

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22124001

研究課題名(和文) 普遍的な再生原理の探求と応用

研究課題名(英文) Regeneration Biology guides real Regenerative Medicine

研究代表者

阿形 清和 (Agata, Kiyokazu)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70167831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 120,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、日本の看板研究の一つであった<再生研究>の成果をもとに、3次元構造をもった指や器官の再生を目指す・新しい再生医療領域の創成をめざした。具体的には、新学術領域研究にふさわしい形で、分子レベルで高い研究成果を出している再生研究者をコアとして、再生できない動物を研究対象に加え、再生できる動物から再生原理を学び、それを再生できない動物に適用することで、再生できなかった構造を再生できるようにすることに成功し(脳を再生できないプラナリアに脳の再生を誘導、四肢関節を再生できないカエルに関節再生を惹起)、基礎研究と再生医療研究とをつなぐ新しい学問潮流を作ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：To gain insights to apply in human regenerative medicine to regenerate tissues/organs, we developed strategies to (1)Understand molecular bases of regeneration in highly regenerative animals such as planarian, cricket and newt. (2)Discover changes in Xenopus tadpole limb regeneration potential during transition from a regeneration-competent to a regeneration-incompetent stage, and provide this information to regeneration-incompetent animals via genetic manipulation to induce regeneration. (3)Establish novel clinical applications to replenish missing tissues/organs by inducing regeneration. We unraveled molecular mechanisms of planarian regeneration, and succeeded in inducing head regeneration from regeneration-incompetent planarians by genetic manipulation. We found a new principle of joint regeneration in newt, and applied it to succeed in evoking joint regeneration from regeneration-incompetent Xenopus. Thus, we opened doors to novel clinical strategies for regenerative medicine.

研究分野：理学

キーワード：再生 再生医療 イモリ カエル プラナリア コオロギ 関節再生

1. 研究開始当初の背景

近年、<再生医療>が隆盛を極め、多額の予算が投じられている。しかし、巨額の予算がついたことによって、失った指をはやす…といった挑戦的な研究から、逆に出口のみつけやすい幹細胞移植へと研究が収束していった。さらに、<再生=応用研究>の図式ができあがったために、日本の看板研究であった<基礎研究としての再生>の予算がどこからも出でこなくなった。しかし、<基礎的な再生研究>は、遺伝子操作の困難だった再生能力の高い動物での遺伝子操作に成功し、世界的にも高い研究成果を蓄積し、飛躍の時を迎えている。そこで、本提案では、新学術領域研究にふさわしい形で、分子レベルで高い研究成果を出している再生研究者をコアとして、再生できない動物を研究対象に加え、基礎研究と再生医療研究をつなぐ新しい学問潮流を作ることを目指す。具体的には、①3次元的な形のある再生を可能にしている分子メカニズムを解明し、②再生できないものがどのステップで止まっているかを明らかにし、その知見を再生できない動物へと展開させ、③それらの成果を受けて3次元構造をもった指や器官の再生を目指す-新しい再生医療の研究領域を作る-の3点を目的として研究を展開した。(2009年の申請時の調書より抜粋)

2. 研究の目的

上述のように、本領域研究の目的は、再生の基礎研究と再生医療をつなぐ新たな研究領域の創出にあった。そのために、総括班では、領域全体の目標を達成するために、①解析ツールの標準化・解析データのデジタル化を支援・推進することによって、異なる動物種間の再生研究からより普遍的な再生原理を抽出できるようにすること、②計画班での交流のみならず、公募班を加えて研究をダイナミックに展開させること、特に、数理モデルとのフィードバックを定期的に行う機会を設定して、理論と実験との両方を先鋭化させていくこと、③<形をつくる>再生研究を幹細胞研究者へと浸透させていく-という3つの明確な使命をもって活動を行った。具体的には、①については、次世代シーケンサーによる発現データのデジタル化・データベース化、再生可能動物のゲノムデータの取得、遺伝子導入ツールをゼノパスで標準化した後に他の動物にも適用していく。②については、数理モデル公募班と実験班との交流会議を開催して、理論とwetな実験とのすり合わせをめざす。③については、再生医療をめざす医学部の若手研究者に再生研究トレーニング・コースを開催して次世代の再生医療研究者を育成するとともに、再生医療関連学会への積極的な参画によって、臓器再生を目指す再生医療へのパラダイムシフトを推進することを具体的な目的とした。

3. 研究の方法

目的①については、次世代シーケンサーを駆使して、イモリ、プラナリア、コオロギのゲノム情報を取得するとともに、各再生系で、再生過程の時系列に応じたトランスクリプトーム解析を行った。また、イモリの実験動物化を図り、イベリアトゲイモリの新規モデル動物化を行った。さらに、ゼノパスで行われたCre-loxP法やIR-LEGO法などのコンディショナル・システムや遺伝子ノックアウト/ノックイン法をイモリへ適用した。②については、理論系と実験系の交流ゼミナールを積極的に開催した。また、新規交流ゼミナールとして両生類を使った遺伝子操作班を組織して、班員間の情報交換の促進を図った。③については、再生医療を志向する若手研究者を対象として再生生物学トレーニングコースを開催するとともに、日本再生医療学会、日本炎症再生医学会へ積極的な参画を行った。

4. 研究成果

上述のように、本領域研究の目的は、再生の基礎研究と再生医療をつなぐ新たな研究領域の創出にあった。そのために、①再生できる生物で再生メカニズムを明らかにし、②再生できない動物と比較し、③再生できない動物に再生能力を惹起する-、ことで再生医療分野へ新たなインパクトを与えることが計画班・公募班としては不可欠であった。総括班の支援を得て、以下のような成果を得た。

①再生可能動物のゲノムデータやトランスクリプトームデータの整備

次世代シーケンサーを用いて、イモリ・プラナリア・コオロギのゲノムデータ、再生過程におけるトランスクリプトームデータを取得し、それらのデータをもとに、遺伝子ノックアウト・イモリやコオロギの作成に成功した。

②班内における情報交換の促進

理論系と実験系の交流促進が行われ、コオロギを用いたRNAiによる実験結果と、Dachsous/Fatを用いた2分子間相互作用仮説にもとづく理論との刷合わせによって、インターカレーションを説明できる数理モデルを提唱することに成功するなどの成果をあげた。

また、両生類を使った研究者が集う交流集会を開催し、林班員を中心としてイベリアトゲイモリを新規モデル動物化すること、ゼノパスで開発されたツールをイベリアトゲイモリへ導入することで、両生類を用いた研究の実験ツールの先鋭化が行われた。

③再生医療分野へインパクトのある成果

上記①、②の支援を受け、プラナリアで100年来謎だった再生メカニズムの謎を解き、その再生原理を誘起することで、再生できないプラナリア(コガタウズムシ)の尾断片から脳を含む頭部を再生させることに成功した。われわれのストラテジーを明解に示す成果として、雑誌 *Nature* に掲載され、トピックスとしてアメリカの *New York Times* 誌にも取り上げられ、再生医療分野において世界的なインパクトを与えることに成功した。さらに、イモリの四肢における関節再生の新たな再生原理の発見によって、関節再生ができないと言われていたカエルから、関節再生を惹起することに成功し、再生医療分野にパラダイムシフトをもたらす成果が得られたことは、総括班としても大きい成果である。

④再生医療分野との積極的な交流

計画班・公募班で再生医療分野にパラダイムシフトをもたらすインパクトのある研究成果を挙げるとともに、総括班では、次の2つを行った。1つは再生医療に興味のある医学系の若手を対象に再生生物学のトレーニングコースを開催した(図1)。



(図1 再生生物学トレーニングコースの案内)

具体的には、イモリなどで心臓や脳の一部を切除する手術をして再生過程を実際に見てもらい、将来の再生医療を実感してもらい、次世代に新たな種を蒔くことを行った。2つめとして、日本再生医療学会や日本炎症再生医療学会などに、戦略的に参画し、3次元構造の再生を目指す再生医療分野の開拓を行った。具体的には、1年目はランチョンセミナーとして、2年目は教育シンポとして、3年目はメイン・シンポとして、少しずつステップアップしながら、3次元構造の再生をめざす企画を行い、再生医療分野に臓器再生を目指す機運を高めていった。

これらの機運については、国際シンポジウムを開催することで、国内のみならず、国外に向けても発信を行った(図2)。



(図2 再生生物学と再生医療を結ぶ2011年の国際シンポジウムの案内)

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125件、うち査読有116件)

① Tsutsumi R., Yamada S. and Agata K. Functional joint regeneration is achieved using reintegration mechanism in *Xenopus laevis* *Regeneration*, 2015, in press 査読有

② Miura S., Takahashi Y., Satoh A., and Endo T. Skeletal callus formation is a nerve-independent regenerative response to limb amputation in mice and *Xenopus*. *Regeneration*. 2015, in press. 査読有

③ Hwang, B., An, Y., Agata, K. and Umesono, Y., 2015, Two distinct roles of the yorkie/yap gene during homeostasis in the planarian *Dugesia japonica*, *Dev Growth Differ*, 57, 3, 209-217, 10.1111/dgd.12195. 査読有

④ Endo, T., Gardiner, D. M., Makanae, A. and Satoh, A., 2015, The accessory limb model: an alternative experimental system of limb regeneration, *Methods Mol Biol*, 1290, 101-113, 10.1007/978-1-4939-2495-0_8. 査読有

⑤ Tsutsumi, R., Inoue, T., Yamada, S. and Agata, K., 2015, Reintegration of the regenerated and the remaining tissues during joint regeneration in the newt *Cynops pyrrhogaster*, *Regeneration*, 2, 1, 26-36, 10.1002/reg2.28. 査読有

⑥Ishimaru, Y., Nakamura, T., Bando, T., Matsuoka, Y., Ohuchi, H., Noji, S. and Mito, T., 2015, Involvement of *dachshund* and *Distal-less* in distal pattern formation of the cricket leg during regeneration, **Sci Rep**, 5, 8387, 10.1038/srep08387. 査読有

⑦ Hayashi, S., Ochi, H., Ogino, H., Kawasumi, A., Kamei, Y., Tamura, K. and Yokoyama, H., 2014, Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration, **Dev Biol**, 396, 1, 31-41, 10.1016/j.ydbio.2014.09.018. 査読有

⑧ Egawa, S., Miura, S., Yokoyama, H., Endo, T. and Tamura, K., 2014, Growth and differentiation of a long bone in limb development, repair and regeneration, **Dev Growth Differ**, 56, 5, 410-424, 10.1111/dgd.12136. 査読有

⑨ Hayashi, T., Sakamoto, K., Sakuma, T., Yokotani, N., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Yamamoto, T. and Takeuchi, T., 2014, Transcription activator-like effector nucleases efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration, **Dev Growth Differ**, 56, 1, 115-121, 10.1111/dgd.12103. 査読有

⑩ Morishita, Y. and Suzuki, T., 2014, Bayesian inference of whole-organ deformation dynamics from limited space-time point data, **J Theor Biol**, 357, 74-85, 10.1016/j.jtbi.2014.04.027. 査読有

⑪ Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu, H., Yamamoto, T., Sakuma, T. and Suzuki, K., 2014, Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9, **Nat Commun**, 5, 5560, 10.1038/ncomms6560. 査読有

⑫ Sato, T., Yamamoto, T. and Sehara-Fujisawa, A., 2014, miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells, **Nat Commun**, 5, 4597, 10.1038/ncomms5597. 査読有

⑬ Mitogawa, K., Hirata, A., Moriyasu, M., Makanae, A., Miura, S., Endo, T. and Sato, A., 2014, Ectopic blastema induction by nerve deviation and skin wounding: a new regeneration model in *Xenopus laevis*, **Regeneration**, 1, 2, 26-36. 査読有

⑭ Yoshida, H., Bando, T., Mito, T., Ohuchi, H. and Noji S. 2014, An extended steepness model for leg-size determination based on Dachshous/Fat trans-dimer system. **Sci. Rep**, 4335. 10.1038/srep04335. 査読有

⑮ Kawasumi, A., Sagawa, N., Hayashi, S., Yokoyama, H. and Tamura, K., 2013, Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals, **Curr Top Microbiol Immunol**, 367, 33-49, 10.1007/82_2012_305. 査読有

⑯ Bando, T., Ishimaru, Y., Kida, T., Hamada, Y., Matsuoka, Y., Nakamura, T., Ohuchi, H., Noji, S. and Mito, T., 2013, Analysis of RNA-Seq data reveals involvement of JAK/STAT signalling during leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus*, **Development**, 140, 5, 959-964, 10.1242/dev.084590. 査読有

⑰ Umesono, Y., Tasaki, J., Nishimura, Y., Hrouda, M., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Nishimura, O., Hosoda, K., Inoue, T. and Agata, K., 2013, The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis, **Nature**, 500, 7460, 73-76, 10.1038/nature12359. 査読有

⑱ Agata, K. and Inoue, T., 2012, Survey of the differences between regenerative and non-regenerative animals, **Dev Growth Differ**, 54, 2, 143-152, 10.1111/j.1440-169X.2011.01323.x. 査読有

⑲ Inoue, T., Inoue, R., Tsutsumi, R., Tada K., Urata, Y., Michibayashi, C., Takemura, S. and Agata K. 2012, Lens regenerates by means of similar processes and timeline in adults and larvae of the newt *Cynops pyrrhogaster*. **Dev. Dyn.** 241, 1575-1583. 10.1002/dvdy.23854. 査読有

⑳ Tasaki, J., Shibata, N., Nishimura, O., Itomi, K., Tabata, Y., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M., Agata, K. and Umesono, Y., 2011, ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration, **Development**, 138, 12, 2417-2427, 10.1242/dev.060764. 査読有

〔学会発表〕(計 306 件)

①阿形清和、三次元構造を作るための座標概念と自己組織化、第 14 回日本再生医療学会総会、2015/3/19~21、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

②Agata K.、What is the difference between regenerative and non-regenerative animals?, SEDB & JSDB Meeting、2014/10/13~15、マドリッド(スペイン)

③梅園良彦、Stem cell differentiation along the anterior-posterior axis during planarian regeneration., 1st Asian Planarian Meeting, 2014/5/8, Robert Black College, 香港大学(香港)

③Hwang, B. and Agata K., Two distinct roles of planarian yorkie-related gene during regeneration and homeostasis.、EMBO Conference The molecular and

cellular basis of regeneration and tissue repair, 2014/9/6~10, Sant Feliu de Guixols (スペイン)

④梅園良彦、林利憲、佐藤伸、「アートな形の再生・エイモリ・ウーパールーパー・プランナリア」、札幌芸術祭、2014/8/16、札幌駅地下B1Fチ・カ・ホ(北海道・札幌市)

⑤阿形清和、三次元構造をもった臓器・器官の再生医療を目指す、第13回日本再生医療学会総会、2014/3/4~6、国立京都国際会館(京都府・京都市)

⑥Agata K, Molecular basis of principles of regeneration: distalization and intercalation 17th International Congress of Developmental Biology, 2013/6/16~20, カンクン(メキシコ)

[図書] (計8件)

① Kondoh, H., and Kuroiwa, A. Edt., Springer, New Principles in Developmental Processes, 2014, 321

② Umesono, Y., Springer, New Principles in Developmental Processes (Chapter 6: Determination of Stem Cell Fate in Planarian Regeneration) 2014, 321(71-84)

③ Satoh A, Springer, New Principles in Developmental Processes (Chapter 15: Limb Regeneration: Reconstitution of Complex Organs Using Specific Tissue Interactions), 2014, 321(197-213)

④ Ochi, H., Kawaguchi, A. and Ogino, H., Springer, New Principles in Developmental Processes (Chapter 21: Differential use of paralogous genes via evolution of cis-regulatory elements for divergent expression specificities), 2014, 321(279-290)

⑤ 越智陽城、新曜社、「変わる」生命誌年号 Vol.73-76 編集 中村桂子(発現調節配列の変化を探る・多様性をつくる鍵はゲノムのどこにある? -)、2014, 271(168-175)

⑥ 林利憲、坂根祐人、竹内隆、鈴木賢二、羊土社、両生類におけるTALENを用いた遺伝子改変: 今すぐ始めるゲノム編集(山本卓編)、2014, 205(180-188)

⑦ Araki, M., Wiley-Blackwell, Xenopus Development, 2014 424(364-367)

⑧ 北田容章、出澤真理、朝倉書店、再生医療叢書 第7巻 神経系(第11章 間葉系幹細胞・Muse細胞を用いた再生医療)、2013, 192(163-187)

[その他]

① ホームページ(以下HP、<http://reg.biol.sci.kyoto-u.ac.jp/repo/reports.html>)を積極的に活用し、班員の研究内容、発表論文やアウトリーチ活動を紹介している。また本研究課題の目的のひとつである「再生研究の新しい学問潮流を生み出す」ためにおこなっている再生動物のトレーニング

プログラムについてもHP上で募集し、コースの様相や内容を報告している。さらにsインターネットを介した研究者と市民の双方向コミュニケーションを充実させるため、サイエンスカフェ(サイバーカフェ)を実施し、会員登録(無料)した視聴者に対してストリーミングを利用して研究の内容について情報を発信し、ソーシャルネットワークを利用して視聴者から意見・疑問などを募り、研究活動へフィードバックさせる計画を進行中である。また研究の内容を不特定の一般市民に広く公開し、市民との直接的な対話を実現する目的で、研究室のfacebookページを開設した(<https://www.facebook.com/J.LegLab>、遠藤班員)。

② 主催シンポジウム

2-1) 国際シンポジウム・ワークショップ

1) 2014年5月(香港大学)、2) 2013年8月(岡山)、3) 2012年3月(徳島大学) 4) 2011年12月(パシフィコ横浜) 5) 2011年12月(京都大学吉田泉殿) 6) 2011年11月(理化学研究所発生再生研究センター) 7) 2011年11月(関西セミナーハウス)

2-2) 国内シンポジウム・ワークショップ

1) 2014年12月(鳥取大学) 2) 2014年8月(北海道大学) 3) 2014年4月(京都大学) 3) 2012年(岡山大学) 4) 2012年4月(岡山大学) 5) 2012年3月(奈良女子大学) 6) 2012年2月(京都大学) 7) 2011年5月(広島大学) 8) 2011年12月(京都大学) 9) 2011年5月(京都大学)

③ アウトリーチ活動

各班員が社会、国民に対するアウトリーチ活動として、積極的に研究活動の内容や成果に関して、テレビや新聞といったマスメディアに対する取材協力や、高校、一般向けの講演をおこなっている。以下に主な活動状況を記載する。

1) 新聞に対する取材協力 9件、2) 雑誌等に対する取材協力 7件、3) テレビ、ラジオへの取材協力、出演 9件、4) 高校や一般向けの講演、実習等 46件(合計71件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿形 清和 (Agata, Kiyokazu)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 70167831

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

野地 澄晴 (Noji, Sumihare)

徳島大学・理事

研究者番号: 40156211

梅園 良彦 (Umesono, Yoshihiko)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号: 20391881

横山 仁 (Yokoyama, Hitoshi)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号：90455816
遠藤 哲也 (Endo, Tetsuya)
愛知学院大学・教養部・准教授
研究者番号：90399816
柴田 典人 (Shibata, Norito)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：60402781