

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04790

研究課題名(和文)四肢再生と皮膚の完全再生を可能にしている共通原理の解明

研究課題名(英文)Elucidation of general principles for limb regeneration and perfect skin regeneration

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：両生類のツメガエルは四肢を切断されると再生芽を形成し、その後四肢を再生する。さらに皮膚を深層の真皮まで傷つけられても瘢痕(傷あと)を残さず、皮膚構造をほぼ完全に再生する。本研究ではまずGFPによる細胞標識により、ツメガエルの皮膚再生では創傷後に皮下の領域から移動してきた再生芽様の細胞が傷口に集積し、皮膚再生に寄与することを発見した。次いでイベリアトゲイモリにおいても皮膚の完全再生が起きることを共同研究者とともに示した。さらに網羅的な発現解析を実施して四肢再生と皮膚再生の両方で発現が活性化する遺伝子群を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト(哺乳類)の場合は四肢を再生できないのはもちろん、皮膚が真皮まで傷ついた際にも再生できず、瘢痕を形成して傷口をふさぐ。瘢痕は元の皮膚の機能を代替できない上に外見も損なうため、瘢痕を残さない皮膚再生の実現が強く望まれている。皮膚を再生する両生類において再生に寄与する細胞が皮下から移動してくるという発見は、皮膚再生のメカニズムの解明と四肢再生との共通性の解明の両方において大きな意義を持つ。本研究でなされた四肢再生と皮膚再生での共通性の解明は、瘢痕のない皮膚再生を将来哺乳類で実現し、更にそこから四肢再生へのステップアップを目指す上での重要な指針になる。

研究成果の概要(英文)：Xenopus, a model amphibian, forms a regeneration blastema after limb amputation and then regenerates a limb at last. Xenopus also regenerates skin almost completely after a deep skin injury extent to dermis without forming a scar. We labeled subcutaneous tissues with GFP and indicated that blastema-like cells derived from subcutaneous tissues migrate to the wound and then contribute to skin regeneration. Then, collaborators and I revealed that an Iberian ribbed newt also regenerates skin after deep injury. Furthermore, we identified some groups of genes which are commonly expressed both in limb regeneration and skin regeneration by RNA-seq analysis in Xenopus.

研究分野：再生生物学

キーワード：再生 四肢 皮膚 両生類

## 1. 研究開始当初の背景

イモリに代表される両生類が高い再生能力を持ち、四肢や尾を切断されても元通りに再生することは古くから知られていた。哺乳類と同じ四肢を持つ脊椎動物（四足動物）でありながら、これら複雑な形態や機能を持つ器官を再生できる両生類は、多くの研究者の興味を集めてきた。さらに2010年ごろから両生類は皮膚だけの創傷に対しても高い再生能力を示すことが相次いで報告され、研究代表者もツメガエルの成体が皮膚を再生することを報告していた（Yokoyama and Maruoka et al., 2011）。さらに代表者らはツメガエルの皮膚再生の際に出現する細胞が再生芽のマーカー遺伝子（*prrx1*）を発現することから、四肢再生と皮膚再生の共通性を提唱していた。

有尾両生類（イモリ・サンショウウオ）は成体でも完全な四肢を再生できるのに対して、無尾両生類（カエル）に属するツメガエルは幼生の時期ではイモリと同様に完全な四肢を再生できるが、変態の進行とともに四肢の再生は不完全になり、変態後（成体）では四肢切断後に再生芽の形成は起きるものの、前後や背腹のパターンが見られない1本の棒状軟骨しか再生できない。このような再生能力の差の原因として、四肢の前後軸のパターン形成に重要な *shh* 遺伝子や背腹軸形成に重要な *lmx1b* 遺伝子などの発現が成体の四肢再生では見られないことがわかってきた（Endo et al., 2000; Matsuda et al., 2001; Yakushiji et al., 2007）。しかし、これら遺伝子の再生における機能の実証は以下に述べる理由から行われていなかった。

胚発生完了後の現象である再生を研究するに当たり、両生類では特定の遺伝子の機能を実証する方法が限られていることが分子レベルの研究を進める上での大きな障害になっていた。近年、遺伝子組換えの技術に加えてゲノム編集が両生類でも行えるようになり、遺伝子のノックアウトも行えるようになったが、ノックアウトにより発生中に致死になったり発生異常を生じる危険性が高い。そのため時期特異的・領域特異的な遺伝子発現の操作技術が望まれていた。代表者らは熱ショックプロモーターを利用した発現誘導の技術と、局所的な熱ショックを組み合わせることで、局所的な発現操作がツメガエルおよびイモリ（イベリアトゲイモリ）で可能なことを研究開始当初に報告していた（Kawasumi-Kita and Hayashi et al., 2015）。またこのころには世代時間が短く1年を通して産卵させられるイベリアトゲイモリが、有尾両生類の新たなモデル動物として研究者の間で徐々に普及してきていた。加えて、ネットイツメガエルのゲノム解読（Hellsten et al., 2010）に続いてアフリカツメガエルをはじめとする他の両生類でのゲノム解読がいよいよ間近になり、ゲノム情報をベースにした解析（ゲノム情報をベースにした網羅的発現解析など）が現実味を帯びてきた時期であった。

## 2. 研究の目的

本研究ではゲノム情報が利用でき、幼生と成体の間で四肢再生の能力が異なるツメガエルを材料にして、再生能力の違いをもたらしている遺伝子群を次世代シーケンサーを用いた網羅的発現解析（RNA-seq）により特定する。さらに四肢再生と皮膚再生において共通して発現が活性化する遺伝子群を同様に RNA-seq により特定することで、皮膚再生と四肢再生との共通性を遺伝子レベルで明らかにする。最終的には代表者らが両生類で実現してきた局所手な遺伝子発現の操作技術を用いることにより、特定の遺伝子群を再生能力の低下したツメガエルの四肢で発現させ、再生能力を回復させることを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では（1）形態再生に関わる遺伝子群の特定、（2）再生芽細胞の形成に関わる遺伝子群の特定、（3）器官再生を制御する遺伝子群の機能の実証 の3つの研究をツメガエルを主な対象にして行う。（1）と（2）において RNA-seq によりそれぞれ目的とする遺伝子群を特定した上で、（3）では局所的な遺伝子発現の操作技術を駆使して、特定の遺伝子を四肢や皮膚で発現させ、その機能を実証する。

### （1）形態再生に関わる遺伝子群の特定

ゲノム情報が以前から解読済みであり、代表者らが以前にエピゲノム解析を行った実績（Hayashi et al., 2015）があるネットイツメガエルを対象にして、幼生と成体のそれぞれの四肢再生サンプルで RNA-seq による網羅的な発現比較を行う。これにより幼生の四肢再生で特異的に発現量が増加する遺伝子群を特定する。

### （2）再生芽細胞の形成に関わる遺伝子群の特定

本項目は、動物の個体サイズが大きく皮膚の創傷実験や移植実験が容易な変態後のアフリカツメガエルを対象にして行う。皮膚再生と四肢再生のサンプルで RNA-seq による網羅的な発現比較を行い、皮膚再生と四肢再生の共通性を検証する。さらに皮膚再生で出現する再生芽様の細胞の起源を明らかにするために、個体間で免疫拒絶を起こさずに移植が可能な近交系のアフリカツメガエル（J系統）を利用して、全身が GFP 標識された遺伝子組換え（Tg）個体と野生型の J 系統個体の間で移植実験を行い、皮下の組織だけが GFP 標識された個体を作成する。この個体の皮膚に創傷を与えて皮膚を再生させ、皮下の組織由来の細胞の皮膚再生への寄与を実証する。

### (3) 器官再生を制御する遺伝子群の機能の実証

熱ショックプロモーターの制御下に目的の遺伝子を組み込んだ Tg 個体を作製し、この個体に局所的な熱ショックを加えることで、適切な時期と位置において目的の遺伝子の発現を誘導する。局所的な熱ショックの方法としては、温度コントロールした金属棒を押し当てる方法と、赤外レーザーの照射により発現を誘導する方法 (IR-LEGO) の 2 通りに方法を用いる。これにより特定の遺伝子の再生における機能の実証や細胞の追跡を行う。

## 4. 研究成果

### 3. 研究の方法で述べた 3 つの項目それぞれに関する研究成果を以下に述べる

#### (1) 形態再生に関わる遺伝子群の特定

幼生の四肢再生で特異的に発現量が増加する数十個の遺伝子を特定した。そのうちの 1/5 程度の遺伝子については in situ hybridization での発現観察を行い、実際に幼生の再生芽内で発現が見られることを確認した (残りの遺伝子については引き続き発現解析を行っている)。以前に行ったエピゲノム解析の結果と総合して、四肢再生における発現制御のメカニズムについて考察した (Hayashi et al., 2020)。

#### (2) 再生芽細胞の形成に関わる遺伝子群の特定

四肢再生と皮膚再生で共通して発現が活性化される数百個の遺伝子を特定した。さらにそれら遺伝子群に対する GO 解析 (エンリッチメント解析) を行い、ここで見られる遺伝子の特徴を解析した。また移植実験で皮下の組織を GFP 標識した状態で皮膚再生を行わせたところ、皮下の組織に由来する細胞が移動して傷口に集積し、皮膚再生に寄与することを発見した (Otsuka-Yamaguchi et al., 2017)。さらにツメガエルでは背中だけでなく頭部の皮膚も再生できることを示すとともに (Otsuka-Yamaguchi et al., 2017)、イベリアトゲイモリも皮膚を再生できることを共同研究者とともに確認し (Abe et al., 2020)、非羊膜類の脊椎動物における皮膚再生について考察した。またツメガエルの皮膚再生において、四肢の再生芽マーカーとされる prrx1 遺伝子に注目して、ツメガエルにおける同遺伝子のエンハンサーが実際に皮膚再生の過程で活性化することを、エンハンサー配列に GFP をつないだ Tg 個体を用いて示した (Yokoyama et al., 2018)。

#### (3) 器官再生を制御する遺伝子群の機能の実証

熱ショックプロモーターに shh または Imx1b 遺伝子をつないだ Tg 個体を作製し、熱ショックで発現を誘導することで、ツメガエルの四肢の発生および再生におけるパターン形成で実際に変化が生じることを示した。また赤外レーザーによる発現誘導 (IR-LEGO) により 1 細胞レベルでの発現誘導 (Hasugata et al., 2018) や表層よりも深い位置 (100  $\mu$ m 程度) の細胞への発現誘導 (Abe et al., 2020) がツメガエルで行えることを報告した。shh に関しては局所的に誘導した発現量が多いほど、成体の四肢再生に対する影響が強いことを示唆する結果を得たことから、再生能力の回復に最適な発現誘導の条件を引き続き解析中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hayashi Shinichi, Tamura Koji, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 97
2. 論文標題 Chromatin dynamics underlying the precise regeneration of a vertebrate limb - Epigenetic regulation and cellular memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 16~25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcdb.2019.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abe Gembu, Hayashi Toshinori, Yoshida Keigo, Yoshida Takafumi, Kudoh Hidehiro, Sakamoto Joe, Konishi Ayumi, Kamei Yasuhiro, Takeuchi Takashi, Tamura Koji, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 100
2. 論文標題 Insights regarding skin regeneration in non-amniote vertebrates: Skin regeneration without scar formation and potential step-up to a higher level of regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 109~121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcdb.2019.11.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tetsuya Bando, Hitoshi Yokoyama, Harukazu Nakamura	4. 巻 60
2. 論文標題 Wound repair, remodeling, and regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 303-305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12566	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hitoshi Yokoyama, Nanako Kudo, Momoko Todate, Yuri Shimada, Makoto Suzuki, Koji Tamura	4. 巻 60
2. 論文標題 Skin regeneration of amphibians: A novel model for skin regeneration as adults	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 316-325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsubara Haruka, Saito Daisuke, Abe Gembu, Yokoyama Hitoshi, Suzuki Takayuki, Tamura Koji	4. 巻 246
2. 論文標題 Upstream regulation for initiation of restricted Shh expression in the chick limb bud	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 417 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.24493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasugata Riho, Hayashi Shinichi, Kawasumi-Kita Aiko, Sakamoto Joe, Kamei Yasuhiro, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 2018
2. 論文標題 Infrared Laser-Mediated Gene Induction at the Single-Cell Level in the Regenerating Tail of <i>Xenopus laevis</i> Tadpoles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Protocols	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/pdb.prot101014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsuka-Yamaguchi Rina, Kawasumi-Kita Aiko, Kudo Nanako, Izutsu Yumi, Tamura Koji, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 246
2. 論文標題 Cells from subcutaneous tissues contribute to scarless skin regeneration in <i>Xenopus laevis</i> froglets	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 585 ~ 597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.24520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 横山仁	4. 巻 -
2. 論文標題 傷あとを残さない皮膚再生 -カエルで明らかになった皮膚再生を可能にする細胞の起源	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 academist Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Riho Hasugata, Takuya Kobayashi, Haruki Ochi, Koji Tamura, Hitoshi Yokoyama
2. 発表標題 Local induction of shh expression alters limb development and regeneration in <i>Xenopus laevis</i>
3. 学会等名 日本発生生物学会 第52回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山仁
2. 発表標題 器官再生を実現する手がかりを <i>Xenopus</i> から探る -異分野との融合は本当に可能か？
3. 学会等名 第2回再生学異分野融合研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多田玲美, 東館拓也, 石川奨馬, 川口茜, 薬師寺那由他, 越智陽城, 荻野肇, 田村宏治, 横山仁
2. 発表標題 ツメガエルにおけるShhの四肢特異的遠位エンハンサー・MFCS1の活性化プロセスの解析 発生と再生での比較
3. 学会等名 第2回再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成澤勇斗, 林真一, 越智陽城, 蓮瀧里帆, 嶋田侑莉, 田村宏治, 横山仁
2. 発表標題 Hippoシグナル経路に関わる転写因子、Teadの機能活性化とツメガエルの四肢再生能力との関連
3. 学会等名 第2回再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋田侑莉, 越智陽城, 横山仁
2. 発表標題 アフリカツメガエルの四肢再生における背腹軸形成機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山仁
2. 発表標題 ツメガエルの四肢再生から探る、器官の再生能力の差を生む原因 -両生類の再生研究の近代化に向けての試行錯誤- シンポジウム テクノロジーが切り開く「シン・再生研究」
3. 学会等名 日本動物学会 第91回大会(オンライン)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hitoshi Yokoyama
2. 発表標題 Amphibian model animals for life science with special reference to skin regeneration
3. 学会等名 Workshop for Agriculture and Life Science Study in Hirosaki University 2021(オンライン)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Reimi Tada, Takuya Higashidate, Shoma Ishikawa, Akane Kawaguchi, Nayuta Yakushiji, Haruki Ochi, Hajime Ogino, Koji Tamura, Hitoshi Yokoyama
2. 発表標題 Activation process of limb-specific distal enhancer (MFCS1) of shh (sonic hedgehog) in developing and regenerating limb of <i>Xenopus laevis</i>
3. 学会等名 Workshop for Agriculture and Life Science Study in Hirosaki University 2021(オンライン)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蓮瀉里帆, 小林託也, 越智陽城, 田村宏治, 横山仁
2. 発表標題 局所的なshhの発現誘導によるツメガエルの四肢のパターン形成への影響
3. 学会等名 日本動物学会東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋田侑莉, 越智陽城, 横山仁
2. 発表標題 アフリカツメガエルの四肢再生における背腹軸形成機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山仁
2. 発表標題 器官再生の原理をXenopusから探る -なぜ両生類は皮膚や四肢を再生できるのか-
3. 学会等名 第1回再生学異分野融合研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蓮瀉里帆, 小林託也, 越智陽城, 田村宏治, 横山仁
2. 発表標題 局所的なshhの発現誘導によるXenopusの四肢のパターン形成への影響
3. 学会等名 第1回再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋田侑莉, 越智陽城, 横山仁
2. 発表標題 アフリカツメガエルの四肢再生における背腹軸形成機構の解析
3. 学会等名 第1回再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hasugata, R., S. Hayashi, A. Kawasumi-Kita, J. Sakamoto, Y. Kamei, H. Yokoyama
2. 発表標題 Infrared Laser-Mediated Gene Induction at the Single-Cell Level in the Regenerating Tail of <i>Xenopus laevis</i> Tadpoles
3. 学会等名 Agriculture and Life Science Seminar in Hirosaki University with the partner Universities (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimada, Y., H. Yokoyama
2. 発表標題 Analysis of dorsal-ventral axis formation in limb regeneration of <i>Xenopus laevis</i>
3. 学会等名 Agriculture and Life Science Seminar in Hirosaki University with the partner Universities (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山仁, 蓮渦里帆, 越智陽城, 成澤勇斗, 小林託也, 田村宏治
2. 発表標題 両生類における局所的な遺伝子発現操作の現状について
3. 学会等名 第12回日本ツメガエル研究集会・第4回次世代両生類研究会 合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋田侑莉, 越智陽城, 横山仁
2. 発表標題 アフリカツメガエルの四肢再生における背腹軸形成機構の解析
3. 学会等名 第12回日本ツメガエル研究集会・第4回次世代両生類研究会 合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蓮瀧里帆, 小林託也, 越智陽城, 田村宏治, 横山仁
2. 発表標題 ツメガエル幼生における局所的な遺伝子発現誘導技術の確立
3. 学会等名 日本動物学会東北支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横山仁, 蓮瀧里帆, 林真一, 川住愛子, 亀井保博
2. 発表標題 アフリカツメガエルの器官再生から見た立体器官の再生メカニズム
3. 学会等名 第3回次世代両生類研究会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蓮瀧里帆, 小林託也, 越智陽城, 田村宏治, 横山仁
2. 発表標題 ツメガエルの四肢における局所的な遺伝子発現誘導技術の確立
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横山仁
2. 発表標題 アフリカツメガエルの皮膚再生と四肢再生 -立体的な器官再生の実現に向けての新たな実験ツール-
3. 学会等名 日本再生医療学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大塚理奈、川住愛子、工藤奈々子、井筒ゆみ、田村宏治、横山仁
2. 発表標題 癒痕を残さない皮膚再生には皮下組織が寄与する -J系統を用いた細胞運命の追跡-
3. 学会等名 第11回日本ツメガエル研究集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横山仁 准教授 弘前大学農学生命科学部 <a href="http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/staff/hitoshi-yokoyama/">http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/staff/hitoshi-yokoyama/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	田村 宏治  (TAMURA Koji)  (70261550)	東北大学・大学院生命科学研究所・教授    (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	内山 郁夫  (UCHIYAMA Ikuo)  (90243089)	基礎生物学研究所・ゲノム情報研究室・准教授    (63904)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関