

研究報告書

「両生類の再生を支えるエピジェネティクス機構の解明と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成28年3月

研究者: 牧 信安

1. 研究のねらい

両生類は我々と同じ脊椎動物であるにも関わらず、極めて高い組織再生能を有している。例えば、有尾両生類イモリは、レンズ、網膜、脳、脊椎、四肢、顎、心臓、小腸等、体のほとんどの組織を再生することができる。この高い再生能はユニークな細胞制御、1) 脱分化と、それに引き続く2) 分化誘導によって支えられている。本さがけ研究では、これらのユニークな細胞制御に着目し、両生類の再生能力を支えるエピジェネティックな基盤を明らかにする。得られた知見を再生医療へ応用することを目指す。

テーマ1) 脱分化

一般に終末分化した細胞は多分化性が失われると考えられているが、イモリの再生過程では、脱分化・分化転換と呼ばれる可塑的な細胞制御が見られる。この過程で分化細胞が別の細胞種へと変化する。脱分化を体細胞核のリプログラミングとして捉え、なぜイモリは体細胞核を可塑的に制御できるのか、エピジェネティックな視点で解明する。さらに、得られた知見を iPS や、分化細胞に対するダイレクトリプログラミングの効率化に応用する。

テーマ2) 分化誘導

iPS や ES 細胞からの分化誘導研究が進む一方で、これら幹細胞から組織レベルの再生を誘導することはほとんど不可能である。この最大の理由は、3次元的構造の誘導機構が明らかにされていないことである。両生類独自の組織再生機構を解明し、その機構を応用することが再生医療具現化に極めて有効な手段と考えられる。両生類の四肢再生誘導において皮膚は必須である。両生類の四肢切断後、切断面付近の皮膚上皮細胞は切断面を移動・被覆し、傷上皮と呼ばれる上皮構造を形成する。傷上皮は再生に必須であり、四肢再生を誘導していると考えられている。この可塑的な上皮細胞の制御による四肢再生の誘導機構を本研究で明らかにする。

2. 研究成果

(1) 概要

テーマ1) 脱分化

イモリのレンズ再生で、虹彩色素上皮細胞 (PEC) が脱分化・分化転換する。この過程で卵母細胞型リンカーヒストン B4 が PEC で発現することが、レンズ再生に必要であることが示されている。本テーマでは、B4 を中心として研究を進めた。B4 の体細胞発現に Klf4 結合予想配列が必要であることをプロモーター解析によって明らかにした。さらに DNA 脱メチル化酵素がレンズ再生に必要であることを明らかにした。

テーマ 2) 分化誘導

両生類の四肢再生に皮膚の作用は必須である。四肢切断後、上皮細胞は切断面を移動・被覆し、傷上皮を形成する。この時、位置情報の異なる上皮細胞が接触することにより、四肢再生が誘導すると考えられている。本研究では、四肢誘導因子を探索する目的で、接触領域で高発現する遺伝子を DEG 解析により抽出した。最終的に傷上皮の背腹接触領域で特異的に発現する遺伝子 X は、四肢誘導活性を持つことを ALM 法によって明らかにした。長年不明であった皮膚由来の四肢誘導因子が、本研究により初めて同定され、再生医療の具現化に新たな提案をするに至った。

(2) 詳細

テーマ 1) 脱分化

卵母細胞への核移植で引き起こされる体細胞核リプログラミング過程で、体細胞型リンカーヒストン H1 は卵母細胞型リンカーヒストン B4 に置換されることが知られる。この置換はクロマチンを弛緩し、体細胞核のリプログラミングに必要であることが明らかになっている。さきがけ研究以前に、イモリのレンズ再生では体細胞である PEC で B4 が発現すること、そしてこの発現がレンズ分化転換に必要であることを見出した。本テーマでは B4 を中心に基礎・応用両面から研究を行った。

1-1) B4 プロモーター解析

イモリはなぜ体細胞で B4 を発現できるか明らかにする目的で、B4 のプロモーター解析を行った。PEC 初代培養に対してプロモーターアッセイを行い、B4 の体細胞発現に関わる領域を探索した。最終的に部分変異コンストラクトを用いて TSS -272 bp に存在する Klf4 結合予想配列 (GCCACGCCCT) が B4 の体細胞発現に関わる領域であることを突き止めた。iPS4 因子の 1 つである Klf4 が PEC の分化転換過程で発現することが明らかにされている (Maki et al., 2009)。今回の結果から、幹細胞因子と B4 が単に独立して発現しているわけではなく、それらが遺伝子ネットワークを形成している可能性が推察された。

1-2) B4 による再生誘導の試み

イモリの四肢再生過程で B4 が発現するのに対して、組織再生できないカエルは B4 を発現しない。したがって、B4 の発現と両生類の組織再生能の連関が示唆された。そこで、B4 をカエルで発現することにより、四肢の再生が誘導できるか検証した。CMV-B4-2A-GFP をネットアイツメガエルに導入し、体細胞で B4 を発現するトランスジェニックカエルを作成した。トランスジェニックカエル 29 個体の前肢を切断し組織再生誘導を検証したが、顕著な再生能の改善は認められなかった。

1-3) iPS 誘導活性の解析

卵母細胞型リンカーヒストンが、iPS 誘導活性を持つ可能性が期待された。そこで、MEF や NS(神経幹細胞)でイモリ B4 を発現させ、iPS 誘導活性を解析した。B4 単独で発現した場合でも、B4 と山中 4 因子(Oct4, Klf4, cMyc, Sox2)と共発現した場合でも、iPS 誘導活性は確認されなかった。

1-4) レンズ分化転換における DNA メチル化制御の必要性

マウス卵母細胞型リンカーヒストン H1foo のプロモーター領域は細胞分化にともない DNA メチル化される。さらにプロモーターアッセイにより、この領域のメチル化は H1foo の発現を抑制することが示されている (Maeda et al., 2008)。以上から、イモリの脱分化過程における DNA 脱メチル化が B4 の発現制御に関わっていることが予想された。そこで、DNA 脱メチル化酵素について研究を行った。組織培養 PEC に対するノックダウン実験により脱メチル化酵素がレンズ分化転換に必要であることを明らかにした。

テーマ 2) 分化誘導

両生類の四肢再生に神経と皮膚が必須であり、両者の相互作用により再生が誘導される。これまでに、四肢再生における神経の役割については多くの研究がなされ、神経由来の再生誘導因子は同定されている (Kumar et al., 2007, Makanae et al., 2014)。一方、その重要性にも関わらず皮膚の研究は遅れ、皮膚由来の再生誘導因子は未同定である。四肢切断後、上皮細胞は切断面を移動・被覆し、傷上皮を形成する。この時、異なる領域由来の上皮細胞が異所的に接触し、この接触が四肢再生を誘導すると考えられている。この接触領域の機能を解明することが、両生類の再生機構解明の鍵と考え研究を行った。

2-1) 接触領域における遺伝子発現

イモリの傷上皮に明確な背腹の接触境界が認められた。そこで、接触領域の分子イベントを明らかにする目的で、接触領域で高発現する遺伝子 (B 遺伝子) を RNA seq による DEG 解析で抽出した。さらに、qPCR および in situ 解析により候補遺伝子を絞り込み、最終的に約 30 種の B 遺伝子を同定した (図 1)。B 遺伝子群のオントロジー解析により、傷上皮の接触領域では、構造タンパク、酵素、そしてシグナル因子が特異的に発現することが明らかとなり、傷上皮は異所的接触を認識し四肢再生を誘導することが示唆された。

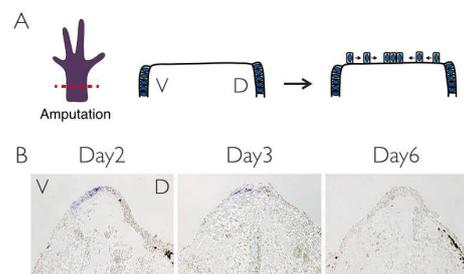


図1. 傷上皮の接触領域におけるB遺伝子の発現。(A) 四肢切断後、皮膚上皮細胞は切断面を移動し、傷上皮細胞層を形成する。(B) B遺伝子の発現の1例。遺伝子Xは背腹(DV)境界領域の傷上皮細胞で発現する。

2-2) 四肢再生誘導因子の同定

傷上皮接触領域の DEG 解析により 3 種のシグナル因子が四肢誘導に関与している可能性が示唆された。これら因子が四肢誘導活性を持つか、アホロートルを用いた Accessory Limb Model 法 (ALM 法) で解析した。ALM 法は、異所的皮膚の移植と神経再配向により過剰肢を誘導する方法である。神経と皮膚は過剰肢誘



図2. 遺伝子Xの四肢誘導活性。上皮への遺伝子Xの導入と神経の再配向により、指の構造が誘導された (A)。指の関節の構造が認められる (B)。

導に必須であり、皮膚移植を行わず、神経の再配向だけでは四肢は誘導されない。この条件下で上皮にシグナル因子のエレクトロポレーションを行い、四肢誘導活性を解析した。3 種因子のうち、遺伝子 X を導入した時、指の構造が異所的に誘導された (図 2)。本研究により、長年未知であった皮膚由来の四肢再生誘導因子として遺伝子 X が同定され、上皮細胞の運動・異所的接触から再生誘導へ至る一連の機構が明らかになった (図 3)。さらに、今回の遺伝子 X の同定は、再生医療具現化に新規な道筋を提案するものである。

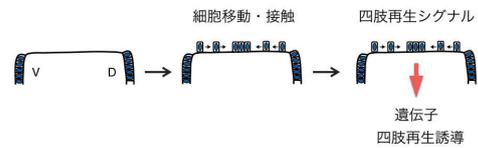


図3. モデル図. 四肢切断後、皮膚上皮細胞は切断面を移動する。背腹の異所的接触が引き金となり遺伝子Xを発現し、四肢再生を誘導する。

3. 今後の展開

四肢再生誘導因子 X の分子機構の解明と応用

皮膚由来の四肢再生誘導因子 X が同定されたことは大きな成果といえる。しかし、その分子機序の解明は今後の課題である。また、すでに同定されている神経由来の因子と組み合わせ、再生医療への応用を試みたい。

位置情報の記憶・認識に関わる分子の探索

上皮細胞の異所的接触によって四肢再生が誘導される。この過程で上皮がどのように位置情報を記憶・認識するか、この分野において最も重要な課題である。本研究で、上皮の接触領域で発現する遺伝子が同定された。これらをレポーターに用い培養条件下で異所的接触を検出する系が構築できる。この系を用いて、上皮による位置情報の記憶・認識機構を解明したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

テーマ1で、研究対象が分散し体系的な研究成果が得られなかったことは反省点である。しかし、テーマ2で、長年未知であった両生類の四肢再生誘導因子を同定できたことは大きな成果であると思われる。傷上皮の接触領域で高発現する遺伝子を抽出するという着眼点で四肢再生因子の探索を行い、最終的に四肢誘導による遺伝子の同定まで行うことができた。本研究で、再生誘導因子 X を中心とした新しい研究領域が開拓され、さらに組織再生医療の具現化に新規な提案をするに至った。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

両生類には極めて高い組織再生能がある。四肢再生誘導因子には既に同定されている神経因子の他に皮膚由来因子があるが、これについてはまだ報告されていない。本研究ではイモリを用い、四肢先端の背腹境界で発現する数種の転写因子・シグナル因子を同定した。その中の遺伝子 X を上皮細胞に導入することにより四肢誘導に成功したことは大きな成果につ

ながる可能性がある。ゲノム情報等がまだ解明されていないイモリを使わざるを得ない研究であるが、世界初の成果でありここまで再生研究を進めた点を高く評価したい。

今後同定した遺伝子が真の求める因子であるかを検証するうえで、分子としての仕事を深めるとともにその機能解析や分子機構の解明が必要である。得られた再生能は不完全なので X 以外に得られた他の複数の因子の関与を検討する必要がある。一方では、現在の評価系では定量生やスループットに難があるのでその改善も求められる。このような基礎研究が達成された先に再生医療への応用が展望できると思われる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Book chapter

1. Maki N. *, Kimura H., Epigenetics and Regeneration. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2013, 367, 237-257 (*, corresponding author)

2. Maki N.*, Methods in Molecular Biology, 2015, 1290 Newt Lens Transdifferentiation: From Lentectomy to Immuno-FISH. Salamanders in regeneration research, pp.81-89 (*, corresponding author)

学会発表

1. Maki N., Suetsugu-Maki R., Sano S., Nakamura K., Nishimura O., Tarui H., Del Rio-Tsonis K., Ohsumi K., Agata K. Tsonis P.A. Stepwise reprogramming in newt lens transdifferentiation. Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2012, 台北, 台湾, 2012 年 10 月

2. Maki N., Suetsugu-Maki R., Sano S., Nakamura K., Nishimura O., Tarui H., Del Rio-Tsonis K., Ohsumi K., Agata K. Tsonis P.A. Expression of oocyte-type linker histone is required for newt lens transdifferentiation. Commemorative Symposium for the 27th International Prize for Biology. 京都, 2011 年 11 月.

3. Maki N., Suetsugu-Maki R., Sano S., Nakamura K., Nishimura O., Tarui H., Del Rio-Tsonis K., Ohsumi K., Agata K., Tsonis P.A., Expression of oocyte-type linker histone is required for newt lens transdifferentiation. 日本発生生物学会, 那覇市, 2011 年 5 月