

イモリの肢再生のしくみは変態によって切り替わる
～250年来の謎に迫る発見～

研究成果のポイント

1. イモリは変態すると、肢再生のマスタープランは保持しつつも、新規骨格筋形成のメカニズムを幹細胞^{注1}型から脱分化^{注2}型に切り替えていることを発見しました。
2. この発見は250年近く明らかにされて来なかったイモリの卓越した再生能力の謎に迫る成果です。
3. 再生しないヒトの手足を自己再生させる新しい医療戦略につながることを期待されます。

国立大学法人筑波大学(以下「筑波大学」という)生命環境系 千葉親文准教授と大学院生田中響(生命環境科学研究科博士後期課程2年)は、筑波大学生命環境系 丸尾文昭助教、Martin Miguel Casco-Robles外国人特別研究員(JSPS)、および米国デイトン大学生物学部Panagiotis A. Tsonis教授らと共同で、イモリは幼生期と成体に変態した後では肢再生のメカニズムを切り替えていることを発見しました。これは250年近く明らかにされて来なかったイモリの卓越した再生能力の謎に迫る成果です。

イモリ(有尾両生類の一種)は、その肢を、生涯に渡り、何度でも繰り返し再生できます。一方、他の両生類では、変態すると肢再生の能力が低下するか、なくなってしまう。こうしたイモリの卓越した再生能力が、両生類一般に見られる幼生期の再生戦略に基づくものなのか、それとも変態後に独自に獲得する新規な再生戦略に基づくものなのかは、これまで明らかにされてきませんでした。

本研究では、イモリが変態して成長するのに伴い、肢再生の細胞メカニズムが「内在性の幹細胞/前駆細胞に基づくメカニズム(幼生モード)」から「体細胞の脱分化に基づくメカニズム(成体モード)」に切り替わることを発見しました。肢の筋に着目すると、幼生イモリの肢再生過程では、衛星細胞^{注3}のような筋に内在する筋幹細胞/筋前駆細胞が新たな筋をつくりますが、変態したイモリでは、これらの細胞は関与せず、切断部の分化した筋線維(多核の細胞)が、脱分化して単核の細胞(筋線維由来の再生芽細胞^{注4})となり、新たな筋をつくります。これらの結果は、イモリが変態後も再生を保証する新たな戦略を進化させたことを示唆しています。

成熟した細胞を再生のために動員する脱分化やリプログラミングの能力は、加齢に伴って幹細胞/前駆細胞の数やはたらきが低下した動物にとって有利だと考えられます。イモリの再生戦略を分子レベルで描き出すことができれば、再生できない体を自己再生させる未来型の医療に向けて極めて有用な手掛かりとなります。

* 本研究の成果は、英国時間の2016年3月30日10時(日本時間同日18時)付で英国科学誌「*Nature Communications*」にオンライン公開されます。

* 本研究は、科学研究費補助金(23124502; 221S0002; 24650229; 25870096; 21300150; 24240062; 26.04097)およびNational Institutes of Health grant(EY10540)によって実施されました。

研究の背景

両生類のイモリ(有尾両生類イモリ科Salamandridaeの一群)は、生涯にわたって(年齢に関わらず)、その肢を何度でも繰り返し再生する能力があります。イモリは、肢が切断されると、その切断端に再生芽と呼ばれる「未分化な細胞が集合したこぶ状の構造体」をつくり、そこから新たな肢を再生します。それに対して他の両生類は、幼生期にはイモリと同様に肢を完全に再生する能力があるものの、変態するとその能力を部分的に、あるいは完全に失ってしまいます。この現象は、18世紀のイタリアの博物学者Lazzaro Spallanzani(実験動物学の祖と呼ばれる)が発見し、1769年に報告しました(Spallanzani, 1769, 1796)。しかし、彼が残した「何故イモリだけがこのように卓越した再生能力をもつのか?」という問いは、250年近く経っても未だ解かれていませんでした。本研究グループは、イモリの卓越した肢再生能力の謎に答えるために、その能力は両生類が一般にもつ幼生期の再生戦略を変態後まで延長させた結果なのか、それとも変態後のイモリが独自に獲得する新規な再生戦略に基づくものなのかを明らかにしたいと考えました。

有尾両生類の肢再生過程においては、分化した筋線維(筋細胞)が脱分化して再生するか、あるいは筋に内在する衛星細胞のような筋幹細胞/筋前駆細胞から新たな筋がつくられて再生すると考えられています。有尾両生類の肢再生の研究には、イモリだけでなく、やはり高い肢再生能力をもつアホロートル(Ambystomatidae科に属する幼形成熟^{注5}型の種;いわゆるウーパールーパー)も利用されています。肢再生過程における新たな筋の形成では、成体イモリは筋線維を用い、アホロートルは衛星細胞を用いることが最近報告されました(Sandoval-Guzmán et al., 2014)。アホロートルでは、ホルモン投与により人為的に変態させた後でも、筋線維は動員されず、衛星細胞のみが動員されます(ただし肢の完全な再生はできない)。このことから、イモリとアホロートルの肢再生における筋の由来の違いは、種の違いに帰せられるのではないかという議論が生まれました。しかし、変態前の幼生イモリの肢再生に、成体と同様に筋線維の脱分化が関わっているかどうかは明らかにされていませんでした。

研究内容と成果

本研究では、2つの方法によりこれらの問題の解明に挑みました。1つ目の方法は、筋線維特異的なプロモーター^{注6}を利用した筋線維、および筋線維由来細胞の追跡技術です。これにより、肢再生過程における筋線維の挙動を、3カ月齢の幼生(いわゆる‘赤ちゃん’)と変態後の幼体(変態後10カ月の16カ月齢の個体;いわゆる‘こども’)との間で比較しました。2つ目の方法は、移植による組織レベルの追跡技術です。幼体および成体(3歳)の個体を用いて、遺伝子組換えにより蛍光標識した組織(皮膚、骨、筋、神経)を肢に移植し、生着した後、肢を切断し、移植した組織が再生肢中のどの組織に分化したかを調べました。これらの方法は、我々が世界に先駆けて確立したアカハライモリ遺伝子改変技術を応用したものです(Casco-Robles et al., 2011)。肢再生過程における衛星細胞の挙動については、衛星細胞に特異的に発現する転写因子Pax7^{注7}を免疫組織化学法により染色することで調べました。

筋線維および筋線維由来細胞を追跡した結果、幼生イモリは切断された肢を再生するために筋線維をまったく必要としないことが明らかになりました。一方、Pax7陽性の細胞が再生芽中に動員されることから、再生肢中の新たな筋は筋幹細胞/筋前駆細胞(衛星細胞)によってつくられると考えられました。この結果は、アホロートルにおいて報告された結果によく対応しています(つまり、幼生イモリとアホロートルの肢再生はよく似ている)。しかし、再生過程全体にわたる詳細な解析から、肢再生の後期においては、筋線維や筋幹細胞/筋前駆細胞(衛星細胞)とは異なる第3の細胞種(おそらく線維芽細胞と思われる)も、筋再生に関わることが明らかになりました。これは本研究による新発見です。それとは対照的に、変態したイモリでは、肢の切断端に存在する筋線維が断片化し、単核化した細胞が再生芽中に動員され、それらの細胞から再生肢中の筋がつくられることが明らかになりました。一方、筋幹細胞/筋前駆細胞(衛星細胞)の動員はまったく観察されませんでした。

これらの結果から、イモリには、肢再生のために筋幹細胞/筋前駆細胞(衛星細胞)と筋線維の両方を使いこなす能力があることが明らかになりました。しかし、筋幹細胞/筋前駆細胞(衛星細胞)の利用は幼生期に特異的で

り、筋線維の利用は変態後に特異的でした。つまり、イモリは変態して成長すると、肢再生のメカニズムを、アホロートルのような幹細胞/前駆細胞型(幼生モード)から、分化した筋線維を利用する脱分化型(成体モード)に切り替えているのです(図1)。このことから、成体イモリとアホロートルの肢再生における筋の由来の違いは、種の違いによるというより、むしろ発生段階の違いによって説明されるべきであると考えられます。

次に、変態後のイモリにおいて、再生肢を構成する個々の組織が、切断端のどの組織に由来するのか(分化運命)を調べました。すなわち肢組織の分化運命を包括的に理解するために、蛍光標識した組織を肢に移植し、その追跡実験を行いました。アホロートルの肢再生においては、組織の分化運命は厳密に決まっており、皮膚は皮膚、骨は骨(軟骨)、筋は筋、神経(シュワン細胞)は神経(シュワン細胞)を再生することが分かっています(Kragl et al., 2009; 図2A)。(ただし、皮膚を構成する表皮は同じ表皮を再生するが、真皮は真皮だけでなく骨の再生にも寄与する。逆に骨が真皮の再生に関わる可能性も議論されている。)変態したイモリにおいても、驚いたことに、組織の分化運命は厳密に決まっており、再生肢を構成する個々の組織の由来組織はアホロートルとほとんど同じであることが明らかとなりました(ただし骨が真皮の再生に関わることはなかった)(図2B)。これらの結果は、成体イモリがアホロートルと同じマスタープラン(基本設計)に基づいて肢を再生させていることを示唆しています。しかし、筋に着目すると、筋線維追跡の結果から明らかなように、成体イモリは分化した筋線維を脱分化して利用しています。つまり、材料を替えているのです。

両生類は一般に、幼生期には肢を完全に再生することができます。カエルのオタマジャクシでも、肢が生えたばかりの時期であれば、その肢を再生することができます。このことから、両生類がもつ幼生期の肢再生メカニズムは、両生類の共通祖先において獲得されたものであるという仮説が示唆されます。本研究により、幼生イモリとアホロートル(幼形成熟)が、ともに筋再生のために筋幹細胞/筋前駆細胞(衛星細胞)を用いることが明らかになりました。また、共通のマスタープラン(あるいはコンセプト)に基づいて肢を再生させていることもわかってきました。これらの結果は、先の仮説を支持するとともに、ヒトを含む四肢動物の肢(すなわち手足)再生のマスタープランの理解に向けて、両生類研究の重要性を示すものです。

イモリは、他の両生類とは違い、変態後は筋線維を動員する脱分化の能力を獲得することで肢を完璧に再生できるようになったといえます。アホロートルを人為的に変態させても肢を再生するための筋線維の動員は起らないことから、この能力はイモリ固有の再生戦略として進化したと解釈できます。この仮説が、250年近く明らかにされて来なかったSpallanzaniの問いへの答えかもしれません。本研究グループは、先行研究において、体細胞の脱分化/リプログラミングが成体イモリの網膜再生において重要であり、その再生様式は他の脊椎動物に見られないユニークなものであることを証明しました。また、外傷に対する細胞の応答性がヒトの外傷性網膜疾患の際のそれと共通していることも示しました(Islam et al., 2014)。最近、成体イモリの筋線維の脱分化に、プログラム細胞死と共通の分子経路が関わるということが報告されました(Wang et al., 2015)。成体イモリが示す体細胞の脱分化/リプログラミングの能力は、細胞の外傷応答や細胞死の分子経路を修飾する何らかの変化によってもたらされた可能性があります。

今後の展開

本研究の結果から俯瞰できる両生類の肢再生の戦略を図3に示しました。両生類の肢は、幼生期には再生することができますが、変態して体の構造や機能が水生型から陸生型に転換すると、しだいに再生能力を失ってしまいます。アホロートルは、変態せず、幼生形態を維持する戦略により、再生能力を生涯にわたって維持することに成功した動物と言えます。一方、イモリは、他の両生類と同様に変態すると再生能力を失うはずでしたが、体細胞の脱分化/リプログラミングのメカニズムを新たに獲得することで、この問題を解決した動物と言えます。

両生類の肢再生の戦略をヒトの再生医療に繋げるためには、まず、両生類の肢再生に共通するマスタープラン(基本設計)を解く必要があります。これには幼生や幼形成熟個体の研究が有効であると考えられます。現状では2つのコンセプトから研究をデザインすることが可能です。一つは、アホロートル型再生の実現です。つまり、変態後に

再生できなくなる原因を探り、その原因を取り除くことで幼生型再生をどう延長させるかを探る研究です。もう一つは、イモリ型再生の実現です。イモリは、再生が困難な成体の体内環境において、完璧な再生を実現する手掛かりを与えてくれるはずですが、そのためにはまず、イモリが獲得したナチュラルな脱分化/リプログラミングのメカニズムを解明しなければなりません。成体の肢組織の分類は、図2に示した通り幼生とほぼ変わりませんが、個々の組織の構造は幼生のものよりはるかに複雑です。最近の研究から、イモリの肢の3次元構造を再構築するメカニズムが、幼生と成体で異なることが示されており、成体の再生様式はヒトを含む有羊膜類の肢形成の様式に似ることがわかっています(Kumar et al., 2015)。成体肢の細胞/組織が、どのようにして幼生と同じマスタープランに従って行動しつつ、成体肢の3次元構造と機能を復元できるのか、そのメカニズムを分子・細胞レベルで明らかにする必要があります。本研究グループは、イモリ型再生の実現を目指しています。今後、これまで築いてきた資源・技術・情報基盤をさらに強化することを通じて、これらの問題を完全解明していく予定です。

参考図

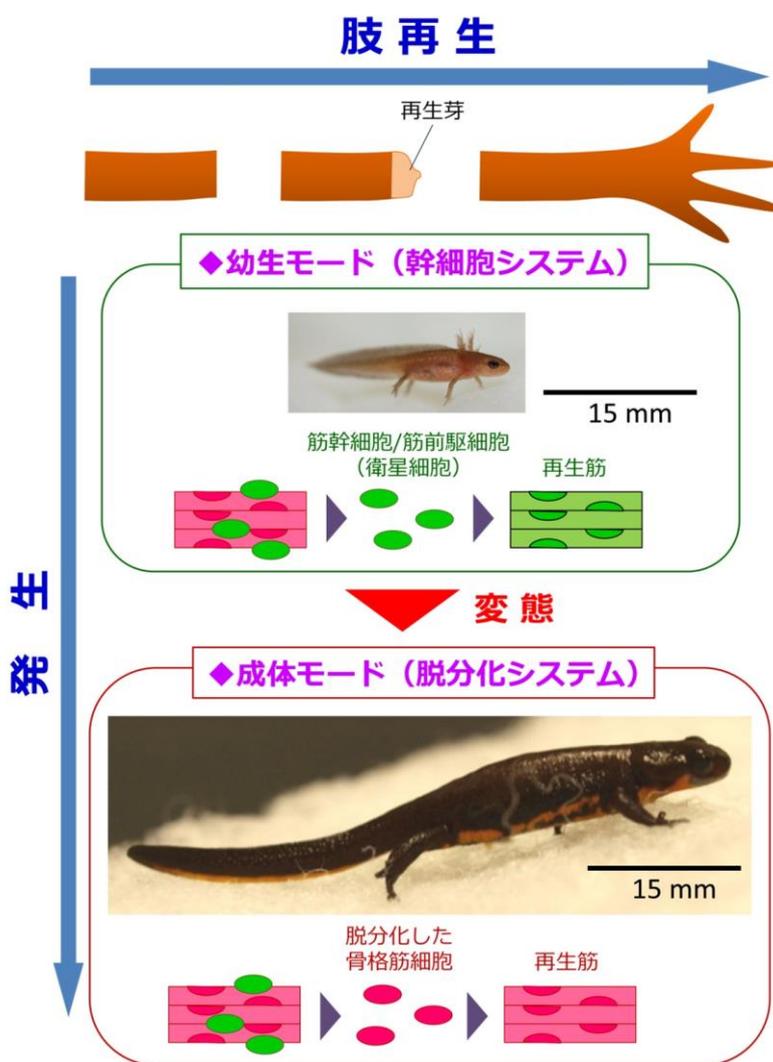


図 1. イモリは変態して成長すると、肢再生のメカニズムを、幹細胞システム(幼生モード)から、分化した細胞を利用する脱分化システム(成体モード)に切り替える。再生肢中の筋に着目すると、幼生期には衛星細胞のような筋に内在する筋幹細胞/前駆細胞を用いて新たな筋をつくるが、変態すると、分化した筋線維(収縮する多核の骨格筋細胞)を単核の細胞に脱分化し、これを材料にして新たな筋をつくる。

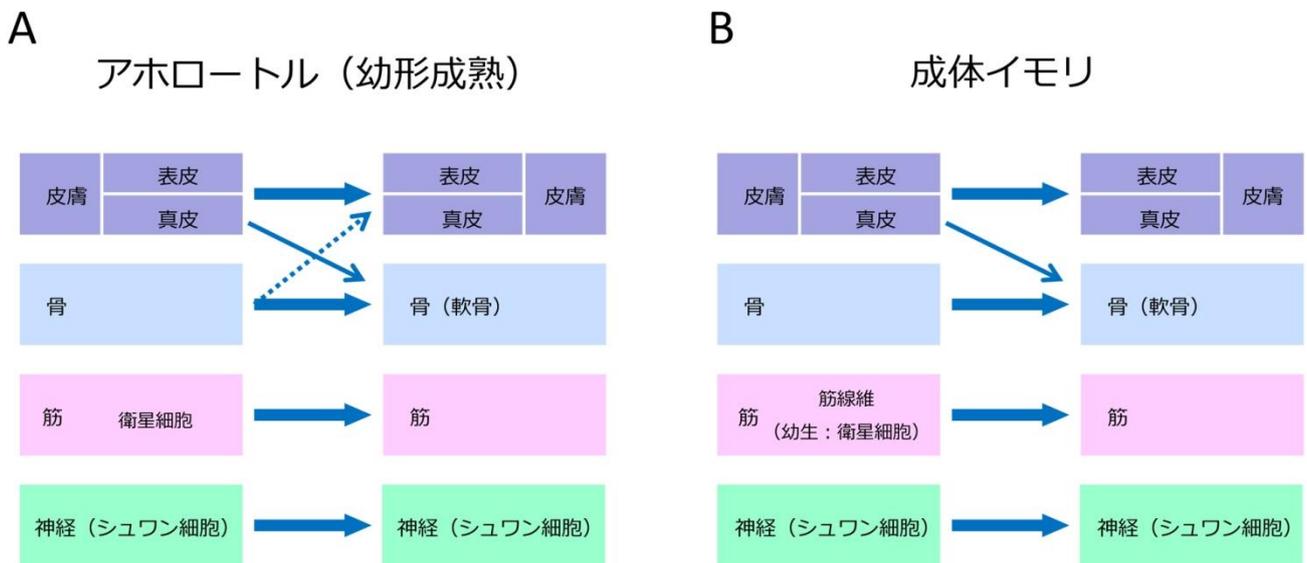


図2. 肢再生過程における組織の分化運命は厳密に決まっている。肢を構成する個々の組織は、アホロートル(A)と成体イモリ(B)の両方において、一部の例外(真皮 - 骨)を除き、同じ種類の組織から再生する。すなわち、アホロートルと成体イモリは、同じマスタープラン(基本設計)に基づいて肢を再生させているようである。しかし、筋に着目すると、アホロートルは衛星細胞(幹細胞/前駆細胞)を、成体イモリは分化した筋線維を材料にしている。

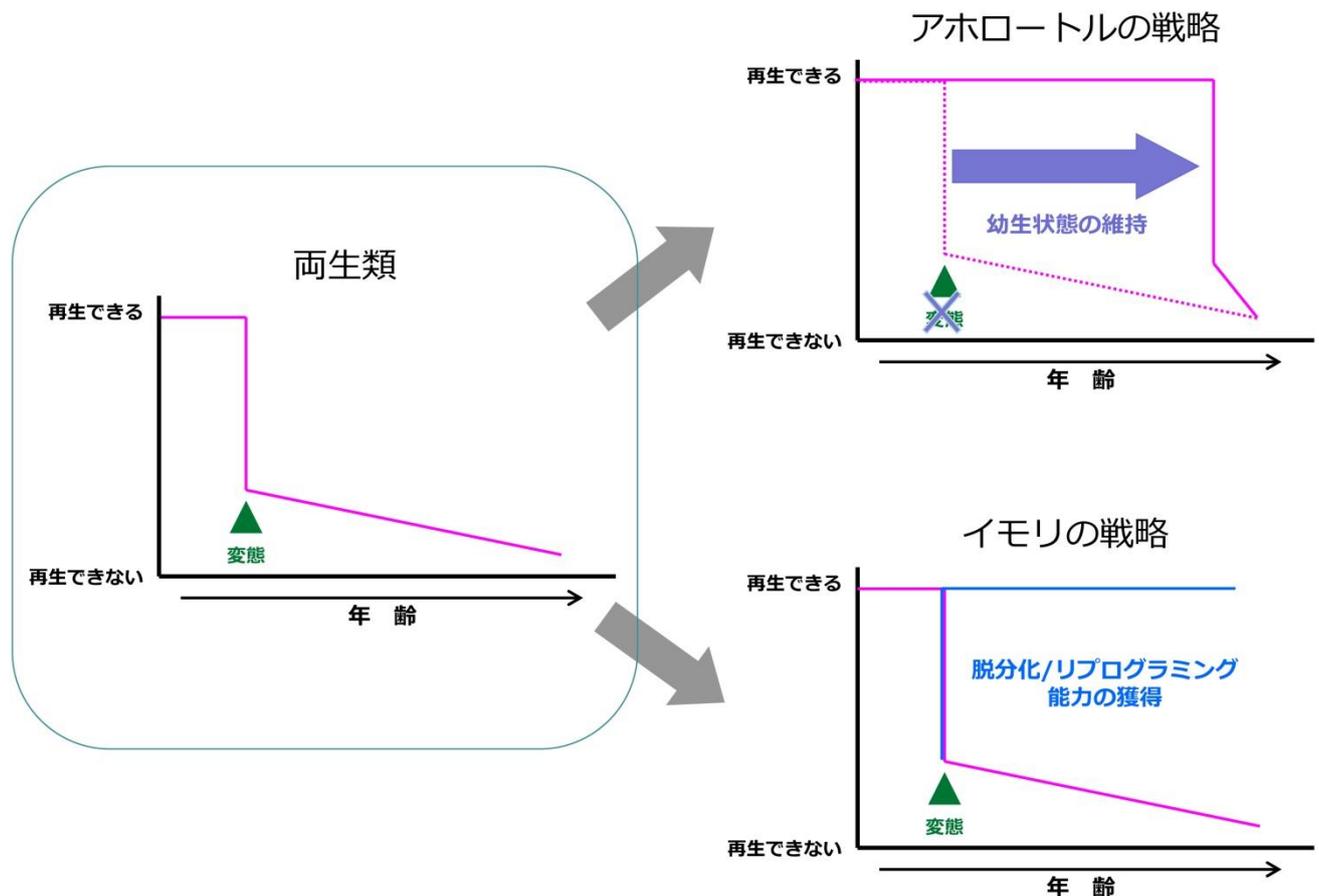


図3. 一般に両生類は変態すると肢再生の能力を失う(赤線)が、アホロートルは幼生状態を維持することで、イモリは変態に伴って脱分化/リプログラミング能力を新たに獲得する(青線)ことでこの問題を解決したと考えられる。

用語解説

- 注1) 幹細胞: 幹細胞とは、分裂して自分と同じ細胞をつくるとともに、分化の方向に進む細胞を生み出す能力がある細胞のことで、無限に増殖できる。それに対して後出の前駆細胞とは、特定の種類の細胞や組織を生み出す細胞のことで、幹細胞と最終分化細胞の中間段階にあるとされる。
- 注2) 脱分化: 分化した細胞がその特徴を失うこと。
- 注3) 衛星細胞: 骨格筋に内在する筋線維(筋細胞)の幹細胞/前駆細胞のことで、筋の成長や修復に働く。
- 注4) 再生芽細胞: 動物の再生過程において、体の切断端に現れるふくらみ(再生芽)を構成する未分化細胞のこと。
- 注5) 幼形成熟: 動物において、変態前の幼生や幼虫、あるいは近縁種において幼形とみなされる性質を残したまま、性的に完全に成熟する現象のこと。
- 注6) プロモーター: 遺伝情報の読み出し(転写)の開始に関わる遺伝子上流域のこと。
- 注7) 転写因子 Pax7: DNA に結合し遺伝情報の読み出し(転写)を制御するタンパク質の一つで、ペアードと呼ばれる特徴的な DNA 結合ドメインをもつ。骨格筋の成長や修復に関わる衛星細胞に発現する。

参考文献

1. Spallanzani, L. *Prodomo di un opera da imprimersi sopra la riproduzioni animali*(1769) [*An Essay on Animal Reproductions* (1769), translated from Italian by M. Matty, 1769, Kessinger Publishing (2010).]
2. Sandoval-Guzmán, T. et al. Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell* **14**, 174–187 (2014).
3. Casco-Robles, M. M. et al. Expressing exogenous genes in newts by transgenesis. *Nature Protoc.* **6**, 600–608 (2011).
4. Kragl, M. et al. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* **460**, 60–65 (2009).
5. Islam, M.R. et al. The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration. *Sci. Rep.* **4**, 6043 (2014).
6. Wang H. et al. Turning terminally differentiated skeletal muscle cells into regenerative progenitors. *Nat. Commun.* **6**:7916 (2015).
7. Kumar, A. Gates, P. B., Czarkwiani, A. & Brockes, J. P. An orphan gene is necessary for preaxial digit formation during salamander limb development. *Nat. Commun.* **6**:8684 (2015).

掲載論文

【題名】 A developmentally regulated switch from stem cells to dedifferentiation for limb muscle regeneration in newts.

(イモリにおける肢筋再生のための発生によって制御される幹細胞から脱分化への切り替え)

【著者名】 Hibiki Vincent Tanaka, Nathaniel Chuen Yin Ng, Zhan Yang Yu, Martin Miguel Casco-Robles, Fumiaki Maruo, Panagiotis A. Tsonis & Chikafumi Chiba

【掲載誌】 Nature Communications

DOI: 10.1038/ncomms11069

問合わせ先

氏名 千葉 親文(ちば ちかふみ)

筑波大学 生命環境系 准教授

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1