

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770168

研究課題名（和文） 失われた四肢再生能を回復させるモデルの構築

研究課題名（英文） Construction of a model for recovery of limb regenerative capacity in non-regenerative animals

研究代表者

横山 仁 (YOKOYAMA HITOSHI)

東北大学・大学院生命科学研究所・助教

研究者番号：90455816

研究成果の概要（和文）：高効率で遺伝子組換え個体を作製できる利点を生かして、変態後に低下する *Xenopus* の四肢再生能を回復させることを目指した。まず遺伝子発現の操作を効率よく行えるように、その手法を改良した。ついで四肢再生の開始過程における Wnt シグナリングの機能を解析し、幼生期と成体期では同シグナリングの再生開始への関与が異なることを明らかにした。さらに Wnt シグナリングの活性化によって、本来は全く再生できない神経を除いた四肢の再生を回復させえることを発見した。

研究成果の概要（英文）：In amphibians, *Xenopus* is advantageous because we can prepare numerous transgenic animals efficiently. I aimed at recovery of limb regeneration in metamorphosed *Xenopus*, which has only restricted regenerative capacity of a limb. I modified the gene manipulation protocols to achieve effective control of gene expression at the beginning. Then, I examined the role of Wnt/ β -catenin signaling in the initiation of limb regeneration and indicated the different mechanisms of limb regeneration initiation in tadpoles and young adults with reference to Wnt/ β -catenin signaling. Finally, I found that the activation of Wnt/ β -catenin signaling can rescue the loss of regenerative capacity in denervated limb of a young adult frog, which cannot regenerate at all originally.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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、発生、*Xenopus*、再生医学、transgenesis

1. 研究開始当初の背景

両生類が行う手足の再生（四肢再生）は四肢という器官（付属肢）全体の再生であり、脊椎動物が行いうる最も高度な再生である。四肢の構造や発生過程における形成機構は脊椎動物間でよく保存されていることから本現象のメカニズムの解明が将来、器官レベル

での再生医療を実現させる上でも極めて有用である。

両生類の中でもイモリやサンショウウオのような有尾両生類は成体になってもその四肢を完全に再生できる。これに対してアフリカツメガエル（以下 *Xenopus*）に代表される無尾両生類は発生の初期には四肢の原基

である肢芽を切断されても、最終的には完全な四肢を再生できるものの、個体発生が進むと次第に再生能が低下し、四肢を再生できなくなる。したがって同種内で再生できる四肢とできない四肢を比較することができ、*Xenopus* における再生能低下の原因を探り、これを逆行させる手法を探ることによって将来ヒトのように四肢を再生できない動物において器官レベルの再生を実現させるための重要な手がかりが得られると期待される。

さらに有尾両生類においてはゲノムサイズが巨大であることや効率のよい遺伝子操作を行うことが困難なため、再生への関与が予想される遺伝子の機能を解析する研究が行えない状態が長年続いてきた。一方で *Xenopus* では *Xenopus tropicalis* を用いたゲノムプロジェクトがほぼ完了（研究開始当初：現在では完了）し、さらに安価で高効率な遺伝子操作の手法が確立しているという大きな利点があった。研究代表者はこの利点を最大限利用して、再生できなくなった *Xenopus* の四肢を再生させ、脊椎動物における四肢再生能回復のモデルを構築する研究に取りかかった。

2. 研究の目的

Xenopus において変態が完了した後の小ガエル（以下 **froglet**）では軟骨のみからなる一本のスパイクしか再生できなくなる。**froglet** の四肢を切断してからスパイクの再生が完了するまでには1ヶ月以上かかる。その一方で再生の成功不成功は再生の開始時期におけるいわゆる「再生芽」の形成をうまく行えるかどうか大きく依存することが知られている。したがって遺伝子操作によって **froglet** の低下した再生能を回復させるためには、この再生開始過程のメカニズムを分子レベルで明らかにするとともに、特定の遺伝子を適切なタイミングで発現させられる実験系が不可欠になる。近年 *Xenopus* でトランスジェニック個体の作成法が確立したことにより、例えば熱ショックプロモーターを利用した発現系やテトラサイクリン（Tet）による発現誘導系を胚発生が終了した後の時期の *Xenopus* でも利用できるようになった。本研究ではこのような発現誘導系を用いて、再生の開始過程のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを最初の目的とする。次に特定の遺伝子を適切な時期に最適の発現量で発現させ、パターン形成の不全及び分化能の不全のそれぞれをレスキューし、究極的にはスパイクしか再生できない **froglet** に、パターンを持ち筋肉等の軟骨以外の組織も供えた四肢構造を再生させることを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

四肢再生において特にその開始過程のメカニズムを明らかにし、次に再生能が低下した *Xenopus* の四肢をモデルにして再生能の回復を行わせるために、以下のような研究方法を用いた。

（1）tg 技術を利用した時期特異的な遺伝子発現操作の確立

従来トランスジェニック（以下 tg）技術を利用した *Xenopus* における遺伝子発現操作では熱ショック（hsp70）プロモーターによる発現誘導系が最もよく用いられてきた。しかし、熱ショックをかけるまでは目的の遺伝子をきちんと発現するかを予測できないことや、一回の熱ショックでは比較的短期間しか目的の遺伝子を発現しないなどの制約があり、再生能の回復を目指す上で改善が必要であった。そこで遺伝子導入に用いるトランスジーンを改良することで、これらの欠点を克服し、効率よく時期特異的な遺伝子を行えるようにした。

（2）tg 技術を利用した領域特異的な遺伝子発現操作の確立

また従来の熱ショックプロモーターを利用した遺伝子発現誘導系では個体の体全体で遺伝子発現が誘導されるため、特定の領域だけに限局した遺伝子発現の誘導が困難であった。そこで領域特異的な発現を行わせるのに適したプロモーターやエンハンサーを探索するとともに、テトラサイクリンを用いた遺伝子発現系の導入を試みた。

（3）四肢再生の開始機構の解析

前述のように四肢再生が成功するためにはその開始過程（再生芽形成）がうまくいくことが鍵になると考えられている。以前の研究から幼生期の *Xenopus* の再生には Wnt/ β -catenin シグナリングの活性化が必須であることが分かっていたが、変態後の **froglet** の再生に対する関与はよくわかっていなかった。そこで幼生期の *Xenopus* を用いた解析でうまくいくことが分かっていた熱ショック（hsp70）プロモーターによる発現誘導系を利用して、時期特異的に Wnt/ β -catenin のアンタゴニストである Dkk1 を発現する tg 個体を作製して再生開始における Wnt/ β -catenin シグナリングの役割を検証した。また *Xenopus* を含めた成体期の両生類の再生では四肢に投射している神経軸索の存在が必須で、再生に先立って神経を除くと再生が起きなくなることが以前から知られていた。そこで、再生開始への関与が予想される神経から分泌されるシグナル（神経因子）との関連を神経軸索の除去手術と組み合わせることで解析した。

(4) 低下した四肢再生能を回復させる手法の探索

主に(2)で述べた領域特異的な遺伝子発現の誘導系を用いることで、再生能が低下したfrogletに対して特定の遺伝子を再生過程で発現させ、再生能を高めることを試みた。またtg個体の作製を介さずに、特定のシグナリングを活性化することが分かっている薬剤を飼育水に加えて四肢の再生過程に作用させることで、失われた再生能を回復させることを試みた。

4. 研究成果

以下、3「研究の方法」で列挙した4つの項目ごとに研究成果を述べる。

(1) tg技術を利用した時期特異的な遺伝子発現操作の確立

従来 *Xenopus* でよく用いられてきた熱ショック (hsp70) プロモーターによる発現誘導では熱ショックをかけるまでは、どの個体が目的の遺伝子を発現してくれるのかを予測できず、したがって必要な例数よりもずっと多数の個体を育てておくことが必要になり、とくに発生後期で実験するにあたってはその事が大きな負担になっていた。



本研究では熱ショックの前にトランスジェンがゲノムに導入された個体を識別するために、眼のレンズで特異的に活性化される (γ) クリスタリンプロモーターを利用することにした。このプロモーターに RFP をつないだトランスジェンを自分が導入したいトランスジェンと直列につないだ上で (図 1) tg 個体作製を行い、レンズが (RFP によって) 赤い蛍光を発した個体だけを選別することによって、目的のトランスジェンがゲノムに導入された個体を効率よく選別できるようになった。同様のプロモーターを用いた標識の試みは以前に他の研究者によっても試みられているが、クリスタリンプロモーターによってレンズが標識された個体のうち、実際に全ての個体が目的の遺伝子を本当に発現しているのかについての定量的検証は行われていなかった。研究代表者は目的の遺伝子を GFP 等で標識することにより、この点を検証した。その結果、クリスタリンプロモーターでレンズが標識された個体のうち半数以上が目的の遺伝子を熱ショック後に発現するが、一部の個体は発現してこないことを明らかにした。従って、クリスタリンプロモーターによる標識と目的の遺伝子そのものへの標識を両方行うことにより、効率よく遺伝子発現の誘導が行えることが分かった。また

Xenopus で広く用いられる tg 個体作製の手法は REMI 法と I-SceI 法に大別されるが、このような標識は REMI 法でしか行えず、I-SceI 法ではうまくいかないことを明らかにした。

長期間にわたって目的の遺伝子を発現させる手法の確立については(2)以降で述べる。

(2) tg 技術を利用した領域特異的な遺伝子発現操作の確立

特定の領域、とくに再生芽の領域で特異的に遺伝子の発現を誘導するために、まず肢芽および四肢の再生芽で特異的に活性化することが報告されていた Prx1 のエンハンサーを利用した。このエンハンサーを利用してテトラサイクリンによる誘導系 (Tet-on) のベクターと組み合わせることによって、テトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリン (Dox) を飼育水に加えることにより肢芽および再生芽特異的な遺伝子発現の誘導が行えることを明らかにした。また Dox を飼育水に入れておくことによって、従来の熱ショックプロモーターによる一回の発現誘導よりも長い期間にわたって目的の遺伝子発現を持続させられることを明らかにした。

また froglet の四肢再生において前後軸や背腹軸に沿ったパターン形成を回復させるためには、再生芽内においてさらに特定の領域に局限した遺伝子発現の誘導を可能にする必要がある。そこで発生中の肢芽において肢芽の後側だけで特異的に発現する *shh* 遺伝子の遠位エンハンサー (MFCS1) 領域と *shh* のプロモーターを連結したトランスジェンを導入した tg 個体を作製して、領域特異的な遺伝子発現をドライブできるか検証した。その結果、通常の *shh* の発現パターンと同様に肢芽および再生芽の後側に局限した遺伝子発現をドライブできることを明らかにした。これにより、再生芽の低下した froglet の再生芽内において領域特異的な遺伝子発現の誘導を可能にするための有力な足がかりになると期待される。

(3) 四肢再生の開始機構の解析

「3. 研究の方法」で述べたように幼生期の再生では必須の働きを持つことが分かっている Wnt/ β -catenin シグナリングに着目して、froglet の四肢再生における同シグナリングの役割を解析した。同シグナリングのアンタゴニストである *Dkk1* を熱ショックにより時期特異的に発現させることにより、その機能を解析したが、解析に当たっては項目(1)で述べたクリスタリンプロモーターによる標識を利用して遺伝子発現操作の効率化を行った。

幼生期の再生とは異なり、froglet の時期

の四肢再生においては繰り返し熱ショックを与えて再生芽形成の期間中にわたってずっと Wnt/ β -catenin シグナリングを阻害してもスパイク状軟骨の再生は正常に起こることが分かった。一方で Wnt/ β -catenin シグナリングに依存することが分かっている fgf-8 や cyclinD1 などの遺伝子発現は Dkk1 を発現させた froglet において減少していた。そこで研究代表者は、幼生期とは異なり froglet の四肢には神経軸索が多数投射しているため、その軸索から分泌されるいわゆる神経因子の存在によって、Wnt/ β -catenin シグナリングの役割が補償され、結果として再生の阻害が起こらないという仮説を建てた。この仮説を検証するために、四肢に投射している神経軸索の数を約半分に減らした上で同様な Wnt/ β -catenin シグナリングの阻害を froglet において行った。その結果シグナリングの阻害によって再生が起こらなくなり、シグナリングを阻害していないコントロールとの間で明らかな差が見られた。したがって神経因子の分子的本体は Wnt/ β -catenin シグナリングとは独立な分子であるが、その神経因子によって制御される下流の分子の機能が Wnt/ β -catenin シグナリングの下流の機能とオーバーラップしており、Wnt/ β -catenin シグナリングがブロックされた際にはその機能を補償できるのだと考えられる。

本研究によって幼生期と成体期では四肢再生の成功の鍵となる、開始過程のメカニズムが異なっていることが Wnt/ β -catenin シグナリングの必要性という観点から明らかになった。さらに成体期では神経からの因子が Wnt/ β -catenin シグナリングよりも再生開始において主要な役割を果たすことが明らかになった。これらの知見は、高等脊椎動物の成体において四肢再生の実現を図る上でも重要な足がかりになると期待される。また神経因子と Wnt/ β -catenin シグナリングそれぞれの下流の機能が重複しているという仮説については次の項目(4)でさらにそれを支持する結果が得られている。

(4) 低下した四肢再生能を回復させる手法の探索

再生能が低下した変態後の froglet において再生能を回復させる作用が期待される HGF 等の遺伝子を tg 技術を利用して発現させたり、あるいは特定のシグナリングを活性化させる薬剤を再生中の froglet に投与することで、再生能を回復させる手法を探索した。その結果、Wnt/ β -catenin シグナリングを活性化する作用を持つ薬剤である GSK3 阻害剤 (BIO) によって一定の再生能回復への効果が見られることが分かった。

前述のように froglet において四肢に投射

している神経を全て除くと再生は起こらなくなり、スパイク状軟骨すら再生しなくなる。

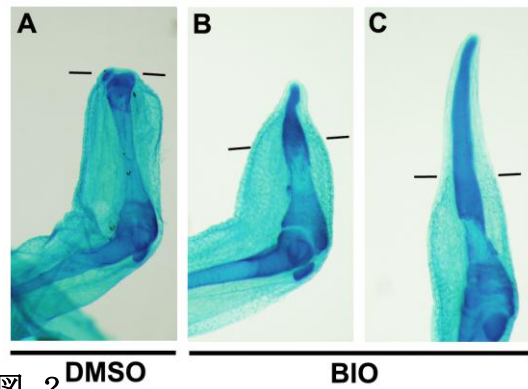


図 2 DMSO BIO
Froglet の前肢を切断してその直後に神経除去 (除神経) を行ない、除神経直後から 10 日目まで薬剤の入った飼育水で飼育した。コントロールとして DMSO を加えて飼育水で飼育した froglet では図 2A のように再生は全く起こらないのに対して、BIO を飼育水に加えた froglet では図 2B のような短いスパイク状軟骨や、図 2C のような長いスパイクの再生が見られるようになった (短い 2 本の直線は切断位置を示している)。BIO 処理を行ったうちで約 25% の個体でスパイク状軟骨の再生が見られた。

従って全く再生を行えない成体期の四足動物に対して Wnt/ β -catenin シグナリングを活性化することで何らかの構造を再生させる可能性が本研究の結果から示唆された。また神経を全て除いた四肢の再生が Wnt/ β -catenin シグナリングの活性化によって救済されたことから、神経因子と Wnt/ β -catenin シグナリングはその下流における機能が重複しているという項目(3)で述べた仮説をさらに支持する結果となった。

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 横山仁、丸岡玉枝、越智陽城、有賀章郎、大湖史朗、萩野肇、田村宏治、Different requirement for Wnt/ β -catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus*, *PLoS ONE*, 査読あり、印刷中、2011、pp. 未定
- ② *横山仁、*丸岡玉枝、有賀章郎、天野孝紀、大湖史朗、城石俊彦、田村宏治、*Prx-1* expression in *Xenopus laevis* scarless skin-wound healing and its resemblance to epimorphic regeneration, *Journal of Investigative Dermatology*, 査読あり、印刷中、2011、pp. 未定
*contributed equally to this study
- ③ 野呂美幸、湯口弘樹、佐藤妙子、對比地孝

- 亘、米井(田村)小百合、横山仁、若松義雄、田村宏治、Role of paraxial mesoderm in limb/flank regionalization of the trunk lateral plate、*Developmental Dynamics*、査読あり、印刷中、2011、pp. 未定
- ④*田村宏治、*野村直生、関亮平、米井(田村)小百合、横山仁、Embryological evidence identifies wing digits in birds as digits 1, 2, and 3、*Science*、査読あり、Vol. 331、2011、pp. 753-757.
*contributed equally to this study
- ⑤*佐藤耕世、*関亮平、野呂美幸、横山仁、田村宏治、Morphogenetic change of the limb bud in the hand plate formation、*Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*、査読あり、Vol. 314B、2010、pp. 539-551.
*contributed equally to this study
- ⑥田村宏治、大湖史朗、横山仁、Limb blastema cell: a stem cell for morphological regeneration、*Development Growth and Differentiation*、査読あり、Vol. 52、2010、pp. 89-99.
- ⑦大湖史朗、伊藤あかり、鈴木誠、佐藤伸、横山仁、田村宏治、Analysis of hoxa11 and hoxa13 expression during patternless limb regeneration in *Xenopus*、*Developmental Biology*、査読あり、Vol. 338、2010、pp. 148-157.
- ⑧上嶋朝佳、天野孝紀、野村直生、野呂美幸、安江泰治、城石俊彦、太田訓正、横山仁、田村宏治、Anterior shift in gene expression precedes anteriormost digit formation in amniote limbs、*Development, Growth and Differentiation*、査読あり、Vol. 52、2010、pp. 223-234.
- ⑨薬師寺那由他、横山仁、田村宏治、Repatterning in amphibian limb regeneration: a model for study of genetic and epigenetic control of organ regeneration、*Seminars in Cell and Developmental Biology*、査読あり、Vol. 20、2009、pp. 565-578.
- ⑩田村宏治、米井(田村)小百合、矢野十織、横山仁、井出宏之、The autopod: its formation during limb development、*Development, Growth and Differentiation*、査読あり、Vol. 50、2008、pp. S177-S178.
- [学会発表] (計6件)
- ①横山仁、Limb regeneration of *Xenopus* as a model for three-dimensional appendage/organ regeneration、The 2nd UCL-Tohoku University Symposium “From Cell/Developmental Biology to

- Neuroscience”、2011年1月23日、仙台
- ②横山仁、丸岡玉枝、越智陽城、有賀章郎、大湖史朗、荻野肇、田村宏治、Different involvement of Wnt/ β -catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus*、EMBO Conference on the Molecular & Cellular Basis of Regeneration & Tissue Repair、2010年9月29日、セジンプラ、ポルトガル
- ③横山仁、丸岡玉枝、越智陽城、有賀章郎、大湖史朗、荻野肇、田村宏治、幼生期と成体期の *Xenopus* でみられる四肢再生における異なる開始機構、日本動物学会東北支部大会、2010年8月7日、福島
- ④横山仁、大湖史朗、有賀章郎、丸岡玉枝、越智陽城、荻野肇、田村宏治、幼生期と成体期のアフリカツメガエルでみられる四肢再生における異なる開始機構 (Different mechanisms in initiation of limb regeneration between larval and adult *Xenopus*)、日本発生生物学会、2010年6月20日および6月21日、京都
- ⑤横山仁、越智陽城、荻野肇、田村宏治、Wnt シグナリングは四肢再生に対して幼生期と成体期で異なる関与をする、日本動物学会、2009年9月19日、静岡
- ⑥横山仁、越智陽城、荻野肇、田村宏治、Wnt/ β -catenin シグナリングは四肢再生に対して幼生期と成体期で異なる関与をする、日本発生生物学会、2009年5月29日、新潟

[その他]
ホームページ等
<http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/tamlab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 仁 (YOKOYAMA HITOSHI)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：90455816

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし