

平成 31 年 4 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14590

研究課題名(和文) 器官再生における各組織幹細胞の普遍的活性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the common mechanisms of tissue stem cell activation shared in different cell lineages during the organ regeneration

研究代表者

深澤 太郎 (FUKAZAWA, Taro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：10565774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエル幼生は尾の高い再生能を示す。幼生尾再生は各組織中に存在する組織幹細胞より未分化細胞が誘導され各々の組織を再構築することで起こるとされる。本研究では、(1)尾再生においてinterleukin-11が複数組織の未分化細胞の誘導・維持に必要十分であることを示した。(2)尾切断時のIL-11シグナリングの下流に位置する遺伝子のうちの一つについて、機能阻害時に尾再生が阻害されることを見出した。この因子がIL-11シグナリングの担う未分化細胞の誘導・維持という機能に関わる実働因子ではないかと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アフリカツメガエル幼生尾再生において、尾切断後に発現するインターロイキン11が尾再生の源となる複数組織の未分化細胞の誘導・維持に必要十分であることを明らかにした。複数種の未分化細胞の誘導・維持を単一の因子が担うことを示すもので、未分化細胞の誘導・維持の機構が各組織で共通であることを意味するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Xenopus laevis tadpole tail poses high regenerative ability. It was suggested that regenerated tail tissues are derived from progenitor cells which were induced from each tissue stem cells. We found that, (1) interleukin-11 (il-11) induces and maintains progenitors of different cell lineages during tail regeneration, and (2) knockdown of gene X, a gene which lies downstream of the IL-11 signaling, inhibits tail regeneration. We think that the IL-11 signaling owe its function of induction and maintenance of progenitors to the gene X.

研究分野：器官再生・免疫学

キーワード：再生 アフリカツメガエル interleukin-11

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

損傷等で失われた器官や付属肢を再形成する「再生」という現象は多くの動物種で観察されるが、例えば両生類は高い再生能を示す一方でヒト含め哺乳類の再生能は非常に限定的であり、何が再生能を規定しているのかについては長らく不明であった。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 幼生 (オタマジャクシ) は、尾を切断した際に脊髄・脊索・筋を含む尾を再生するという高い再生能を示す。申請者はツメガエル幼生再生組織形成機構の解析を行っており、再生芽増殖細胞で高発現している因子としてインターロイキン 11 (*il-11*) を同定していた (Tsujioka *et al.*, 2015)。IL-11 は受容されると STAT3、ERK、PI3K 経路を活性化するが、受容体またはこの 3 経路に対する阻害剤はいずれもツメガエル幼生尾再生を阻害するという結果を得た。ツメガエル尾再生では、各組織中に存在する組織幹細胞が尾の切断により各々活性化され、(細胞運命が拘束された) 未分化細胞を生み出し、これらが分化して各々の組織を再形成する様式であるとされている (Gargioli *et al.*, 2004) が、前述の阻害剤はいずれの組織の再生も阻害していた。これより、各組織幹細胞には組織の別を問わず共通した活性化機構があり、IL-11 はその機構に関わる因子ではないかと着想した。

### 2. 研究の目的

各組織中に存在する組織幹細胞は組織の別を問わず共通した活性化機構があり、尾切断をトリガーとして発現の始まるインターロイキン 11 がその共通の活性化因子であることの証明

### 3. 研究の方法

- (1) Crispr/Cas9 法を用いた *il-11* ノックダウン個体の作出とその尾再生能評価
- (2) 上記ノックダウン個体の尾切断後の発現遺伝子プロファイル解析
- (3) *il-11* 強制発現による未分化細胞誘導の検討
- (4) 尾再生時の IL-11 シグナリング下流で機能する遺伝子の探索とその機能解析

### 4. 研究成果

- (1) Crispr/Cas9 法を用いた *il-11* ノックダウン個体の作出とその尾再生能評価

*il-11* の幼生尾再生への寄与を解析するため、*il-11* ノックダウン個体の作出を行った。*X. laevis* ゲノム *il-11* 上の配列を標的とした guide RNA 2 種と *cas9* mRNA とを受精卵へ顕微注入し *il-11* ノックアウト細胞をモザイクにもつ個体 (ノックダウン個体; KD 個体) を作出した。変異導入がなされたかについては、KD 個体より抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR 産物を用いた Heteroduplex mobility assay により標的領域への変異の導入を確認した。KD 個体について尾を切断し 1 週間後にその再生の程度を評価したところ、KD 群では対照群 (*cas9* mRNA のみ注入) に対し有意に再生尾長が短縮した (図 1)。この *il-11* KD 群再生尾長の短縮は、KD 時にドキシサイクリン誘導系を用いた *il-11* の強制発現によりレスキューされることから、*il-11* は尾再生に必要なであることが示された。

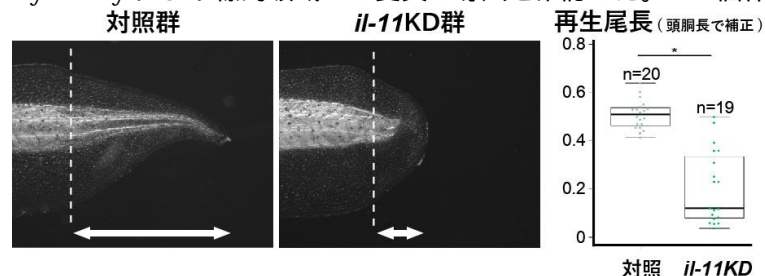


図 1 *il-11* KD 群と対照群の尾切断後の再生尾長比較。対照個体 (左) に対し KD 個体 (中央) では再生尾の短縮がみられ、KD 群と対照群とで再生尾長に統計的に有意な差が見られた (右;  $P < 0.05$ , Dunnett's test)。 (Tsujioka *et al.*, *Nat. Comm.* (2017)より改変して引用)

- (2) *il-11* KD 個体の尾切断後の発現遺伝子プロファイル解析

尾再生における *il-11* シグナリングの機能を解析するため、*il-11* KD による尾切断後の発現遺伝子プロファイルに与える影響を解析した。*il-11* KD 個体 (と対照個体) を作出し両者の尾切断 48 時間後の再生尾を用いて RNA-seq を行った。その結果、*il-11* KD 群では神経・脊索・筋肉の未分化マーカー遺伝子の発現減少が見られた。これは *il-11* 機能阻害時には再生尾形成のもととなる未分化細胞の減少を意味し、*il-11* は尾再生時の未分化細胞を維持する機能をもつと考えられる。

また、RNA-seq の結果、以前当研究室で尾再生時に高発現する遺伝子として同定されていた *Xenopus Neuronal pentraxin 1 (XNP1)* も *il-11* KD 群で発現低下が見られていたため、詳細に発現解析を行ったところ、脊髄における *XNP1* の発現と再生能との間に相関関係を認めた (Hatta-Kobayashi *et al.*, 2016)。

- (3) *il-11* 強制発現による未分化細胞誘導の検討

前述の RNA-seq の結果から *il-11* は再生芽における未分化細胞の維持に寄与していることが想定されたが、*il-11* は尾切断後 2 時間以内という早い段階から発現することと合わせると、未分化細胞を維持するだけでなく誘導する機能ももつと予想した。そこで、ドキシサイクリン依存に *il-11* を発現誘導するコンストラクトを作製し受精卵へ顕微注入、この個体の尾を切らない状態で *il-11* を強制発現したところ、先述の神経・脊索・筋肉の未分化マーカー遺伝子の発

現上昇が観察された(図2)。これは神経・脊索・筋肉の未分化細胞が *il-11* により誘導されたことを示す。このことは、未分化細胞の誘導という尾再生の最初期段階が人為的に再現できたこと、また神経・脊索・筋肉といった複数の組織の未分化細胞の誘導を *il-11* という単一の因子が担うことを意味する (Tsujioka *et al.*, 2017)。

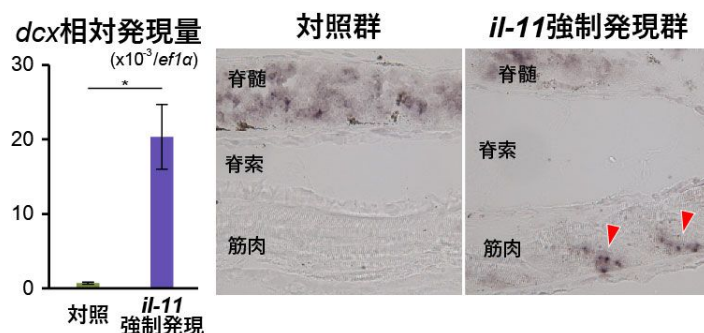


図2 *il-11* を強制発現させた際の未分化マーカー遺伝子の発現。一例として筋未分化マーカー遺伝子 (*doublecortin; dcx*) について示す。*il-11* を強制発現させると尾での *dcx* の発現量が有意に上昇する(左; \* $P < 0.05$ , Student's t-test.)。 *il-11* を強制発現させた群(右)とその対照群(中央)の尾における *dcx* の発現細胞。 *il-11* 強制発現群(右)では写真の筋肉の領域に *dcx* を発現する筋肉の未分化細胞(矢じり)が出現していた。(Tsujioka *et al.*, *Nat. Comm.* (2017)より改変して引用)

#### (4) 尾再生時の IL-11 シグナリング下流で機能する遺伝子の探索とその機能解析

尾再生において IL-11 シグナリングは前述のような役割をもつため、このシグナリングの下流にて発現誘導される因子は再生に重要な働きを持つと考えられる。

そこでまず、IL-11 を受容する細胞に着目した。IL-11 受容体は IL-11 受容体  $\alpha$  鎖 (IL-11R $\alpha$ ) と共通シグナル分子である GP130 との複合体から成る。*il-11ra* を Crispr/cas9 法により KD したところ、この KD 個体も尾再生が阻害されることを見出した。次にこの KD 個体を用い、機能的な IL-11R $\alpha$  を発現していない細胞がその後の再生尾形成に寄与するか検討したところ、IL-11R $\alpha$  欠損細胞も寄与していることを示唆する結果を得た。IL-11R $\alpha$  は細胞増殖それ自体には必要でないことを意味し、これより IL-11 は IL-11R $\alpha$  発現細胞を介して未分化細胞の誘導を行っていることが考えられた。

次に、IL-11 下流で発現誘導され再生に重要な働きをもつ因子の探索を行った。前述(2)の RNA-seq で *il-11* KD 群で発現の低下している遺伝子(約 300 遺伝子)が得られていた。ここで、前述の IL-11R $\alpha$  が細胞増殖それ自体に必要でないことから、IL-11R $\alpha$  発現細胞は再生芽中の非増殖細胞分画に含まれると想定した。そこで、当研究室の先行研究で得られていた再生芽における増殖細胞・非増殖細胞分画における RNA-seq 解析データ (Tsujioka *et al.*, 2015) を用い、前述約 300 遺伝子の中から再生芽非増殖細胞分画において高い発現をしめす遺伝子について探索を行ったところ、現時点でこのうち 1 つの遺伝子で、Crispr/cas9 法による KD 時に尾再生が阻害されるという結果を得ている。この遺伝子は尾再生時の IL-11 シグナリングの下流で未分化細胞誘導を行っている実働因子であると考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Hatta-Kobayashi Y\*, Toyama-Shirai M\*, Yamanaka T\*\*, Takamori M\*\*, Wakabayashi Y, Naora Y, Kunieda T, Fukazawa T†, Kubo T (2016) Acute phase response in amputated tail stumps and neural tissue-preferential expression in tail bud embryos of the *Xenopus* neuronal pentraxin I gene. *Dev. Growth Differ.* **58**(9), 688-701. doi: 10.1111/dgd.12326  
\*equal contribution, \*\*equal contribution, †corresponding author

Tsujioka H, Kunieda T, Katou Y, Shirahige K, Fukazawa T†, Kubo T (2017) *interleukin-11* induces and maintains progenitors of different cell lineages during *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nature Commun.* **8**, 495. doi: 10.1038/s41467-017-00594-5  
†corresponding author

[学会発表](計 4 件)

Hiroshi Tsujioka, Taro Fukazawa, Takekazu Kunieda, Yuki Katou, Katsuhiko Shirahige, Takeo Kubo  
Analysis of the role of *interleukin-11* in tail regeneration of *Xenopus laevis* tadpoles.  
第 22 回国際動物学会 第 87 回日本動物学会 合同大会 (国際学会)

2016年11月14日～2016年11月19日  
沖縄コンベンションセンター（沖縄県宜野湾市）

深澤太郎

アフリカツメガエル幼生の再生不応期において尾再生能を阻害する免疫細胞種の同定

第89回日本動物学会大会

2018年9月13日～2018年9月15日

札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

出口桃子、深澤太郎、久保健雄

アフリカツメガエル幼生尾再生における *il-11* 下流遺伝子群の解析

第41回日本分子生物学会年会

2018年11月28日～2018年11月30日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

佐々木佳代、深澤太郎、久保健雄

アフリカツメガエル幼生尾再生におけるインターロイキン 11 受容体と、その発現細胞の役割の解析

第41回日本分子生物学会年会

2018年11月28日～2018年11月30日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

プレスリリース

インターロイキン 11 は、オタマジャクシの尾再生芽の未分化細胞の誘導・維持に働く  
-器官再生の最初期段階の人為的再現に成功-

<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2017/5505/>

## 6. 研究組織

本研究への研究分担者の参画はない。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。