

平成30年 5月28日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26711015

研究課題名(和文)四肢再生誘導因子の特定と遺伝子改変動物創出

研究課題名(英文) Determination of regeneration inducers in urodele amphibians

研究代表者

佐藤 伸(satoh, akira)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・准教授

研究者番号：90512004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、両生類の四肢再生研究における最重要課題である、「四肢再生開始を支配する神経因子」の同定を目標に据えた。四肢再生研究において、四肢の再生開始が神経の支配に大きく依存していることは長く知られている。これは教科書にも長く記載されている事項であるが、神経の機能を説明する分子実体は明らかにされてこなかった。我々の研究チームはこの190年余りにわたる謎に、新規の実験モデルを構築・使用することで解答を見出しつつある。本研究内で骨形成因子と繊維芽細胞成長因子の組み合わせが、四肢再生において神経の役割を代替し得ることを証明した。また、同定した因子が複数の器官と動物に有効であることを示す事が出来た

研究成果の概要(英文)：This study aims for identification of nerve molecules, which regulate blastema induction phase in amphibian limb regeneration. It has been well described that nerve plays an essential roles in blastema induction. However, identification of nerve factors had not been achieved over 190 years. We approached this issue with a brand-new experimental model called the accessory limb model, which we established recently. What we found in this study was that Fibroblast growth factors (Fgfs) and Bone morphogenetic protein (Bmp) could substitute for nerve roles in blastema induction. Moreover, we demonstrated that our defined molecules can induce organ-level regeneration in multiple organs and species.

研究分野：再生生物学

キーワード：四肢再生

1. 研究開始当初の背景

四肢再生現象は、器官再生の代表的事象として長く研究対象になってきた。有尾両生類（イモリ・サラマンダーなど）は、高等脊椎動物にはない高い器官再生能力を有している。この有尾両生類などに観察される器官再生能力を解明し、ヒトなどの高等脊椎動物の器官再生能力の向上に役立てるというコンセプトに沿って多くの研究がなされてきた。四肢に関しては、再生開始メカニズムについて多くの研究がなされてきた。その最も重要な成果として、再生開始に神経が必須である事がおよそ190年前に明らかにされた（Todd T.J., 1823, Q. J. Sci. Lit. Arts）。しかし、その後神経の実体分子の同定、ひいては四肢の再生開始メカニズムの解明につながるような「確実性」なブレークスルーは生み出されてこなかったといっても過言ではないだろう。それ故に、発生の教科書には両生類の四肢再生開始における神経の必要性に関する記載は比較的古くから記載されているものの、大きく刷新される事はなかった。再生開始を支配する神経因子を確定させられれば、歴史的成果というだけではなく、教科書の大幅な改訂が可能になるだけのインパクトを与えられる。

四肢再生研究の難点は、四肢という解析対象が「複雑系」である事を大きな要因としてあげることができる。四肢には多種多様な細胞・組織種が含まれ、これらは3次元的にも複雑な構成をしている。ここに、切断などの損傷という複雑性をさらに増す要因が付け加わる状況で再生が起こる。このような複雑系に対し、複雑なまま分子生物学的解析を行う試みはこれまで芳しい成果を上げていなかった。我々を中心にした研究チームはこの「複雑系」という四肢再生研究の難点を「過剰肢付加モデル（The accessory limb model）」というユニークな

実験系を構築・発展させることで乗り越えた。

過剰肢付加モデルは、過剰にもう一つの手足（足）をはやすというものである。この過剰肢誘導の実験系は切断を伴う四肢の再生系と比較して、研究上の圧倒的なアドバンテージを持つ。それは、四肢再生反応を 皮膚 神経 のたった二つの四肢の構成成分の相互作用だけで引き起こせるからである。これは、四肢の構成成分すべてを対象にした「超複雑」な実験系から、究極的にまで「単純化」した実験系と言える。この単純化された実験系によって多くの事項を明らかにしてきた。

過剰肢付加モデルは「皮膚損傷」を神経の介在によって「四肢形成」に言わば相転移させる実験系と言える。我々が研究に用いているメキシコサラマンダーも 皮膚損傷だけでは皮膚の修復がなされるだけで、四肢形成には至らない。ところが、神経を配向させることによって四肢再生反応を誘導できる。この相転移を誘導する神経の役割を担う実体分子を特定する事こそ、四肢再生研究分野において最大の課題の一つであるといえる。

これまでに申請者らは過剰肢付加モデルを使用して、皮膚損傷 神経を配向させた再生環境 の2サンプル間において次世代シーケンサー（Roche454）を用いた比較解析を行ってきた。結果として、MMP（細胞外マトリックス分解酵素）、FGF-Signaling 関連因子、BMP-Signaling 関連因子が再生環境で活性化されていることを明らかにしてきた。この解析結果を基に、2011年には、神経の配向なしに、MMP と FGF-Signaling の活性化によって再生へ向けた構造（再生芽）の誘導ができることを報告することができた。この成果は、再生における神経の役割を考える上で大きな契になりうるものとして画期的であると言

えるだろう。

上記の画期的発見によってもなお神経因子の確定というには不十分であった。なぜならば FGF-Signaling の活性化だけでは再生芽の形成までは可能であるものの、四肢の形成には至らないという問題点が依然残されていたからである。完全な四肢の再生を誘導する因子の道程を目指す事が本研究の課題であった。

2. 研究の目的

(1) 神経に発現する BMP 遺伝子の特定

これまでの研究から FGF に加えて BMP が再生の初期段階で関与している公算が高い。ことが明らかである。神経に発現する BMP を同定し、再生の関与を調べる。

(2) 特定した「再生誘導因子」の四肢再生プログラム起動能力の検証

上記 BMP と FGF を単独、又は組み合わせで再生への影響を調べる。

(3) より詳細な検証に向けての遺伝子改変動物作成

上記に研究によって再生誘導因子の特定ができたうえで、その因子を利用するためのツールとなる遺伝子改変動物の作成を目指す。

3. 研究の方法

(1) 神経に発現する BMP 遺伝子の特定
始めに、サラマンダーの DRG(脊髄後根神経節)神経に発現する BMP をすべて PCR・次世代シーケンシング等で検証した。さらに、高等脊椎動物等への発展性を睨み、半再生動物(アフリカツメガエル) 再生不能動物(マウス)における DRG 神経の Transcriptome の情報も探索した。サラマンダーよりも「高等」な動物とされるアフリカツメガエルにおいても皮膚損傷後に神経を配向させることで再生の誘導は可能で

あることを証明できたので、ツメガエル DRG 神経の Transcriptome の中にもサラマンダーと同じ再生誘導にかかわる神経因子がある事を期待できたことから、両者に共通に発現する遺伝子だけに絞って神経因子の探索を行った。

また、過剰発現実験などの研究に向け、対象遺伝子の全長クローニング(メキシコサラマンダー)をも行った。サラマンダーにおいてはゲノム情報など基本情報が不足しているため遺伝子のクローニングに時間を費やした。

(2) 特定した「再生誘導因子」の四肢再生プログラム起動能力の検証

目的因子を用いた再生誘導の実験のノウハウはすでに当研究室で確立しているものを用いた。皮膚損傷後3日程度経過後に、損傷部に徐放性ゼラチンビーズを任意の因子とともに移植する。これら一連の検証においては、過剰肢付加モデルで使用した研究手法(遺伝子発現パターンや分化能検定法など)をそのまま使用した。

(3) より詳細な検証に向けての遺伝子改変動物作成

本項目は研究が非常に大きく進展したために、計画当初と変更し、目的遺伝子をノックアウト&ダウンするためのより発展的な遺伝子改変動物の創出を目指す方向で行った。遺伝子改変動物作成については、鳥取大学の竹内&林研究室の標準プロトコルを使用した。

4. 研究成果

メキシコサラマンダ（ウーパールーパー、アホロートル）のDRGの神経細胞に発現するFGFとBMP遺伝子の探索を行い、さらにアフリカツメガエルにおける同様の探索から、FGF2, FGF8, BMP2, BMP7が神経因子として再生に働きかけている公算が高い事が初めに明らかになった。この結果をRT-PCRとinsitu hybridizationによって確認を取ったところ、予想通り上記4因子が神経に発現している事が明らかになった。ただし、この時点でアフリカツメガエルにはBMP2遺伝子は神経にほとんど発現していないことも明らかになった。時間が前後するが、神経細胞から軸索を通して再生芽までBMPとFGFが運ばれることも明らかにした。この実験では後根神経節に存在するDRGニューロンに直接FGF8-GFP, BMP7-GFPをエレクトロポレーションによって導入し、GFPの蛍光が再生領域で観察できるかどうかで検証を行った。結果、再生領域で導入後速やかにGFPの蛍光が観察されることが判明した。FGF-GFPとBMP-GFPの融合タンパク質は生体機能も発揮できることから、これらの結果は生体内の反応を模倣したものと考えている。

神経に発現するBMとFGFを同定したことで、過剰肢付加モデルにおいて、当該遺伝子を導入し、神経の代替ができるかどうかという研究が可能になった。今回同定したいずれの遺伝子もタンパク質として市販のもの（マウス・ヒトリコンピナント）が利用可能である。市販のものがアホロートルの体内で正しく生理機能を発揮できるかは、in vivoレベルで下流の遺伝子（タンパク質）のリン酸化w引き出せることを確認したことと、時間前後するが、アホロートルのFGFとBMPを精製し、それと同様の活性を持つ（四肢誘導活性）ことから問題ないと判断している。過剰肢付加モデルにおいて、皮膚損傷部に神経の代わりに

FGFとBMPを単独、もしくはコンビネーションで加えたところ、BMP+FGFというコンビネーションの添加時においてのみ過剰肢の形成を観察することができた（詳しくは論文を参照）。FGF2+8では再生芽の誘導までは起こるものの、四肢の形成には至らない。BMP7（もしくはBMP2）単独では、再生芽用の「ふくらみ」はできる物の再生芽マーカー遺伝子の欠落や、軟骨分化能を有する細胞の出現には至らない。もちろん、四肢の形成にも至らなかった。また、ノックダウンの研究から、FGF8もしくはBMP7のどちらか一方でも欠失させると再生に対して著しいマイナス（再生阻害）の影響が出ることも判明した。これらの成果はFGFとBMP同時期に両者のインプットが再生の開始、ひいては完全な再生反応の完遂に必要な十分であることを示していると考えられる。この成果によって200年余りにわたって謎であった両生類の再生開始メカニズム、並びに再生開始を支配する神経因子の同定に成功したと言えると自負する。

本研究は当初の予定を超えて更なる発展を見ることができた。（この先一部現在進行形の結果を含む。）我々の同定した神経因子はその他の器官に、またその他の動物にも適応可能であろうか？アホロートルをはじめとする再生可能動物はその器官の多くを再生できる。反対に非再生動物はほぼすべての器官を再生できない。この事は、個体全体に渡って一元的に再生を支配する基盤メカニズムの存在を示唆すると考えられる。我々の同定したFGF+BMPがこの基盤システムにアクセスしているのものであれば他の器官再生も誘導できるのではないかと考えた。初めにアホロートル尻尾再生に注目し、研究を行った。アホロートルの尻尾は神経依存的再生をしめす。四肢の再生研究と同様に過剰尾付加モデルとも呼ぶべき実験系を構築し、FGFとBMPの効果を検証した。結果、四肢と同様に

再生反応を誘導することが可能であることが判明した。ただし、誘導された尻尾の再生は不完全であり、神経配向時と比較して不完全且つ矮小な構造しか誘導できなかった。しかしながら、重要なのは「尻尾においても再生芽の誘導が FGF+BMP によって可能である」という事を示したことにある。各機関によってディテールが異なる事はある意味当たり前であり、おそらくは再生反応の開始以後の各論の部分で不足があるものと思われる。この部分については今後のさらなる研究を必要とするだろう。現在更に、レンズやエラと言ったその他器官についても解析を重ね、その多くで再生反応の開始を誘導出来ている。これらの結果は、器官再生普遍的な誘導因子として FGF+BMP という組み合わせが機能することを示すものである。また、その他動物への応用に関しても研究を展開し、イモリ、アフリカツメガエルにおいて効果を認めることができた。イモリでは FGF+BMP によって完全な四肢誘導までが可能であった。カエルでは FGF+BMP によって再生芽の誘導までが可能であることを見出した。ただし別プロジェクトにおいて、アフリカツメガエルにおいて更なる再生に向けた改善に神経因子が働き得ることを示してもいる。つまりは、両生類と言う括りでは FGF+BMP が普遍的な（四肢）器官再生誘導因子と言えるものである事を証明した。

これらの研究成果は当初の予定を大きく超える物であった。研究の進展に従って遺伝子改変動物の方策を変える必要が生じた。CRISPR システムの登場によって、アホロートルにおいても遺伝子 KO が可能になってきたため、再生誘導物質（FGF+BMP）関連遺伝子を KO して詳細な下流因子の解析が行える体制が整った。ただし、再生研究で問題になるのは初期発生を乗り越える必要があるという事である。多くの遺伝子欠損は胚性致死に至り、さらなる解析、つまり再生の解析には

至らない。この問題を解決する遺伝子組み換え体の創出を目指している。この項目に関しては現在進行形の研究を大きく関連するため、本報告内では省略する。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕（計4件）

査読あり “Reactivation of larval keratin gene (*krt62.L*) in blastema epithelium during *Xenopus* froglet limb regeneration”, **Satoh A**, Makanae A., Nishimoto Y. and Mitogawa K., *Developmental Biology*, 432; 265–272, 2017, DOI : 10.1016/j.ydbio.2017.10.015.

査読あり “Hyperinnervation improves *Xenopus laevis* limb regeneration”, Mitogawa K.*, Makanae A., and **Satoh A***, *Developmental Biology*, 433(2), 276-286, 2017, DOI : 10.1016/j.ydbio.2017.10.007

査読あり “FGF and BMP derived from dorsal root ganglia regulate blastema induction in limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*”, **Satoh A**, Makanae A., Nishimoto Y. and Mitogawa K., *Developmental Biology*, 417(1):114-25., 2016, DOI : 10.1016/j.ydbio.2016.07.005

査読あり “Cooperative inputs of Bmp and Fgf signaling induce tail regeneration in urodele amphibians”, Makanae A., Mitogawa K. and **Satoh A.**, *Developmental Biology*, 410(1), 45-55, 2016, DOI : 10.1016/j.ydbio.2015.12.012

〔学会発表〕（計 14 件）
国際学会のみ記載する

1) Akira Satoh, Nerve functions in blastema induction and pattern formation in limb regeneration, 14th Limb Meeting, Edinburgh, 2017/7/28

2) Akira Satoh, Regeneration inducers of appendage regeneration, Okinawa, International Congress of Zoology, 2016/11/16

3) Akira Satoh, Regenerative medicine for organ regeneration in urodele amphibians, 13th Limb Meeting, Florida, Tampa. 2015/6/29

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

2017/3/19 日本経済新聞に研究紹介

2017/9/6 山陽新聞 子供新聞に記事

2017/3/9 再生医療学会にて高校生へのアウトリーチ活動

2016/12/29 テレビ朝日「池上彰 2016 総ざらい 今年のニュースとあのニュースの今!? 年末 4 時間 SP」 過剰肢モデルと研究紹介

2016/12/1 雑誌 Newton に研究の紹介記事

6 . 研究組織

< 記入例 >

(1) 研究代表者

佐藤 伸 (SATO, Akira)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・准教授

研究者番号 : 90512004