

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21517

研究課題名(和文)無尾両生類(ツメガエル)の器官再生能を規定する分子的要因に関する研究

研究課題名(英文)Study on the molecular basis that defines organ regenerative ability in an anuran amphibian (*Xenopus laevis*)

研究代表者

久保 健雄 (Kubo, Takeo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：10201469

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文): ツメガエル幼生の器官再生能を規定する分子的要因を探る目的で、その分子基盤・細胞動態を解析した。本研究期間では、(1) 幼生切断肢芽のFGF10による形態形成能向上に関連する候補として新規なsteap4+細胞集団を見出した。(2) 幼生尾再生促進能をもつ免疫細胞と、その機能に必要な遺伝子を同定した。(3) 幼生尾再生においてはil11が必須な役割を担うが、その受容体も尾再生に重要であることを示した。(4) ツメガエルにおけるノックイン手法の確立と改良を行った。(5) サイドポピュレーション法による幼生尾再生芽の組織幹細胞濃縮分画法を確立した。各項目の研究成果はそれぞれ国際誌に論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の器官再生能に関する研究は、基礎生物学のみならず、将来的には臨床応用の観点からも重要である。本研究課題の最終目標は、両生類のもつ高い器官再生能を支える両生類固有な分子基盤・細胞挙動を解明することである。本研究課題ではアフリカツメガエル幼生の肢芽切断後の形態の再形成に関与する新規な候補細胞集団の同定、尾再生に必要な新規遺伝子の同定に加えて、幼生尾再生芽からの組織幹細胞濃縮分画の単離法や、ツメガエルゲノムの任意部位へのノックイン法の確立と改善と言う、将来的な研究発展の礎となる研究基盤を整備した。これらの研究成果は何れも独自性が高く、再生生物学分野において重要な貢献をなすものと考えている。

研究成果の概要(英文): We analyzed the molecular basis and cellular dynamics to explore the molecular factors determining organ regenerative ability in *Xenopus laevis* tadpoles. In this research period, (1) We identified the steap4+ cell population as a candidate cell population associated with enhanced morphogenesis by FGF10 after tadpole limb bud amputation. (2) We identified immune cells able to promote larval tail regeneration and a gene essential for their function. (3) We previously showed that il11 is essential in tadpole tail regeneration. Here we showed that its receptor is also important for tail regeneration. (4) We first established and improved a knock-in method in *X. laevis*. (5) We established a method for enrichment and fractionation of tissue stem cells of regenerating tadpole tails by side-population method. The results of each research subject were published in international journals.

研究分野: Regenerative biology

キーワード: アフリカツメガエル 器官再生 再生芽 Single cell RNA-seq Crispr/Cas9 Side population法 IL-11 マクロファージ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

無尾両生類であるアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の幼生(オタマジャクシ)は高い器官再生能をもつ。幼生の尾は切断後、1週間程度で脊髄や脊索、筋肉を備えた機能的な尾を再生することができる。また幼生の後肢芽においても発生ステージ 52 以前に切断した際にはその後正常に後肢を形成できる。一方で、後肢芽においては発生の進行とともにその切断時の後肢形成能は低下することも知られている [1]。これらの特徴から、ツメガエル幼生は器官再生能や発生の進行に伴うその喪失に関わる細胞挙動や分子機構の解析の良いモデルになる。

2. 研究の目的

本研究では、ツメガエル幼生の器官再生能を規定する分子的要因を探る目的で、再生芽における分子機構と細胞挙動を解析した。具体的には、(1) ツメガエル幼生肢芽の発生進行に伴う切断後形態形成能喪失に関与する細胞種の解析、(2) ツメガエル幼生尾の再生に必要な免疫細胞種の機能を担う因子の同定、(3) ツメガエル幼生尾再生におけるインターロイキン 11 受容体の解析、また研究遂行に必要な手法確立として(4) ツメガエルゲノムへのノックイン手法の確立とその効率向上法、(5) ツメガエル幼生尾再生芽からの組織幹細胞濃縮分画単離法の確立、を行った。

3. 研究の方法

(1) ツメガエル幼生肢芽の発生進行に伴う再生能喪失に関与する細胞種の解析

アフリカツメガエル幼生は後肢芽を切断してもその後正常に後肢を形成することができる。しかしながら、これは発生ステージ 52 以前までであり、発生の進行に伴い後肢芽切断後に形成される後肢は指が正常に形成されないなど後肢形成能の低下を示し、発生ステージ 58 頃では切断後に形成される後肢は指様の構造を欠くスパイク形成となる [1]。ここで、発生ステージ 56 頃までにおいては、肢芽切断後に Fibroblast growth factor 10 (FGF10)を投与すると限定的ではあるが後肢形成能が回復することが報告されていた [2-3]。本研究では、肢芽切断後 FGF10 投与による形態形成能向上に付随する細胞挙動について、FGF10 処理・無処理の肢芽再生芽での single cell RNA sequencing (scRNAseq)の比較により解析した。

(2) ツメガエル幼生尾の再生に必要な免疫細胞種の機能を担う因子の同定

当研究室の先行研究により、ツメガエル幼生尾再生における各組織の未分化細胞の誘導に必要な因子としてインターロイキン 11 (*il11*)を同定していた [4]。本研究では、尾再生において *il11* ノックダウン(KD)時に発現低下する遺伝子の探索を端緒に *il11* 下流の機構を解析した。

(3) ツメガエル幼生尾再生におけるインターロイキン 11 受容体の解析

前述の *Il11* は分泌因子であるため、その機能は *Il11* を受容した細胞によって発揮されると考えられる。本研究ではツメガエル *Il11* の受容体の発現解析と機能解析を行った。

(4) ツメガエルゲノムへのノックイン手法の確立とその効率向上

アフリカツメガエルにおいては研究開始時点でゲノムの特定位置への配列挿入法(ノックイン)は確立されていなかった。本研究ではノックイン手法を確立し、さらにノックイン効率向上の条件検討を行った。

(5) ツメガエル幼生尾再生芽からの組織幹細胞濃縮分画単離法の確立

様々な状況証拠からツメガエル幼生尾再生には組織幹細胞が寄与すると考えられているが [5]、組織幹細胞マーカーがツメガエルでは十分には整備されておらず、再生時の幹細胞の挙動の解析が困難であった。本研究では、幹細胞マーカー分子ではなく薬剤排出能を利用して組織幹細胞を組織より抽出するサイドポピュレーション法 [6] がツメガエル幼生尾再生芽へ適応可能かを検討した。

4. 研究成果

(1) ツメガエル幼生の発生ステージ56において後肢芽を切断後、FGF10・PBS(対照)を浸透させたビーズを傷口下に移植(図1) 5日間後の再生芽を組織分散し scRNAseq を行った。先行研究において FGF10 投与は再生芽の Apical Epidermal Cap (AEC)での *fgf8* 発現を誘導することが報告されていたが [2]、本 scRNAseq データの AEC 様の遺伝子発現プロファイルを示す細胞群において FGF10 投与群では *fgf8* 発現の有意な上昇が確認されたことから、ビーズ移植などの操作に問題はなかったと判断した。このデータを用い FGF10 投与時にその遺伝子発現プロファイルが大きく影響を受ける細胞種を探索したところ、前述の AEC の他、骨髄性白血球の一部と、*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4 (steap4)* を排他的に発現する線維芽細胞様集団(steap4+ population)を見出した。steap4+ population はこれまでに報告のなかった集団であり、また FGF10 処理群の steap4+ population はツメガエル幼生尾の再生に

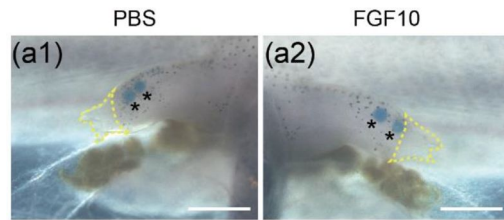


図1. 後肢芽切断後に PBS または FGF10 を浸透させたビーズ(*)を移植した個体

必須と報告されている *matrix metalloproteinase 8* を高発現するようになっており(図2)、FGF10 が媒介する後肢形成能向上にこの細胞集団が関与する可能性を初めて示した [7]。

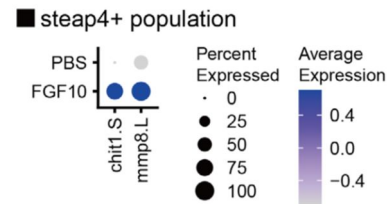


図2. steap4+ population は FGF10 処理により mmp8 を高発現するようになる

(2) 尾再生時における *il1l* の下流で機能する因子を探索するために尾切断後の *il1l* KD 群で対照群に対し発現低下する遺伝子の探索を行ったところ、そのような因子として *Xetrov90002578m.L* と *Xetrov90002579m.S* を得た。この2つの遺伝子の KD は尾再生を阻害した。幼生尾再生芽における scRNAseq を実施したところ、この2つの因子はマクロファージ様の遺伝子発現様式を示す白血球の一部で発現が検出された。そこで、ツメガエルでのマクロファージ様細胞において機能する *mpeg1* プロモーター配列の下流に *Xetrov90002578m.L* を導入したコンストラクトを作成しマクロファージ様細胞選択的な *Xetrov90002578m.L* 発現のレスキューを試みた。前述の2つの因子の KD 個体で見られた尾再生阻害は、マクロファージ様細胞選択的な *Xetrov90002578m.L* 発現誘導によりレスキューされることを見出した。これをもって、前述の2つの因子は尾再生に必須な機能をもつマクロファージ様細胞の再生促進能を担う因子であるとし、これらの因子を *regeneration factors expressed on myeloid* と命名した [8]。

(3) アフリカツメガエルゲノムにおいて他種との配列相同性から *il1l receptor alpha subunit (il1lra.L)* 遺伝子がアノテーションされていた。まずこの遺伝子が実際にツメガエル II11 受容体の構成因子であるかを検討するため、*il1lra.L* KD ツメガエル培養細胞株を樹立しこの細胞の II11 への応答能をリン酸化 Stat3 の核移行を指標に確認したところ、野生型株では見られたリン酸化 Stat3 の核移行が KD 株では見られなくなることを確認し、*il1lra.L* はツメガエルにおける II11 受容に必要な遺伝子であることが示された。次に *il1lra.L* KD ツメガエル幼生を作出し尾を切断すると、これらの個体は *il1l* KD と同様に尾再生が阻害されることを見出した。*in situ* hybridization によりツメガエル幼生尾再生過程での *il1lra.L* の発現部位を観察してみると、尾切断前後に依らず恒常的に脊髄・脊索・筋肉・表皮・間充織の大部分の細胞で発現が観察された。創傷は偶発的に起こるものであるため、いついかなる部位で創傷による II11 発現が起こっても、恒常的で広範囲に *il1lra.L* を発現させることで対応している可能性を考えている [9]。

(4) Crispr/Cas9 法による DNA 二本鎖切断と、切断部位近辺の配列をホモロジーアームとして持たせた長鎖一本鎖 DNA (lsDNA) の導入とによりノックインが起こることが他生物種で報告されていた [10]。そこでアフリカツメガエルでのノックインでのこの手法の有効性を確かめるため、受精卵に cas9 mRNA と guide RNA、lsDNA を共注入したところ、lsDNA 配列のゲノムへのノッ

クインが確認された(図3)。次にノックイン効率を推定するため、ノックイン細胞が GFP で標識される系を構築し作出された個体を酵素的に細胞分散させ GFP 陽性細胞数の率からノックイン効率を算出する系を確立した。この評価系では個体に占めるノックイン細胞の率は平均 7%程度と算出された。ここで、顕微注入後の胚を 6 時間 12°C に置くという過程を加えるとノックイン効率は平均 17%に改善することも見出した [11]。

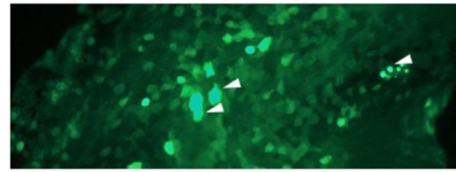


図 3. ノックイン操作を行った幼生の体幹部(拡大図)にはノックインが起きたことを示す GFP 陽性細胞が多数認められた

(5) 幾つかの動物種の組織において、その組織幹細胞が ABC トンラスポーター発現による薬剤排出能を持つことが知られており、核酸染色試薬に対し染色抵抗性を示す細胞集団(サイドポピュレーション; SP)を単離することで組織幹細胞の濃縮分画を得る方法として SP 法がある [6]。SP 法がツメガエル幼生尾再生芽に適応可能であるかを検討するため、幼生尾再生芽の細胞を酵素を用いて分散させ、核酸染色試薬で染色したのちフローサイトメトリーを行ったところ、SP が検出された。そこで幼生尾再生芽 SP をセルソーターにて回収し scRNAseq を行ったところ、SP には筋衛星細胞や神経前駆細胞が高頻度で含まれていることが確認され、SP 法がツメガエル幼生尾再生芽の組織幹細胞濃縮にも有効であることを示した [12]。

なお、(1)と(2)の scRNAseq は「先進ゲノム支援」(16H06279)のご支援により実施した。また、(1)~(5)の研究成果の一部は科研費課題番号 19K06437、(1)(2)(5)の研究成果の一部は課題番号 22K19325、(5)の研究成果の一部は課題番号 22J21275 の研究費を部分的に利用して実施した。また、(1)~(5)の全ての研究項目について、発表論文は当研究室助教の深澤太郎博士が連絡著者を務めた。

<引用文献>

1. Simon A, Tanaka EM (2013) Limb regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 2, 291-300.
2. Yokoyama H, Ide H, Tamura K (2001) FGF-10 stimulates limb regeneration ability in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 233, 72-79.
3. Aztekin C, Hiscock TW, Gurdon J, Jullien J, Marioni J, Simons BD (2021) Secreted inhibitors drive the loss of regeneration competence in *Xenopus* limbs. *Development* 148: dev199158.
4. Tsujioka H, Kunieda T, Katou Y, Shirahige K, Fukazawa T, Kubo T (2017) *interleukin-11* induces and maintains progenitors of different cell lineages during *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat. Commun.* 8: 495.
5. Gargioli C, Slack JMW (2004) Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration. *Development* 131, 2669-2679.
6. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 159, 123-134.
7. Yanagi N, Kato S, Fukazawa T, Kubo T (2022) Cellular responses in the FGF10-mediated improvement of hindlimb regenerative capacity in *Xenopus laevis* revealed by single-cell transcriptomics. *Dev. Growth Differ* 64, 266-278.
8. Deguchi M, Fukazawa T, Kubo T (2023) *regeneration factors expressed on myeloid* expression in macrophage-like cells is required for tail regeneration in *Xenopus laevis* tadpoles. *Development* 150: dev200467.
9. Suzuki S, Sasaki K, Fukazawa T, Kubo T (2022) *Xenopus laevis ill1ra.L* is an experimentally proven interleukin-11 receptor component that is required for tadpole tail regeneration. *Sci. Rep.* 12: 1903.
10. Nakayama T, Grainger RM, Cha S-W (2020) Simple embryo injection of long single-stranded donor templates with the CRISPR/Cas9 system leads to homology-directed repair in *Xenopus tropicalis* and

Xenopus laevis. *Genesis* 5: e23366.

11. Kato S, Fukazawa T, Kubo T (2021) Low-temperature incubation improves both knock-in and knock-down efficiencies by the CRISPR/Cas9 system in *Xenopus laevis* as revealed by quantitative analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 543, 50-55.
12. Effective enrichment of stem cells in the regenerating *Xenopus laevis* tadpole tails using the side population method. *Dev. Growth Differ* 64, 290-296.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Deguchi M, Fukazawa T, Kubo T	4. 巻 10
2. 論文標題 regeneration factors expressed on myeloid expression in macrophage-like cells is required for tail regeneration in <i>Xenopus laevis</i> tadpoles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200467	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 Kato S, Kubo T, Fukazawa T	4. 巻 64
2. 論文標題 Effective enrichment of stem cells in regenerating <i>Xenopus laevis</i> tadpole tails using the side population method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 290 ~ 296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12797	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 Yanagi N, Kato S, Fukazawa T, Kubo T	4. 巻 64
2. 論文標題 Cellular responses in the FGF10 mediated improvement of hindlimb regenerative capacity in <i>Xenopus laevis</i> revealed by single cell transcriptomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 266 ~ 278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12795	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 Suzuki S, Sasaki K, Fukazawa T, Kubo T	4. 巻 12
2. 論文標題 <i>Xenopus laevis</i> il11ra.L is an experimentally proven interleukin-11 receptor component that is required for tadpole tail regeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 1903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05954-w	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 Kato S, Fukazawa T, Kubo T	4. 巻 543
2. 論文標題 Low-temperature incubation improves both knock-in and knock-down efficiencies by the CRISPR/Cas9 system in <i>Xenopus laevis</i> as revealed by quantitative analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 50-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.038.Epub 2021 Jan 27.	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 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Sumika Kato, Momoko Deguchi, Takeo Kubo, Taro Fukazawa
2. 発表標題 analysis of tissue stem cells and their differentiation trajectories in <i>Xenopus</i> tadpole tail regeneration: insights from single-cell RNA sequencing.
3. 学会等名 Inaugural Meeting of The International Society for Regenerative Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 出口桃子、深澤太郎、久保健雄
2. 発表標題 アフリカツメガエル幼生尾の再生を促進する免疫細胞の機能に必須な因子の同定
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sumika Kato, Momoko Deguchi, Takeo Kubo, Taro Fukazawa
2. 発表標題 Estimation of tissue stem cells and their differentiation trajectories in <i>Xenopus</i> tail regeneration using single-cell RNA analysis.
3. 学会等名 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Developmental Biologists
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤寿美香, 久保健雄, 深澤太郎
2. 発表標題 ツメガエル幼生尾再生における組織幹細胞・前駆細胞系列の解析. 第46回日本分子生物学会年会 (2023) 神戸コンベンションセンター、兵庫県神戸市
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sumika Kato, Takeo Kubo, Taro Fukazawa
2. 発表標題 Side population method is effective for tissue stem cell enrichment in <i>Xenopus laevis</i> tadpoles.
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Developmental Biologists
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤寿美香、久保健雄、深澤太郎
2. 発表標題 ツメガエル幼生尾再生におけるシングルセル-RNA解析を用いた組織幹細胞・前駆細胞系列 の推定
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 出口 桃子、深澤 太郎、久保 健雄
2. 発表標題 ツメガエル幼生尾再生に促進的に働く免疫細胞の同定
3. 学会等名 第91回日本動物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 駿也、深澤 太郎、久保 健雄
2. 発表標題 ツメガエル幼生尾再生に関わるIL-11受容体の機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張 優希、藤倉 崇紘、深澤 太郎、久保 健雄
2. 発表標題 アフリカツメガエル再生不応期の再生能低下に関わる分子機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 細胞生理化学研究室 https://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~saibou/</p>
--

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
研究協力者	深澤 太郎 (Fukazawa Taro) (10565774)	東京大学・大学院理学系研究科生物科学専攻・助教 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	出口 桃子 (Deguchi Momoko)		当研究室の大学院生（当時）
研究協力者	加藤 寿美香 (Kato Sumika)		当研究室の大学院生
研究協力者	柳 のど香 (Yanagi Nodoka)		当研究室の大学院生（当時）
研究協力者	鈴木 駿也 (Suzuki Shunya)		当研究室の大学院生（当時）
研究協力者	張 優希 (Cho Yuki)		当研究室の大学院生（当時）
研究協力者	藤倉 崇紘 (Fujikura Takahiro)		当研究室の大学院生（当時）

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関