

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22417

研究課題名(和文) 組織再生におけるレチノイン酸シグナル作用の再検証と再生可否決定機構の解明

研究課題名(英文) Re-evaluation and analysis of the role of retinoic acid signaling that may permissively control tissue regeneration

研究代表者

川上 厚志 (Kawakami, Atsushi)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：00221896

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)：生物は、組織を長期に維持、再生する能力＝組織恒常性を持つが、このメカニズムは未だ明らかでない。私達はレチノイン酸(RA)受容体アゴニストがゼブラフィッシュ尾ヒレの再生を不可逆的に阻止するユニークな作用を見だし、本研究では、アゴニスト作用機構の解析を行った。その成果、(1)アゴニストは過剰なRAシグナルを発生させるが、逆に、下流の標的Cyp26を介して強力かつ持続的なフィードバック阻害が誘導される。(2)誘導されたCyp26は、RAを分解し、急性のRAクリアランスを生じる。(3)その結果、アゴニストは、RAシグナルの停止を誘発し、これが数日持続することにより再生不能となることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レチノイン酸RAは奇形誘発物質として知られ、母親が過剰摂取すると四肢の形成などに重篤な奇形を生じる。RAは四肢発生で重要なだけでなく、イモリや魚類などの四肢や鰭の再生にも関与することが示唆されてきた。しかし、この役割については統一的な見解がなかった。本研究によって、はじめて、RAが再生において必須の役割を持つことが示された。

RAや誘導体は、実際の治療薬としても用いられているが、RAなどを繰り返し投与すると、逆に血中濃度が低下する事が知られていた。本研究は、過剰RAシグナルがRAクリアランスを起すメカニズムを明らかにした。これは、治療薬としてのRAの投与や新薬開発に一石を投じるものである。

研究成果の概要(英文)：Organisms can maintain and regenerate tissues for a long period of time by the mechanism termed as tissue homeostasis, but this mechanism has not been clarified yet. We found that retinoic acid (RA) receptor agonists irreversibly block the regeneration of zebrafish fin, and in this study, we analyzed the mechanism of action of the agonists. We revealed that (1) agonists generate excessive RA signals, but paradoxically, strong and sustained feedback inhibition is induced via the downstream target Cyp26. (2) The induced Cyp26 degrades RA, resulting in acute RA clearance. (3) it was shown that the agonist induces the cessation of RA signal, which leads to the loss of regeneration after several days.

研究分野：再生発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ ヒレ 再生 レチノイン酸

## 1. 研究開始当初の背景

生物は、多細胞体制を維持・再生する能力 = 組織ホメオスタシスを持つが、この分子・細胞的メカニズムは未だ明らかになっていない。 魚類や両生類の一部など脊椎動物の一群は高い組織再生能を持ち、四肢やヒレを再生することができる。一方で、ほ乳類などの種では、組織再生は限定的であり、四肢の再生は起こらない。 組織再生過程や種による再生能の差異を明らかにすることで、組織恒常性の普遍原理の解明や再生医療などへの展開が期待される。

近年、ゼブラフィッシュのヒレをモデルとして組織再生の分子的な基盤の解析が進み、Fgfをはじめ (Shibata et al. 2016. *Development* 143; 2021-2929), 様々なシグナルが再生過程に関与することが示されてきた。しかし、これまでに示されたシグナルは、それらの阻害によって再生は一時的に停止するが、阻害がなくなるとまた再生を再開できる、一時的な細胞増殖や組織伸長の阻害と考えられるものが多い。

私達は、化合物スクリーニングから、再生に影響を与える化合物としてレチノイン酸受容体 RAR $\beta$  特異的アゴニストを同定した。このレチノイン酸(RA)アゴニストは、劇的な効果を示し、幼生でも成体でも、再生を不可逆的に完全停止させ、あたかもほ乳類組織のように再生不能に変化させた。 これまでに多数の再生に関与するシグナルが報告されているがこのように不可逆的に再生を停止させるものは知られていない。

これまでの予備的な研究によって、以下の点が明らかとなった(図1)。

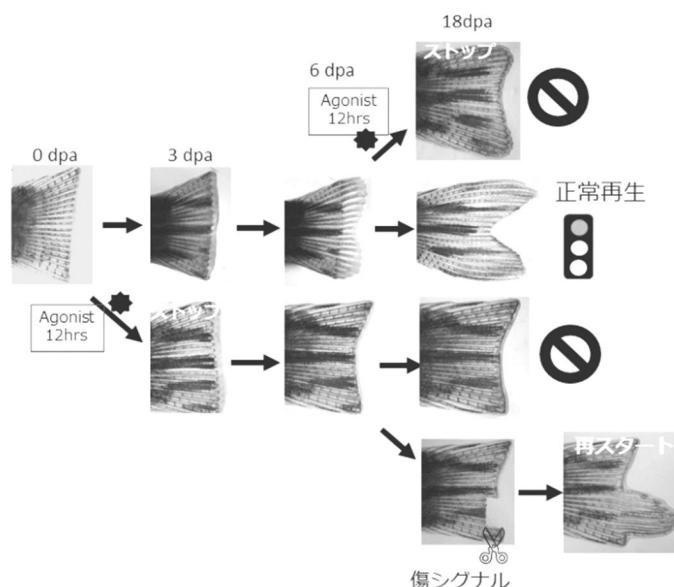


図1: RA アゴニストは再生を不可逆的に停止させる  
RA アゴニストを 12 時間投与するだけで、再生のどの段階でも再生を停止し、傷害を与えることで、再生は再開する。

1. 組織切断後、12時間以下のアゴニスト処理で、哺乳類の四肢と同様に、組織再生が起こらなくなる。
2. アゴニストは、どの再生ステージで投与しても再生を停止させる。
3. 再生が停止した組織は、傷を与えることで、再び再生を開始する。

これらの事実は、RA シグナルが再生可否、ないしは再生のエッセンシャルなチェックポイントとして作用することを示唆しており、このようなシグナルは、組織や動物による組織再生能力の違いの基盤になっている可能性も考えられる。

レチノイン酸 (RA) シグナルは、最もよく研究されてきたシグナルの一つである。これまでに行われた多数の研究により、催奇形性や様々な病態への関与が示唆されてきたが、中でも、RA シグナルは脊椎動物の四肢発生においては、肢芽の伸長や前後軸の形成に必須の役割を果たすことが示されている。また、ヒレ再生過程でも、RA シグナルは再生に必須であるという報告や、両生類の一部では、切断した尾から肢を再生させること (ホメオティックトランスフォーメーション) も示されており、RA の付属器官形成、再生における必須の役割を示す研究の一方で、RA の投与によって、逆に再生不全や、過剰な骨形成などの異常が起こることも報告され、付属器官再生における RA シグナルの役割は実は明瞭でない。

興味深いことに、細胞内の RA 濃度は、RA 合成酵素 Raldh による合成反応と代謝酵素である Cyp26 による分解反応のバランスで決まるが、Cyp26 自身は RA シグナルの転写標的遺伝子のひとつであり、ネガティブフィードバックによって RA を分解する (図2)。従って、従来行われてきた様々の投与と実験またはノックダウン実験で、RA シグナルは ON・OFF のどちらの状態なのか実は明かではない。 プラスの効果や治療を狙った投与が、実際

は、RA シグナルがネガティブになっていたとすれば、従来の研究結果は真逆の事を示唆していることになる。

## 2. 研究の目的

上記のように、RA シグナルは、一方でネガティブフィードバックによる RA リガンド自身の分解を誘導する。このようなフィードバックによって制御される RA シグナルは、自然の状態での作用や、また RA アゴニストを作用させた場合に、平衡点はポジティブに作用しているのか、逆にネガティブに作用しているのか、予測不可能である。

本研究では、RAR アゴニストのユニークな作用を手がかりに、再生における RA シグナル作用を再検証し、組織再生の停止は RA シグナルの活性化または抑制化のどちらによっているのか 解明を目的とした。そしてさらに、制御メカニズムの更なる解析と、また、下流で活性化または抑制化される遺伝子の探索から、再生の可否、進行チェックポイントの鍵となる因子の探索 を目指した。

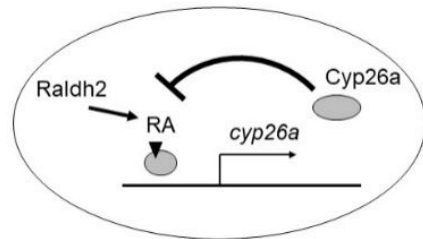


図2： RA シグナルの制御機構  
RA シグナルは、強いネガティブフィードバックが働く。

## 3. 研究の方法

RAシグナル作用の再検証と、下流の標的（再生の鍵）因子同定を目指し、以下の研究を行った。

- (1) RAシグナル活性化の再検証：従来のRA投与実験やノックダウンなどには説明不可能な結果が存在する。RAシグナルの標的の一つであるCyp26aを介した強いネガティブフィードバックが存在するために、RAシグナルがON・OFFのいずれであるのか、従来の研究では詳細に検証されず見逃されてきたと考えられる。本研究では、RAレポータートランスジェニック(Tg)、Cyp26a TgなどによってRAシグナルを可視化し、RAR阻害剤、Cyp26a阻害剤などと組み合わせることで検証することによって、アゴニストがRAシグナルを正または負のどちらに変化させているかをイメージングによって詳細に解析した。
- (2) RA下流で働く、再生可否決定因子の探索：RAシグナルは核内受容体を経て直接に転写に作用する。RAアゴニストによって、正または負に制御される遺伝子は、再生の可否（StopまたはGo）を決めるエッセンシャルな分子と予想される。RNAシーケンスにより、このプロセスに関わる遺伝子の探索を行う。
- (3) 再生可否決定因子の検証と再生できない生物種を再生させる：候補遺伝子をそれぞれ、熱誘導プロモーター下に挿入してTgを作製し、強制発現によって、アゴニストの再生停止をレスキューできるか検証する。さらに、レスキューに成功した場合、同様の手法で、ツメガエルやほ乳類など、四肢が再生できない動物で強制発現させて、再生を誘導できるかどうか試みる。また、ケミカルを用いてRAシグナルのレベルを操作して、アゴニストによる再生停止のレスキューや他の動物で再生誘導が可能かどうか検討する。

## 4. 研究成果

### (1) RAシグナル活性化の再検証：

私達は化合物スクリーニングから、レチノイン酸受容体RAR $\beta$ アゴニストを同定した。レチノイン酸（RA）アゴニストは、短時間の処理で、その時点で再生を不可逆的に停止させた。さらに、再生が停止した組織は、傷を与えることで、再び再生を開始した。

本研究では、第一に、アゴニストによる再生阻害状態は、再生過程のどのステップに影響を与えているか解析を行った。このため、当研究グループで作製してきた数々の再生応答を示すトランスジェニックゼブラフィッシュを用い、アゴニストの影響を精査した。

その結果、アゴニストは、傷上皮や再生芽マーカーの発現開始には影響せず、再生の最初の段階は比較的正常に始まっていることが示唆された。一方、数日経つと、再生芽マーカーの発現は失われていった。さらに、すでに再生芽などの形成が起こっている段階のヒ

レに投与する実験を行うと、この場合も、再生芽マーカーの発現は数日で失われて行くことが示された。すなわち、RARアゴニストは、再生芽の維持に影響を与える事が示唆された。

RAシグナルは、核受容体を介して遺伝子の転写を直接制御することが知られているが、これら標的遺伝子の中には、Cyp26などのRAリガンドを分解する酵素の遺伝子がある。Cyp26aを介した強いネガティブフィードバックが存在するために、アゴニスト存在下でRAシグナルはON・OFFのいずれであるのか不明である。私達は、実際のRAシグナル活性化を見るために、RAレポータートランスジェニックなどの方法を試みたが、中でも、Cyp26a Tgは非常に感度良く、RAシグナルの活性化をモニターできることがわかった。

正常な再生過程では、Cyp26発現は、組織再生時にはほとんど変化がないか、むしろ一時的に低下したが、アゴニスト投与したヒレでは、極めて高いCyp26発現を示し、この効果は、アゴニストがなくても、数日以上にわたって維持されることがわかった。このことは、アゴニストによってRAリガンドは低下する可能性を示している。

さらに、Cyp26の発現と再生との相関を調べるために、様々なRA中間体・代謝体の投与を行い、Cyp26活性化と再生を検証した。幾つかのRA代謝産物は、いずれもCyp26発現を誘導したが、RARアゴニストは最も強く、長くCyp26を誘導した。RA代謝物の中には、比較的弱くしかCyp26の誘導を起こさず、その場合、再生も停止しなかった。また、再生不能となったヒレを再切断する実験を行うと、アゴニストによるCyp26発現が一定以上にあるうちは再生できないが、5日以上経過してCyp26発現が十分に低下すると再生する事も示された。以上から、RARアゴニストは、Cyp26を強く長く誘導することにより、RA分解を誘導し、RAシグナルを低下させていることが示唆された。

次に、アゴニストが長期にCyp26の発現を持続、上昇させるメカニズムを明らかにした。LC/MS分析により、投与後の生体内のアゴニスト量を経時的に定量した結果、アゴニストは細胞内に非常に効率よく取り込まれ、同じ濃度のall trans RAを投与した場合と比べて1000倍もの量が投与1日後に存在し、さらに長期にわたって減少しないことが示された。このような細胞内への取り込みと蓄積がCyp26の高発現のメカニズムであることが示唆された。

さらに、LC/MSにより、all trans RAの濃度を定量した結果、正常な再生では切断後にRA濃度はわずかに上昇するのに対し、アゴニスト投与では、即座に細胞内のall trans RAは検出できなくなり、アゴニストと誘導されるCyp26高発現は、細胞内RAのクリアランスを起こすことが示された。以上の解析から、アゴニストは、強く長いネガティブフィードバックにより、逆説的に、RAシグナルの低下を起こすと考えられた。このようなRA低下が再生阻害に繋がっていると考えられる。

しかしながら、RARアゴニストはRAシグナルを活性化し続けるが、再生は阻害されるのはなぜなのか？これに対し、当研究では、阻害剤を使って受容体特異性の解析を行った。アゴニスト投与と同時に、RAR阻害剤を投与すると、Cyp26誘導は抑制され、再生は正常に進むことがわかった。このことから、RARはCyp26誘導には必要であるが、再生にはRARは必要ではないことが明らかになった。RAはRXRなどの非RARを受容体として作用し、再生の進行に必要な下流遺伝子の発現を制御していると考えられる。再生にとってどの受容体を介した下流シグナルが必要なのか、さらに解析を進めている。

## (2) RA下流で働く、再生可否決定因子の探索：

RAシグナルは核内受容体を経て直接に転写に作用する。RAアゴニストによって制御される遺伝子は、再生の可否を決めるエッセンシャルな分子と予想される。

そこで、私達は、アゴニスト処理したヒレのRNAシーケンス解析により、このプロセスに関わる遺伝子の探索を行った。アゴニストの投与は再生初期の12時間程度でも完全に再生を阻害するが、上で明らかにしたように、アゴニストは長期に細胞中に蓄積して作用し、4~5日目まで持続すると再生能が失われる。つまり、msxcで見られたように、アゴニスト投与後、4~5日以降に発現が維持できなくなる遺伝子の中に、再生の進行にエッセンシャルな遺伝子が含まれていると推測される。

RNAプロファイリングによって、アゴニストによって発現が抑制される遺伝子を同定し

たところ、再生初期には応答遺伝子の多くは、正常に近く発現が開始していたが、四肢の発生や魚類ヒレの再生時に、伸長する組織の先端や再生芽に発現する遺伝子をはじめ、発生、再生と関わる可能性が考えられる遺伝子のいくつかが影響を受けることがわかった。

(3) 再生可否決定因子の検証と再生できない生物種を再生させる：

RNAプロファイリングから同定された、RAシグナルに依存して再生中に活性化される遺伝子の、いずれが再生進行にエッセンシャルな働きをしているのか明らかにするために、強制発現実験を行っている。候補遺伝子をヒートショックプロモーター下に発現させるコンストラクトを導入したゼブラフィッシュトランスジェニックを作製した。強制発現によって、アゴニストの再生停止をレスキューできるか検証を進めている。現在までに、各遺伝子について複数のトランスジェニック系統を作製し、安定に最も強い発現が見られる系統の確立と、ヒレ再生時における効果の吟味、さらに、アゴニストによる再生停止をレスキューできるか検討を進めている。

以上の成果は、今後、再生に必要とされる RA 受容体の解明、再生の進行を司る下流の標的遺伝子の解析などによってさらに発展し、四肢、ヒレなどの付属器官再生における重要なチェックポイント機構の解明に繋がることが期待される。また、本研究によって示されたアゴニストによる RA クリアランスは、医学、薬理学上の重要な知見として、分野を超えたインパクトを与えるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横澤 満聡, 川上 厚志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュのヒレの再生における形とサイズの位置情報
3. 学会等名 日本動物関東支部第72回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小宮広滉, 川上厚志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの発生, 成長, 再生を通じた間葉細胞の系譜解析
3. 学会等名 日本動物関東支部第72回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Teruhisa Tamaki, Atsushi Kawakami
2. 発表標題 Mechanism of gene induction in response to regeneration in zebrafish fin
3. 学会等名 第53回日本発生生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misato Yokozawa, Keina Matumura, Atushi Kawakami
2. 発表標題 Regeneration mechanism of size and shape in the zebrafish fin
3. 学会等名 第53回日本発生生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Siyu Zhou and Atsushi Kawakami
2. 発表標題 PI3K /Akt signal at wounded site supports the survival of regenerative cells by recruiting the macrophage during zebrafish fin fold regeneration
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Teruhisa Tamaki and Atsushi Kawakami
2. 発表標題 JSDB Trial Meeting
3. 学会等名 Mechanism of gene induction in response to regeneration in zebrafish fin
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島朋哉、谷下絵里、川上厚志
2. 発表標題 過剰のRAシグナルは、Cyp26a1のネガティブフィードバックによってゼブラフィッシュのヒレ再生を不可逆的に停止する
3. 学会等名 日本動物関東支部第71回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Kawakami, Eri Tanishita, Tomoya Nakashima
2. 発表標題 A signal mediated by retinoic acid functions as a novel regulative step for allowing zebrafish fin regeneration
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田牧輝久、柴田恵理、川上厚志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの再生応答に関するエンハンサー配列の同定
3. 学会等名 日本動物関東支部第71回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横澤満聡、川上厚志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの鰭条の位置情報を維持する機構の解明
3. 学会等名 日本動物関東支部第71回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Siyu Zhou and Atsushi Kawakami
2. 発表標題 PI3K signal is required for regenerative cell survival by recruiting the macrophage to amputation site
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田牧輝久、柴田恵里、川上厚志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの再生応答エンハンサーの同定と解析
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 川上厚志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュヒレの再生における位置情報と成長制御のメカニズム
3. 学会等名 第2回 再生学異分野融合研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横澤満聡、柴田恵里、川上厚志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュヒレの鰭条の長さは、鰭条に固有の位置情報によって決まる
3. 学会等名 第2回 再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田牧輝久、柴田恵里、川上厚志
2. 発表標題 傷害に応答した遺伝子誘導に関わるエンハンサーの探索
3. 学会等名 第2回 再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Siyu Zhou and Atsushi Kawakami
2. 発表標題 PI3K/AKT signal supports regenerative cell survival by recruiting the macrophage to amputation site
3. 学会等名 第25回 小型魚類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kumpei Murase, Eri Tanishita, Tomoya Nakashima, Ayumi Nagashima, Atsushi Kawakami
2. 発表標題 RAR agonist antagonizes zebrafish fin regeneration
3. 学会等名 第54回 日本発生生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Misato Yokozawa, Keina Matsumura, Yuki Yokota, Atsushi Kawakami
2. 発表標題 Regeneration mechanism of size and morphology in the zebrafish
3. 学会等名 第54回 日本発生生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田牧輝久、吉田貴史、川上厚志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュヒレ再生における再生エンハンサー
3. 学会等名 第92回 日本動物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横澤満聡、松村慧奈、横田裕輝、川上厚志
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの尾ヒレにおける形の再生メカニズム
3. 学会等名 第92回 日本動物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村瀬訓平, 谷下絵里, 中島朋哉, 永鷺鮎美, 川上厚志
2. 発表標題 レチノイン酸シグナルによるゼブラフィッシュの尾ひれ再生の制御機構
3. 学会等名 第92回 日本動物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上厚志, 村瀬訓平, 谷下絵里, 中島朋哉, 永鷺鮎美
2. 発表標題 レチノイン酸シグナルのアゴニストは, アンタゴニスティックに作用して再生を停止させる
3. 学会等名 第3回 再生学異分野融合研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021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