

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06266

研究課題名(和文)再生を制御する傷表皮シグナルの解明

研究課題名(英文)Study for wound epidermis signal to regulate regeneration

研究代表者

餅井 真 (Mochii, Makoto)

兵庫県立大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90202358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：尾部再生過程の傷表皮とAEC細胞で特異的にEGFPを発現するトランスジェニック・アフリカツメガエル幼生から、これら組織の細胞をソーティングにより単離し、トランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、傷表皮/AECから分泌され再生を制御する可能性のある分子の遺伝子として数10の遺伝子を同定した。さらに再生肢芽における発現も検討した結果、一部遺伝子は肢芽で発現しないこともわかった。一方、肢芽の傷表皮/AEC由来因子として知られているfgf8の発現は尾部では検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、尾部の傷表皮/AECが比較的多種類の分泌因子を放出することおよび、尾部と肢芽とで分泌因子の組成が異なることを明らかにした。この発見は器官再生のメカニズム解明へ向けての重要なステップとなる。

研究成果の概要(英文)：Wound epidermis (WE) and the apical epithelial cap (AEC) are believed to trigger regeneration of amputated appendages such as limb and tail in amphibians by producing certain secreted signaling molecules. Here we used an es1:egfp transgenic *Xenopus laevis* to isolate WE/AEC cells during the time course of tail regeneration. Transcriptome analysis revealed that more than 8,000 genes, including genes involved in several signaling pathways, displayed dynamic changes of their expression during tail regeneration. We identify seven secreted signaling molecule genes (mdk, fstl, slit1, tgf 1, bmp7.1, angptl2 and egfl6) that are highly expressed in tail AEC cells. Among these genes, five were also highly expressed in limb AEC cells but the other two are specifically expressed in tail AEC cells. Interestingly, there was no expression of fgf8 in tail WE/AEC cells, whose expression and pivotal role in limb AEC cells have been reported previously.

研究分野：発生生物学

キーワード：アフリカツメガエル 再生 傷表皮 apical epithelial cap 分泌性シグナル因子

## 1. 研究開始当初の背景

両生類は脊椎動物の中では非常に高い再生能力を持つグループであることが知られており、再生能力が高くないほ乳動物と比較することで、再生のしくみをより深く知ることができる期待される。ほ乳動物でも両生類でも、外部から損傷を受けた場合に傷口を被うのは皮膚である。皮膚の表皮と真皮の間には基底膜が存在し、正常な状態では両組織の細胞が直接接触することはない。両生類など、高い再生能力を有する種の皮膚が損傷を受けると、表皮が迅速に傷口を被い、一過的に直下の組織(真皮、筋肉等)と直接相互作用できる状態となる。このような状態の表皮を傷表皮と呼ぶが、有尾両生類の四肢や尾部を切断した場合、この傷表皮およびそれから派生した多層構造である apical epithelial cap (AEC)が、直下の細胞の動員・増殖・分化を引き起こし、大規模な再生へと導くと考えられている。実際、有尾両生類で、傷表皮や AEC が形成されない条件にすると、四肢や尾部の再生が阻害されることが報告されている。一方、再生能力の低いほ乳類では、通常傷口が血餅で被われた後、比較的ゆっくりと表皮が傷口を被うが、傷表皮が形成されない状態で癒痕形成に至る場合が多い。そこで、傷表皮および AEC から放出されるシグナル分子が、再生の開始や進行に決定的な役割を担うと考えられており、そのような分子の同定と作用機構の解明が、再生メカニズムを明らかにする上で最も重要なテーマのひとつとなってきた。

有尾両生類とアフリカツメガエル幼生の四肢再生過程、およびゼブラフィッシュのヒレ再生過程では、繊維芽細胞成長因子 8 (FGF8)、10 (FGF10)、20 (FGF20)等が、傷表皮および AEC で発現することがわかっている。一方、胚発生過程において、発達中の肢芽の先端部分(外胚葉性頂堤)で発現する FGF が肢芽の伸長を制御することも知られていることから、FGF ファミリー分子が四肢およびヒレ再生における最も重要な傷表皮/AEC 由来因子と考えられている。しかし、尾部再生過程においても、FGF が傷表皮/AEC から放出される因子として重要な役割を担うかどうかは明らかになっていない。また、Wnt など細胞分化や増殖に重要な他のシグナル分子遺伝子が再生尾部や再生肢芽で発現することも報告されているが、それらが傷表皮や AEC で発現するかどうか明確にはなっていない。近年ではトランスクリプトーム解析等により網羅的に遺伝子発現情報を収集することが可能となっているが、再生時の傷表皮や AEC を対象としたトランスクリプトーム解析は報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、有尾両生類よりも遺伝子発現解析や操作が容易であり、なおかつ旺盛な再生能力を有するアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)幼生を主要な材料として用いる。アフリカツメガエル幼生尾部を再生モデルとして、すでに様々な遺伝子の発現、あるいは遺伝子の機能解析の報告があり、複数のシグナル伝達経路が再生の進行に必要なこともわかっている。しかし、実際に傷表皮や AEC でどのような遺伝子が発現しているかについては、極めて限定的な知見しか得られていない。これらの組織を単離することができれば、細胞種特異的に網羅的遺伝子発現解析をすることが可能であるが、形態を指標に外科的に傷表皮や AEC を単離する事は非常に困難である。申請者らは、尾部切断後に一過的に発現上昇する遺伝子の一つとして、アフリカツメガエル *es1* を同定している(Tazaki et al.,2005)。この遺伝子は、尾部切断後の傷表皮および AEC を構成する細胞を中心とした表皮細胞で特異的に発現することがわかっている(Sugiura et al., 2009)。また、*es1* の発現制御領域を用いたトランスジェニック動物(*es1:egfp*)を作成することによって、傷表皮や AEC の細胞を、EGFP の蛍光で標識することにも成功している(Sato et al., 2018。図 1)。そこで、このトランスジェニック個体から、EGFP 発現細胞を単離し、それを材料としたトランスクリプトーム解析をおこない、その結果発現が確認された遺伝子リストをもとに、以下

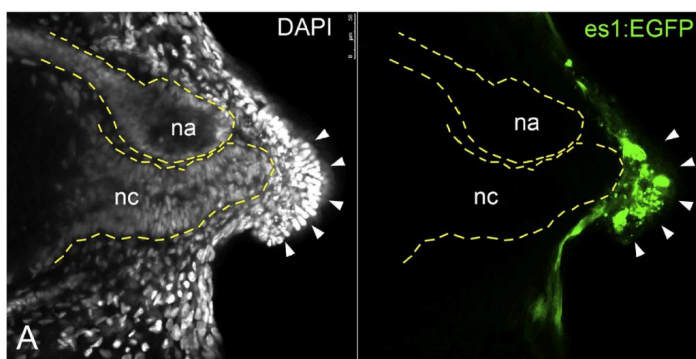


図1. *es1:egfp*トランスジェニック・オタマジャクシ再生尾部(3日後)のコンフォーカル顕微鏡像。DAPIは核染色。*es1:EGFP*個体ではAEC領域の細胞が蛍光標識される。左が頭部側、上が背側を示す。na, 再生脊髄の末端。nc, 再生脊索

の問題を明らかにすべく研究を進めた。

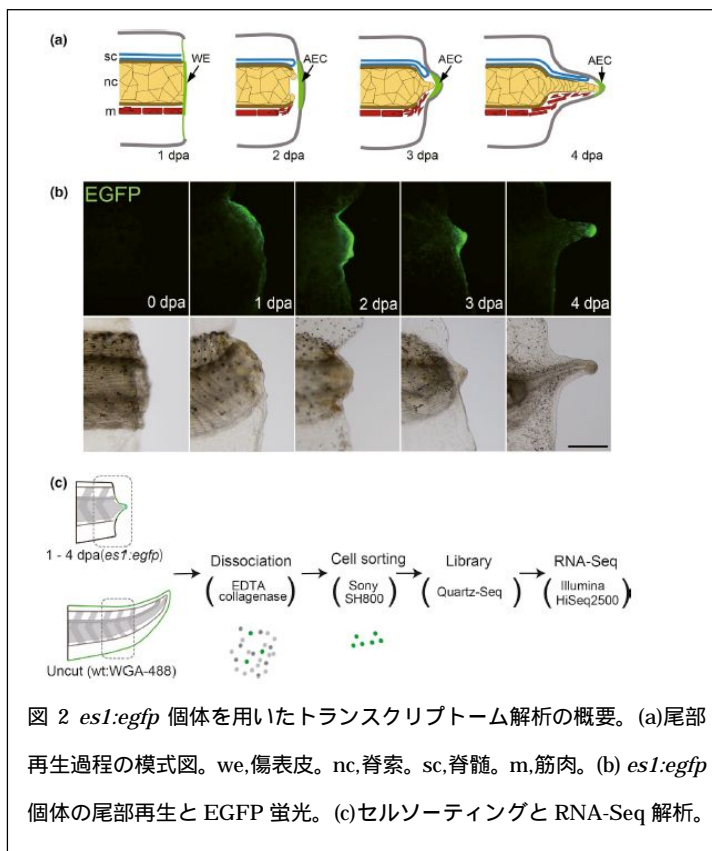
- (1) 尾部再生過程においても、FGF ファミリーが、傷表皮および AEC で発現し、再生を制御する重要なシグナル因子として働くのか。
- (2) FGF ファミリー以外にどのような分泌性シグナル因子が、傷表皮および AEC で発現するのか。
- (3) 本研究で同定できた分泌性シグナル因子が実際再生に必要なかどうか。

注：アフリカツメガエル *es1* は、現在 *Glutamine Amidotransferase Like Class 1 Domain Containing 3A (gatd3a)* と表記されているが、本報告書では、発見・発表時の呼称である *es1* を用いる。

### 3. 研究の方法

- (1) *es1:egfp* トランスジェニック個体を用いたトランスクリプトーム解析(図 2)

トランスジェニック幼生の尾部を切断し、傷表皮が形成される 1 日後、あるいは AEC が確認できる 2、3、4 日後の再生芽を EDTA 処理とコラーゲナーゼ処理により解離し、セルソーター (SONY SH800) を用いて EGFP 陽性細胞を単離し、各条件につき 100 個の細胞からなるサンプルを 3 セットずつ得た (Okumura et. al, 2019)。また、切断前の尾部表皮を蛍光レクチン (alexa 488-WGA) で標識し、同様に表皮細胞を単離した。次に、これらサンプルを材料として Quartz-Seq 法による RNA-seq 解析をおこない (Sasagawa et al., 2013)、そのデータをもとに、切断 1-4 日後の *es1:EGFP* 陽性細胞で発現する分泌シグナル因子候補遺伝子のリストを作成した。



- (2) ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション

RNA-Seq により傷表皮/AEC で強く発現すると期待される分泌シグナル因子の cDNA を EST ライ

ブラリーあるいは、PCR 法によりクローン化、DIG-RNA プローブを作製し、再生尾部あるいは再生枝芽を材料としたホールマウント in situ ハイブリダイゼーションをおこなった。

- (3) CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子の機能解析

尾部再生への必要性が期待される遺伝子について、そのタンパク質コーディング領域に特異的な CRISPR/Cas9 標的配列をそれぞれ 2-3 箇所選択し、対応する single guide RNA (sgRNA) を合成し、Cas9 タンパク質との複合体を受精卵に注入した。得られた初代個体 (crispant) の尾部を切断し、再生が正常に進行するかどうか検討した。異質 2 倍体である *Xenopus laevis* では多くの遺伝子が 2 セット (L, S) 存在するが、その場合、L, S 遺伝子に共通する配列に対する sgRNA を作製した。

- (4) エレクトロポレーション法による遺伝子の機能解析

CMV プロモーター下で目的遺伝子を発現するプラスミド DNA を、幼生尾部の表皮へエレクトロポレーション法で導入し、その後尾部を切断し、再生の進行を観察した。また、蛍光タンパク質 Venus や DsRed を発現するプラスミドを同時に導入することで、エレクトロポレーションの効率の検証と、導入細胞の追跡をおこなった。

### 4. 研究成果

(1) *es1:egfp* トランスジェニック個体を用いたトランスクリプトーム解析

尾部切断前の表皮、切断後 1、2、3、4 日後の尾部から単離した *es1:eGFP* 陽性細胞それぞれについて RNA-Seq 解析をおこなった結果、8,000 以上の遺伝子が発現変動することがわかった。それらには、これまでに再生に重要な働きを持つと報告されている reactive oxygen species (ROS)、FGF、canonical と non canonical Wnt、transforming growth factor (TGF)、Notch 等のシグナル伝達に関連するものが含まれていた。また、上皮 間充織転換に関連する遺伝子発現変化も検出されたが、これは傷表皮から AEC への組織変化を反映すると思われる。

また、分泌性シグナル因子をコードする可能性のあるものを、データベース中の記述等から選り出した結果、100 以上の分泌シグナル因子遺伝子候補が発現変動することが明らかとなった。これにより、当初考えていたよりもはるかに多くの種類の分泌性シグナル因子遺伝子が尾部切断後の傷表皮/AEC 細胞で発現することがわかった。

(2) ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析

傷表皮/AEC で発現上昇する分泌シグナル因子遺伝子のうち発現レベルが高いと思われるもの 20 個程度について、再生尾部における発現をホールマウント in situ ハイブリダイゼーションにより解析した。その結果、*mdk*, *bmp7.1*, *tgfb1*, *fstl1*, *slit1*, *angptl2*, *egfl6* の少なくとも 7 つの遺伝子が再生尾部の AEC を含む領域で発現することが確認された(図 3)。これら遺伝子について、肢芽の再生芽における発現解析もおこなったところ、*mdk*, *bmp7.1*, *tgfb1*, *fstl1*, *slit1* は肢芽の傷表皮/AEC でも同様に発現したが、*angptl2*, *egfl6* は検出されなかった。

一方、重要性が指摘されている *fgf8* については、再生肢芽での発現は確認されたものの、今回のトランスクリプトーム解析でもホールマウント in situ ハイブリダイゼーションでも再生尾部での発現は検出されなかった。またいずれの *fgf* 遺伝子についても、尾部傷表皮/AEC での発現レベルが高くないことがトランスクリプトーム解析から明らかになった。

以上をまとめると、再生尾部の傷表皮/AEC では比較的多種類の分泌シグナル因子を産生すること、FGF の発現レベルが低いこと、さらには再生肢芽の傷表皮/AEC とは質的に異なることが明らかとなった (Okumura et al., 2019)。

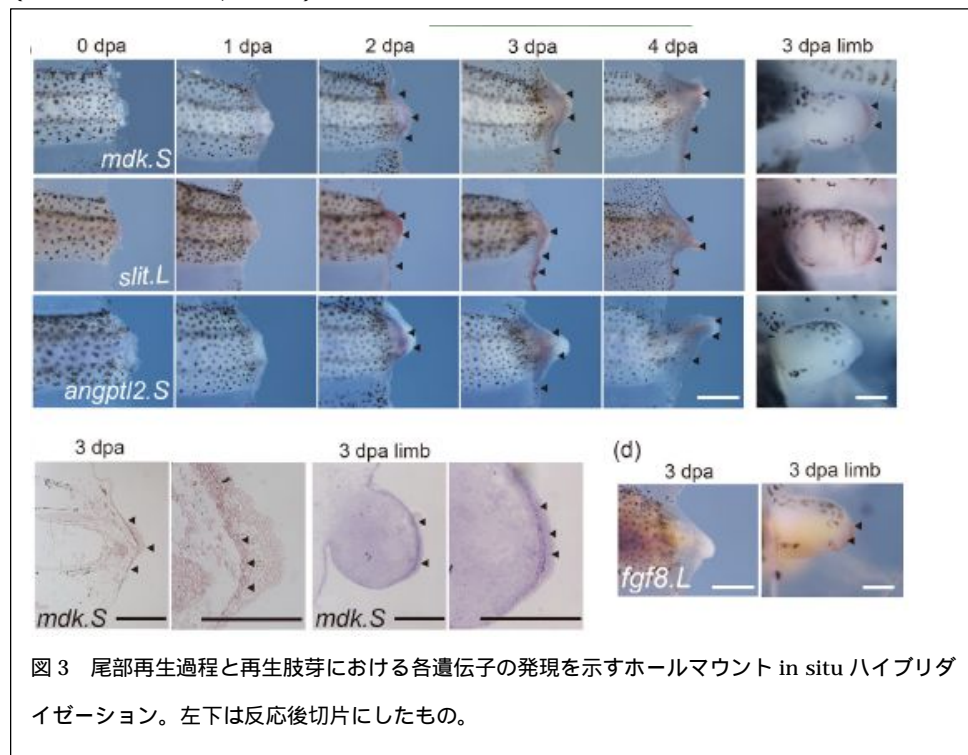


図 3 尾部再生過程と再生肢芽における各遺伝子の発現を示すホールマウント in situ ハイブリダイゼーション。左下は反応後切片にしたもの。

(3) CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子の機能解析

尾部傷表皮/AEC で発現する分泌シグナル因子遺伝子のうち、*cxcl8*, *fstl1*, *tgfb1*, *mdk*, *bmp7.1*, *pthlh*, *fibin*, *egfl6*, *slit1* について、それぞれ 2-3 種の sgRNA を合成し、Cas9 複合体として受精卵に注入した。得られた crisplant 個体では高い頻度で標的遺伝子の切断/変異導入が確認され、それぞれの遺伝子の機能低下が予想された。さらに尾部を切断したところ、*tgfb1* crisplant の場合のみで、有意に再生不全が観察された。

(4) エレクトロポレーション法による遺伝子の機能解析

傷表皮/AEC で発現することが本研究から明らかになった *slit1* の産物は、アクソンガイダンスにおいて忌避的に働くことが知られている。尾部表皮で *slit1* を過剰に発現させたところ、抗ア

セチル化チューブリン抗体で標識される神経繊維の分布が AEC で低下し、再生の進行が遅れることが示唆された。傷表皮/AEC で発現する slit1 が神経軸索の伸長を調節し、さらには再生を制御する可能性が示唆された。

<引用文献>

Sasagawa, Y., Nikaido, I., Hayashi, T., Danno, H., Uno, K. D., Imai, T., & Ueda, H. R. (2013). Quartz-Seq: A highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic geneexpression heterogeneity.

*Genome Biol.* 14, R31. Erratum. In: *Genome Biol.* 2017 18, 9.

Sato, K., Umesono, Y., & Mochii, M. (2018). A transgenic reporter under control of an es1 promoter/enhancer marks wound epidermis and apical epithelial cap during tail regeneration in *Xenopus laevis* tadpole.

*Dev. Biol.* 433, 404–415.

Sugiura T, Tazaki A, Ueno N, Watanabe K, Mochii M. (2009) *Xenopus* Wnt-5a induces an ectopic larval tail at injured site, suggesting a crucial role for noncanonical Wnt signal in tail regeneration.

*Mech Dev.* 26:56-67.

Tazaki A, Kitayama A, Terasaka C, Watanabe K, Ueno N, Mochii M. (2005) Macroarray-based analysis of tail regeneration in *Xenopus laevis* larvae.

*Dev Dyn.* 233:1394-404.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Okumura A, Hayashi T, Ebisawa M, Yoshimura M, Sasagawa Y, Nikaido I, Umesono Y, Mochii M.  | 4. 巻<br>61            |
| 2. 論文標題<br>Cell type-specific transcriptome analysis unveils secreted signaling molecule genes expressed in apical epithelial cap during appendage regeneration. | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Dev. Growth Differ.  | 6. 最初と最後の頁<br>447-456 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/dgd.12635   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>菊本葵、奥村晃成、梅園良彦、餅井真                        |
| 2. 発表標題<br>アフリカツメガエル幼生の尾部再生時に傷表皮で発現する分泌シグナル因子遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会大90回大会                             |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>塚原由希菜、奥村晃成、梅園良彦、餅井真               |
| 2. 発表標題<br>アフリカツメガエル幼生尾部再生時の傷表皮/AECにおける神経の役割 |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会89回大会                       |
| 4. 発表年<br>2018年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>餅井真                         |
| 2. 発表標題<br>傷表皮で発現する分泌シグナル因子遺伝子の同定と機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第三回 再生学異分野融合研究会（招待講演）       |
| 4. 発表年<br>2021年                        |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|