

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650229

研究課題名(和文) 成体イモリ肢再生解析 TGP ラインの確立

研究課題名(英文) Establishment of TGP line for the study of adult newt limb regeneration

## 研究代表者

千葉 親文 (CHIBA, Chikafumi)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：80272152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：高効率なトランスジェニック技術(TG)と個体間組織移植(TP)を組み合わせることで、成体イモリの肢再生メカニズムを分子・細胞レベルで解析する新たな実験系(TGPライン)を確立した。これを用いて、幼生および成体の肢再生の系譜解析を行った結果、それぞれがもちいる細胞メカニズムに違いがあることがわかった。また、成体肢の皮膚、筋肉、骨、神経はそれぞれ厳密に同じ組織を再生した。この成果は、脊椎動物の再生能力を理解する上で重要な知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：We established a novel experimental system named 'TGP line' which enables us to investigate cellular and molecular mechanisms underlying limb regeneration in adult newts by combination of a highly efficient transgenic technique (TG) and tissue transplantation techniques (TP). Utilizing this system, here we carried out cell lineage tracing in the limb regeneration, and found that larval and adult newts regenerate their limbs by different cellular mechanisms. In addition, in the adult newt, we found that the key tissues of the limb regeneration, such as the skin, muscles, bones and nerves, rigidly give rise to the same type of tissues, with a few exceptions. These findings would certainly contribute to understanding of differences in regeneration-competency among vertebrates.

研究分野：再生生理学

キーワード：再生 イモリ 肢 系譜解析 脱分化 幹細胞 筋

## 1. 研究開始当初の背景

成体イモリのみせる再生現象の中でも、四肢の再生は魅力的で、研究者にとって究極の到達目標である。しかし、この現象の解明は技術的な困難さゆえに進んでおらず、200年に渡り多くが謎のまま残されている。最近、アホロートルの再生芽細胞の分化能に関してこれまでの定説を覆す結果が報告された。すなわち、それまでホモな細胞集団と考えられていた再生芽細胞が実はヘテロであり、組織幹細胞のように分化能も限られ、胚葉のバリアを越えることはないことが証明されたのである (Kragl et al., Nature, 2009)。しかし、アホロートルはネオテニーであるため、肢の構造が成体型とは異なる。そのため、これがそのまま成体イモリの肢再生に当てはまるかどうかは分からない。

この研究者がアホロートルを選んだ理由は、イモリではトランスジェニックができないからであった。しかし、我々は、先の挑戦的萌芽研究 (H20-22年) により、イモリの高効率なトランスジェニック法 (Casco-Robles et al., Nat. Protoc., 2011) と人工変態制御による簡易な飼育法を確立した (Yamada et al., Zool. Sci., 2012)。このことから、イモリでチャレンジしない理由はもはやない。さらに、細胞・組織特異的プロモーターとタモキシフェン誘導性 Cre リコンビナーゼ (CreER<sup>T2</sup>) を利用した条件付き遺伝子発現制御法を組み合わせれば、より詳細な分子メカニズムに切り込むこともできるだろう。こうした経緯から、我々は、本丸であるイモリに回帰し、その四肢再生の分子・細胞メカニズムの解明に挑むことにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、成体イモリの肢再生メカニズムを遺伝子レベルで解析する新たな実験系 (TGP ライン) の確立を目指す。これにより、肢再生に関わる再生芽細胞集団の系譜 (再生芽細胞はどこから来て何になるのか?) およ

び分化能 (イモリの再生芽細胞は胚葉のバリアを破れるか?) を明らかにする。

## 3. 研究の方法

高効率なトランスジェニック技術 (TG) により、細胞系譜解析用のアカハライモリを作出した。条件付き遺伝子発現制御法、および胚や成体の個体間組織移植 (TP) により細胞系譜を解析した。Cell-Killing method を適用した細胞の分化能評価は、条件付き遺伝子発現制御法の開発が予想以上に難航したため、そちらを優先し、今回は行わなかった。

## 4. 研究成果

条件付き遺伝子発現制御による系譜解析  
骨格筋細胞を追跡するため、CarA プロモーターと CreER<sup>T2</sup>-LoxP システムを組み合わせたレポーター (mCherry) コンストラクトをイモリに導入した。まず、このシステムをもちいると、幼生期に分化した骨格筋細胞だけが自発的に蛍光標識されることが分かった。一方、衛星細胞 (骨格筋前駆細胞) は標識されなかった。

前肢に着目して、切断後の再生を観察した結果、幼生期の肢では、骨格筋細胞の脱分化や再生芽への移動は観察されず、肢再生への主たる関与は認められなかった。一方、衛星細胞の再生芽への移動は観察された。この様式は、アホロートルとよく似ていた。

変態後の成体の前肢では、骨格筋細胞の脱分化や再生芽への移動が観察され、再生肢中の骨格筋細胞に分化することが分かった。しかし、軟骨など他の細胞になることはなかった。一方、再生芽細胞の再生芽への移動は顕著ではなかった。これらの結果は、イモリが発生段階に依存して筋再生の細胞起源を衛星細胞 (幹細胞; 幼生型) から骨格筋細胞 (分化転換; 成体型) に切り替えていることを示唆している。すなわち、成体イモリの肢再生をアホロートルの知見で説明することはできないことが明らかになった。

## 個体間組織移植 (TP)による系譜解析

EGFP や mCherry を全身に発現するイモリを作製し、前肢の皮膚、筋肉、骨、神経(髄鞘)を野生型イモリの対応する部分にそれぞれ移植した。ただし、皮膚の表皮については、尾芽胚期に前肢予定表皮領域を移植した。移植組織を含む位置で肢を切断し、移植組織の再生過程での変化を追跡した。その結果、皮膚は、皮膚と間質性の組織を再生した。間質性の組織は、主として真皮に由来した。皮膚や表皮移植でも、移植組織から全ての表皮がつかられなかった。皮膚以外の何らかの細胞が表皮再生に関わると考えられる。筋肉は、骨格筋細胞と骨/軟骨を再生した。条件付き遺伝子発現制御による系譜解析の結果から、骨格筋細胞は骨格筋細胞しか再生しないことが分かっている。このことから、筋肉に含まれる骨格筋細胞以外の細胞が骨の再生に寄与している可能性が考えられる。骨は骨/軟骨を再生した。神経については解析中である(表皮に分化することはない)。

以上の結果から、変態後の成体イモリでも、再生芽細胞はアホロートルのようにヘテロな細胞集団であり、基本的には胚葉のバリアを破るほどの分化能はもたないと考えられる。むしろ、皮膚や骨についてみると、アホロートルより分化の方向が厳格に決まっているように見える。ただし、骨の再生に関与した筋肉中の細胞の種類によっては、分化転換が起きている可能性もあるので、今後、この細胞種を特定する必要がある。

本研究により、イモリの肢再生の細胞メカニズムが変態前後で幼生型から成体型に切り替わること、しかし、成体イモリでもアホロートルのように、再生肢のもとになる細胞の分化能は厳格に決まっていることが明らかになった(投稿準備中)。このことは、両生類の肢再生の基本原則とイモリの特異性の理解につながる重要な発見である。この成果は、本研究で確立した解析技術ともども、

本研究分野の今後の発展に大いに貢献すると考えられる。

## 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 10 件)

1. Kudo, Y., Chiba, C., Konoki, K., Cho, Y. and Yotsu-Yamashita, M. (2015) Confirmation of the absence of tetrodotoxin and its analogues in the juveniles of the Japanese fire-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*, captive-reared from eggs in the laboratory using HILIC-LC-MS. *Toxicon* **101**: 101-105. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.05.008. 査読有
2. Endo, Y., Toyama, F., Chiba, C., Mori, H. and Shoji, K. (2015) A memory efficient short read *de novo* assembly algorithm. *IPSJ Transactions on Bioinformatics* **8**: 2-8. DOI: 10.2197/ipsjtbio.8.2. 査読有
3. Casco-Robles, M.M., Miura, T. and Chiba, C. (2014) The newt (*Cynops pyrrhogaster*) RPE65 promoter: molecular cloning, characterization and functional analysis. *Transgenic Res.* DOI 10.1007/s11248-014-9857-1. 査読有
4. Nakamura, K., Islam, M.R., Takayanagi, M., Yasumuro, H., Inami, W., Kunahong, A., Casco-Robles, R.M., Toyama, F. and Chiba, C. (2014) A transcriptome for the study of early processes of retinal regeneration in the adult newt, *Cynops pyrrhogaster*. *PLoS ONE* **9**, e109831. DOI: 10.1371/journal.pone.0109831. 査読有
5. Islam, M.R., Nakamura, K., Casco-Robles, M.M., Kunahong, A., Inami, W., Toyama, F., Maruo, F. and Chiba, C. (2014) The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration. *Sci. Rep.* **4**, 6043. DOI: 10.1038/srep06043. 査読有
6. Endo, Y., Toyama, F., Chiba, C., Mori, H. and Shoji, K. (2014) De novo short read assembly algorithm with low memory usage. *Proceeding of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms*. 215-220. DOI: 10.5220/0004881002150220. 査読有

7. Chiba, C. (2014) The retinal pigment epithelium: An important player of retinal disorders and regeneration. *Exp. Eye Res.* **123**:107-114. DOI: 10.1016/j.exer.2013.07.009. 査読有
  8. 千葉親文, (2013) アカハライモリのモデル動物化に向けた資源・技術・情報基盤の研究: 外傷性疾患の治療と再生研究への適用を視野に、関西実験動物研究会会報 30号: 43-51. 査読無
  9. Mizuno, A., Yasumuro, H., Yoshikawa, T., Inami, W. and Chiba, C. (2012) MEK-ERK signaling in adult newt retinal pigment epithelium cells is strengthened immediately after surgical induction of retinal regeneration. *Neurosci. Lett.* **523**: 39-44. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.06.037. 査読有
  10. Chiba, C., Yamada, S., Tanaka, H., Inae-Chiba, M., Miura, T., Casco-Robles, M.M., Yoshikawa, T., Inami, W., Mizuno, A., Islam, MD. R., Han, W., Yasumuro, H., Matsumoto, M. and Takayanagi, M. (2012) Metamorphosis inhibition: an alternative rearing protocol for the newt *Cynops pyrrhogaster*. *Zool. Sci.* **29**: 293-298. DOI: 10.2108/zsj.29.293. 査読有
- [学会発表](計 23 件)
1. 竹島一仁、平野高大、越智陽城、星島一幸、高山 - 渡辺絵里子、渡辺明彦、外山史、千葉親文、CRISPR-Cas9 を用いたアカハライモリ・チロシナーゼ遺伝子欠失個体の作製、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
  2. Chiba, C., Toyama, T., Maruo, F., Islam, M.R., Casco-Robles, M.M. and Casco-Robles, R.M. Can we learn the cause of differences in regeneration-competency from the newt? International Workshop on Developmental and Regenerative Biology in Yamagata. 2014 年 9 月 10 日、山形大学 (山形県山形市) 招待講演
  3. 千葉親文、外山史、丸尾文昭、Islam, M.R., Casco-Robles, M.M. and Casco-Robles, R.M. 私たちは再生できる・できないの原因をイモリから学ぶことができるか? 第 85 回日本動物学会・シンポジウム・ゲノム情報と胚誘導・形態形成研究のクロストーク、2014 年 9 月 12 日、東北大学 (宮城県仙台市) 招待講演
  4. Casco-Robles, M.M., Miur, T. and Chiba, C.、再生イモリの網膜色素上皮層における導入遺伝子発現、第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学 (宮城県仙台市)
  5. 三浦智也、Casco-Robles, M.M.、千葉親文、イモリのトランスジェニック効率に対するニワトリ beta-globin インスレーターの効果、第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学 (宮城県仙台市)
  6. 安室博文、千葉親文、成体イモリ網膜色素上皮細胞の細胞周期進入における上皮間葉移行の関与、第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学 (宮城県仙台市)
  7. Casco-Robles, R.M., Chiba, C. and Toyama, F. Cloning of unique regeneration-specific genes in the newt. 第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学 (宮城県仙台市)
  8. 田中響、ナツサーニオン、Casco-Robles, M.M.、三浦智也、千葉親文、イモリ肢の再生に関わる細胞種、第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学 (宮城県仙台市)
  9. Chiba, C., Islam, M.R., Kunahong, A., Casco-Robles, M.M., Nakamura K., Inami, W. and Toyama, F. Adult newt RPE cells are reprogrammed into a unique state of multipotent cells to regenerate missing neural retina. XXI Biennial Meeting of the International Society for Eye Research. 2014 年 7 月 22、San Francisco, USA.
  10. 千葉親文、中村研太、Roman M. Casco-Robles、外傷性疾患の治療と自己再生誘導の寄与する新奇イモリ遺伝子の探索: 網膜と肢を例に、第 119 回日本解剖学会総会・シンポジウム・次々世代の再生医学研究 - 再生可能動物に学ぶ -、2014 年 3 月 27 日、自治医科大学 (栃木県下野市) 招待講演
  11. 安室博文、千葉親文、成体イモリ網膜色素上皮細胞の細胞周期進入における上皮間葉移行の関与、第 84 回日本動物学会、2013 年 9 月 28 日、岡山大学 (岡山県岡山市)
  12. 千葉親文、吉川太朗、水野亜季、安室博文、網膜を完全再生する成体イモリ網膜色素上皮細胞の細胞周期再進入メカニズムの解析、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 22 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
  13. 千葉親文、アカハライモリのモデル動物化に向けた資源・技術・情報基盤の研究: 外傷性疾患の治療と再生研究への適用を視野に、関西実験動物研究会第 117 回例会、2013 年 3 月 1 日、京都大学 (京都府京都市) 招待講演
  14. 千葉親文、イモリ研究のための資源・技術・情報基盤の開発と body-parts 再生

研究への実践適用、第 83 回日本動物学会・第 32 回胚誘導と形態形成・第 22 回イモリネットワーク共催シンポジウム、2012 年 9 月 14 日、大阪大学(大阪府豊中市)招待講演

15. 千葉親文、イモリに学ぶ外傷性疾患の治療と網膜再生の戦略、第 83 回日本動物学会・シンポジウム・脊椎動物における in vivo 再生、2012 年 9 月 14 日、大阪大学(大阪府豊中市)
16. 千葉親文、Martin M. Casco-Robles、色素細胞の分化転換と網膜再生、第 83 回日本動物学会・第 8 回色素細胞シンポジウム、2012 年 9 月 13 日、大阪大学(大阪府豊中市)招待講演
17. 田中響、Martin M. Casco-Robles、三浦智也、佐藤雄太、千葉親文、成体イモリ再生芽細胞集団系譜および分化能解析、第 83 回日本動物学会、2012 年 9 月 15 日、大阪大学大阪府豊中市)
18. 三浦智也、Martin M. Casco-Robles、田中響、千葉親文、イモリの再生研究のための条件付き発現系の開発、第 83 回日本動物学会、2012 年 9 月 15 日、大阪大学大阪府豊中市)
19. Martin M. Casco-Robles、三浦智也、Ailidana Kunahong、田中響、千葉親文、成体再生イモリに対する Cre リコンビナーゼおよび RNAi の適用、第 83 回日本動物学会、2012 年 9 月 15 日、大阪大学大阪府豊中市)
20. Md. Rafiqul Islam、井波航、千葉親文、発生および再生過程のイモリ眼球における Pax6 の比較解析、2012 年 9 月 15 日、大阪大学大阪府豊中市)
21. 井波航、Md. Rafiqul Islam、吉川太朗、水野亜季、千葉親文、成体アカハライモリの網膜再生初期における Pax6 発現の解析、2012 年 9 月 15 日、大阪大学大阪府豊中市)
22. 安室博文、千葉親文、成体イモリ網膜色素上皮細胞の細胞周期進入における接触阻止の関与、2012 年 9 月 15 日、大阪大学大阪府豊中市)
23. 千葉親文、触れてみよう、イモリと生物学、動物学会東北支部主催講演会、2012 年 8 月 5 日、山形大学(山形県山形市)招待講演

〔その他〕

ホームページ等

イモリ網膜再生のページ：

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~chichiba/>

イモリネットワーク Japan Newt Research Community：

<http://imori-net.org/>

IMORI：

<http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉親文 (CHIBA, Chikafumi)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：80272152

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：