

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19370089

研究課題名（和文） 四肢再生に見る器官再生メカニズムの基盤

研究課題名（英文） The molecular basis of limb regeneration.

研究代表者

田村 宏治 (TAMURA KOJI)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：70261550

研究成果の概要：

「器官再生を可能としている分子メカニズムの包括的理解」の研究目的のもと、両生類におけるトランスジェニック技術の再生研究への応用基盤形成を中心に多角的な解析を行った。結果、Prx1 エンハンサーを用いたトランスジェニック *Xenopus* の作成により再生幹細胞の可視化に成功しこの形成に MAPK・PI3K 経路が必須であることを発見した。また四肢再生過程における shh 発現に DNA メチル化を含めたエピジェネティックな制御が重要であることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：四肢，器官再生，両生類，形態形成，遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

近年再生医療は、胚性幹細胞(ES 細胞)や成体幹細胞を材料とした幹細胞生物学の発展とともにめざましく躍進しており、病気や事故で失われた器官を患者自身の治癒力をもって治す“器官再生”の可能性に徐々に近づきつつあるように見える。しかし、器官再生に必要な全ての組織種を分化させ、さらに機能を有した“形態”を再生させるための必須の基盤である、器官再生を制御する分子メカニズ

ム全体への理解は、現状は非常に立ち遅れている。したがって、自然状態で器官再生を行う動物の再生の分子メカニズムを理解することは、今後の再生医療に器官再生という新たな展開をもたらすための重要となる。

研究開始当初までに研究代表者はアフリカツメガエルの四肢をモデルとして、長年にわたって器官再生メカニズムの解析を進めてきた。これらの研究のなかで研究代表者の最も大きな功績は、単なる異形組織再生とも

考えられてきたアフリカツメガエル成体における四肢再生が、形態形成不全を伴いながらもイモリなどの有尾両生類における四肢再生と同様の器官再生過程で行われていることを複数の論文を通して証明したことがある。これにより、有尾両生類に比べて分子レベルでの解析に圧倒的に有利なアフリカツメガエルを用いた器官再生研究の基盤が形成された。

このような研究の流れと背景のもとに、器官再生メカニズムの包括的解明を推進するために、本研究を計画した。

2. 研究の目的

上に示した現状と背景をもとに、「器官再生を可能としている分子メカニズムの包括的理解」を研究目的として設定した。すなわち、器官再生能力とはどう理解されるのか、器官再生における多能性幹細胞とはどのような性質を持つか、形態を再形成する能力を規定している分子メカニズムはなにか、そしてこれらの過程のどの部分をどのように克服することによって器官再生が可能になるか、これらの問いに対する基本原理の解明が本研究の研究目的である。

なお、2年間の期間内に行う研究に関して、より具体的な研究目標を以下のように設定した。

- (1) 四肢再生における再生芽細胞誘導の分子機構の理解
- (2) 四肢再生における再生芽細胞の特異性に関わる分子の半網羅的解析
- (3) 形態形成能力の責任メカニズムの抽出・同定
- (4) 形態再形成に対するエピジェネティック制御の役割の解明

3. 研究の方法

研究目的の項で掲げた4つの研究目標を達成するため、それぞれに対して具体的な研究計画を立てて研究を展開した。

- (1) 四肢再生における再生芽細胞誘導の分子機構の理解

四肢再生の初期過程である再生芽形成のなかでも最も初期の起こる再生芽細胞の誘導機構に分子レベルでアプローチするために、作出した四肢特異的な *Prx1* エンハンサーを用いたトランスジェニックアフリカツメガエルの系を用いて再生芽細胞誘導の上流メカニズムの解析を行う。器官培養系にさまざまなリガンド因子やシグナル伝達分子、あるいはそれらの阻害分子を加え、GFPの発現を手がかりに再生芽細胞の誘導に必要なシグナリングメカニズムを同定する。

- (2) 再生芽細胞の特異性に関わる分子の半網羅的解析

再生芽細胞の誘導システムに応答して再生芽細胞が形成されたときに、再生芽細胞が獲得する性質を明らかにするために初期再生芽に特異的な発現を示す遺伝子の同定を行う。

解析には信頼性の高い遺伝子発現比較を行うことが可能な **HiCEP** 法を用いる。研究開始当初までに小規模のパイロット実験によって再生過程において発現量が上昇する遺伝子候補を獲得しており、本研究では解析の規模を拡大してさらに多くの再生芽特異的発現遺伝子を解析する。

- (3) 形態形成能力の責任メカニズムの抽出・同定

アフリカツメガエルの成体では、四肢は再生過程で正常な形態を再形成できない。形態再形成の過程のどの部分にこの形態形成不全の原因があるかを明らかにすることは、器官再生過程において形態形成メカニズムの理解につながる。そこで、前後・背腹・基部先端それぞれの軸形成の指標をそれぞれ *shh*、*Lmx1*、*Hoxa11/13* の3つに絞り、それぞれの遺伝子および関連分子の発現状態を詳細に解析する。

さらに再生芽形成とこれらの遺伝子の発現の関係を調べる目的で、再生芽形成不全を引き起こす除神経肢を作成して、このときの各遺伝子の発現状態を調べ、形態形成と再生芽形成の関係とそれに対する各遺伝子の機能について考察する。

- (4) 形態再形成に対するエピジェネティック制御の役割の解明

遺伝子発現のエピジェネティック制御は、特に遺伝子発現の負の調節に重要であることから、アフリカツメガエル成体の四肢再生における形態形成不全の原因としてエピジェネティック制御が重要な役割を持つ可能性がある。そこで形態形成不全の原因遺伝子と目される *shh* に関して四肢におけるエンハンサー配列が同定されているのでその配列に関しても、エピジェネティックな主要な調節のひとつである DNA のメチル化の状態をバイサルファイト法によって調べる。研究開始当初までに予備実験として *shh* のエンハンサー領域の DNA メチル化状態を発生中の四肢に関して解析している。これをさまざまな段階のさまざまな組織(とくに成体の再生芽)から抽出したゲノム DNA に関して行い、メチル化状態と遺伝子発現状態の比較によって相関関係を解析する。

4. 研究成果

- (1) 四肢再生における再生芽細胞誘導の分

子機構の理解

四肢再生の初期過程において、Prx1 遺伝子が神経非依存的に再発現することを見出し、更なる解析のために Prx1-GFP トランスジェニックカエルを作成した。組織培養系において、MAP キナーゼおよび PI3 キナーゼ経路が Prx1 遺伝子再発現に必須であることを、このトランスジェニック動物を用いて明らかにした(Suzuki et al., 2007)。

(2) 再生芽細胞の特異性質に関わる分子の半網羅的解析

HiCEP 法を用いて、再生芽特異的発現遺伝子を獲得した。Hesr1 を含む、12 種類の遺伝子を候補遺伝子として同定した(未発表)。

(3) 形態形成能力の責任メカニズムの抽出・同定

四肢形成過程について、とくにその基部先端部軸形成過程を詳細に検討した。その結果、四肢形成過程では細胞のミキシングが起きていること、Hoxa11/13 遺伝子の発現が同調的に変化すること、などを見出した(Sato et al., 2007)。これを元に、四肢再生過程における基部先端部軸形成を再検討し、アフリカツメガエルの四肢再生過程において、この軸形成が Hox 遺伝子発現変化の部分で不全があることを突き止めた(現在、論文投稿準備中)。

(4) 形態再形成に対するエピジェネティック制御の役割の解明

アフリカツメガエルの四肢再生過程の軸形成不全に関して、shh 遺伝子の発現不全がその調節領域のエピジェネティックな負の制御によることを突き止めた。これに関して、四肢とそれ以外の臓器、カエルの発生変態過程における変化を調べ、さらにイモリおよびサンショウウオとの比較を行い、四肢再生過程における shh 遺伝子再発現とエピジェネティック制御との関係を調べた(Yakushiji et al., 2007)。

カエル成体の四肢再生時に発現不全となる shh 遺伝子の発現が、DNA 脱メチル化剤とヒストン修飾剤との組み合わせによって誘導できることを見出し、四肢再生過程における遺伝子発現調節にエピジェネティックな制御が重要な役割を果たしていることを示した。一方で、Hoxa 遺伝子群にも発現異常があることが四肢再生時の細胞の分化に異常をもたらして結果として形態異常を引き起こしている可能性を考察した。これらについて、四肢再生に関わる転写調節とエピジェネティック制御について独自の考察をまとめた。また、トランスジェニックカエル作成技術を導入し、任意の時期に任意の場所で遺伝子強制発現が行える系を構築して、とく

に筋衛星細胞の分化に着目して Pax9 遺伝子についての解析を行った。

(5) その他

これらの知見を様々な脊椎動物種で比較するための基盤としての、魚類・両生類・爬虫類・鳥類・哺乳類の各グループにおけるモデル実験系の確立を行い、各グループの動物維持と胚の獲得を行う実験環境も整えた。さらにいくつかの解析を行い、四肢の形態形成の多様性に関する基礎データを収集し論文としてまとめ報告した(Yonei-Tamura et al., 2008)。とくに爬虫類に関しては繁殖コロニーを確立した。

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 10 件)

- ① Kidokoro, H., Okabe, M., and Tamura, K. (2008). Time-lapse analysis reveals local asymmetrical changes in C-looping heart tube. *Developmental Dynamics* 237, 3545-3556. (査読有)
- ② Yonei-Tamura, S.*, Abe, G.*, Tanaka, Y., Anno, H., Noro, M., Ide, H., Aono, H., Kuraishi, R., Osumi, N., Kuratani, S., and Tamura, K. (2008). Competent stripes for diverse positions of limbs/fins in gnathostome embryos. *Evolution & Development* 10, 737-745. (査読有)
- ③ Kuraku, S., Takio, Y., Tamura, K., Aono, H., Meyer, A., Kuratani, S. (2008). Non-canonical Role of Hox14 revealed by its expression patterns in lamprey and shark. *PNAS* 105, 6679-6683. (査読有)
- ④ Tamura, K., Yonei-Tamura, S., Yano, T., Yokoyama, H., and Ide, H. (2008). The autopod: its formation during limb development. *Development Growth and Differentiation* 50, Suppl 1, S177-187. (査読有)
- ⑤ Kawasaki, A., Kumasaka, M., Satoh, A., Suzuki, M., Tamura, K., Goto, T., Asashima, M., and Yamamoto, H. (2008). Mitf contributes to melanosome distribution and melanophore dendricity. *Pigment Cell and Melanoma Research* 21, 56-62. (査読有)
- ⑥ Yakushiji, N., Suzuki, M., Satoh, A., Sagai, T., Shiroishi, T., Kobayashi, H.,

- Sasaki, H., Ide, H., and Tamura, K. (2007). Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians. *Developmental Biology* 312, 171-182. (査読有)
- ⑦ Kobayashi, T., Habuchi, H., Tamura, K., Ide, H., and Kimata, K. (2007). Essential role of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase in chick limb bud patterning and development. *Journal of Biological Chemistry* 282, 19589-19597. (査読有)
- ⑧ Suzuki, M., Satoh, A., Ide, H., and Tamura, K. (2007). Transgenic *Xenopus* with prxl limb enhancer reveals crucial contribution of MEK/ERK and PI3K/AKT pathways in blastema formation during limb regeneration. *Developmental Biology* 304, 675-686. (査読有)
- ⑨ Sato, K., Koizumi, Y., Takahashi, M., Kuroiwa, A., and Tamura, K. (2007). Specification of cell fate along the proximal-distal axis in the developing chick limb bud. *Development* 134, 1397-1406. (査読有)
- ⑩ Abe, G., Ide, H., and Tamura, K. (2007). Function of FGF signaling in the developmental process of the median fin fold in zebrafish. *Developmental Biology* 304, 355-366. (査読有)
- [学会発表] (計18件)
- ① 田村宏治. A Variety of Limb Regeneration Abilities in Tetrapods. 第8回 NIBB-EMBL 合同シンポジウム "Evolution: Genomes, cell types and shapes". 2008.11.23. 岡崎コンファレンスセンター
- ② 薬師寺那由他*, 井出宏之, 田村宏治. Reactivation of SHH signaling is a key to anterior-posterior (AP) repatterning during *Xenopus* froglet limb regeneration. The EMBO Conference on the Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair. 2008. 10. 06.08. Caixa Forum, Palma de Mallorca, Spain
- ③ 田村宏治*, 薬師寺那由他. Genetic and Epigenetic Controls of Gene Expression During Limb Regeneration In *Xenopus*. 第16回 CDB ミーティング "Cis- sequence Regulation and its Evolution". 2008.10.01. 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
- ④ 大湖史朗*, 薬師寺那由他, 横山仁, 田村宏治. アフリカツメガエル四肢再生過程における基部先端部軸形成不全の分子メカニズム. 日本動物学会第79回大会. 2008.09.05. 福岡大学七隈キャンパス
- ⑤ 田村宏治*, 薬師寺那由他, 大湖史朗, 横山仁. Molecular and cellular mechanisms of pattern-deficient limb regeneration in *Xenopus* froglet. 10th International Conference on Limb Development and Regeneration. 2008.08. 16. Teatro Auditorio/Euroforum Infantes, San Lorenzo de El Escorial, Madrid (Spain)
- ⑥ 丸岡玉枝*, 薬師寺那由他, 大湖史朗, 横山仁, 田村宏治. アフリカツメガエルにおける皮膚創傷治癒過程—付加再生との比較の観点から—. 平成20年度日本動物学会東北支部大会. 2008.07.26. 盛岡市観光文化交流センター
- ⑦ 薬師寺那由他*, 嵯峨井知子, 城石俊彦, 小林久人, 佐々木裕之, 井出宏之, 田村宏治. Reactivation of SHH signaling is a key to anterior-posterior (AP) repatterning during *Xenopus* froglet limb regeneration. 日本発生生物学会第41回大会 (ISDB共催) ワークショップ. 2008.05.30. 徳島県郷土文化会館
- ⑧ 田村宏治*, 薬師寺那由他, 大湖史朗, 横山仁. Patterning-deficient limb regeneration in *Xenopus*. 日本発生生物学会第41回大会 (ISDB共催) シンポジウム. 2008.05.28. 徳島県郷土文化会館
- ⑨ 薬師寺那由他*, 嵯峨井知子, 城石俊彦, 小林久人, 佐々木裕之, 井出宏之, 田村宏治. 四肢再生過程におけるShhの発現を制御するエピジェネティクス機構. 第2回日本エピジェネティクス研究会年会. 2008.05.10. 東レ総合研修センター
- ⑩ 田村宏治. 四肢発生メカニズムから見た有対附属肢の相同性と多様性. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム. 2008.03.27. 大分大学医学部
- ⑪ 田村宏治. 両生類四肢再生にみる器官再生の基礎. 第16回日本形成外科学会基礎学術集会. 2007.10.11. クラウンプラザ神戸
- ⑫ 薬師寺那由他*, 嵯峨井知子, 城石俊彦, 小林久人, 佐々木裕之, 井出宏之, 田村宏治. 両生類における四肢再生の鍵となるShh発現のエピジェネティクス制御. 第78回日本動物学会. 2007.09.20. 弘前大学文京町キャンパス
- ⑬ 田村宏治. Epigenetic regulation of Shh expression as a key for limb regener

- ation in amphibians. The Healing Foundation Centre for Tissue Regeneration Opening Symposium. 2007.09.14. The University of Manchester
- ⑭ 大湖史朗*、伊藤あかり、鈴木誠、佐藤伸、井出宏之、田村宏治. ツメガエル四肢再生過程における基部先端部軸形成不全の分子メカニズム. 日本動物学会平成19年度東北支部大会. 2007.07.28. カレッジプラザ、秋田
- ⑮ 田村宏治. Conserved developmental mechanism of vertebrate appendages. 8th International Congress of Vertebrate Morphology. 2007.07.18. the University P. & M. Curie (UPMC Paris VI)
- ⑯ 薬師寺那由他*、鈴木誠、佐藤伸、嵯峨井知子、城石俊彦、小林久人、佐々木裕之、井出宏之、田村宏治. 両生類における四肢再生の鍵となるShh発現のエピジェネティクス制御. 第1回日本エピジェネティクス研究会年会. 2007.06.15. 大阪大学コンベンションセンター
- ⑰ 薬師寺那由他*、嵯峨井知子、城石俊彦、小林久人、佐々木裕之、井出宏之、田村宏治. Epigenetic regulation plays a key role in gene re-expression during Xenopus limb regeneration. 2007.05.28. 第40回日本発生生物学会. 福岡国際会議場
- ⑱ 田村宏治. Epigenetic Regulation of Shh Expression as a Key for Limb Regeneration in Amphibians. NIBB-EMBL合同シンポジウム Cell & Developmental Biology. 2007.05.24. 基礎生物学研究所
(*印は発表者)

[図書] (計 2件)

- ① 田村宏治、米井小百合. 6章 四肢の進化と発生. 21世紀の動物科学シリーズ 3. 「動物の形態進化のメカニズム」(社団法人 日本動物学会監修). 培風館. 204-236.(2007)
- ② 日下部りえ、田村宏治、倉谷滋. Intermision 3 体筋の発生と進化. 21世紀の動物科学シリーズ 3. 「動物の形態進化のメカニズム」(社団法人 日本動物学会監修). 培風館. 194-203. (2007)

[その他]

○報道関連情報

- ① 「研究ノート拝見 生物の設計図を解く」河北新報 2007.07.24 朝刊 18面 (研究紹介記事)

○アウトリーチ活動

- ① 田村宏治. 脊椎動物の進化と発生の関係 (あなたの背中に肢は生えるか?). 「東

- 北大学学部・学科説明会」模擬講義. 2008.12.05. 宮城県仙台第一高等学校
- ② 田村宏治. 動物四肢の発生と進化. 栃木県立宇都宮高等学校生徒向け講演 (スーパー・サイエンス・ハイスクール事業). 2008.03.18. 栃木県立宇都宮高等学校

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 宏治 (TAMURA KOJI)
東北大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号：70261550

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし