

形の作り直し—再生現象の分子生物学的解析

「形とはたらき」領域 西川 慶子

1. 研究のねらいと背景

通常、我々ヒトを含む脊椎動物は成体として体の形が完成した後は、器官レベルでの大規模な再生を行なうことができません。つまり、事故、疾病、老化などで体のある部分を失ってしまうと、その部分が大きければ取り戻すことができないのです。もし、自由自在に失った器官を再生することができたら、どんなに素晴らしいでしょう。近年、再生工学という考え方から、こんな夢を可能にしようとする研究が数多く行なわれるようになってきました。これらの研究の主流となっているのは、成体の組織の中に少数存在すると言われている幹細胞 (stem cell) を利用するというものです。幹細胞とは、比較的未分化で増殖能力を持ち、自己保存能と多分化能を持つ細胞として定義されています。

さて、このように幹細胞の存在は確かに指摘されてはいるものの、ヒトは実際にはそれを使って大規模な再生を行なえないのです。しかし、成体においても器官レベルの再生を易々とやってのける動物がいます。有尾両生類 (イモリ類) と呼ばれる動物です。彼らは我々ヒトと同様の体制 (四肢を持つ脊椎動物) を持ちながら、四肢、顎、レンズ、網膜、そして内臓の一部までも再生してしまうことが知られています。生理的に大規模な再生を行なうことのできるイモリには、幹細胞が存在するのでしょうか？ また、もし存在するなら、どのようにそれらを使って器官を形作っていくのでしょうか？

イモリが四肢を再生するときには、切断端に再生芽と呼ばれる構造ができます。再生芽は先端キャップと呼ばれる上皮で覆われ、その中は再生芽間充織細胞 (以下、再生芽細胞) で満たされています (図1)。この再生芽細胞は再生体の全ての間葉系の組織を生みだし、幹細胞と呼べる細胞です。再生芽細胞は未分化でよく増殖し、筋や軟骨を生み出すので、幹

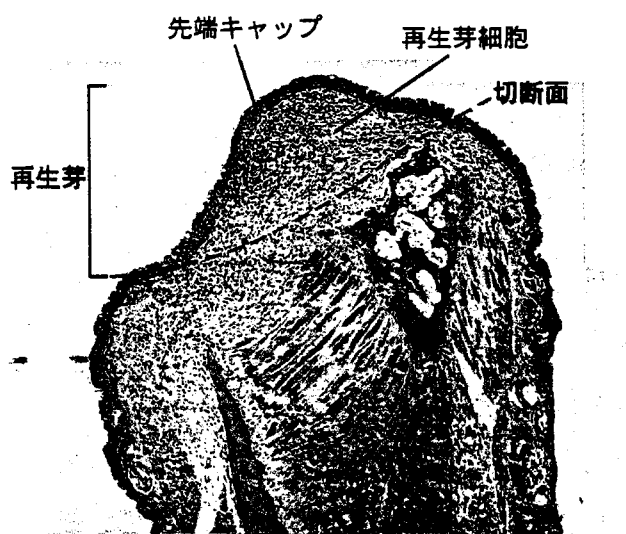


図1 中期再生芽の断面図

細胞としての条件を満たしているといえます。したがって再生できない動物は幹細胞をうまく利用することができないが、イモリは幹細胞を上手に使って器官を構築することができるのです。では、イモリの再生芽細胞には何か特別な性質があるのでしょうか？

イモリの再生芽細胞の起源については、これまでに様々な実験から調べられています。その結果、分化した多核の筋管が脱分化し、単核で多分化能を持つ再生芽細胞になることがわかっています。ここで非常に興味深いことは、イモリにおいては再生過程に必要な幹細胞的な役割を持つ再生芽細胞は始めから存在する（哺乳類のように）のではなく、分化した組織から脱分化という過程を経て作り出すのです。組織の中にわずかしか存在しない幹細胞を単離して利用するよりは、イモリのように分化した自己の組織から効率よく幹細胞を作り出すことができれば、その応用ははかりしれないことでしょう。我々は自然に「再生工学」を行っているイモリから何か学ぶことはできないのでしょうか？

私の研究の目的は、こんな不思議な能力を持つイモリを主なモデル動物として、再生芽の形成機構と再生芽細胞の性質について分子レベルで明らかにすることです。

2. 研究方法と成果

2-1 再生芽細胞の形成過程で特異的に発現する遺伝子のクローニングとその発現の解析

再生芽細胞は切断端の筋管に由来すると考えられます。そこで再生芽細胞が脱分化によって生みだされる仕組みを明らかにするために、切断端付近の筋管で発現の変化する遺伝子をディファレンシャルディスプレイを用いて網羅的に調べることにしました。このようなアプローチにより筋管から再生芽細胞の生みだされるときに必要となる遺伝子が明らかになると予想されます。その結果、肢切断後に発現の変化する遺伝子がいくつか確認できました。その中でも特に興味深い発現パターンを示したのが図2の矢印で示してある遺伝子です。この遺伝子は未切断肢筋ではほとんど発現が見られませんが、切断後に発現が増加し、切断後22日目には未切断肢と同レベルまで発現が低下するというものです。この遺伝子の全長をクローニングし塩基配列を決定したところ、ヒトですでにクローニングされている *rad* (*ras* associated with

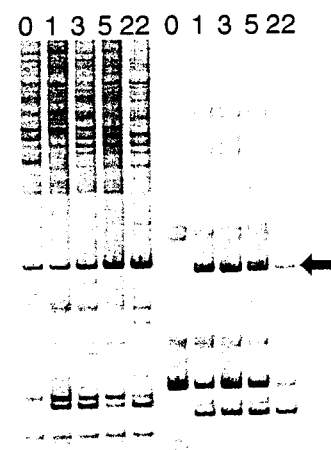


図2 ディファレンシャルディスプレイのパターン。切断後（日数は図の上に表示）に切断部付近の筋を集め、ディファレンシャルディスプレイを行なった。

diabetes) のイモリホモログ (newt *rad*; *nrad*) であることがわかりました。*rad* はもともとヒトにおいてII型糖尿病 (インスリン非依存性) 関連遺伝子としてクローニングされていた遺伝子で、一部のII型糖尿病患者の骨格筋で高い発現が見られます。また、低分子量Gタンパク質である Ras スーパーファミリーに属していることが予想されています。

nrad の再生過程での発現をノザンブロットで調べると、この遺伝子は切断後4時間から発現が始まり、切断刺激に対して非常にレスポンスの早い遺伝子であることがわかりました。さらに四肢の再生過程での発現を詳しく調べるために *in situ* ハイブリダイゼーションを行いました (図3)。最も *nrad* の発現が高いと思われる切断5日後の肢では、図3に示すように、その発現は筋で点状に検出されました。おもしろいことに、*nrad* の発現は切断端の筋で非常に強く、そこから遠ざかるにつれて弱く、切断面から肢の遠近軸にそって勾配を成しているのがわかりました。さらにこの発現パターンを詳細に調べると、*nrad* の転写産物は核の周りに存在すること、切断端付近の筋のほとんどの核で *nrad* を発現していることが明らかになりました。筋の大部分の核は多核の筋管の中に存在し単核の衛星細胞は少数であることを考えると、*nrad* は多核の筋管の核で発現しているといえます。分化した筋管でのこのような発現パターンから、*nrad* と筋の脱分化との関連が予想されます。そこで再生過程での脱分化の程度を変化させる試薬 (レチノイン酸) を用いて、*nrad* の発現がどのよ

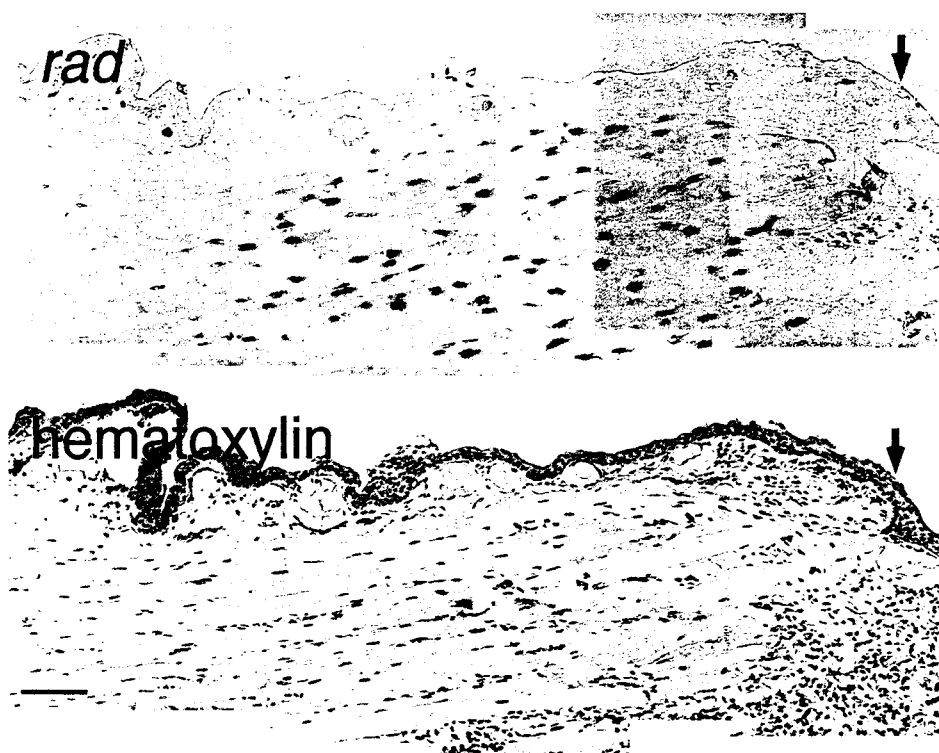


図3 *in situ* ハイブリダイゼーションによる再生肢における *nrad* の発現。切断後5日目切片。矢印が肢の切断面。

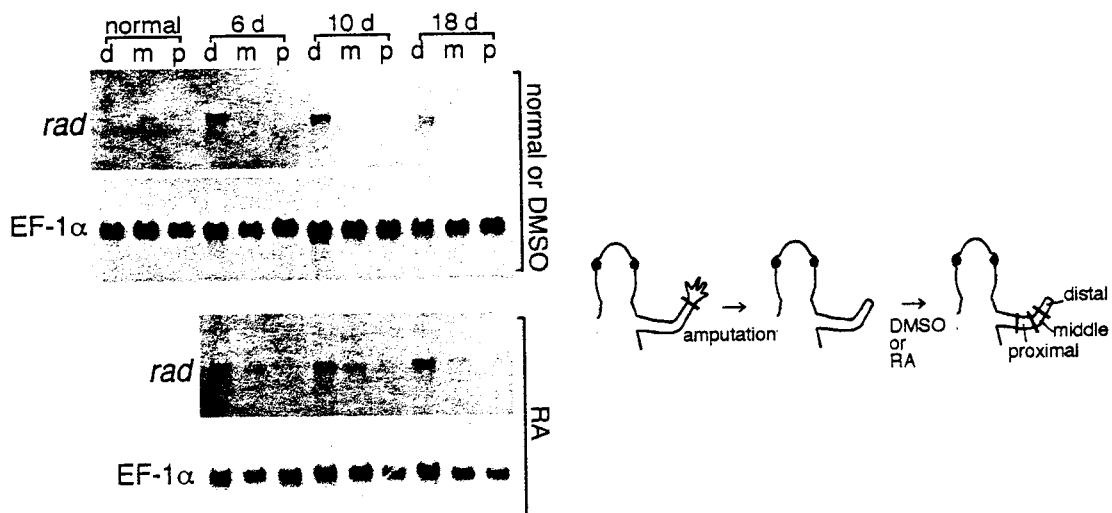


図4 レチノイン酸 (RA) を与えた個体での *nrad* の発現。右側にサンプリングのスキームを示した。

うに変化するか調べました。レチノイン酸は、位置価を変化させる試薬としてよく知られていますが、肢再生中の個体に与えると、脱分化の期間をより長く、また脱分化の範囲が基部側まで広がることが組織学的な観察から知られています。図4に示すように、コントロールでは先端部の筋でのみ *nrad* の発現がみられ、再生過程が進むにつれ発現が低下していきます。一方、レチノイン酸を投与した個体では *nrad* の発現はより基部側まで広がり、高い発現レベルもより長い期間持続していました。したがって、これまでに観察されてきたレチノイン酸による脱分化の変化と *nrad* の発現は非常によく一致するといえます。*rad* をヒトからクローニングしたグループによって行なわれた実験ですが、培養系でメラノーマに *rad* を強制発現させると DNA 合成を促進することが知られています。イモリの *rad* が再生過程で脱分化とよく一致した発現パターンを示したことは非常に興味深い結果だといえます。

2-2 負の分化制御因子 *Id* をマーカーとした再生芽細胞の性質の解析

イモリの再生芽細胞が持つ幹細胞としての機能を明らかにするためのもう一つのアプローチとして、完全な再生を行なう動物 (イモリ) と不完全な再生しかできない動物 (ツメガエル) との間で再生芽細胞の性質の比較を行ないました。前述したように、有尾両生類の一種であるイモリは生涯を通じて完全な四肢の再生を行なうことができ、再生芽細胞は多種類の組織へと分化する幹細胞的な機能を持っています。一方、これと系統的には近縁である無尾両生類 (ツメガエル) は発生過程を通じて再生能力が低下していきます。すなわち、ステージ51で後肢を切断した場合は正常な形態を持った肢を再生できますが、発生が進んでいくに

したがって再生肢の指の数が少なくなり、成体の肢を切断しても主に軟骨でできた手足のパターンをとらなわれないスパイク状（棒状）の肢を生ずるのみです。したがって成体のツメガエルにおいて形成される再生芽細胞は軟骨のみにしか分化しない（一方向へしか分化しない）細胞であり、イモリの場合のような幹細胞的な機能は持たないと思われます。そこで両者の再生芽細胞の性質を比較することによって、多分化能を持ち完全な形態形成を行なうことのできるイモリの再生芽細胞の機能が明らかになると予想されました。

イモリとツメガエルの再生芽細胞の性質を比較するためのマーカーとしては負の分化制御因子である Id に着目しました。Id は inhibitor of differentiation または inhibitor of DNA binding と呼ばれる遺伝子です。正の分化制御因子として知られる MyoD などに対して拮抗的に働き、組織特異的な遺伝子発現を抑制する機能を持つことがわかっています。一般的には発生初期で細胞が未分化な状態であるときに発現が高いことが示されています。再生芽における Id の発現を調べれば、分化の状態が解析できるはずですが、そこでイモリとツメガエルより Id のクローニングを試み、両者より Id2 と Id3 をクローニングすることができました。再生芽における遺伝子の発現を調べると、イモリ、ツメガエルとも正常肢では Id2 と Id3 の発現は低く、初期から中期の再生芽では発現が非常に高いことがわかりました。さらに、発現の局在を調べると Id3 は 2 つの動物とも前軟骨凝集塊で特に高く、軟骨へ分化する前の細胞で機能していることが予想されました（図 5）。以上の結果から、イモリとツメガエルの初期から中期の再生芽の性質は Id の発現を指標にすると、非常によく似ていることがわかりました。ところが、再生過程の後期まで解析すると興味深いことが明らかになりました。図 6 に示すように、イモリの場合には再生過程を通じて 2 つの Id の発現は高いレベルでした。特に興味深いのは指伸長期という再生の最も最後の過程での発現です。このステージは未分化であった再生芽細胞が再び分化を始め形態形成もさかんな時期です。このような組織でも負の分化制御因子である Id の発現が高いことは注目に値すると思われます。



図 5 初期から中期再生芽における Id3 の発現

一方、ツメガエルにおける発現はId2はスパイク状の再生体（イモリでのパレット期から指伸長期に相当する）でも高いままでしたが、Id3はこの時期には未切断肢と同レベルになっていました。図5に示すようにId3の発現が前軟骨凝集塊で高いことを考えるとツメガエルでは軟骨の分化がより早く進むと思われました。つまりイモリでは、負の分化制御因子Idを再生過程の後期まで発現し続けることによって、再生芽細胞は多分化能を持つ幹細胞的な機能を発揮し、形態形成を円滑に行なうのではないかと予想されました。

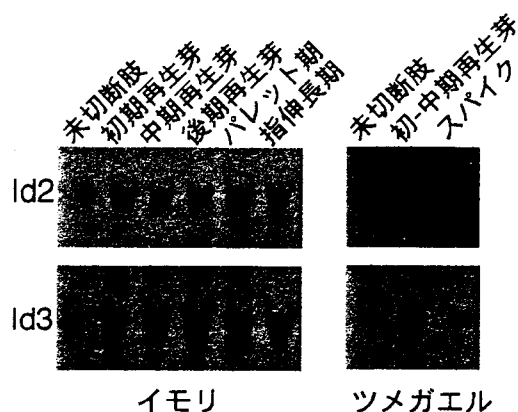


図6 再生過程におけるIdの発現

2-3 無尾両生類の後肢再生能力低下に関わる遺伝子の単離

前述したように無尾両生類（ツメガエル）は幼生期の比較的若い時期には完全な肢再生能力を持っていますが、発生が進み変態期を迎えた後はその能力を失ってしまいます。したがって無尾両生類で変態期を境に後肢での発現パターンが変化する遺伝子や、後肢を切断した時期により再生過程での発現パターンが変化する遺伝子の中に肢再生に関わる重要な遺伝子があると考えられます。

再生能力と関わりのある遺伝子をクローニングするために、cDNA サブトラクションを行い、若い幼生期と変態期の幼生の再生中の肢のうち、前者でより強く発現する遺伝子群のcDNA単離を試みました。cDNAサブトラクションによって得られた遺伝子は、部分的に塩基配列を決定し同定を試みました。またいくつかの遺伝子に関しては whole mount *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、再生中の肢などでの発現領域を調べその機能について考察しました。その中でも再生肢で興味深い発現パターンを示すcDNAクローンを同定することができました。このcDNAクローンは新規のケラチンをコードするものでした。この新規ケラチンは、若い幼生の再生中の後肢では切断基部（切断を受けた後残った部分）にのみ発現があり、再生中の部分では発現が無いことが判りました（図7）。また同じ発生段階の切断を受けていない肢では全体に発現がありました。再生時に発現が抑制されるという意味において再生に関わる遺伝子であることが判りましたので、さらに解析を進めました。RT-PCRの結果、正常な肢での発現は上皮に局限されることが判りました。また発現領域は後肢だけでなく体全体の上皮に及び、発現時期は個体の一生のなかでは孵化後から変態を



図7 ステージ54幼生の再生中の後肢（切断後3日）での発現（矢頭はおよその切断位置を示す）

始める直前までの期間に限られていました。そして幼生に変態を誘導する甲状腺ホルモンを作用させると、その1日後までに発現量の減少が観察され、3日後までには検出できなくなりました。この遺伝子の発現は再生時に消失するので幼生時の肢再生現象を解析するための良いマーカーになると思われます。また幼生特異的であることから上皮の変態を解析するための有用なマーカーであることも判りました。この二つの特徴は変態期の再生能力低下を解析する上で役立つものであると考えられます。

2-4 遺伝子機能解析のための再生芽での遺伝子発現系の開発の試み

再生芽形成に関わる遺伝子の機能を解析するためには、目的の遺伝子を異所的に発現させる系が必要となってきます。遺伝子を異所的に発現させる方法としてはいくつかあります（エレクトロポレーション、ジーンガン、ウィルス、トランスジェニック動物など）が、有尾両生類に対しては必ずしも適切とはいえません。そこで本研究では、トリ胚などで成功例



図8 レポーター遺伝子をトランスフェクションしたCOS細胞を再生芽に移植したもの（移植後3日）。赤矢印が肢の切断面。

のある COS 細胞を利用した系を用いることにしました。培養した COS 細胞にレポーター遺伝子として lacZ をトランスフェクションし、細胞塊を作ってイモリの正常肢または再生芽に移植しました。その結果、正常肢、再生芽とも移植から 2 週間程度の発現がみられ (図 8)、遺伝子産物の発現系として利用可能なことが示唆されました。

3. 今後の展望

本研究によって、脱分化による再生芽細胞形成やその維持に関わる遺伝子が明らかになりました。今後は、現在開発中の遺伝子産物発現系を利用して再生に関わる遺伝子の機能を明らかにしたいと考えています。さらに、再生現象解明の鍵となる脱分化がどんなシグナルによって引き起こされるのかを明らかにし、分化した組織から幹細胞様の細胞を作り出すことを人工的に制御できることを目指していきたいと思います。

4. 発表リスト

4-1 論文

1. K. Shimizu-Nishikawa, I. Tazawa, K. Uchiyama and K. Yoshizato (1999) Expression of the helix-loop-helix type negative regulators of differentiation during limb regeneration in urodele and anuran. *Develop. Growth Differ.*, 41, 731-743.
2. K. Shimizu-Nishikawa, S. Tsuji, and K. Yoshizato (2000) Identification and characterization of newt *rad* (*ras* associated with diabetes), a gene specifically expressed in regenerating limb muscle. *Dev. Dyn.* (in press)

4-2 総説

1. 西川慶子、吉里勝利 (1999) 組織再生の分子メカニズム。ティッシュ・エンジニアリング、名古屋大学出版会、p80-94
2. 西川慶子 (1999) 有尾両生類四肢再生の分子メカニズムー再生芽形成に関して。 *Molecular Medicine*, 36, p1382-1391
3. K. Shimizu-Nishikawa, K. Yoshizato (2000) The mechanisms of limb regeneration in urodeles and anurans. *J. Zool. Sci. India* (in press)

4 - 3 口頭発表

1. 西川慶子、内山孝司、吉里勝利 (1998) 有尾両生類肢再生過程におけるHLH型転写因子遺伝子の発現。日本発生生物学会第31回大会要旨 p187
2. 西川慶子、廣山咲織、吉里勝利 (1998) 有尾両生類肢再生時の切断された筋肉で発現パターンの変化する遺伝子のクローニング。日本動物学会第69回大会要旨 p130
3. 田澤一朗、西川慶子、吉里勝利 (1998) アフリカツメガエル再生肢における負の分化制御因子 Id ファミリーの遺伝子発現。日本動物学会第69回大会要旨 p130
4. K. Shimizu-Nishikawa, S. Hiroyama, and K. Yoshizato (1999) Molecular cloning of cDNA whose expression is up-regulated in amputated muscle during urodele limb regeneration. The Frontiers of the Biology of Amphibia. The International Symposium. p66
5. I. Tazawa, K. Shimizu-Nishikawa, and K. Yoshizato (1999) Expression of Id family, negative regulators of differentiation, in the regenerating limbs of urodele and anuran. The International Symposium. p66
6. 西川慶子、廣山咲織、吉里勝利 (1999) 有尾両生類肢再生過程で筋肉で特異的に発現が上昇する遺伝子は低分子量 G タンパク質をコードする。日本発生生物学会第32回大会要旨 p86
7. 西川慶子、田澤一朗、辻咲織、関田陽子、吉里勝利 (2000) 四肢再生時に現われる再生芽間充織細胞の幹細胞としての機能とそれを生み出す仕組。日本発生生物学会第33回大会要旨 p7
8. 関田陽子、西川慶子、吉里勝利 (2000) 両生類を用いた遺伝子機能解析系の開発。日本発生生物学会第33回大会要旨 pXIV

4 - 4 招待学術講演

1. 西川慶子、内山孝司、吉里勝利 (1998) 組織再生に必要な脱分化の分子メカニズム。第1回日本組織工学会要旨 p58-59
2. K. Shimizu-Nishikawa (1999) Helix-loop-helix type negative regulators of differentiation have important roles for limb regeneration in amphibians. The Frontiers of the Biology of Amphibia. The International Symposium. p44
3. 西川慶子 (2000) イモリはなぜ手足を再生できるのか? 日本機械学会バイオエンジニアリング部門 p89-90