

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03829

研究課題名(和文) 高い器官再生能力を持つ有尾両生類マトリソームの分子実体解明と哺乳類への応用

研究課題名(英文) Molecular dissection of matorisome in a high-regenerative capability animal, salamanders

研究代表者

鈴木 賢一 (Suzuki, Ken-ichi)

基礎生物学研究所・超階層生物学センター・特任准教授

研究者番号：90363043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：再生中の器官には、細胞の脱分化や幹細胞の増殖を保证するための「細胞外マトリックス」や「分泌性増殖因子」で構成されたマトリソームが存在していると考えられている。本研究では、イモリとカエルの四肢再生芽マトリソームの比較オミクス解析を行った。その中でイモリ再生特有なマトリソーム因子のノックアウトを行い、四肢再生における機能を解析した。およびイモリマトリソームプロテオミクスの高度化に必要なタンパク質データベースを充実させるためのゲノムプロジェクトを先進ゲノム支援の元に行った。さらに、マウス四肢再生を誘導するための脱細胞化マトリックスの移植実験を行い、その評価も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題によって得られる成果は、以下のような先進的な生体材料の開発に繋がることが期待できる。(1) 創傷治癒や器官再生を促進する有用な治療用生体材料の開発。(2) より生体に近い機能と構造を持つオルガノイドの創生技術の開発。(3) 幹細胞を生体に近い状態で大量に産生可能な培養技術の開発。生体材料工学に新機軸を打ち出し、イモリの高い器官再生能力についてマトリソームという新しい視点から解明を行う本申請課題は、これまでに前例のないユニークな研究例となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：It is believed that regenerating organs contain matrisomes, which are composed of "extracellular matrix" and "secretory growth factors" that ensure cell dedifferentiation and stem cell proliferation. In this study, we performed comparative omics analysis of the matrisomes of newt and frog limb regenerating buds. We knocked out matrisome factors specific to newt regeneration and analyzed their functions in limb regeneration. In addition, we conducted a genome project with the support of the Platform for Advanced Genome Science (PAGS) to improve the protein database required for the advancement of newt matrisome proteomics. In addition, we experimented with transplanting decellularized matrices to induce mouse limb regeneration and evaluated the results.

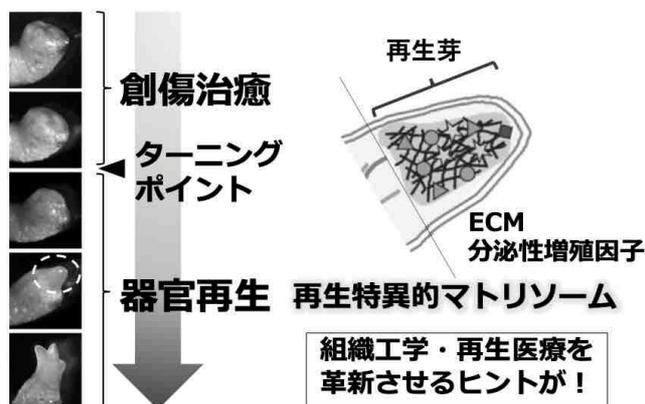
研究分野：再生生物学

キーワード：器官再生 両生類 四肢再生 マトリソーム ゲノム オミクス解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

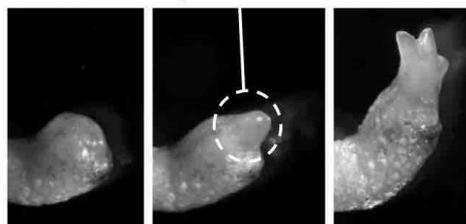
有尾両生類(イモリ、サンショウウオ、アホロートル)は脊椎動物の中でも卓越した器官再生能力を有する。レンズ、四肢、心臓、さらには脳に至るまで、形態的かつ機能的に再生することが可能であるため、その高い能力は古くから生物学において注目されてきた。有尾両生類の四肢再生時には、筋骨・軟骨・皮膚繊維芽細胞が脱分化し、未分化間葉系幹細胞の特徴を持った再生芽細胞の塊である再生芽が形成される。その際、神経や免疫細胞の影響下で創傷治癒から器官再生へと段階的に変化していく過程が知られており、このターニングポイントでの分子機構は再生研究における最重要課題である(Endo et al., 2004)。脱分化を促進し、再生芽細胞の増殖を支え、様々な組織由来の細胞を呼び込んで器官再生を完遂させる再生特有の細胞外環境の解明から、組織工学や再生医療を革新的発展に導く知見が得られると期待できる。しかしながら、未だその分子機構や実体は深い謎に包まれている。



マトリソーム(Matrisome)とは、プロテオミクス技術の発展により腫瘍や疾患組織の細胞外環境を構成しているタンパク質を包括的に理解する際に生まれた定義である(Hynes and Naba et al., 2012)。細胞外マトリックス(ECM)や、それに結合する分泌性増殖因子を主とするマトリソームは、器官を形成して維持する細胞にとって最も重要な細胞外環境である。特に、腫瘍が前癌性から癌性へと悪性化するタイミングで細胞外環境が変化することから、マトリソーム研究は年々盛んになっている。正常組織や器官が損傷を受けた際にも、マトリソームは破壊されながら新しく再構築され、細胞の移動、脱分化、増殖、そして再分化を保証し、器官修復や再生を完遂させる。イモリの器官再生においても、神経や免疫細胞の影響下で創傷治癒から器官再生へと段階的に変化していく過程で、器官再生特異的なマトリソームを形成していることが推測される。

マトリソーム(Matrisome)とは、プロテオミクス技術の発展により腫瘍や疾患組織の細胞外環境を構成しているタンパク質を包括的に理解する際に生まれた定義である(Hynes and Naba et al., 2012)。細胞外マトリックス(ECM)や、それに結合する分泌性増殖因子を主とするマトリソームは、器官を形成して維持する細胞にとって最も重要な細胞外環境である。特に、腫瘍が前癌性から癌性へと悪性化するタイミングで細胞外環境が変化することから、マトリソーム研究は年々盛んになっている。正常組織や器官が損傷を受けた際にも、マトリソームは破壊されながら新しく再構築され、細胞の移動、脱分化、増殖、そして再分化を保証し、器官修復や再生を完遂させる。イモリの器官再生においても、神経や免疫細胞の影響下で創傷治癒から器官再生へと段階的に変化していく過程で、器官再生特異的なマトリソームを形成していることが推測される。

四肢再生芽 (イベリアトゲイモリ)



を完遂させる。イモリの器官再生においても、神経や免疫細胞の影響下で創傷治癒から器官再生へと段階的に変化していく過程で、器官再生特異的なマトリソームを形成していることが推測される。

2. 研究の目的

本申請課題の具体的な目的は、オミックス解析と逆遺伝学的解析が可能となった有尾両生類であるイベリアトゲイモリをモデルとし、高度な器官再生を可能とする再生マトリソーム因子を徹底的に分子レベルにて同定し、器官再生におけるそれらの機能や役割を理解することである。得られた結果から、組織工学や再生医療へ革新的な生体材料の開発に繋がる知見を供することを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) イモリ四肢再生芽のマトリソームプロテオミクス解析: 四肢再生芽では再生芽細胞(未分化間葉系細胞)が大量に出現し増殖する。この再生芽を脱細胞化処理してマトリソーム分画とし、ショットガンプロテオミクス解析を行う。

(2) **カエル再生芽の比較マトリソームプロテオミクス解析**: 有尾両生類であるイモリとは対照的に、無尾両生類であるアフリカツメガエル成体の四肢再生芽は不完全な尖頭様の軟骨凝集塊となる。(1)と同様に、この不完全な再生となるアフリカツメガエル成体の四肢再生芽について、比較マトリソームプロテオミクス解析を行い、再生特有(イモリ特有)なマトリソーム因子を同定する。

(3) **イモリ四肢再生におけるマトリソーム因子の機能解析**: イベリアトゲイモリでは、受精卵に CRISPR-Cas9/sgRNA RNP をインジェクションすることにより、ファウンダー個体において体細胞変異率 99%以上のノックアウトが可能である(Suzuki et al., 2018)。この超高効率ファウンダーノックアウト(KO)解析により、個体レベルで上記標的マトリソーム遺伝子の四肢再生における機能(表現型)を評価する。さらに、これらのマトリソーム因子 KO イモリの四肢再生時における形態形成遺伝子群(Hox, Prrx1, Shh, FGF 等)の発現を *in situ* FISH などにより詳細に解析し、再生マトリソーム因子の器官再生における役割を理解する。

(4) **マウス個体を用いた再生マトリソームの *in vivo* 評価**: 再生マトリソーム因子をマウスの切断指に移植することにより、創傷治癒の促進や指再生が可能か否かを検討し、高等生物における再生マトリソームの器官再生誘導能を評価する。本申請課題では、POC 実験として脱細胞化したマウス軟骨を自家移植し、スキャフォールドとしての評価を組織学的解析により行う。

4. 研究成果

(1) **イモリ四肢再生芽のマトリソームプロテオミクス解析**: イモリ四肢再生芽を脱細胞化処理してマトリソーム分画とし、さらにヘパリン濃縮や脱グリコシル化したサンプルを、LC-MS/MS による包括的なショットガンプロテオミクスにより解析した結果、約 2000 種類のマトリソーム関連タンパク質に成功した。イモリマトリソームプロテオミクスの高度化に必要なタンパク質データベースを充実させるためのゲノムプロジェクトを先進ゲノム支援(PAGS)の支援の下に行い、20G のドラフトゲノムデータの取得を達成した。これにより、イモリプロテオミクス解析の充実が期待できる。

(2) **カエル再生芽の比較マトリソームプロテオミクス解析**: (1)と同様に、不完全な再生にとどまるアフリカツメガエル成体の四肢再生芽についてもマトリソームプロテオミクス解析を行い、イモリとカエルの結果を比較したところ、マトリソーム構成タンパク質の違いが確認された(右図)。イモリ再生芽においては、豊富な ECM のレパートリー、さらには複数のプロテアーゼインヒビターが特異的に確認された。一方、カエル再生芽には基底膜構成 ECM が少なく、軟骨 ECM が多いことが判明した。これら再生芽マトリソームの質的な違いは再生能力の違いを反映していると推測している。

イモリとカエルの四肢再生芽のマトリソームの違い



(3) **イモリ四肢再生におけるマトリソーム因子の機能解析**: 上記イモリ再生芽の特徴を示すようなマトリソーム遺伝子群について、CRISPR-Cas9 によるノックアウトを行い、その表現型を解析した。創傷治癒の際に誘導されるテネイシンを KO したイモリ個体において、当初の期待とは反対に、四肢再生は全く正常に起こった。このことはテネイシンが四肢再生においては積極的に関与していないことを意味している。その他、プロテアーゼインヒビター(遺伝子 X) やある

種のコラーゲン（遺伝子 Y）を KO しても、四肢再生は正常に起こったことから、再生能力の高いイモリでは豊富な ECM のレパートリーが機能的代償することにより、再生能力を保証しているのではないかと推測している。また、再生中のマトリソーム遺伝子の発現制御を *in vivo* 解析するために、両生類における新しいトランスジェニックやノックイン技術の開発も行い、アフリカツメガエルの再生マトリソームにおいて重要な役割を持つと推測されるパーシカン遺伝子の内在性発現の可視化に成功した。

（４）マウス個体を用いた再生マトリソームの *in vivo* 評価：この研究項目では、再生マトリソーム因子の外挿を目指した POC 実験として位置付けて行なった。新生児マウス個体から指軟骨片を取り出し、低張液・界面活性剤・ヌクレアーゼ消化することにより脱細胞化処理を行なった。その脱細胞化軟骨片をマウスの指に戻し自家移植を行い、その生着を組織学的に評価した。一連の脱細胞化はうまくいっており、コントロール（アガロース移植）と比較したところ、さまざまな再生分泌因子を染み込ませた生体スキャホールドとしての有用性が期待できる結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shibata Yuki, Okumura Akinori, Mochii Makoto, Suzuki Ken-ichi T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Protocols for transgenesis at a safe harbor site in the <i>Xenopus laevis</i> genome using CRISPR-Cas9	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102382 ~ 102382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102382	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 Mochii Makoto, Akizuki Kai, Ossaka Hero, Kagawa Norie, Umesono Yoshihiko, Suzuki Ken-ichi T.	4. 巻 506
2. 論文標題 A CRISPR-Cas9-mediated versatile method for targeted integration of a fluorescent protein gene to visualize endogenous gene expression in <i>Xenopus laevis</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 42 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2023.11.010	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 M, Okumura A, Chihara A, Shibata Y, Endo T, Teramoto M, Agata K, Bronner ME, Suzuki K	4. 巻 121
2. 論文標題 Fgf10 mutant newts regenerate normal hindlimbs despite severe developmental defects	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2314911121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2314911121	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 該当する
1. 著者名 Mochii M, Akizuki K, Ossaka H, Kagawa K, Umesono M, Suzuki K	4. 巻 506
2. 論文標題 A CRISPR-Cas9-mediated versatile method for targeted integration of a fluorescent protein gene to visualize endogenous gene expression in <i>Xenopus laevis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 42-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2023.11.010	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 Shibata Y, Okumura A, Mochii M, Suzuki K	4. 巻 4
2. 論文標題 Simple transgenesis at a novel safe harbor site in the <i>Xenopus laevis</i> genome using CRISPR-Cas9	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STARProtocols	6. 最初と最後の頁 102382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2022.06.001	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 Brown T, Elewa A, Iarovenko S, Subramanian E, Araus AJ, Petzold A, Susuki M, Suzuki K, Hayashi T, Toyoda A, Oliveira C, Osipova E, Leigh D, Simon A, Yun M	4. 巻 -
2. 論文標題 Sequencing and chromosome-scale assembly of the giant <i>Pleurodeles waltl</i> genome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biorxiv	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) 10.1101/2022.10.19.512763	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Takeuchi T, Matsubara H, Minamitani F, Satoh Y, Tozawa S, Moriyama T, Maruyama K, Suzuki K, Shigenobu S, Inoue T, Tamura K, Agata K, Hayashi T	4. 巻 149
2. 論文標題 <i>Hoxa13</i> has an essential and predominant role in digit formation during development and regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 (5)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.200282	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 Shibata Y, Suzuki M, Hirose N, Takayama A, Sanbo C, Inoue T, Umesono Y, Agata K, Ueno N, Suzuki K, Mochii M	4. 巻 489
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-based simple transgenesis in <i>Xenopus laevis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 76-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2022.06.001	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木賢一
2. 発表標題 器官再生を理解するために：時空間生体情報のマルチモーダル統合解析へ
3. 学会等名 第94回日本動物学会大会 関連集会「最先端in situ転写解析が拓く動物学研究の可能性」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木賢一
2. 発表標題 イペリアトゲイモリの行進
3. 学会等名 第93回日本動物学会大会 シンポジウム「第40回胚誘導と形態形成」・「第30回イモリ・ネットワーク：両生類研究の魅力 過去・現在・未来」
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
研究分担者	遠藤 哲也 (Tetsuya Endo) (90399816)	愛知学院大学・教養部・准教授 (33902)	

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		
米国	The California Institute of Technology		