

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06897

研究課題名(和文) 器官再生において再生芽細胞への脱分化を誘導するエピジェネティックな機構

研究課題名(英文) Epigenetic regulation for blastema formation during leg regeneration in the cricket

研究代表者

板東 哲哉 (Bando, Tetsuya)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：60423422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：フタホシコオロギの脚を切断すると再生芽が形成され、失われた組織は再生芽細胞から再構築される。再生芽細胞は、エピジェネティックな遺伝子発現の変化により分化細胞が脱分化したものと考えられており、増殖能と多分化能を有する。ヒストンH3K27メチル化を制御するE(z)とUtxは再生芽形成に関与しなかった。一方、ヒストンH3K9アセチル化は傷口周辺に遊走してきたマクロファージによって促進され、器官再生と関連することが示唆された。マクロファージによる器官再生の促進には自然免疫経路やROSの活性化が必要であった。

研究成果の概要(英文)：When we amputate a leg of the two-spotted cricket, cricket regenerates lost part of leg from blastema cells, which are multipotent-proliferating cells. Blastema cells are thought as dedifferentiated cells from differentiated cells mediated by epigenetic changes of gene expression, however, detail mechanism of the epigenetic regulation during blastema formation is unclear. E(z) and Utx methyltransferases and demethylates at histone H3K27. These enzymes regulated repatterning process but did not regulate dedifferentiation process. We found that macrophages were essential for leg regeneration in the cricket via the activation of Jak/STAT and TLR signaling pathways. In the macrophage-depleted regenerating leg, histone H3K9 acetylation was decreased, maybe via ROS production by Crq/CD36 and NADPH oxidase. Cbp and Rpd3, which encode histone acetyltransferase and histone deacetylase, respectively, were needed for leg regeneration.

研究分野：再生生物学

キーワード：器官再生 再生芽 脱分化 ヒストンH3K27 ヒストンH3K9 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

失われた手足などの器官を再生することは人類の長年の夢であるが、ヒトの再生能は乏しく実現できていない。しかしながら器官再生は昆虫、魚類、両生類など幅広い多数の生物種で観察される現象であり、器官再生を制御する分子メカニズムは生物種を超えて保存されていると考えられている。器官の一部が失われると、修復された傷口付近に再生芽が形成される。再生芽は、分化細胞が脱分化した再生芽細胞から形成され、幹細胞と同様に増殖能と多分化能を持つ。増殖した再生芽細胞は既存の器官の位置情報に基づいてさまざまな組織へと再分化して失われた器官が再構築される。再生生物学において最も解明すべき疑問は『再生芽細胞の形成を制御する分子メカニズム』である。これまでの研究から、器官の一部を切除すると、分化した細胞が脱分化を起こして再生芽細胞を形成することが明らかにされている。分化細胞の脱分化は遺伝子発現のエピジェネティックな変化により引き起こされると考えられているが、その分子メカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)の脚を切断すると、脚の先端部に再生芽が形成され、再生芽細胞から失われた部分のみが再生される。フタホシコオロギは再生生物学の新規モデル動物であり、古典的な移植実験のみならず、RNA 干渉法(RNAi)やゲノム編集を応用可能であり、器官再生を遺伝子レベルで解析できる(Mito et al., 2002, Mito and Noji, 2008, Nakamura et al., 2008)。再生芽形成過程において、分化細胞は再生芽細胞へと脱分化し、再生芽細胞は分化細胞へと再分化する。これら脱分化・再分化の過程を調節するエピジェネティック制御の解明を目的とした。器官再生はさまざまな生物において観察される現象であり、その分子基盤は普遍的と考えているため、進化的に保存された遺伝子を標的とした。

3. 研究の方法

3.1 コオロギ脚再生過程におけるヒストン H3K27 メチル化の機能解析の方法

フタホシコオロギ 6 齢幼虫の脚切断後 0 時間と 24 時間、またフタホシコオロギ成虫の脚切断後 0 時間と 3 時間からそれぞれ RNA を抽出し、RNA-seq を行って発現比較を行ったデータから、再生過程で発現が変化するエピジェネティック因子を見出ししていた。それらエピジェネティック因子のうち、ヒストン H3K27 のメチル化にはたらく *E(z)* (*Enhancer of zeste*) と *Utx* (*Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome*) をクローニングし、RNAi を行って表現型の解

析や抗体染色によるヒストンメチル化の解析を行った。またフタホシコオロギと近縁種であるタンボコオロギからも *E(z)* と *Utx* をクローニングし、RNAi を行って再生脚の形態を解析した。

3.2 コオロギの概日行動におけるヒストン H3K27 メチル化の機能解析の方法

フタホシコオロギに対して *E(z)*(RNAi) を行ったオス成虫個体について行動解析を行った。

3.3 再生不全コオロギの作出

再生芽形成過程において、脱分化にはたらくエピジェネティック修飾を解明する目的で、再生芽形成不全コオロギの作出を試みた。近年、アホロートル、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルやマウスを用いた再生研究から、マクロファージが再生に必須であることが分かってきた(Godwin et al., 2013, Petrie et al., 2014, Miura et al., 2015)。フタホシコオロギに対し、クロドロン酸を内包するリポソームを投与して、マクロファージ枯渇個体の作出を試みた。

さらに、マクロファージ枯渇による表現型の原因遺伝子を探るため、マクロファージ枯渇個体において遺伝子発現の変化やエピジェネティックな修飾の変化を定量 PCR(qPCR) や免疫染色を行って解析し、原因遺伝子候補に対する RNAi を行って表現型の解析を進めた。

4. 研究成果

4.1 フタホシコオロギ脚再生におけるヒストン H3K27 メチル化の役割

これまでに我々が行ったフタホシコオロギ再生脚の比較 RNA-seq 解析から、ヒストン H3K27 をメチル化する *E(z)* やメチル化ヒストン H3K27 を脱メチル化する *Utx* の発現が再生の初期に増加することが分かっている。そこでフタホシコオロギの *E(z)* と *Utx* をクローニングし、再生過程における機能解析を行った。

E(z)(RNAi) 個体の後脚を脛節で切断すると、失われた部分が再生したが、過剰な脛節が形成されていた。*Utx*(RNAi) 個体では、脛節の棘の再生と附節の関節の形成が異常になった。これらの表現型は、*E(z)*(RNAi) による脛節形成遺伝子 *dachshund* (*dac*) の異所的発現と、*Utx*(RNAi) による関節形成遺伝子 *Epidermal growth factor receptor* (*Egfr*) の発現抑制が原因であった。

脚パターン遺伝子 *dac* や *Egfr* は、主に遠近軸方向のパターン形成にはたらく遺伝子である。そこで *E(z)*(RNAi) 個体の脚を移植して過剰肢形成を誘導した。左側の脚を右側の脚の同じ位置に移植すると、前後軸に沿った位置情報の不連続が生じて、脚の前後に過剰肢が形成される。*E(z)*(RNAi) 個体でもコントロール個体と同様に過剰肢が形成されたことから、*E(z)* は遠近軸方向のパターン形成を制御するが前後軸方向のパターン形成は制

御しないことがわかった。

また *E(z)*(RNAi)や *Utx*(RNAi)を行った数日後に脚を切断した場合でも表現型は変化せず、再生脚の形態異常の表現型が観察されるのみであり、再生不全の表現型を示すことはなかった。すなわち、コオロギ脚再生において *E(z)*と *Utx* は、再パターン形成過程で脚パターン形成遺伝子の発現を制御することで再分化を制御すること、再生芽形成には関与しないこと、がわかった。

フタホシコオロギと近縁種であるタンボコオロギから *E(z)*と *Utx*ホモログをクローニングして RNAi を行ったところ、フタホシコオロギと同様の表現型が見られたことから、脚再生過程における *E(z)*と *Utx*の役割は保存されていると示唆された。これらの成果は雑誌論文 7,6,1 として発表し、その他 1~7 のような反響があった。

4.2 フタホシコオロギの概日行動におけるヒストン H3K27 メチル化の役割

昆虫において *E(z)*はヒストン H3K27 をメチル化する唯一の酵素をコードしている。メチル化ヒストン H3K27 は抑制的な修飾であるため、ヘテロクロマチン化が促進されて近傍遺伝子の発現はオフになる。このようなエピジェネティックな変化は、日長に応じた概日リズムの制御にも関わると考え、*E(z)*(RNAi)個体の概日リズムの解析を行ったところ、日長の変化に対する応答が異常になることが分かった。これらの成果は雑誌論文 5 として発表した。

4.3 再生芽形成を誘導するシグナル経路の同定

ヒストン H3K27 のメチル化が脱分化に関与せず再分化にのみはたらくことが分かったため、別のアプローチから脱分化過程におけるエピジェネティックな制御の解析を進めた。

近年、アホロートルなどの再生可能動物を使った再生研究から、マクロファージが再生開始に必須であることが報告されている。そこでフタホシコオロギの再生におけるマクロファージの重要性を解析し、マクロファージを枯渇させた個体が再生不全を示す場合は、その個体におけるエピジェネティックな変化を解明することを目的とし実験系の確立を目指した。

4.3.1 コオロギのマクロファージの可視化

昆虫は開放血管系であるため赤血球が存在せず、体液中に含まれる細胞成分は白血球系の細胞のみである。コオロギの腹腔に墨汁を注入し、体液を塗沫標本にしてギムザ染色すると、墨汁を貪食したプラズマ細胞（昆虫マクロファージ）が観察された。これらのマクロファージは蛍光物質で標識したリポソームの投与により可視化することができた。

再生過程におけるマクロファージの分布

を経時的に調べたところ、脚切断直後にはマクロファージはほとんど見つからないが、脚切断後 2 日目には再生脚の中に多くのマクロファージが見つかり、とくに再生芽付近に集まっている様子が観察された。

4.3.2 コオロギのマクロファージへのドラッグデリバリー

クロドロン酸は ATP アナログとしてはたらく、クロドロン酸を取り込んだ細胞は ATP を代謝できなくなるため細胞死を起こす。クロドロン酸内包リポソーム (Clo-lipo) を投与したコオロギは、コントロールリポソーム (PBS-lipo) を投与したコオロギよりもマクロファージの細胞数が減少しており、マクロファージの細胞膜に局在しマーカー遺伝子の 1 つとして知られている *croquemort* (*crg*) 遺伝子の発現も低下していた。Clo-lipo 投与個体の脚を切断すると、再生芽が形成されず、ほとんどの個体が再生不全の表現型を示した。Clo-lipo 投与個体の再生脚では、EdU で標識される S 期の細胞や、抗リン酸化ヒストン H3S10 抗体で標識される M 期の細胞がほとんど検出されなかった。PBS-lipo や Clo-lipo を投与した再生脚から RNA を抽出し、qPCR を行って発現比較をしたところ、Clo-lipo 投与個体では細胞増殖に必須なサイクリン E やサイクリン B の発現が低下していた。

4.3.3 マクロファージではたらくシグナル経路の同定

マクロファージ枯渇による再生不全の原因となるシグナル経路を同定するため、比較 RNA-seq 解析結果の見直しを行い、自然免疫に関わる Jak/STAT シグナル因子群と TLR シグナル因子群の発現が再生初期に上昇していることを見出した。Jak/STAT シグナルは再生に必須なシグナル経路である (Bando et al., 2013)。マクロファージ枯渇個体において Jak/STAT シグナル因子であるサイトカイン *upd*、インターロイキン受容体 *dome*、ヤヌスキナーゼ *hop*、転写因子 *Stat* の発現が低下していた。

TLR シグナルは感染性微生物やアポトーシスまたはネクローシスした細胞由来のデブリなどを認識し、抗菌物質などの発現を促して生体防御にはたらくシグナル経路であり、昆虫では胚発生期の背腹軸の決定にもはたらくことが知られている。フタホシコオロギのドラフトゲノムを解析したところ、TLR をコードする *toll* 様受容体遺伝子は 11 遺伝子、TLR のリガンドとしてはたらく *spz* は 2 遺伝子、シグナル伝達にはたらく *tube*, *pelle*, *MyD88*, *TRAF6* はそれぞれ 1 遺伝子ずつ、NFκB 転写因子をコードする *dorsal*, *Dif*, *Relish* は 1 遺伝子ずつ見出された。マクロファージ枯渇個体では、2 遺伝子の *spz* や TLR をコードする 11 遺伝子のうち 5 遺伝子の発現が半減していた。

TLR シグナル因子をクローニングし、それ

ぞれの遺伝子に対して RNAi を行ったところ、TLR のいくつかの遺伝子や MyD88 に対して RNAi を行ったコオロギは再生不全や再生能の低下の表現型を示した。これら RNAi 個体の再生脚では、S 期や M 期の細胞が減少し、サイクリン E やサイクリン B の発現が低下していた。

以上の結果から、マクロファージは自然免疫にはたらく TLR シグナルや Jak/STAT シグナルを介して再生芽の形成を促し、再生に寄与することが分かった。

4.4.1 再生芽形成と関連するエピジェネティック修飾

マクロファージを枯渇させると Jak/STAT シグナル因子や TLR シグナル因子の発現が低下して再生芽が形成されなかったことから、傷口付近に遊走したマクロファージが、何らかの因子を介して Jak/STAT シグナルや TLR シグナルを活性化し、分化細胞のエピジェネティック修飾を変化させることで脱分化を促進して再生芽細胞へと脱分化させると考えられた。そこでマクロファージ枯渇個体の再生脚におけるエピジェネティック修飾の変化を、抗体染色を行って可視化した。

4.4.1 マクロファージ枯渇によるエピジェネティック修飾の変化

コントロール個体とマクロファージ枯渇個体の再生脚において、トリメチル化ヒストン H3K27 とアセチル化ヒストン H3K9 の局在について調べたところ、トリメチル化ヒストン H3K27 はコントロール個体の再生脚とマクロファージ枯渇個体の再生脚で変化はなかった。この結果は、ヒストン H3K27 メチル化を制御する E(z) と Utx は再生芽形成に関わらなかった結果とも一致する。一方、アセチル化ヒストン H3K9 はマクロファージ枯渇個体の再生脚で低下していた。近年、オタマジャクシ尾部再生を実験系とした研究から、切断により傷害された細胞に由来する ROS がヒストン H3K9 のアセチル化を促すことが報告されている (Suzuki et al., 2015)。

4.4.2 器官再生におけるヒストンアセチル化の役割

マクロファージ枯渇個体の再生脚ではヒストン H3K9 アセチル化が低下し、再生芽形成が起こらず再生不全を示すことが分かった。そこで器官再生におけるヒストンのアセチル化の役割を調べる目的で、ヒストンアセチル基転移酵素 Cbp とヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 について RNAi を行って再生過程の変化を解析した。

Cbp(RNAi) 個体の再生脚は、附節の先端部が再生せず、再生能が低下する表現型を示した。Rpd3(RNAi) 個体の再生脚は、附節が折れ曲がって再生し、再生した脛節の先端の形態も異常であったことから、再生能が低下する表現型であった。Cbp(RNAi) や Rpd3(RNAi) の

表現型から、再生芽の低形成や再パターンニング異常によって表現型が引き起こされたと考えられた。

4.5 器官再生においてヒストンアセチル化を促す因子の同定

マクロファージ枯渇個体の再生脚でヒストン H3K9 のアセチル化が低下していたことから、ヒストン H3K9 アセチル化によってユークロマチン化が誘導されて発現がオンになる遺伝子が再生芽形成を促進すると考えられる。

昆虫マクロファージのマーカーとして知られている *crq* は CD36 ホモログをコードし、酸化コレステロールや細胞由来のデブリを認識するスカベンジャー受容体として機能する。CD36 は TLR と協調的にはたらく、また CD36 の下流では ROS 産生に関わる NADPH オキシダーゼがはたらいている。フタホシコオロギ *crq* ホモログをクローニングし RNAi を行ったところ、*crq*(RNAi) 個体は再生不全や再生能の低下を示した。また NADPH オキシダーゼをコードする *Duox* に対して対しても RNAi を行ったところ、*Duox*(RNAi) 個体は再生不全を示した。

4.6 まとめ

コオロギ脚再生において、ヒストン H3K27 メチル化を介したエピジェネティック制御は再生芽形成に必要なではなかった。一方でマクロファージによって活性化される Jak/STAT シグナルや TLR シグナルは再生芽形成に必須であり、ヒストン H3K9 アセチル化を介したエピジェネティック制御が脱分化を促していると考えられる。TLR シグナルと協調してはたらく Crq/CD36 による NADPH オキシダーゼを介した ROS 産生がヒストン H3K9 アセチル化の促進に関与していると示唆された。

Jak/STAT シグナルにおいてはたらく転写因子 STAT や TLR シグナルにおいてはたらく転写因子 Dorsal/Dif がエピジェネティック因子と協調的にはたらくことでヒストン H3K9 アセチル化が変化する可能性が考えられる。今後はこれらの因子の関連を明らかにしていきたい。

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7件)

1. Bando T, Mito T, Hamada Y, Ishimaru Y, Noji S Ohuchi H. Molecular mechanisms of limb regeneration: Insights from regenerating legs of the cricket *Gryllus bimaculatus*. The International Journal of Developmental Biology. 2018 (in press)

- (査読有り)
- Nose M, Tokuoka A, Bando T, Tomioka K. *timeless2* plays an important role in reproduction and circadian rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J Insect Physiol.* 2018 Feb - Mar;105:9-17. doi: 10.1016/j.jinsphys.2017.12.007. (査読有り)
 - Kutaragi Y, Miki T, Bando T, Tomioka K. Transcriptional and nontranscriptional events are involved in photic entrainment of the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Physiological Entomology.* 2016 December; 41(4):358-68. (査読有り)
 - Ishimaru Y, Tomonari S, Matsuoka Y, Watanabe T, Miyawaki K, Bando T, Tomioka K, Ohuchi H, Noji S, Mito T. TGF- signaling in insects regulates metamorphosis via juvenile hormone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 May 17;113(20):5634-9. (査読有り)
 - Hamada Y, Tokuoka A, Bando T, Ohuchi H, Tomioka K. *Enhancer of zeste* plays an important role in photoperiodic modulation of locomotor rhythm in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Lett.* 2016 Mar 19;2:5. <https://doi.org/10.1186/s40851-016-0042-7> (査読有り)
 - 板東哲哉, 濱田良真, 奥村美紗, 坂東優希, 大内淑代 昆虫に学ぶ器官再生 ケミカルタイムズ 2016 Jul; 241:2-6. (査読有り)
 - Hamada Y, Bando T, Nakamura T, Ishimaru Y, Mito T, Noji S, Tomioka K, Ohuchi H. Leg regeneration is epigenetically regulated by histone H3K27 methylation in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development.* 2015 Sep 1;142(17):2916-27. (査読有り)

〔学会発表〕(計8件)

- 板東哲哉, 奥村美紗, 濱田良真, 大内淑代 再生モデル昆虫では Toll 様受容体が器官再生を促進する 第 123 回日本解剖学会 総会・全国学術集会 2017/3/28-2017/3/30 東京都武蔵野市
- Tetsuya Bando, Misa Okumura, Yuki Bando, Mayuko Hagiwara, Yoshimasa Hamada, Hideyo Ohuchi Innate immunity signalings promote tissue regeneration in the cricket. *ConBio2017*(第 38 回日本分子生物学会年会合同学会) 2017/12/6-2017/12/9 兵庫県神戸市
- 板東哲哉, 奥村美紗, 濱田良真, 大内淑

- 代 再生モデル昆虫におけるマクロファージを介した再生開始メカニズム 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017/3/28-2017/3/30 長崎県長崎市
- 奥村美紗, 板東哲哉, 濱田良真, 大内淑代 フタホシコオロギ脚再生におけるマクロファージを中心とした炎症反応の役割 第 2 回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会 2016/8/21-2016/8/22 愛知県岡崎市
 - Tetsuya Bando, Misa Okumura, Yoshimasa Hamada, Yuki Bando, Hideyo Ohuchi Molecular link between innate immunity and tissue regeneration. *Cricket Meeting 2016/5/28 徳島県徳島市*
 - 板東哲哉, 濱田良真, 奥村美紗, 野地澄晴, 大内淑代 再生モデル昆虫における器官再生のメカニズム 第 121 回日本解剖学会 総会・全国学術集会 2016/3/27-2016/3/30 福島県郡山市
 - 板東哲哉, 濱田良真, 三戸太郎, 野地澄晴, 大内淑代 Angiomotin regulates cell proliferation cooperatively with Expanded and Merlin during cricket leg regeneration. *BMB2015*(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会) 2015/12/1-2015/12/4 兵庫県神戸市
 - 板東哲哉 再生モデル昆虫コオロギに学ぶ器官再生のメカニズム 再生生物学シンポジウム『次世代型器官再生生物学の発展』 2015/8/5 岡山県岡山市

〔図書〕(計2件)

- Bando T, Hamada Y, Noji S. *Leg formation and regeneration. Springer, The Cricket as a Model Organism Development, Regeneration, and Behavior, 2017, 31-48*
- Ohuchi H, Bando T, Mito T, Noji S. *Eye development and photoreception of a hemimetabolous insect, Gryllus bimaculatus. Springer, The Cricket as a Model Organism Development, Regeneration, and Behavior, 2017, 39-62*

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

- A day in the life of cricket lab 2016/7/14 <http://thenode.biologists.com/day-life-cricket-lab/lablife/>
- 切断されたコオロギの脚が再生される仕組みを解明 子供の科学 2015年12月号 p. 12
- Okayama University Medical Research

- Updates (OU-MRU) Vol.16 2015/10/30
http://www.okayama-u.ac.jp/up_load_files/ebulletin-RUs/pdf/Vol16.pdf
4. Cricket leg regeneration: histone modification matters 2015/10/22
<http://thenode.biologists.com/cricket-leg-regeneration-histone-modification-matters/research/>
 5. 切断されたコオロギの脚が再生するメカニズムを解明 岡山大・濱田良真氏ら 財経新聞 2015/9/26
<https://www.zaikei.co.jp/article/20150926/270491.html>
 6. 岡山大、コオロギの脚が切断されても元通りに再生する仕組みを解明 マイナビニュース 2015/9/17
<https://news.mynavi.jp/article/20150917-a349/>
 7. 岡山大学プレスリリース コオロギの脚が元の形に再生する仕組みを解明 2015/9/17
http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id333.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板東 哲哉 (BANDO TETSUYA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：60423422

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

三戸 太郎 (MITO TARO)
徳島大学・生物資源産業学部・准教授
研究者番号：80322254

(4) 研究協力者

なし