

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06376

研究課題名（和文）再生原理の理解にもとづいて四肢再生を惹起する

研究課題名（英文）Evoking regenerative ability based on the principle of regeneration

研究代表者

阿形 清和（Agata, Kiyokazu）

基礎生物学研究所・ 所長

研究者番号：70167831

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 136,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、イモリで理解された四肢の『再生原理』（2つのステップ：＜先端化＞と＜間を作る＞）によると、カエルでは＜先端化＞は行われるが＜間を作る＞ステップが止まっている、マウスでは2つのステップとも止まっていると考えられた。そこで、カエルで＜間を作る＞ことを引き起こして四肢再生を惹起する、マウスで＜先端化＞を引き起こしてカエル状態まで持ち込むことを研究の目的とした。その結果、マウスで＜先端化＞を引き起こすことで、カエル同様に関節の再生を惹起することに成功した!! しかし、カエルでゲノム編集によって＜間を作る＞ステップを誘発して完全な四肢再生を惹起するまでには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療の提唱者として知られる本研究代表者が、iPS細胞を用いた再生医療ではなく、再生できる生き物から『再生の原理』を学ぶことで、再生できない生き物を再生できるようにすることを目標に研究を展開してきた。今回は、マウスで＜先端化＞を引き起こすことで関節再生を惹起させることに成功したことの社会的インパクトは高く、新たな再生医療へ向けて大きな前進となった。

研究成果の概要（英文）：Newt can regenerate complete limb structures after amputation including functional joint regeneration. Newt limb regeneration is achieved by two steps, distalization and intercalation. We are trying to induce limb-regeneration ability in frogs and mice. In the case of frogs, they lose the capability to achieve complete limb regeneration after metamorphosis due to the loss of MFCS1 activity after metamorphosis, although distalization is induced. When we compared the MFCS1 sequences between newts and frogs, newts were found to possess several specific sequences. Thus, we subsequently swapped the MFCS1 sequences between newts and frogs using CRISPR/Cas9 technology to evoke limb regeneration in frogs. Although we have not yet succeeded in swapping the MFCS1 sequences, we have succeeded in evoking joint regeneration in mice by artificially inducing distalization.

研究分野：再生生物学

キーワード：四肢再生 関節再生 イモリ カエル マウス ディスリゼーション インターカレーション 再生医療

様 式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

本研究の代表者は、(1)いろいろな再生現象の分子・細胞レベルでの研究から、再生の普遍的な原理を明らかにし、(2)動物によって再生能力の差があるのは進化の過程における環境適応の結果と考え、(3)環境適応の結果として失った再生能力を再生段階の止まった段階を克服することで惹起することに挑戦している。本研究では四肢再生に焦点を当て、再生の普遍原理<先端化>と<インターカレーション>という 2 つの段階について、四肢再生能の違いを考察した。イモリは変態後も四肢再生能力を維持するのに対し、カエルは変態後に四肢再生能力を失いスパイク状の構造しか再生できない。これは再生の第一段階の<先端化>は行われるが、第二段階の<インターカレーション>が遂行されないためと考えられた。すなわち FGF シグナルは機能するものの、FGF シグナルとポジティブ・フィードバック・ループを作るための Shh シグナルが機能しないためと考えられた。また、マウスでは、第二段階のみならず、第一段階の FGF による<先端化>が遂行されず、第二段階に入ることすらできずに四肢の再生能を完全に失ったと考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、(1)マウスについては、再生の第一段階である<先端化>を FGF 刺激で引き起こすことで関節再生を惹起すること、(2)カエルについては再生の第二段階<インターカレーション>をゲノム編集によって引き起こすことで、カエルを変態後も Shh シグナルを活性化させて完全な四肢再生を惹起することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスについては、<先端化>の重要因子と考えられる FGF を指の第二関節で切断後に投与することで、先端化を引き起こし、関節の再生を惹起することを行った。さらに、必要に応じて、イモリやカエルとは異なる点を探し出し、マウスでもイモリやカエルと同様に関節再生を引き起こす工夫を行った。

イモリにおいては、四肢再生における<インターカレーション>は、<先端化>シグナルの FGF と SHH とのフィードバックループが形成されることで遂行される。そして、*fgf* 遺伝子と *shh* 遺伝子との間でインターカレーションを引き起こすのに不可欠なのが *shh* 遺伝子のスーパーエンハンサーである MFCS1 である。カエルでは、変態後にこの MFCS1 エンハンサーが遺伝子のエピジェネティックな修飾を受けて不活化されることで、四肢再生が阻害されることが報告されている。そこで、本研究では、カエルの MFCS1 配列を、変態後も MFCS1 エンハンサーが機能するイモリの MFCS1 配列に置き換えることで(またはその逆の置き換え、すなわちスワッピングを行う)、カエルで<インターカレーション>を引き起こし完全な四肢再生を惹起することを試みた。具体的には、カエルやイモリの受精卵を採取し、MFCS1 の各種ガイド RNA と MFCS1 配列を顕微注入することでゲノム編集を行った。

4. 研究成果

(1) マウスにおける<先端化>による関節再生の惹起

① FGF ピーズ移植による先端化と関節再生の惹起

カエルでは不完全な四肢再生しか起きないものの<先端化>が行われていることは、関節部で切断した場合に関節再生が引き起こされることで証明することに成功した(Tsutsumi et al., 2016)。そこで、マウスでも<先端化>を誘発すれば、カエル同様に関節部で切断した場合に関節の再生を惹起できるのではないかと考えた。実際に、生後マウスの中指の第二関節部で切断して、FGF ピーズを移植して<先端化>を引き起こした場合に、低頻度であるが関節様の構造が再生されることを見出した。さらに、マウスとイモリ/カエルと異なる部分を探し出し、それらの違いを克服することで、マウスにおいても関節の再生を惹起することに成功した(未発表、特許出願中)。

(2) カエルにおける<インターカレーション>の誘発による完全な四肢再生の惹起の試み

① MFCS1 スーパーエンハンサーの機能解析

マウスで *shh* 遺伝子の約 1Mbp 上流に四肢特異的な長距離エンハンサーが同定され(ZRS)、そのエンハンサー配列が四足動物で極めて高く保存されているために MFCS1(Mouse-Fish-Conserved-Sequence-1)と命名された。変態後のカエルでは、このエンハンサーが機能しなくなるために、四肢の再生が不全になることが知られている。一方、完全な四肢再生が可能なイモリにおいては、MFCS1 は変態後も機能していることが報告されている。すなわち、この MFCS1 が四肢再生時の<インターカレーション>を引き起こすためのキープレーヤーであり、MFCS1 がエンハンサーとして機能するかどうかで、四肢再生ができるかできないかの運命を分けていると考えられた。

そこで、イモリとカエルのエンハンサー配列を比較したところ、四肢再生能をもつイモリに保存されていて、四肢再生能を失ったカエルには欠損している配列があることが判明した。それらを CCG 配列、CAT 配列と命名した(図 1)。

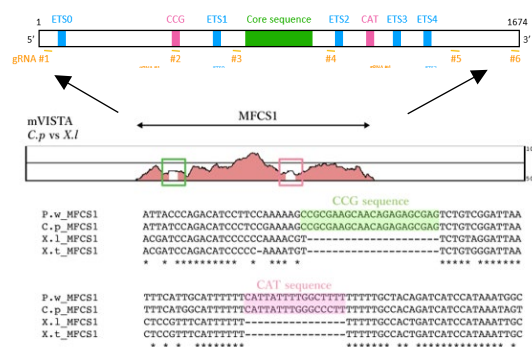


図 1 イモリ 2 種とカエル 2 種の MFCS1 領域の DNA 配列の比較(VISTA 解析による)

近年、MFCS1 は super enhancer と呼ばれ、この領域で non-coding RNA (ncRNA/enhancer RNA と呼ばれる)が転写されることでエンハンサー活性が保持されることが示唆されている。そこで、本研究においても、MFCS1 領域からの non-coding RNA(ncRNA)の転写の有無を検定した(図 2)。その結果、イモリでは発生過程でも再生過程でも MFCS1 領域から ncRNA が転写されているのに対し(図 2 左)カエルでは変態後に MFCS1 領域からの ncRNA の転写が激減して *shh* の mRNA も検出されなくなることを見出した(図 2 右)。

すなわち、MFCS1 はエンハンサーRNA(eRNA)を介して、約 1Mbp 下流の *shh* 遺伝子の発現を制御していることを示唆した。イモリに特異的に保存されている CCG 配列部位が eRNA の転写制御にかかわっている可能性が高いので、eRNA が MFCS1 領域のどの部分から転写されているかについて CAGE seq 解析を行ったが、転写量が少なく転写開始点を同定するに至らなかった。現在、NET-CAGE によって転写開始部位の同定を進めている。

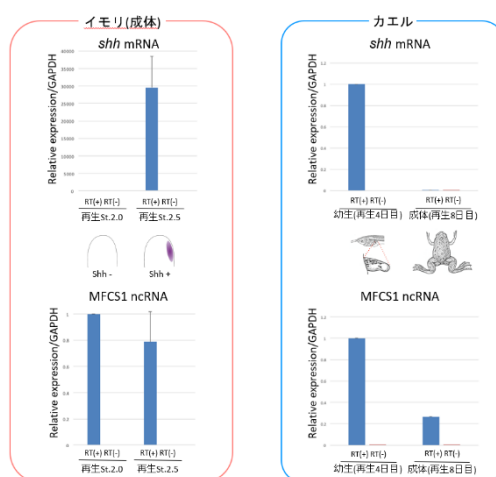


図 2 イモリとカエルの ncRNA の検出

② イモリとカエルの MFCS1 領域のゲノム編集によるスワッピング

eRNA の転写部位の同定には至らなかったが、イモリとカエルの MFCS1 領域全体にわたるスワップするためのゲノム編集を試みた。その結果、イモリにおいて、図 3 にあるように、CCG 配列より 5'側を欠損した場合には、インターカレーションが起きずにカエル再生時と同じようにスパイク様の構造が形成されることが明らかになった。種々の領域を欠損した F0 個体を多数得たが、コロナ禍で研究室への出入り制限もありそれらの個体が死滅したことで、F1 を得ることもなく研究は振出しに戻った。カエルのゲノム編集についても精力的に行ったが、これも全個体が死滅したために、残念ながら報告できる状態には至っていない。

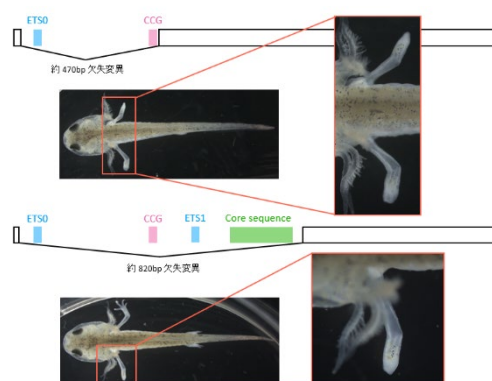


図 3 イモリ MFCS1 領域のゲノム編集個体と

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsunami M, Suzuki M, Haramoto Y, Fukui A, Inoue T, Yamaguchi K, Uchiyama I, Mori K, Tashiro K, Ito Y, Takeuchi T, Suzuki KT, Agata K, Shigenobu S, Hayashi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 A comprehensive reference transcriptome resource for the Iberian ribbed newt <i>Pleurodeles waltl</i> , an emerging model for developmental and regeneration biology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsz003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki M, Hayashi T, Inoue T, Agata K, Hirayama M, Suzuki M, Shigenobu S, Takeuchi T, Yamamoto T, Suzuki KT.	4. 巻 443(2)
2. 論文標題 Cas9 ribonucleoprotein complex allows direct and rapid analysis of coding and noncoding regions of target genes in <i>Pleurodeles waltl</i> development and regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 127-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2018.09.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Takashi, Matsubara Haruka, Minamitani Fumina, Satoh Yukio, Tozawa Sayo, Moriyama Tomoki, Maruyama Kohei, Suzuki Ken-ichi T., Shigenobu Shuji, Inoue Takeshi, Tamura Koji, Agata Kiyokazu, Hayashi Toshinori	4. 巻 149
2. 論文標題 Newt <i>Hoxa13</i> has an essential and predominant role in digit formation during development and regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200282	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miura Shinichirou, Tsutsumi Rio, Agata Kiyokazu, Endo Tetsuya	4. 巻 6
2. 論文標題 Maturing Articular Cartilage Can Induce Ectopic Joint-Like Structures in Neonatal Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Engineering and Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 373 ~ 382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40883-020-00176-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計36件（うち招待講演 20件 / うち国際学会 7件）

1．発表者名 石井維直，松原遼，阿形清和
2．発表標題 ニワトリの関節再生に参画する細胞の探索
3．学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4．発表年 2019年

1．発表者名 Kiyokazu Agata
2．発表標題 The hourglass model of limb regeneration/四肢再生の砂時計モデル
3．学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演)
4．発表年 2019年

1．発表者名 Haruka Matsubara, Kiyokazu Agata
2．発表標題 The unique mmp1 expression for the stump of the joint regeneration in <i>Xenopus laevis</i> / アフリカツメガエル関節再生時のスタンプ領域における特異的なmmp1発現
3．学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4．発表年 2019年

1．発表者名 Masakazu Hotta, Haruka Matsubara, Kiyokazu Agata
2．発表標題 Identification of the cells expected to participate in mouse joint regeneration/マウス関節再生に参画が期待される細胞の同定
3．学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4．発表年 2019年

1．発表者名 Haruka Matsubara, Kiyokazu Agata
2．発表標題 Regenerating joint exhibits specific cellular response in the frog (<i>Xenopus laevis</i>)
3．学会等名 Limb Development and Regeneration: New Tools for a Classic Model System (国際学会)
4．発表年 2019年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 再生生物学は今、何を目標しているのか
3．学会等名 第2回再生学位分野融合研究会 (招待講演)
4．発表年 2019年

1．発表者名 松原遼
2．発表標題 カエル (<i>Xenopus laevis</i>) の関節再生は特殊な細胞応答現象を示す
3．学会等名 第2回再生学位分野融合研究会
4．発表年 2019年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 プラナリアやイモリに学ぶ再生原理と再生医療
3．学会等名 金沢大学 幹細胞生物学セミナー (招待講演)
4．発表年 2018年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 再生生物学と再生医療を考える
3．学会等名 埼玉県高等学校生物研究会（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Kiyokazu Agata
2．発表標題 Regeneration, Stem Cells and Medicine
3．学会等名 第70回日本細胞生物学会/第51回日本発生生物学会合同年会（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Haruka Matsubara, Takeshi Inoue, Ei Kakuta, Kiyokazu Agata
2．発表標題 Differential gene expressions between joint and non-joint blastemas/stumps in frog
3．学会等名 第70回日本細胞生物学会/第51回日本発生生物学会合同年会
4．発表年 2018年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 炎症、損傷治癒、再生能力の関係を考える
3．学会等名 第39回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Kiyokazu Agata
2．発表標題 The Japanese amphibian regeneration initiative
3．学会等名 Salamander Models in Cross-Disciplinary Biological Research（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 サラマンダー（イモリ亜目+サンショウウオ亜目）を用いた再生研究の世界潮流
3．学会等名 基礎生物学研究所/イペリアトゲイモリトレーニングコース（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 松原遼、井上武、角田瑛、阿形清和
2．発表標題 イペリアトゲイモリとアフリカツメガエルの再生時MMP動態解析
3．学会等名 基礎生物学研究所/再生学異分野融合研究会
4．発表年 2018年

1．発表者名 角田瑛、猪鼻拓也、井上武、阿形清和
2．発表標題 両生類での四肢特異的Shh エンハンサーMFCS1に着目した四肢再生を惹起する試み
3．学会等名 基礎生物学研究所/再生学異分野融合研究会
4．発表年 2018年

1．発表者名 松原遼、遠藤哲也、井上武、角田瑛、阿形清和
2．発表標題 MMPに着目したマウスとイペリアトゲイモリ四肢切断時応答の差異
3．学会等名 日本動物学会第89回大会
4．発表年 2018年

1．発表者名 堀田正和、松原遼、阿形清和
2．発表標題 マウス関節再生に参画が期待される細胞の同定
3．学会等名 日本動物学会第89回大会
4．発表年 2018年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 再生できる動物に学ぶ再生医療
3．学会等名 台東区教育委員会生涯学習ラーニングスクエア（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Kiyokzu Agata
2．発表標題 What did we learn from regenerative animals such as planarian and newt?
3．学会等名 Molecular mechanisms of developmental and regenerative biology（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 関節の再生を科学する
3．学会等名 第5回学習院大学ブランディング・シンポジウム/第24回生命科学シンポジウム（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 角田瑛、猪鼻拓也、井上武、阿形清和
2．発表標題 Trial for elicitation of limb regeneration in frog by modifying limb-specific Shh enhancer MFCS1
3．学会等名 第41回日本分子生物学会
4．発表年 2018年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 プラナリアやイモリに学ぶ再生医療
3．学会等名 としまコミュニティ大学（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 角田 瑛、猪鼻拓也、井上 武、阿形清和
2．発表標題 両生類における四肢特異的shhエンハンサーMFCS1領域の転写活性の解析
3．学会等名 第3回次世代両生類研究会 両生類研究に関するエトセトラ
4．発表年 2017年

1．発表者名 井上 武、木村聡介、坂本陸哉、阿形清和
2．発表標題 イペリアトゲイモリの四肢再生過程における再生芽サイズとパターンニングの相関
3．学会等名 第3回次世代両生類研究会 両生類研究に関するエトセトラ
4．発表年 2017年

1．発表者名 松原 遼
2．発表標題 機能的な四肢再生を目指して
3．学会等名 第1回水棲生物再生研究会
4．発表年 2017年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 再生における傷上皮の重要性を考える
3．学会等名 イモリ型の臓器再生フォーラム（招待講演）
4．発表年 2017年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 再生メカニズムが語る未来の再生医療
3．学会等名 22世紀先端研究セミナー（招待講演）
4．発表年 2017年

1．発表者名 角田 瑛、猪鼻拓也、井上 武、阿形清和
2．発表標題 両生類の四肢再生過程における四肢特異的shhエンハンサーMFCS1領域の解析
3．学会等名 イベリアトゲイモリ研究会
4．発表年 2017年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 Evoking regenerative ability from non-regenerative animals
3．学会等名 KEY Forum：The 3rd International Symposium on Stem Cell Traits and Developmental Systems（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 Joint regeneration in newt and frog
3．学会等名 International Symposium at Hitrohima University "Amphibian development, regeneration, evolution and beyond"（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 再生のメカニズムをもとに将来の再生医療を考える
3．学会等名 広尾学園中学校・高等学校講演（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 再生できない動物を再生できるようにする
3．学会等名 2016年日本動物学会関東支部公開講演会 21世紀動物学の夢（招待講演）
4．発表年 2016年

1．発表者名 浦田悠子、山下 航、井上 武、阿形清和
2．発表標題 Roles of ependymoglia cells in brain regeneration after partial excision of the amphibian optic tectum
3．学会等名 the 22nd International Congress of Zoology / the 87th meeting of Zoological Society of Japan
4．発表年 2016年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 再生の原理を理解し、再生できないものを再生できるようにする
3．学会等名 第16回日本再生医療学会総会（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2017年

1．発表者名 阿形清和
2．発表標題 Regeneration of "The Society of Cell"
3．学会等名 Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

イベリアトゲイモリのポータルサイトiNewt
<http://www.nibb.ac.jp/imori/main/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------