

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06121

研究課題名(和文) Toll様受容体シグナルが促進する脱分化誘導因子のエピジェネティックな発現制御

研究課題名(英文) Toll receptor signaling mediated epigenetic regulation of blastema formation gene expression in the cricket *Gryllus bimaculatus*

研究代表者

板東 哲哉 (Bando, Tetsuya)

岡山大学・医歯薬学域・講師

研究者番号：60423422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：フタホシコオロギの後脚を脛節で切断すると、数回の脱皮を経て再生する。脚再生にはToll受容体やスカベンジャー受容体を発現する昆虫マクロファージ(プラズマ細胞)が重要である。プラズマ細胞のどのような機能が再生に寄与するのかを調べるため、活性酸素種ROSを産生するDuoxに着目した。Duox(RNAi)個体では再生脚の先端が肥大し、幼虫期致死となった。再生脚の肥大した部分には血球が過剰に遊走しており、また上皮細胞の細胞増殖もコントロール個体とは異なっていた。Toll受容体のリガンドの発現も変化していたことから、ROSによるToll受容体シグナルの活性の調節が脚再生に重要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの再生可能動物において、器官が傷害されると創傷部位でROS産生が高まり、WntシグナルやJNK、ERKなどを介して器官再生を促進することが知られている。コオロギの脚再生では、Duox(RNAi)によりROSを低下させると、再生脚の肥大や幼虫期致死の表現型が示され、血球遊走の増加と細胞増殖の低下が起こっていた。ROSの低下によりToll受容体のリガンドの発現が変化したことから、ROSはTollシグナルの活性化を介して再生を制御すると考えられる。本研究成果より、器官再生におけるTollシグナルの重要性が深まり、免疫と再生の関連を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：When the legs of the cricket *Gryllus bimaculatus* are amputated, the lost parts are regenerated through several molts. Toll and scavenger receptors-expressing plasmotocytes, which are the insect macrophages, promote leg regeneration. However, the details of this process remain poorly understood. In order to gain further insight into this process, we analyzed the function of Duox, which is a NADPH oxidase and produces reactive oxygen species (ROS), during regeneration. Crickets subjected to RNAi-mediated knockdown of Duox exhibited hypertrophy in the regenerating legs and exhibited lethal phenotypes during the nymphal stage. In comparison to control crickets, Duox(RNAi) crickets exhibited increased hemocyte migration and altered epidermal cell proliferation. Additionally, the expression of several ligands of Toll receptors was altered in Duox(RNAi) regenerating legs, suggesting that ROS-mediated regulation of Toll signaling may promote proper leg regeneration in the crickets.

研究分野：再生生物学

キーワード：コオロギ 再生 再生芽細胞 マクロファージ 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

両生類や小型魚類、昆虫、プラナリアやヒドラなど、多くの生物が器官再生能を持ち、四肢などのさまざまな器官を再生できる。一方でヒトやマウスの再生能は限られており、四肢などは再生できない。両生類や小型魚類をモデル動物とした研究から、器官再生においてマクロファージが重要な役割を果たすことが明らかにされた。申請者は、不完全変態昆虫フタホシコオロギの脚再生を器官再生のモデル系と位置付け、脚再生における昆虫マクロファージ(プラズマ細胞)の機能を解析した。Toll 受容体やスカベンジャー受容体を発現するプラズマ細胞が切断部位に遊走し、昆虫サイトカイン Upd を発現して Jak/STAT シグナルを活性化することで細胞増殖を促進し、失われた脚を再生することを解明した。プラズマ細胞における Toll 受容体シグナルの活性化は、感染性微生物には依存せず、DAMPs に依存していた。

2. 研究の目的

コオロギの脚再生において、プラズマ細胞では、DAMPs 認識時には再生を促進し PAMPs 認識時には別の経路が活性化するようなシグナル経路の使い分けがあると考えられた。そこで、どのような機能が Toll 受容体シグナルを制御し、器官再生に必要なかを解明するため、活性酸素種 ROS の産生に着目した。近年、さまざまな再生可能動物において、器官が傷害されると速やかに ROS が産生され、Wnt シグナルや Erk/Jnk シグナルを介して細胞増殖を活性化して器官再生を促進することが解明されつつある。フタホシコオロギの脚再生において、ROS の産生と Toll 受容体シグナルの活性化の関係の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ROS 産生の制御

NADPH oxidase により産生される ROS に着目し、NADPH oxidase をコードする *Nox5* 遺伝子や *Duox* 遺伝子の発現を RNAi を用いて低下させた。コントロールには *DsRed* 遺伝子を用いた。

また NADPH oxidase 阻害剤アポシニン (Apocynin/APO やジフェニリドンヨードニウム (Diphenyliodonium Chloride/DPI) を用いた阻害実験を行った。

(2) ROS の検出

ROS を可視化する目的で CellROX Green Reagent, C11-Bodipy, ジヒドロエチジウム (Dihydroethidium/DHE) の投与と、抗 4-HNE 抗体を用いた抗体染色を行った。

(3) 再生脚の組織学的解析

再生脚を組織学的に観察するため、再生脚を脚切断後 2 日 (2dpa)、4dpa、6dpa でブアン固定し、パラフィン切片化してヘマトキシリン・エオシン染色を行った。

(4) 細胞増殖の検出

細胞分裂 S 期の細胞を同定するため、Click-iT Plus EdU Imaging Kit を用いた。また、*cyclinE* および *cyclinB* 遺伝子の qPCR を行って分裂細胞を定量した。

(5) プラズマ細胞の可視化

プラズマ細胞の貪食能を利用して、蛍光色素 DiO を含むリポソーム (DiO-lipo) を体腔に投与し、再生脚に遊走するプラズマ細胞を可視化した。

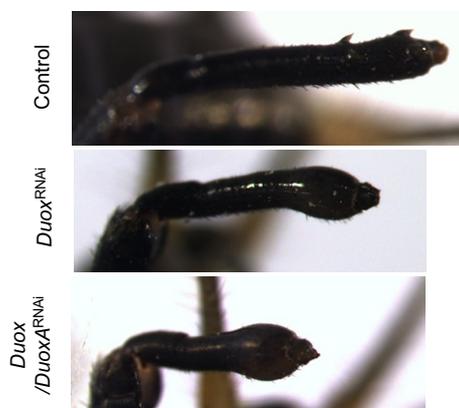
4. 研究成果

(1) NADPH oxidase 遺伝子の同定と ROS 産生阻害

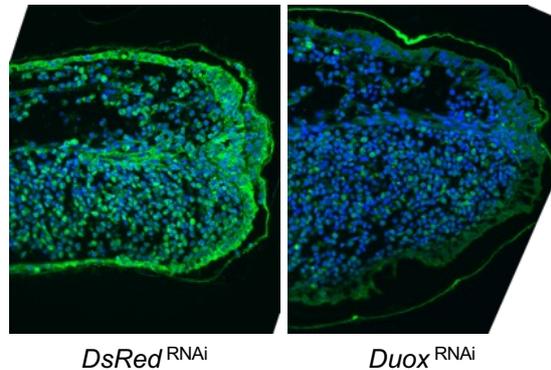
フタホシコオロギのゲノムから、NADPH oxidase をコードする *Duox* と *Nox5* の 2 つの遺伝子を同定した。RNAi により再生過程で発現を低下させて表現型を調べると、*Nox5*(RNAi) 個体は正常に再生したが、*Duox*(RNAi) 個体は再生脚の肥大を起し、個体サイズが小さいまま幼虫期致死となった。

Duox は細胞膜上に局在する酵素で、NADPH を分解して H_2O_2 を産生する。*Duox* と複合体を形成する *DuoxA* は、*Duox* の活性の調節に働く。そこで *Duox*(RNAi) と *DuoxA*(RNAi) を同時に行ったところ、*Duox*(RNAi) による再生脚の肥大が *DuoxA*(RNAi) によって増強された。

Duox(RNAi) 個体で観察された表現型が ROS に低下によるものかを確認するため、再生脚における ROS の可視化を試みた。CellROX Green Reagent や DHE を体腔に投与し、翌日に再生脚を取り出して観察したが、蛍光が弱く褪色が早いので、観察は困難であった。次に酸化ストレスにより蛍光波長が変化する C11-Bodipy を用いて ROS の可視化を試みた。C11-Bodipy を体腔に投与し、翌日に再生脚を取り出して観察したところ、コントロール個体でも *Duox*(RNAi) 個体でも酸化ストレスが検出された。*Duox*(RNAi) は効果が現れ



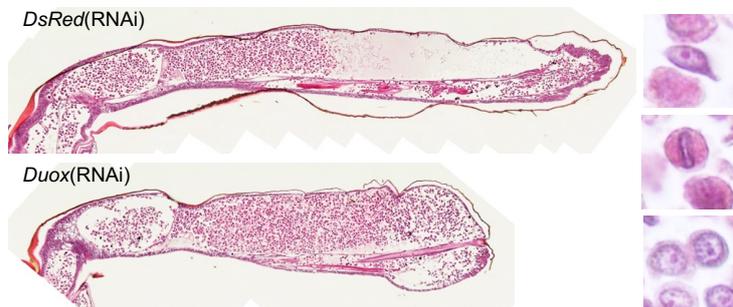
るまでに時間がかかり、効果出現前の酸化ストレスにより、*Duox*(RNAi) 個体でも C11-Bodipy の蛍光が変化したと考えられた。そこで、コントロール個体と *Duox*(RNAi) 個体の 5dpa の再生脚をパラフィン切片化し、抗 4-HNE 抗体で染色して脂質過酸化の検出を試みた。コントロール個体では、上皮組織や間充織の細胞で抗 4-HNE 抗体により脂質過酸化物が検出された。*Duox*(RNAi) 個体では検出が大幅に低下し、ROS 産生が低下していると考えられた。



NADPH oxidase 阻害剤を用いて ROS 産生を低下させた場合の表現型も観察した。DPI を投与した個体の脚再生においても、*Duox*(RNAi) 個体と同様の再生脚の肥大が観察された。一方で APO 投与個体では再生能が低下し、異なる表現型が観察された。APO は ROS 産生を亢進させる場合もあるため、コオロギに対しては ROS 産生阻害以外の効果を示すのかもしれない。

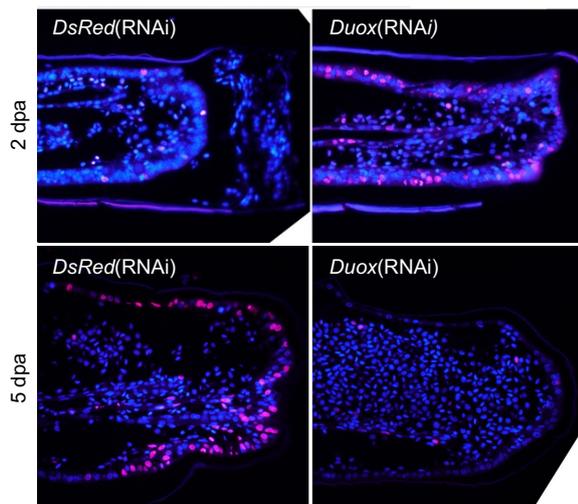
(2) 肥大した再生脚の組織学的な解析

Duox(RNAi) により肥大した再生脚でどのような変化が起こっているかを観察するため、再生脚をパラフィン切片化してヘマトキシリン・エオシン染色を行った。*Duox*(RNAi) 個体の再生脚では、脚全体で間充織の細胞が増加し、先端にかけて肥大していた。間充織の細胞を詳細に観察すると、①紡錘形の細胞、②エオシン好性の細胞、③ヘマトキシリン好性の小型の細胞、が多く分布していた。①の細胞は形態的にプラズマ細胞であり、②の細胞はエノシトイドと考えられた。そこで血球細胞のマーカー遺伝子を用いて qPCR を行ったところ、プラズマ細胞マーカーの *To112-1*, *To112-2*, *To112-5*, エノシトイドのマーカーであるフェノールオキシダーゼ *P01*, *P02*, *P05*、顆粒細胞マーカーの *integrinPS3* の発現が増加していたほか、未分化マーカーの *nanos* の発現が *Duox*(RNAi) 再生脚で増加していた。これらの発現解析から、*Duox*(RNAi) 個体では再生脚で血球が増加して再生脚が肥大したと考えられた。



(3) 再生脚における細胞増殖の解析

再生脚で増加していた血球は、再生脚での細胞増殖が増加したのか、再生脚への遊走が亢進したのかを調べるため、脚再生過程での細胞増殖を検出した。2dpa の再生脚では、コントロールではわずかに上皮細胞の細胞分裂が検出されたが、*Duox*(RNAi) 個体では上皮細胞の細胞分裂が亢進していた。間充織の細胞では増殖は見られなかった。5dpa では、コントロールでは上皮組織で分裂細胞が多数検出されたが、*Duox*(RNAi) 個体では上皮でも間充織でも分裂している細胞は検出されなかった。これらの結果から、*Duox*(RNAi) 再生脚では、血球の遊走が亢進したと考えられた。



(4) 再生脚における細胞増殖の制御

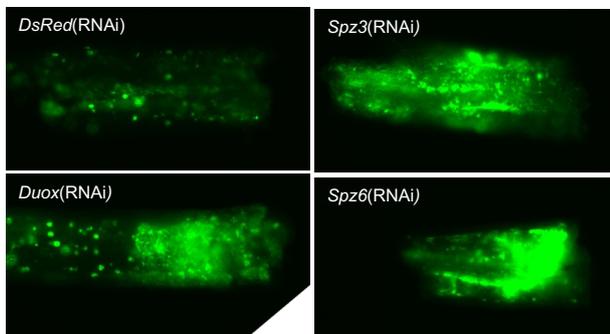
過去の研究から、*fat*(RNAi), *dachsous*(RNAi), *warts*(RNAi) は再生脚の肥大を示すこと、これら RNAi による肥大は *yorkie*(RNAi) により抑制されることが示されており、Hippo 経路が再生脚における細胞増殖を制御することを解明している。そこで *Duox*(RNAi) による再生脚の肥大を *yorkie*(RNAi) により抑制できるかを調べたところ、肥大は抑制された。再生脚に遊走する血球の増加を Hippo 経路が制御していると考えられた。

ROS によるオートファジーの制御が Hippo 経路の活性の調節に関与することが報告されてい

るため、オートファジーに関連する *Sqstm1* と *Rubicon* の機能解析を行った。*Sqstm1*(RNAi)も *Rubicon*(RNAi)も再生脚の短縮が観察され、さらに *Sqstm1*(RNAi)では個体サイズが小さくなった。これらの再生脚では、細胞分裂S期の細胞はコントロール個体と変わらなかったが、M期の細胞は減少していた。Hippo 経路を介した ROS による脚再生の制御にオートファジーが関連する可能性が示唆された。

(5) 再生脚への血球遊走の制御

再生脚への血球遊走に昆虫サイトカインが関わる可能性を検討するため、Toll 受容体のリガンド *Spz* のフタホシコオロギホモログをクローニングした。これまでに *Spz* と *Spz2* が存在することが知られていたが、フタホシコオロギのゲノムを詳細に調べると、さらに *Spz3*, *Spz6*, *Neurotrophin1* (*NT1*)が見つかった。*Duox*(RNAi) 個体の再生脚では、*Spz2* の発現が増加、*Spz3* が半減、*Spz6* は大幅に減少していた。



Spz3, *Spz6*, *NT1* に対して RNAi を行って再生脚の変化を観察したところ、*Spz3*(RNAi)や *Spz6*(RNAi) 個体では再生不全を示した個体が多かった。*NT1*(RNAi) 個体の多くは正常に再生した。

DiO-lipo を投与して、再生脚中のプラズマ細胞の分布を可視化した。コントロール個体の再生脚と比較して *Duox*(RNAi) 個体ではプラズマ細胞が増加していた。また *Spz3*(RNAi) や *Spz6*(RNAi) でもプラズマ細胞が増加していた。*Duox*(RNAi) で観察された血球遊走の増加に *Spz3* や *Spz6* が関与する可能性が示唆された。

(6) 抗酸化に関わる分子の機能解析

生体内で産生された ROS は、転写因子複合体 *Keap1/Nrf2* によって発現調節される抗酸化遺伝子群により消去される。そこで *Keap1* と *Nrf2* の機能について RNAi により解析した。*Keap1*(RNAi) では低 ROS 状態、*Nrf2*(RNAi) では高 ROS 状態になると期待される。*Keap1*(RNAi) 個体は再生能が低下し、短い脚を再生した。*Nrf2*(RNAi) ではクチクラのメラニン化が起こらず、脱皮途中で致死となったが、脚再生は起こっていた。

Duox により産生される ROS のうち、 H_2O_2 は *Catalase* によって分解される。そこで *Catalase* に対する RNAi を行った。*Catalase*(RNAi) では、付節の再生不全や再生付節の分節不全など、再生能が低下する表現型が示された。*Catalase*(RNAi) は高 ROS 状態を呈すると期待されるが、*Nrf2*(RNAi) とは表現型が異なっていた。

これらの結果から、*Duox*(RNAi) とは異なるが、*Keap1/Nrf2* 系や抗酸化遺伝子 *Catalase* も脚再生に寄与すると考えられた。

以上の結果から、フタホシコオロギの脚再生過程において、創傷後に *Duox* から ROS が産生され、血球の遊走や上皮細胞の増殖が起こって、失われた部分が再生することが分かった。RNAi による ROS 産生の低下は、*Spz* などを介して血球の遊走を制御し、またオートファジーによる Hippo 経路の調節を介して細胞増殖を制御すると示唆された。未分化性の維持に働く *nanos* の発現も *Duox* により調節を受けていたことから、幹細胞の増殖も ROS によって制御されていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Bando, T., Okumura, M., Bando, Y., Hagiwara, M., Hamada, Y., Ishimaru, Y., Mito, T., Kawaguchi, E., Inoue, T., Agata, K., Noji, S. & Ohuchi, H.	4. 巻 149
2. 論文標題 Toll signalling promotes blastema cell proliferation during cricket leg regeneration via insect macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev199916
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.199916	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 Guillem Ylla, Taro Nakamura, Takehiko Itoh, Rei Kajitani, Atsushi Toyoda, Sayuri Tomonari, Tetsuya Bando, Yoshiyasu Ishimaru, Takahito Watanabe, Masao Fuketa, Yuji Matsuoka, Austen A. Barnett, Sumihare Noji, Taro Mito & Cassandra G. Extavour	4. 巻 4
2. 論文標題 Insights into the genomic evolution of insects from cricket genomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02197-9	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 板東 哲哉, 奥村 美紗, 濱田 良真, 大内 淑代	4. 巻 57
2. 論文標題 フタホシコオロギが解き明かす免疫と再生の思いがけない関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 33-36
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 板東哲哉、奥村美紗、大内淑代
2. 発表標題 マクロファージと活性酸素による昆虫脚再生の制御
3. 学会等名 日本解剖学会 第76回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村美紗、板東哲哉、大内淑代
2. 発表標題 コオロギ脚再生におけるNADPH oxidasesにより産生される活性酸素の役割
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板東哲哉、奥村美紗、大内淑代
2. 発表標題 NADPH oxidasesによるコオロギ脚再生の制御メカニズム
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (MBSJ2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板東哲哉、奥村美紗、大内淑代
2. 発表標題 Toll受容体と活性酸素による昆虫の器官再生の制御
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Misa Okumura, Tetsuya Bando, Hideyo Ohuchi
2. 発表標題 Regulation of blastema cell proliferation during cricket leg regeneration via reactive oxygen species
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

免疫に働くToll受容体がコロナギの再生を促進するメカニズムを解明
https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id900.html
Okayama University Medical Research Updates
https://www.okayama-u.ac.jp/tp/news/news_id11026.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------