

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06184

研究課題名(和文) マクロファージにより活性化される脱分化誘導因子のエピジェネティックな発現制御

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of dedifferentiation-inducible genes mediated by macrophage during regeneration

研究代表者

板東 哲哉 (Bando, Tetsuya)

岡山大学・医歯薬学域・講師

研究者番号：60423422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フタホシコオロギは切断された脚を元どりに再生できる。失われた器官の再生には再生芽の形成が必要であり、再生芽細胞は分化した細胞が脱分化した細胞であるが、再生芽の形成については不明な点が多い。コオロギの脚再生過程では、脚の切断により傷害された細胞に由来するデブリがToll受容体を発現するプラズマ細胞(昆虫のマクロファージ)に受容されていた。プラズマ細胞は創傷部位へと遊走してサイトカインを産生することでJak/STATシグナルを活性化させ、細胞増殖を亢進させて再生芽の形成を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な生物の器官再生に、免疫細胞の一種であるマクロファージが重要であることが分かっているが、マクロファージが器官再生を促進する詳細なメカニズムは不明であった。我々は、Toll受容体シグナルが昆虫のマクロファージの遊走を促進することがきっかけとなり、器官再生が促進されることを見出した。これまで無関係とされていた器官の再生と個体の免疫の関連を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus* regenerates the lost part of leg. During the leg regeneration process, the blastema, which is the population of undifferentiated-proliferating cells, is formed beneath the wound epithelium. The blastema cells proliferate and differentiate to regenerate the lost part of leg, however, molecular mechanisms of the blastema formation are unclear. In this study, we found that the plasmatocytes, which are known as insect macrophages, recognized debris of injured cells and accumulated into the wound site. The plasmatocytes produced the insect cytokine Upd to activate Jak/STAT signaling, inducing the blastema cell proliferation and leg regeneration.

研究分野：再生生物学

キーワード：コオロギ 再生 再生芽細胞 マクロファージ Toll

1. 研究開始当初の背景

器官再生は昆虫、魚類、両生類など多くの生物で観察される現象であるが、ヒトの再生能は低い。失われた器官を再生できる生物と再生できない生物の最大の違いは、再生する器官のもととなる『再生芽』を形成する能力の差である。再生芽細胞は分化した細胞が脱分化した細胞と考えられており、未分化性の維持にはたらく因子が脱分化を誘導すると考えられている。分化した細胞では脱分化誘導因子の発現は抑制されるが、切断により脱分化誘導因子の発現がエピジェネティックに再活性化されると、分化細胞から再生芽細胞への脱分化が促進されると考えられる。しかし、そのエピジェネティックな制御機構は解明されていない。

申請者は不完全変態昆虫フタホシコオロギの脚再生を器官再生のモデルと位置づけ、コオロギ脚再生の分子メカニズムの解析を行っている。近年、昆虫マクロファージであるプラズマ細胞が、コオロギ脚再生過程において再生芽の形成に必須であることを見出した。

2. 研究の目的

プラズマ細胞が再生芽細胞への脱分化を誘導する分子メカニズムを明らかにする。プラズマ細胞は昆虫のマクロファージであるが、昆虫の体液に含まれる細胞については昆虫種間で違いが多く、ショウジョウバエ以外の昆虫ではプラズマ細胞についても不明な点が多い。まず、プラズマ細胞の形態や機能を明らかにする。次に、プラズマ細胞が異物を認識したり排除したりする際に働く遺伝子群やシグナル経路を調べ、再生過程における機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プラズマ細胞の可視化と除去、分裂細胞の可視化

昆虫マクロファージであるプラズマ細胞は、貪食能が高いという性質を利用して、リポソームを介したドラッグデリバリーが可能である。緑色蛍光を発する脂質 BODIPY を表面に付加したリポソーム (BODIPY-lipo) を用いてプラズマ細胞を可視化した。また ATP アナログであるクロドロン酸を含有するリポソーム (Clo-lipo) を投与してプラズマ細胞を除去した。

細胞の増殖は、Click-iT EdU Cell Proliferation Kit (EdU) と抗リン酸化ヒストン H3Ser10 抗体 (PH3) を用いて S 期と M 期の細胞を可視化した。細胞骨格や核はローダミンファロイジンやヘキスト 33342 で染色した。

染色した再生脚は、ライカの倒立蛍光顕微鏡やツァイスの共焦点顕微鏡で観察した。

(2) 走査型電子顕微鏡による観察

コオロギ 3 齢幼虫の脚を脛節で切断し、再生脚を 5 齢幼虫期にサンプリングしてグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドで固定した。エタノールで脱水した後に tert ブタノール中で凍結乾燥した。オスミウムでコートし、走査型電子顕微鏡で微細構造を観察した。

(3) 定量 PCR

再生脚から RNA を抽出し、逆転写して cDNA を合成した。cDNA に対して遺伝子ごとにデザインしたプライマーを用いて定量 PCR を行った。内在性コントロールには β -actin 遺伝子を用いた。

4. 研究成果

(1-1) プラズマ細胞の可視化

多くの昆虫で、プラズマ細胞は貪食能が高い紡錘形の細胞と報告されている。コオロギの脚を切断し、BODIPY-lipo とローダミンファロイジンを用いてマクロファージを可視化すると、BODIPY-lipo の取り込みにより緑色蛍光を発する球形の細胞と、ローダミンファロイジンの赤色蛍光を発する紡錘形の細胞が分布していた (図 1)。

Clo-lipo を投与してプラズマ細胞を枯渇させると、球形の細胞は観察されなくなり、紡錘形の細胞のみが観察される。すなわち貪食能が高いプラズマ細胞は球形の細胞であり、紡錘形の細胞は不活性状態のプラズマ細胞と考えられる。

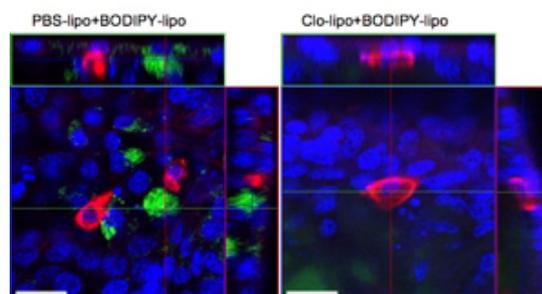


図1 プラズマ細胞の可視化

(1-2) Clo-lipo 投与個体の脚再生

Clo-lipo を投与したコオロギは、再生能の低下や再生不全の表現型を示し、Toll 受容体遺伝子 Toll2 を RNA 干渉法により発現低下させた場合も同様の表現型を示した。形態異常となった再生脚を走査型電子顕微鏡で観察したところ、付節の低形成や形態形成異常による分節構造の形成阻害が原因であった (図 2)。

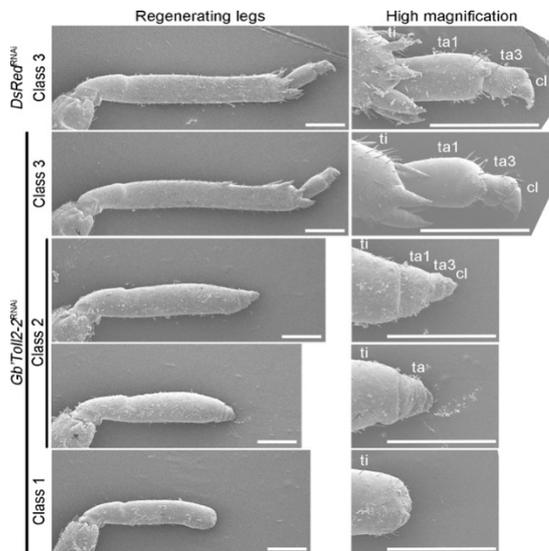


図2 再生脚の形態

33342 で染色して共焦点顕微鏡で観察した。コントロール個体と比較して、Clo-lipo 投与個体では細胞分裂 S 期や M 期の細胞が著しく減少しており、細胞分裂の低下により再生能が低下したと考えられた (図 3)。

(1-4) Toll 受容体の機能

Clo-lipo 投与個体では Toll 受容体遺伝子群のうち *Toll2-1*, *Toll2-2*, *Toll2-5* の 3 遺伝子の発現が低下していたことから、これらの遺伝子はプラズマ細胞に発現すると示唆された。そこで *Toll2-2* の機能を RNAi を用いて解析した。*Toll2-2*(RNAi) 個体の再生脚では、創傷部位へのプラズマ細胞の遊走が低下し、昆虫サイトカインの一種 upd の発現が低下していた (図 4)。Upd は Jak/STAT シグナルのリガンドとして機能し、Jak/STAT シグナルはコオロギ脚再生において再生芽細胞の増殖を促進することが知られている (Bando et al., Development (2013) 140 (5): 959-964.)。

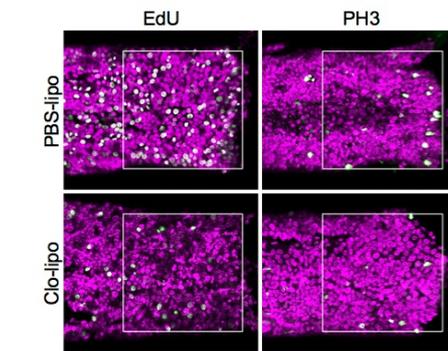


図3 細胞増殖の可視化

(1-3) Clo-lipo 投与個体の細胞増殖

Clo-lipo 投与個体の再生脚における細胞増殖の割合を解析するため、再生脚を抗リン酸化ヒストン H3Ser10 抗体または Click-iT EdU Cell Proliferation Kit で染色し、核をヘキスト

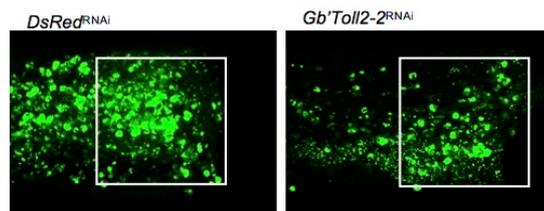


図4 プラズマ細胞の分布

(1-5) プラズマ細胞活性化因子の探索

コオロギの脚を切断すると、活性化したプラズマ細胞が創傷部位でサイトカイン Upd を産生することが分かったが、プラズマ細胞を活性化する因子は不明であった。脚切断に伴う感染性の微生物や傷害された細胞に由来するデブリがプラズマ細胞に受容されると考えられた。感染性微生物の認識に働く分子群に対する RNAi を行ったところ、脚再生が正常に起こったことから、微生物感染の認識は脚再生に必要ではないと考えられた。一方、スカベンジャー受容体 CD36 の昆虫ホモログ Crq がデブリの認識に働くことが知られていたため、*crq*(RNAi) したコオロギの脚再生を観察したところ、脚再生が阻害された (図 5)。

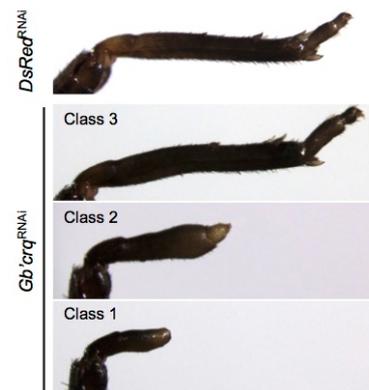


図5 再生脚の形態

以上の結果から、Toll 受容体を発現するプラズマ細胞が創傷部位へと遊走し、Upd を産生することで Jak/STAT シグナルを活性化して再生芽細胞の増殖を増加させ、脚再生を促進すると考えられた。傷害された細胞由来のデブリが認識された時のみ再生芽細胞への脱分化が誘導され、微生物感染時には脱分化が誘導されない分子メカニズムには、環境依存的に切り替わるエピジェネティックな分子群が寄与していると考えられる。これらの分子実態の解明が今後の課題となる。

(2-1) 低酸素応答因子 Hif-1 の機能

近年、マウスにおいては低酸素応答因子 Hif-1 α が心筋幹細胞のマーカーとして用いられている。コオロギ脚再生において、プラズマ細胞によって細胞増殖が増加する細胞が Hif-1 α を発現しているのではないかと考え、脚再生における Hif-1 α の機能解析を行った。

コオロギ Hif-1 α は脚切断後に一過的に発現が低下し、その後徐々に発現が回復した。Hif-1 α (RNAi) 個体の再生脚は、一部の個体で再生能が低下する表現型が観察された (図 6)。

Hif-1 α (RNAi) した再生脚における細胞増殖を調べたところ、細胞分裂 S 期や M 期の細胞も減少しており、細胞増殖が低下したことにより再生能も低下したと考えられた (図 7)。

(2-2) 様々な不完全変態昆虫の脚再生における Hif-1 α の発現
 フタホシコオロギ以外の昆虫の脚再生過程を観察するため、原始的な無翅昆虫であるマダラシミ (Tdo) の成虫、不完全変態昆虫網翅類のアルゼンチンモリゴキブリ (Bdu) の 3 齢幼虫、直翅類のヨーロッパエコオロギ (Ado) の初齢幼虫の後脚を切断したところ、1~2 回の脱皮を経て失われた部分が再生することが分かった。これらの昆虫において、切断直後の脚と 1 dpa の再生脚での Hif-1 α の発現を定量 PCR により比較したところ、いずれの昆虫種でも発現が増加する傾向が見られた (図 8)。一過的に発現が低下するフタホシコオロギとは逆の傾向であるが、脚再生を促進する遺伝子は脚再生過程で発現上昇することが多いため、これらの昆虫の脚再生を Hif-1 α が促進する可能性が期待される。



図6 再生脚の形態

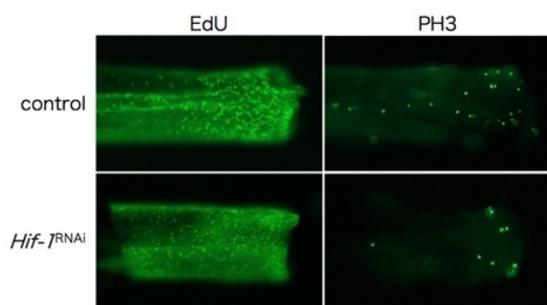


図7 細胞分裂の可視化

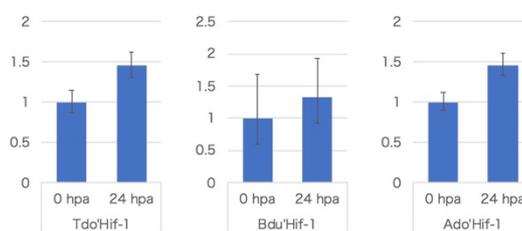


図8 昆虫種ごとの発現比

以上の結果から、昆虫の脚再生過程において Hif-1 α は細胞増殖に影響して脚再生を促進し、その機能は進化的に保存されていると考えられた。今後は Hif-1 α 発現細胞の同定や、脚再生過程におけるプラズマ細胞の挙動と Hif-1 α 陽性細胞の増殖との関連などに着目して解析を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Narasaki-Funo, Y., Tomiyama, Y., Nose, M., Bando, T. & Tomioka, K.	4. 巻 127
2. 論文標題 Functional analysis of Pdp1 and vrille in the circadian system of a cricket	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Insect Physiology	6. 最初と最後の頁 104156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinsphys.2020.104156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomiyama, Y., Shinohara, T., Matsuka, M., Bando, T., Mito, T. & Tomioka, K.	4. 巻 6
2. 論文標題 The role of clockwork orange in the circadian clock of the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-020-00166-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bando T, Mito T, Hamada Y, Ishimaru Y, Noji S, Ohuchi H.	4. 巻 62
2. 論文標題 Molecular mechanisms of limb regeneration: insights from regenerating legs of the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The International Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 559-569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bando T, Yokoyama H, Nakamura H.	4. 巻 60
2. 論文標題 Wound repair, remodeling, and regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 303-305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishimaru Y, Bando T, Ohuchi H, Noji S, Mito T.	4. 巻 60
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein signaling in distal patterning and intercalation during leg regeneration of the cricket, <i>Gryllus bimaculatus</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 377-386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kutaragi Y, Tokuoka A, Tomiyama Y, Nose M, Watanabe T, Bando T, Moriyama Y, Tomioka K.	4. 巻 4
2. 論文標題 A novel photic entrainment mechanism for the circadian clock in an insect: involvement of c-fos and cryptochromes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-018-0109-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Guillem Ylla, Taro Nakamura, Takehiko Itoh, Rei Kajitani, Atsushi Toyoda, Sayuri Tomonari, Tetsuya Bando, Yoshiyasu Ishimaru, Takahito Watanabe, Masao Fuketa, Yuji Matsuoka, Austen A Barnett, Sumihare Noji, Taro Mito, Cassandra G Extavour	4. 巻 4
2. 論文標題 Insights into the genomic evolution of insects from cricket genomes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 communications biology	6. 最初と最後の頁 733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02197-9.	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 該当する

1. 著者名 Tetsuya Bando, Misa Okumura, Yuki Bando, Marou Hagiwara, Yoshimasa Hamada, Yoshiyasu Ishimaru, Taro Mito, Eri Kawaguchi, Takeshi Inoue, Kiyokazu Agata, Sumihare Noji, Hideyo Ohuchi.	4. 巻 149
2. 論文標題 Toll signalling promotes blastema cell proliferation during cricket leg regeneration via insect macrophages.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev199916
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199916.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 板東 哲哉, 奥村 美紗, 濱田 良真, 大内 淑代	4. 巻 57
2. 論文標題 フタホシコオロギが解き明かす免疫と再生の思いがけない関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 33-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 板東 哲哉, 奥村 美紗, 大内 淑代
2. 発表標題 昆虫脚再生におけるToll様受容体とCD36による再生芽細胞の増殖の制御
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回 日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村美紗, 板東哲哉, 坂東優希, 萩原万優, 大内淑代
2. 発表標題 Toll受容体によるコオロギ脚再生の促進メカニズム
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 板東哲哉, 奥村美紗, 坂東優希, 萩原万優, 大内淑代
2. 発表標題 Toll様受容体とスカベンジャー受容体CD36による昆虫の器官再生メカニズム
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bando T, Okumura M, Hagiwara M, Hamada Y, Mito T, Noji S, Ohuchi H.
2. 発表標題 Innate immunity signaling pathways promote leg regeneration in the cricket
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 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板東哲哉, 奥村美紗, 坂東優希, 萩原万優子, 濱田良真, 大内淑代
2. 発表標題 マクロファージによる器官再生の促進: 昆虫の脚再生をモデルとして
3. 学会等名 日本解剖学会 第73回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板東哲哉, 濱田良真, 三戸太郎, 野地澄晴, 大内淑代
2. 発表標題 極性分子複合体はコオロギ脚再生に必要である
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 板東哲哉, 奥村美紗, 大内淑代
2. 発表標題 NADPH oxidasesによるコオロギ脚再生の制御メカニズム
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板東哲哉、奥村美紗、大内淑代
2. 発表標題 Toll受容体と活性酸素による昆虫の器官再生の制御
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>牛木辰男、ずかんシリーズ ヒトの細胞 『コラム11 再生するイモリの脚の不思議 (p. 98-99)』、技術評論社 (2021/5/29発売) 免疫に働くToll受容体か&#12441;コオロキ&#12441;の再生を促進するメカニクス&#12441;ムを解明 https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id900.html Okayama University Medical Research Updates https://www.okayama-u.ac.jp/tp/news/news_id11026.html</p>

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