

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14560

研究課題名(和文) 様々な器官における高次元の再生能力を支える基盤メカニズムへのアプローチ

研究課題名(英文) Study of fundamental organ regeneration system

研究代表者

佐藤 伸 (sato, akira)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・准教授

研究者番号：90512004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：再生誘導物質(BMP7+FGF2+FGF8)を尻尾・目(レンズ)に応用し、反応能の有無を組織学的手法・分子生物学的手法によって検証した。当研究室で作成した徐放性ビーズに再生誘導物質であるBMP+FGFのカクテルを染み込ませ、再生反応の誘導箇所に埋め込んだ。再生反応が進んでいるかをマーカー遺伝子の発現を指標に分子生物学的解析を進めた。BMP7+Fgf2+Fgf8が器官横断的に再生反応を惹起できることを実証した。器官横断的な再生反応を支える詳細な分子実体までは明らかにすることができなかったが、分子実体の解明のための基盤的データをすべて揃えることができた。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we found that BMP7+FGF2+FGF8 can induce limb regeneration. This protein cocktail is actually the limb regeneration inducer in some species. We applied our-defined protein cocktail into other organs. Eye (lens) and tail regeneration were focused. We found that BMP7+FGF2+FGF8 application could induce tail regeneration in urodele amphibians. Regarding to the lens regeneration in an axolotl, the protein combination could induce lens regeneration with very low success rate. However, due to the low induction rate, we still need further confirmation on this point. The detail molecular mechanism, which underlies general organ regeneration ability, has still been unknown. However, the results in the present study successfully provides fundamental insights. We are heading further investigation to identify the molecular entities of organ regeneration ability.

研究分野：再生生物学

キーワード：四肢再生 尾部再生 レンズ再生 FGF BMP

1. 研究開始当初の背景

当研究室のこれまでの研究で、過剰肢付加モデルと言う世界的にもユニークな研究系を発展させてきた。その独自の実験系を使用して両生類の四肢再生開始メカニズムを研究し、多くの成果を上げてきた (Endo et al., 2004, Dev. Biol.; 当研究室 2007 ~ 2014, Dev. Biol. 10 報, その他 10 報)。四肢を再生可能なメキシコサラマンダーやイモリであっても、四肢の皮膚を傷つけただけではその損傷箇所はヒトと同様の皮膚修復反応が起こるだけである。しかし、損傷後に再生誘導物質として BMP2(又は BMP7)と FGF2(and/or FGF8) を効かせると修復に代えて四肢再生反応を誘導できることを明らかにした。つまりはイモリとメキシコサラマンダーにおける四肢器官の「再生薬」を同定したと言えるだろう。この物質の特定に成功した大きな要因の一つは、まぎれもなく過剰肢付加モデルというユニークな実験モデルの存在にある。もう一つの要因は、当研究室が独自に作成している徐放性ビーズ (タンパク質のキャリア) にあると考えられる。この徐放性ビーズは Tabata らが報告した方法 (Tabata et al., 1999, J. Biom. Sci. Poly.) に、数点の工夫を加えたものである (2014 Springer Text book に Chapter 掲載)。このビーズによって、損傷箇所に長期間にわたって目的タンパク質を効かせることが可能になった。これによって初めて四肢誘導という明瞭な反応を引き出した。以上により、当研究室は以下の 3 つを世界的なアドバンテージとして持つといえる。

(1) 過剰肢付加モデルと言う四肢再生研究をリードする実験系

(2) 再生誘導物質 (BMP+FGF) の同定

(3) 徐放性ビーズの作成プロトコル以上を研究の背景として本研究提案は立案された。

2. 研究の目的

本研究では、メキシコサラマンダーにおいて再生誘導物質が「四肢だけ」に効くのかという検証をした。これまで、四肢とその他器官の再生能力は違う現象として扱われてきたと言える。しかし、イモリ等の再生できる動物は四肢だけではなく、その他多くの器官を再生できる。反面、再生できない動物は、大規模な損傷に際してほとんどの器官を再生することができない。これは、再生できる動物に多器官に渡る基盤的な再生メカニズムがある事を意味するのではないだろうか? その様な基盤的再生メカニズムが存在するならば、BMP+FGF という再生誘導物質に四肢だけではなく、他の器官も応答できる可能性がある。本研究によって個体全体に渡って高い再生能力を維持する基盤的メカニズムにアプローチできれば、その学術的意義は大きいと考える。

3. 研究の方法

再生誘導物質を尻尾・目 (レンズ) に応用し、反応能の有無を組織学的手法・分子生物学的手法によって検証する。当研究室で作成した徐放性ビーズに再生誘導物質である BMP+FGF のカクテルを染み込ませ、再生反応の誘導箇所に埋め込む。再生反応が進んでいるかを判定するために各器官に応じたマーカー遺伝子を単離し、その遺伝子が発生過程を模倣して再発現するかどうかを検証する。BMP と FGF という具体的因子を使用することで、これまでに報告されている BMP と FGF によって制御される下流因子制御を参考

に解析を進めることができる。下流因子の制御について（四肢を含め）器官横断的に比較することで、基盤的な再生メカニズム解明への足がかりとする。これら器官それぞれの反応をまとめて論文にすることで当該研究領域に大きなインパクトを与えることを期待する

4. 研究成果

(1) 有尾両生類尻部における器官再生誘導実験

始めに四肢再生同様に神経組織による過剰尾形成を行った。メキシコサラマンダー尾部に損傷を与えただけでは何も起こらない(コントロール)。しかし、神経組織として Spinal Cord を損傷尾に移植した場合、過剰な尻尾の形成を認めることができた(図1)。器官再生開始の神経支



図1：神経組織による過剰尾の誘導
矢頭=過剰尾。矢印=通常尾

配と言う観点から四肢再生等の相同性ははっきりと証明できたと言える。この結果に従い、

四肢と同様の神経因子

(BMP7+FGF2+FGF8)が尾部における器官再生反応の開始を支配できるかどうかを検証した。端的には Spinal Cord を使用した実験を Spinal Cord の代わりにタンパク質のカクテルを徐放性の担体(ゼラ

チンビーズ)に吸着させたものを移植する方法で検証を行った。結果、不完全な構造ではあったが器官再生反応の開始を認めることができた。次に、この構造の詳細な解析のために切片を作成し、免疫染色によって解析を進めた。免疫染色の

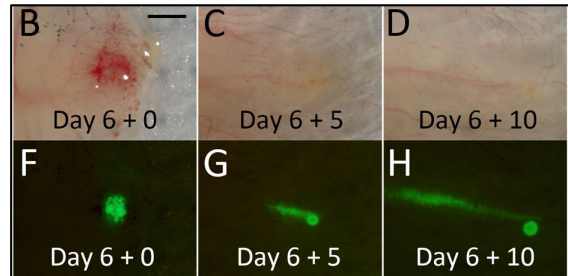


図2：BMP7+FGF2+FGF8で誘導した再生芽は通常の尻尾の再生に参画できる。緑→再生誘導物質によって誘導した再生芽の細胞

結果、支持削構造である Notochord (この Stage では軟骨に置き換わっている)の欠落や、筋組織の不完全さが明らかになった。この不完全な構造から、正しい「再生芽」の誘導ができていない可能性が考えられた。この可能性の検証として、BMP7+FGF2+FGF8 によって誘導された再生芽を尻尾を切断した場合の再生芽に移植することで、通常の再生に参画し、各種組織形成に参加できるかを検証した(図2)。さらに切片を作成し、詳細な構造参加を検証した。結果、皮膚繊維芽細胞由来である細胞群が南国の形成に参画できる細胞となっている事が明らかになった(図3)。

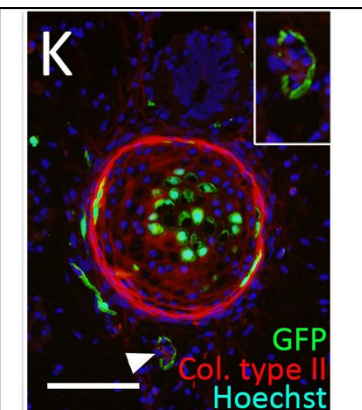


図3：軟骨形成能の確認。緑=移植細胞。赤=軟骨

細胞由来である細胞群が南国の形成に参画できる細胞となっている事が明らかになった(図3)。

(2) 有尾両生類におけるレンズ再生誘導実験

イモリでのレンズ再生は有名であり、日本がリードしてきた分野と言うことも有り多くの方に既知である。しかし、メキシコサラマンダーは予想に反してレンズの再生能力を有さない。この再生能力の不全(不能)を BMP7+FGF2+FGF8 によって解決し得るかに挑んだ。イモリの実験を参考に、メキシコサラマンダーのレンズを除去し、そこに

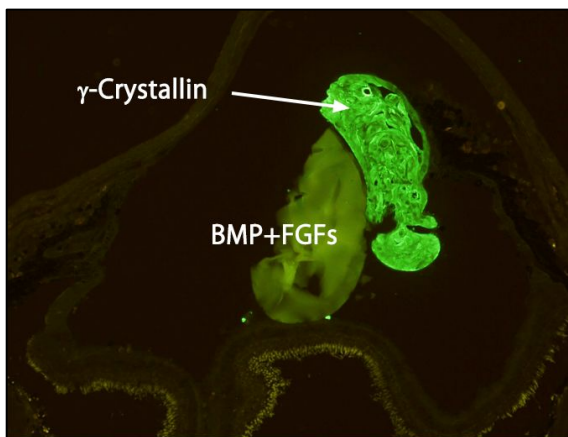


図4：メキシコサラマンダーにおけるレンズ再生の誘導。
緑色=クリスタリン
(レンズマーカー遺伝子)

BMP7+FGF2+FGF8 を添加する実験を行った。結果、25 例中 3 例で確実なレンズ形成を認める事ができた(図 4)。しかしながらその低い誘導率の起因するそれ以上の解析進めるのは困難であった。と問えば、途中経過を観察しようにもどのサンプルが成功裏にレンズを誘導し得るか分からなければ、遺伝子の発現変化等を観察する術がない。期間中に、誘導率を引き上げることはできなかった。

以上の結果は、BMP7+FGF2+FGF8 によって器官再生が普遍的に誘導施できることを示す画期的な成果と言えるだろう。この報告書には含めないが、メキシコサラマンダー、イモリ等の有尾両生類をは

じめ、アフリカツメガエルにおいても器官再生反応を BMP7+FGF2+FGF8 によって誘導できることを証明した。我々が突き止めた BMP7+FGF2+FGF8 による再生反応のより高度な分子生物学的な解析を今ぐ進めてゆく事で器官普遍的な再生遺伝子ネットワークを明らかにすることができるだろう。本研究が挑戦的萌芽である事を鑑みれば十二分な成果を上げたと自負している。

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 1 件)

(1) “Cooperative inputs of Bmp and Fgf signaling induce tail regeneration in urodele amphibians”, Makanae A., Mitogawa K. and Satoh A., *Developmental Biology*, 410(1), 45-55, 2016, 査読あり

[学会発表](計 7 件)

代表的な物を抜粋

- (1) 佐藤伸、「器官再生誘導物質の応用例と展望」、日本再生医療学会、2017/3/8、仙台国際センター
- (2) 佐藤伸、「器官再生誘導物質の応用例と展望」、日本再生医療学会、2017/3/8、仙台国際センター
- (3) 佐藤伸、「Regeneration inducers of appendage regeneration」、国際動物学会、2016/11/16、JPN(OKINAWA)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://organregeneration.jimdo.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 伸 (Satoh Akira)

岡山大学

異分野融合先端研究コア・准教授

研究者番号：90512004

(2)研究分担者

なし