

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07075

研究課題名(和文) 器官再生における体細胞リプログラミング機構の解明

研究課題名(英文) Investigating cellular reprogramming process during disc regeneration in *Drosophila melanogaster*

研究代表者

勝山 朋紀 (Tomonori, Katsuyama)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任助教

研究者番号：70400273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、翅成虫原基内で隣接するpouch領域とhinge領域に着目し、pouch領域切除後、hinge細胞がどのようにしてpouch領域を再構築するのか明らかにすることを目指した。器官再生プロセスを発生と切り離して解析するために、*erg2*酵母を用いて蛹化を抑制した幼虫を用いた。Pouch領域に損傷を加えると、hinge領域を含む損傷部位周辺領域の細胞で細胞周期re-entryが起こり、細胞の形態を変えpouch方向へ移動する様子が観察された。また、翅成虫原基で特徴的な発現パターンを示す *Wingless* の発現パターンが、損傷後約72時間かけて再構築されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to uncover the molecular mechanism of cellular fate reprogramming during disc regeneration. We focused on two adjacent regions in wing discs, pouch and hinge, and questioned how the hinge cells are changed to pouch cells when pouch region is lost. The larval development was dietary-arrested at the end of third instar not only for using the mature wing discs that have clear pouch and hinge subdivisions, but also for long monitoring of regeneration process. We observed that the cells in hinge region become proliferative upon pouch ablation, and the lost pouch region is eventually reconstructed. In addition, we demonstrated that the patterned expression of *Wingless* (*Wg*) that disrupted by pouch ablation was gradually reconstructed in 72 hours after ablation. These results suggest that the arrested larvae retain the ability for disc regeneration, and that the cells from hinge region most likely contribute to rebuild pouch region.

研究分野：発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ 成虫原基 再生 細胞リプログラミング 細胞運命 決定転換

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエ幼虫体内に存在する成虫原基には高い再生能があり、有尾両生類の四肢再生や硬骨魚のひれ再生と同様のプロセス（付加形成）をたどることから、器官再生モデルとして古くから研究が盛んに進められてきた。当研究の開始までに、傷害を受けた成虫原基における再生プログラムの開始には、一過的なJNK シグナリングの活性化が必要不可欠であること（Galko and Krasnow, 2004; Bosch et al, 2005 & 2008）、さらに研究代表者のこれまでの研究より、再生芽形成に必要な増殖を促すシグナリング経路として、JNK シグナリングの下流でJAK/STAT シグナリングとWg シグナリングが協調的に働いていること（図1, Katsuyama et al, 2015）がそれぞれ示されていた。しかし、このように再生初期に働く遺伝子やシグナルリングカスケードが徐々に明らかになってきているのに対し、再生中・後期に損傷周辺の細胞により構成される再生芽で起こる細胞リプログラミングの理解は、他のモデル動物の付加形成研究も含めてほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ成虫原基の再生をモデルに、細胞リプログラミングに関わる遺伝子の探索とその機能解析を通してその機構を明らかにすることを目的とする。研究代表者は、翅成虫原基内で隣接する二つの領域、wing pouch(翅を形成する領域)とwing hinge(pouchを取り囲むように位置し、翅の付け根を構成する領域)に着目し、pouch細胞を切除後にhinge細胞がどのような遺伝子発現やエピジェネティック制御の変化を経てpouch細胞を再構築するのかを明らかにする。また、遺伝学的研究に適したショウジョウバエの優位性を利用し、大規模な遺伝子スクリーニングを展開する予定である。

3. 研究の方法

本研究では、成虫原基の断片化や移植といった煩雑で細密な手技を伴う、古くから行われてきた実験系ではなく、より簡便に遺伝子操作に基づく細胞損傷による成虫原基再生実験系（genetic ablation系, Smith-Bolton et al, 2009; Bergantiños et al, 2010）を改良して応用する。すでに、genetic ablation 系での成虫原基の再生においても、損傷部位周辺の細胞がJNK シグナリングの活性化依存的に領域を超えて再生に寄与していることが示されている（Herrera et al, 2013）。このことは、周辺の細胞が同様の付加形成プロセスを経て損傷部位再生に働いていることを意味しており、この系を用いて細胞リプログラミングに焦点を当てた研究を展開できることを示唆している。さらに本研究では、再生に関わる遺伝子が再生過程のどの段階で必要とされるのかを細かく分類するために、再生過程を長期に渡り観察する必要がある。また発生個体中での

再生では、細胞増殖など発生と再生に共通なプロセスを区別できないだけでなく、成虫原基の発生に必要な遺伝子は発生個体中の再生スクリーニングで評価することができない。これらの問題に対し、研究代表者はユニークな方法で解決に導く。すでに研究代表者は、エサに用いる酵母の種類（*erg2Δ*）により蛹化に必要なエクジソン合成を阻害し幼虫を最終齢でとどめることができ、*in vivo* の器官再生においても再生に伴う細胞増殖と発生による細胞増殖とを区別できることを見出している（Katsuyama and Paro, 2013）。*erg2Δ* 酵母の作用はショウジョウバエの遺伝型によらないので、本研究の genetic ablation 系にも組み合わせることができる。そして、本研究でその機構を解明しようとしている、失われた pouch 細胞が hinge 細胞のリプログラミングにより再生される過程を、発生と切り離して十分に追うことが可能となる。

4. 研究成果

【細胞リプログラミングプロセスに焦点を当てた成虫原基再生実験系の確立】

本研究では、再生中の細胞リプログラミングプロセスを可視化できる実験系の確立を目指した。具体的には、ショウジョウバエ研究の利点である多彩な遺伝子発現制御システムを組み合わせ、wing pouch 細胞と hinge 細胞において独立した遺伝子操作を行い、wing pouch 細胞を遺伝学的に死滅させ、一方で永続的に蛍光（例：GFP）標識した hinge 細胞の再生過程における挙動をトレースする。さらに、Hinge 由来の細胞がリプログラミングし pouch 細胞に運命転換された際には別の蛍光（例：RFP）を発するようにしておき、再生した wing pouch 領域が（GFP + RFP =）黄色になるようにデザインし、実験系の確立を行なった。また、本実験系のために、翅成虫原基の wing pouch 領域と hinge 領域でそれぞれ特異的に発現する遺伝子 *defective proventriculus*, *teashirt* より、エンハンサー配列領域をそれぞれ同定した。さらに、研究代表者は両エンハンサーが、発生を最終齢（三齢）幼虫後期で停滞させた幼虫の成虫原基においても領域特異性を維持したまま活性化し続けることを明らかにした。

続いて、本研究で重要な役割を担う *erg2Δ* 酵母により幼虫の蛹化を抑制する実験系を用いて、実際に再生中の細胞リプログラミングが見られる系であることを確認した。発生停滞中の幼虫の翅成虫原基において、wing pouch 領域を遺伝学的に損傷除去すると、確かに hinge 領域を含む損傷周辺領域の細胞で顕著な細胞周期 re-entry と損傷部位を塞ぐように進む細胞移動が観察された。さらに、成虫原基の再生の指標として、翅成虫原基の傷害部位を含む領域で特異的な発現パターンを示し、成虫原基の細胞増殖や領域区画化に関わる Wingless (Wg, Wnt1 ホモログ) を用い、wing pouch 領域損傷後に発現パターン

が再構築される過程を継時的に調べると、本実験系では、傷害により失われた Wg 発現パターンが 48~72 時間かけて完全にパターンが再構築されることを明らかにした。一方、wing pouch 領域から出た大量の死細胞は、その大半が除かれることなくその場所にとどまっており、再び出来上がった原基細胞層と囲芽膜 (peripodial membrane) との間の原基腔内に残っていた。

【翅成虫原基創傷後に上昇する遺伝子プロファイルと新規再生関連遺伝子の同定】

上記実験と並行して、損傷した成虫原基において発現誘導される遺伝子をマイクロアレイ発現解析から同定した。この中には、すでに成虫原基損傷に応じて発現誘導されることが報告されていた Unpaired サイトカイン (Upd3、IL-6 ホモログ) やインシュリン様ペプチド (Dilp8) に加えて、これまで器官再生への関与が知られていない遺伝子や、機能の全く知られていない遺伝子が多数抽出された。成虫原基再生に関わる候補遺伝子を絞り込むために、翅成虫原基において一過性の傷害誘導と各候補遺伝子の RNAi による遺伝子ノックダウンを独立に操作し、組織修復不良の結果成虫の翅の回復率に影響を及ぼす因子を探索した。その結果、基底膜の主要構成因子の一つである Nidogen を同定した。

細胞外マトリックスである基底膜の主要構成因子は、ショウジョウバエとほ乳類で高く保存されている。ショウジョウバエでは、基底膜は成虫原基など各器官を包み込む形で形成され、細胞表面に近いほうから順にラミニン層と IV 型コラーゲン層の 2 層の網目構造から成る。Nidogen は 2 層の間に局在してラミニンと IV 型コラーゲンにそれぞれ結合し、両層を繋ぎ止める働きがある。幼虫期の IV 型コラーゲンは主に脂肪体によって合成されており、成虫原基など他の器官は、幼虫体内を満たす体液 (ヘモリンフ) 中に放出された IV 型コラーゲンを取り込んで基底膜を形成する。また、傷害を受けた成虫原基では、JNK シグナリングの下流で発現誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼ (Mmp1) により IV 型コラーゲン層の分解が起こり、結果として、損傷部位周辺の細胞に創口を塞ぐための細胞移動や細胞形状の変化を可能とさせる柔軟性を与えることが知られている。実際に、我々の成虫原基マイクロアレイ発現解析においても、傷害により Mmp1 の有意な発現上昇が認められた。今回我々は、この条件下において同時に Nidogen 発現レベルの上昇を確認しており、この結果は、傷害を受けた成虫原基では基底膜を壊すだけでなく再構築するための動きがすでに始まっていることを示唆するものである。

続いて、傷害を加えた後の再生中成虫原基の基底膜について、その構成因子であるラミニン (Laminin B1)、IV 型コラーゲン (Viking) そして Nidogen の局在と動態を経時的に解析

した。その結果、傷害を受けた成虫原基の基底膜上ではラミニン層に変化は見られないが、損傷部位周辺において IV 型コラーゲン層の消失が確認された。また、Nidogen については、遺伝子発現上昇の結果と矛盾することなく、損傷に応じて基底膜上に高レベルに発現集積することが明らかとなった。次に、消失した IV 型コラーゲンが再生中に回復するのかどうかについて、その動態を経時的に調べたところ、驚くべきことに、24 時間後にはすでに IV 型コラーゲン層が再構築されることが明らかとなった。このことから、傷害を受けた成虫原基は、IV 型コラーゲン層を壊すとともに、体液中に存在する IV 型コラーゲンを効率良く呼び込み再び基底膜を再構築する必要があり、そのために Nidogen の発現増加が一翼を担っている可能性が示唆された。また、IV 型コラーゲン層の再生が Wg 発現の再パターンニングに先立って起こること、さらに前述の Nidogen ノックダウンによる翅再生不良の結果を併せて考えると、基底膜の再編は、再生のための細胞増殖や領域区画化に関わるモルフォゲンの拡散を調節するための重要プロセスと考えられる。現在、これらの可能性について答えを得るために、Nidogen 機能欠失変異体を用いて解析を進めている。

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 6 件)

Masuko K, Fuse N, Komaba K, Katsuyama T, Nakajima R, Furuhashi H, Kurata S. winged eye induces transdetermination of *Drosophila* imaginal disc in concert with a histone methyltransferase, Su(var)3-9. *Cell Rep.*, 22: 206-217, 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.105, 査読有

Katsuyama T* and Paro R. Imaginal disc transplantation in *Drosophila*. In: Lanzuolo C and Bodega B (ed) Polycomb Group Proteins: Methods and Protocol, *Methods Mol Biol*, Humana Press, 1480:301-310, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-6380-5_26, 査読無

Akmammedov A, Katsuyama T, and Paro R. A rapid TALEN assembly protocol. In: Lanzuolo C and Bodega B (ed) Polycomb Group Proteins: Methods and Protocol, *Methods Mol Biol*, Humana Press, 1480:269-281, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-6380-5_23, 査読無

勝山朋紀, 三浦正幸. 発生, 組織修復, 再生におけるアポトーシスの役割. 田中正人, 中野裕康 編集, 実験医学 2016 年

4月増刊号,「細胞死 新しい実行メカニ
ズムの謎に迫り疾患を理解する」,
<https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758103541/>, 査読無

西内 久美子 (NISHIUCHI Kumiko)

Kashio S, Obata F, Zhang L, Katsuyama T,
Chihara T, Miura M. Tissue nonautonomous
effects of fat body methionine metabolism
on imaginal disc repair in *Drosophila*. *Proc
Natl Acad Sci USA*, 113: 1835-1840, 2016,
doi: 10.1073/pnas.1523681113, 査読有

Katsuyama T, Comoglio F, Seimiya M,
Cabuy E, Paro R. During *Drosophila* disc
regeneration JAK/STAT coordinates cell
proliferation with Dilp8-mediated
developmental delay. *Proc Natl Acad Sci
USA*, 112: E2327-2336, 2015, doi:
10.1073/pnas.1423074112, 査読有

[学会発表](計4件)

Katsuyama T, Kashio S, Zhou M, Miura M.
“A role of Nidogen in the reorganization of
basement membrane during imaginal disc
regeneration”, The 25th European
Drosophila Research Conference, 2017,
Imperial College London, London, United
Kingdom.

Katsuyama T, Kashio S, Zhou M, Miura M.
“A role of Nidogen in the reorganization of
basement membrane during imaginal disc
regeneration”, The 4th Asia-Pacific
Drosophila Research Conference, 2017,
Osaka-Univ., Osaka, Japan.

勝山朋紀, 櫻尾宗志朗, 周曼迪, 三浦正幸,
“Determining molecular mechanisms for
tissue non-autonomous responses to disc
damage in *Drosophila melanogaster*”, 第12
回日本ショウジョウバエ研究会, 2016,
立教大学, 東京.

周曼迪, 勝山朋紀, 櫻尾宗志朗, 三浦正幸,
“Establishing a system for investigating
cellular reprogramming process during disc
regeneration in *Drosophila melanogaster*”,
第12回日本ショウジョウバエ研究会,
2016, 立教大学, 東京.

6. 研究組織

(1)研究代表者

勝山 朋紀 (KATSUYAMA, Tomonori)
東京大学・大学院薬学系研究科・特任助教
研究者番号: 70400273

(2)研究協力者

櫻尾 宗志朗 (KASHIO Soshiro)
周 曼迪 (Zhou, Mandi)
船越 政史 (FUNAKOSHI Masabumi)