

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640051

研究課題名(和文)再生芽「自己抗原」の同定とそのマスキングによる再生能賦活化に関する研究

研究課題名(英文) Study on the reactivation of regenerative ability by masking 'autoantigens' expressed in organ blastema.

研究代表者

久保 健雄 (Kubo, Takeo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：10201469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ツメガエル幼生は、不応期では、未熟な白血球が再生芽増殖細胞を「非自己」として攻撃するため尾再生が起きないと考えられている。本研究では、再生芽増殖細胞特異的に発現する interleukin-11 (il-11) や、増殖細胞を攻撃する白血球のマーカーである XPhyH-like の機能解析を通じて、尾再生の分子機構解明を目指した。

その結果、IL-11 は尾再生に必要であり、単独で多彩な組織に由来する未分化細胞の誘導・維持に働くことが示唆された。また、XPhyH-like マウスホモログは白血球活性化に伴い発現上昇することから、カエルでも同様に、白血球を介した尾再生能の阻害に関わる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Xenopus laevis tadpoles transiently lose their tail regenerative ability during the 'refractory period', probably because immature leukocytes attack proliferating tail blastemal cells as 'non-self' during the period. In the present study, we aimed to clarify molecular mechanisms underlying tail regeneration through functional analyses of interleukin-11 (il-11), which is selectively expressed in the proliferating tail blastemal cells, and XPhyH-like, which is a putative marker gene for leukocytes that attack tail blastemal cells. The results indicated that il-11 is necessary for tail regeneration and play important roles in the induction and maintenance of undifferentiated cells of various tissue origin in tail blastema. In addition, XPhyH-like was suggested to be related to impaired tail regenerative ability caused by immature leukocytes, because murine XPhyH-like homologue (Phyhd1) was induced in leukocytes accompanied with the leukocyte activation.

研究分野：動物生理化学

キーワード：アフリカツメガエル 器官再生 未分化増殖細胞 インターロイキン-11 ゲノム編集 PhyH-like Phyhd1 T細胞活性化

1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 幼生 (オタマジャクシ) は高い尾再生能をもつが、発育段階で一時的に再生能を失う (再生不応期)。代表者らは不応期とその後の可能期では尾切断後の免疫応答が異なること、不応期の幼生を免疫抑制剤処理したり、免疫細胞分化に働く *PU.1* をノックダウンすることにより、尾再生能が顕著に回復することを発見した。これら知見に基づき代表者らは、不応期では未熟な自己反応性免疫細胞が再生芽増殖細胞を「非自己」として認識・攻撃するため再生能を失うこと、しかしながらその後の可能期では制御性 T 細胞が分化し、自己反応性免疫応答を抑制するため再生能が回復することを示唆した [Fukazawa *et al.* *Development* (2009)]。さらに、この尾再生に阻害的に働く白血球のマーカー遺伝子の候補として *XPhyH-like* を同定した [Naora *et al.* *BBRC* (2013)]。 *XPhyH-like* の発現は不応期に幼生全身で一過的に増強し、白血球分画に濃縮された。しかしながら、 *XPhyH-like* 発現細胞が実際に再生芽増殖細胞を攻撃する「自己反応性」免疫細胞の実体なのか、また再生芽細胞が発現すると予想される「自己抗原」の実体は何かについては不明である。本研究では、こうした尾再生に阻害的に働く免疫細胞や、再生芽増殖細胞「自己抗原」の実体を同定し、再生における役割を解明することで、将来的には再生能の人為的賦活化に向けた、新たな手掛かりを得ることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、以下の目的を設定した。

- (1) 尾再生芽増殖細胞が発現すると想定される「自己抗原」を同定する目的で、再生芽増殖細胞を単離し、その遺伝子発現プロファイルを解明する。同定された遺伝子群から「自己抗原」となり得る分子を探索し、その機能を解析する。並行して同定された遺伝子群から、再生芽増殖細胞の分化や増殖に必要な役割を担う分子を探索し、その機能を解析する。
- (2) ツメガエルでは免疫細胞マーカー遺伝子がほとんど利用できないため、 *XPhyH-like* 陽性細胞の同定は困難であった。一方、 *XPhyH-like* のホモログはマウスにも存在する [Naora *et al.* *BBRC* (2013)]。そこで、 *XPhyH-like* ホモログがマウスでも免疫細胞に発現するか調べ、免疫細胞でどのような機能をもつかを解析する。
- (3) (1) で同定した遺伝子の中でも、 *interleukin-11 (il-11)* は、再生芽での発現の組織特異性が非常に高いことから再生芽増殖細胞において重要な機能をもつと推測された。

そこで、ゲノム編集法を用いることで、 *il-11* が尾再生に必要な役割を担うか、担う場合はどのような役割を担うか調べる。

3. 研究の方法

- (1) 幼生尾の「再生芽増殖細胞 (4X)」を単離するため再生芽の組織をコラゲナーゼ処理し、分離した細胞を FACS に適用し、核相が 4X の細胞を分離した。その際、核相が 2X の細胞を「再生芽非増殖細胞 (2X)」として単離した。さらに、正常尾の増殖細胞と比較するため、尾芽胚の正常尾組織もコラゲナーゼ処理の後、FACS に適用し、核相が 4X の細胞を「尾芽胚増殖細胞 (4X)」として分離した。それぞれから抽出した mRNA を用いて RNA-seq 法を行い、「再生芽増殖細胞 (4X)」に選択的に発現する遺伝子を選別した。なお、本研究項目は東京大学の白髭克彦教授、加藤由紀助教との共同研究として実施した。
- (2) *XPhyH-like* のマウスホモログ *Phyhd1* のマウス成体での発現特異性を定量的 RT-PCR 法により調べた。さらに末梢血から T 細胞を単離し、抗 CD3 抗体と抗 CD-28 抗体を用いて活性化した後、経時的に T 細胞を回収し、 *Phyhd1* の発現を定量的 RT-PCR 法で調べた。
- (3) *il-11* の尾再生における機能を調べる目的で、ゲノム編集法を用いて *il-11* を体細胞レベルでモザイクにノックダウンした F₀ 幼生を作出し、尾の再生に対する影響を調べた。また、 *il-11* ノックダウン群と対照群の再生尾での遺伝子発現プロファイルを RNA-seq 法で比較した。さらに *il-11* を正常尾で強制発現した幼生尾について、未分化細胞のマーカー遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法で調べた。

4. 研究成果

- (1) 再生芽増殖細胞を FACS を用いて単離し、その遺伝子発現プロファイルを RNA-seq で網羅的に解析するという新規な手法により、尾の再生芽非増殖細胞 (2X) や尾芽胚増殖細胞 (4X) に比べて、尾再生芽増殖細胞 (4X) で選択的に発現する 10 個の遺伝子を、世界で初めて同定した [Tsujioka *et al.* *PLoS ONE* (2015)]。その中で、 *il-11* はゼブラフィッシュの心臓再生時に誘導されることから [Fang *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2013)]、種を超えて *il-11* が器官再生に働く可能性が示唆された。また *keratin-18* のホモログである *Ouro1* と 2 は、アフリカツメガエルの変態期に自身が「自己抗原」として免疫細胞により攻撃されることで尾の退縮に働くことが提案されている [Mukaigasa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2009)]。従って、尾再生においても *keratin-18* を発現する再生芽増殖

細胞が「非自己」として誤認されることで、尾の再生が阻害される可能性が考えられた。

(2) これまで *XPhyH-like* のマウスホモログとして *Phyhd1* が同定されていたが今回、その発現の組織特異性を調べた結果、*Phyhd1* がマウスでは白血球(T細胞とB細胞)で発現し、T細胞をT細胞受容体に対する抗体を用いて刺激すると発現誘導されることを見いだした[Furusawa *et al.* BBRC (2016)]。これはT細胞活性化の新規な分子機構の解明につながるだけでなく、ツメガエルの器官再生に阻害的に働く免疫系の解明にもヒントを与える興味深い知見である。ツメガエルでも不応期にはXPhyH-likeを発現する白血球が活性化されており、これが再生能の阻害に繋がる可能性が考えられる。

(3)ゲノム編集法を用いて *il-11* を体細胞レベルでモザイクにノックダウンしたF₀幼生を作出したところ、尾再生が顕著に抑制されることから、*il-11* が尾再生に必要であることが示された。また、*il-11* ノックダウン群と対照群の再生尾での遺伝子発現プロファイルをRNA-seq法で比較したところ、*il-11* ノックダウン群の尾切断端では複数組織の未分化細胞マーカー遺伝子の発現が減少していたことから、*il-11* が複数組織の未分化細胞の分化・誘導に働くことが示唆された。さらに *il-11* を正常尾で強制発現した幼生尾では、これらの未分化細胞のマーカー遺伝子の発現が増強された。これらの知見は *il-11* が器官再生時の未分化細胞の分化誘導や維持に重要な働きを担うことを示唆している[Tsujioka *et al.* submitted]。

上記の知見は、再生に阻害的に働く免疫応答と再生芽増殖細胞に特異的な増殖シグナルの一端を解明した点で、国際的にも見ても、非常に重要な研究成果であると考えている。

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)(全て査読有)

1. Hatta-Kobayashi Y, Toyama-Shirai M, Yamanaka T, Takamori M, Wakabayashi Y, Naora Y, Kunieda T, Fukazawa T, Kubo T. (2016) Acute phase response in amputated tail stumps and neural tissue-preferential expression in tail bud embryos of the *Xenopus* neuronal pentraxin I gene. *Dev. Growth Differ.* 58(9):688-701 (2016) DOI: 10.1111/dgd.12326
 2. Furusawa Y, Kubo T., Fukazawa T (2016) *Phyhd1*, an *XPhyH-like* homologue, is induced in mouse T cells upon T cell stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 472(3):551-556 (2016) DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.039
 3. Tsujioka H, Kunieda T, Katou Y, Shirahige K, Kubo T. Unique gene expression profile of the proliferating *Xenopus* tadpole tail blastema cells deciphered by RNA-sequencing analysis. *PLoS ONE* 10(3):e0111655 (2015) DOI: 10.1371/journal.pone.0111655
- [学会発表](計8件)
1. Tsujioka H, Kunieda T, Fukazawa T, Kubo T. Analysis of the role of *interleukin-11* in tail regeneration of *Xenopus laevis* tadpoles. 第22回国際動物学会 第87回日本動物学会 合同大会(沖縄) 2016年11月17~18日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)
 2. 辻岡洋、國枝武和、加藤由紀、白髭克彦、久保健雄 Analysis of the role of *interleukin 11* in tail regeneration of *Xenopus laevis* tadpoles. 第48回日本発生生物学会大会 2015年6月2~5日 つくば国際会議場(茨城県つくば市)
 3. 辻岡洋、深澤太郎、國枝武和、久保健雄 インターロイキン11のアフリカツメガエル幼生尾の再生に果たす役割の解析 日本動物学会第86回新潟大会 2015年9月17~19日 朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)
 4. Tsujioka H, Kunieda T, Katoh Y, Shirahige K, Kubo T. The role of interleukin 11-signaling in tail regeneration of *Xenopus laevis* tadpoles. Society for Developmental Biology 74th annual meeting. July 9-13th, 2015, Snowbird, Utah USA コンベンションセンター
 5. 辻岡洋、國枝武和、加藤由起、白髭克彦、久保健雄 Comprehensive screening and identification of genes expressed preferentially in the proliferating blastema cells of the *Xenopus laevis* tadpole tails. 第47回日本発生生物学会大会 2014年5月27~30日 WING AICHI(愛知県名古屋市)
 6. 辻岡洋、國枝武和、加藤由起、白髭克彦、久保健雄 アフリカツメガエル幼生尾の再生芽増殖細胞に選択的に発現する遺伝子の網羅的検索と解析 第66回日本細胞生物学会大会 2014年6月11~13日 奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター

(奈良市)

7. 辻岡洋、國枝武和、加藤由起、白髭克彦、
久保健雄 アフリカツメガエル幼生尾の
再生芽増殖細胞に選択的に発現する遺伝
子の網羅的検索と解析 日本動物学会
第 85 回 仙台大会 2014 年 9 月 11~13
日 東北大学川内北キャンパス(仙台市)
8. 辻岡洋、國枝武和、加藤由起、白髭克彦、
久保健雄 アフリカツメガエル幼生尾の
再生芽増殖細胞に選択的に発現する遺伝
子の解析 第 37 回日本分子生物学会年
会 2014 年 11 月 25~27 日 パシフィコ横
浜(横浜市)

[その他]

ホームページ等

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専
攻 細胞生理化学研究室

[http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/sa
ibou/papers.html](http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/saibou/papers.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保 健雄 (KUBO.Takeo)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10201469

(2)研究協力者

白髭 克彦 (SHIRAHIGE, Katsuhiko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：90273854

加藤 由紀 (KATOU, Yuki)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50391917