

令和元年5月28日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19400

研究課題名(和文) 有尾両生類の再生原理を用いたニワトリ胚四肢再生の実現

研究課題名(英文) Induction of Intercalary regeneration in chicken limb buds

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、有尾両生類において四肢と言う「器官」の再生反応を誘導する遺伝子(再生誘導物質)の特定に成功した。本研究は、両生類研究で明らかにした再生誘導因子をニワトリ胚に応用し、ニワトリ胚における四肢再生反応を誘導を行った。ニワトリ胚において肢再生実験を行うに当り、インターカレーションモデルを採用した。インターカレーションモデルとは中間部再生ともいえる機構であり、両生類の四肢再生機構の中核をなす概念となる。言い換えればインターカレーションの誘導が可能であることが証明できれば、両生類型の再生を羊膜類で達成したという意に限りなく近いという事になる。実績としてインターカレーションの誘導に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、両生類型の再生メカニズムが羊膜類で聞こうとしては残存していることを示した初めての成果として意義深いものとする。その意義に関しては総説として発表し、今後の研究展開の指針とした。また、社会的なメッセージとしては、単に両生類のバイオロジーとして帰結するのではなく、よりヒトに近い動物に応用することを「実働」している研究の姿勢を示すことで、市井の方々に基礎研究の重要性を認識してもらう事ができた。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies clearly shown that Fgf2+Fgf8+Bmp7 are the regeneration inducers in urodele amphibians. The identified regeneration inducers can induce regeneration responses in varied organs and multiple species. In the present study, we tried to apply our defined molecules onto chicken limb buds in order to withdraw potential regeneration ability. Amphibian limb regeneration takes so called a intercalation mechanism. Chicken limb buds do not have the intercalary regeneration mechanism. However, we demonstrated that the ectopic Fgf2+Fgf8 expression in a chicken limb bud resulted in induction of intercalary responses. We also performed cell lineage analysis using a chick-quail chimera analysis. Our results indicate that the conserved regeneration mechanism can induced by Fgf2+Fgf8 inputs even in non-regenerative animals.

研究分野：再生生物学

キーワード：四肢再生

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

1. 研究開始当初の背景

有尾両生類は四肢を含めた非常に高い器官再生能力を持つ。反対に哺乳類などにはそのような高い再生能力は基本的には観察されないか、残滓と言えるほどの物しか観察されない。ヒトを含めた哺乳類の再生能力の欠失は、進化の過程で失ったものなのかもしれない。この疑問に答えるにはまず初めに両生類の再生システムを紐解き、その分子的なシステムを明らかにしたうえで哺乳類のシステムを比較することが最適な方法であろう。しかし、これまで両生類の再生システムは分子レベルでの実体解明がなされてこなかったことが、比較研究の大きな障害であった。私たちの研究室では両生類の再生を惹起する分子を同定することに成功し、その成果を哺乳類等に活用できるかどうかという観点から研究を行っている。

当研究室では両生類の再生において FGF signaling が中心的な役割を果たすことを証明してきた (Satoh et al., 2018, doi: 10.1387/ijdb.180118as; Makanae and Satoh, 2018, doi: 10.1186/s40851-018-0090-2. Satoh et al., 2010, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.023.)。この役割とは「再生芽の誘導」「パターン形成」の二つにある。損傷後に修復が起こる事は哺乳類においても観察される事象であるが、再生可能動物の場合、過剰な FGF シグナルのインプットがある場合器官レベルの再生が惹起される。再生の開始プロセスは当研究室を中心に精力的に研究がなされ、今ではその誘導因子の実体と開始機構の大枠は明白となった。再生誘導因子 (FGF2+FGF8) が切断面・損傷面に作用することで、分化細胞が活性化され細胞種によっては多能性を獲得する (Satoh et al., 2011, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.04.017. ; Makanae and Satoh, 2012, doi: 10.1002/ar.22529. ; Makanae et al., 2014, doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.021.)。活性化され構造再生に参画する細胞を再生芽細胞と呼び、再生芽細胞は損傷部の先端部に集合し再生芽を形成する。再生芽は四肢の発生システムを模倣したパターン形成を行う事が知られている。この四肢発生のパターン形成とは「挿入則 (インターカレーション) 」という概念が存在している。インターカレーションとは、四肢においては先端を始めに規定し、その後基部側との相互作用によって中間部を形成するという機構である。四肢再生において四肢のインターカレーション機構は FGF シグナリングによって規定されることは研究代表者の研究成果である (Satoh et al., 2018, doi: 10.1387/ijdb.180118as; Makanae and Satoh, 2018, doi: 10.1186/s40851-018-0090-2. ; Satoh et al., 2010, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.023.)。端折って説明すれば、有尾両生類において、四肢を 3 分割し中間部を抜いた四肢を外科的に構成する。通常何も起こらず、移植片はそのまま生着し、中間部が再生することはない。しかし、ここに Fgf2+Fgf8 を異所的に与えることで中間部の構造を再生することができる。この様に Fgf シグナリングは四肢の再生の開始期とパターン形成時の 2 点において重要な役割を果たす事が研究背景として存在している。

2. 研究の目的

本研究主目的は同定した再生誘導因子をニワトリ胚において効果検証することにある。ニワトリ胚ステージ 25 の切断肢と昼間部欠損肢芽に対して両生類の四肢再生と比較しながら効果検

証する事を目的とする。

3．研究の方法

本報告書では成果のあった項目のみを記載する。当初計画には記載があったが数多の検討の結果再現性と確信を以て報告できる次項とは至らなかったものも数多くある。これは萌芽研究の性質上、理解していただきたい部分と考える。

ニワトリ胚 St25 の肢芽において、先端部切除と過剰肢モデル (Endo et al., 2004, Dev. Biol. DOI; 10.1016/j.ydbio.2004.02.016) に沿った上腕部表層切除を行った。この損傷部に対して徐放性ビーズによる FGF2+8 の添加実験等を行った。この結果は基本的には定量的な結論を得ることができなかったため以下の記載からは省く。同定因子の中間部再生誘導実験の方法は以下のとおりである。ニワトリ胚 St25 の肢芽を上腕の中ほどと、手根骨中ほどで切断する。切除された先端部をタングステンピンによって上腕部と接合する。この接合によって上腕部基部側半分と先端部が組み合わされ、上腕部先端 ~ (すべての前腕部) ~ 手根骨基部側までの中間部構造を欠失させることができる。この欠失を徐放性ビーズに染み込ませた FGF によって誘導できるかどうか本研究方法の概略となる。

4．研究成果

ニワトリ胚前肢芽における中間部再生の誘導研究を行った。研究代表が過去に行ったメキシコサラマンダーにおける先行研究と比較しながら実験を組んだ。hamburger hamilton stages25 にニワトリ前肢芽は軟骨形状からすれば指骨まで分化の進んだステージとなる。このステージのニワトリ肢芽では柱脚・軛脚・自脚の区別は明瞭であり、切断に際して切除ミス等は比較的起りにくいステージである。この肢芽を軛脚を中心に自脚基部側、柱脚先端部側を含んだ中間部領域を取り除いた。除去後に切り離した先端部 (自脚) を切り株となる柱脚基部側と接合させることで中間部がないニワトリ肢芽を作り出すことができる。中間部除去の可否は *in situ* hybridization によってそれぞれのマーカー遺伝子の発現パターンによって評価した。コントロールとして PBS を接合部に添加した場合は、中間部構造が再生してくることはなかった。対して FGF2+FGF8 (マウスリコンビナントタンパク質) を接合部に添加した場合は失った中間部の構造が再生してくることが明らかになった。誘導される再生構造の形状は状態の良し悪しに程度の差はあるものの 2 本の軟骨から成る軛脚の形状を取っていた。この誘導された軛脚上の構造の評価のため、Hoxa11 遺伝子の発現パターンを調べた。Hoxa11 は予定軛脚領域に発現することが明らかな遺伝子である。FGF2+FGF8 を接合部に移植した肢芽では Hoxa11 の発現が観察されるが、コントロール群ではその発現を観察することができなかった。これまでの両生類の四肢再生研究において、インターカレーション方式で行われる再生では基部側の組織から生み出される細胞群が中間部構造の再生の主体となる事が示唆されてきた。この知見をニワトリで検証するにあたり、古典的に実験方法による不鮮明な知見しかなかった事から GFP 遺伝子組み換えメキシコサラマンダーを用いた実験で再検証した。すでにメキシコサラマンダーを用いた

インターカレーションの実験は論文としており、FGF2+FGF8 がインターカレーションの媒体をして働くことも示してある (Satoh et al., 2010, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.023.)。この実験系を用いて、基部側レシピエントとして GFP 陽性個体、先端部側ドナーとして野生型個体を用いた。結果として、インターカレーションで誘導された中間部構造はおよそ 80%程度が基部側由来で、先端部由来の細胞も 20%程度参加することが明らかになった。この知見はこれまでの古典的な知見を修正するものであり、論文の中に含めた。この知見と比肩して解析するために、ニワトリ肢芽の実験系ではニワトリ/ウズラのキメラ解析を行った。先端部をウズラ由来とし、基部側はニワトリの組織を利用することで最終構造における細胞の寄与を免疫抗体染色で可視化することができる。この木目から移籍の結果からメキシコサラマンダーの結果と同様の細胞の寄与を観察することができた。また、基部側から生じる細胞集団に Hoxa11 の発現を観察できる事も明らかにした。一連の結果から、ニワトリの肢芽においても有尾両生類型の四肢再生メカニズムを誘導できることが明らかになった。これらの成果は論文としてまとめ、誌上に発表した (Satoh et al., 2018, doi: 10.1387/ijdb.180118as; Makanae and Satoh, 2018, doi: 10.1186/s40851-018-0090-2.)。

一連の成果を基に、総説として今後の再生研究の向かう方針を発表した。FGF8 の発現ドメインが再生動物と非再生動物では異なる事が一つのカギとなる。羊膜類をはじめとする研究が良く進んでいるモデル動物において四肢発生における FGF8 の発現は外胚葉性長堤 (AER) と呼ばれる上皮に特異的に発現している。対して四肢を再生できる動物 (メキシコサラマンダー) では FGF8 は間充細胞に強く発現することが明らかになっている。この間充細胞側の発現がインターカレーションを媒介するために重要な働きを持つのではないかという観点で総説を執筆発表した。この観点は古典的な知見と近年の分子生物学的な知見とを融合したもものになっており、今後の研究方針を示す仕様とした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. (査読あり) “Nerve roles in blastema induction and pattern formation in limb regeneration”, **Satoh A.**, Kazumasa Mitogawa, Makanae A., *Int. J. Dev. Biol.* 2018, *Correspondence author*.
2. (査読あり) “Ectopic Fgf signaling induces the intercalary response in developing chicken limb buds”, Makanae A., and **Satoh A.**, *Zoological Letters*, 2019, 4, 8, DOI: <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0090-2>, *Correspondence author*.

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 佐藤伸

「アフリカツメガエルの四肢再生に観察される不完全性を改善する試み」

XCIJ/次世代両生類研究会合同シンポジウム、2018/9/19、広島大学

2) 佐藤伸

「両生類型の再生システムは哺乳類でも共通なのか？」

再生異分野融合研究会、2018/8/30、岡崎カンファレンスホール

3) 佐藤伸

「メキシコサラマンダーの四肢再生と骨再生」

骨代謝学会、2018/7/28、長崎新聞文化ホール

4) 蒔苗亜紀、佐藤伸

「Induction of intercalary responses in chicken limb bud」

APDBN/JSDB/JSCB Meeting、2018/6/6-8、船堀タワーホール

〔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〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

本研究は佐藤研究室のメンバ、特に佐藤伸と蒔苗亜紀によって推進された。

(1)研究分担者

なし