメント分基部側の位置 (橙四角)、uncut のひれ (青四角) で、 $212 \times 212 \mu\text{m}$ の正方形に含まれる細胞数をカウントした。

- (B) uncut のひれにおける, EdU 染色 (赤)。共焦点顕微鏡による光学切片像と, z-stack から再構築した組織横断面を示した。核は DAPI (青) で染色した。白破線は表皮と間葉の境界線。スケールバーは 50 μm 。
- (C-E) 10 dpa の再生ひれにおける, EdU 染色 (赤) の結果。(C)は先端側, (D)は切断面, (E)は基部側の領域における写真。共焦点顕微鏡による光学切片像と, z-stack から再構築した組織横断面を示した。核は DAPI (青) で染色した。白破線は表皮と間葉の境界線。スケールバーは 50 μm 。
- (F) EdU⁺細胞数の定量結果。棒グラフのバーの色は, それぞれ(A)の図に色枠で示した四角の領域に対応している。共焦点顕微鏡画像をもとにして, EdU⁺基底層細胞数, EdU⁺中間層・表層細胞数, EdU⁺表皮細胞全体の数をそれぞれ定量した。それぞれ, N=5 匹のゼブラフィッシュから, 2 画像ずつ計 10 枚の画像を定量した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ 。

第三章 傷上皮細胞の機能解析

3.1 背景と目的

3.1.1 傷上皮による再生芽誘導

両生類を用いた四肢再生の様々な研究から、傷上皮が再生芽形成に必須であり、傷上皮が再生芽を誘導している可能性が示唆されてきた。しかしながら、傷上皮の実際の機能や、再生芽誘導における役割などは明らかでなかった。

近年のゼブラフィッシュにおけるひれ再生の研究から、傷上皮で発現する様々なシグナル分子が明らかにされ、これらの再生芽誘導における役割が期待されている。しかし、これらのシグナルが予定再生芽細胞によって実際に受容されているのかはあまり検証されていない。傷上皮で発現し、予定再生芽細胞によって受け取られるようなシグナル分子を明らかにすることは、再生芽の誘導機構の解明につながると考えられる。

3.1.2 再生関連シグナルの解析

この十数年の、ゼブラフィッシュにおけるひれの再生過程の分子生物学的な解析によって、Fibroblast growth factor (Fgf) (Lee et al., 2005; Poss et al., 2000; Wills et al., 2008), Insulin-like growth factor (Chablais and Jazwinska, 2010), Notch (Grotek et al., 2013; Kametani et al., 2015), Bone morphogenetic protein (Smith et al., 2006), Retinoic acid (Blum and Begemann, 2012), Wnt (Stoick-Cooper et al., 2007; Wehner et al., 2014), Activin β A (Jaźwińska et al., 2007), Sonic hedgehog (Quint et al., 2002), Stromal cell-derived factor 1 (Bouzaïffour et al., 2009), Laminin (Chen et al., 2015), Adenosine (Rampon et al., 2014), hydrogen peroxide (Gauron et al., 2013)など、ゼブラフィッシュのひれ再生過程に関与する様々な分子やシグナルが明らかになってきた。それらの中でも、Fgfシグナルは、胚発生における細胞の増殖や分化の過程において重要な役割を果たすことが知られている成長因子の一つであり、創傷治癒においても重要な役割を果たすことが数多く示されている。Leeらは、ドミナントネガティブ型のFgf受容体を強制発現するゼブラフィッシュを作製し、このTgを用いて再生時のFgfシグナルを阻害すると再生が停止することを示した。さらに、非再生時に断続的にFgfシグナルを阻害すると、ひれの先端が徐々に退縮して失われることも示された (Wills et al., 2008)。これらの結果は、Fgfシグナルがひれの再生や恒常性維持に必須であることを示している。

また、Whiteheadらは、*fgf20a*の温度感受性変異体 (*devoid of blastema; dob*)の解析から、*dob*変異体は通常の28°Cでは正常に成魚まで成長するが、ひれを切断して33°Cで飼育する

と、再生芽の形成が起こらず、尾ひれの再生が進行しないことを示した (Whitehead et al., 2005)。このことから、少なくとも Fgf20a によるシグナルは再生過程で必須の役割を持つことが示された。

以上のように、Fgf シグナルは組織再生で必須の働きをされると考えられるが、ゼブラフィッシュには 32 種類の Fgf リガンドが存在し (Itoh and Konishi, 2007)、これら多数のリガンドの発現や役割、特に再生組織における Fgf リガンドの発現細胞・受容細胞の全貌については明らかになっていない。

3.1.3 本研究の目的

本研究では、多数の Fgf リガンドのうち、再生に実際に関与する Fgf リガンドを同定することを目的とした。さらに、傷上皮、再生芽、それぞれにおける Fgf シグナルに着目して機能解析を行い、これらの再生過程における役割の解明を目指した。

3.2 結果

3.2.1 *fgf20* は最も早く傷上皮に発現する Fgf リガンドである

当研究室の先行研究における RT-PCR 解析により, 再生ひれで *fgf3*, *fgf7*, *fgf10a*, *fgf10b*, *fgf12a*, *fgf12b*, *fgf13a*, *fgf20a*, *fgf20b*, *fgf24* が発現することが示唆されていた (堀田なつみ, 2013 年度修士論文)。

本研究では, これらの Fgf リガンドの組織特異的な発現を明らかにするため, 2 dpa のひれの再生組織を傷上皮と再生芽に分けて RT-PCR を行った。傷上皮と再生芽がうまく分離できていることは, 再生芽マーカーの *msxc*, 表皮マーカーの *p63* の発現によって確かめた (Fig. 3-1 A)。この結果, *fgf3*, *fgf7*, *fgf10a*, *fgf10b*, *fgf12b* は主に再生芽に, *fgf12a*, *fgf13a*, *fgf20a*, *fgf20b*, *fgf24* は主に傷上皮に発現している Fgf リガンドであることが明らかになった (Fig. 3-1 B)。

さらに, 再生 1, 2, 3, 4 日の各ステージにおける発現を RT-PCR によって解析した結果, *fgf20a* と *fgf20b* が最も発現開始が早く, 1 dpa から発現が検出されたが, その他は 2 dpa 以降にしか発現が認められなかった。従って, *fgf20a* と *fgf20b* は, 最も早いステージから傷上皮に発現する Fgf リガンドであることが明らかになった (Fig. 3-1 C)。

先行研究において, Whitehead らは, *fgf20a* は再生芽と傷上皮の境界で発現すると報告していた (Whitehead et al., 2005)。一方で, 別のグループは再生芽で発現すると報告している (Blum and Begemann, 2012)。このような *fgf20a* の発現細胞の不確かさは, *fgf20a* 遺伝子の発現レベルが極めて低く, ISH の検出が非常に困難なためだったと考えられる。

本研究では, 上記の RT-PCR に加え, さらに *fgf20a* の発現細胞を *in situ* で明らかにするため, エンハンサートラップ Tg ライブラリから, EGFP カセットが *fgf20a* 遺伝子の 1.6 kb 上流に挿入された HGn21A 系統 (Nagayoshi et al., 2007) を同定した (Fig. 3-2 A)。この Tg のひれを切断すると, 再生芽の形成がまだ起こっていない 12 hpa の再生の早いステージから EGFP の蛍光が観察されはじめ, 2 dpa までには傷上皮の基底層に発現が局限することが観察された (Fig. 3-2 B)。その後, 2 dpa をピークにして EGFP 蛍光は減衰し, 再生完了時にはひれの先端にわずかに見えるだけになった。このようなひれ先端のわずかな発現は, 切断前のひれでも同様に観察された (Fig. 3-2 B)。本研究で新たに長い RNA プローブを設計し, *fgf20a* の ISH を行ったところ, この結果は Tg における EGFP 局在と一致し, 傷上皮の基底層に局在して見られた (Fig. 3-2 C)。このことから, Tg の EGFP 発現は内在性の *fgf20a* の発現を再現していることが確認された。

以上の, RT-PCR, ISH, Tg による発現解析から, *fgf20a* と *fgf20b* は Fgf リガンドの中で最

も早く傷上皮に発現し始め、再生の進行とともに傷上皮基底層細胞に局限して発現する Fgf リガンドであることが明らかになった。*fgf20a* の変異体では再生芽形成が起こらないこと併せて考えると、Fgf20 は初期 Fgf シグナルとして傷上皮に発現し再生芽形成を誘導する因子であることを示唆している。

3.2.2 *fgf3*, *fgf10a* は先端再生芽で発現する

上の Fgf リガンドの RT-PCR 発現解析から、*fgf3*, *fgf7*, *fgf10a*, *fgf10b*, *fgf12b* は主に再生芽に発現していることが示された。これらの遺伝子の *in situ* での発現を検証するため、ISH を行った。その結果、再生芽で明確に発現が検証できたのは *fgf3* と *fgf10a* のみであり、その他の *fgf* についてはほとんど発現が検出できなかった。*fgf3* と *fgf10a* は、再生芽の先端部分（先端再生芽）で強く発現し、主要な再生芽発現 *fgf* であると考えられる。(Fig. 3-3)。

3.2.3 再生芽移植による間葉細胞特異的なシグナルノックダウン

以上の発現解析から、再生初期の Fgf シグナルである *fgf20a* および *b* が表皮に発現して、再生芽誘導に関わることが示唆された。一方で、*fgf20a* 変異体では、傷上皮自身が正常に形成されないことも報告されており (Whitehead et al., 2005), *fgf20a* 変異体で見られる再生阻害が、傷上皮自体の欠損による間接的な作用の結果である可能性も考えられる。そこで、再生芽になる予定の間葉細胞が直接 Fgf20 シグナルを受け取っているのかを検証する実験を行った。

このため、間葉細胞でのみ Fgf シグナル阻害を行うことを考えた。Fgf シグナルを阻害するため、ドミナントネガティブ型 Fgf 受容体 (dn-Fgfr1) を発現誘導できる Tg(*hsp70:dn-fgfr1*) を用い (Lee et al., 2005), 38°C のヒートショックにより dn-Fgfr1 を強制発現させた。Fgf レセプターは二量体として働くので、dn-Fgfr1 の強制発現によりすべての Fgf シグナルを競合的に阻害することができる。

本研究では、この Tg の間葉細胞を野生型のひれに移植によってモザイク状に導入し、間葉細胞でシグナルノックダウンを行った (Fig. 3-4 A)。移植細胞およびその子孫細胞を同定するために、ドナーには、全身のほとんどすべての細胞で DsRed 蛍光タンパクを常時発現する Tg(*Olactb:loxP-dsR2-loxP-egfp*) 系統 (Yoshinari et al., 2012) と Tg(*hsp70l:dn-fgfr1*) のダブル Tg を用いた (Fig. 3-4 A)。

ダブル Tg の再生芽を野生型の 2 dpa の再生芽に移植して再生させると、ドナー由来の移植細胞は再生芽の一部として定着し、増殖して多数の間葉細胞を生じた (Fig. 3-4 B)。切片を作製して精査したところ、ドナー由来の赤い移植細胞のほとんどは、表皮や骨芽細胞

(Zns5⁺細胞)にはならず、間葉細胞に寄与した (Fig. 3-4 C)。

3.2.4 再生初期の Fgf シグナルは間葉細胞に直接働き再生芽形成を誘導する

hsp70l:dn-fgfr1 トランスジーンをもつ細胞を導入したモザイクひれを、移植後 5 日で再切断した後、*dn-Fgfr1* 発現をヒートショックによって誘導し、Fgf シグナルを阻害した。上に述べた様に、ひれ再生の初期ステージ (2 dpa より前) では傷上皮の *fgf20a*, *fgf20b* のみしか発現していないので (Fig. 3-1 C), この時期でヒートショックを行うことで、Fgf20 シグナルを特異的に阻害できると考えられる。

移植によって作製したモザイクひれをヒートショックなしで再生させると、移植細胞 (赤い細胞) はホストの細胞と同じく、切断面から先端側に移動してともに再生芽を形成することが観察された (Fig. 3-5 A)。しかし、ヒートショックを行って初期 Fgf シグナルを阻害すると、Fgf シグナルに応答できない移植細胞はほとんど先端側に移動しなかった (Fig. 3-5 A, B)。

面白いことに、ヒートショックを行っても、*hsp70l:dn-Fgfr1* トランスジーンをもつ細胞を含むモザイクなひれの再生長は、モザイクでない野生型のひれの再生長と有意差はなかった (Fig. 3-5 C)。また、Fgf 阻害を行ったモザイク再生芽にも再生芽マーカー *msxc* の発現は見られ、移植細胞の数が多い場合には再生芽が小さくなる傾向が見られたが、ほぼ正常な再生芽が形成されていた (Fig. 3-5 D)。

以上をまとめると、Fgf に応答できる細胞とできない細胞のモザイクひれでも、傷上皮や再生芽などの再生組織は、Fgf に応答できる野生型の細胞によって正常に形成され、Fgf シグナルに応答できない細胞は先端への細胞移動ができず、再生芽に寄与しないことが示された。このことから、2 dpa より前の再生初期の Fgf20 シグナルは、表皮から間葉細胞に直接働きかけ、間葉細胞をリクルートし再生芽形成を誘導していることが示唆された。

3.2.5 *fgf20a* の過剰発現は再生芽マーカー遺伝子の発現を誘導する

ここまでの発現解析と機能阻害実験の結果から、*fgf20a* は再生芽誘導に直接関わっていることが強く示唆された。これをさらに検証するため、ヒートショックプロモーターによって *fgf20a* の発現を誘導する Tg(*hsp70l:mcherry-t2a-fgf20a*) を作製し、*fgf20a* の gain-of-function 実験を行った。Tg 作製にあたっては、トランスジーンの子孫細胞への伝達が見られた候補のうち、ヒートショックによって全身で最も強く *mcherry* を発現する系統を単離し、実験に用いた。ISH によって、この Tg ではヒートショックによって *fgf20a* mRNA がひれで過剰に発現していることを確かめた (Fig. 3-6 A)。

この Tg を用いて再生開始前から *fgf20a* の強制発現を行った後、2 dpa でひれを回収・固定し、先端再生芽マーカーである *msxc* と *junbl* の発現を ISH により検証した。すると、*fgf20a* の強制発現を行ったひれでは、先端再生芽の早期マーカーである *junbl* の発現の顕著な上昇が観察された。また、*msxc* の発現も、基部側に広がっていることが観察された (Fig. 3-6 B)。以上の結果から、*fgf20a* の強制発現により、間葉細胞から先端再生芽細胞への誘導が起こることが示された。

3.2.6 再生芽の Fgf シグナルは再生芽の増殖に必要である

ここまでの結果から、初期 Fgf シグナル (Fgf20 シグナル) が再生芽誘導を行うことが明らかになった。そこで次に、再生芽に発現する *fgf3*, *fgf10a* の機能について検討を行った。これらの Fgf シグナルは、再生芽形成後のステージで、Fgf20 とは別の役割を持っている可能性が考えられる。そこで、*fgf3*, *fgf10a* によって仲介される後期 Fgf シグナルの役割を検証するため、再び Tg(*hsp70:dn-fgfr1*)を用い、これに 3 dpa から始めて毎日一度のヒートショックを行って、再生芽形成後における Fgf シグナルの阻害を行った (Fig. 3-7 A)。すると、Fgf シグナル阻害を行った場合には再生が直ちに停止し、先端再生芽マーカーの発現も低下した (Fig. 3-7 B,C)。細胞死の増加は観察されなかったが、再生芽における増殖細胞の数は著しく低下していた (Fig. 3-8 A-E)。以上から、後期 Fgf シグナルが再生芽の増殖に必要であることが示唆された。さらに、Fgf シグナルの阻害により、*fgf3*, *fgf10a*, *fgf20a* のリガンドの発現も減少していた (Fig. 3-7C)。このことから、Fgf シグナルは表皮および再生芽におけるリガンドの発現維持にも必要だと考えられる。

次に、初期 Fgf シグナルの機能解析と同様の手法により、後期 Fgf が直接再生芽細胞に受容されているのかを検証した。このために、先の実験と同様に、移植によって Fgf シグナルに応答しない細胞を導入したモザイクひれを作製し、これを用いて、今度は再生芽形成ステージ以降の後期 Fgf シグナルの阻害を行った。再生芽マーカーである *msxc* の発現が開始する 2 dpa から始めて、1 日 1 回のヒートショックを行った。

移植によって作製したモザイクひれをヒートショックなしで通常通りに再生させると、移植細胞もホストの野生型細胞も再生芽として増え続けていったが、ヒートショックを行って後期 Fgf シグナルを阻害すると、Fgf シグナルに応答できない移植細胞 (赤い細胞) は再生芽領域から排除されて後退していった (Fig. 3-9 A)。EdU 染色により細胞増殖を検出した結果、Fgf シグナルに応答できない細胞は増殖領域外にのみ分布し、このために細胞増殖しないことが示唆された (Fig. 3-9 B, C)。このように、Fgf に応答できない細胞は再生領域から排除されるが、野生型の細胞は正常に増殖し、全体の増殖細胞数には変化がなかった

(Fig. 3-9 D)。以上の結果から、後期 Fgf シグナルもまた、再生芽の間葉細胞に直接受容されることによって、それらの細胞増殖を維持していることが示唆された。

3.2.7 Fgf3 シグナルは再生芽の細胞増殖を促進する

以上の阻害実験から、後期 Fgf シグナルが再生芽の細胞増殖を活性化していることが示唆された。リガンドの発現解析からは、再生芽に *fgf3* と *fgf10a* が発現することが明らかになっており、これらのリガンドのいずれかまたは両方が細胞増殖を促進している可能性が考えられる。これを検証するため、Tg(*hsp70l:fgf3*) (Kwon et al., 2010)を用い、*fgf3* の強制発現実験を行った。この Tg では、ヒートショックを与えることによって、全身で *fgf3* の発現を誘導することができる (Fig. 3-10)。

この Tg のひれを切断し、*fgf3* の強制発現を誘導した後、EdU を取り込ませ、細胞増殖への Fgf3 の効果を検証した。しかし、このように全身性に Fgf3 を発現する実験では、細胞増殖への影響は観察されなかった (結果示さず)。この理由としては、再生中のひれではすでに細胞増殖が活性化され、飽和状態であるために、Fgf3 強制発現の効果が検出できないことが考えられた。

そこで本研究では、Fgf3 による細胞増殖への効果を観察する新しい系として、再生芽外植体の培養系を新たに確立した。この系では、3 dpa の再生組織から傷上皮を取り除き、再生芽のみを取り出しコラーゲンゲルに包埋して 28.5°C で培養した (Fig. 3-11 A)。このように表皮細胞を除いて培養を行うと、6 時間後には、再生芽間葉細胞の細胞増殖が低下し、再生芽マーカーである *junbl* の発現も著しく低下した (Fig. 3-11 B, C)。傷上皮を除いた再生芽の外植体は、特定の因子を与えた時の再生芽の細胞増殖活性化を検証する系となり得ることがわかった。

そこで、Tg(*hsp70l:fgf3*)の再生ひれから採取した再生芽外植体を 28.5°C で 6 時間培養し、その後 37.5°C に移して *fgf3* の発現を誘導すると (Fig. 3-12 A)、WT から採取した再生芽外植体と比べ、*fgf3* を誘導した Tg 外植体では細胞増殖が著しく増加した (Fig. 3-12 B, C)。また、TUNEL 染色により細胞死を検出したところ、*fgf3* を過剰発現した外植体と、コントロールの外植体の間で差は見られなかったことから (Fig. 3-12 D, E)、Fgf3 が外植体における増殖細胞の細胞死を阻止することによって、増殖が一件増加したように見えたわけではないことが分かった。以上のことから、Fgf3 は、実際に、再生芽細胞の増殖を促進する作用を持つことが示された。

3.2.8 *fgf20a* は *fgf3* を介して再生芽の細胞増殖を促進する

さらに、本研究では、*fgf20a* の細胞増殖への影響についても検証した。*fgf20a* を強制発現した再生芽外植体を用い、同様に細胞増殖の活性化について検証を行った。すると Fgf20a の発現によっても、*fgf3* の強制発現でみられたのと同程度の細胞増殖の増加が見られた (Fig. 3-12 B, C)。*fgf20a* を強制発現した再生芽外植体では、先端再生芽のマーカである *junbl* や *fgf3* の発現が上昇していたが (Fig. 3-13 A)、一方で、*fgf3* を強制発現した再生ひれでは、*fgf20a* の強制発現で観察されたような *junbl* と *msxc* の発現上昇は観察されなかった (Fig. 3-14 B)。これらのことから、Fgf20a と異なり、Fgf3 には再生芽誘導能はないこと、Fgf20a は再生芽の誘導とそれによる *fgf3* の発現誘導によって、間接的に再生芽間葉細胞の増殖を促進していることが示唆された。

3.3 考察

3.3.1 傷上皮細胞は Fgf20a を介して再生芽形成を誘導する

再生芽と傷上皮は付加再生における特徴的な組織である。傷上皮の重要性は様々な方法で示唆されてきたが、再生における具体的な機能については明らかになっていなかった。本研究では、*fgf20a* の発現が、再生芽が形成されるより前の早いステージから、傷上皮に局在していることを示した。さらに、その早期の Fgf シグナルが再生芽形成に必要であること、そして *fgf20a* の強制発現によって再生芽マーカー遺伝子である *junbl* の発現が誘導されることを明らかにした。これらの結果から、傷上皮の Fgf20a こそが、再生芽形成を誘導する Fgf リガンドであることが示された。以前の報告において、*fgf20a* の温度感受性変異体、*dob* 変異体のひれを切断しても再生芽形成が起こらないことが示されていたが(Whitehead et al., 2005)、*fgf20a* の正確な発現パターンや、作用する標的細胞などは明らかになっていなかった。本研究の結果とあわせると、Fgf20a が傷上皮のシグナルを間葉細胞に伝える Fgf リガンドであることが明らかになった。*fgf20* は、オタマジャクシの尾の再生でも発現することが明らかになっており(Lin and Slack, 2008)、組織再生において種間で保存された役割を担っていると考えられる。

以上のように、本研究では、Fgf20a による傷上皮から再生芽への作用メカニズムを明らかにしたが、*fgf20a* 自身が傷害によって誘導されるメカニズムはいまだ不明である。再生組織での reactive oxygen species (ROS) の産生を調べた最近の研究では、傷上皮で ROS の産生量が上昇すること、ROS の産生を阻害すると傷上皮での細胞死が抑制され、再生自体も阻害されることが示されている(Gauron et al., 2013)。さらに ROS の産生阻害を行うと *fgf20a* の発現が減少することも同時に示されている。また、オタマジャクシの尾の再生においても ROS が必須であり、ROS の産生阻害によって *fgf20* の発現低下が起こることが示されている(Love et al., 2013)。以上のことは ROS シグナルや細胞死シグナルが *fgf20* の発現誘導に関わっている可能性を示唆している。今後、*fgf20* の発現誘導の詳細な機構の解明が期待される。

3.3.2 再生芽に発現する *fgf3* は再生芽細胞の増殖を促す

傷上皮での *fgf20* の発現とは対照的に、RT-PCR と ISH による解析の結果、*fgf3* と *fgf10a* は先端再生芽で発現していることが本研究により分かった。多くの研究によって、*fgf3* と *fgf10a* は細胞増殖活性を持つことが示唆されているが(Itoh and Ornitz, 2004; Konishi et al., 2006; Shin et al., 2006; Wang et al., 2007)、これまでひれ再生における役割はわかっていなかった

た。本研究では、再生芽外植体を用いて *fgf3* の強制発現を行い、Fgf3 は再生組織（再生芽）における細胞増殖を活性化させることを実際に示した。

Fgf10a の機能に関しては、本研究では詳細な解析を行わなかったが、おそらく Fgf3 とオーバーラップするような役割があることが推測される。Fgf10 の変異マウスでは四肢がなくなり、ゼブラフィッシュでは胸ひれがなくなることが知られている (Min et al., 1998; Norton et al., 2005; Sekine et al., 1999)。また、アフリカツメガエルの四肢ではパターンニングを失った不完全な再生をすること（スパイクの形成）が知られているが、Fgf10 を添加することでパターンニングがある程度回復することが示されている (Yokoyama et al., 2001)。これらから、Fgf10 もまた、付属器官の発生や再生において、細胞の増殖やパターン形成に重要な役割を果たしていることが考えられる。また、Fgf3, Fgf10a, Fgf20a 以外の、ISH では検出できない低レベルで発現している他の Fgf リガンドが、再生において、これらの Fgf と重複する機能や、あるいはさらに何らかの別の機能を持っている可能性もあり得るが、発現レベルから考えるとごくマイナーなものであると考えられる。

3.3.3 鰭条の中の間葉系細胞が Fgf シグナルのターゲットである

以前の研究では、ISH によりひれ再生中の Fgf レセプターの発現解析が行われ、いくつかのレセプターの発現が報告されている (Lee et al., 2009)。しかしながら、これらレセプターの発現は再生組織中に広範囲に広がっており、どの細胞が Fgf リガンドを受容し実際に機能しているのかはこれまで明らかではなかった。

本研究では、Fgf シグナルの受容細胞を明らかにするため、再生芽移植という新しいアプローチを開発した。2 dpa のひれから再生芽のみをとりだしてホストの再生領域に移植すると、ドナーの細胞は、ほとんどが骨芽細胞以外の間葉細胞になる。このような系を用いれば、間葉細胞の一部を、遺伝的に改変し、かつ蛍光タンパクなどでラベルした細胞と置き換えて、様々なシグナルを強制発現したり抑制した場合の細胞の振る舞いを追跡することが可能になる。今まで、ゼブラフィッシュでは、胚での細胞移植は多数行われてきたが、成魚の、特にひれの細胞を移植した例はほぼなかった。今後、ゼブラフィッシュにおける Tg を用いた遺伝子改変技術と、細胞または組織の移植を用いた解析は、成体における再生や恒常性にかかわる様々なシグナルや分子の働きの解明に寄与することが期待される。

3.4 図表および図表の説明

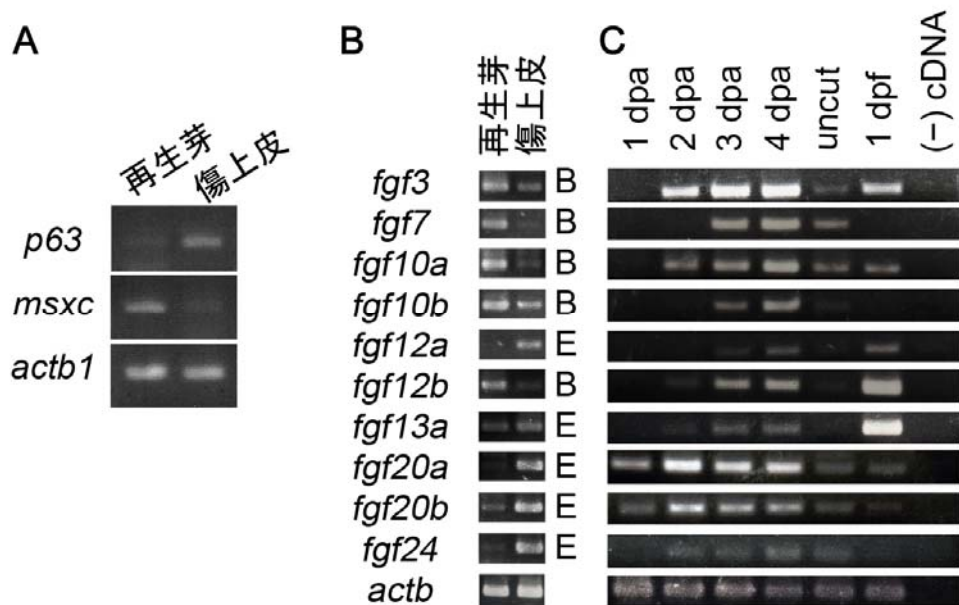


Fig. 3-1 RT-PCRによる、再生組織におけるFgfリガンドの発現解析

- (A) RT-PCRによる、再生芽と傷上皮における、*p63* (表皮マーカー)、*msxc* (再生芽マーカー)の発現解析。2 dpaの再生領域を、傷上皮と再生芽に分けて、それぞれからmRNAを精製し、RT-PCRを行った。*p63*、*msxc*の発現が、それぞれ傷上皮由来cDNAと再生芽由来cDNAにしか見られないことから、コンタミネーションなく傷上皮と再生芽を分けることができたことを示している。*actb1*、 β -actinプライマー。
- (B) RT-PCRによる、再生芽と傷上皮における、*fgf*リガンドの遺伝子発現解析。2 dpaの再生領域を、傷上皮と再生芽に分けてRNAを調整し、RT-PCRにより*fgf*リガンドの発現解析を行った。PCRのサイクル数は35サイクル。B、再生芽 (blastema) で主に発現しているリガンド；E、傷上皮 (epidermis) で主に発現しているリガンド。*actb*、 β -actinプライマー。
- (C) RT-PCRによる、1, 2, 3, 4 dpaの再生ひれにおけるFgfリガンドの発現解析。PCRサイクルは30サイクル。uncut、非再生時のひれ由来のcDNA；1 dpf、受精後1日目の胚由来のcDNA；(-)cDNA、cDNAなしのコントロール。

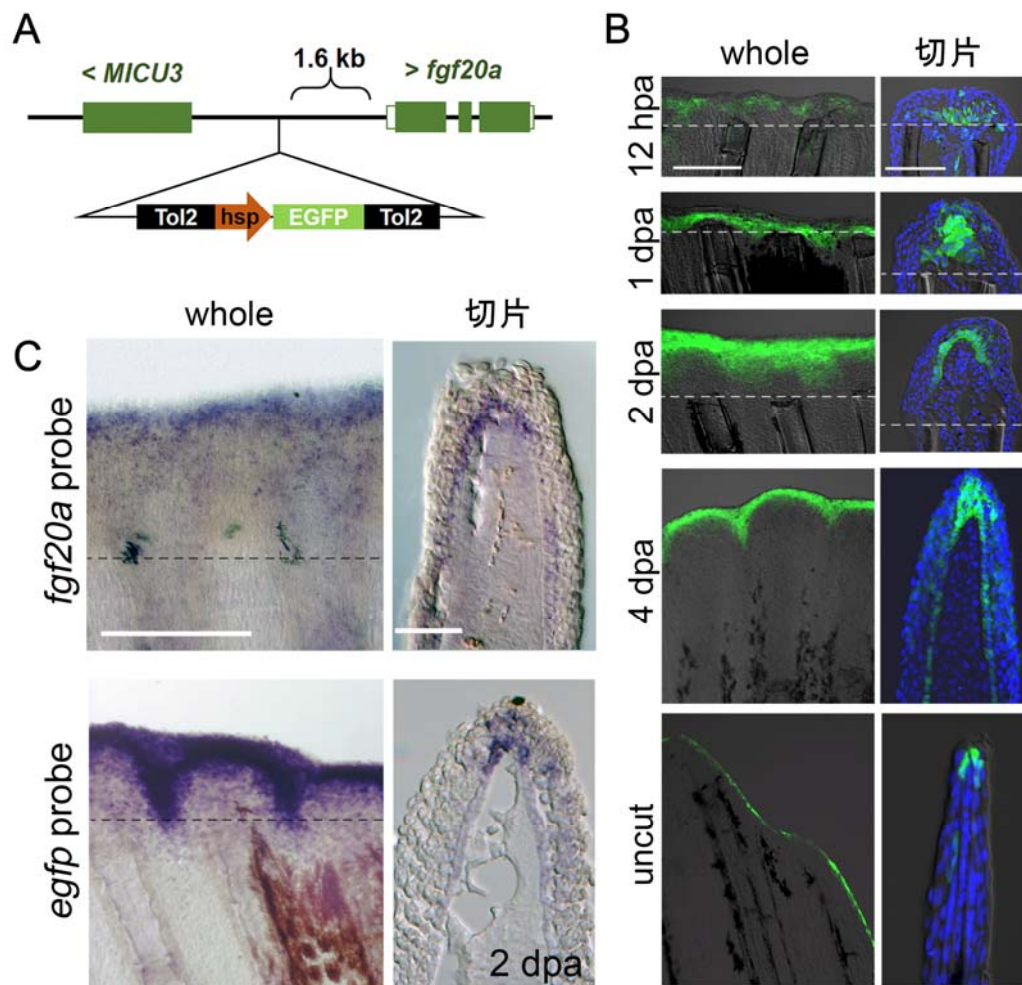


Fig. 3-2 エンハンサートラップライン HGn21A における, *fgf20a* の発現の再現

- (A) HGn21A ラインにおけるトランスジーン挿入領域。*fgf20a* 遺伝子の上流 1.6 kb の領域に、ヒートショックプロモーターの最小配列と *egfp* 配列を含むカセットが挿入されている。*tol2* はトランスポゾン配列。
- (B) HGn21A ラインの再生ひれにおける EGFP 発現。上から 12 hpa, 1, 2, 4 dpa, 非再生ひれ (uncut)。左列はホールマウント像, 右列は切片像を示している。切片は DAPI によって核を染色した。白破線は切断位置。スケールバーはそれぞれ 200 μm (左), 50 μm (右)。
- (C) ISH による, 2 dpa のひれにおける内在性の *fgf20a* の発現と (上), HGn21A における *egfp* の mRNA 発現解析 (下)。左列はホールマウント像, 右列は切片像を示している。破線は切断位置。スケールバーはそれぞれ 200 μm (左), 50 μm (右)。

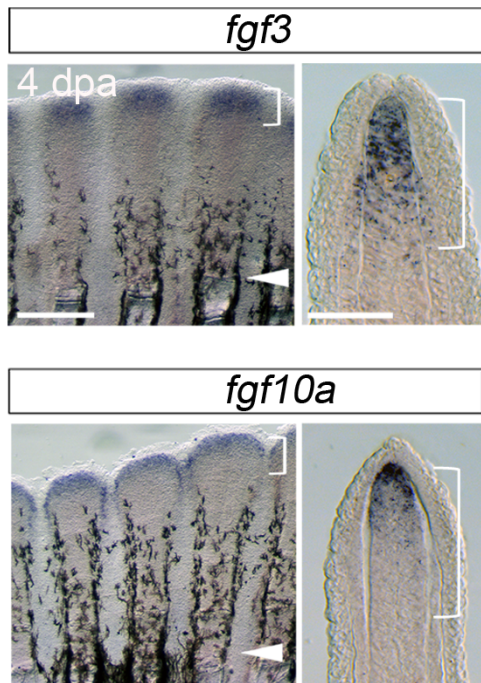


Fig. 3-3 *fgf3*と*fgf10a*は先端再生芽に発現している

ISHによる、再生ひれにおける*fgf3*と*fgf10a*の発現解析。4 dpaのひれを用いた。左はホールマウント像、右は切片像を示している。白矢頭は切断位置、白かっことはおよその再生芽領域を示している。スケールバーはそれぞれ200 μm (左), 50 μm (右)。

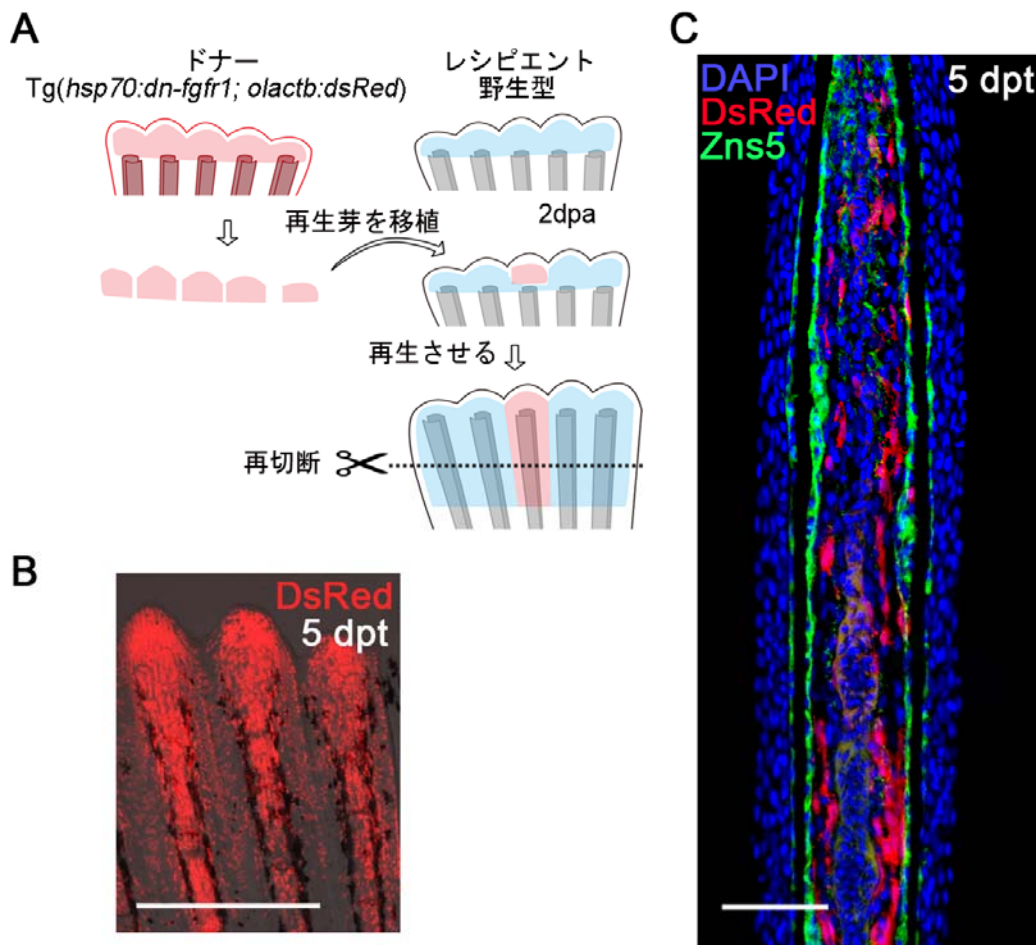


Fig. 3-4 再生芽移植による、蛍光ラベル間葉細胞を持つモザイクひれの作製

- (A) 再生芽移植実験の手順。ドナーには、*Tg(hsp70l:dn-fgfr1: Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp)*を用いた。この2 dpaの再生芽を、野生型の2 dpaの再生領域に移植し、細胞が定着した移植後5日目でひれを再切断して、再度、再生を誘導した。
- (B) ホールマウントで観察した移植後5日目（5 dpt, days post transplantation）のひれ。ドナー由来の赤い細胞が、再生組織に寄与している。スケールバーは500 μm 。
- (C) 移植後5日目（5 dpt）のひれの切片における、DsRed（赤）とZns5（緑、骨芽細胞マーカー）の免疫染色による検出。核はDAPIで染色した。DsRed陽性細胞のうち、Zns5陽性の細胞は226個中11個のみであり、ほとんどが間葉細胞になっていた。スケールバーは50 μm 。

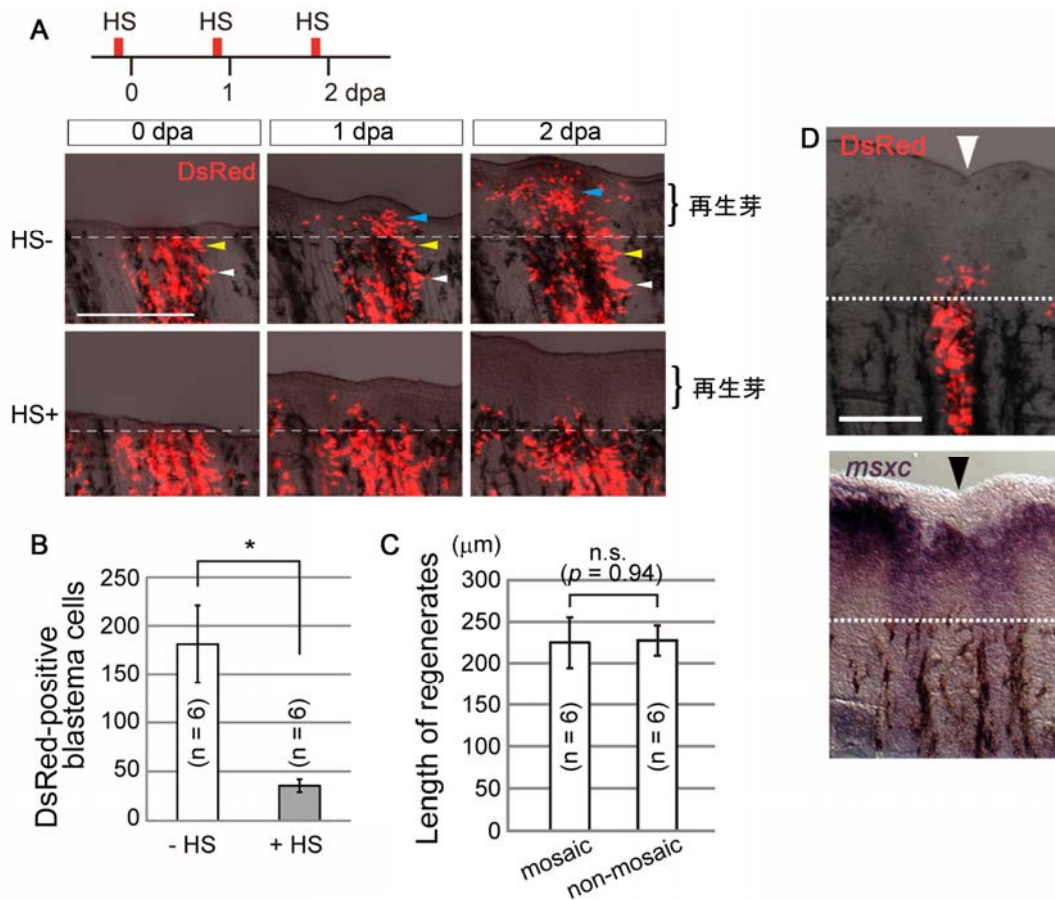


Fig. 3-5 初期の Fgf シグナルを受容できない間葉細胞は再生芽にならない

- (A) 間葉細胞を移植したモザイクひれにおける、ひれ再切断後の移植細胞の追跡。初期 Fgf を阻害されていない移植間葉細胞（上段）は、切断面を超えて先端側に移動し、再生芽形成に寄与していたが、1日1回 HS（ヒートショック）を与えたひれ（下段）では、切断面を超えて再生芽領域に遊走する移植間葉細胞（*dn-Fgfr1* 発現細胞）がほとんどなかった。矢頭は同一の細胞を示している。破線は切断位置。括弧は再生芽領域。スケールバーは 200 μm 。
- (B) 初期 Fgf を阻害したモザイク鰭条 (-HS) と阻害しなかったモザイク鰭条 (+HS) における、切断面を超えて先端側に移動した移植間葉細胞数の定量。N = 6 鰭条。* $p < 0.02$ 。
- (C) 1日1回のヒートショックを与えた、モザイクな鰭条とコントロール鰭条の、2 dpa での再生長の定量。N = 6 鰭条。n.s.は有意差なしの意。
- (D) 初期 Fgf を阻害したモザイク鰭条における *msxc*（再生芽マーカー）の発現解析。2 dpa のひれを用いて ISH を行ったところ、*msxc* の発現が見られ、正常な再生芽が形成されていることが分かった (n = 5/5)。矢頭はモザイク鰭条の位置。破線は切断位置。スケールバーは 200 μm 。

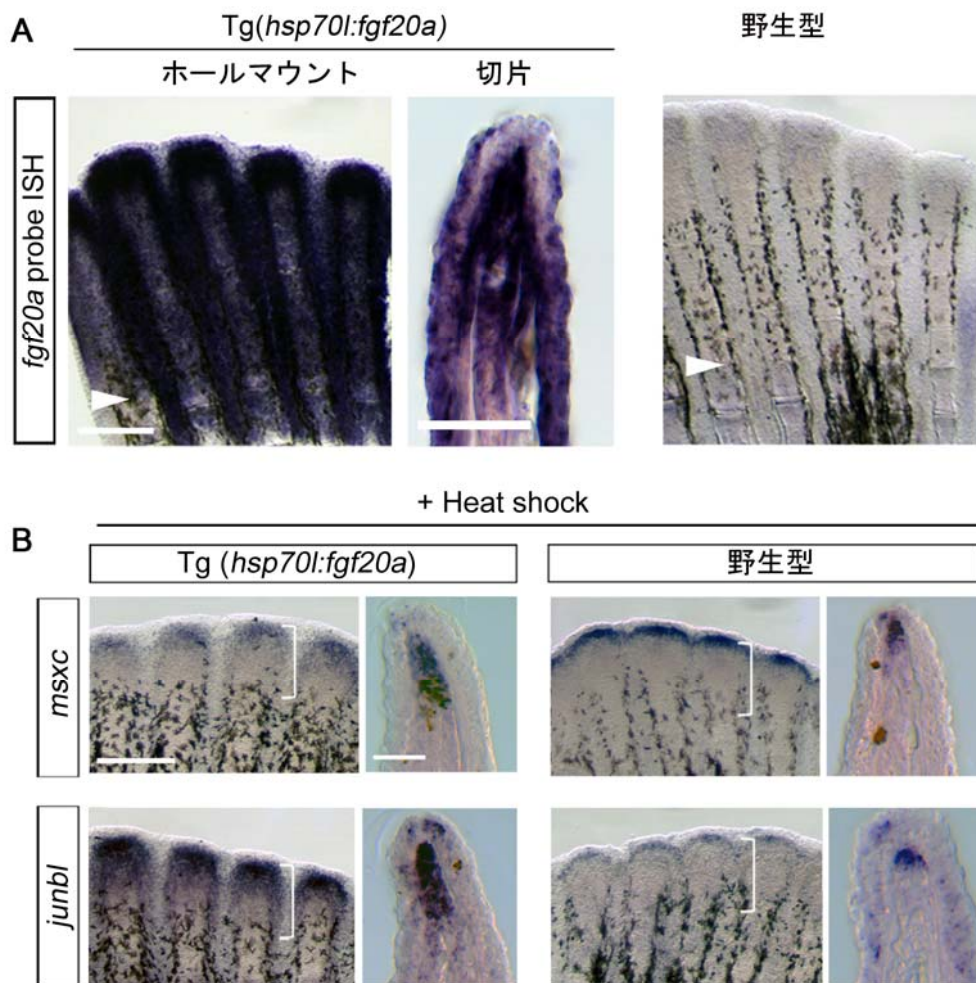


Fig. 3-6 *fgf20a* の強制発現により、先端再生芽マーカーの発現が誘導される

(A) Tg(*hsp70l:mcherry-t2a-fgf20a*)と野生型のひれにおける、ISHによる*fgf20a*の発現解析。1日1回、1時間37°Cのヒートショックを与えて*fgf20a*の発現を誘導し、4 dpaでひれを回収した。左がホールマウント像で、右が切片像。野生型はホールマウント像のみを示している。矢頭は切断位置。スケールバーはそれぞれ200 μm (ホールマウント像)、50 μm (切片像)。

(B) Tg(*hsp70l:mcherry-t2a-fgf20a*)と野生型のひれにおける、ISHによる*msxc*と*junbl*の発現解析。1日1回、1時間37°Cのヒートショックを与え4 dpaでひれを回収した。それぞれのパネルの、左がホールマウント像で、右が切片像。*fgf20a*を過剰発現したひれでは、いずれの先端再生芽マーカーの発現も基部側に広がった (n=10/10)。括弧はおおよその再生芽領域。スケールバーはそれぞれ200 μm (ホールマウント像)、50 μm (切片像)。

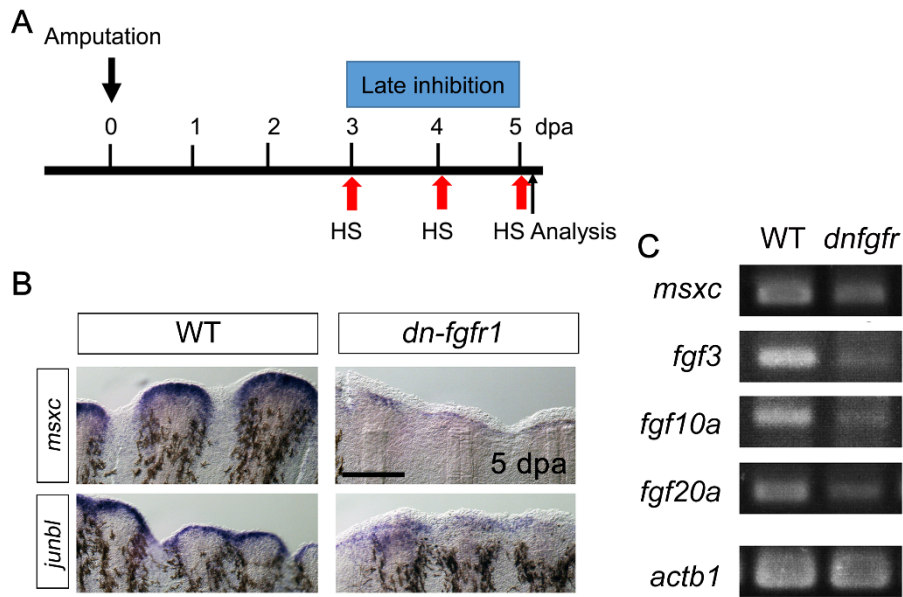


Fig. 3-7 後期 Fgf シグナルを阻害すると先端再生芽マーカ―と Fgf リガンドの発現が低下する

- (A) 後期 Fgf シグナル阻害実験の手順。Tg(*hsp70l:dn-fgfr1*)と野生型のひれを切断し、3 dpa から 1 日 1 回のヒートショックを与え、5 dpa のヒートショック後、直ちにサンプルを回収して実験に用いた。
- (B) *msxc*, *junbl* (先端再生芽マーカ―) の ISH による発現解析。後期 Fgf シグナル阻害を行ったひれ (*dn-fgfr1*, それぞれ n=6) では、野生型 (WT) における、*msxc* (n=6), *junbl* (n=7) と比べ、*msxc*, *junbl* の発現が低下していた。後期 Fgf シグナルは再生芽の維持に必要であることを示唆している。スケールバーは 200 μ m。
- (C) *msxc*, *fgf3*, *fgf10a*, *fgf20a* の RT-PCR による発現解析。後期 Fgf シグナル阻害を行ったひれ (*dn-fgfr1*) では、野生型 (WT) と比べ先端再生芽マーカ―と各種 Fgf リガンドの発現が低下していた。後期 Fgf シグナルは *fgf* リガンドの発現維持にも必要と考えられる。*actb1*, β -actin プライマー。

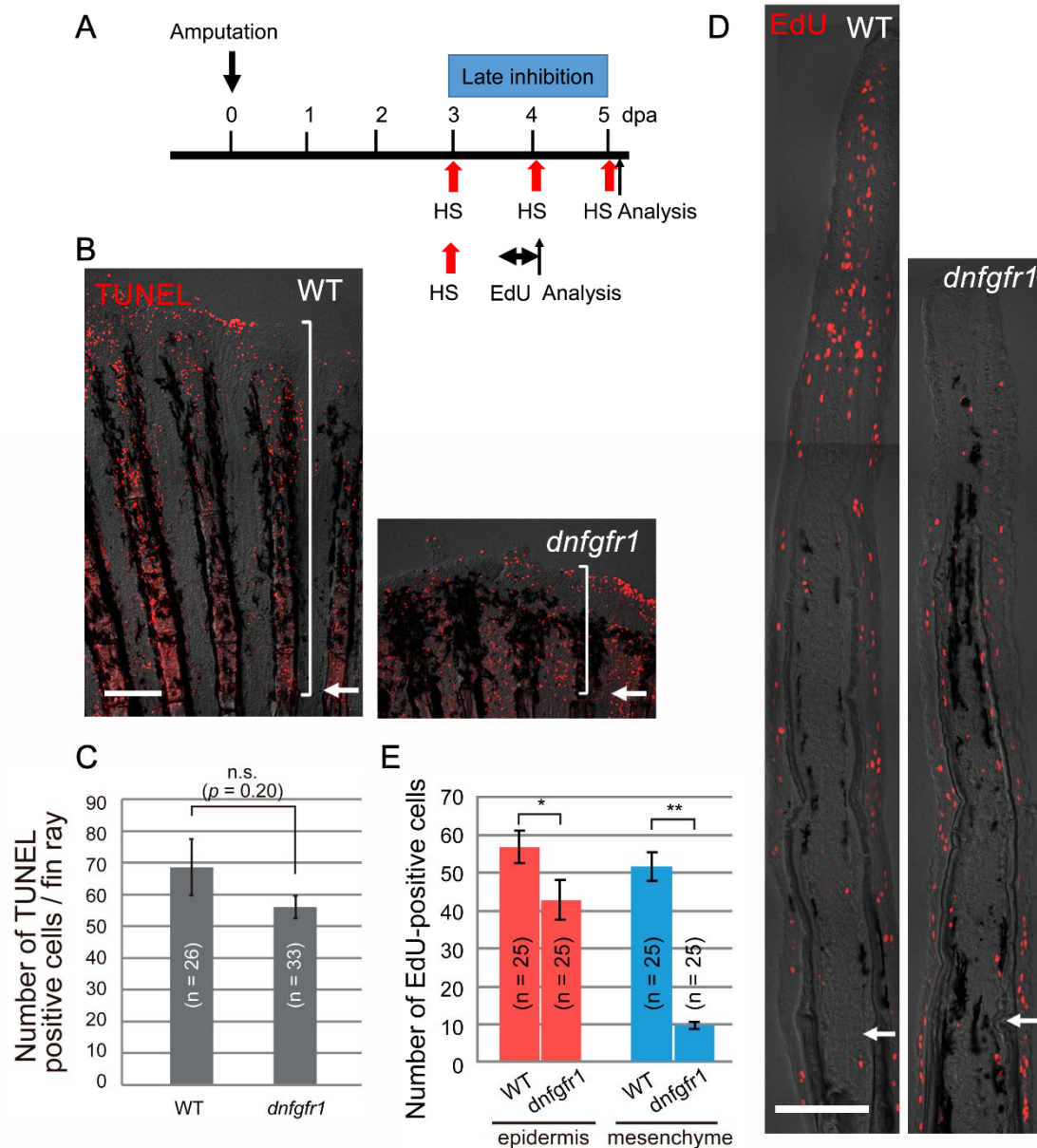


Fig. 3-8 後期 Fgf シグナル阻害は再生芽の細胞増殖を低下させる

- (A) 後期 Fgf シグナル阻害実験の手順。Tg(*hsp70l:dn-fgfr1*)と野生型のひれを切断し、3 dpa から 1 日 1 回のヒートショックを与えた。TUNEL 染色には、5 dpa のヒートショック後、直ちにサンプルを回収して用いた。EdU 染色には、4 dpa の 6 時間前から EdU を取り込ませ、6 時間後にサンプルを回収して用いた。
- (B) 後期 Fgf シグナルを阻害したひれにおける、TUNEL 染色による細胞死の検出。後期 Fgf シグナル阻害を行ったひれ (*dn-fgfr1*) では、野生型 (WT) と比べ、TUNEL 陽性細胞数に変化は見られなかった。矢印は切断位置。括弧は再生領域。スケールバーは 200 μm 。
- (C) TUNEL 陽性細胞数の定量。1 鰭条当たりの TUNEL 陽性細胞数を定量した。野生型は、

n = 26 鰭条 (5 匹), Tg(*hsp70l:dn-fgfr1*)は n = 33 鰭条 (4 匹)。n.s., not significant (有意差なし)。

(D) 後期 Fgf シグナルを阻害したひれにおける, EdU 染色による増殖細胞の検出。後期 Fgf シグナル阻害を行ったひれ (*dn-fgfr1*) では, 野生型 (WT) と比べ, EdU 陽性細胞数が減少していた。矢印は切断位置。スケールバーは 100 μm 。

(E) EdU 陽性細胞の定量。背側および腹側から 3, 4, 5 番目の鰭条の切片を作製し, 切断面より先端側の, 表皮の EdU 陽性細胞と, 再生芽の EdU 陽性細胞をカウントした。野生型, Tg(*hsp70l:dn-fgfr1*)ともに, n = 25 切片 (5 匹から 5 切片ずつ)。* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ 。

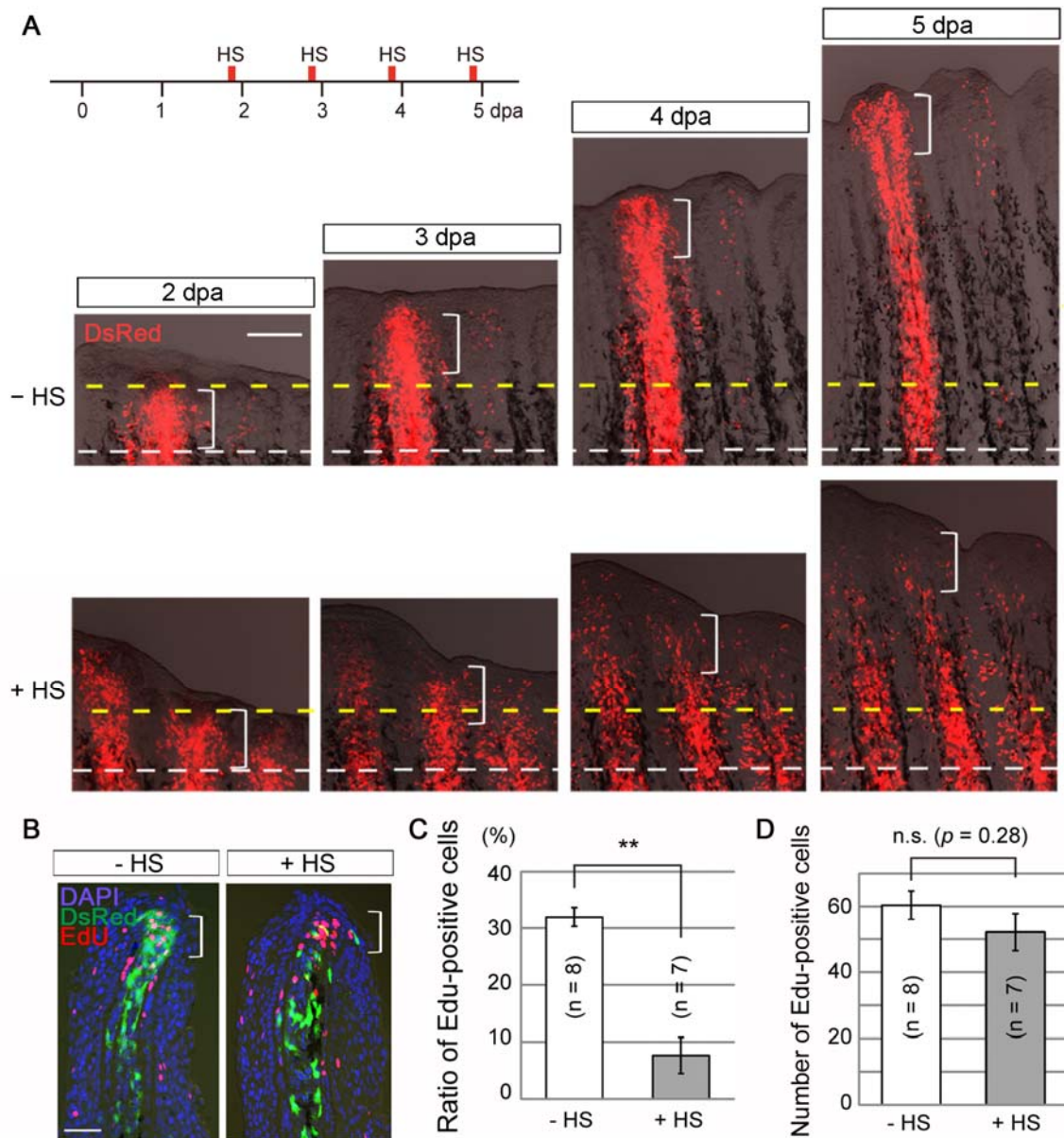


Fig. 3-9 後期 Fgf を阻害された再生芽細胞は増殖が維持されない

(A) 後期 Fgf を阻害した際の移植細胞の追跡。後期 Fgf を阻害されていない移植間葉細胞 (上段, $n = 9/9$) は、増殖し、再生領域全体に広がっているが、2 dpa から 1 日 1 回 HS (ヒートショック) を与えたひれ (下段, $n = 8/8$) では、移植間葉細胞が再生芽の増殖領域から消え、再生領域の先端部分から無くなった。白破線は切断部位。黄破線は 2 dpa で再生芽の先端位置。括弧はおおよその再生芽増殖領域。スケールバーは 200 μm 。

(B) 4 dpa のモザイク鰭条 (緑, DsRed⁺移植細胞) における, EdU 染色による増殖細胞 (赤) の検出。モザイクひれを切断し, 2 dpa から 1 日 1 回のヒートショックを与え, 4 dpa で 6 時間 EdU を取り込ませ, その後固定, 染色した。コントロールにはヒートショックを

与えなかった。DsRed（緑）は免疫染色で検出した。核は DAPI で染色した。後期 Fgf シグナルを阻害された移植間葉細胞は，再生芽増殖領域（白括弧）から消えていた。スケールバーは 20 μm 。

- (C) 移植間葉細胞中の，EdU 陽性細胞数の定量。ヒートショックを与えないひれでは，約 30%の移植細胞が EdU 陽性だが（n=8 鰭条，5 匹），ヒートショックを与え後期 Fgf シグナルを阻害したひれでは，この割合が 5%に減少した（n=7 鰭条，5 匹）。** $p < 0.001$ 。
- (D) モザイク鰭条における，総 EdU 陽性細胞数の定量。(C)の定量で用いた切片で，EdU 陽性細胞をカウントした。ヒートショックを与えない鰭条とヒートショックを与えて後期 Fgf シグナルを阻害した鰭条とで，総増殖細胞数に差はなかった。n.s. ,not significant（有意差なし）。

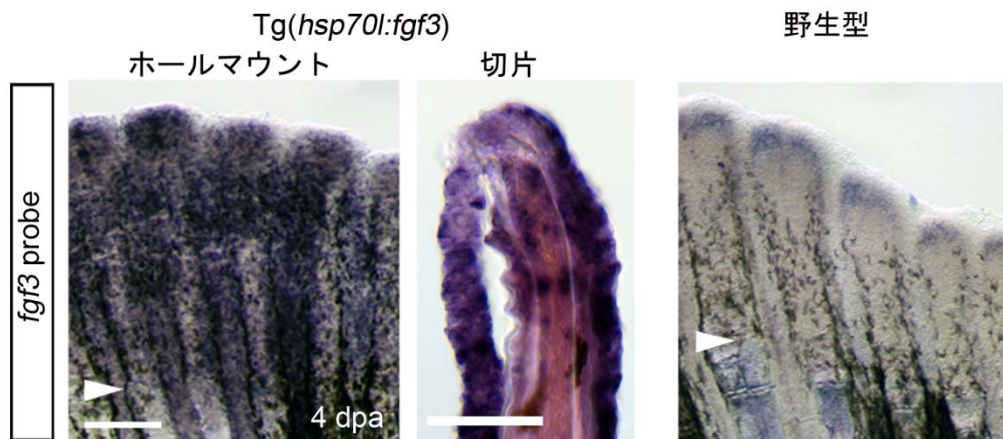


Fig. 3-10 Tg(*hsp70l:fgf3*)を用いた *fgf3* の強制発現

Tg(*hsp70l:fgf3*)と野生型のひれにおける、ISHによる*fgf3*の発現解析。1日1回、1時間37°Cのヒートショックを与え4 dpaでひれを回収した。左がホールマウント像で、右が切片像。野生型はホールマウント像のみを示している。Tgにおいて*fgf3*の発現が広範囲に誘導されている。矢頭は切断位置。スケールバーはそれぞれ200 μm (ホールマウント像), 50 μm (切片像)。

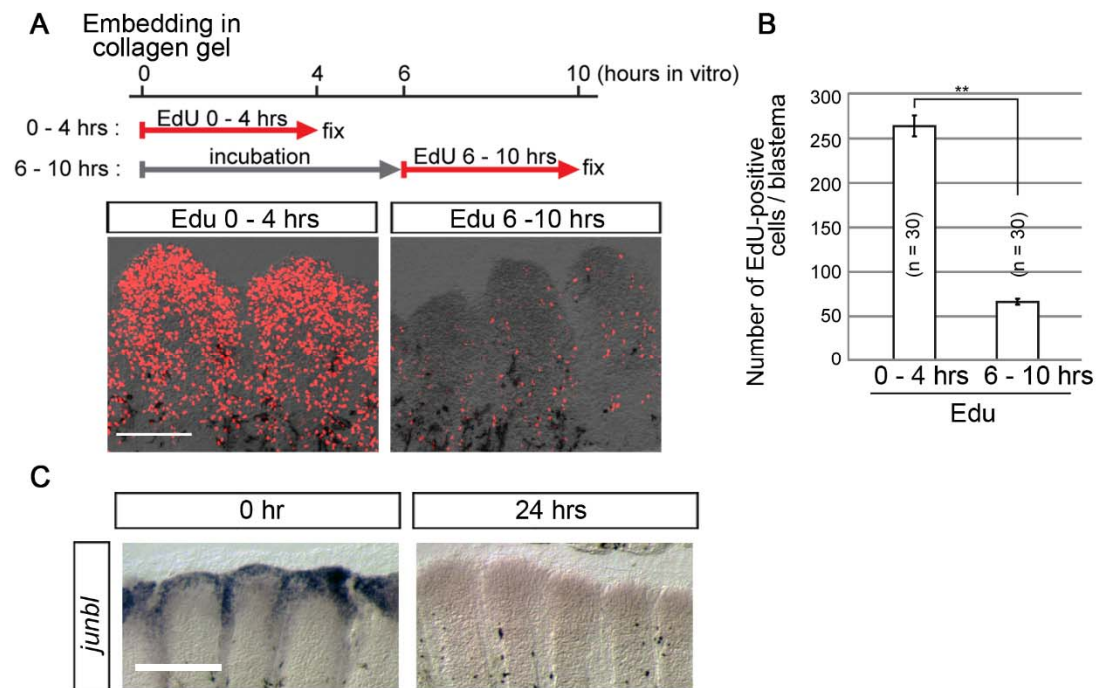


Fig. 3-11 傷上皮を取り去った再生芽外植体では、細胞増殖が維持されない

- (A) 再生芽外植体における、EdU 染色による増殖細胞の検出。3 dpa の再生領域の傷上皮を除き、コラーゲングェルに包埋した直後から 4 時間 EdU を取り込ませた外植体 (EdU 0-4 hrs) では多数の増殖細胞が見られるのに対し、コラーゲングェルに包埋後、6 時間培養してから 4 時間 EdU を取り込ませた外植体 (EdU 6-10 hrs) では増殖細胞がほとんど見られない。スケールバーは 200 μ m。
- (B) 再生芽外植体における EdU 陽性細胞の定量。n = 30 個の再生芽 (4 匹の魚から採取)。
** $p < 0.001$ 。
- (C) 再生芽外植体における、ISH による *junbl* の発現解析。コラーゲングェルに包埋した直後 (0 hr) では *junbl* の発現が見られるが、コラーゲングェルに包埋し、24 時間培養した外植体 (24 hrs) では *junbl* の発現が見られない。それぞれ n = 5。スケールバーは 200 μ m。

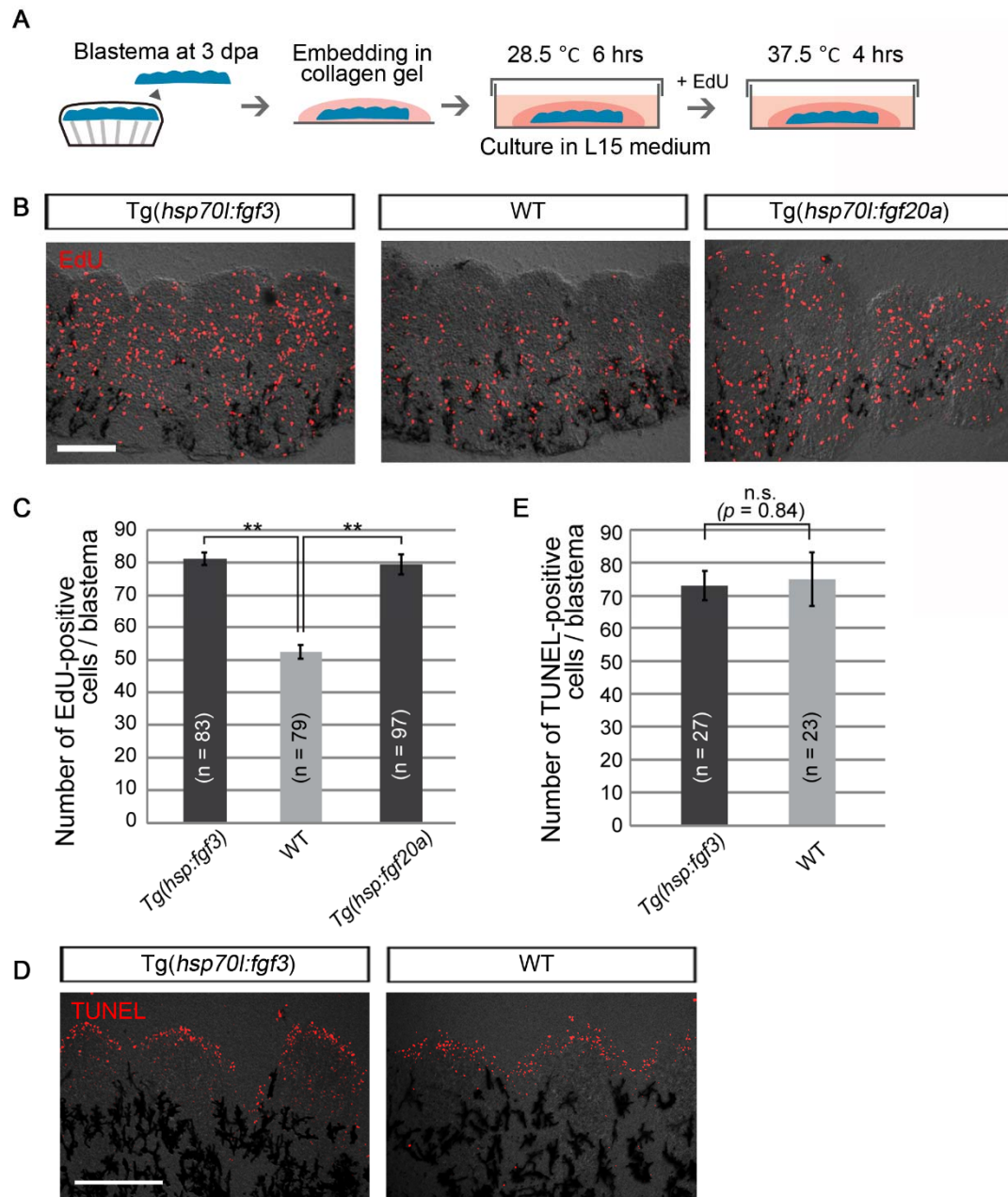


Fig. 3-12 *fgf3*, *fgf20a* の強制発現は、再生芽外植体の細胞増殖を促進する

- (A) 再生芽外植体における、Fgf リガンド強制発現実験のスキーム。3 dpa の再生領域を採取し、傷上皮を除いてコラーゲンゲルに包埋し、28.5°C で 6 時間、L15 培養液中で培養した。その後、培養液に EdU を加え、37.5°C で 4 時間培養して取り込ませた後、固定した。
- (B) Tg(*hsp70l:fgf3*), Tg(*hsp70l:mcherry-t2a-fgf20a*), 野生型のそれぞれのひれから採取した外植体における、EdU 染色による増殖細胞の検出。*fgf3*, *fgf20a* を強制発現したひれでは、細胞増殖が増加していた。

- (C) 外植体における EdU 陽性細胞の定量。定量に用いた再生芽の数をバーの中に示している。 ** $p < 0.001$ 。
- (D) Tg(*hsp70l:fgf3*)と野生型のひれから採取した外植体における, TUNEL 染色による細胞死の検出。スケールバーは 100 μm 。
- (E) 外植体における TUNEL 陽性細胞の定量。 *fgf3* を強制発現したひれにおいて, 細胞死に減少も増加も見られなかった。定量に用いた再生芽の数をバーの中に示している。 n.s., not significant (有意差なし)。

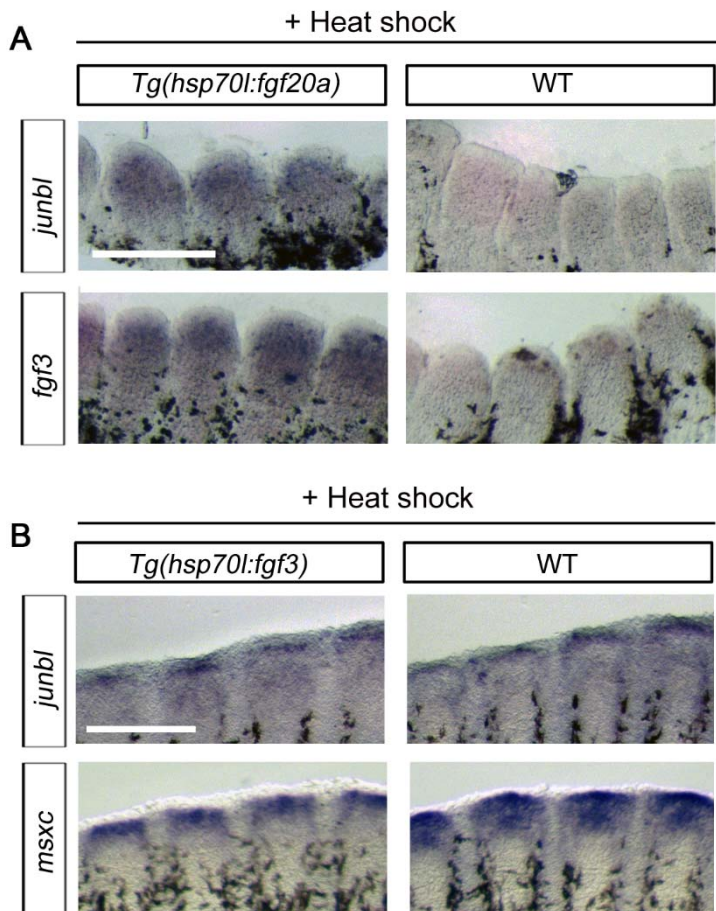


Fig. 3-13 *fgf20a* の強制発現により、先端再生芽マーカーの発現が誘導される

- (A) Tg(*hsp70l:mcherry-t2a-fgf20a*)と野生型のひれから採取した外植体における、ISH による *junbl*, *fgf3* の発現解析。20 時間 28.5°C で培養した後、4 時間 37.5°C でさらに培養して、*fgf20a* の遺伝子発現を誘導した。*fgf20a* の強制発現を行ったひれでは、再生芽に発現する遺伝子である *junbl*, *fgf3* の発現が上昇していた。Tg, 野生型どちらも n = 5。スケールバーは 200 μm。
- (B) Tg(*hsp70l:fgf3*)と野生型の再生ひれにおける、ISH による *junbl*, *msxc* の発現解析。1 日 1 回、1 時間 37°C のヒートショックを与え 4 dpa でひれを回収した。*fgf3* の強制発現を行っても、*junbl*, *msxc* の発現上昇は見られなかった。つまり、Fgf3 シグナルは再生マーカーの発現を誘導しないことを示している。Tg, 野生型どちらも n = 6。スケールバーは 200 μm。

第四章 結論

付加再生における傷上皮の重要性は古くから知られていたが、その細胞系譜や、組織再生における具体的な役割については明らかになっていなかった。本研究では、ゼブラフィッシュの尾ひれをモデルとして、傷上皮の細胞系譜および機能を明らかにすることを目的とし、第一に、*fn1b* を傷上皮マーカーとした傷上皮細胞の細胞系譜解析を行った。第二に、傷上皮による再生芽の誘導や再生芽の細胞増殖における Fgf シグナルの機能について解析を行った。

細胞系譜解析によって、傷上皮細胞は鰭条間の表皮細胞がひれの先端側と側方側に移動して形成されることが明らかになった。そして傷上皮形成の初期に *fn1b* を発現する細胞は再生中に細胞死によって消失すること、そのあとに *fn1b* を発現する細胞は再生後もひれの表皮に残るものがあることを発見し、細胞運命が異なることを明らかにした。さらに、傷上皮形成後に *fn1b* を発現する傷上皮由来細胞は、一部はひれ表皮に長期的に寄与するが、多くはひれ先端へと押し出されるように移動し、再生中に失われることが分かった。このような再生中のダイナミックな表皮の再構成は、表皮全体の細胞増殖と共役して起こることも明らかになった。

さらに、Fgf シグナルの機能解析によって、傷上皮基底層に発現する Fgf20a が、間葉細胞に直接働きかけて再生芽誘導を行っていることが明らかになった。また、再生芽ができた後のステージでも、先端再生芽に誘導される Fgf3 などの発現と、この Fgf シグナルの再生芽間葉細胞への直接の働きによって、再生芽の細胞増殖を促進していることが示唆された。

以上の、傷上皮や再生時の表皮の解析を通し、新たに興味深い点が見つかった。例えば、傷口から遠く離れた領域の表皮まで細胞増殖の活性化シグナルが伝播することはこれまで知られていなかった。どのようなメカニズムによって、遠方の細胞増殖が誘導されているのか非常に興味深い。

また、*fgf20a* の発現細胞は先端部の傷上皮基底層細胞のみに限局し、*fn1b* が広範囲の傷上皮に発現するのは対照的である。*fn1b*⁺細胞と *fgf20a*⁺細胞はほぼ異なる細胞集団と考えられ、*fgf20a*⁺傷上皮細胞についても、その由来や細胞運命の解析を行えば、再生の制御機構について新たな発見につながると考えられる。さらに今後、傷上皮の誘導自身にかかわるシグナルやメカニズムなどについても明らかになることによって、生物が本来持つ内在性の再生、修復力を使った再生医療への発展が期待される。

第五章 実験材料と方法

ゼブラフィッシュ (*Danio rario*) の飼育

ゼブラフィッシュは、東京工業大学の所属研究室で 10 年以上継代している *Tupfel long fin* (TL) 系統と AB 系統の交雑系を野生型として用いた。Tg(*krt4p:gal4*) (Wada et al., 2013) は北里大学の和田浩則准教授から、Tg(*UAS:GFP*) (Asakawa et al., 2008), および HGn21A 系統 (Nagayoshi et al., 2007) は国立遺伝学研究所の川上浩一教授から、Tg(*hsp70l:dnfgr1-egfp*) (Lee et al., 2005) は Zebrafish International Resource Center (ZIRC) から、Tg(*hsp70l:fgf3*) (Sweet et al., 2011) は Texas A&M University の Bruce B. Riley 教授から、それぞれ分与していただいた。Tg(*Olactb:loxP-dsrRed2-loxP-egfp*) (Yoshinari et al., 2012), Tg(*hsp70l:mcherry-t2a-fgf20a*) (横田裕輝, 2014 年度修士論文) は所属研究室で作製された系統を用いた。BAC Tg(*fn1b:egfp*), BAC Tg(*fn1b:creERT2*), Tg(*krt4p:mcherry-t2a-creERT2*), は本研究で新たに作製した。

ゼブラフィッシュの飼育方法は、The Zebrafish Book に従い、一部改変した。具体的には、成魚および幼魚は再循環システムにより維持し、システムの水温はヒーターで 28.5°C に保った。照明は明 14 時間、暗 10 時間の周期に調整した。エサは、魚のサイズに合わせて量を調節しながら、孵化させたブラインシュリンプを朝と夜に、粉エサを昼に与えた。胚の飼育には、egg water (0.06% artificial marine salt, 0.0002% methylene blue) を用いた。幼魚は、受精後 5 日目から餌を与え循環システムに置いた。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、tricaine (ethyl 3-aminobenzoate methanesulphonate, Sigma-Aldrich) 麻酔の下で行い、苦痛を最小限に抑えるようにした。

成魚尾ひれの再生実験

成魚の再生実験には、2~12 カ月齢のゼブラフィッシュを用いた。ひれを切断する際には、魚を 0.002% tricaine/ egg water で麻酔してから、解剖用メスを用いて、尾ひれの一番短い鰭条の中央を通る直線で切断した。異なる部分を切断した際には、その旨を図の説明に記載した。切断後水槽に戻して 28.5°C で再生を進行させ、目的のステージで採取し、その後の解析に使用した。

Tg ゼブラフィッシュの作製

BAC コンストラクトの作製は以前に確立されている方法に従った (Ando et al., 2017; Bussmann and Schulte-Merker, 2011; Narayanan and Chen, 2011; Suster et al., 2011)。*fn1b* 遺伝子を含む BAC クローン CH73-4O17 は、配列が決定されているゼブラフィッシュ BAC のなか

ら検索し、BAC PAC リソースセンターから入手した。この BAC を用い、EGFP 発現コンストラクト、Cre リコンビナーゼ発現コンストラクトをそれぞれ作製した。

Tg(*krt4p:mcherry-t2a-creERt2*)の作製には、*pTol2(hsp70l:mcherry-t2a-creERt2)*(Yoshinari et al., 2012)の SfiI 認識部位を用いて、ヒートショックプロモーターを、*krt4* の上流 4kb を含むプロモーターに置換した。

DNA は、PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (invitrogen) を用いて精製し、インジェクション溶液(125 ng/μl BAC DNA または 25 ng/μl プラスミド DNA, 25 ng/μl transposase mRNA, 0.2 M KCl, 0.25% フェノールレッド)を調整した。ゼブラフィッシュの受精卵は 2 mg/ml の Pronase (Roche) で数分処理し、コリオンを取り除き、1~4 細胞期に上記の溶液をインジェクションした。インジェクションした F0 胚は 0.3x Niu-Twitty buffer (17.4 mM NaCl, 0.21 mM KCl, 0.12 mM MgSO₄, 0.18 mM Ca(NO₃)₂, 1.5 mM HEPES, pH 7.6) 中で受精後 5 日まで飼育した。遺伝子の導入効率の高い個体を選んで F0 として飼育し、F0 同士を掛け合わせ、F1 に挿入が起こっているものをスクリーニングした。F1 キャリアは野生型と 3 世代以上交雑して、安定に遺伝子を保持、発現するものをライン化して実験に用いた。

顕微鏡観察

蛍光実体顕微鏡で観察する際は、tricaine で麻酔した魚を 2%アガロースで作成した観察台に乗せて観察し、写真を撮影した。共焦点顕微鏡を用いたライブイメージングの際には、麻酔した魚を観察台に乗せた後、さらにひれを 2%低融点アガロースで固定してから観察した。

蛍光実体顕微鏡は AF6000 (Leica) を用いた。共焦点顕微鏡を用いたライブイメージング、免疫染色したひれやその切片の写真撮影は FV-1000 (Olympus) または LSM 780 (Carl Zeiss) によって行った。ISH の組織切片の写真は Axioplan 2 (Carl Zeiss) によって取得した。

whole mount *in situ* hybridization (ISH)

ISH は Thisse らの方法に沿って行った(Thisse and Thisse, 2008)。具体的な操作を以下に示す。

採取したサンプルは直ちに 4% paraformaldehyde (PFA, sigma aldrich) / Phosphate Buffered Saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄)に浸漬し、4°C で一晩以上固定した。その後、0.1% Tween 20/PBS (PBT)で洗浄し、段階的に MeOH に置換して脱水した。脱水したサンプルは 100% MeOH 中で-30°C で保存した。サンプルを室温に戻し、段階的に PBT に置換して再水和させ、10 μg/ml ProK/PBT で 20 分間処理し、その後 PBT で洗浄した。4% PFA/PBS を用いて室温で 20 分間の再固定を行った後、PBT で洗浄した。その後、Hybridization Buffer (HB, 50% formamide, 5xSSC (pH 7.0), 500 ug/ml torula (yeast) RNA

or tRNA 50 ug/ml heparin, 0.1% Tween 20, 9mM citric acid to pH 6.0-6.5) に置換し, 65-70°Cで2時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。用いた 20x Saline Sodium Citrate (20xSSC, Nacalai Tesque)の組成は, 3 M NaCl, 0.3 M Sodium Citrate, pH 7.0 である。続いて Digoxigenin (DIG)標識したアンチセンス RNA プローブ約 1 µg/ml を含む HB に置換し, 65-70°Cでハイブリダイゼーションを一晩行った。その後, HB/2xSSC 混合溶液(75%HB, 50%HB, 25%HB)で各 10 分間洗浄し, 続いて 2xSSC と 0.2xSSC による洗浄を行った。以後はサンプルを室温に戻し, 0.2xSSC/PBT 混合溶液(75% 0.2xSSC, 50% 0.2xSSC, 25% 0.2xSSC)で各 5 分間洗浄を行い, 続けて PBT に置換した。さらに, Blocking buffer (2 mg/ml BSA, 5% sheep serum /PBT)で室温にて 2 時間以上のブロッキングを行った後, Alkaline Phosphatase (AP)標識抗 DIG 抗体を Blocking buffer に 4000 倍希釈し, 4°Cで一晩抗体反応を行った。その後, PBT で洗浄を行い, NTMT buffer (50mM MgCl₂, 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.1% Tween20)で 5 分間, 3 回洗浄を行った後, 450 µg/ml nitro blue tetrazolium (NBT), 175 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) を含む NTMT buffer に置換し, 室温・遮光条件下で発色反応を行った。発色後は, PBT により数回洗浄し, 4% PFA/PBS に置換することで発色反応を停止した。染色したサンプルは 80% glycerol に置換し, 光学顕微鏡を用いて観察した。組織切片を作製する際は, 80% glycerol を PBT により洗い流し, 20% sucrose /PBS に置換して 4°Cで一晩おいてから, ティッシュ・テック O.C.T.コンパウンド (サクラファインテックジャパン) に包埋して切片作製を行った。

組織切片の作製

サンプルを 4% PFA/PBS に浸漬し, 4°Cで一晩固定した。その後, PBT で洗浄し, 段階的に MeOH に置換して脱水した。脱水したサンプルは 100% MeOH 中で-30°Cで保存した。サンプルを PBT で段階的に再水和した後, 20% sucrose /PBS に置換して 4°Cで一晩おいた。サンプルは, アルミホイルで作製した型に O.C.T.コンパウンドとともに包埋して液体窒素で冷却し, 凍結させた。包埋したサンプルはクライオスタットを用いて 10~20 µm 厚の薄切片にし, 観察または染色に使用した。

Whole mount 免疫染色

4% PFA /PBS で一晩固定したサンプルを PBTx (0.1% Triton X-100 / PBS) で置換した。さらに, ブロッキングバッファー (5% sheep serum, 0.2% BSA/PBSTx) に置換して, 室温 2 時間シェーカー上に置き, ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体と 4°C 一晩または室温 2 時間反応させた。その後, PBTx で 10 分間 6 回洗浄し, 次に, ブロッキングバッファ

一で希釈した二次抗体に置換して、4°C 一晩または室温 2 時間反応した。最後に、PBTx で 10 分間 6 回洗浄し、蛍光退色防止剤として 25 mg/ml DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2,] octane, Nacalai Tesque) を含む 80%グリセロールに置換し、スライドガラス上にマウントした。サンプルは、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。

凍結切片における免疫染色

作製した凍結切片は、最初に PBS, 次に PBTx に浸し O.C.T.コンパウンドを洗い流した後、ブロッキングバッファーとともに、乾かないよう湿潤箱中で室温 2 時間ブロッキングを行った。次に、ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体と、4°C 一晩または室温 2 時間反応させた。PBTx で 10 分 3 回洗浄し、ブロッキングバッファーで希釈した二次抗体に置換し、さらに 4°C 一晩または室温 2 時間反応させた。PBTx で 10 分間 3 回洗浄し、25 mg/ml DABCO を含む 80%グリセロールでマウントして、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。

用いた抗体の詳細は以下のとおりである。

抗体名	動物種	希釈倍率	メーカー
anti-GFP	rat	1/1000	Nacalai Tesque
anti-DsRed	rabbit	1/1000	Clontech
anti-Zns5	mouse	1/100	ZIRC
anti-E-cadherin	mouse	1/1000	BD Transduction Laboratories™
anti-rabbit Alexa 488	goat	1/1000	Invitrogen
anti-rabbit Alexa 568	goat	1/1000	Invitrogen
anti-mouse Alexa 488	goat	1/1000	Invitrogen
anti-rat Alexa 488	goat	1/1000	Invitrogen

Cre-loxP システムでの組換えの誘導

CreERt2 発現 Tg と, Tg(*Ola*ctb:*loxP-dsRed-loxP-egfp*)システムを掛け合わせ, ダブル Tg を得た。目的のステージで, 0.1~5 μ M の 4-OH tamoxifen (TAM, Sigma) /Egg water, または 2.5 μ M の fulvestrant (ICI, sigma) /Egg water 中で飼育し, Cre リコンビナーゼによる組換えを誘導した。

Cre 標識された細胞の定量

Cre ラベルされた傷上皮細胞コロニーの数と面積の定量 (Fig. 2-12) には, ImageJ ソフト

ウェア(ver1.49; <https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いた。顕微鏡で取得した蛍光画像を 2 値化し、“analyse particles” コマンドを用いて定量した。

TUNEL 染色

組織を 4% PFA/PBS で 4°C 一晚固定した後、PBT x で 2 回洗浄し、MeOH に段階的に置換した。100% MeOH で十分に脱水を行い、-20°C で保存した。サンプルを室温に戻し、PBTx に段階的に置換した。PBTx で 5 分の洗浄を 5 回行い、10 µg/ml ProK/PBTx と室温、15 分間反応、さらに PBTx で洗浄、4% PFA/PBS、20 分間の再固定を行った後、再び PBTx で洗浄した。この後、フレッシュに作製した 0.1% sodium citrate/0.1% Triton X-100/H₂O に置換し、氷上で 15 分間静置し、その後、PBTx で 5 分間の洗浄を 3 回行った。TUNEL 反応溶液 (labeling mix : enzyme solution = 9 : 1, Roche) を 50 µl 加え、37°C で 1 時間反応を行った。反応後、PBTx で洗浄し、サンプルを、DABCO を含む 80% グリセロールに置換した。その後、スライドガラス上にマウントし、共焦点顕微鏡にて写真撮影を行った。

EdU 染色

細胞増殖は Click-iT EdU Imaging Kit (Life Technologies)を用いて検出した。ゼブラフィッシュは 50 µM の EdU を溶かした飼育水にいれ、12 時間または 6 時間、28.5°C で飼育した。EdU の検出は、添付のマニュアルの通りに行った。免疫染色を行う場合は、EdU 染色を先に行い、その後、続けて抗体反応を行った。染色したサンプルは、25 mg/ml DABCO を含む 80%グリセロールでマウントし、観察した。

RT-PCR

組織特異的 RT-PCR に用いるサンプルを調製するため、2 dpa の野生型の再生部分を採取し、6.25%パンクレアチン / L15 培養液中で 37°C 25 分酵素処理をした。その後 10%FBS (Fetal bovine serum, 牛胎児血清 / L15 培養液) で置換し、30G の注射針を用いて、注意深く再生芽と傷上皮に剥離した。5 匹分の再生芽と傷上皮を集め TRIzol® RNA Isolation Reagents (GibcoBRL) を用いて RNA を抽出した。その後、ThermoScrip RT-PCR System (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として目的の遺伝子を PCR 増幅した。

通常の RT-PCR には、組織を分離することなくそのまま使用し、同様の手順で cDNA を合成し、PCR を行った。

RT-PCR に用いたプライマーは以下のとおりである。

RT-PCR 用プライマー		
<i>fgf3</i>	F	GTGAGTTTCTGGAGCGCATTC
	R	CCTATGAGAGCCTGTGTGGTG
<i>fgf7</i>	F	GACACAAGATCCAAACAACCTGCT
	R	GACGCTCTCTTTCCCTCGTCTT
<i>fgf10a</i>	F	CGAAATCAAGTCTGTGGATGTG
	R	GGAGAAAGTGTGTGGCTGTGT
<i>fgf10b</i>	F	CGGTGTGTGTTCGTTTATTTTCTC
	R	TTACTGCCAAGACCTCTGATAGC
<i>fgf12a</i>	F	GTTTCTACATCGGCATGAACG
	R	GATCGCTGTTTCTCTTCAATCTC
<i>fgf12b</i>	F	CACAGCGGAGTGTAAGTTTAAGG
	R	ACTCTTTCCCTGGTGCTCATAGTG
<i>fgf13a</i>	F	CATCAGAACACTTCACACCAGAG
	R	CCGCTACCAGAACGAGAGAAT
<i>fgf20a</i>	F	CTGTCAAAGCCGCAAGCAGTGACTGCGCAAAACAC
	R	GAGTTTGAGGTTTCATTGGTTTCAGCTGTGACCTAG
<i>fgf20b</i>	F	AAACCTCGGACTGTTGAATGA
	R	GAGCCATAAAGTTCTCCCTTGTC
<i>msxc</i>	F	CTCCAACCTCTCCGACTGCAAG
	R	CAGTTTCTCTAGTTCGGCCTCCTG
<i>p63</i>	F	CCTCAGTATACAAGCCTGGGGCTTCTCAACAGCAT
	R	ATCTGACAGTACAGCTTCTTCAACTCTGTGGAGTA
<i>actb1</i>	F	TTCACCACCACAGCCGAAAGA
	R	TACCGCAAGATTCCATACCCA

熱誘導による遺伝子の強制発現

Tg(*hsp70l:dn-fgfr1*), Tg(*hsp70l:fgf3*), Tg(*hsp70l:mcherry-t2a-fgf20a*)を用いた遺伝子強制発現には、ゼブラフィッシュを小型のバスインキュベーターに入れ、28.5°Cから10分かけて38°Cにまで温度を上げ、38°Cで60分保ち、その後10分かけて28.5°Cまで再び温度を下げた。これを1日1回行った。

再生芽移植

再生芽移植は、以前報告した方法に従って行った(Shibata et al., 2017; Yoshinari et al., 2012)。

詳細を以下に示す。

ドナーには、Tg(*hsp70:dn-fgfr1*)と Tg(*Olactb:loxP-dsRed-loxP-egfp*)系統の魚を掛け合わせて得られた、ダブル Tg の魚を用いた。レシピエントには野生型の魚を用いた。ドナーは、2 dpa で再生芽を採取し、penicillin/streptomycin を含む、0.3x Niu-Twitty buffer 中で、30G の注射針を用いて再生芽と傷上皮を物理的に剥離し、再生芽をさらに 1 鱗条分ずつ単離した。移植には、先端を直径 20 μm ほどに加工したガラス針を用いて、レシピエントの 2 dpa の再生芽に穴をあけドナーの再生芽を押し込み、傷が閉じるのを待って飼育水に戻した。移植した魚は、移植後 5 日目まで再生させて移植細胞を定着させ、さらにひれを切断して再生を誘導した。

統計処理

統計解析は Microsoft Excel 2016 を用い、Student's *t*-test (two tailed) によって有意差を検定した。すべての統計結果は、平均値と標準誤差 mean \pm standard error of mean (SEM) で示してある。サンプルサイズと *p* 値は、図の中か、図の説明に示してある。*p* 値が 0.05 以上の時、有意差なし (n.s., not significant) とした。

参考文献

- 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**, 643–650.e3.
- Armstrong, B. E., Henner, A., Stewart, S. and Stankunas, K.** (2017). Shh promotes direct interactions between epidermal cells and osteoblast progenitors to shape regenerated zebrafish bone. *Development* **144**, 1165–1176.
- Asakawa, K., Suster, M. L., Mizusawa, K., Nagayoshi, S., Kotani, T., Urasaki, A., Kishimoto, Y., Hibi, M. and Kawakami, K.** (2008). Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 1255–1260.
- Becker, T., Wullmann, M. F., Becker, C. G., Bernhardt, R. R. and Schachner, M.** (1997). Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* **377**, 577–595.
- Bely, A. E.** (2010). Evolutionary Loss of Animal Regeneration: Pattern and Process. *Integr. Comp. Biol.* **50**, 515–527.
- Bely, A. E. and Sikes, J. M.** (2010). Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 1464–1469.
- Bereiter-Hahn, J. and Zylberberg, L.** (1993). Regeneration of teleost fish scale. *Comp. Biochem. Physiol.* **105**, 625–641.
- Bernhardt, R. R., Tongiorgi, E., Anzini, P. and Schachner, M.** (1996). Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* **376**, 253–264.
- Blum, N. and Begemann, G.** (2012). Retinoic acid signaling controls the formation, proliferation and survival of the blastema during adult zebrafish fin regeneration. *Development* **139**, 107–16.
- Bouzaffour, M., Dufourcq, P., Lecaudey, V., Haas, P. and Vríz, S.** (2009). Fgf and Sdf-1 pathways interact during Zebrafish fin regeneration. *PLoS One* **4**, 1–8.
- Brockes, J. P.** (1997). Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science* **276**, 81–7.
- Broussonet, P. M. A.** (1786). *Observations sur la régénération de quelques parties du corps des poissons*. Histoire del'Académie Royale des Sciences.
- Bussmann, J. and Schulte-Merker, S.** (2011). Rapid BAC selection for tol2-mediated transgenesis in zebrafish. *Development* **138**, 4327–4332.
- Campbell, L. J. and Crews, C. M.** (2008). Wound epidermis formation and function in urodele amphibian limb regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 73–79.
- Chablais, F. and Jazwinska, A.** (2010). IGF signaling between blastema and wound epidermis is required for fin regeneration. *Development* **137**, 871–879.
- Chen, C.-H., Merriman, A. F., Savage, J., Willer, J., Wahlig, T., Katsanis, N., Yin, V. P. and Poss,**

- K. D.** (2015). Transient laminin beta 1a Induction Defines the Wound Epidermis during Zebrafish Fin Regeneration. *PLoS Genet.* **11**, e1005437.
- Chen, C. H., Puliafito, A., Cox, B. D., Primo, L., Fang, Y., Di Talia, S. and Poss, K. D.** (2016). Multicolor Cell Barcoding Technology for Long-Term Surveillance of Epithelial Regeneration in Zebrafish. *Dev. Cell* **36**, 668–680.
- Dent, J. N.** (1962). Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J. Morphol.* **110**, 61–77.
- Evans, N. D., Oreffo, R. O. C., Healy, E., Thurner, P. J. and Man, Y. H.** (2013). Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **28**, 397–409.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. and Chambon, P.** (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 752–757.
- Frank R. Lillie** (1901). Notes On Regeneration And Regulation In Planarians. *Am. J. Physiol.* **6**, 129–141.
- Fuchs, E.** (2008). Skin stem cells: rising to the surface. *J. Cell Biol.* **180**, 273–84.
- Gauron, C., Rampon, C., Bouzaffour, M., Ipendey, E., Teillon, J., Volovitch, M. and Vriza, S.** (2013). Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci. Rep.* **3**, 2084.
- Geurtzen, K., Knopf, F., Wehner, D., Huitema, L. F. A., Schulte-Merker, S. and Weidinger, G.** (2014). Mature osteoblasts dedifferentiate in response to traumatic bone injury in the zebrafish fin and skull. *Development* **141**, 2225–2234.
- Gilbert, S. F.** (2000). *Developmental biology*. Sinauer Associates.
- Goss, R. J.** (1956). Regenerative inhibition following limb amputation and immediate insertion into the body cavity. *Anat. Rec.* **126**, 15–27.
- Grotek, B., Wehner, D. and Weidinger, G.** (2013). Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during zebrafish fin regeneration. *Development* **140**, 1412–23.
- Itoh, N. and Konishi, M.** (2007). The Zebrafish fgf Family. *Zebrafish* **4**, 179–186.
- Itoh, N. and Ornitz, D. M.** (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* **20**, 563–569.
- Jaźwińska, A., Badakov, R. and Keating, M. T.** (2007). Activin- β A Signaling Is Required for Zebrafish Fin Regeneration. *Curr. Biol.* **17**, 1390–1395.
- Kametani, Y., Chi, N. C., Stainier, D. Y. R. and Takada, S.** (2015). Notch signaling regulates venous arterialization during zebrafish fin regeneration. *Genes to Cells* **20**, 427–438.
- Kawakami, A.** (2010). Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Dev. 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.
- Konishi, M., Asaki, T., Koike, N., Miwa, H., Miyake, A. and Itoh, N.** (2006). Role of Fgf10 in cell proliferation in white adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **249**, 71–77.
- Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J. and Brand, M.** (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development* **138**, 4831–4841.
- Kwon, H.-J., Bhat, N., Sweet, E. M., Cornell, R. A. and Riley, B. B.** (2010). Identification of Early Requirements for Preplacodal Ectoderm and Sensory Organ Development. *PLoS Genet.* **6**, e1001133.
- Le Guellec, D., Morvan-Dubois, G. and Sire, J.-Y.** (2004). Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 217–231.
- Lee, Y., Grill, S., Sanchez, A., Murphy-Ryan, M. and Poss, K. D.** (2005). Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development* **132**, 5173–5183.
- Lee, Y., Hami, D., De Val, S., Kagermeier-Schenk, B., Wills, A. A., Black, B. L., Weidinger, G. and Poss, K. D.** (2009). Maintenance of blastemal proliferation by functionally diverse epidermis in regenerating zebrafish fins. *Dev. Biol.* **331**, 270–280.
- Lee, R. T. H., Asharani, P. V. and Carney, T. J.** (2014). Basal Keratinocytes Contribute to All Strata of the Adult Zebrafish Epidermis. *PLoS One* **9**, e84858.
- Lin, G. and Slack, J. M. W.** (2008). Requirement for Wnt and FGF signaling in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Dev. Biol.* **316**, 323–335.
- Love, N. R., Chen, Y., Ishibashi, S., Kritsiligkou, P., Lea, R., Koh, Y., Gallop, J. L., Dorey, K. and Amaya, E.** (2013). Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat. Cell Biol.* **15**, 222–228.
- Mescher, a L.** (1976). Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface. *J. Exp. Zool.* **195**, 117–128.
- Min, H., Danilenko, D. M., Scully, S. A., Bolon, B., Ring, B. D., Tarpley, J. E., DeRose, M. and Simonet, W. S.** (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev.* **12**, 3156–3161.
- Morgan, T. H.** (1901). *Regeneration*. New York, The Macmillan Company.
- Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H. and Kawakami, K.** (2007). Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn*-like. *Development* **135**, 159–169.
- Narayanan, K. and Chen, Q.** (2011). Bacterial Artificial Chromosome Mutagenesis Using Recombineering. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 1–10.

- Nechiporuk, A. and Keating, M. T.** (2002). A proliferation gradient between proximal and msxb-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. *Development* **129**, 2607–2617.
- Norton, W. H. J., Ledin, J., Grandel, H. and Neumann, C. J.** (2005). HSPG synthesis by zebrafish Ext2 and Extl3 is required for Fgf10 signalling during limb development. *Development* **132**, 4963–73.
- Pfefferli, C. and Jaźwińska, A.** (2015). The art of fin regeneration in zebrafish. *Regeneration* **2**, 72–83.
- Poleo, G., Brown, C. W., Laforest, L. and Akimenko, M.-A.** (2001). Cell proliferation and movement during early fin regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.* **221**, 380–390.
- Porrello, E. R., Mahmoud, A. I., Simpson, E., Hill, J. A., Richardson, J. A., Olson, E. N. and Sadek, H. A.** (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* **331**, 1078–80.
- Poss, K. D., Shen, J., Nechiporuk, a, McMahon, G., Thisse, B., Thisse, C. and Keating, M. T.** (2000). Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev. Biol.* **222**, 347–358.
- Poss, K. D., Wilson, L. G. and Keating, M. T.** (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* **298**, 2188–90.
- Quint, E., Smith, A., Avaron, F., Laforest, L., Miles, J., Gaffield, W. and Akimenko, M.-A.** (2002). Bone patterning is altered in the regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and bmp2b or exposure to cyclopamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8713–8.
- Rakers, S., Gebert, M., Uppalapati, S., Meyer, W., Maderson, P., Sell, A. F., Kruse, C. and Paus, R.** (2010). “Fish matters”: the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Exp. Dermatol.* **19**, 313–324.
- Rakers, S., Niklasson, L., Steinhagen, D., Kruse, C., Schaubert, J., Sundell, K. and Paus, R.** (2013). Antimicrobial Peptides (AMPs) from Fish Epidermis: Perspectives for Investigative Dermatology. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1140–1149.
- Rampon, C., Gauron, C., Meda, F., Volovitch, M. and Vriza, S.** (2014). Adenosine enhances progenitor cell recruitment and nerve growth via its A2B receptor during adult fin regeneration. *Purinergic Signal.* **10**, 595–602.
- Robertson, J. F.** (2001). ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data. *Br. J. Cancer* **85 Suppl 2**, 11–4.
- Sandoval-Guzmán, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., Tazaki, A., Joven, A., Tanaka, E. M. and Simon, A.** (2014). Fundamental Differences in Dedifferentiation and Stem Cell Recruitment during Skeletal Muscle Regeneration in Two Salamander Species. *Cell Stem Cell* **14**, 174–187.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., et al.** (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat. Genet.* **21**, 138–141.
- Shibata, E., Ando, K. and Kawakami, A.** (2017). Transplantation of Mesenchymal Cells Including the

- Blastema in Regenerating Zebrafish Fin. *BIO-PROTOCOL* **7**, 1–7.
- Shin, M., Noji, S., Neubüser, A. and Yasugi, S.** (2006). FGF10 is required for cell proliferation and gland formation in the stomach epithelium of the chicken embryo. *Dev. Biol.* **294**, 11–23.
- Sikes, J. M. and Newmark, P. A.** (2013). Restoration of anterior regeneration in a planarian with limited regenerative ability. *Nature* **500**, 77–80.
- Smith, A., Avaron, F., Guay, D., Padhi, B. K. and Akimenko, M. A.** (2006). Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function. *Dev. Biol.* **299**, 438–454.
- Solanas, G. and Benitah, S. A.** (2013). Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 737–748.
- Sternberg, N.** (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. *J. Mol. Biol.* **150**, 603–608.
- Stewart, S. and Stankunas, K.** (2012). Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. *Dev. Biol.* **365**, 339–349.
- Stoick-Cooper, C. L., Weidinger, G., Riehle, K. J., Hubbert, C., Major, M. B., Fausto, N. and Moon, R. T.** (2007). Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* **134**, 479–489.
- Suster, M. L., Abe, G., Schouw, A. and Kawakami, K.** (2011). Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. *Nat. Protoc.* **6**, 1998–2021.
- Sweet, E. M., Vemaraju, S. and Riley, B. B.** (2011). Sox2 and Fgf interact with Atoh1 to promote sensory competence throughout the zebrafish inner ear. *Dev. Biol.* **358**, 113–121.
- Tassava, R. a and Garling, D. J.** (1979). Regenerative responses in larval axolotl limbs with skin grafts over the amputation surface. *J. Exp. Zool.* **208**, 97–110.
- Thisse, C. and Thisse, B.** (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* **3**, 59–69.
- Thornton, C. S.** (1957). The effect of apical cap removal on limb regeneration in *Amblystoma* larvae. *J. Exp. Zool.* **134**, 357–381.
- Tu, S. and Johnson, S. L.** (2011). Fate Restriction in the Growing and Regenerating Zebrafish Fin. *Dev. Cell* **20**, 725–732.
- Wada, H., Ghysen, A., Asakawa, K., Abe, G., Ishitani, T. and Kawakami, K.** (2013). Wnt/Dkk negative feedback regulates sensory organ size in zebrafish. *Curr. Biol.* **23**, 1559–1565.
- Wagner, D. E., Wang, I. E. and Reddien, P. W.** (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* **332**, 811–6.
- Wang, X.-P., Suomalainen, M., Felszeghy, S., Zelarayan, L. C., Alonso, M. T., Plikus, M. V, Maas, R. L., Chuong, C.-M., Schimmang, T. and Thesleff, I.** (2007). An Integrated Gene Regulatory Network Controls Stem Cell Proliferation in Teeth. *PLoS Biol.* **5**, e159.
- Wehner, D., Cizelsky, W., Vasudevaro, M., Özhan, G., Haase, C., Kagermeier-Schenk, B., Röder,**

- A., Dorsky, R. I., Moro, E., Argenton, F., et al.** (2014). Wnt/ β -Catenin Signaling Defines Organizing Centers that Orchestrate Growth and Differentiation of the Regenerating Zebrafish Caudal Fin. *Cell Rep.* **6**, 467–481.
- Whitehead, G. G., Makino, S., Lien, C.-L. and Keating, M. T.** (2005). Fgf20 Is Essential for Initiating Zebrafish Fin Regeneration. *Science* **310**, 1957–1960.
- Wills, A. a, Kidd, A. R., Lepilina, A. and Poss, K. D.** (2008). Fgfs control homeostatic regeneration in adult zebrafish fins. *Development* **135**, 3063–3070.
- Yokoyama, H., Ide, H. and Tamura, K.** (2001). FGF-10 Stimulates Limb Regeneration Ability in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **233**, 72–79.
- Yoshinari, N. and Kawakami, A.** (2011). Mature and juvenile tissue models of regeneration in small fish species. *Biol. Bull.* **221**, 62–78.
- 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.
- 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.

研究業績

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.

Shibata, E., Ando, K. and Kawakami, A. (2017). Transplantation of Mesenchymal Cells Including the Blastema in Regenerating Zebrafish Fin. *BIO-PROTOCOL* 7, 1–7.

Ando, K., Shibata, E., Hans, S., Brand, M., and Kawakami, A. (2017). Osteoblast Production by Reserved Progenitor Cells in Zebrafish Bone Regeneration and Maintenance. *Developmental Cell* 43, 643–650.

Shibata, E., Ando, K., Murase, E. and Kawakami, A. Heterogeneous fates and dynamic rearrangement of wound epidermis derived cells during and after zebrafish fin regeneration. (Submitted)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究に関するすべてを指導してくだり、自由な研究活動の場を与えて下さった、指導教官である川上厚志先生に心より感謝を申し上げます。また、研究に関して多くのご助言を下さった工藤明先生、猪早敬二先生、茶谷昌宏先生に感謝いたします。

6年間の楽しい研究生生活を共にした工藤・川上研究室の皆様にご感謝いたします。特に、博士課程の先輩として多くのことを教えてくださった安藤和則さん、長谷川智也さん、本研究の前任者であった村瀬瑛美子さん、堀田なつみさん、本研究で用いた *Tg(hsp70l:mcherry-t2a-fgf20a)* の作製に携わってくれた横田裕輝さんに深く感謝いたします。

本研究で用いた、*Tg(krt4p:gal4)* 系統を分与してくださった北里大学の和田浩則先生、*Tg(UAS:GFP)* および *HGn21A* 系統を分与してくださった国立遺伝学研究所の川上浩一先生、*Tg(hsp70l:fgf3)* 系統を分与してくださった Texas A&M University の Bruce B. Riley 先生、*Tg(hsp70l:dnfgfr1-egfp)* 系統を分与してくださった Zebrafish International Resource Center (ZIRC) の皆様にご感謝いたします。

多くのチャレンジや国際交流の場を提供して下さり、奨励金・旅費支援を通して研究生生活をサポートしてくださった、情報生命博士教育院 (ACLS) の皆様にご感謝いたします。

最後に、9年にわたる大学・大学院生活を理解してくれ、支えてくれた家族、親族、友人に心より感謝いたします。

柴田恵里