

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15068

研究課題名(和文) 昆虫脚再生における幹細胞群形成の時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the spatiotemporal regulatory mechanisms underlying the formation of a blastema, a mass of undifferentiated stem cells, in insect leg regeneration

研究代表者

石丸 善康 (ISHIMARU, Yoshiyasu)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・助教

研究者番号：50435525

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)：再生芽を構成する未分化幹細胞の脱分化プロセスの分子機構は未だ不明である。本研究では、マクロファージ様細胞の機能がコオロギの脚再生に關与することを明らかにし、再生芽形成に必須な JAK/STATシグナル経路への関与も示唆された。また、マクロファージ選択的に殺細胞効果を示すクロドロン酸処理と正常な再生脚の2群間でトランスクリプトーム解析(RNA-seq)を行った結果、再生に必要なと考えられる多くの遺伝子の情報が得られた。さらに、CRISPR/Cas法を利用してSTAT遺伝子座にGFPを挿入したノックインコオロギの作製に成功しており、再生芽の時空間的な形成様式を可視化して解析することが可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、コオロギ脚の再生初期過程にマクロファージ様細胞の機能が関与すると示唆された。さらに、マクロファージ様細胞の産生因子が脱分化や再生芽形成に關与している可能性があり、その再生関連因子の情報が得られた。再生能力の高い昆虫の脚再生原理を分子レベルで解明することは、脊椎動物の原理的に同等な再生過程の解明につながると期待される。また、iPS細胞の場合と異なる脱分化誘導の分子機構解明は、生体本来が持つリセット機構として新しい再生原理の発展に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of the dedifferentiation process in undifferentiated cells constituting the regenerating blastema remain unknown. In the present study, we found that the function of macrophage-like cells is involved in the cricket leg regeneration and might be associated with the JAK / STAT signaling pathway, which is essential for the blastemal formation. As a result of our transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis between clodronate-treated and normal regenerating tissues, we obtained the gene information necessary for leg regeneration processes. Furthermore, we have succeeded in generating knock-in (KI) cricket in which GFP was knocked in at the STAT locus using the CRISPR/Cas system. Using the KI cricket, we are planning to reveal the spatiotemporal growth regulation of the regenerating blastema.

研究分野：発生・再生生物学

キーワード：再生 脱分化 マクロファージ 幹細胞 コオロギ CRISPR/Cas トランスクリプトーム

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) イモリをはじめとする再生能力を持つ動物では、損傷部にある細胞・組織がいったん未分化な幹細胞に脱分化し、再生芽を形成する。また、コオロギ幼虫においても脚を切断すると、再生芽を形成して完全に再生することが知られているが、昆虫の場合、未分化細胞の由来が脱分化によるのか、既存の幹細胞なのか未だ明確ではなく、その分子メカニズムもほとんど解明されていない。

(2) 再生過程において発生過程と大きく異なる点は、再生の初期であり、再生の場合は既存の細胞・組織からスタートし、未分化な細胞で構成される再生芽が形成される。その後、再生芽は発生における肢芽の発生過程のメカニズムを反復利用して、失われた部分を再生する。本研究室では、コオロギを用いた分子レベルでの脚再生メカニズムの研究により、Dachsous/Fat シグナル系による再生脚の細胞増殖及び位置情報の制御、再生芽形成における JAK/STAT シグナル経路の関与、再生脚の再パターン形成に関わる転写因子の制御機構、脚再生におけるエピジェネティック因子の関与などを明らかにしてきた。

(3) マクロファージは自己免疫系で重要な役割を担っており、損傷に応じて多様な炎症性または抗炎症性サイトカインを産生し、損傷組織の治癒に関与することが知られている。また近年、脊椎動物の四肢再生や魚類のヒレ再生においてマクロファージが関与していることが報告され、マクロファージによる炎症と再生の関係が明らかにされつつある。

(4) 本研究室では、モデル昆虫のコオロギにおいてゲノム編集技術 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated 9 (CRISPR/Cas9) システムを用いた遺伝子ノックアウト・ノックインが可能となり、発生に関わる遺伝子の機能解析が進められている。CRISPR/Cas9 システムによるノックインの際、DNA 二本鎖切断修復は主に非相同末端結合 (NHEJ) もしくは相同組換え (HR) のどちらかの経路で行われるが、遺伝子を正確にノックインすることができる HR は効率が低く、現在報告されている生物種も限られている。一方、コオロギでは NHEJ によるノックインに成功している。

### 2. 研究の目的

(1) 昆虫の脚再生過程において、再生芽を構成する未分化な幹細胞群の由来が「脱分化」によるのかを明らかにし、脱分化現象を引き起こす分子機構の解明を目的とする。

(2) コオロギにおいてマクロファージ様細胞が再生芽の形成に関与するかを明らかにする。

(3) マクロファージ様細胞が産生する再生関連因子を探索し、脱分化や再生芽形成に関与するかを明らかにする。

(4) 未分化細胞を蛍光標識することで再生芽の形成メカニズムと未分化細胞の由来を明らかにする。未分化細胞で特異的なマーカーの遺伝子座に GFP レポーター遺伝子を挿入したノックインコオロギの系統を作製することで未分化細胞を可視化して解析が可能となる。

### 3. 研究の方法

(1) マクロファージ様細胞がコオロギの脚再生に関与するか解析を行った。骨粗鬆症治療薬として開発されたクロドロン酸 (Clodronate) は、細胞内で ATP 類似体として ATP 代謝を阻害し、破骨細胞・ミクログリア等のマクロファージへの殺細胞効果を示す。クロドロン酸単剤では細胞透過率が低いため、リポソームに内包することで、マクロファージ貪食効率を促進できる。クロドロン酸を内包したリポソームをコオロギ 3 齢幼虫に投与し、脚を切断後、再生への影響を解析した。

(2) マクロファージ様細胞の機能が脚再生過程に関連するかを示すため、クロドロン酸処理によるマクロファージ様細胞の枯渇状態を確認した。損傷治癒が起こる脚切断 4 時間後のクロドロン酸処理と正常な再生脚の切断組織から RNA を抽出し、マクロファージ由来のマーカー遺伝子として免疫応答系 *Toll like receptor2 (Toll2)* と炎症性サイトカイン *eiger* (TNF ホモログ) の発現量を qPCR により解析した。

(3) 未分化細胞の増殖と未分化性維持に関与する JAK/STAT シグナル経路にマクロファージ様細胞の機能が影響するか調べため、クロドロン酸処理の脚切断組織における *STAT* 遺伝子の発現量を qPCR により解析した。

(4) クロドロン酸処理したコオロギと正常なコオロギの脚切断部位から RNA を抽出し、その cDNA 配列を次世代シーケンサー (RNA-Seq 解析) で決定し、その中から再生に関連する候補因子を探索した。

(5) *STAT*は幹細胞の未分化性維持と再生芽形成に關与する。そこで、PITCh(Precise Integration into Target Chromosome: 標的染色体領域への正確な遺伝子挿入)システムを用いたマイクロホモロジー(MH, 40bp)媒介末端結合(MMEJ)依存的なCRISPR/Casゲノム編集法により*STAT*遺伝子座にGFPの正確なノックインを行った。*STAT*-GFP融合タンパクが未分化幹細胞群で発現することで可視化が可能となり、再生芽の時空間的な形成様式が解析できる。

(6) 脚再生の初期過程におけるDecapentaplegic(*Dpp*)シグナル径路の機能はこれまで不明であった。そこで、RNAiを用いた解析により再生における*Dpp*シグナルの機能解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 脚再生過程にマクロファージ様細胞が關与するか調べるため、マクロファージ選択的に殺細胞効果を示すクロドロン酸をコオロギ3齢幼虫に投与し、脚を切断後、再生への影響を調べた。その結果、損傷治癒は確認されたが、再生芽は形成されず、その後の再生も生じない(図1)ことから、マクロファージ様細胞がコオロギ脚の再生芽形成に關与することが示唆された。



図1. クロドロン酸処理による脚再生への影響

(2) クロドロン酸処理によるマクロファージ様細胞の枯渇状態を調べるため、マクロファージ由来のマーカー遺伝子として*Toll2*と*eiger*の発現量をqPCRにより解析した。その結果、*Toll2*の発現量は正常な再生脚と比較して約0.5倍に減少しており(図2左)、クロドロン酸処理によりマクロファージ様細胞の枯渇が示唆された。逆に、*eiger*の発現量は約2.5倍に増加しており(図2右)、マクロファージ様細胞の非存在により炎症反応に異常が生じたためと示唆された。

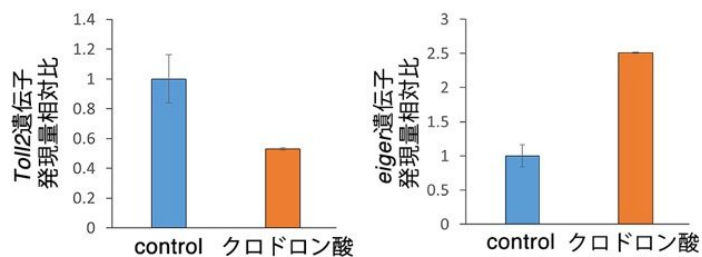


図2. クロドロン酸処理に対する*Toll2*及び*eiger*発現解析

(3) クロドロン酸処理した再生脚において再生芽形成に必要な*STAT*遺伝子の発現をqPCRにより解析した結果、正常では脚切断後12 hours(h)で*STAT*発現量が約2倍に増加するのに対して、クロドロン酸処理により*STAT*発現は上昇しないことが明らかとなった(図3)。このことは、再生初期においてマクロファージ様細胞から未分化細胞におけるJAK/STATシグナル径路への關与を示唆している。

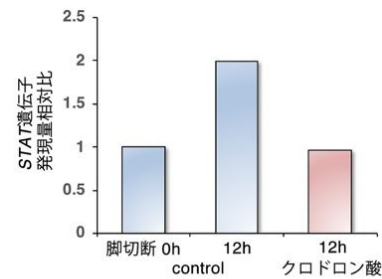


図3. クロドロン酸処理に対する*STAT*発現解析

(4) クロドロン酸処理と正常個体の脚切断組織においてRNA-Seqによるトランスクリプトーム解析を行った。クロドロン酸処理vs.正常再生脚の2群間で有意に発現変動している遺伝子2,322のうち(図4-1)、発現量が増加した遺伝子は1,676、発現量が減少した遺伝子は646であった(図4-2)。また、Gene Ontology解析の結果、脚形成、筋組織形成、幹細胞の未分化性維持や増殖、免疫応答系などに関与する遺伝子の発現が有意に変動していた。再生芽形成に必要と考えられる多くの遺伝子の情報を得ることができたため、現在、RNAiを用いて再生芽形成への影響を調べることにより、再生に關与する遺伝子の同定を遂行中である。

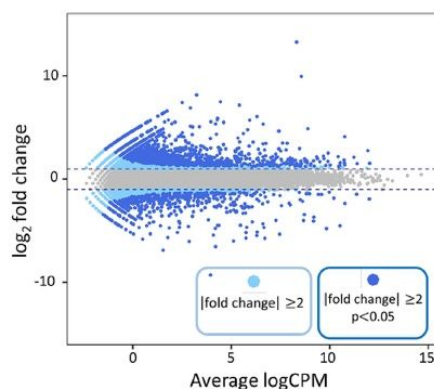


図4-1. コントロールとクロドロン酸処理を比較したMAプロット

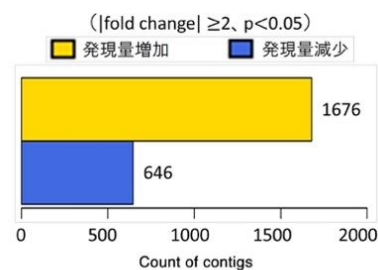


図4-2. コンティグの発現量を2群間(コントロール vs. クロドロン酸処理)で比較

(5) マイクロホモロジー媒介末端結合(MMEJ)機構を利用した遺伝子ノックイン技術 CRIS-PITCh システムを用いて、再生芽形成に重要な *STAT* 遺伝子の C 末端に蛍光マーカー遺伝子 GFP のノックインを行うことで、未分化細胞群の GFP 蛍光標識を目指した(図 5)。ノックインにおいて PCR による遺伝子型解析結果を平均すると、ドナーベクターの 5' 側で MMEJ が検出された割合は 50.0%、3' 側では 75.0%、両側では 35.4%であった。また、シーケンス解析により正確にノックインされていることも確認できた。一方、非同末端結合(NHEJ)も生じており、その効率は、5' 側で 20.8%、3' 側で 79.1%、両側では 14.6%であった。また、MMEJ による正確なノックインが確認された中の 1 個体においては胚における蛍光が観察された(図 6)。現在、ノックインコオロギの系統化を遂行中である。

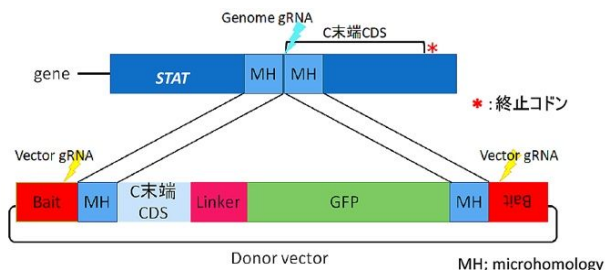


図5. マイクロホモロジー媒介末端結合(MMEJ)

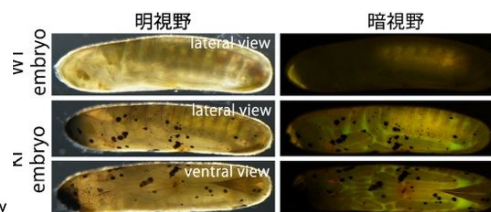


図6. MMEJによりGFPをKnock-in(KI)した胚の蛍光観察

(6) 脚再生の初期過程における Decapentaplegic(Dpp)シグナル経路の関与について解析を行った。Dpp シグナル伝達物質である *mad* に着目し、RNAi による機構解析を行った結果、附節が再生しない(図 7)ことから、再生脚の遠位端形成の開始に Dpp シグナル経路が関与すると示唆された。一方、再生脚の脛節において、より遠位方向への伸長が確認された(図 7; 青色矢印)ことから、脛節の遠位方向の伸長抑制とサイズ調節にも Dpp シグナル経路が関与している可能性が示唆された。また、これら附節と脛節における結果は、Dpp の Type 受容体に対する RNAi 解析でも同様の結果であることが確認された。従って、Dpp シグナル経路が再生脚の最遠位形成と遠近軸に沿った位置情報の維持に関与しており、位置情報に基づいた遠位方向への再生脚伸長の制御に必須であることがわかった。

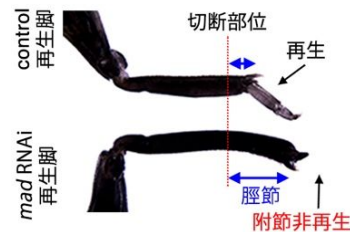


図7. *mad* RNAiによる脚再生への影響

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Ishimaru Y., Tomonari S., Watanabe T., Noji S., Mito T. Regulatory mechanisms underlying the specification of the pupal-homologous stage in a hemimetabolous insect, *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, 査読有, in press.

Ishimaru Y., Bando T., Ohuchi H., Noji S., Mito T. Bone morphogenetic protein signaling in distal patterning and intercalation during leg regeneration of the cricket, *Gryllus bimaculatus*, *Development Growth & Differentiation*, 査読有, 60(6), 2018, pp.377-386.

DOI:10.1111/dgd.12560

Bando T., Mito T., Hamada Y., Ishimaru Y., Noji S., Ohuchi H. Molecular mechanisms of limb regeneration: insights from regenerating legs of the cricket *Gryllus bimaculatus*, *The International Journal of Developmental Biology*, 査読有, 62(6/7/8), 2018, pp.559-569.

DOI:10.1387/ijdb.180048ho

Awata H., Wakuda R., Ishimaru Y., Matsuoka Y., Terao K., Katata S., Matsumoto Y., Hamanaka Y., Noji S., Mito T., Mizunami M. Roles of OA1 octopamine receptor and Dop1 dopamine receptor in mediating appetitive and aversive reinforcement revealed by RNAi studies, *Scientific Reports*, 査読有, 6(29696), 2016.

DOI:10.1038/srep29696

Ishimaru Y., Tomonari S., Matsuoka Y., Watanabe T., Miyawaki K., Bando T., Tomioka K., Ohuchi H., Noji S., Mito T. TGF- signaling in insects regulates metamorphosis via juvenile hormone biosynthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, 113(20), 2016, pp.5634-5639.

DOI:10.1073/pnas.1600612113

[学会発表](計9件)

Watari T., Ishimaru Y., Noji S., Mito T. Involvement of macrophages in leg

regeneration of the cricket *Gryllus bimaculatus*, 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists, 2019年5月, 大阪.

Nakamura Y., Tomonari S., Kawamoto K., Watanabe T., Ishimaru Y., Noji S., Mito T. Resolving the correlation between phenotype and genotype in a segmentation gene even-skipped in the cricket *Gryllus bimaculatus*, 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists, 2019年5月, 大阪.

Kawamoto K., Matsuda M., Yamashita T., Watanabe T., Tomonari S., Ishimaru Y., Noji S., Mito T. Precise in-frame integration of a GFP gene using microhomology-mediated knock-in technology in *Gryllus bimaculatus*, 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists, 2019年5月, 大阪.

Yamashita T., Mito T., Ishimaru Y., Watanabe T., Tomonari S., Kawamoto K., Matuda M. Generation of an enhancer-trap strain of the scalloped gene in the cricket *Gryllus bimaculatus*, 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists, 2019年5月, 大阪.

Nakamura Y., Kawamoto K., Sayuri T., Watanabe T., Ishimaru Y., Mito T., Noji S. Gene knock-out analysis of a segmentation gene even-skipped in the cricket *Gryllus bimaculatus*, Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th, 2018年6月, 東京.

上村 菜月, 友成 さゆり, 渡辺 崇人, 松岡 佑児, 石丸 善康, 野地 澄晴, 三戸 太郎, 遺伝子ノックイン技術の応用によるレポーターコオロギ系統の作製, 第88回日本動物学会, 2017年9月, 富山.

Matsuda M., Matsuoka Y., Ishimaru Y., Tomonari S., Watanabe T., Noji S., Mito T. Functional analysis of a Hox gene, abdominal-A, in the cricket *Gryllus bimaculatus* using a CRISPR/Cas9-mediated gene knock-in system, 50th Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists, 2017年5月, 東京.

Nakamura Y., Kawamoto K., Tomonari S., Matsuda M., Watanabe T., Ishimaru Y., Uemura N., Noji S., Mito T. even-skipped is required for segmentation and elongation of embryos in the cricket *Gryllus bimaculatus* as revealed by CRISPR/Cas9-based gene knock-out, 50th Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists, 2017年5月, 東京.

Kawamoto K., Tomonari S., Matsuoka Y., Watanabe T., Ishimaru Y., Noji S., Mito T. even-skipped acts principally as a gap gene in the cricket *Gryllus bimaculatus* as revealed by CRISPR/Cas9-based gene knockout analysis, JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology (+49th Meeting) Hosted by JSDB, 2016年6月, 東京.