

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770252

研究課題名(和文) 有尾両生類四肢再生における筋細胞制御と進化的考察

研究課題名(英文) regulations of muscle cells in limb regeneration in axolotl limb regeneration

研究代表者

佐藤 伸 (Sato, Akira)

岡山大学・その他部局等・准教授

研究者番号：90512004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：有尾両生類の四肢再生において、多くの組織・細胞はもともと「四肢」にいたものでなくてはならない。ところが、筋肉に関してはこの限りでない可能性が高い。この可能性の追求のため、当研究室が世界的にリードする実験システムである過剰肢付加モデルを改良し、筋肉細胞の再生過程の動態を解析しやすいようにした。一連の解析の結果、当初の予想通り、筋肉は位置によらず(存在部位によらず)、四肢再生体へと寄与できることを明らかにした。この研究の成果を進化的な側面から比較してゆく事で、今後四肢や肉鱗、有肉の背鱗などに存在する筋肉の起源について議論できるようになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been believed that regenerated limb must be consisted of limb derived cells. But recent our studies imply that muscle cells are not in the case. To investigate whether non-limb derived muscle cells can participate into limb regeneration, we improved our novel experimental system, called the accessory limb model. The improved accessory limb model is an ideal experimental system to investigate limb regeneration. We first revealed dynamics of expression of muscle marker genes. Then, we tested whether tail muscle (non-limb origin) cells could participate into limb regeneration. Our results indicate that non-limb derived muscle cells makes limb muscles in limb regeneration as we expected. Those results are quite useful and insightful for understanding limb regeneration. moreover, our knowledge can provide a novel insights into limb muscle evolution.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：四肢再生 筋発生 四肢筋の進化

### 1. 研究開始当初の背景

有尾両生類は四肢を再生できる。このような非常に高い器官再生能力は長く研究のターゲットとなってきた。四肢再生はその代表的事例として研究され、現在に至る。四肢再生の研究の歴史は300年にも渡る。初めの報告は1712年にロプスターの四肢再生に関するものである。脊椎動物内では有尾両生類(イモリ・メキシコサラマンダなど)が特に高い再生能力を持つとして知られている。この有尾両生類の四肢再生メカニズムも同様に長く研究の対象になってきた。有尾両生類の四肢再生では、「神経」の存在が非常に重要な役割を果たすことが知られている。両生類の四肢再生能力の解明のために神経因子の特定は最重要課題である。(神経因子の解明については別の研究プロジェクトで研究を進めている。)

有尾両生類の四肢再生研究は近年過剰肢付加モデルという新規実験方法にて解析が進められている(Endo et al., 2004, Dev. Biol.)。過剰肢付加モデルは本研究を推進したグループを含む研究チームが構築したものである。この過剰肢付加モデルの表現型は下図に示す通りである。過剰肢を得るためには基本的に、神経+皮膚損傷が必要である。皮膚損傷だけでは単純な皮膚修復反応しか起こさない。しかし、そこに神経の参画があると、皮膚修復反応は四肢の再生反応へと転



過剰肢付加モデルにおける典型的な表現型。上腕より過剰な四肢を生じる

換し損傷部より過剰な肢を形成するに至る。この実験系の優れた点は、四肢にある種々様々な構成成分のうちから、神経と皮膚の二つに絞って再生の開始を研究できることにある。この利点を生かし、非常に精力的に研究を推進することができている。

過剰肢付加モデルにおいて過剰肢を得るには皮膚損傷が必要であるが、その皮膚は「四肢」由来である必要がある。例えば、四肢の皮膚を頭部などの他の部位の皮膚と取り換えておくと、四肢再生反応は途中で停止し、四肢の再生は失敗に終わる(Thornton, 1962, J. Exp. Zool.)。この事は「四肢」という位置情報を持つ皮膚が、最終的に「四肢」

を再生するという事に必要であること意味すると思われる。過剰肢の組織構成を見てみると、皮膚神経意外にも通常の四肢にある構成成分はすべて観察できる。神経や皮膚以外のその他組織については、四肢由来である必要があるかどうかの情報はほとんどない。再生体(再生芽という構造を指す)に正しい位置から、正しい構造を再生させる事は、ある意味当たり前の事ではあるが非常に根源的な問題である。四肢の切断面に尻尾が生えてきては困るわけであり、細胞は何らかの位置情報を受け取り、正しい位置から正しい構造を再生させている事が伺われる。本研究は位置情報を担う役割という観点から、再生における筋肉細胞の役割を検証したものである。

### 2. 研究の目的

四肢に存在する最も大きな組織として筋肉を挙げることができるだろう。過剰肢においても通常師と同様に筋肉は形成される。これまでの四肢再生研究では筋肉細胞の挙動にはあまり大きな焦点を当ててこられなかった。本研究では四肢再生における筋肉細胞の挙動に焦点を当てた。

四肢再生時において、皮膚(真皮)の繊維芽細胞は四肢由来である必要性がある事は古くから知られている(Thornton, 1962, J. Exp. Zool.)。四肢に最も存在感を以てある筋肉については、再生時に四肢由来である必要性があるかどうかは不明であった。本研究は筋肉細胞の由来について、四肢由来である必要があるかどうか?という部分に焦点を当てた。また、これまで筋肉の挙動を調べるうえで分子生物学的なマーカー遺伝子等の単離がなされていなかったため、その部分においても実験を行った。以上の結果から、筋細胞の四肢再生時における挙動や異議を論じる事ができるようになった。

### 3. 研究の方法

上記研究目標を達成するために以下2つに大別する方法で行った。

#### (1) 過剰肢付加モデルの改良による筋細胞の挙動解析

過剰肢付加モデルは原則的には「皮膚損傷+神経」で完遂される。損傷皮膚と神経の関係だけで再生反応が惹起され、深層組織から筋細胞の参画を促す。この際に、深層組織が四肢由来である場合は、すべての再生参加細胞が四肢由来になる。筋肉細胞は再生反応が起こったのちに、2次的に侵入してゆく集団とされている。よって、再生の開始を四肢以外のところで励起できれば、四肢以外の金組織からの筋細胞の供給が可能になると考えた。そのため、過剰肢付加モデルの四肢以外の領域での応用を試みた。結果は以下に記する。

## (2) 筋細胞マーカー遺伝子の単離による四肢再生時における筋細胞の動態解析

有尾両生類(メキシコサラマンダ)の遺伝子情報はまだ整備されていない。筋細胞マーカー遺伝子の単離もほとんど行われていない。そこで、多種の遺伝子情報を基に、いくつかの遺伝子の単離を試みた。単離した遺伝子は MyoD, Myogenin, Cardiac Actin, Myosin heavy chain である。この内前者2つは発現解析である in situ hybridization において有効な染色パターンを検出できなかったため使用しなかった。解析は後者2つを以て行った。

また、筋細胞動態の解析のために抗体を用いた免疫染色も行った。

## (3) 筋細胞の侵入阻害実験

筋細胞の四肢フィールドへの移入は HGF シグナリングによって支配されている事は明らかにされている。HGF シグナリングを遮断することによって筋細胞の再生フィールドへの侵入を阻害する実験を行った。シグナリングの遮断には HGF 阻害剤である c-Met Kinase inhibitor II (Calbiochem, 0.9 $\mu$ M) を用いた。

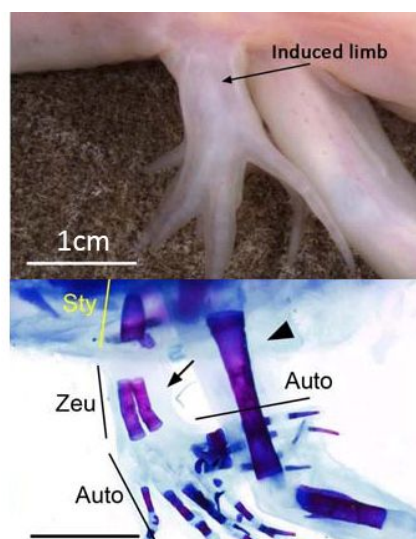
## 4. 研究成果

### (1) 過剰肢付加モデルのわき腹/尻尾領域への応用

四肢以外の筋肉が再生に参画できるかどうかを検証するために、過剰肢をわき腹領域に誘導することを試みた。わき腹領域に皮膚損傷を与え、四肢から神経を遊走させてもすべてのケースで、四肢再生は惹起できなかった。この際には、ある肉塊のようなふくらみは形成されるものの、伸長するなど四肢再生に向けた持続的な伸長反応は見られなかった。もともと、皮膚は四肢由来であることが必須であることが報告されており、わき腹の皮膚では四肢形成をサポートできないという結果は先の報告に矛盾しないものと考えられる。そこで、四肢の皮膚をわき腹損傷と同時に移植することで改善を試みた。結果、誘導効率は低いものの、わき腹に四肢を異所的に誘導することができるようになった。ただし、20%程度の低い四肢誘導率であった。この低い誘導効率を改善するためにレチノイン酸を使用した。レチノイン酸は四肢発生・再生時に様々な生理活性を持つ物質として知られている(Maden, 2002, Int. J. Dev. Biol.)。このレチノイン酸を過剰肢誘導の手術と同時期に導入することで、過剰肢形成効率の大幅な改善を見ることができた(55%)。形成されたわき腹誘導肢は右図のようなものである。

異所的に形成された四肢は、組織染色や免疫染色によって検証を行ったところ、筋肉を含め通常の四肢に必要な構成成分が存在している事を確認した。

筋細胞の存在は、わき腹筋組織から供給さ



わき腹に誘導された過剰肢。

(上)背側から見た図。(下)骨格をアリザリンレッドを用いて可視化したもの。レチノイン酸を用いたため、多指の形態を示している。

れた筋細胞が、四肢の形成に参画し筋形成を行ったという事を強く示唆するものである。四肢由来の筋組織でなくとも、四肢形成に参画できる可能性が高い。

### (2) 筋特異的遺伝子発現パターンの検証

筋肉の形成過程を検証してゆく上で、指標となる筋特異的なマーカー遺伝子がメキシコサラマンダでは単離されておらず、先述の4遺伝子について単離を試みた。実際の検証には Cardiac Actin を筋細胞の分化初期から後期マーカー遺伝子として、Myosin Heavy Chain (MHC) 遺伝子を後期マーカー遺伝子として使用した。

過剰肢における発現パターンを検証したところ、Cardiac Actin 遺伝子は再生体(以下再生芽と呼ぶ)の間充細胞全般にわたって発言を観察できた。後期になると、過剰肢の背側腹側に限局した発現パターンを呈するようになった。MHC 遺伝子に関しては初期には発現を認めることができなかったが、後期には Cardiac Actin 遺伝子と同領域において発言を見ることができた。これらの遺伝子発現パターンは、通常の切断肢における両遺伝子発現パターンと矛盾ないものであった。このことから、わき腹過剰肢における筋細胞形成過程は、切断によって引き起こされる四肢再生時におけるものと同じであることが強く示唆された。

### (3) 筋肉移動の阻害実験

上記二点の実験結果の意義について述べる。まず四肢筋組織以外の筋組織から供給された筋肉細胞であっても四肢再生に参画できる事は実験1から示唆される。加えて、実験2からは過剰肢における筋形成が、通常の再生過程と同じプロセスによって形成され



るであろうことを強く伺わせる。上記2点に加えて、尻尾の筋肉が過剰肢形成に参画できるという実験結果を入れていたが、論文の投稿過程において削除を求められた。よってこの報告書においても、ピアレビューを通過しなかったデータ故に、一文で述べるにとどめる。投稿過程でさらに求められた実験として、過剰肢に移入する筋細胞の移動メカニズムが、他の高等脊椎動物の四肢発生過程で報告されている HGF-cMet シグナリングによって制御されるかどうかという問いであった (Christ and Brand-Saberi, 2002, Int. J. Dev. Biol.)。この実験は過剰肢を使用したほうが良いが、わき腹に過剰肢をはやした動物を多く作成し、逐一見てゆくためには膨大な生命を消費せねばならない。目的のために最小限の生命の消費ですむように、実験3は通常の切断肢を用いた実験系で行った。

切断肢を阻害剤で処理したところ、筋細胞が再生芽中に観察できなくなった。移動性の筋細胞は PAX7 遺伝子の発現を以て観察できるが、この PAX7 陽性の細胞はコントロールでは観察できるものの、実験区では観察できないことが分かった。この事は、他の高等脊椎動物同様に HGF-cMet シグナリングが筋細胞の移動を制御し、再生芽中への筋細胞の移入をコントロールしている事を示唆するものであると考える。

以上の結果から、筋肉に関しては四肢再生過程において四肢に由来する必要はないという事を強く示唆するものである。筋細胞は皮膚繊維芽細胞等由来の再生芽細胞が作り出した、四肢の Blueprint に従って再生芽内に配置させられることが伺われる。

以上の結果を進化的側面から考察する事ができると考える。一連の実験結果は、筋肉は、従属的に移動し、移動先でパターン形成を行えるというものであると考えられる。とすれば、先んじて肢芽のような筋肉に対する誘因力のある構造ができれば、どこにでも有肉の構造は作り出しうる。これを例えばシラカンスなど背側などに筋肉を含む突起構造を有する動物に当てはめることができるだろう。突起構造ができる事、また、そこに HGF シグナリングによる筋誘引の要因が付加されるという2つを満たすことで、動物は突起物に動かすことができる(つまり有肉の)構造を付加することができるようになったのではないだろうか?今後、この成果を進化的側面などから展開してゆく面白いと考えている。

## 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1件)

Ayako Hirata, Aki Makanae, Akira Satoh,  
“Accessory limb induction on flank region and its muscle regulation in axolotl”, *Developmental Dynamics*, 242(8), 932-940, 2013

〔学会発表〕(計6件)

(主な発表)

平田絢子、蒔苗亜紀、佐藤伸、Ectopically induced limb on a flank possesses non-limb derived muscles in *Ambystoma mexicanum*, 日本発生生物学会、2011

平田絢子、佐藤伸、ウーパールーパー四肢再生における筋形成、集まれ!理系女子 第4回女子生徒による科学研究発表交流会、2012

佐藤伸、蒔苗亜紀、Finding molecular triggers of limb regeneration in axolotls, 日本発生生物学会、2013

〔図書〕(計1件)

Akira Satoh, Chapter 14, *New principles in Developmental Processes*, A. Kuroiwa and H. Kondoh ed. 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://organregeneration.jimdo.com/>

## 6. 研究組織

(1)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 (RCIS)・准教授

研究者番号: 90512004

