

哺乳類と小型魚類のゲノムワイドな比較による脊髄再生能を規定する要因の解析

辻岡 洋*

Analysis of Factors that Determine Regenerative Ability of the Spinal Cord through Genome-wide Comparison Mammals and Small Fish Species

Hiroshi TSUJIOKA*

The ability to regenerate the injured spinal cord varies depending on species. We previously found that zebrafish possess high regenerative ability whereas medaka (*Oryzias latipes*) possess poorer ability. Our preliminary data also suggested the ability also varies among medaka related species. We also found expression level of some genes correlate with ability to regenerate the spinal cord both among small fish species and mammals. Here we tried genome wide analysis to compare gene expression of those genes. Quantification of regeneration rate clearly showed diverse regenerative ability among medaka related species. We obtained high quality data of single nucleus RNA-seq of medaka related species and long read RNA-seq of *O. luzonensis*, which is suitable for further analyses in the future. Single nucleus RNA-seq of neonate and adult mice showed clear diminish of WNT signaling in adult after spinal cord injury. These results suggest usefulness of medaka related species for spinal cord regeneration study and possible involvement of WNT signaling.

1. メダカ近縁種の脊髄再生能の定量比較

これまでメダカ近縁種の脊髄再生能が多様であることが組織学的解析により示唆されていたが、まだ定量していなかったため、定量した。既報と同じく脊髄損傷部の厚み（再生率）を測定したところ、ルソンメダカ (*O. luzonensis*) 及びセレバスメダカ (*O. celebensis*) はミナミメダカ (*O. latipes*) と同様再生能が低いのにに対し、キタノメダカ (*O. sakaizumii*) はゼブラフィッシュ (*D. rerio*) と同様再生能が高いことが明らかとなり（図1）、メダカ近縁種で脊髄再生能が多様であることが示された。

2. メダカ近縁種の single nucleus RNA-seq (snRNA-seq)

dkk2 シグナルを含め、メダカ近縁種の細胞の遺伝子発現を調べるため、*O. latipes*, *O. sakaizumii*, *O. luzonensis* の3種に関して、脊髄切断2週後（もしくは非切断）の脊髄損傷部の細胞のsnRNA-seqを行った。*O. latipes*のゲノムが解読済みであったため、*O. latipes*のゲノム情報に対し3種のsnRNA-seqのデータをマッピングした。その結果、各メダカ近縁種で脊髄の代表的な細胞種が検出され（図2）、高品質なデータが得られたことが示唆された。しかしながら、マッピング率は*O. latipes*及び非常に近縁な*O. sakaizumii*では54-66%であったのに対し、*O. luzonensis*は33-36%であり、正確な解析のためには改善が必要であると考えられた。

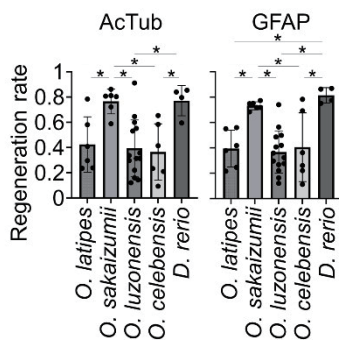


図1 メダカ近縁種の脊髄再生能。再生率 (regeneration rate) は損傷部の厚みを非損傷部の厚みで除した値。AcTub: 神経細胞マーカー, GFAP: アストロサイトマーカー, * $P < 0.05$, Tukey's HSD test.

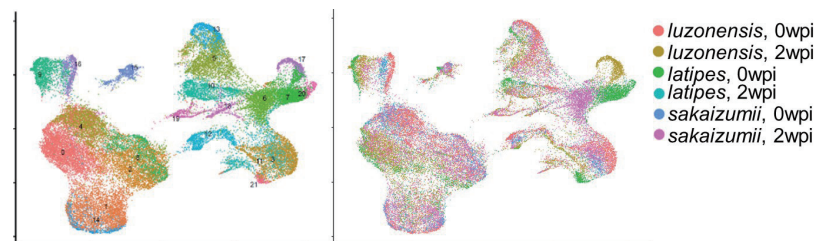


図2 メダカ近縁種のsnRNA-seq. 0: Neu (神経細胞), 1: OL/Neu, 2: Neu/OL, 3: Sch/OL, 4: AS/Neu, 5: AS (アストロサイト), 6: OL (オリゴデンドロサイト), 7: MG (ミクログリア), 8: Neu/AS, 9: Neu/OL, 10: OL, 11: Sch (シュワン細胞), 12: OL, 13: AS, 14: Neu/OL, 15: Neu, 16: AS/Neu, 17: MG/Hem (造血細胞), 18: OL/AS, 19: OL, 20: MG, 21: OL.

2026年2月16日 受理

* 豊田理研スカラー

福島県立医科大学医学部神経解剖・発生学講座, 大阪大学大学院医学系研究科分子神経科学

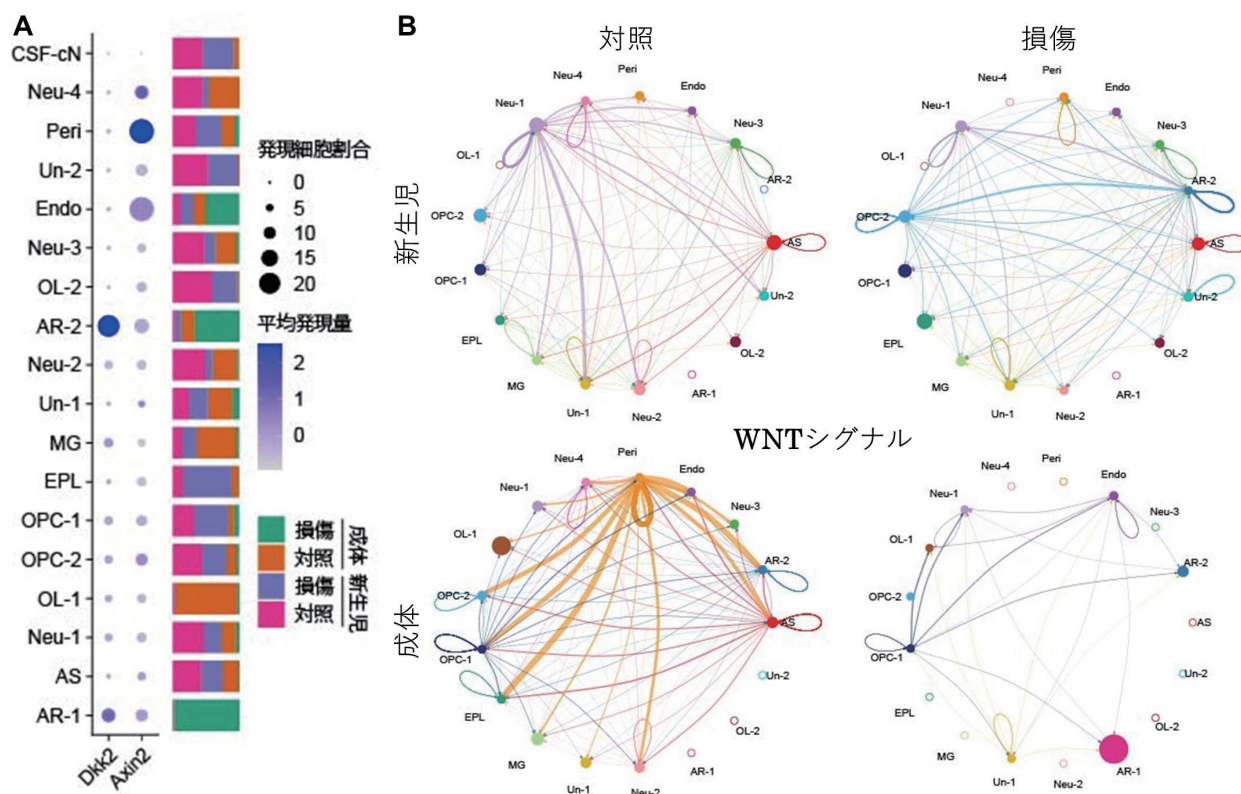


図3 マウス脊髄損傷後のWntシグナル発現細胞。(A) 各細胞種での遺伝子発現量。Neu: 神経細胞, CSF-cN: 脳脊髄液接触神経細胞, AS: アストロサイト, MG: ミクログリア, OL: オリゴデンドロサイト, OPC: オリゴデンドロサイト前駆細胞, Peri: ペリサイト, Endo: 血管内皮, EPL: 上衣細胞様細胞, AR: 成体反応性細胞, Un: 未同定細胞。(B) Wntシグナルの通信量。矢印の太さは通信の強さを示す。ノードの大きさは細胞数を示す。白抜きノードは細胞数が少ないため(10未満)、計算に用いられなかった細胞を示す。

3. ルソンメダカの long read RNA-seq

*O. luzonensis*はドラフトゲノム自体は存在したため、遺伝子定義ファイルを作成すれば、解析が可能となる。snRNA-seqは3'側しか読めないため、snRNA-seqの情報をもとに正確な遺伝子定義ファイルを作成するのは困難である。そこで、全長mRNAの情報を入力するため、脊髄損傷部の組織のRNAを用い、long read RNA-seqを行った。平均して1100 bpの高品質なシーケンスが得られ、現在、リファレンスの遺伝子定義ファイルを作成している。

4. マウス脊髄損傷後のDkk2シグナル発現細胞の解析

マウスの脊髄損傷時のDkk2シグナル発現細胞と再生能の相関を調べるため、以前取得したマウス脊髄損傷14日後の成体(再生能が低い)及び新生児(再生能が高い)の脊髄損傷部のsnRNA-seqのデータを再解析した。WNTシグナルを阻害するDkk2は成体の反応性細胞で高発現する一方、WNTの下流で転写活性が誘導されるAxin2は、成体損傷群ではほとんど存在しないペリサイトで高発現し(図3A)、WNTシグナルの活性化は再生能に逆相関することが示唆された。CellChat¹⁾を用いてWNTシグナルの細胞間通信を調べたところ、成体の対照群ではペリサイトから強いWNTシグナルが発信されている一方、成体の損傷群ではWNTシグナルの通信がほとんどなくなっており(図3B)、再生能が低い成体ではWNTシグナル通信自体が低下することが示唆された。もしDkk2非依存にWNTシグナルの低下(WNTの発現量低下等)が生じているのであれば、Dkk2を阻害してもWNTシグナルは活性化せず、効果が無いことが示唆されるが、WNTシグナルの低下はDkk2によるWNTシグナル活性化低下の下流で生じている可能性もあり、その場合、Dkk2を阻害することはWNTシグナルの活性化につながる可能性がある。今後はDkk2ノックアウトマウスを用いて検証する必要がある。

今回は年度初めに異動が決まったため、特に移動に制約を受ける遺伝子組換え生物を用いた実験がほとんどできなかったが、*in silico*解析等を行い、研究を進める上で重要なDkk2シグナルの変化をゲノムワイドに調べるという目的は達成することができた。今後は遺伝子組換え生物を用いた実験を行うことで、Dkk2シグナルが脊髄再生に与える影響を実験的に示し、新たな脊髄再生治療法の基盤となることが期待される。

REFERENCE

- 1) Suoqin Jin, *et al.*, *Nat Protoc.*, **20** (2025) 180-219.