

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 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：22124002

研究課題名(和文)イモリを用いた再生原理の解明

研究課題名(英文)Principles of regeneration in newts

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) 100,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、イモリの四肢再生においても傷上皮が先端部として機能することで、残存部と相互作用して再生芽を形成し残存部と先端部との間の構造を再生するモデルを提唱していたが、今回の関節再生に焦点を当てた研究によって、想定以上に残存部から再生芽(新規再生部)へ強力な働きかけがあることが判明した。残存部からの働きかけによって、(1)残存部の軟骨と再生部の再生軟骨は整合性のある形を形成し、(2)上腕部の筋肉が下腕の再生部の骨と腱を形成することで機能的な関節が形成されることを明らかにした。さらに、カエルでこの原理を適用したところ、関節を再生できないと言われていたカエルに機能的な関節を惹起することに成功した。

研究成果の概要(英文)：When we removed the lower arm of newts at the elbow joint level, we found regeneration of a functional elbow joint within 70 days after amputation, although the size of the regenerating lower arm was still miniature compared to that of the remaining upper arm, suggesting the existence of a reintegration system between regenerating and remaining tissues during regeneration. Based on this finding, we have amputated frog arms at the joint level according to our experiments using newts, and we have succeeded in evoking functional joint regeneration from frog, in which nobody had observed joint regeneration after metamorphosis so far. That is, we have shown a new strategy to induce regeneration ability in "non-regenerative" animals. The remaining joint part in the upper arm may supply cells and produce factors to form a functional elbow joint. This became a landmark work for future regenerative medicine in the field of joint regeneration.

研究分野：発生学

キーワード：再生 イモリ 四肢 関節 再生シグナル トランスジェニック

1. 研究開始当初の背景

動物界全般を見渡した時、高等な動物ほど再生能力が落ちるというより、動物門ごとに再生できるものと再生できないものがあることに気づく(文献⑧参照)。そこで、本研究班では、(1)再生できる動物で再生原理を明らかにし、(2)近縁種で再生できない動物と比較することで再生能力の違いをもたらしているステップを明らかにし、(3)再生できない動物でそのステップを乗り越えることで再生できるようにすることを目標としている。このような背景のもと、本計画班では、終生四肢を再生できるイモリと変態後に四肢を再生できなくなるカエルとの再生能力の違いに着目して研究を展開し、四肢を再生できないカエルで四肢再生をできるようにすることに挑戦した。また、脳の再生能力の違いについても、プラナリア・イモリとカエルとの比較を行った。

2. 研究の目的

本研究は3つの目的で構成されている。すなわち、(1)四肢を再生できるイモリで再生の原理を明らかにする。(2)四肢を再生できないカエルでは再生のどのステップで止まっているかを明らかにする。(3)カエルで止まっているステップを遺伝子操作などで乗り越えることで四肢再生を誘導できるようにする。この3つを具体的な目的として実験を行った。

3. 研究の方法

関節を含む四肢再生の再生原理の研究については、日本産のアカハライモリを用いて行った。四肢再生の比較をしたカエルについてはアフリカツメガエルを主に用いて実験を行った。

また、遺伝子操作についても研究当初においては日本産アカハライモリを野外から採集してきて実験を行ったが(文献⑦参照)、遺伝子操作のための受精卵を一年中コンスタントに得られないことから、公募研究班の林利憲班員(鳥取大・生命)が確立したイベリアトゲイモリの飼育・実験系を導入して、遺伝子導入を行うようにした(文献⑤参照)。

カエルとの遺伝子操作の相互乗り換えについては計画班の横山班員(東北大・生命)/越智班員(山形大・医)とイモリと同じ遺伝子コンストラクトを導入する共同研究を実施することで遂行した。

肘の関節再生についての詳細な解析については、山田博士(京大・医)のご厚意によったEFICSを使わせてもらい、肘の関節構造の三次元構築を行った。

4. 研究成果

○関節再生の原理の解明

四肢再生においても傷上皮が先端部として機能することで、残存部と相互作用して再生芽を形成し、残存部と先端部との間の構造を再生するという〈ディスタリゼーション&インターカレーション〉という再生の普遍モデルが適用されると主張していたが、関節再生でそのモデルの重要性がさらに認識された。すなわち、イモリで関節部位で切断した時、再生芽で形成されたミニチャアの下腕部と元の大きさの残存部の上腕との間に大きさのギャップがありながら、残存部の関節の大きさに合うように再生部の関節の大きさが調整されていることを見出した(図1、文献③)。

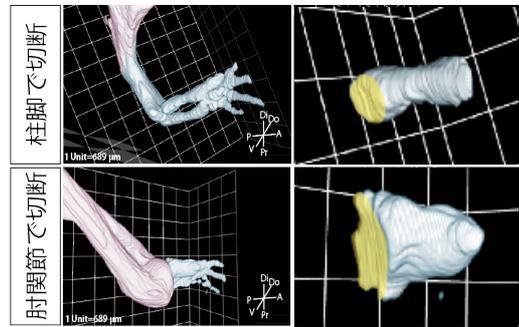


図1 再生部の関節面が異様に大きいことを示す(下段右の拡大図)

今回の肘関節での切断実験によって、想定以上に残存部から新規再生部へ強力な働きかけがあることが判明した。この残存部からの働きかけによって〈残存部と再生部との構造の調和がとられている〉ことが明らかとなった。われわれはこの現象を reintegration mechanism(組織間調和)と命名し、組織間調和によって、(1)残存部の軟骨と再生部の再生軟骨は整合性のある形を形成すること、(2)上腕部の筋肉が下腕の再生部の骨と腱を形成して結合することで機能的な関節が形成されることを明らかにした(図2)。また、この組織間調和は関節再生に局限したのではなく、再生現象で普遍的に起きていることを示唆した。

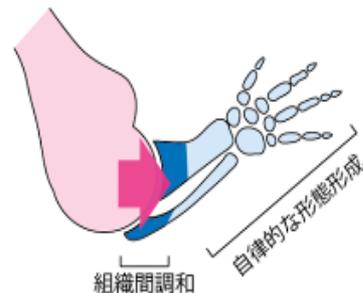


図2 肘関節の再生原理

○関節再生ができないと言われていたカエルで関節再生を引き起こすことに成功

カエルでは四肢の何処で切断しても関節は再生しないと言われてきた。しかし、今回、われわれは、イモリで肘関節部分で切断することで、想定以上に残存部から新規再生部へ強力な働きかけがあることを明らかにした。そこで、変態後のカエルを用いてイモリと同様に肘関節部で切断したところ、カエルにおいても機能的な関節を再生させることに成功した。

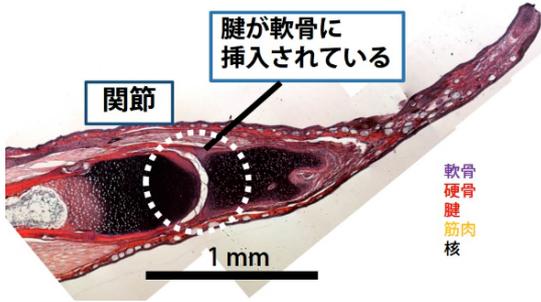


図3 カエルで再生した肘関節

すなわち、(1)イモリで関節の再生の原理を明らかにしたことで(文献③)、(2)カエルでも同様な実験をしてイモリの再生と比較し、(3)カエルで世界で初めて関節の再生を誘導することに成功した(文献①)。この画期的な成果によって、関節の再生できない哺乳類においても関節再生を引き起こすことができる可能性を示唆した。

○四肢再生能力の違いとエピジェネティック・ステータスの比較

イモリでは終生にわたり四肢を再生できるのに対し、カエルでは変態前はイモリ同様に四肢再生能力はあるものの、変態後にはスパイクといわれる軟骨からだけなる突出構造物しか再生できない。これは、カエルでは傷上皮による先端化は起きるものの、Shhの発現がないためにその後のインターカレーションが機能しない結果と考えられている。

そして、この差は、Shh遺伝子の四肢特異的なエンハンサー部位(MFCS1)が変態後にメチル化を受けることで変態後の再生芽での発現が抑制されることが示唆されている(Yakushiji et al., 2007)。そこで、本研究ではイモリにおけるShh遺伝子の四肢特異的なエンハンサー部位(MFCS1)をクローニングし、そのDNAメチル化部位の比較を行った。すると、確かに、MFCS1部位としての配列保存性は高いものの、メチル化候補部位がほとんど保存されていないことが明らかとなった。



図4 イモリとカエルのDNAメチル化部位CpGの比較(上段がイモリ、下段がカエルの配列)

○イモリとカエルのShh遺伝子の四肢特異的なエンハンサー部位(MFCS1)のエンハンサー活性の比較

そこで、イモリとカエルのShh遺伝子の四肢特異的なエンハンサー部位(MFCS1)をGFPのレポーター遺伝子とつないだ発現ベクターを作成し、イモリとカエルに遺伝子導入して、エンハンサー活性の比較を行った。すると、どちらの種のエンハンサーもイモリを宿主とする場合には四肢特異的なエンハンサー活性を示したものの、カエルを宿主とした場合には、イモリのはエンハンサー活性を示さないという予想外の結果を得た。

○四肢再生能力の違いの新たな可能性

われわれは、イモリで遺伝子操作を行う上で従来のアカハライモリから、本総括班によって開発された新規モデル動物、イベリアトゲイモリへ実験動物の転換を図った。そこで、イベリアトゲイモリにおけるMFCS1部位をクローニングして、シークエンスして他のMFCS1と比較したところ、イモリでのみ保存されている新たな保存配列を見出した。その結果、Shh遺伝子の発現の差を生むメカニズムとしては、エピジェネティックな違いと保存配列の違い両方の面から調べる必要が出てきた。その結果、期間内に再生能の違いを生むメカニズムについての結論を導き出すことができなかった。

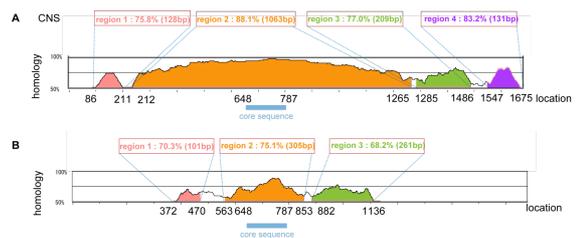


図5 イモリのMFCS1にのみ保存されている配列の発見(上段の右端の紫部分)

○研究成果の総括

カエルの四肢をイモリのエンハンサーに置き換える遺伝子操作でカエルの四肢を再生させることには至らなかったが、(1) 従来関節の再生は無理と考えられてきたカエルで、関節の再生を引き出すことに成功した点、(2) マウスなどの哺乳動物での関節再生を引き出す有力な方法論として再生医療分野にも大きな衝撃を与えた点、は高く評価できる。

○その他

両生類四肢再生過程における遺伝子プロファイリングについても精力的に行い(文献⑥)、EST データをデータベース化した。

再生医療へのインパクトという点において脳の再生は関心も高く、脳の再生の原理についても、プラナリア・イモリを使って精力的に展開した(文献②④)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

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

②Inoue T., Hoshino H., Yamashita T., Shimoyama S. and Agata K. Planarian shows decision-making behavior in response to multiple stimuli by integrative brain function **Zoological Lett**, 査読有, 2015, 1:7
Doi: 10.1186/s40851-014-0010-z

③Tsutsumi R., Inoue T., Yamada S. & Agata K. Reintegration of the regenerated and the remaining tissues during joint regeneration in the newt *Cynops pyrrhogaster* **Regeneration**, 査読有, 2015, 26-36
Doi: 10.1002/reg2.28

④Inoue T., Yamashita T., and Agata K. Thermosensory signaling by TRPM is processed by brain serotonergic neurons to produce planarian thermotaxis **J Neurosci**, 査読有, 34(47) 2014:15701-14
Doi: 10.1523/JNEUROSCI.5379-13.2014

⑤Hayashi T., Sakamoto K., Sakuma T., Yokotani N., Inoue T., Kawaguchi E., Agata K., Yamamoto T., and Takeuchi T. 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, 査読有, 56, 2014, 115-21
Doi: 10.1111/dgd.12103

⑥Kragl M., Roensch K., Nusslein I., Tazaki A., Taniguchi Y., Tarui H., Hayashi T., Agata K., Tanaka M. E. Muscle and connective tissue progenitor populations show distinct *Twist1* and *Twist3* expression profiles during axolotl limb regeneration
Dev. Biol. 査読有, 373, 2013, 196-204
Doi: 10.1016/j.ydbio.2012.10.019. Epub 2012 Oct 24.

⑦Inoue T., Inoue R., Tsutsumi R., Tada K., Urata Y., Michibayashi C., Takemura S., Agata K. Lens regenerates by means of similar processes and timeline in adults and larvae of the newt *Cynops pyrrhogaster*. **Dev. Dyn.** 査読有 241, 2012: 1575-1583
Doi: 10.1002/dvdy.23854. Epub 2012 Sep 4.

⑧Agata K. and Inoue T. Survey of the differences between regenerative and non-regenerative animals **Dev. Growth Differ.** 査読有, 54, 2012, 143-152
Doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01323.x. Epub 2012 Feb 20

[学会発表] (計 32 件)

- ① 井上武、イモリ脳再生過程におけるトランスクリプトーム解析、第14回日本再生医療学会総会、平成27年3月21日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- ② 井上武、断崖絶壁! イベリアトゲイモリのトランスクリプトームとゲノムへの登山開始-今、一合目-、第1回イベリアトゲイモリ研究集会、平成26年12月4日、鳥取大学医学部(鳥取県・米子市)
- ③ 平山実季、Comparative analysis of activity of limb-specific *Shh* enhancer MFCS1 in newts and frogs、第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ④ 前田祐伽、Transcriptome analysis during early stage of brain regeneration in the newt *Pleurodeles waltl*、第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ⑤ 阿形清和、What is the difference

- between regenerative and non-regenerative animals?, SEDB X JSDB Meeting、平成 26 年 10 月 14 日、マドリッド (スペイン)
- ⑥ 阿形清和、再生できる生物から何を学んだのか、第 26 回高遠シンポジウム、平成 26 年 8 月 29 日、高遠さくらホテル (長野県伊那市)
- ⑦ 堤璃水、Analysis of the reintegration of the regenerated and remaining tissues during limb joint regeneration in newts and frogs、第 47 回日本発牛生物学会、平成 26 年 5 月 28-29 日、ウインクあいち (愛知県名古屋市)
- ⑧ 平山実季、Comparative analysis of activity of limb-specific *Shh* enhancer MFCS1 in newts and frogs、第 47 回日本発牛生物学会、平成 26 年 5 月 28-29 日、ウインクあいち (愛知県名古屋市)
- ⑨ 前田祐伽、Transcriptome analysis of regeneration brain in the newt *Pleurodeles waltl*、第 47 回日本発牛生物学会、平成 26 年 5 月 28-29 日、ウインクあいち (愛知県名古屋市)
- ⑩ 浦田悠子、Comprehensive studies on regeneration of the dopaminergic neuron in newts and frogs、第 47 回日本発牛生物学会、平成 26 年 5 月 28-29 日、ウインクあいち (愛知県名古屋市)
- ⑪ 堤璃水、Analysis of the Harmonization between the Regenerated Tissues and the Remaining Tissues during Newt Limb Joint Regeneration、第 12 回 CDB シンポジウム、平成 26 年 3 月 10-12 日、理化学研究所 (兵庫県神戸市)
- ⑫ 武村翔太、アカハライモリの前肢再生過程における遺伝子発現の変化についての解析、第 36 回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑬ 浦田悠子、Comparative studies on ependymal cells in the dopaminergic neuron regeneration in a newt, *Cynops pyrrhogaster* and a frog, *Xenopus tropicalis*、第 36 回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑭ 堤璃水、イモリ四肢関節構造を再生するメカニズムの解析、第 36 回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑮ 山下航、Characterization of the lineage of neural stem cells in newts
- 第 36 回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑯ 井上武、Restoration of the brain function during brain regeneration in planarian and newt、第 17 回国際発牛生物学会、平成 25 年 6 月 17 日、カンクン (メキシコ)
- ⑰ 阿形清和、Molecular basis of principles of regeneration : distalization and intercalation、第 17 回国際発牛生物学会、平成 25 年 6 月 16 日、カンクン (メキシコ)
- ⑱ 堤璃水、The analysis on pattern formation of the joint during newt limb regeneration、日本発牛生物学会第 46 回大会、平成 25 年 5 月 29-31 日、くにびきメッセ (島根県松江市)
- ⑲ 武村翔太、Comprehensive Analysis of Time-course of Gene Expression Pattern during Forelimb Regeneration in Newt *Cynops pyrrhogaster*、日本発牛生物学会第 46 回大会、平成 25 年 5 月 29-31 日、くにびきメッセ (島根県松江市)
- ⑳ 浦田悠子、Studies on regeneration of the dopaminergic neuron in newts, *Cynops pyrrhogaster*、日本発牛生物学会第 46 回大会、平成 25 年 5 月 29-31 日、くにびきメッセ (島根県松江市)
- 21 山下航、In vitro analysis of the neural stem cells in newt *Cynops pyrrhogaster*、日本発牛生物学会第 46 回大会、平成 25 年 5 月 29-31 日、くにびきメッセ (島根県松江市)
- 22 阿形清和、EvoDevo and Regeneration、INTERNATIONAL SYMPOSIUM "EVOLUTIONARY SYSTEMS BIOLOGY"、平成 25 年 4 月 14 日、ハイデルベルク (ドイツ)
- 23 井上武、脳を再生できる動物から脳再生のメカニズムを探る、第 12 回日本再生医療学会総会、平成 25 年 3 月 22 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 24 井上武、脳を再生できるプラナリア・イモリに学ぶ脳再生のメカニズム、第 12 回日本再生医療学会総会、平成 25 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 25 道林千晶、イモリ中脳再生の初期過程における組織学的・分子学的解析、第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24 年 12 月 11 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

- 26 浦田悠子、Transgenic analysis of mesencephalic dopaminergic neuron regeneration in a newt, *Cynops pyrrhogaster*, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology、平成 24 年 5 月 31 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- 27 阿形清和、脳再生機構解明のためのノックアウトイモリの未来、第 1 回ゲノム編集研究会、平成 24 年 2 月 28 日、広島大学(広島県東広島市)
- 28 堤璃水、Studies on ERK signaling activity during regeneration in newts、第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 29 阿形清和、How to Convert Non-regenerative Animals to Regenerative Ones?, The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting from Regeneration Biology to Regenerative Medicine(I)、平成 23 年 11 月 25 日、理化学研究所(兵庫県神戸市)
- 30 堤璃水、Analysis of ERK Signaling during Lens Regeneration in Newts, The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting from Regeneration Biology to Regenerative Medicine(I)、平成 23 年 11 月 24 日、理化学研究所(兵庫県神戸市)
- 31 井上武、Development of a Strategies for Future Brain Therapy: Lessons from Planarian and Newt Brain, The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting from Regeneration Biology to Regenerative Medicine(I)、平成 23 年 11 月 24 日、理化学研究所(兵庫県神戸市)
- 32 堤璃水、The analysis of signaling activities during regeneration in newt using a transgenic technique、EMBO Conference Series 3rd in a series <Molecular and cellular basis of regeneration & tissue repair、平成 22 年 9 月 29 日、セジンプラ(ポルトガル)

[その他]
ホームページ等

<http://reg.biol.sci.kyoto-u.ac.jp>

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

井上 武 (INOUE, Takeshi)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：40391867