

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：33303
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590180
 研究課題名（和文）
 四肢の再生メカニズムの解明：なぜ、手は手になり、足は足になるのか？
 研究課題名（英文）
 Analysis of pattern formation in regenerating limbs of *Ambystoma mexicanum*
 研究代表者
 下川 隆 (SHIMOKAWA TAKASHI)
 金沢医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：70302841

研究成果の概要（和文）：四肢再生医療の開発のための基礎研究として、切断四肢が再生する有尾両生類をモデルに用い、なぜ手（前肢）からは手が、足（後肢）からは足が再生するのかということについて、その決定因子を解明しようと試みた。一連の実験からTbx5という遺伝子が再生四肢の前肢決定因子になっている可能性が示唆された。しかしながら、後肢に関しては未だ不明のままとなっているので、今後さらなる解析が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Urodeles have the ability to regenerate amputated limbs throughout their life span. In the present study, we attempted to elucidate how axolotls can specify limb type correctly during the regeneration process. We misexpressed Tbx5 in regenerating hindlimb blastema, and consequently a forelimb-like hindlimb regenerated from the hindlimb blastema. Therefore, we considered that Tbx5 plays a key role in the specification of forelimb during the regeneration process of axolotl limbs. However, we could not elucidate the factor in specifying forelimb blastema in the present study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：再生医療・有尾両生類

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療への関心が非常に高まりつつあるが、臨床応用するためには未だ多くの課題を残している。骨や血管、皮膚といった、単一の組織を再生することが現時点での目標となっているが、手や足といった、多種類の組織からなる体の一部分をまとめて再生させることに関しては、ほとんど手つかずの状態にある。

このような背景のもと、我々は切断四肢が再生する有尾両生類（サンショウウオ等）をモデル動物として用い、四肢の再生医療開発への基礎研究を行うこととした。

2. 研究の目的

有尾両生類では、切断された四肢が完全に元通り再生するので、組織再生メカニズムを研究するモデルとして最適である。遺伝子導入なども容易で、遺伝子の機能解析も容易に

行うことができる。さらに、四肢再生過程は発生過程にも酷似しており、再生のみならず発生過程も含めた、四肢形態形成過程における分子メカニズムを解析するには非常に有効なモデルである。

我々の研究目標は、四肢という器官全体を再生させる医療の開発にある。そのための基礎研究として、本研究では、*Ambystoma mexicanum* (メキシコサンショウウオ) を用いて、なぜ手(前肢)からは手が、足(後肢)からは足が再生するのかということについて、その決定因子を解明しようと試みた。

本研究ではさらに、四肢の形態形成における背腹軸決定に関与する因子である *Lmx1b* のクローニングをおこない、その発現パターンの解析を加えて行った。四肢の形態形成軸には、背腹軸に加え、近遠軸、前後軸のパターン決定の基本となる軸線が存在している。有尾両生類の四肢再生過程において、過去の研究では、近遠軸と前後軸に関しては、比較的多くの報告が認められる。しかしながら、背腹軸に関与する因子についての解析は、過去の研究ではほとんど報告がなく、我々も将来的な四肢再生医療の開発のための基礎データとして、必要なものであると常々感じていた。そのため、標題となっている手足の決定因子に関する研究と並行して、背腹軸決定に関与する因子に関する研究を行ってきた。このたび、*Lmx1b* と *Wnt 7a* について、再生過程における発現パターンの解析結果に多少のまとまりを得たのでここに報告させていただく。

3. 研究の方法

メキシコサンショウウオの四肢を切断したのち、再生組織に発現ベクターに組み込ん

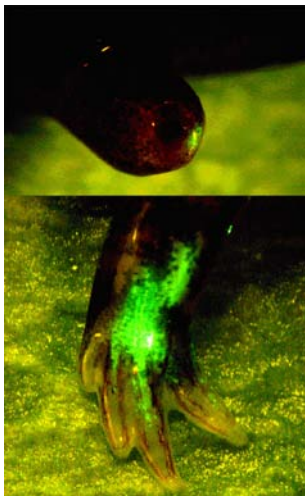


図1 再生前肢に GFP を強制発現させたところ。

だ目的遺伝子を導入し、強制的に再生中の四肢で目的遺伝子を発現させた。導入方法として、エレクトロポレーション、遺伝子銃、レトロウイルスベクターによる方法を比較検討した結果、エレクトロポレーションによる方法が、簡便かつ確実性が高いということとなった(図1)。結果の評価は、外観、組織切片、骨格染色などによって行った。

4. 研究成果

本研究では、マウスやニワトリの四肢発生過程で、前・後肢の決定に関与する *Tbx5*, *Tbx4* に着目し、アホロートルにおいてこれらの遺伝子のクローニングを行い、四肢再生過程における発現パターンについて解析し、さらにこれらの遺伝子を、再生四肢に強制発現させる実験を行った。

Tbx は四肢再生過程において、*Tbx5* が前肢にのみ、また *Tbx4* が後肢にのみ発現が認められたことから、四肢再生においてそれぞれ前・後肢の決定に関与していると考えられた。*Tbx5* を発現するベクターを後肢にエレクトロポレーションにて導入後に切断すると、そこから生じる再生体には、前肢に類似したものが認められた(図2および3)。

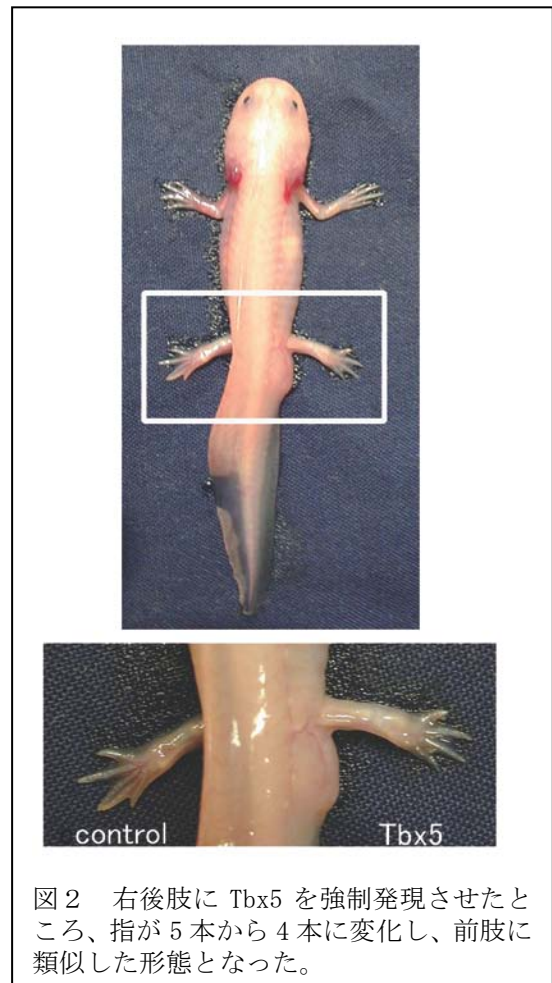


図2 右後肢に *Tbx5* を強制発現させたところ、指が5本から4本に変化し、前肢に類似した形態となった。

Tbx5発現ベクターを導入した後肢から生じる再生体には、前肢に類似したものから、完全な正常後肢にいたるまで、さまざまなバリエーションが認められた(図4)。形成された骨のパターンを精査すると、第4指と第5指とが癒合する傾向が認められ、第4・5遠位列足根骨のみ癒合する場合から(図4B)、手根骨に加え中足骨底での第4・5中足骨の癒合(図4C)、第4・5中足骨体での癒合(図4D)しているものが認められた。これらのバリエーションが生じた理由として、導入されたTbx5発現ベクターの効率の差によるものではないかと考えられた。

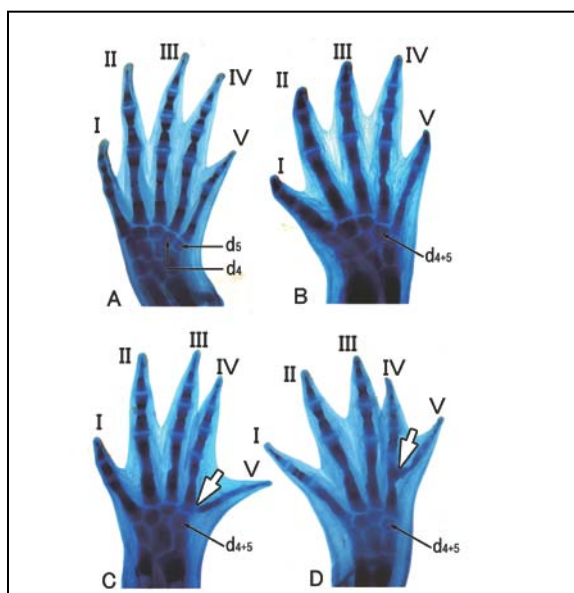


図4 Tbx5 発現ベクターを導入した後肢から生じた再生体にみとめられたバリエーション。

- A) 正常後肢
- B) 第4・5遠位列足根骨のみ癒合 (d_{4+5})
- C) 第4・5遠位列足根骨の癒合 (d_{4+5})に加え、中足骨底での癒合(白矢印)を伴う例
- D) 第4・5遠位列足根骨の癒合 (d_{4+5})に加え、中足骨体での癒合(白矢印)を伴う例

Tbx4発現ベクターを前肢に導入する実験を試みたが、最終的には残念ながら後肢に類似した再生体を得ることはできなかった。発現ベクターの機能状態を再検討する必要があると考えられた。

以上の実験から、Tbx5が再生四肢の前肢決定因子になっている可能性が示唆された。しかしながら、後肢に関しては未だ不明のままとなっているので、今後さらなる検討を加えていきたいと考えている。

今回、我々は四肢の形態形成における背腹

軸決定に関与する因子であるLmx1bのクロニングをおこない、その発現パターンの解析を加えて行ってきた。このたび、Lmx1bとWnt7aについて、再生過程における発現パターンの解析結果についても併せてここで報告させていただく。マウスやニワトリの四肢発生過程で、背腹軸のパターン決定に関与していると報告のあるLmx1bとWnt7aについて、アホロートルにおいてこれらの遺伝子のクロニングを行い、四肢再生過程における発現パターンについて解析した。

Lmx1bは四肢発生過程において、背側間葉に発現が認められると報告されている。アホロートルの四肢発生過程においてLmx1bは、過去の報告同様に背側間葉に発現が認められた(図5)。

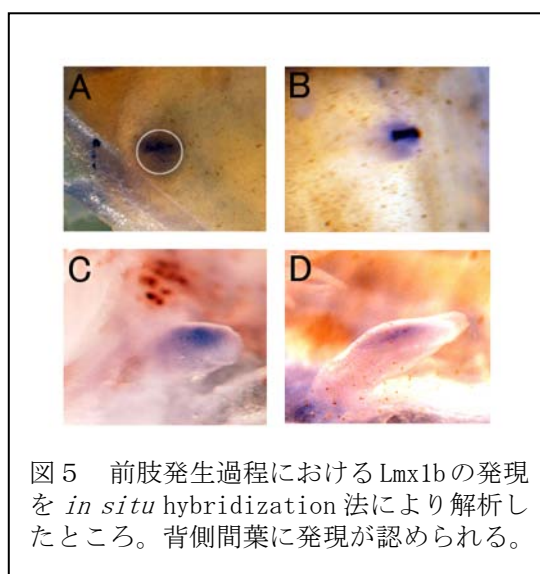


図5 前肢発生過程におけるLmx1bの発現を *in situ* hybridization法により解析したところ。背側間葉に発現が認められる。

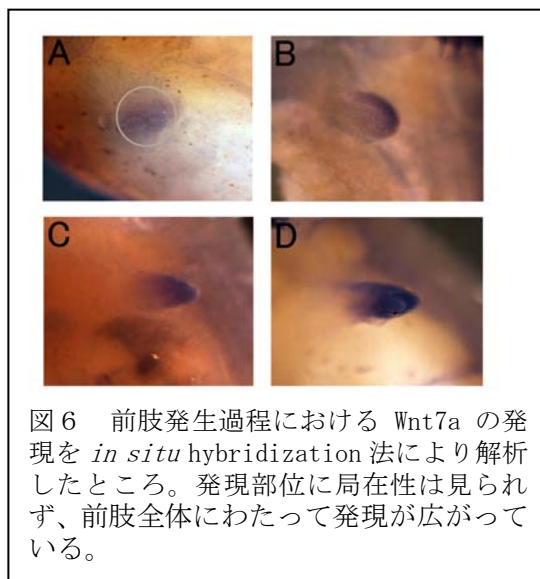


図6 前肢発生過程におけるWnt7aの発現を *in situ* hybridization法により解析したところ。発現部位に局在性は見られず、前肢全体にわたって発現が広がっている。

Wnt7aは過去に報告された有羊膜類などにおいて、発生四肢の背側外胚葉に発現が認め

られ、背側間葉にLmx1bの発現を誘導するといわれている。アホロートル発生前肢において、Wnt7aの発現を解析したところ、間葉を含めた発生前肢全体に発現が認められ、過去の有羊膜類での報告とは明らかに異なっていた（図6）。それゆえ、アホロートルではWnt7aとLmx1bとの間に、明確な相互作用が存在しない可能性が示唆され、発現に局在性が認められないことから、発生四肢において背腹軸の決定には関与していないものと考えられた。

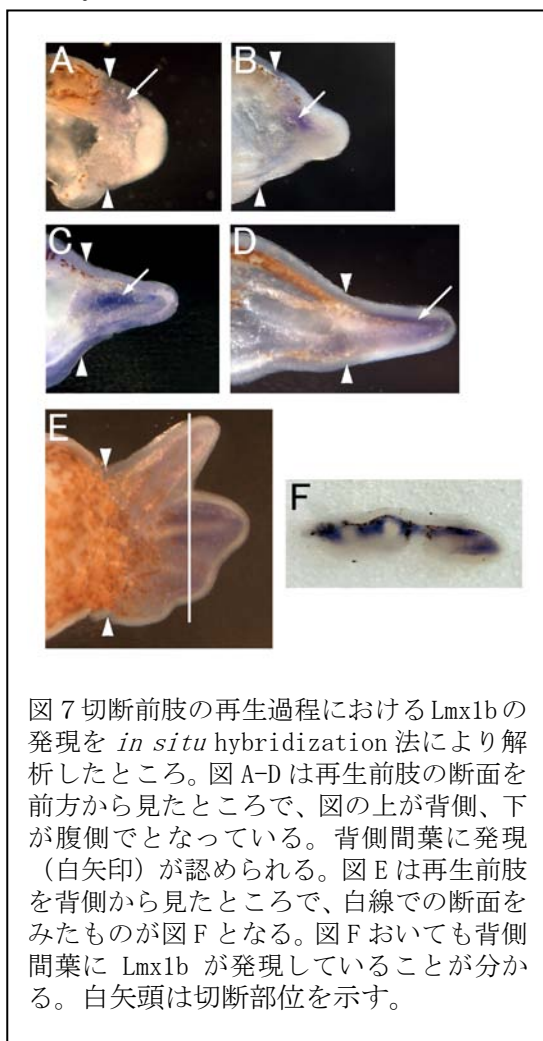


図7 切断前肢の再生過程におけるLmx1bの発現を *in situ* hybridization法により解析したところ。図A-Dは再生前肢の断面を前方から見たところで、図の上が背側、下が腹側となっている。背側間葉に発現（白矢印）が認められる。図Eは再生前肢を背側から見たところで、白線での断面をみたものが図Fとなる。図Fにおいても背側間葉にLmx1bが発現していることが分かる。白矢頭は切断部位を示す。

アホロートルの四肢切断再生過程において、Lmx1bの発現様式を解析したところ、発生四肢と同様に背側間葉に発現が認められた。（図7）。このことから、再生過程においてLmx1bは背腹軸を決定する因子の一つである可能性が示唆された。データは示さないが、Lmx1bを組み込んだ発現ベクターをエレクトロポレーションにより再生四肢の腹側間葉に導入すると、再生した四肢の形態に指数の減少や、関節形態の異常などが見られた。筋肉の変化をみると、本来腹側になるところに背側の構造物に類似した筋が形成されていた。さらなる解析が必要ではあるが、Lmx1bが再生体の背

腹軸決定に重要な役割を持っていると考えられた。



図8 切断された前肢の再生過程におけるWnt7aの発現を *in situ* hybridization法により解析したところ。図は再生四肢の断面を見たところで、図の上が背側、下が腹側となっている。発現部位に局在性は見られず、前肢全体にわたって発現が広がっている。白矢頭は切断部位を示している。

アホロートルの四肢切断再生過程において、Wnt7aの発現様式を解析したところ、発生四肢と同様に間葉を含めた再生体全体に発現が認められた（図8）。発現に局在性が認められないことから、再生四肢において背腹軸の決定には関与していないものと考えられた。データは示さないが、Wnt7aを組み込んだ発現ベクターをエレクトロポレーションにより再生四肢の腹側間葉に導入すると、再生した四肢の形態に全く変化は認められず、さらなる解析が必要ではあるものの、Wnt7aが再生過程において、背腹軸決定に関与している可能性は低いと考えられた。

以上のように、有尾両生類における切断四肢の再生過程において、前後肢を決定する因子の解析ならびに、背腹軸を決定する因子の解析を行ってきた。我々の最終目標である四肢再生医療開発への道のりはまだまだ遠いが、研究を進め、目標へ近づきたいと考えている。有尾両生類における結果を、そのまま哺乳類に応用するのは非常に難しいが、今回クローニングしたTbx4、Tbx5、Lmx1b、Wnt7aといった遺伝子は、塩基配列が哺乳類のもの高い相同性を示しており、生物のボディプランは共通しているのだと改めて認識させられた。ヒトは切断四肢が再生しないので、四肢再生能力を持つ両生類との違いを明らかにすることが、ヒトの四肢再生医療の開発への早道なのではないかと我々は考えている。

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3件)

① Shimokawa, Yasutaka, Kominami, Shinohara. Lmx-1b and Wnt-7a expression in axolotl limb during development and regeneration. 2013. Okajimas Folia Anat Jpn 89: 119-124. (10.2535/ofaj.89.119)

② Shimokawa, Kominami, Yasutaka, Shinohara. Misexpression experiment of Tbx5 in axolotl (*Ambystoma mexicanum*) hindlimb blastema. 2013. Okajimas Folia Anat Jpn 89: 113-118 (10.2535/ofaj.89.113)

③ Shimokawa, Yasutaka, Kominami, Shinohara. Wound epithelium function in axolotl limb regeneration. 2012. Okajimas Folia Anat Jpn 89: 75-81 (10.2535/ofaj.89.75)

[学会発表] (計1件)

① 下川隆、安高悟、木南利栄子、篠原治道. The function of the wound epidermis in the regeneration of axolotl limb. 第116回日本解剖学会学術総会、2011年3月25日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下川 隆 (SHIMOKAWA TAKASHI)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70302841

(2) 研究分担者

安高 悟 (YASUTAKA SATORU)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：30139787

木南 利栄子 (KOMINAMI RIEKO)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：60163672