

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年3月22日現在

再生原理の理解にもとづいて四肢再生を惹起する

Evoking limb regeneration from non-regenerative animals

課題番号：16H06376

阿形 清和 (AGATA, KIYOKAZU)

学習院大学・大学院自然科学研究科・教授



研究の概要（4行以内）

イモリでは、四肢切断後に〈先端化〉と〈インターカレーション〉の2段階で進行する。カエルでは〈先端化〉はいくものの、〈インターカレーション〉のステップで止まり、マウスでは〈先端化〉すら行かずに再生ができない。本研究では、カエルとマウスで、止まっている段階を突破することで四肢再生を惹起することを目指す。

研究分野：生物学

キーワード：発生・分化、器官形成、再生、エピゲノム、ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

イモリの四肢の再生もプラナリアの再生と同じく、〈先端化〉と〈インターカレーション〉の2段階で進行することを見出した。そして、カエルでは第一段階の〈先端化〉はいくものの、第二段階の〈インターカレーション〉がうまく行かずスパイク状の骨のみが再生し、マウスでは〈先端化〉すら行かずに全く再生ができない。また、〈先端化〉は傷上皮の形成に伴う FGF シグナルの活性化によって、〈インターカレーション〉は先端化の FGF シグナルと Shh シグナルのポジティブ・ループの形成によって遂行されると考えられた。すなわち、カエルでは FGF シグナルは活性化されるものの四肢特異的エンハンサー(MFCS1)を介した Shh シグナルとのポジティブ・ループが形成されないためにスパイクが形成され、マウスでは傷上皮が形成されないために FGF シグナルが活性化されないために全く四肢再生ができないと推測された。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、カエルで MFCS1 を介した FGF シグナルと Shh シグナルのポジティブ・ループを形成させることで、カエルで指パターンを含む四肢再生を惹起させること、また、マウスで FGF シグナルを活性化させる、さらには、FGF シグナルと Shh シグナルのポ

ジティブ・ループを形成させることで関節再生を含む四肢再生を惹起させることを目的とした。

3. 研究の方法

カエルで FGF シグナルと Shh シグナルのポジティブ・ループを形成させるために、ポジティブ・ループ形成に重要な機能を担っていると考えられる *Shh* 遺伝子の四肢特異的エンハンサーMFCS1 をゲノム編集によって、カエルのものとイモリのものをお互いに入れ替える実験(スワッピング)を行い、イモリをカエル化(スパイク形成)できるか、逆にカエルがイモリ化(完全四肢再生)できるようになるかを検証する。

また、マウスで四肢の関節再生を惹起させるために、イモリやカエルで関節再生に参画する細胞を同定し、関節再生ができないワトリやマウスにも同様な細胞が居るのか居ないのかを組織培養と移植実験とによって検証した。

4. これまでの成果

○*Shh* 遺伝子の四肢特異的エンハンサー MFCS1 のイモリとカエルの配列のゲノム編集によるスワッピング実験

約 1.6kb の MFCS1 配列について、イモリとカエルで比較したところ、全般的に良く似た配列で構成されているものの、イモリ特異的、あるいはカエルに特異的な配列を見たい出した(図 1)▶

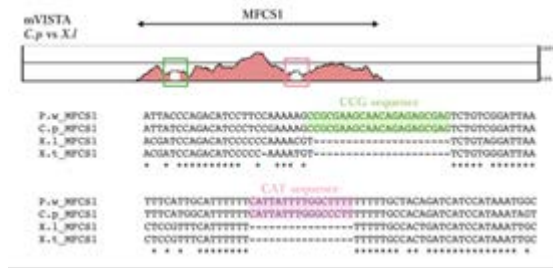


図 1. イモリとカエルの MFCS1 配列比較、イモリに特異的な挿入配列を示した。

イモリとカエルで MFCS1 配列を入れえるために、イモリについてはイベリアトゲイモリをゲノム編集用のモデル動物として、カエルについてはネッタイツメガエルをモデル動物として扱えられるようにし、図 2 に示す部位に guide RNA (gRNA) を作製した(図 2)。

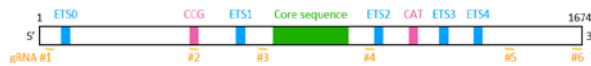


図 2. イモリの MFCS1 領域の gRNA 作成部位。

これらの部位でゲノム編集を行ったところ、イモリについては 4 箇所、カエルでは 2 箇所を高効率でゲノム編集できる部位を同定することに成功した。特にイモリでは、完全に MFCS1 領域を欠損したゲノム編集に成功した。また、一部のゲノム編集個体では四肢の正常発生そのものに異常が見られた(図 3)。

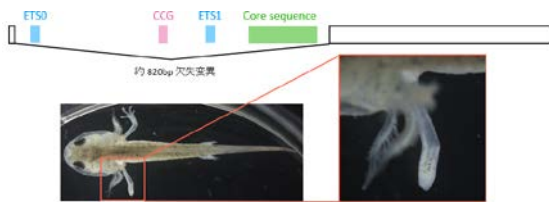


図 3. イモリ MFCS1 部分欠損による四肢発生異常個体。意外にも全領域欠損ヘテロ個体は正常な四肢を発生。

また、イモリやカエルで関節の再生に参画する細胞として関節部の腱や韧带の中に潜んでいる細胞を同定し、同様の細胞がマウスの腱や韧带にも存在していることを示すことに成功し(図 4)、マウスでの関節再生の可能性を強く示唆した。

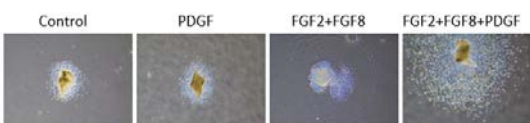


図 4. マウスの関節部の腱から這い出てきた細胞。

さらに、新たに見出した再生原理---イモリ類のみならず、サンショウウオ類でも、異なるサイズの四肢や異なる成長段階の四肢の四肢再生時には、ある一定の細胞数の再生芽を形成した時にパターン形成が遂行されるという<四肢再生の砂時計モデル>についても検証する。

5. 今後の計画

ゲノム編集技術を駆使して、イベリアトゲイモリとネッタイツメガエルで *Shh* 遺伝子の四肢特異的エンハンサーの取り換え(スワッピング)実験を完遂して、MFCS1 を介した FGF シグナルと *Shh* シグナルのポジティブ・ループが形成されるか、四肢再生が惹起されるかを明らかにしたい。

また、マウスで同定された関節再生に参画する細胞を in vivo で活性化することで関節の再生が惹起されるようになるかについても明らかにする予定である。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

・ Matsunami M, Suzuki M, Haramoto Y, Fukui A, Inoue T, Yamaguchi K, Uchiyama I, Mori K, Ito Y, Takeuchi T, Suzuki KT, Agata K, Shigenobu S, Hayashi T.

A comprehensive reference transcriptome resource for the Iberian ribbed newt *pleurodeles waltl*, an emerging model for developmental and regeneration biology. **DNA Research**, in press

・ Suzuki M, Hayashi T, Inoue T, Agata K, Hirayama M, Suzuki M, Shigenobu S, Takeuchi T, Yamamoto T, Suzuki KT. Cas9 ribonucleoprotein complex allows direct and rapid analysis of coding and noncoding regions of target genes in *Pleurodeles waltl* development and regeneration. **Dev Biol.** 15;443(2):127-136 (2018)

・ Urata Y, Yamashita W, Inoue T, Agata K. Spatio-temporal neural stem cell behavior leads to both perfect and imperfect structural brain regeneration in adult newts. **Biol Open.** 25;7(6). (2018)

7. ホームページ等

イベリアトゲイモリのポータルサイト iNewt <http://www.nibb.ac.jp/imori/main/>

大学の研究室ホームページサイト <https://www.univ.gakushuin.ac.jp/sci/bio/laboratory/detail-agata/>