

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06437

研究課題名(和文)脊椎動物器官再生における組織横断的な幹細胞ニッチの活性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the hypothesized activation mechanisms of tissue stem cell niche shared across different tissues in the organ regeneration of vertebrates.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)器官再生時における幹細胞挙動とそれを支える分子基盤について研究を行い、本研究期間では、*X. laevis*への遺伝子導入手法の確立とその効率改善、再生時の組織前駆細胞産生におけるil11受容体の関与の解析、幼生尾再生芽中の幹細胞濃縮におけるSide population法の有用性の証明、肢芽再生においてFGF10投与時の再生能向上に關与する可能性のある新規細胞集団の同定、がなされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の最終目的は器官再生時の組織幹細胞活性化を促す細胞・分子基盤の解明にある。本研究期間において、この目標達成へ向けた手法確立(ゲノムの特定領域への配列挿入法の確立と効率向上、分子マーカーを必要としない幼生尾再生芽の組織幹細胞濃縮分画法の確立)と基礎知見の収集(再生時の幹細胞活性化を起こすil11シグナリングの動態の解析、肢芽再生能向上に寄与する新規細胞集団の同定)がなされ、器官再生時の幹細胞挙動の解明へ向け一定の成果が上げられたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the identification of molecular mechanisms that support the activation of tissue stem cells during organ regeneration in *Xenopus laevis*. In this study period, we reported (1) the establishment of knock-in method in *X. laevis* and the improvement method of its efficiency, (2) an analysis of il11 receptor function during the induction of tissue precursors in tail regeneration, (3) the application of the side population method to enrich the tissue stem cells in regenerating bud of tadpole tails, and (4) the identification of novel cell population and its possible involvement in the improvement of FGF10-mediated regeneration of hind limb bud of tadpoles.

研究分野：再生生物学

キーワード：アフリカツメガエル 器官再生 組織幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)は幼生の尾や肢芽において高い再生能をもつことが知られている。我々はツメガエル幼生尾再生において、尾切断後に発現誘導されるインターロイキン 11 (*il-11*) が尾再生時の複数組織の前駆細胞の誘導に必要十分であることを報告した(辻岡ら、*Nature Commun.* 2017)。ツメガエル幼生尾再生は尾を構成する各組織の幹細胞より組織前駆細胞が産生されこれらより再生尾が形成される様式と考えられており、*il-11* という単一因子が複数組織の前駆細胞を誘導することから、各組織の幹細胞を共通に活性化する機構の存在を想定し、この機構の実証へ向けた研究を行っている。

2. 研究の目的

研究の最終目的は幼生尾再生時に *il-11* シグナリングが各組織幹細胞を活性化する機構の実証である。これへ向けて、本研究期間では(1)尾再生時における *il-11* 受容体の発現解析と機能解析、(2)幼生肢芽再生能に関わる細胞種の解析、また研究遂行に必要な手法確立として(3)ツメガエルゲノムの特定領域への配列挿入法の確立とその効率向上、(4)幼生尾再生芽からの、分子マーカーを必要としない組織幹細胞濃縮分画法の確立、を行った。

3. 研究の方法

(1) 尾再生時における *il-11* 受容体の発現解析と機能解析

ツメガエル幼生尾再生における各組織の前駆細胞の誘導に必要な因子である *il-11* について、この機能は *Il-11* を受容する細胞によって発揮されると考えられる。そこで、ツメガエルにおける *Il-11* の受容体を実験的に同定し、その受容体の再生過程における発現解析、機能阻害時の尾再生への影響を検討した。

(2) 幼生肢芽再生能に関わる細胞種の解析

ツメガエル幼生は肢芽を切断した際にその後正常に脚を形成するが、この肢芽の再生能は発生の進行とともに低下する。ここで、肢芽切断後に FGF10 を投与するとその低下した再生能が限定的ではあるが回復することが報告されている。この FGF10 投与による肢芽再生能向上に関与する細胞種を、肢芽再生芽での single cell RNA sequencing (scRNAseq)により探索した。

(3) ツメガエルゲノムの特定領域への配列挿入法の確立とその効率向上

アフリカツメガエルにおいては本研究期間開始時点においてゲノムの狙った領域への配列挿入法(ノックイン)は報告が無かった。ノックインは今後予定している各種解析に必須の技術であるため、アフリカツメガエルにおける長鎖一本鎖 DNA を用いたノックイン手法の確立とそのノックイン効率の評価系の構築、ノックイン効率向上の検討を行った。

(4) 幼生尾再生芽からの、分子マーカーを必要としない組織幹細胞濃縮分画法の確立

幼生尾再生時の組織幹細胞挙動の解析においての障壁として、組織における幹細胞の存在比率の低さとツメガエルにおいて確立された幹細胞マーカーの整備不足が挙げられる。これらを解決するため、組織幹細胞のもつ薬剤排出能を指標に核酸染色試薬に低染色性となる細胞集団を分画することで組織幹細胞濃縮分画を得るサイドポピュレーション法をツメガエル幼生尾再生芽へ適応することを試みた。

4. 研究成果

(1) 尾再生時における *il-11* 受容体の発現解析と機能解析

哺乳類において、*Il-11* 受容体は Interleukin 11 Receptor 鎖 (*Il-11R*) と *Il-6* ファミリーサイトカインの受容体に共通な Glycoprotein 130 (*Gp130*) の複合体が知られている。アフリカツメガエル (*X. laevis*) ゲノム上には塩基配列の相同性から *il-11ra.L* とアノテーションされている遺伝子が存在するが、*X. laevis il11ra.L* が実際に *X. laevis Il-11* 受容体コンポーネントとして機能するかを実験的に確認した。まず、アフリカツメガエル培養細胞株 XTC-YF において *Il-11* シグナリングに関わる各分子 (*il-11ra*, *gp130*, *jak1*, *jak2*, *stat3*) の発現を確認した。次に、リコンビナント *X. laevis Il-11* を合成し XTC-YF に投与したところ、哺乳類での知見と同様に *Stat3* のリン酸化が確認された。ここで *il-11ra.L* ノックアウト XTC-YF 株を樹立し *Il-11* を投与したところ、*Stat3* のリン酸化は確認されなかった。この株では他のサイトカイン(Lif)による *Stat3* リン酸化は健全であることから、*X. laevis il-11ra.L* は *X. laevis Il-11* 受容に必須な遺伝子であることが示された。この *il11ra.L* について、Crispr/Cas9 法を用い受精卵への *cas9* mRNA と *il11ra.L* 標的 guide RNA の共注入によるノックダウン個体を出しその尾切断時の尾再生の程度を観察すると、*il-11* ノックダウン時と同様に再生尾長の顕著な短縮が確認され、尾再生時の *Il-11* シグナリングを担う因子であると示唆された。幼生における *il-11ra.L* の発現局在を *in situ* hybridization により検討してみると、脊髄、脊索、筋肉、表皮、間充織の大部分の細胞で発現が観察され、この発現は尾切断前後で共通であった。*Il-11* は創傷に応じて創傷部局所に発現するものであることから、個体内での幅広い組織・細胞での恒常的な *il-11ra.L* の発現は偶発的に生じる創傷に対する備えとしての意義が考えられる。ここで *il-11ra.L* ノックダウン個体の(短縮した)再生尾を構成する細胞における *il-11ra.L* 変異導入率の計測から、*il-11ra.L* ノックアウト細胞も再生尾形成に寄与していることが示唆された。*Il-11* は尾再生時の組織前駆細胞の誘導に必要な十分であるが、この際誘導さ

れる組織前駆細胞自身における II-11 受容体発現が必要ないことを示唆するもので、II-11 シグナリングを受け組織幹細胞を活性化する機能をもつ細胞種の存在が考えられた。(鈴木ら、*Sci. Rep.* 2022)

(2) 幼生肢芽再生能に関わる細胞種の解析

ツメガエル幼生の発生ステージ 56 の時点で後肢芽を切断するとその後形成される脚は不完全な手指形成に留まるが、この際 FGF10 投与により手指形成能が向上することが報告されている。この系を用い、当該ステージの個体の肢芽を切断、FGF10 投与・非投与の切断 5 日後再生芽を酵素的に組織分散し scRNAseq を実施した。FGF10 投与により Apical Epidermal Cap (AEC)における *fgf8* 発現が誘導されることが報告されていたが、今回の scRNAseq データにおいてこの状況が確認されたことから FGF10 処理は機能的であったと判断した。FGF10 投与・非投与群間で発現プロファイルが大きく変化する細胞集団を探索したところ、前述の AEC、特定の白血球集団に加え、線維芽細胞様の遺伝子発現プロファイルを示し *six-transmembrane epithelial antigen of prostate4* を排他的に発現する細胞集団 (steap4+ population) を見出した。特に steap4+ population の器官再生への関与はこれまでに報告が無く、FGF10 による肢芽再生能向上に関与する可能性のある新規細胞集団であると考えている。(柳・加藤ら、*Dev. Growth Differ.* 2022)

(3) ツメガエルゲノムの特定領域への配列挿入法の確立とその効率向上

研究開始時点でアフリカツメガエルにおいてゲノムへのノックイン法は確立されていなかった。本研究では、Crispr/cas9 法による染色体 2 本鎖切断と、切断部位近傍の配列を付加した長鎖一本鎖 DNA を用いたノックイン法とその効率向上を検討した。まず、この方法を用いチロシナーゼ遺伝子座に Internal Ribosome Entry Site を付加した AcGFP1 配列の挿入を試みたところ、チロシナーゼ発現細胞の一部において GFP 蛍光を認めたことから、この手法によりノックインが可能であることが判明した。次にノックイン効率の評価のため、作出個体を酵素的に組織分散しフローサイトメトリーにかけることで個体内の GFP 陽性細胞の率を測定する定量的なノックイン効率の評価系を構築した。この評価系を利用しノックイン効率を向上させる条件を探索したところ、受精卵への Crispr/cas9 コンストラクトと長鎖一本鎖 DNA のインジェクション操作後に通常の飼育温度より低温 (12℃) に一定時間置くことで導入効率が有意に上昇することを見出した。(加藤ら、*BBRC* 2021)

(4) 幼生尾再生芽からの、分子マーカーを必要としない組織幹細胞濃縮分画法の確立

ツメガエル幼生尾再生時における組織幹細胞挙動を解析する際の障壁として、組織幹細胞の存在比率の低さと確立された分子マーカーの整備不足がある。この両者を解決するため、分子マーカーを用いない方法で組織幹細胞を濃縮する方法であるサイドポピュレーション法を幼生尾再生芽に適応し、この濃縮分画において scRNAseq を実施することにより分子マーカー未同定な組織幹細胞を推定することを試みた。哺乳類で、いくつかの組織においてその組織幹細胞が ABC トランスポーターによる高い薬剤排出能を持つことが報告されており、これを利用し核酸染色試薬で染色した際に排出能により低染色性となる細胞集団 (サイドポピュレーション; SP) を分画することで幹細胞濃縮分画を得る方法が SP 法である。SP は ABC トランスポーターの阻害剤である Verapamil 存在下・非存在下で核酸染色試薬である Hoechst 33342 の染色性が変わる集団として定義される。今回、ツメガエル幼生尾再生芽を酵素的に組織分散させ Verapamil 存在・非存在下で Hoechst 33342 染色を行ったところ、2 つの SP が検出された。この SPs について scRNAseq を行ったところ、SP には筋衛星細胞や神経前駆細胞が濃縮されていることが判り、SP 法はツメガエル幼生尾再生芽からの組織幹細胞の濃縮に有用であることが示された。SP にはマーカー未同定の組織幹細胞も含まれていると考えられ、今回の scRNAseq データより推定作業を進めている。(加藤ら、*Dev. Growth Differ.* 2022)

研究の最終目的は器官再生時の組織幹細胞活性化を促す細胞・分子基盤の解明にある。本研究期間において、この目標達成へ向けた手法確立 (ゲノムの特定領域への配列挿入法の確立と効率向上、分子マーカーを必要としない幼生尾再生芽の組織幹細胞濃縮分画法の確立) と基礎知見の収集 (再生時の幹細胞活性化を起こす II11 シグナリングの動態の解析、肢芽再生能向上に寄与する新規細胞集団の同定) がなされ、器官再生時の幹細胞挙動の解明へ向け一定の成果が上げられたと考えている。

なお、(1)-(4)の研究の一部は課題番号 20K21517 と、(2)と(4)の研究の一部は課題番号 22K19325 と共同で実施した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Shunya, Sasaki Kayo, Fukazawa Taro, Kubo Takeo	4. 巻 12
2. 論文標題 Xenopus laevis il11ra.L is an experimentally proven interleukin-11 receptor component that is required for tadpole tail regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-022-05954-w	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 Kato Sumika, Fukazawa Taro, Kubo Takeo	4. 巻 543
2. 論文標題 Low-temperature incubation improves both knock-in and knock-down efficiencies by the CRISPR/Cas9 system in Xenopus laevis as revealed by quantitative analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 50 ~ 55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.038	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 Yanagi Nodoka, Kato Sumika, Fukazawa Taro, Kubo Takeo	4. 巻 64
2. 論文標題 Cellular responses in the FGF10 mediated improvement of hindlimb regenerative capacity in Xenopus laevis revealed by single cell transcriptomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 266 ~ 278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12795	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 Kato Sumika, Kubo Takeo, Fukazawa Taro	4. 巻 64
2. 論文標題 Effective enrichment of stem cells in regenerating Xenopus laevis tadpole tails using the side population method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 290 ~ 296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12797	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sumika Kato, Takeo Kubo, Taro Fukazawa
2. 発表標題 Side population method is effective for tissue stem cell enrichment in <i>Xenopus laevis</i> tadpoles.
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Developmental Biologists
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taro Fukazawa
2. 発表標題 The immune response network that determines the regenerative ability of <i>Xenopus laevis</i> tadpole tails.
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Developmental Biologists
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤寿美香、久保健雄、深澤太郎
2. 発表標題 ツメガエル幼生尾再生におけるシングルセル-RNA解析を用いた組織幹細胞・前駆細胞系列 の推定
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 出口 桃子、深澤 太郎、久保 健雄
2. 発表標題 アフリカツメガエル幼生における再生を促進する免疫細胞の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳 のど香、深澤 太郎、久保 健雄
2. 発表標題 アフリカツメガエル幼生においてrf1b.Sは再生時特異的に尾形成に働く
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 寿美香、久保 健雄、深澤 太郎
2. 発表標題 ツメガエル幼生尾再生時における組織幹細胞動態解析のための、サイドポピュレーション法による幹細胞濃縮の検討
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤 太郎
2. 発表標題 アフリカツメガエル幼生尾再生不応期における免疫応答ネットワーク
3. 学会等名 第92回日本動物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤 太郎
2. 発表標題 創傷がトリガーする器官再生に固有な現象とその機構
3. 学会等名 第91回日本動物学会大会シンポジウム・テクノロジーが切り開く「シン・再生研究」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出口 桃子、深澤 太郎、久保 健雄
2. 発表標題 ツメガエル幼生尾再生に促進的に働く免疫細胞の同定
3. 学会等名 第91回日本動物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 駿也、深澤 太郎、久保 健雄
2. 発表標題 ツメガエル幼生尾再生に関わるIL-11受容体の機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張 優希、藤倉 崇紘、深澤 太郎、久保 健雄
2. 発表標題 アフリカツメガエル再生不応期の再生能低下に関わる分子機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出口桃子、深澤太郎、久保健雄
2. 発表標題 ツメガエル幼生尾の再生に関わるIL-11下流遺伝子の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------