様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６年　６月　３日現在

機関番号：１３８０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０５３７８

研究課題名（和文）マナマコ内臓放出-横切断からの再生における再生芽形成と器官形成の分子機構の解析

研究課題名（英文）Study on molecular mechanisms of blastema formation and organ regeneration in a whole-body regeneration model of sea cucumber, Apostichopus japonicus.

研究代表者
鳥山　優（Toriyama, Masaru）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：６０２０２２０６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では，マナマコの横切断再生実験系を用いて，後方の切断体の切断面に生じる再生芽の組織学的解析と，遺伝子発現変動の経時的解析を行った。切断面に生じる再生芽では2週頃には体内側に発達した上皮組織が観察され，そこには大型・球形の細胞も多数観察された。これら細胞は神経組織表面等から遊離してくる様子が観察された。また，RNA-seq解析とその後のISH解析により，これら細胞はProminin遺伝子等の幹細胞・多能性幹細胞マーカーを複数発現していた。さらなる細胞分化マーカー解析により，本再生系では脱分化によって多能性幹細胞を生じること，胚葉を超えた細胞の分化転換が生体内で起こっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
器官再生のための再生医療技術を開発するにあたり，器官再生の様々な過程における細胞動態や分子制御機構の基礎的知見の集積が必要である。それには再生能力が高い動物の器官再生機構から学んでいくことも必要である。本研究は，系統進化的にヒトと同じ新口動物に属し，再生能力が高いマナマコを用いて，器官再生の基盤となる再生芽形成とそこからの細胞分化の機構を解析したものである。再生過程において，生体内にて脱分化により多能性幹細胞を生じ，それら細胞から再生に必要な細胞が分化して供給されるという，ユニークな再生機構が存在する可能性を示した。その分子機構は，将来的に器官再生技術開発のための基礎をなすものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we carried out histological and gene expression analyses of regeneration blastema that develops on the amputated surface of the posterior body of bisected Japanese sea cucumber, Apostichopus japoicus. A thick epithelial layer was observed at the surface of regeneration blastema to the side facing to the internal, coelomic cavity at around 2 weeks of regeneration. Many characteristic cells, which were large in size and spherical, were observed in and around the regeneration blastema. These cells seemed to emerge mainly from the surface of nerve tissues. RNA-seq analysis and subsequent ISH analysis revealed that these cells expressed several stem cell and pluripotent stem cell markers such as the Prominin gene. Further analysis using cell differentiation markers suggested that, in this regeneration system, pluripotent stem cells are generated by dedifferentiation, and that these stem cells contribute to provide the missing lineage of cells in the regenerating tissues.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ナマコ　内臓放出　横切断　器官再生　再生芽　遺伝子発現解析

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

再生医療技術を開発していくにあたり，器官再生の様々な過程での細胞動態やそれを制御する遺伝子発現についての詳細を正確に理解する必要がある。しかし，ヒトの器官再生能力は多くの器官で限られているうえ，ヒトサンプルを用いた再生研究を行うには材料の入手や倫理面等，様々な面での制約も大きい。従って，実験動物を用いた基礎研究で得られた知見を，ヒトでも検証・応用していくことが重要になってくる。これまでにプラナリア，イモリなどを始めとして，様々な動物を用いた再生研究が行われてきたが，動物種，あるいは対象とする成長段階や器官によってその再生能力は大きく異なる。こうした再生能力に差がある動物などを対象としてその再生機構を比較解析することで，再生能の低いヒトの器官に応用できる知見が得られると期待される。

我々は，高い再生能力を持つことで知られている棘皮動物に属するマナマコを用いて器官再生の研究を進めている。マナマコは人為的に内臓放出を誘導することが可能であり，他の動物では難しい内臓の再生の研究が盛んに行われている。さらには，その個体を横切断して前・後二つの切断体に分離しても，それぞれが再生して別々の個体となることを，我々は独自に見出している(以下，横切断-再生系)。高い再生能力を持つ動物でも，その再生機構には違いが見られる。例えば，プラナリアのように全身に多能性幹細胞が存在し，それらに依存して再生する機構や，イモリの肢芽の再生に見られるように，細胞の脱分化・再分化に依存した再生機構が知られている。一方，これら器官や個体の切断に対して再生能力が高い動物では，切断端に未分化な細胞集団から構成される再生芽が形成される。それに対して，再生能力に劣る哺乳類の四肢等の切断では機能的な再生芽が形成されない。従って「機能的な再生芽形成の有無」が器官再生能力を決める一つの要因と考えられている。マナマコの横切断-再生系においても，切断部に肥厚した再生芽が形成されることを我々は確認した。しかしその再生芽形成細胞の構成や形成機構，および再生芽からの器官分化過程の詳細はまだ未解明である。本実験系の切断面に形成される再生芽は，体内側に向かって起こる内臓再生の起点となるものであり，他の再生モデルでは見られないユニークなものである。その再生芽形成やそこからの器官分化の機構の解明は，臓器再生技術の開発にも繋がるものと期待される。

２．研究の目的

本研究はマナマコの横切断-再生系を用いて，器官形成の起点となる再生芽形成機構とそこからの器官再生機構を明らかにすることを目的とし，以下の研究項目について解析を行った。
(1)再生芽形成・器官形成過程の組織学的解析
(2)各種ステージの再生芽の網羅的遺伝子発現解析
(3)目的遺伝子発現細胞の同定と機能解析

３．研究の方法

マナマコ横切断-再生系における再生芽形成過程とそこからの器官分化初期過程の，組織学的構成と細胞の動態を解析した。またそれらの過程に関わる遺伝子発現変動の網羅的解析を行った。

(1) 再生芽形成，器官形成過程の組織学的解析： 横切断後の後方の切断体の再生過程を，形態的・組織学的に観察した。また，BrdU を取り込ませてその免疫組織化学(IHC)を行うことで，細胞増殖パターンを解析した。また各種細胞マーカーの発現（例：神経 *Pcsk2*; 筋芽細胞 *Myf5*; 内胚葉細胞 *FoxA*; 多能性幹細胞 *Klf*; 生殖細胞 *Vasa*）を，*in situ* ハイブリダイゼーション(ISH)にて，あるいはポリクローナル抗体を作製して IHC にて解析した。解析にあたっては，再生芽とその周辺組織に着目し，組織・細胞形態の観察と各種マーカーの発現と増殖パターンの解析から，切断部周辺の各種細胞の再生芽形成への関与の可能性について探った。

(2) 網羅的遺伝子発現解析：横切断後の後方の切断体，及び「再生芽」に標的を絞ってサンプリングを行い，RNA-seq 解析を行った。対象として，切断直後（D0），再生５日（D5），再生７日(D7)，再生 14 日(D14)から得たサンプルを用いて RNA-seq 解析を行い，遺伝子発現の比較解析を行い，差次的発現(DEG)する遺伝子を同定した。

(3) 候補遺伝子発現細胞の特定：上記(2)で同定した DEG の幾つかの発現を，RT-PCR 及び ISH にて解析し,発現細胞や発現動態を解析した。

４．研究成果

(1) 再生芽形成・器官形成過程の組織学的解析：マナマコ横切断後の後方切断体の再生過程を，解剖学的・組織学的に観察した。再生２ヶ月頃には口の原基が観察され，３ヶ月頃までには触手を伴う口と機能的な消化管が再生し，摂餌が観察された。切断面部分に生じる再生芽においては，再生２週～4 週頃には体内側表面に発達した上皮組織が観察され，そこにはヘマトキシリン染色で細胞質が陽性となる，大型で球形の特殊な細胞が再生２週～4 週をピークとして多数観察された。これら細胞は縦走神経組織や筋組織の表面から遊離してくると思われる像が組織学的に観

察された。大型で球形の特殊な細胞が増生する再生 4 週における細胞増殖活性を解析したところ，体壁内腔表面を覆う上皮，及び体壁内には BrdU シグナル陽性の細胞が散在していたが，大型で球形の特殊な細胞では陽性シグナルが観察されなかった。

（2） 再生芽における網羅的遺伝子発現解析：RNA-seq 解析の結果，再生の時間経過に伴い差次的発現する多くの遺伝子が同定された。特に，切断直後(D0)および D5，D7 で同定された 340 個の DEG をその発現変動パターンから 8 つのクラスター群に分類し，それらの中で D0 から D5 にかけて発現上昇が顕著なクラスター1 には細胞外マトリックスのリモデリングに関わる *MMP-16* や幹細胞制御に関わる *Sall* が，また，D0,D5，D7 と順次発現レベルが上昇していくクラスター4 には細胞の増殖，分化，及び幹細胞制御に関わる *Rreb1, FoxA, Prominin* といった遺伝子が同定された(Fig.1)。

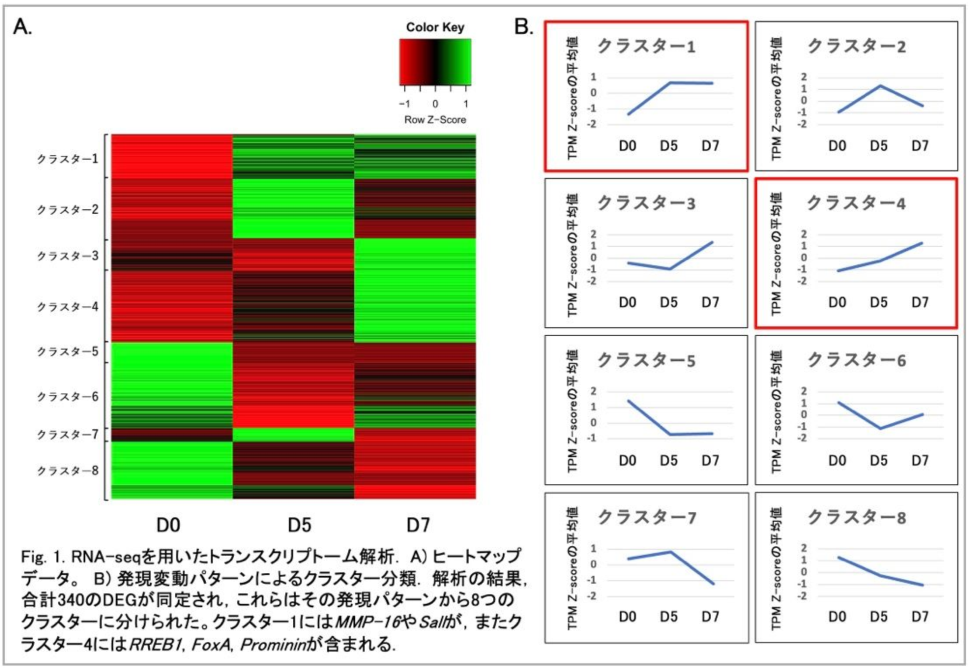

Fig. 1. RNA-seqを用いたトランスクリプトーム解析．A）ヒートマップデータ。B）発現変動パターンによるクラスター分類．解析の結果，合計340のDEGが同定され，これらはその発現パターンから8つのクラスターに分けられた。クラスター1には*MMP-16*や*Sall*が，またクラスター4には*RREB1, FoxA, Prominin*が含まれる．

（3）再生過程で発現上昇する遺伝子の発現細胞の同定： RNA-seq 解析の結果，DEG として同定された遺伝子群のうち，再生の進行とともに発現上昇する遺伝子に着目し，RT-PCR 及び ISH 解析を行ったところ，*Prominin* が再生初期から次第に発現上昇することが RT-PCR にて確認された。ISH にて発現部位の解析を行なったところ，*Prominin* は再生 1 週間では神経組織にて弱い発現が観察され，その後，その神経組織表面部位での発現がより顕著になり，そこから *Prominin* 陽性の大型・球形の細胞が出現する様子が組織学的に観察された。特に再生 4 週ではそれら *Prominin* 陽性の大型・球形の細胞が神経組織周囲だけでなく，周辺の組織内にも散在している様子が観察された(Fig.2)。また，*Prominin* は造血幹細胞やがん幹細胞といった多くの幹細胞で発現することが知られているので，多能性幹細胞マーカーである *Klf* の発現も併せて解析したところ，*Prominin* と陽性の大型・球形の細胞は *Klf* を共発現していることが明らかになった。これらのことから，大型・球形の細胞は神経組織の細胞から脱分化によって生じる多能性幹細胞であることが示唆された。さらに，内胚葉マーカーの *FoxA* の発現を再生芽にて解析した。初期の再生芽には *FoxA* 陽性細胞は観察されないが，再生 4 週ではクラスター状に染まる強陽性集団が再生芽内に観察され，その周辺には *FoxA* 弱陽性の細胞が存在し，さらにその細胞集団が神経組織周辺の *FoxA* 弱陽性かつ *Prominin* 弱陽性の大型・球形様の細胞集団へとつながっている様子が観察された。これらのことから，この *Prominin* 陽性の大型・球形の細胞から内胚葉細胞が生じる，すなわち神経組織からの分化転換が起こっている可能性が組織学的に示された。

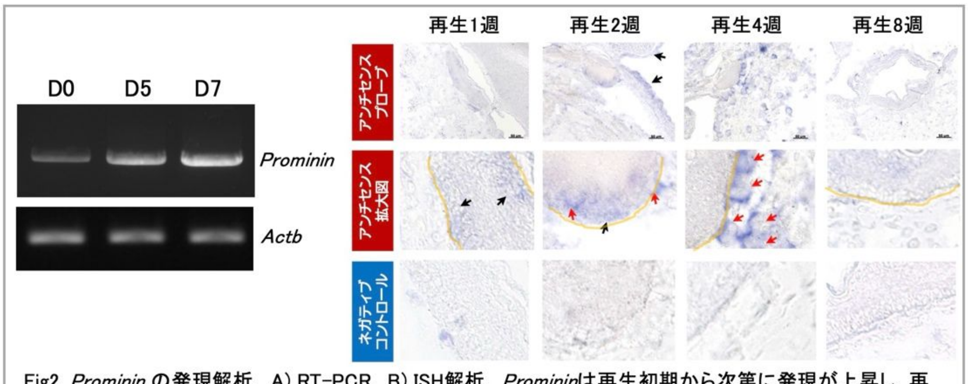

Fig2. *Prominin* の発現解析．A）RT-PCR．B）ISH解析．*Prominin*は再生初期から次第に発現が上昇し，再生2-4週間では神経組織(オレンジ境界線)付近に見られる大型・球型の細胞での発現が顕著に観察された。

以上の結果から, 本実験系における器官再生においては, 脱分化によって多能性幹細胞が生じ, その多能性幹細胞から様々な系譜の細胞が生じる機構が存在することを示唆しており, すなわち胚葉を超えた細胞の分化転換が生体内で起こる可能性を示すユニークなものである。この再生に関わるさらなる細胞動態・分子機構の解明が, ヒト臓器再生医療の技術開発への応用に繋がることが期待できる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 高岡 菜月, 道羅 英夫, 鳥山 優, 小池 亨
２．発表標題 マナマコの消化管再生過程における前後軸パターニングと領域化の解析
３．学会等名 日本動物学会(第93回 早稲田大会)
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

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
研究分担者	小池　亨 (Koike Toru) (20377716)	静岡大学・理学部・講師 (13801)	
研究分担者	道羅　英夫 (Dohra Hideo) (10311705)	静岡大学・理学部・教授 (13801)	

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