

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19533

研究課題名（和文）ストレス応答に学ぶ新たな臓器再生へのエピジェネティック制御アプローチ

研究課題名（英文）Epigenetic regulation as novel approach for organ regeneration - Learning from the stress response mechanism

研究代表者

李 桃生 (LI, Tao-Sheng)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：50379997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：健康成獣マウスとイモリ個体を、異なる酸素状態下に肺および心臓組織内における代謝関連因子およびエピジェネティック関連因子の発現の違いについて定量評価した。その結果、8%酸素刺激により、イモリ肺組織内のDnmt3、Mbd2、Mbd3、Hdac2の発現は有意に上昇し、マウス肺組織内ではDnmt1とDnmt3の発現が有意に低下していることが判明した。また、我々の改良した培養方法で、イモリ下肢組織から効率良く細胞増幅することに成功した。培養増幅してきた細胞は、老化することなく長期培養可能で、放射線照射や酸化ストレス刺激などに対する応答も実験で確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、イモリとマウスは酸素濃度変化に対する応答機構が異なることを判明できた。また、我々の改良した方法でイモリ組織細胞を長期培養増幅に成功し、イモリの組織細胞をin vitro実験に提供することが可能となった。これらの研究成果は、イモリに秘めている生物学的特性に関する分子機構の解明に繋がり、臓器再生、発癌予防、及び放射線傷害軽減などにブレークスルー成果を生み出すことに期待できる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the differences in the expression of metabolic and epigenetic-related factors in lung and heart tissues of healthy adult mice and newts under different oxygen conditions. The results showed that 8% oxygen (hypoxia) stimulation significantly increased the expression of Dnmt3, Mbd2, Mbd3, and Hdac2 in newt lung tissue, and significantly decreased the expression of Dnmt1 and Dnmt3 in mouse lung tissue. We also succeeded in efficiently expanding primary tissue cells from newts using our original method. These primary tissue cells from newts can be maintained for long periods without senescence, and are sensitively respond to radiation and oxidative stress stimuli.

研究分野：生物学

キーワード：イモリ エピジェネティック制御 ストレス応答 再生 癌 放射線傷害

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己再生修復機能は、生物種や組織臓器によって大きく異なる。例えば、極めて高い再生能力を有する両生類のイモリに対し、哺乳類のマウスは、組織臓器の再生機能が限定的である。また、マウスにおいても皮膚や肝臓は高い再生修復能力が保たれている一方、心臓や脳では、傷害後の自己再生修復が極めて低いレベルである。しかし、全ての生物種や組織臓器において、自己再生修復はストレス負荷(傷害)に対する応答行為であり、特に組織細胞のエピジェネティック修飾がそのプロセスを起動する最初のステップである。つまり、エピジェネティック修飾が自己再生修復の Common Switch であり、ストレス応答におけるエピジェネティック修飾を調節する機構が明らかにできれば、エピジェネティック制御による新たな臓器再生治療法の創出が可能と思われる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、再生能力が大きく異なる両生類のイモリと哺乳類のマウスの心臓組織細胞を用いて、組織再生を効率的に誘導できる酸素刺激などに与え、特にエピジェネティック修飾の角度から、イモリとマウスの組織臓器細胞のストレス応答機構の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) イモリ組織細胞培養と検証に関する実験：イモリの下肢から組織を採集し、我々の改良した培養方法で、組織細胞の単離培養と増幅を行った。また、培養増幅した細胞の品質(老化)、凍結保存方法、および放射線照射や酸化ストレス刺激に対する応答性などに関する検証・評価も行った。

(2) イモリとマウス個体が酸素濃度変化に対する応答に関する実験：健常成獣マウスとイモリ個体を、それぞれ低濃度酸素(8% O₂)、正常酸素(20% O₂)、または高濃度酸素(80% O₂)状態下に2時間おいた後、肺および心臓組織を採集した。それぞれの臓器組織内における代謝関連因子およびエピジェネティック関連因子の発現の違いについて、RNA-seqまたはRT-PCR法で定量評価した。

4. 研究成果

(1) イモリ組織細胞培養と検証に関する実験：

我々の改良した培養方法で、イモリ下肢組織から数ヶ月間の継代培養でコンタミネーションなく、効率良く細胞増幅することに成功した。長期間継代培養でも、イモリ組織細胞の増殖能力が低下することなく、Senescence β -Galactosidase 染色による評価で細胞の老化現象も見られなかった(図1)。

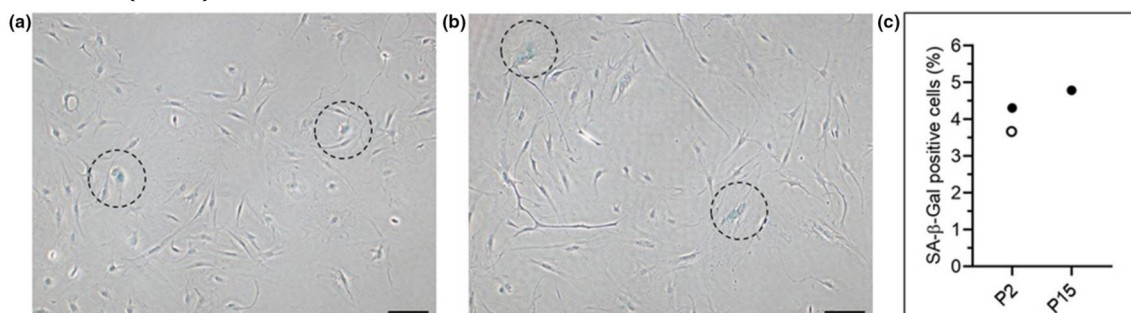


図1：継代培養P2 (a) とP15 (b) の細胞における β -Galactosidase発現の定量評価 (c)。

また、長期培養増幅した細胞は、凍結保存が可能であり、凍結保存した細胞が解凍後の細胞生存率が高く、増殖能力も保たれていたことが判明した。さらに、培養増幅した細胞を用い

て、放射線照射や酸化ストレス刺激などに対する応答の有無も実験で検証しており、培養増幅したイモリ組織細胞はこれらの刺激に敏感に反応することを確認できた（図2）。

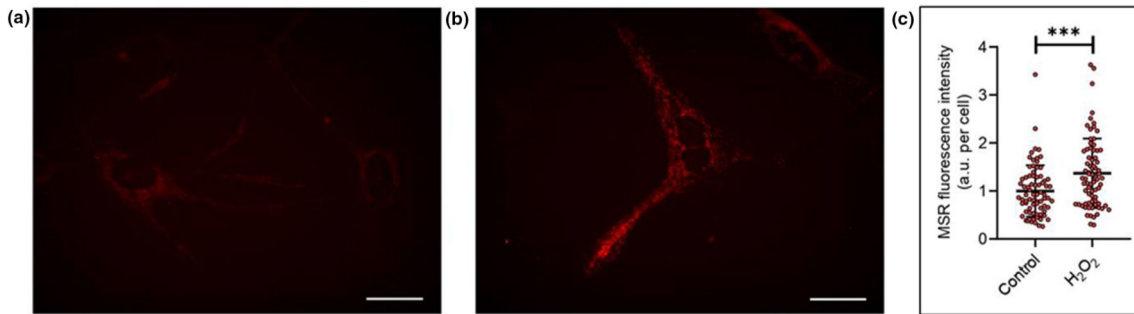


図2：継代培養P12の細胞を0 μM H₂O₂ (a) または200 μM H₂O₂ (b) 刺激1時間後に、MitoSOX™ Red stainingによるミトコンドリア内活性酸素種の発現定量 (c)。

(2) イモリとマウス個体が酸素濃度変化に対する応答に関する実験：

低濃度酸素刺激により、イモリ肺組織内のDnmt3、Mbd2、Mbd3、Hdac2の発現は有意に上昇し、マウス肺組織内ではDnmt1とDnmt3の発現が有意に低下していることが判明した（図1）。また、高濃度酸素下では肺組織内におけるこれらエピジェネティック関連因子の発現変化が軽微であることも判明した（図3）。

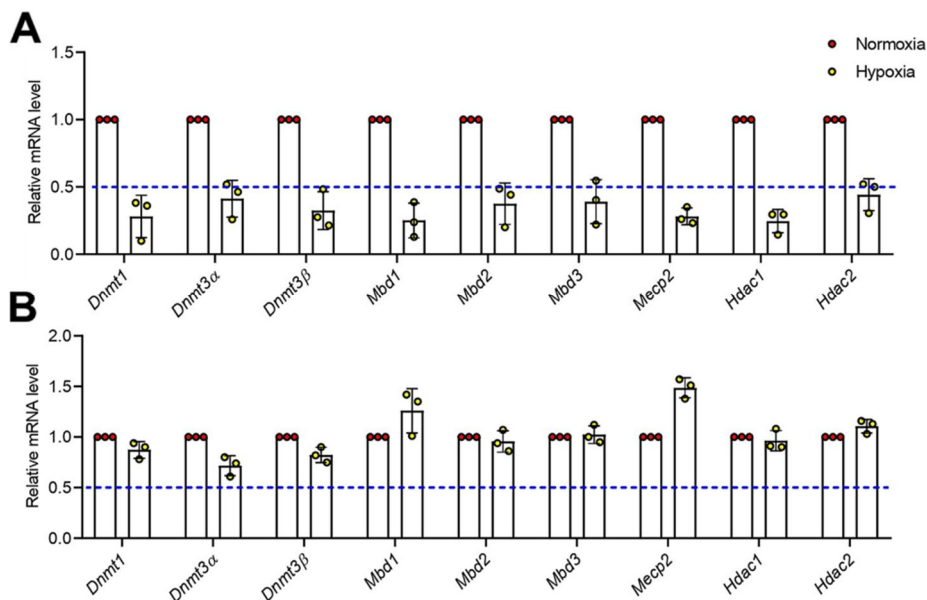


図3：酸素濃度変化によるイモリ (A) とマウス (B) 肺組織におけるエピジェネティック制御因子の発現。

一方、心臓組織については、RNA-seq解析を行った。代謝や酸化還元関連分子の発現変化がマウスとイモリ共に多く認められたが、両者の酸素濃度変化に対する反応が異なっていることも見受けられ、その詳細な結果を纏めた論文は学術誌に投稿中である。

今後は、我々が培養増幅に成功したイモリ組織細胞を用いて、in vitro実験を中心にさらなる研究を展開し、臓器再生、発癌、放射線傷害などの分野でブレークスルー知見と成果を得られることに期待したい。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Wu Ji-Wen, Zhang Xu, Sekiya Reiko, Aoyagi Kiyoshi, Li Tao-Sheng	4. 巻 2021
2. 論文標題 Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modification in Newt Tail Tissue Cells following Amputation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/8828931	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 Hasan Md. Mahmudul, Sekiya Reiko, Li Tao Sheng	4. 巻 65
2. 論文標題 Ex vivo expansion of primary cells from limb tissue of <i>Pleurodeles waltl</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 255~265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12866	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 Hasan Md. Mahmudul, Sekiya Reiko, Zhang Xu, Yassouf Mhd Yousuf, Li Tao-Sheng	4. 巻 19
2. 論文標題 Comparison of hypoxia- and hyperoxia-induced alteration of epigene expression pattern in lungs of <i>Pleurodeles waltl</i> and <i>Mus musculus</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0299661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0299661	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Md. Mahmudul Hasan, Tsuyoshi Kawabata, Reiko Sekiya, Tao-Sheng Li
2. 発表標題 Primary cells of <i>Pleurodeles waltl</i> : future tool for in vitro molecular biology studies
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
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	後藤 信治 (Goto Shinji) (50186889)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教 (17301)	

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