

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08467

研究課題名(和文) イモリとマウス心臓の再生能力を規定するシグナルと心筋細胞の応答能の解明

研究課題名(英文) Study of a signaling system responsible for the capability of the cardiac regeneration and response capacity of their cardiomyocytes

研究代表者

林 利憲 (Hayashi, Toshinori)

広島大学・両生類研究センター・教授

研究者番号：60580925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々は、イモリが心臓を再生するメカニズムの解明を目的とした研究を行った。その結果、イモリとマウスにおいてcyclin D1遺伝子の転写調節活性がある領域を見出すとともに、その転写活性をtdTomato遺伝子のmRNA量の変化で検出する方法を確立した。さらに、再生時における細胞周期制御因子の発現量の変化を解析した。加えて、イモリの心臓に凍結損傷を与えて再生を誘起する方法を確立した。さらに、イモリの遺伝子モデル作成やインジェクションプロトコルの改良、イモリへのCRISPR/Cas9法の導入など、イモリのモデル実験系とバイオリソースの整備を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、イモリとマウスの心臓における再生能力の違いについて、心筋細胞の増殖能の違いに着目して研究を行った。細胞増殖進行の鍵となるcyclin Dという、イモリとマウス共通の遺伝子の機能に着目することで、異なる動物間での比較研究により再生能力を明らかにしていくための道を開いた。

同時に、本研究で整備されたイベリアトゲイモリの実験系やバイオリソースは、再生現象にとどまらず、様々な研究に活用されていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed research aimed at elucidating the mechanism by which the amphibian newt regenerate the heart. In the results, we found a region with transcriptional regulatory activity of cyclin D1 gene in the newt and the mouse, and established a method to estimate the transcriptional activity of the cyclin D1 by the change of mRNA level of tdTomato gene. We analyzed changes in the expression levels of the cell cycle regulators during regeneration. In addition, we developed a cry-damage methods for inducing cardiac regeneration in the newts.

Moreover, in order to polish the model experimental system and bioresources of the newt, we have developed or improved the Gene model, CRISPR/Cas9 for the newts, and high-efficient microinjection protocol.

研究分野：再生生物学

キーワード：イベリアトゲイモリ cyclin D 心臓再生 心筋細胞 新規モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有尾両生類に属するイモリは、これまでに知られている脊椎動物の中で最も強い再生能力を持ち、四肢や尾に加え、角膜、水晶体や網膜などの眼の組織、脊髄や脳、さらには心臓に至るまで、様々な部位を再生する。これに対して、ヒトやマウスといった哺乳類の再生能力は限定的であり、たとえ損傷を受けても心臓を再生することはできない。

どうしてイモリは心臓を再生でき、マウスはできないのか？一般に体の部位を再生する能力は動物の生存にとって有利であると考えられるにも関わらず、なにゆえ動物間でそのキャパシティに違いがあるのだろうか。このような、動物間における再生能力の差異を決定づけている機構を明らかにすることは、再生現象を理解していく上で不可欠であり、そのためには動物の種間を超えた比較研究が求められる。

しかしながら、イモリとマウスのように大きく異なる動物の間で比較研究を行うためには、(1)それぞれの動物について、心臓の損傷後に細胞レベルでどのような応答が起こるのかを詳細にふまえた解析が必要である。その上で(2)その応答のどの段階に注目すれば意味のある比較ができるのか？さらには、(3)動物種間の比較可能な実験系をどのように準備するのが重要である。

そこで本研究では、研究代表者自らが中心となって開発してきた新規モデル動物であるイベリアトゲイモリを使い、心臓損傷後における心筋細胞の増殖制御に着目した心臓再生機構の研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、再生可能なイモリ的心臓では損傷後の心筋細胞の増殖が起こる一方で、再生できないマウス的心臓では心筋細胞自体の増殖が起こらない点に注目した。そして、このような心筋細胞の増殖能力の違いにより再生能力の有無が生じると考えた。そこで、心臓再生を可能とする機構を解明することを目指して、心室損傷時において、イモリ的心筋細胞が増殖を開始の機構に焦点を絞った研究を行った。特に、cyclin D 遺伝子を初めとする、細胞周期制御因子の転写調節機構の解明に向けた解析を行った。

また背景の項で述べたように、マウスを始め他のモデル動物と直接比較が可能な実験結果を得て、イモリを用いた研究を加速するためには、イモリのモデル実験系とバイオリソースの整備が重要であるため、これらの研究基盤の整備も同時に行った。

3. 研究の方法

上の目的を達成のため以下の研究項目を実施した。

(1) レポーターイモリとレポーターマウスによる cyclin D1 遺伝子の発現解析

心筋細胞を含め、細胞は細胞周期と呼ばれるステップが進行することによって増殖する。この細胞周期の開始に重要な役割を果たす cyclin D1 遺伝子について、その発現を制御する DNA 配列を同定する目的で、イモリとマウスそれぞれについて、cyclin D1 タンパク質のコード領域の上流側を蛍光タンパク質の遺伝子に繋いだ遺伝子コンストラクトを遺伝子導入した個体を作成した。これにより cyclin D1 遺伝子の発現を可視化したマウスとイモリを用いて、その詳細な発現パターンと、転写制御を担う DNA 領域を解析した。

(2) 凍結損傷法の確立

マウスとのより直接的な比較を目指して、マウス的心臓損傷法と同様の手法をイモリに適用するための手術法を検討した。マウス的心臓損傷方法には、冠動脈の結紮法と液体窒素による凍結傷害法があるが、イモリには凍結が適していると考え、実際の手術法を確立した。

(3) モデル実験系とイモリリソースの整備

マウスを始め、他のモデル生物から得られているデータとの比較研究を行う上で、遺伝子発現情報をバイオインフォマティクスにより解析する手法が極めて強力である。しかしそのような解析を行うためには、参照となるイベリアトゲイモリの遺伝子の配列情報が求められる。イベリアトゲイモリは新規のモデル動物であるため、遺伝情報が未整備であったため、網羅的な RNA セークエンسを行い、イモリの遺伝子データベースの整備を行った。

また、イモリを用いた研究を進めていく上で基本的な技術であるマイクロインジェクション法の改良を行うとともに、他の研究に研究材料となるイモリを提供するためのバイオリソースの拡充を行った。

4. 研究成果

(1) cyclin D1 遺伝子の転写制御領域の同定と、q-PCR による発現パターンの評価

心筋細胞の増殖に重要な役割を果たす cyclin D1 遺伝子の発現を蛍光タンパク質により可視化できるマウスとイモリを用いて、その詳細な発現パターンを解析した。その結果、イモリとマウス、いずれも cyclin D1 遺伝子上流側 5 に転写調節活性がある領域を見出すとともに、その転写活性を tdTomato 遺伝子の mRNA 量の変化で検出する方法を確立した。加えて、本研究で作

成したイベリアトゲイモリの遺伝子カタログ(項目3)を利用して、イモリの主要な細胞周期制御因子の、心臓再生過程における発現パターンを詳細に解析した。

(2) イモリ心臓の凍結損傷法の開発

これまでイモリの心臓再生は、心室の先端部を外科的に切除する方法で誘起されてきた。この方法では、切除とともに大量の出血が起こるため、イモリ個体への負担が大きい。また、マウスやラットで行われている心臓の損傷法とは大きく異なる。そこで、マウスで広く行われている液体窒素による凍結損傷による再生誘起法をイモリに適用した。

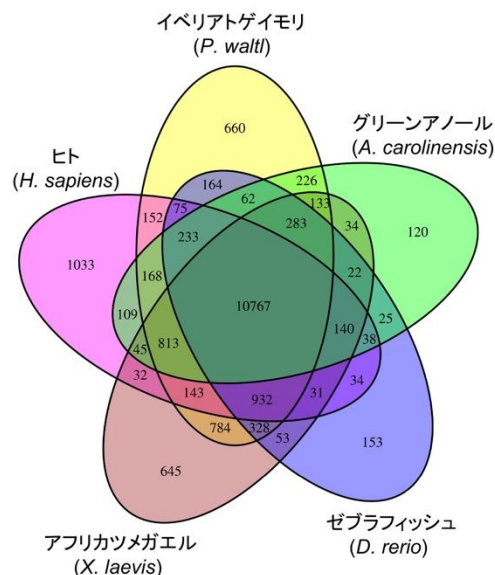
その結果、凍結損傷を受けたイモリの心臓は、4週間程度で再生することが確認できた。また、この方法では手術時にほとんど出血が起こらないためイモリの生存率(手術の成功率)が高く、実験個体へのダメージも少ないと考えられる。これにより、マウスにより近い条件で心臓損傷モデル間の比較が可能となった。また、従来の心室切除と、凍結損傷法それぞれの試料から、発現しているRNAの発現情報を次世代シーケンサーにより網羅的に取得した(論文投稿準備中)。

(3) モデル実験系整備とイモリリソース化

イモリの遺伝子カタログの作成

イモリの遺伝情報データベースを作成するために、複数の研究機関に跨る共同研究グループを結成した。グループに参加する研究者により、イベリアトゲイモリの様々な臓器や異なる発生段階の胚で発現しているRNA-seqデータが収集された。これをもとに、イベリアトゲイモリの遺伝子モデルを構築した。このモデルを検証したところ、イベリアトゲイモリが保有する全遺伝子の約98%をカバーする網羅性の高い高品質の遺伝子カタログであることが確認され、インフォマティクス解析の重要なリファレンスとなることが示された(国際科学雑誌に発表)。

右図にイベリアトゲイモリとヒトなど他の脊椎動物との遺伝子レパートリー比較の結果を示す。魚類から哺乳類まで、それぞれの代表となるモデル動物を選び、イベリアトゲイモリとの間でどの程度の遺伝子群を共有するのか、イベリアトゲイモリ固有の遺伝子はどの程度存在するのかを解析した。



マイクロインジェクション法の改良

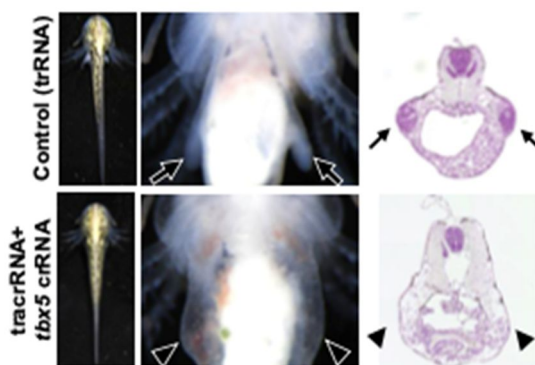
受精卵に対するマイクロインジェクションはゲノム編集を含むイモリの遺伝子操作技術の基礎となる。より効率的、かつ簡便で低コストでのインジェクションが可能となるように改良した方法を国際科学雑誌に発表した。

イモリに対するCRISPR/Cas9法の確立

広島大学の山本、鈴木らと共同で、イモリの受精卵に対するマイクロインジェクション操作を介して、インジェクションを行った初代個体(F0個体)の世代で遺伝子ノックアウトの表現型解析が可能であることを示した(国際科学雑誌にて発表)。この方法は、CRISPR/Cas9をマイクロインジェクションされた個体の標的遺伝子を99%以上の効率で破壊できることが明らかとなった。

本研究成果は「1週間でできるゲノム編集」として日経サイエンス誌に紹介された。

右図は、*tbx5* 遺伝子をCRISPR/Cas9によってノックアウトしたイモリ(下段)と対照個体(上段)。*tbx5* 遺伝子のノックアウトにより心臓の形成が阻害されることが示された



イモリバイオリソースの整備と提供

代表者が所属する研究室において繁殖したイモリ個体を国内の研究者に提供した。本研究の期間内で延べ100件以上の提供を行った。特に研究期間の3年目以降は、現在の所属である広島大学両生類研究センターにおいて、イベリアトゲイモリのバイオリソースを充実させた。

さらに、イモリの研究情報を公開するためのポータルサイト(iNewt)を開設した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsunami Masatoshi, Suzuki Miyuki, Haramoto Yoshikazu, Fukui Akimasa, Inoue Takeshi, Yamaguchi Katsushi, Uchiyama Ikuo, Mori Kazuki, Tashiro Kosuke, Ito Yuzuru, Takeuchi Takashi, Suzuki Ken-ichi T, Agata Kiyokazu, Shigenobu Shuji, Hayashi Toshinori	4. 巻 26
2. 論文標題 A comprehensive reference transcriptome resource for the Iberian ribbed newt <i>Pleurodeles waltl</i> , an emerging model for developmental and regeneration biology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 217 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsz003	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 Koriyama Kazuki, Sakagami Risa, Myouga Ayumi, Hayashi Toshinori, Takeuchi Takashi	4. 巻 247
2. 論文標題 Newts can normalize duplicated proximal-distal disorder during limb regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1276 ~ 1285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.24685	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 Suzuki M., Hayashi T*, Inoue T., Agata K., Hirayama M., Suzuki M., Shigenobu S., Takeuchi T, Yamamoto T., and Suzuki KT*.	4. 巻 447
2. 論文標題 Cas9 ribonucleoprotein complex allows direct and rapid analysis of coding and noncoding regions of target genes in <i>Pleurodeles waltl</i> development and regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 127-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.09.008.	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 Ayano Hirako, Yuki Takeoka, Toshinori Hayashi, Takashi Takeuchi, Satoshi Furukawa, and Akihiko Sugiyama	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of cadmium exposure on Iberian ribbed newt (<i>Pleurodeles waltl</i>) testes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Toxicol Pathol.	6. 最初と最後の頁 345-350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2017-0032	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 竹内 隆、林 利憲	4. 巻 68
2. 論文標題 心臓再生が可能な動物と不可能な動物のモデル - その比較から心臓再生を理解する	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 569-573
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 -

1. 著者名 Hayashi T, Nakajima M, Kyakuno M, Doi K, Manabe I, Azuma S, Takeuchi T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Advanced Microinjection Protocol for Gene Manipulation Using the Model Newt <i>Pleurodeles Waltl</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Dev Biol .	6. 最初と最後の頁 280-286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1387/ijdb.180297th.	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 -

1. 著者名 Abe Gembu, Hayashi Toshinori, Yoshida Keigo, Yoshida Takafumi, Kudoh Hidehiro, Sakamoto Joe, Konishi Ayumi, Kamei Yasuhiro, Takeuchi Takashi, Tamura Koji, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 100
2. 論文標題 Insights regarding skin regeneration in non-amniote vertebrates: Skin regeneration without scar formation and potential step-up to a higher level of regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcdb.2019.11.014	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17件（うち招待講演 14件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 林 利憲、客野 瑞月、竹内 隆
2. 発表標題 モデルメモリが可能にする新しい再生医療への挑戦
3. 学会等名 日本動物学会 関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshinori Hayashi, Mie Nakajima, Mitsuki Kyakuno, Ikumi Manabe, Kanako Doi, Takashi Takeuchi
2. 発表標題 Establishment of Newt model using Iberian Ribbed Newt (<i>Pleurodeles waltl</i>) for Regeneration Research and more.
3. 学会等名 International Symposium at Hiroshima University Amphibian development, regeneration, evolution and beyond (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 利憲、客野 瑞月、中島 美英、竹内 隆
2. 発表標題 次世代シーケンスとゲノム編集技術によるイモリの配偶子形成機構の研究
3. 学会等名 第88回日本動物学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 客野 瑞月、佐久間 哲志、鈴木 賢一、山本 卓、野瀬 俊明、恒川 直樹、竹内 隆、林 利憲
2. 発表標題 イモリ始原生殖細胞の決定におけるVASA遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第88回日本動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中島 美英、佐久間 哲志、山本 卓、竹内 隆、林 利憲
2. 発表標題 イモリの持つがん化耐性能力の解明に向けた研究～p53変異体を用いた解析～
3. 学会等名 第88回日本動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshinori Hayashi, Mitsuki Kyakuno, and Takashi Takeuchi
2. 発表標題 New approach toward elucidation of the mechanisms for PGC determination in amphibian newts.
3. 学会等名 The International Research Symposium on Regulation of Germ cell development in vivo and in vitro (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshinori Hayashi, Ayumi Myouga, Eri Tsuchiya, Shohei Azuma Yukio Sato and Takashi Takeuchi
2. 発表標題 Study of cardiac regeneration using new model newt <i>Pleurodeles waltl</i> .
3. 学会等名 Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshinori Hayashi, Ayumi Myouga, Eri Tsuchiya, Shohei Azuma Yukio Sato and Takashi Takeuchi
2. 発表標題 Study of cardiac regeneration using new model newt <i>Pleurodeles waltl</i> .
3. 学会等名 Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 利憲、佐藤 幸夫、竹内 隆
2. 発表標題 「再生できる動物」と「再生できない動物では何が異なるのか？」
3. 学会等名 再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 利憲、茗荷 あゆみ、東 翔平、土屋 絵莉、竹内 隆
2. 発表標題 新規実験モデル動物のイペリアトゲイモリが可能にする新しい再生研究
3. 学会等名 再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshinori Hayashi, Ayumi Myouga, Eri Tsuchiya, Shohei Azuma Yukio Sato and Takashi Takeuchi
2. 発表標題 Cardiac regeneration in newts achieved based on the compensatory manner.
3. 学会等名 ICZ/ZSJ Joint Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 林 利憲、竹内 隆
2. 発表標題 イモリの再生能力を支える機構をマウスとの比較から明らかにする
3. 学会等名 ユニーク動物研究会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 林 利憲、茗荷 あゆみ、土屋 絵莉、東 翔平、竹内 隆
2. 発表標題 イペリアトゲイモリを用いた心臓再生における細胞増殖の制御機構の研究
3. 学会等名 次世代両生類研究会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hayashi T, Kyakuno M, Ikuta H, Manabe I, Takeuchi T
2. 発表標題 Study of the stem cell system from organ regeneration in the newt.
3. 学会等名 International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 利憲
2. 発表標題 イペリアトゲイモリユーザーのためのコミュニティ・リソース
3. 学会等名 第90回日本動物学会大阪大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 利憲
2. 発表標題 イモリが見せる多様な再生様式
3. 学会等名 第2回再生学異分野融合研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 利憲
2. 発表標題 新しいモデル動物、イペリアトゲイモリとイペリアリサーチコンソーシアム
3. 学会等名 第28回琉球実験動物研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木賢一, 鈴木美有紀, 林 利憲	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 16
3. 書名 ゲノム編集実験スタンダード (Crispr:両生類における遺伝子機能解析)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腫瘍を誘導する変異型p53遺伝子	発明者 林 利憲、竹内 隆、梅山 穂香、山 本 卓、佐久間 哲	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-044844	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

iNewt http://www.nibb.ac.jp/imori/main/
--

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
連携研究者	竹内 隆 (Takeuchi Takashi) (70197268)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	