

平成23年6月16日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870027

研究課題名（和文）高等脊椎動物の四肢再生に向けた研究

研究課題名（英文）first step for limb regeneration in higher vertebrates

研究代表者

佐藤 伸 (SATOU AKIRA)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・助教

研究者番号：90512004

研究成果の概要（和文）：

ニワトリの四肢再生に取り組んだ。ニワトリの肢芽を切断後に何が起こるのか?そして何が“再生できない”理由になっているのかを明らかにすることを目的とした。切断後にどのような変化が起こるのかを組織学的観点から観察し、その後両生類との比較のために遺伝子発現を調べた。さらに両生類の知見から、AECとよばれる構造が再生の引き金になっていることが明らかであったため、AECと相同の機関であると考えられるAER（外胚葉性長堤）に着目して研究を行った。その結果、AERは損傷後にニワトリであってもWnt2bとFgfのシグナリングによって誘導されることを見出した。これらの研究成果は、高等脊椎動物での四肢再生の第一歩として非常に大きな意義を持つものと考えている。

研究成果の概要（英文）：

We were analyzing about limb regeneration in higher vertebrates. It was not described what happened after limb bud amputation in higher vertebrates. We first described events after limb bud amputation at histology and molecular level. Then we compared regenerative events in an amphibian and a chick. And we know AEC (apical epithelial cap) in an axolotl is the key of amphibian limb regeneration. Therefore, we next focused on AER (Apical epidermal ridge) since AER has been considered to be a functionally similar structure with the AEC. We found that AER was re-inducible after wounding by Wnt2b and Fgf-signaling. Our findings can be thought as a first step for mammalian limb regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			

年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：5806

キーワード：発生、再生、ニワトリ、四肢再生

1. 研究開始当初の背景

両生類では四肢の切断後、分化した細胞が脱分化することによって様々な細胞へ分化できる未分化細胞（再生芽細胞）が生み出される。この未分化細胞が切断面に集合し、再生芽と呼ばれる構造が作り出される。この再生芽の成否が再生できるかできないかを分ける分水嶺であると考えられている。ではどのようにして再生芽は生じるのであろうか？再生芽を形成させる引き金を発見できれば高等脊椎動物でその引き金がどの様に制御されているかという観点から高等脊椎動物における再生能力を検証できる。研究提案者はこの引き金に関して学術上大きな進展を得た。両生類では四肢の切断後、数時間以内に切断面を周囲の上皮が覆う。この上皮は傷上皮と呼ばれるもので、この傷上皮の形成だけでは再生反応は起こらない。切断面に存在する神経との接触がこの傷上皮の機能化を促すことが明らかになった（研究業績 2、3、4）。神経との接触を遮断すると再生は起こらず、上皮の機能化も生じない。つまり、神経による傷上皮の機能化が再生反応の引き金であるということ突き止めたのである。この結果はさらなる飛躍を考える上で非常に大きな一歩となるものである。なぜならば、マウスは切断後に上皮の機能化や再生現象は起こらないが、再生反応を引き起こせる環境は潜在的に有することが判明しているからである（Masaki and Ide, 2007）。四肢再生の引き金である傷上皮とその機能化を引き起こせれば、マウスでも再生させられる

可能性が高いということに他ならない。この観点は、上皮の機能化がカギであることを突き止めた提案者のみが考え出しうる観点である。国内外にも提案者の研究グループ以外には両生類での知見を高等脊椎動物に転換しようという研究グループはいない。ゆえに独創性の高い先進的な研究成果が見込まれた。

2. 研究の目的

マウスでの研究には時間や使用にかかわる制約が多い。赴任したばかりの環境で実験に関わる要件をそろえることは極めて困難である。加えて実験操作の容易性が低い。これらの理由によってニワトリ胚を用いた実験によって、マウスでの研究へつながる礎を築くことを目的としたい。ニワトリ胚でも切断後に傷上皮の機能化が起こらない。しかし、発生過程に存在する機能化した上皮と同じ役割を果たせる組織があり、それを移植すると再生反応が起こることがすでに明らかにされている（Hayamizu et al., 1999）。これは、高等脊椎動物でも機能化された上皮さえ形成できれば再生できるということを改めて裏付ける証拠であるといえる。本研究提案は、切断後なぜ上皮に機能化が起こらないのかという問題に以下の順序で取り組むものである。

- 1) 切断後におこる変化を両生類と比較する。
- 2) なぜ上皮の機能化が起こらないのかについて解析する

3. 研究の方法

実験の詳細は発表論文に記載があるので、ここではあくまで一般的な概要を述べるにとどめる。

(1) ニワトリ胚と肢芽切断

ニワトリは岡山県内の養鶏場から入手。38度でインキュベートし、ハンバーガーハミルトンステージ表に従ってステージングを行った。HH23の段階で胚を一部露出させ、肢芽の切除を行った。肢芽の先端部数百マイクロメートルを切除した。切除後は抗生物質を滴下したのち、再度固定までの間インキュベートする。

(2) 分子生物学的解析法

詳細は発表論文参考の事。主に *in situ* hybridizationとimmunohistochemistryを中心解析を行った。

4. 研究成果

まず、ニワトリの肢芽を切除し、その後どのような変化が起こるのかを観察した。肢芽切断後、傷口はおよそ18時間でおおよそ閉じることが分かった。その際にはF-Actinの集積が移動上皮に観察できることを確認している。これは過去に報告されている事象に矛盾しない結果である(Martin, 1997; Redd et al., 2004)。また、肢芽切断後に多数の細胞死が起こることを予想していたが、これは予想に反して、ほとんど観察されなかった。方は、細胞の増殖に関しては、一時的に大きく減衰するものの、切断後12時間では切断部付近でも活発な細胞増殖が観察できた。遺伝子の発現については様々調べたが、特筆すべきものは背腹軸形成にかかわる因子たちであろう。背腹にかかわる遺伝子としてLmx1b、Wnt-7a、En-1の発現をしらべた。この結果、切除後には傷口が閉じるとはいえ、背腹軸形成にかかわる遺伝子発現は乱れることが明らかになった。背腹の軸形成は、AERの形成に必須と考えられており(Fernandez-Teran and Ros, 2008)、この軸

形成に異常があるということは四肢再生に向けて非常に重要な情報であると考えられる。

次に行ったことはAERの再誘導事件である。AERは両生類四肢再生時になくしてはならないものとして形成されるAECと機能的に等価なものであると感あげられている。また、実のところ、AERを肢芽切除後に「人為的に」切断面に貼り付けた場合、その切断された肢芽は再生にむけた反応を示すことが既に報告されている。ゆえに、切断後にAERを「人為的」ではなく「自然に」形成させることができれば、ニワトリの四肢再生は具体的なものとなるのがわかる。問題はその方法である。私たちの研究で肢芽切断後には18時間という非常に長い時間が傷口の修復に必要であることが分かった。今までの知見などに照らせば、この18時間という時間はAERの再誘導を考える上で、非常に大きな障害であることが容易に予想された。ゆえに、今回は傷口の修復の促進という部分は将来の課題としてとっておき、AERの再誘導にだけ焦点を当てた。実験の詳細は発表論文にある通りであり、ここでその細部まで述べることを避けるが、まず、肢芽に「損傷」を与え、その損傷部に背腹境界面を強制的に形成させる。その形成された背腹境界面に対して、特定因子を効かせることによってAERの再誘導を試みた。AERはWnt2bとFgf10によって誘導できうることを見出した。この異所的に誘導されたAERは機能的かどうかについては残念ながら確実な成果をもって答えることができなかったが、軟骨小片などが付随的に誘導されることから、誘導されたAERは機能まで有することが強く示唆される。

これら一連の研究成果は高等脊椎動物と両生類の四肢再生をつなぐ研究成果として画期的である。国内外にも似た研究は近年では存在していない。また、このような研究の与えるインパクトについては、提案のようなテーマで平成24年度から新学術研究領域が勝ち上がったことから考えてもわかると思う。そのような「ブーム」の火付け役として

の意味も見いだせるかもしれない。

最後に、この研究費は研究のスタートアップのためという側面が強い。したがって、本研究提案は研究自体そのものよりも、いかに研究を円滑にスタートさせることができるかどうかという意味が大きい様に思う。そのような観点から、この研究費の成果を述べれば、この研究費をもとに研究資材の充実を図り、その他の研究につなげる経過を得た。現在、提案者は自身の研究室を立ち上げることに成功しており、その運営も極めて順調である。ゆえに、研究スタートアップ支援という広義での成果は堂々と胸を張れるものであると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 佐藤伸、蒔苗亜紀、和田直之、The Apical ectodermal ridge (AER) can be re-induced by wounding, wnt-2b, and fgf-10 in the chicken limb bud、Developmental Biology、査読有、342(2):157-68, 2010

[学会発表] (計 1 件)

佐藤伸、高等脊椎動物(ニワトリ)における両生類型の再生システム覚醒への挑戦、発生学会秋季シンポジウム、2009/11/28、静岡・三島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 伸 (SATOU AKIRA)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・助教
研究者番号：90512004