

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659080

研究課題名（和文）ツメガエル幼生において未熟な免疫系が標的とする再生芽特異的な分子の同定と解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of blastema-specific molecules that are targeted by immature immune system in *Xenopus* tadpoles

研究代表者

久保 健雄 (KUBO TAKEO)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10201469

研究成果の概要（和文）：我々は、ツメガエル幼生の「再生不応期」では未熟な自己反応性免疫細胞が再生芽細胞を攻撃するため尾が再生しないが、「再生可能期」には制御性T細胞が分化し、再生できることを示唆した。しかしどの免疫細胞が再生芽細胞を「非自己」として攻撃するかは不明である。今回我々は、不応期の尾切断端に浸潤し、再生を阻害する免疫細胞で発現すると考えられる新規遺伝子を同定した。また、この遺伝子は、発生過程でも生存に必須な役割を担うことが分かった。この遺伝子は、再生芽細胞を攻撃する自己反応性免疫細胞のマーカーとして有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）： So far, we suggested that, in the 'refractory period' of the *Xenopus* tadpoles, immature immune cells attack blastema cells of the amputated tails as 'non-self', resulting in failure in tail regeneration, whereas, in the 'regeneration period', regulatory T cells differentiate to reactivate tail regenerative ability. However, what kinds of immune cells target the blastema cells remains unclear. In the present study, we identified a novel gene that is supposed to be expressed in immune cells that invade amputated tail stumps to repress tail regenerative ability. This gene played an essential role in tadpole survival during the developmental stages. This gene will be available as a maker for auto-reactive immune cells that attack tail blastema cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、実験病理学

キーワード：動物、免疫系、再生

1. 研究開始当初の背景

動物の器官再生能の程度は動物種や発生段階により異なる。例えば、プラナリアは体の小さな断片から全身を再生できるし、カニなどの節足動物は肢が再生する。脊椎動物では

魚類（ゼブラフィッシュ）では心臓やヒレが再生する。有尾両生類（イモリ）では四肢や尾が再生するが、無尾両生類（カエル）では幼生（オタマジャクシ）の時期は四肢や尾が再生するが、成体（カエル）になると再生能を失う。一方、ヒトを含めた哺乳類では肝臓

が補償性再生をするが、四肢の再生能は無い。しかしながら、再生能が多様である理由、つまり再生能を規定する要因は明らかではない。

さて、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は幼生期に高い尾の再生能をもつが、発生過程で再生能が一過的に失われる時期 (再生不応期) がある (Slack et al. 2003)。我々はこれまでに不応期と不応期後可能期の尾切断端で発現が異なる遺伝子を differential display 法を用いて網羅的に検索した結果、不応期と可能期の尾切断端では異なる免疫反応が起きていることを見いだした。即ち、不応期では免疫応答は慢性的・持続的に起きるが、可能期では一過的に起きるにすぎない。さらに不応期個体を免疫抑制剤 (FK506 等) 処理することで再生能が顕著に回復することを見いだした (Fukazawa et al., *Development* 2009) (図 1)。

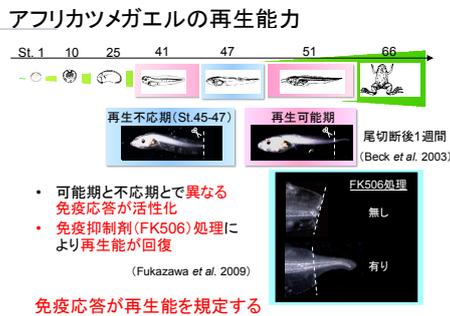


図 1 アフリカツメガエルの発育段階に伴う尾再生能の変化と、「不応期」の尾再生能の免疫抑制剤処理による人為的活性化

このことは、不応期で起きる免疫応答は再生に対し阻害的に働くことを示唆している。一方、不応期後可能期では、様々な免疫応答を阻害する制御性 T 細胞のマーカー遺伝子 *foxp3* の発現を指標に、不応期後可能期では、尾切断端に制御性 T 細胞が浸潤するのにに対し、不応期では尾切断端に制御性 T 細胞はほとんど見られないことを示した。

このことから、尾再生能と免疫応答の間に次のような関連が示唆される。つまり、不応期前可能期では免疫系が未だほとんど発達していないため、再生芽細胞が攻撃されず再生できるのに対し、不応期では未熟な自己反応性免疫細胞が再生芽細胞を「非自己」として攻撃・破壊するため再生できない。一方、不応期後可能期には制御性 T 細胞が分化し、免疫細胞の働きを抑制するため再生できることを示唆した (図 2)。以前から、動物が高等になるほど再生能が低くなる一方で、免疫系は高度になることが知られていたが、その逆相関の理由は不明であった。我々の知見は、この逆相関に初めて実験的根拠を与えると伴に、再生芽細胞が未熟な免疫系の攻撃対象となる

何らかの「非自己マーカー」を発現しているという、新規な可能性を提示した。

切断端再生模式図と仮説

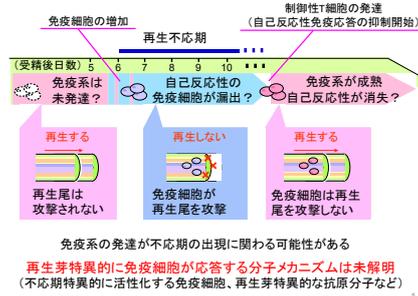


図 2 発育段階の進行と、尾切断端で起きる再生芽細胞に対する免疫応答の模式図

2. 研究の目的

一方で、どのような免疫細胞が再生芽細胞を「非自己」として攻撃するのか、また再生芽細胞が免疫細胞から攻撃される際に標的となる「非自己マーカー」は何かといった点は不明であった。今回、我々はこの点を解明すべく、研究を実施した。

3. 研究の方法

再生に阻害的に働く免疫関連因子を同定する上で、我々は不応期個体を免疫抑制剤 (FK506) 処理すると再生能が回復する事実を利用した。つまり、不応期個体とそれを FK506 で 24 時間処理し、再生能が賦活化された尾切断端で、FK506 処理の有無により発現が異なる遺伝子を differential display 法を用いて網羅的に探索した。これにより再生に阻害的に働く因子を、FK506 処理により発現抑制される因子として検出することが可能である。

一方、FK506 処理の副作用を検出することを避ける目的で、可能期個体を同様に FK506 処理した際にも発現変動する遺伝子は除外した。

4. 研究成果

その結果、不応期で免疫抑制剤処理することで再生可能になった条件で、無処理 (再生しない) の条件と比べ、尾切断端での発現が異なる遺伝子として次の 3 つの遺伝子を得た。クローン#1 はフィタン酸代謝酵素の類似タンパク質をコードする新規遺伝子で、不応期の尾切断後 5~10 時間後をピークとして一過的に発現した。我々のこれまでの解析から、尾切断端に、切断後一過的に発現する遺伝子は、尾切断端に一過的に浸潤する免疫細胞で発現していることが多い。この遺伝子の不応期個体の尾切断端での発現は、FK506 処理で低減することから、クローン#1 は不応期の尾切断端に浸潤し、不応期に再生に阻害的に働く免疫細胞で発現すると考えられた。一方、クロ

ーン#1 は全身では発生段階のうち、不応期にほぼ選択的に発現していた。図 2 に示すように、不応期には自己反応性の免疫細胞が全身に漏出している可能性が高い。従って、この知見もクローン#1 が再生に阻害的に働く免疫細胞に発現していることを支持している。

一方、受精卵にクローン#1 のモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) を注入し、クローン#1 をノックダウンする実験では、MO 注入により発生段階でほとんどの個体が死亡した一方、塩基置換を導入した MO ではそのような効果は見られなかったことから、クローン#1 は発生過程での生存にも必須な役割 (例えば感染防御や、発生過程で生じるアポトーシス細胞の除去等) を演じることも分かった。

クローン#2 の cDNA は顕著な ORF をもたないことから、non-coding RNA として働く可能性がある。クローン#2 の発現も、不応期の尾切断後、5~10 時間をピークとして尾切断端で一過的発現上昇し、その発現は FK506 処理により低減することから、尾切断端で働く免疫系のエフェクター遺伝子と推定された。一方、クローン#1 とは異なり、発生段階では発現変動しないことから、尾切断端に常在する免疫細胞で発現誘導される可能性が考えられた。

クローン#3 は新規な C-タイプレクチンの遺伝子で、尾切断後 48 時間にかけて、再生の有無に関わらず発現上昇した。発生段階では、胚発生期には発現しない一方、不応期には全身で発現誘導された。尾切断端では再生の有無に関わらず組織のリモデリングが起きると予想されること、また先述の通り、不応期では自己反応性免疫細胞が全身に漏出することから、全身で一部細胞のアポトーシスとそれに伴う組織のリモデリングが起きると推定されることから、クローン#3 は発生では働かず、既に形成された組織のリモデリングに働くと考えられた。これら知見は、不応期の再生に阻害的に働く免疫関連因子の実態を解析した世界でも高い独創性と学術的意義をもつ研究成果と考えている。

不応期における尾切断端の再生モデル図

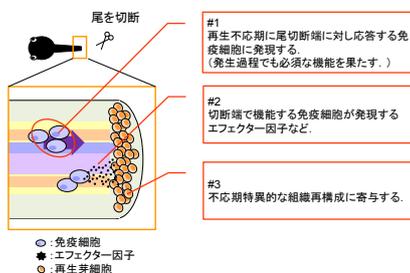


図 3 本研究で同定した 3 つの遺伝子産物の不応期幼生の尾切断端での役割の模式図

本研究成果の中で、特にクローン#1 はこれまで未同定であった、再生芽細胞を「非自己」として攻撃する免疫細胞に固有なマーカーとなる可能性もあり、今後再生に阻害的に働く免疫応答と再生能の関係を、カエルの成体(再生能をもたない)や、哺乳類(やはり再生能をもたない)で検証する上でも有用と期待される。クローン#2 に関しては non-coding RNA としての実体解明が先決である。クローン#3 に関しては、一般に C 型レクチンは組織形成や免疫との関連が示唆されているが、一旦形成された組織のリモデリングに働く例は知られておらず、C 型レクチンの新しい生理機能の発見に繋がる可能性がある。

なお本研究成果の主要な部分に関しては、幾つかの新規なデータを加えた後に論文発表する予定であるが、2010 年には「細胞工学」に、従来の研究生を紹介する和文総説を発表した。また、2011 年 6 月には米国ニューハンプシャー州で開催された Gordon Research Conference ‘Tissue repair & Regeneration’では招待講演として、やはり従来の研究成果を発表したが、世界各国から参加した約 200 名の関連分野の参加者から大変な好評を博した。なお、本研究成果に関しては大学院生の直良悠子さんがポスター発表を行っている。

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) 深澤太郎、直良悠子、國枝武和、久保健雄
「免疫抑制による“再生不応期”のアフリカツメガエル幼生尾の再生能の人為的活性化：脊椎動物の器官再生能の有無を決定する要因を探る」
細胞工学 30, 418-423 (2011)

[学会発表] (計 6 件)

1) Yuko Naora, Taro Fukazawa, Takekazu Kunieda, Takeo Kubo
‘Analysis of the Mechanisms that Determine Tail Regenerative Ability in *Xenopus laevis* Tadpoles’
The 21st CDB Meeting The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting ‘from Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)’
2011 年 11 月 25 日
兵庫県神戸市理研 CDB

2) Yuko Naora, Hiroshi Tsujioka, Taro Fukazawa, Takekazu Kunieda, Takeo Kubo
‘Analysis of the mechanisms that determine tail regenerative ability in *Xenopus laevis* tadpoles’
Gordon Research Conferences, Tissue Repair & Regeneration

June 8th, 2011
New London, New Hampshire, USA

3) Takeo Kubo
'Immunosuppression reactivates tail regeneration during the refractory period'
Gordon Research Conferences, Tissue Repair & Regeneration
June 8th, 2011
New London, New Hampshire, USA

4) 直良悠子、深澤太郎、國枝武和、久保健雄
「アフリカツメガエル幼生尾の再生能を規定する候補遺伝子の同定と解析」
日本動物学会第81回大会 2010年9月24日
東京都目黒区 東京大学

5) Yuko Naora, Kota Kaneko, Yuko Hishida, Taro Fukazawa, Takekazu Kunieda, Takeo Kubo
'Analysis of the mechanisms that determine tail regenerative ability in *Xenopus laevis* tadpoles'
2010 SDB-JSDB Joint Meeting (Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting Jointly with Japanese Society of Developmental Biologists) August 5th-9th, 2010
Albuquerque, New Mexico, USA

6) 直良 悠子, 金子 洸太, 菱田 祐子, 深澤 太郎, 國枝 武和, 久保 健雄
「アフリカツメガエル幼生における尾再生能力規定要因の解析」
第 43 回日本発生生物学会 (APDBN 共催)
2010 年 6 月 20 日、21 日
京都市 国立国際会館

[その他]
ホームページ等
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/saibou/lab.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保 健雄 (KUBO TAKEO)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：10201469

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

國枝 武和 (KUNIEDA TAKEKAZU)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：10463879