

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22124005

研究課題名(和文)脊椎動物の器官再生能を規定する普遍原理の解明

研究課題名(英文)General principles determining organ-level regenerative capacity in vertebrates

研究代表者

横山 仁(YOKOYAMA, Hitoshi)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：90455816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 75,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はゼノパス(ツメガエル)を主な材料にして、動物の器官再生の普遍的なメカニズムの解明を目指した。四肢の前後軸形成に着目して、鳥類四肢の指のアイデンティティーを決定した。また哺乳類とは異なり、ゼノパスは成体でも皮膚をほぼ完全に再生できることを発見した。さらに器官再生におけるHippoシグナル経路の機能を検証し、動物界における普遍的な再生メカニズムの存在を裏付けた。これとは別に再生過程におけるゲノムのエピジェネティックな修飾の安定性をエピゲノム解析から実証した。また新しい実験技術として、両生類における局所的な遺伝子発現操作を可能にするシステムを開発した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to reveal common principles of organ-level regeneration among animals by using *Xenopus* as the main model. Firstly, we focused on the anterior-posterior axis formation of a limb and elucidated the avian digit identity of fore- and hindlimb. We found that an adult (metamorphosed) *Xenopus* can regenerate its skin almost completely after deep injury while an adult mammal cannot regenerate its skin. We analyzed the function of Hippo signaling pathway in organ regeneration of *Xenopus* and provided evidence that underlies the common mechanism(s) among vertebrate and invertebrate animals. We also found that epigenetic modification of genome is stable during limb regeneration by genome-wide analysis of histone modification. We also developed new experimental techniques for local gene induction in amphibians.

研究分野：再生生物学、発生生物学

キーワード：再生 四肢 皮膚 遺伝子操作 両生類

### 1. 研究開始当初の背景

本研究課題を開始した当初、両生類を対象にした器官の再生研究では遺伝子の発現レベルでの解析は普及してきたものの、遺伝子の機能レベルでの解析はほとんど行われていなかった。脊椎動物と無脊椎動物に共通した普遍的な再生のメカニズムの存在が、古典的な移植実験の成果から示唆されていたものの、両生類における分子遺伝学的な研究手法の欠如から、普遍的な再生メカニズムの分子レベルでの検証が全く行えない状態が長く続いた。しかし、遺伝子組換え技術の普及や、両生類（ネットイツメガエル）でのゲノム解読によって、ようやく普遍的な再生メカニズムの検証に挑戦しうる状況が生まれた。研究代表者らはゼノパス（アフリカツメガエル、ネットイツメガエル）を主な研究対象にして、遺伝子組換え技術や次世代シーケンサーを利用したエピゲノム解析を駆使して、普遍的な再生メカニズムの分子レベルでの解明に向けて挑戦を開始した。

### 2. 研究の目的

イモリに代表される有尾両生類を用いた再生現象の研究は、位置価の不連続を埋める「インターカレーション（位置価の挿入）」の概念を生み出した。しかし遺伝子操作が困難という技術上の制約から、その分子機構の解明は進んでいない。一方で近年の幹細胞研究は大きな進歩を遂げたが、哺乳類において四肢のような器官を再生させることは未だ不可能である。無尾両生類であるゼノパスは、幼生では四肢の原基（肢芽）を完全に再生できるが、変態後の成体では再生能が低下するため、種内で再生能の違いを比較できる。さらに近年では遺伝子組換え（Tg）個体の大量作製技術が開発され、遺伝子の機能レベルでの解析が可能になりつつある。本研究ではこれらゼノパスの利点をフルに生かして、脊椎動物の器官レベルの再生能を遺伝子の機能にまで踏み込んで解析し、脊椎動物・無脊椎動物の全般にわたる普遍的な再生原理の解明に資することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 遺伝子操作を駆使した器官再生の分子機構の普遍性の解明  
両生類の中でもゼノパスは低いコストで大量のTg個体の作製が可能である。そのため、これまで両生類では困難であった遺伝子の機能レベルでの解析を行うことができる。そこで四肢再生や尾の再生などの器官再生をモデルにして、コオロギやプラナリアなど無脊椎動物における再生の分子機構と比較を行うことで、再生の普遍的なメカニズムの検証を行った。

(2) 次世代シーケンサーを駆使したエピゲノム解析  
両生類の中でも例外的にゲノム解読が完了

しているゼノパスの利点を生かして、四肢の再生にフォーカスにおいて、ゲノムのエピジェネティックな修飾状態が再生の過程でどのように移り変わるのかを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 四肢発生・再生における前後軸形成機構の解明

四足動物の指は、その発生過程において shh 遺伝子の制御下に形成され、またその作用の違いによって前後軸に沿った各指のアイデンティティーが作られると考えられている。我々はマウスの5本の指（前側から順に1 - 2 - 3 - 4 - 5とする）の形成メカニズムを基準にして、鳥類の指のアイデンティティーを推定する実験を行った。それにより鳥類の前肢は1 - 2 - 3指、後肢は1 - 2 - 3 - 4指を有することを示した（Tamura and Nomura et al., 2011）。さらにネットイツメガエルを用いて、両生類では1番の指の前側に痕跡的な6番目の指が存在することを発見した（Hayashi et al., 2015b）。

#### (2) 四肢再生の開始と皮膚再生に関する研究

両生類の四肢再生において、再生芽の形成は再生の成功に非常に重要である。我々は熱ショック依存的に Wnt シグナリングを阻害できる Tg ゼノパスを利用して、幼生期の四肢再生には Wnt シグナリングが必須だが、成体期の再生には必ずしも必須ではないことを示した（Yokoyama et al., 2011）。さらに我々は皮膚の創傷治癒に着目した。哺乳類の成体では皮膚が深層の真皮まで傷つくと真皮を再生できず、代わりにコラーゲン線維に富んだ癒痕が形成されて傷口を埋める。癒痕は傷跡として残り、様々なトラブルの原因になる。これに対してゼノパスの成体では創傷後に癒痕の形成が起らず、分泌腺のような皮膚付属器官を含めた皮膚の再生が起きることを発見した(図1、Yokoyama and Maruoka et al., 2011)。

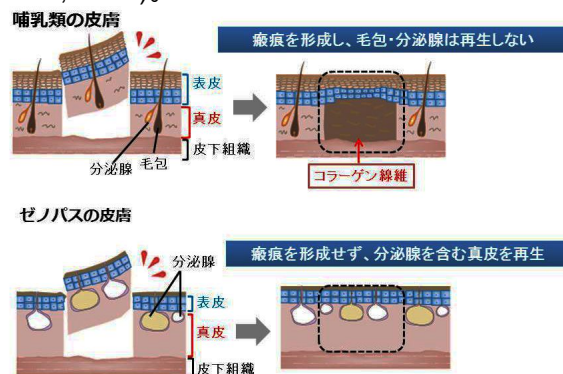


図1 ゼノパスは皮膚を再生できる

(3) 器官再生の普遍的な制御メカニズム  
Hippo シグナル経路の機能に関する研究  
器官のサイズ調節に關与する Hippo シグナル経路は、昆虫（コオロギ）の脚の再生に必

須であることが既に報告されていたが、脊椎動物の器官再生における機能は不明であった。我々は Hippo 経路の下流における重要な分子である Yap と Tead4 に着目し、それぞれの分子の機能を熱ショック依存的に阻害できる Tg ゼノパスの系統を樹立した。そして Yap の機能はゼノパスの幼生における四肢（肢芽）の再生だけでなく、挿入再生（インターカレーション）にも必須であることを示した（図2、Hayashi et al., 2014b）。さらに Yap と Tead4 の機能は幼生の尾の再生にも必要であり、再生する尾のサイズ調節に関与する可能性を示した（Hayashi et al., 2014a）。これらの結果は Hippo シグナル経路が器官再生において、動物界全般で普遍的な機能を持つことを示唆する。

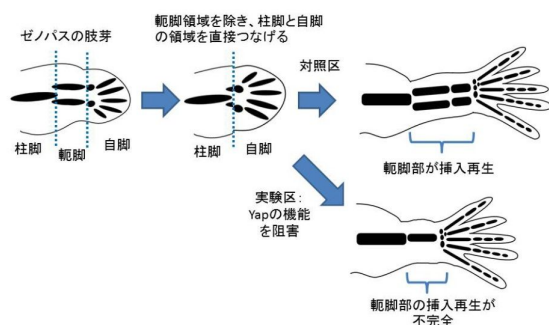


図2 Yapの機能は脊椎動物における挿入再生(インターカレーション)に必要なである

#### (4) 四肢再生におけるエピゲノム解析

ゲノム配列が解読されているネッタイツメガエルを利用して、遺伝子の転写調節に重要な働きをする、ゲノムのエピジェネティックな修飾状態をクロマチン免疫沈降 (ChIP) によって解析した。次世代シーケンサーを利用してヒストンの修飾状態 (H3K4 トリメチル化と H3K27 トリメチル化) をゲノムワイドに解析した結果、幼生期に確立した四肢領域のエピジェネティックな修飾状態は四肢の切断後も維持されることが明らかになった (Hayashi et al., 2015a)。

#### (5) 両生類における局所的な遺伝子発現操作システムの確立

Tg 個体を用いた熱ショックによる遺伝子発現誘導の技術をより洗練させ、生体内の目的の領域でのみ局所的に遺伝子発現を誘導する技術を両生類に導入した。赤外レーザーの照射によって遺伝子発現を誘導する技術 (IR-LEGO) を利用して、ゼノパスとイベリアトゲイモリで同技術による局所的な発現誘導が可能であることを示した (Kawasumi-Kita and Hayashi et al., 2015)。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計20件)

† は equal contribution した co-first authors

† Kawasumi-Kita, A., † Hayashi, T., Kobayashi, T., Nagayama, C., Hayashi, S., Kamei, Y., Morishita, Y., Takeuchi, T., Tamura, K. and Yokoyama, H. (2015) Application of local gene induction by infrared laser-mediated microscope and temperature stimulator to amphibian regeneration study. 査読有 *Development Growth and Differentiation*, **57**, 601-613.

DOI: 10.1111/dgd.12241

Hayashi, S., Kawaguchi, A., Uchiyama, I., Kawasumi-Kita, A., Kobayashi, T., Nishide, H., Tsutsumi, R., Tsuru, K., Inoue, T., Ogino, H., Agata, K., Tamura, K. and Yokoyama, H. (2015) Epigenetic modification maintains intrinsic limb-cell identity in *Xenopus* limb bud regeneration. 査読有 *Developmental Biology*, **406**, 271-282.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.08.013

Hayashi, S., Ochi, H., Ogino, H., Kawasumi, A., Kamei, Y., Tamura, K. and Yokoyama, H. (2014) Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. 査読有 *Developmental Biology*, **396**, 31-41.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.09.018

Hayashi, S., Tamura, K. and Yokoyama, H. (2014) Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for *Xenopus* limb bud regeneration. 査読有 *Developmental Biology*, **388**, 57-67.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.01.018

Yokoyama, H., Maruoka, T., Ochi, H., Aruga, A., Ohgo, S., Ogino, H. and Tamura, K. (2011) Different requirement for Wnt/  $\beta$ -catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus*. 査読有 *PLoS ONE*, **6**, e21721.

DOI: 10.1371/journal.pone.0021721

† Yokoyama, H., † Maruoka, T., Aruga, A., Amano, T., Ohgo, S., Shiroishi, T. and Tamura, K. (2011) *Prx-1* expression in *Xenopus laevis* scarless skin-wound healing and its resemblance to epimorphic regeneration. 査読有 *Journal of Investigative Dermatology*, **131**, 2477-2485.

DOI: 10.1038/jid.2011.223

† Tamura, K., † Nomura, N., Seki, R., Yonei-Tamura, S. and Yokoyama, H.

(2011) Embryological evidence identifies wing digits in birds as digits 1, 2, and 3. 査読有 *Science*. **331**, 753-757.

DOI: 10.1126/science.1198229

[学会発表](計32件)

横山仁 (2016年3月28日・ビッグパレットふくしま、福島県郡山市)「四肢と皮膚の完全再生を可能にする分子・細胞メカニズムの探求」日本解剖学会 シンポジウム 再生研究の新機軸 不可能を可能とする内在性プログラムの探索 [招待講演、日本語]

Hitoshi Yokoyama, Rina Otsuka, Aiko Kawasumi-Kita, Tamae Maruoka and Koji Tamura (2016年3月18日・岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市)「Skin regeneration of *Xenopus*, as a model for scar-free skin regeneration in adulthood」Aquatic model organisms for human disease and toxicology research [招待講演、英語]

Koji Tamura, Aiko Kawasumi, Shinichi Hayashi, Rina Otsuka and Hitoshi Yokoyama (2014年3月10日・理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター)「Molecular basis of wound repair and limb regeneration in amphibians and mammals」The 12<sup>th</sup> annual CDB symposium "Regeneration of organs: Programming and self-organization" [招待講演、英語]

横山仁 (2013年9月28日・岡山大学)「発生原理から見たアフリカツメガエルの器官再生」日本動物学会 シンポジウム: 発生原理に基づく再生生物学とその展望 [招待講演、日本語]

Hitoshi Yokoyama, Tamae Maruoka, Haruki Ochi, Akio Aruga, Takanori Amano, Toshihiko Shiroishi, Hajime Ogino, Koji Tamura (2011年11月25日・理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター)「Limb Regeneration of *Xenopus* as a Model for Three-dimensional Appendage/Organ Regeneration」第21回CDBミーティング The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting "from Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)" [招待講演、英語]

[その他]

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/staff/hitoshi-yokoyama>

<http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/tamlab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 仁 (YOKOYAMA, Hitoshi)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号: 90455816

(2) 研究分担者

田村 宏治 (TAMURA, Koji)

東北大学大学院・生命科学研究科・教授

研究者番号: 70261550