

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570239

研究課題名(和文) 迅速な傷表皮形成と再生開始メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Mechanism for rapid wound healing and initiation of regeneration

研究代表者

餅井 真 (MOCHII, Makoto)

兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授

研究者番号：90202358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：両生類付属器官の再生開始のしくみを明らかにする目的で、アフリカツメガエル幼生尾部切断後における迅速な傷修復および脊索の伸張について研究した。

- 1 脊索の単離・培養および、移植実験から、傷表皮や筋肉組織が脊索の再生に重要な役割を持つことが示唆された。
- 2 es1遺伝子プロモーターを用いることにより、傷表皮細胞を効率よく標識できるトランスジェニック系統を確立した。この系統を用いた解析から、es1の発現上昇と傷修復にはTGF- $\beta$ 、ROSおよびERKシグナルが必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I analyzed wound healing and regeneration initiation after tail amputation using *Xenopus* tadpoles.

1. Analysis of notochord fragments grafted under host skin suggested that wounding of notochord, skin and muscle tissue is necessary to initiate notochord regeneration.
2. I established transgenic lines harboring egfp under control of *xes1* promoter/enhancer, in which wound epidermis is labeled in situ. Pharmacological analysis using the transgenic tadpoles showed that TGF- $\beta$ , ROS and ERK signals are required for both *es1* expression and proper wound healing.

研究分野：発生生物学

キーワード：尾部再生 傷修復 脊索 再生開始 シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

両生類は一般的にほ乳動物よりはるかにすぐれた再生能力を持つ。その再生メカニズムを明らかにし、ほ乳動物と比較することによって、再生能力の本質を明らかにすることができ、将来的には再生医療へと応用することが期待されている。イモリやサンショウウオなど有尾両生類の四肢再生および、無尾両生類のオタマジャクシの尾部をモデルとした研究から、両生類の付属器官を切断すると、まず迅速に表皮が傷口を被い、引き続き傷口を被った表皮(傷表皮)の一部が多層化することが知られている。この多層化した傷表皮はAEC (apical epidermal cap)とよばれ、その直下に再生芽の主成分となる細胞が集積、増殖、さらには分化することにより再生が進行する。古典的な実験から、このAECが再生に必要な構造であり、直下の細胞との相互作用が重要であると示唆されている。一方、ほ乳動物の付属肢が切断された場合、傷口を被うのは血餅であり、その後時間をかけて表皮に置き換えられる。両生類で見られるような傷表皮やAECが形成されることはなく、直下に再生芽が形成されることもない。つまり、傷口が迅速に表皮で被われ、AECが形成されることが、再生が進行するための必須のステップであり、逆に、このステップが無いことが理由となって、ほ乳動物で付属肢が再生しないと推定することができる。しかし、迅速に傷口が表皮で被われるしくみやAECが形成するメカニズム、あるいはAECの再生における役割の詳細についてはほとんど明らかにされていない。

我々は、これまでにアフリカツメガエル幼生の尾部再生について研究をおこなってきた。その結果、尾部切断後24時間以内に傷口が表皮で被われ、その一部は顕著な多層構造を持つAECとなり、直下に脊索細胞が集積、増殖することにより再生が進行することを明らかにした。また、再生過程で一過的に発現上昇する遺伝子の網羅的な解析から、AECを含む傷表皮で強く発現する遺伝子として、アフリカツメガエル *es1* を同定している。

## 2. 研究の目的

両生類の付属器官の切断後にみられる表皮による迅速な傷修復とそれに引き続きおきるAEC形成を制御するしくみを明らかにする。また、AECが直下の細胞とどのような相互作用をすることにより、再生が開始するのか明らかにする。具体的には、アフリカツメガエル幼生の尾部切断後、どのような過程により表皮が傷口を被い、多層化してAECとなるのかを解析する。また、脊索細胞の集合、増殖、分化に、AECあるいはAEC由来の分子がどのように影響するかについて解析する。さらに、*es1* 遺伝子プロモーターを利用した傷表皮の標識をおこない、これらの研究に利用する。

## 3. 研究の方法

### (1) 傷修復過程の観察

幼生尾部切断後に、傷口が表皮で被われる過程とAECが形成される過程を組織学的、および色素を用いた細胞標識により解析した。

### (2) 脊索再生に必要な組織と因子の同定

幼生尾部の脊索を単離し、別の個体の皮下に移植し、さらにもう一度傷つけることにより、どのような組織への損傷が脊索の再生を誘導するか検討した。また、単離した脊索を培養し、添加したシグナル因子がその伸張を促進するかどうか検討した。

### (3) *es1* 遺伝子の発現調節領域を用いたトランスジェニック系統の確立

*es1* 遺伝子上流配列を含むレポーター遺伝子を持つトランスジェニック個体を作成し、内在 *es1* 同様に傷表皮やAECで強く発現するかどうか検討した。

### (4) *es1:egfp* トランスジェニック系統を用いた傷修復シグナルの検索

傷表皮で *Egfp* を発現するトランスジェニック系統を確立し、傷修復にどのようなシグナルが必要か、様々なシグナルに対する阻害剤を用いて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 傷修復過程の観察

蛍光標識したレクチン(WGA)を用いることにより、効率よく表皮細胞を標識することがわかった。尾部切断後24時間までに、残った部分の表皮が上皮形態を維持したまま傷口被うことがわかった。また、もとの表皮の基底層と表層の両方の細胞が傷口を被うことが示唆された。

### (2) 脊索再生に必要な組織と因子の同定

幼生尾部から純粹に単離した脊索断片を培養すると、個々の細胞が移動し、脊索としての形態を維持しなかったが、周囲を囲む細胞外基質性の鞘とともにマトリゲル中で培養することにより、形態を維持できることがわかった。また、AECを含む断片を共培養すると、脊索の部分的な伸長が見られた。一方、解離した脊索細胞の増殖活性を持つbFGFを添加しても明らかな変化は観察されなかった。

恒常的に *Egfp* を発現するトランスジェニック個体から単離した上記脊索断片を別個体の皮下に移植し、さらに尾部を切断することにより、標識された脊索の再生過程を観察することができた。周囲の組織を部分的に切断する実験から、脊索の再生(伸長)には、表皮と脊索の損傷に加えて筋肉領域の損傷が必要であることが示唆された。

### (3) *es1* 遺伝子の発現調節領域を用いたトランスジェニック系統の確立

*es1* 遺伝子上流5kb断片のうち傷表皮における遺伝子発現に必要な領域を絞り込む実験をおこなったところ、レポーター遺

伝子の発現レベルと頻度は段階的に低下したものの、上流約 300 b 程度でも、傷に応答する発現を制御できることがわかった。

*es1* 遺伝子上流 5kb を含む断片に *egfp* をつないだコンストラクト (*es1:egfp*) を発現するトランスジェニック個体を成熟させ、このうち 2 個体のメスから、安定して *Egfp* を発現する子孫を得ることができた。

上記 F1 幼生を用いて、詳細に *Egfp* の発現を観察したところ、胚発生における *es1* の発現の大部分を再現するとともに、幼生の尾部、肢芽切断後および成体の傷口で発現上昇することが明らかとなった。尾部切断後は、6 時間以内に傷口に近接した表皮で発現を開始し、傷を被う表皮で強い発現が維持されるとともに、24 時間にかけて発現領域は頭部方向に広がった。約 2 日後に発現が最大となり、特に AEC 領域で強く発現したが、3 日後では、AEC 以外の領域での発現が低下した。つまり、得られたトランスジェニック系統では、AEC を含む傷表皮領域で、*Egfp* が安定して、個体ごとのばらつきが少ない状態で発現することがわかった。

(4) *es1:egfp* トランスジェニック系統を用いた傷修復シグナルの検索

傷修復過程が抑制されることが知られている TGF- $\beta$  シグナルの阻害剤で、上記トランスジェニック幼生 (F1 世代) を処理したところ、*es1:egfp* の発現上昇が低下し、この発現には TGF- $\beta$  シグナルが必要であることが示唆された。さらに、アフリカツメガエルの尾部やゼブラフィッシュのヒレ再生に必要であると報告されている複数のシグナルに対する阻害剤を用いて検討したところ、ROS および ERK シグナルが、尾部切断後の *es1:egfp* の発現上昇に必要であることが示唆された。また、これらシグナルが傷修復に必要であることも明らかになった。

## 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 4 件)

Taniguchi Y, Watanabe K, Mochii M.

Notochord-derived hedgehog is essential for tail regeneration in *Xenopus* tadpole. *BMC Dev Biol.* 査読あり 2014 Jun 18;14:27.

Doi: 10.1186/1471-213X-14-27.

Terayama K., Kataoka K., Morichika K., Orii H., Watanabe K. and Mochii, M.

Developmental regulation of locomotive activity in *Xenopus* primordial germ cells. *Dev*

*Growth Differ.* 査読あり 2013

Feb;55(2):217-28.

Doi: 10.1111/dgd.12018.

Taguchi A, Takii M, Motoishi N, Orii H,

Mochii M and Watanabe K Analysis of

localization and reorganization of germ plasm in *Xenopus* transgenic line with fluorescence-labeled mitochondria *Dev.*

*Growth Differ.* 査読あり 2012 54: 767-776.

DOI: 10.1111/dgd.12005

Tada H, Mochii M, Orii H and Watanabe K

Ectopic formation of primordial germ cells by transplantation of the germ plasm: Direct evidence for germ cell determinant in

*Xenopus*. *Dev. Biol.* 査読あり 2012 371: 86-93.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.08.014

[学会発表] (計 12 件)

K. Sato, Y. Umesono, M. Mochii Screening of early signals in *Xenopus* tadpole tail regeneration using *es1:egfp* transgenic lines. The 5th Short-term Student Exchange Program Between College of Natural Sciences in Dong-A University and School of Science in University of Hyogo. 2015 年 8 月 21 日 兵庫県科学技術支援センター(兵庫県上郡町)

餅井真 傷表皮で発現する *Xenopus es1* について 次世代両生類研究会(第一回会合)2015 年 8 月 24 日 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

佐藤、佐久間、鈴木、山本、渡辺、餅井 アフリカツメガエル初期胚における *es1* 遺伝子の機能の解析 日本動物学会第 85 回大会 2014 年 9 月 11 日 東北大学(宮城県仙台市)

伊藤、渡辺、餅井 アフリカツメガエルにおける *Chloride intracellular channel 5* の発現と機能 日本動物学会第 85 回大会 2014 年 9 月 11 日 東北大学(宮城県仙台市)

多田、餅井、梅園、織井 アフリカツメガエルの始原生殖細胞で zygotic に発現する遺伝子の解明 日本動物学会第 85 回大会 2014 年 9 月 11 日 東北大学(宮城県仙台市)

Okumura, Umesono, Mochii Gene expression analysis of the apical epithelial cap during regeneration in *Xenopus laevis*. 2nd International

Picobiology Institute Symposium 2014  
年 9月 9日 兵庫県科学技術支援センタ  
ー(兵庫県上郡町)

奥村、渡辺、餅井 アフリカツメガエル  
幼生尾部再生時に傷表皮で発現する遺伝  
子の解析 日本動物学会第 64 回大会  
2013年9月26日 岡山大学(岡山県岡山  
市)

Terayama, Orii, Watanabe, Mochii  
Locomotive activity of *Xenopus*  
primordial germ cell is regulated by  
extracellular signals involving SDF-1.  
46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese  
Society of Developmental Biologists  
2013年5月28日 くにびきメッセ(島根  
県松江市)

餅井 ゼノパス幼生の尾部再生からわか  
ること 日本動物学会第 83 回大会 2012  
年9月13日 大阪大学(大阪市)

大杉、保地、渡辺、餅井 *Xenopus* 幼生  
尾部再生の開始メカニズム 日本動物学  
会第 83 回大会 2012年9月13日 大阪  
大学(大阪市)

Tada, Mochii, Orii, Watanabe Ectopic  
formation of primordial germ cells by  
transplantation of the germ plasm. 14th  
International *Xenopus* Conference 2012  
年9月9日 Giens Peninsula (France)

Yasukawa, Yoshioka, Tazaki, Watanabe,  
Mochii *Xenopus es1* is expressed in the  
wound epidermis of regenerating tail  
and limb bud in tadpole. Joint Meeting of  
45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese  
Society of Developmental Biologists &  
The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese  
Society for Cell Biology 2012年5月28日  
神戸国際会議場(神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/regeneration/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

餅井 真 (MOCHII, Makoto)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・  
准教授

研究者番号：90202358

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

大杉 忠裕 (OOSIGI, Tadahiro)

安川 重裕 (YASUKAWA, Shigehiro)

奥村 晃成 (OKUMURA, Akinari)

佐藤 健太郎 (SATO, Kentaro)

原田 星矢 (HARADA, Seiya)