

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03685

研究課題名(和文)四肢再生全般を支配する神経因子の解明と再生不能(不全)動物への応用

研究課題名(英文) Nerve roles throughout the process of organ-level regeneration Nerve roles throughout the process of organ-level regeneration

研究代表者

佐藤 伸 (Satoh, Akira)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・研究教授

研究者番号：90512004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々の究極の研究ゴールのうちの一つはヒトを含む再生不能動物における四肢(器官)再生の実現である。再生不能動物を再生させるために何が必要なのだろうか？有尾両生類(イモリ・アホロートルなど)の四肢再生研究から少なくとも2つの克服すべきポイントが明らかになった。1)再生の開始。2)四肢パターンの形成。この二つのポイントにおいて神経が必要不可欠な制御要因であるそれぞれのポイントを支配する神経因子を同定することで、その因子に対する再生不能動物の反応を比較/検討することが可能になる。本研究内においては特に2)のパターン形成における神経因子の役割について解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

器官レベルの再生研究は近年非常にホットになりつつあるテーマである。特にES/iPS細胞等を使用した再生研究の盛り上がりとともに、より高度な再生研究へのニーズが高まっている。高度な再生を考えた時に動物学をベースにした再生は大きな存在感を発揮できる。動物学をベースにする再生研究は、我々が発見した再生誘導因子の確定によって、200年にわたる停滞に終止符を打つことができた。本研究課題は確定した再生誘導因子の新しい機能の発見の一助とともに、その信頼性をさらに底上げする成果となったといえる。今後、哺乳類を含めた再生研究へ昇華させるためにより詳細な解析とより大胆な他動物への応用を視野に入れる必要がある。

研究成果の概要(英文)：One of the ultimate goals of this research field is to achieve organ-level regeneration in a regeneration incompetent animal. To achieve this, we are referring to regeneration competent animals in order to elucidate their trick of regeneration competency. The nerves play a central role in their regeneration processes. No nerves mean no regeneration in urodele amphibians. We successfully identified the nerve factors in amphibian limb regeneration. BMP7+FGF2+FGF8 are the nerve factors, which can induce limb regeneration. In the present study, we also revealed that the same factors could induce gill regeneration. We also tested whether the same molecules can trigger limb regeneration in chick embryos. Moreover, we also could find that "embryolization" takes place in the early phase of limb regeneration in *Xenopus* froglet limbs. Those findings might contribute to understandings of organ-level regeneration potency.

研究分野：発生再生生物学

キーワード：四肢再生 FGF BMP インターカレーション 外鰓再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の究極の研究ゴールのうちの一つはヒトを含む再生不能動物における四肢(器官)再生の実現である。再生不能動物を再生させるために何が必要なのだろうか?有尾両生類(イモリ・アホロートルなど)の四肢再生研究から少なくとも2つの克服すべきポイントが明らかになった。

④再生の開始。⑤四肢パターンの形成。この二つのポイントにおいて神経が必要不可欠な制御要因である(Endo et al, 2004, Dev. Biol., Wallace H., 1981, Book "Vertebrate limb regeneration"), それぞれのポイントを支配する神経因子を同定することで、その因子に対する再生不能動物の反応を比較/検討することが可能になる。最終的に、このような比較研究が再生不能動物における器官再生の実現とつながると確信している。

再生の開始プロセスでは、切断後、「再生芽」と呼ばれる特徴的な構造が誘導される。再生不能動物は、まずこの再生芽を誘導することができない。故に、再生可能動物と再生不能動物を分ける最初の分岐点として、再生芽の誘導メカニズムは200年以上も長きに渡って研究の対象となってきた。上述のとおり「再生芽の誘導」を制御する要因として神経が絶対的存在である事は古くから明らかであったが、その分子実体は謎であった。近年、我々は、FGF2, FGF8, BMP7が再生の開始を支配する神経の実体分子であることを突き止めた(Makanae et al., 2014, Dev. Biol. Satoh et al., 2015, D.G.D, 2015)。この因子の発見によって複数の動物種(アホロートル・イモリ・カエル)で、且つ複数の器官(四肢・尻尾・アゴ・エラ)において人為的に再生の開始をコントロールすることができるようになった(Makanae et al., 2014, 2016, Dev. Biol., Makanae et al., 2020, Sci. Rep., Saito et al., 2020, Dev. Biol.)。この発見は再生不能動物における再生反応の誘導への道筋を見出す上で非常に大きな成果であると自負している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の④-⑤にわたって基盤的機能を担う神経因子の探索である。本研究課題内では以下3つのテーマについて研究を展開した。

アフリカツメガエルにおける再生体パターン形成不全を神経因子によって改善する試み

これまでの研究では再生反応の起点となる神経因子の探索と同定が主題であったが、この問題をクリアしたことによって次なる目標が設定可能となった。神経は再生過程において一貫して再生体内に存在しており、再生途中での神経の除去は、ステージによって四肢再生のパターニングに深刻な影響を及ぼすことは知られている。再生の初期に神経を除去した場合は再生自体の即時停止とともに、再生構造の退縮が観察される。再生後期に神経除去した場合は再生の停滞が起こり、中途な状態での形態形成に帰結する。これらの実験は有尾両生類によるものであるが、神経の再生後期に関わる事象は他にもカエルなどを用いた実験から見出すことができる。カエルでは過剰な再生体への神経配向がより複雑な構造への亢進を促せることが判明している。アフリカツメガエルの再生体は指構造を持つものではなく、スパイクと呼ばれる一本の円錐状の構造をとる。再生自体の寄贈は可能なものの、四肢としてのパターン形成システムに異常があって、円錐状の構造に帰結するものだと考えられてきた。この構造上の形態形成不全を是正するための試みは長く行われてきたものの、依然として解決できていない事項である。有尾両生類の四肢再生における神経が支配するパターン形成システムを解明し、パターン形成不全を呈するアフリカツメガエルの四肢再生に応用し、完全なツメガエルでの再生を実現させることを目的とした。

両生類で同定した再生因子によって鳥類(ニワトリ胚)において再生誘導が可能かどうかの検証

再生因子同定を達成しても依然として、非再生動物(哺乳類など)への応用への同定は果てしない。これまでにマウスの指再生などに応用してきたが、世界を揺るがす成果は出ていない。再生誘導因子によって引き出される反応の何が異なるのかについての遺伝子カスケードに関しては別課題で研究を進めている。本研究では、非再生動物としてニワトリ胚を選定し、ニワトリ胚において両生類で同定した再生誘導因子の効果を検証した。ニワトリ胚は成鶏よりも高い再生能力を持つものと期待される。一般的に、胎児期は成体よりも再生能力が高いとされ、かなり限定されているが再生能力を示す文献も散見される(Taylor et al., 1994, Dev. Biol., Vogel and Tickle 1993, Development)。成体における再生誘導は、ハードルが高いと考え、胎児期の胚を用いることにした。ニワトリ胚を用いて、両生類型の再生を誘導することができれば、誘導再生現象と合わせ別研究で進めている再生誘導因子によって駆動される下流カスケードの比較検証に大きな一助とすることができる。

具体的には、両生類の再生における四肢パターン形成の一般則である「インターカレーション」に着目した。四肢パターン形成におけるインターカレーションとは先端部と基部の相互作用によって中央部を形成するという概念である。これは、基部側から徐々に伸長するというものではなく、再生にあたっては指先に相当する部分が初期に定義され、規定されて先端部が切断基部と相互作用することで失った構造が回復するというものである。両生類では同定した再生誘導因子のうち、FGFがこのインターカレーションを媒介することを報告している(Satoh et al., 2010, D.G.D.)。ニワトリ胚の肢芽(四肢の形成原基)は、基本的に再生能力を持たない。これは成鶏同様の事項であり、基本的な再生能力はないとされるゆえんである。しかしながら、胚発生のごく初期には肢芽の先端部の除去に除去部に発現する遺伝子発現を補うことで、不完全ながら先端部構造の回復が可能であることなどが示されている(Taylor et al., 1994, Dev. Biol., Vogel and Tickle 1993, Development)。しかし、今回我々はより後期の基本的に成鶏同様にいかなる切除にも再生能力は観察されない肢芽の発生後期ステージを用いて検証した。肢芽を基部先端部方向に3等分し、その中間部を除去する。先端部は基部と合着させ中間部欠失肢芽を形成する。この欠失部分をインターカレーション反応誘導によって補完することが実験目的となる。この検証によって、恒温動物でも両生類型の四肢再生反応を(発生胚ではあるが)再現可能であることを実証し、また、今後の再生遺伝子ネットワークの解明に寄与させることが期待できる。

同定した再生誘導因子の外鰓における再生誘導

同定した再生誘導因子の普遍性について、これまでも四肢に始まり、尻尾、歯とその有用性を示してきた。本研究内では外鰓における有効性も検証した。本研究によって、同定した再生誘導因子のさらなる信頼性と有益性を高めることに貢献した。

3. 研究の方法

各論文を参照された方がよいと判断し、本項目は割愛する。

4. 研究成果

アフリカツメガエルにおける再生体パターン形成不全を神経因子によって改善する試み

本研究の提案時には未完成だった研究成果が当時在籍した大学院生によって劇的に進められ、研究開始の前と直後に論文として発表することができた。故に、当該研究成果は本資金とはみなさず、別資金による研究成果として報告してある。ただ、俯瞰的にこれまでの研究成果をまとめた総説論文として報告するに至った。これは再生の開始を支配する神経因子(FGF2+FGF8+BMP7)

が再生の後期のパターン形成にも重要な働きを示すことを種普遍性から論じたものになっている。

本研究課題とはやや趣が異なった結果になったが、アフリカツメガエルを用いた検証では思わぬ副産物ができるためこれを記しておきたいと思う。四肢再生では「発生中の肢芽」への回帰ということが通念として存在している。言い換えれば、四肢切断後に切断部分でのみ胎児化が誘導され、発生途上の「肢芽」が誘導されるという事である。しかしながら、アフリカツメガエルでは変態というイベントがあるがゆえに「胎児系統の細胞」は変態途中で一掃されてしまっている。故に、胎児化が本当に起こるのであれば、再生途上で幼生型の遺伝子発現が起動されるはずである。しかしこのような観点でこれまで研究が展開されてこなかったため、四肢再生が「胎児化」なのかは不明なままであった。この問題に、アフリカツメガエルでは幼生型と成体型の遺伝子発現が全く異なる上皮細胞に着目し、その遺伝子発現を比較解析することで「胎児化」に関する知見を積み上げることに成功した。結果として、アフリカツメガエルの成体における差四肢再生では、幼生型の遺伝子発現が一過的に再現されることを見出した(図1)。この成果はアフリカツメガエルの再生過程における「胎児化」を指し示す一証となるだろう。

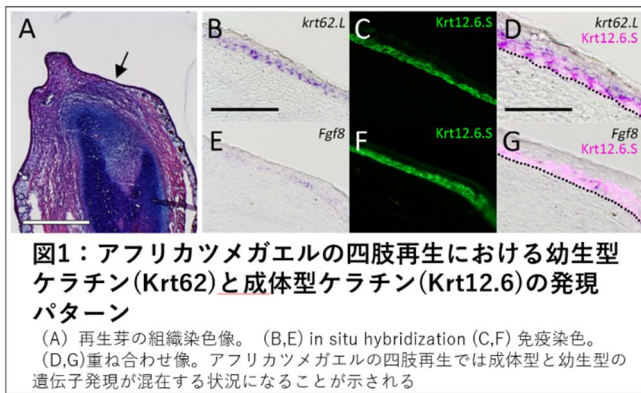


図1：アフリカツメガエルの四肢再生における幼生型ケラチン(Krt62)と成体型ケラチン(Krt12.6)の発現パターン
(A) 再生芽の組織染色像。(B,E) in situ hybridization (C,F) 免疫染色。(D,G)重ね合わせ像。アフリカツメガエルの四肢再生では成体型と幼生型の遺伝子発現が混在する状況になることが示される

アフリカツメガエルの再生過程における「胎児化」を指し示す一証となるだろう。

両生類で同定した再生因子によって鳥類(ニワトリ胚)において再生誘導が可能かどうかの検証

ニワトリ胚におけるインターカレーション反応を誘導することを目指した。始めに従来の知見を裏付けるために、

中間部欠失によって全く再生が起こらないことを確認した。似た実験自体は1980年代に行われているが、あまりに時代が古かったため知見の更新という意味合いでも実証を行った。また、同じ中間部欠失をアホロートル四肢においても実行し、以下を実証した。(イ)四肢を3分し、前腕部欠失をつくると、前腕は再生しない。(ロ)中間部欠失はFGF2+8の添加によって再生可能である。(ハ)FGF2+8+によって再生した中間部構造は主に基部からの細胞供与にて補完される。この3点についてニワトリ肢芽において実現可能かを検証した。FGF2+8+の添加によってニワトリ胚肢芽において、中間部欠失部分の再生に成功した(図2)。ニワトリーウズラのキメラ解析によって、再生体の大部分の構造は基部側からの細胞供与によって補完されることも明らかにした。ニワトリ胚において再生反応が有尾両生類同様のシステムによって起動可能であること、そして何より同定した再生誘導因子のうち FGF2+8 によってその起動ができることを示した意義は大きいと考えている。

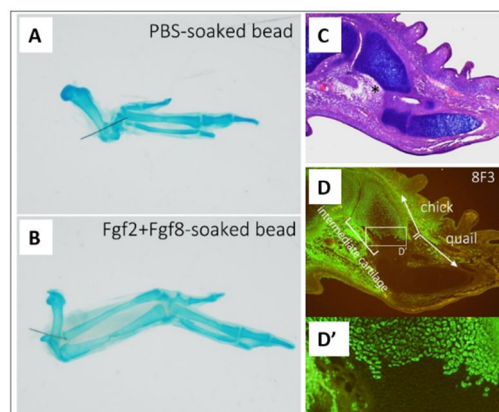


図2：ニワトリ肢芽におけるインターカレーション反応誘導実験

(A)コントロール。中間部欠失は回復していない。(B)FGF2+8を添加した場合。中間部は再生する。(C)組織染色像。(D)ニワトリーウズラのキメラ解析。基部側からの細胞寄与を示す(緑)

同定した再生誘導因子の外鰓における再生誘導

再同定した生誘導因子(FGF2+FGF8+BMP7)の外鰓への適用可能性を検証した。アホロートルは幼形成熟という生活様式をとり、生涯をかけて外鰓(エラ)を失うことがない状態で一生を過ごす。外鰓は体外に突出した構造であり、さまざまな外的要因によって損傷を受ける。一般的には

この外鰓は再生可能であるとされていたが、これまでに科学的な検証はされてこなかった。まずは外鰓の科学的記載をすることから始めた。実際にアホロートルは外鰓を再生できる。外鰓の再生の神経依存性は三叉神経節から外鰓に伸びる神経の切断によって検証した。外鰓は神経依存的に再生していることが明らかになり、四肢再生との共通項が浮き彫りになった(図3)。四肢再生との共通性という観点から、四肢再生において神経因子として機能する再生誘導因子(FGF2+FGF8+BMP7)の再生への関与を検証した。始めに阻害剤を用いた実験によって外鰓の再生が FGF シグナルと BMP シグナルによって正に制御されていることを示した。続いて、FGF と BMP の添加によって再生を誘導できるかを検証したが、再生芽と呼ばれる再生の開始自体は誘導できたもののパターンを持つ外鰓の誘導には至らなかった。これは四肢再生とは再生の開始システムは類似するものの、そのあとに続く再生フローが異なることを意味していると考えられる。いずれにせよ、再生の開始システムの共通性が見えたことによって、器官レベルの再生現象という事象の根本への理解という面から大きな進展が得られたと考えられる。

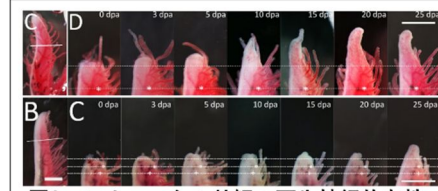


図3：アホロートル外鰓の再生神経依存性
論文からの抜粋(上段)通常の外鰓切断。(下段)除神経状態の外鰓切断。アホロートルの外鰓再生は神経依存的であることが分かる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwata Reiko, Makanae Aki, Satoh Akira	4. 巻 249
2. 論文標題 Stability and plasticity of positional memory during limb regeneration in <i>Ambystoma mexicanum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 342 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.96	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 Saito Nanami, Nishimura Koki, Makanae Aki, Satoh Akira	4. 巻 452
2. 論文標題 Fgf- and Bmp-signaling regulate gill regeneration in <i>Ambystoma mexicanum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 104 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.04.011	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 Mitogawa K, Makanae A, Satoh A	4. 巻 433(2)
2. 論文標題 Hyperinnervation improves <i>Xenopus laevis</i> limb regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 276-286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2017.10.007.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤伸
2. 発表標題 Induction of regeneration callus (blastema) in ANIMALS
3. 学会等名 植物生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤伸
2. 発表標題 メキシコサラマンダーの四肢再生と骨再生
3. 学会等名 骨代謝学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤伸
2. 発表標題 両生類型の再生システムは哺乳類でも共通なのか？
3. 学会等名 再生異分野融合研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 AKIRA SATOH
2. 発表標題 Nerve functions in blastema induction and pattern formation in limb regeneration
3. 学会等名 14th Limb Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://organregeneration.jimdofree.com/

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
---------	---------