

# 研究報告書

## 「細胞リプログラミングの段階的制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 佐藤 伸

### 1. 研究のねらい

分化細胞の一つ一つは、その発生過程をさかのぼれば未分化な細胞にあたる。発生過程をさかのぼって当たる「未分化細胞」とは、単にES細胞などだけを指すのではなく、器官・組織それぞれの幹細胞ともいべき未分化細胞をも意味する。例えば、四肢の皮膚繊維芽細胞は胎児期の「肢芽間充織細胞」という未分化細胞から形成される。この未分化な肢芽間充織細胞はごく初期の段階では「結合組織系の細胞種であれば何にでも分化できる」という多分化能を呈する。これが意味するところは、発生過程を少しだけ(段階的に)遡れば、器官組織に応じた“多分化能を有する細胞”は存在する(獲得できる)のである。組織・器官再生を考えたときに、発生時間をすべて巻き戻した iPS 細胞を使用しなくても、上記のような「未分化細胞」が得られれば解決するだろう。問題は、発生過程を少しだけ巻き戻すというリプログラミング機構があるかどうかである。

我々の使用する有尾両生類の四肢再生システムは、上記の「発生過程の段階的な巻き戻し」という現象を観察できる数少ない系である。有尾両生類の四肢再生プロセスにおいては、真皮を構成する皮膚繊維芽細胞が「脱分化」し、未分化な「幹細胞様」の細胞に変貌すると考えられている。この幹細胞様の細胞は「再生芽細胞」と呼ばれ、結合組織系の細胞種であれば“何にでもなりうる”という分化の多能性を呈する。しかも、この再生芽細胞は「四肢」としてのアイデンティティは有しており、他所へ移植しても四肢の構成成分にしか分化しない。つまりは、「位置情報は維持しつつ、分化状態だけ一定程度巻き戻す」という現象が起こるのである。実験的にも、この再生芽細胞が発生過程に形成される肢芽間充織細胞に相当するものであることが示されている。そして、その再生芽細胞が再度発生過程を繰り返し、元の四肢を再生する。強調したいのは、このような分化の巻き戻しが「生体が持つ内在性のメカニズム」によって引き起こされている事である。この成体の持つ「内在的な分化リセット機構→再分化機構」(リプログラミング)を明らかにすることが本研究の目的である。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

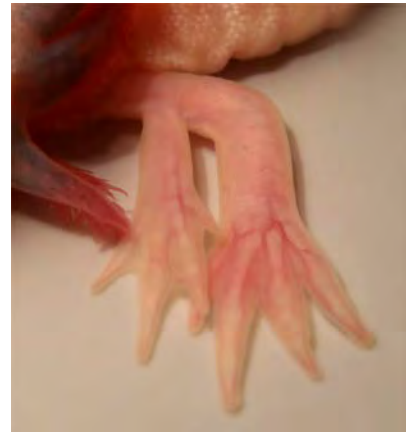
四肢の再生の開始システム、つまりは未分化細胞が現れるそのシステムが明らかではなかった。この謎は当該分野における長きにわたる謎として存在しているものであった。まずはこの問題に取り組むことから始めた。再生研究に非常に有用である新規研究系(過剰肢誘導モデル)を発展させ、これを使用し、非再生系と再生系との間で比較解析を行った。その解析の中から数個の重要と考えられるシグナルカスケードを拾い出すことができた。そのうち3つが再生反応の開始に重要な役割を果たすことが明らかになった。我々が明らかにしたその3つとは、1) FGF-Signaling 2) MMPによるECMの分解 3) 因子G である。この3者の活

性によって再生反応を人為的にコントロールすることができるようになった。言い換えれば、この3者を非再生系である「単純な皮膚損傷」に与えることで、「再生系」である四肢形成へ導くことができるようになった。これらの発見をもとに、細胞レベルでの分化のリプログラミングにアプローチできると考える。

## (2) 詳細

### 2-1. 四肢再生惹起システムの発見

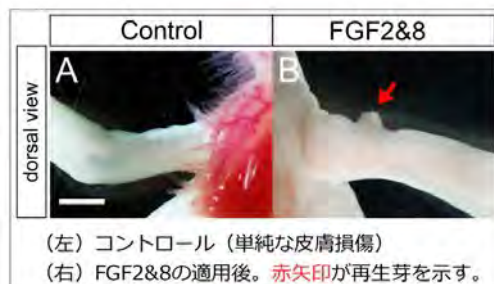
なぜ有尾両生類は四肢の再生を惹起できるのか？この問い自体は 250 年にも長きにわたる謎として依然存在している。この謎に挑むべく、我々は独自に発達させてきた過剰肢付加モデルと呼ぶ研究システムを用いて研究を行っている。この研究システムを端的に示せば右図のようなものになる。もう一本の「過剰な腕をはやせる」実験系である。この過剰肢の形成に必要なのは ①皮膚損傷 ②神経の存在 の二つだけであることが分かっている。このたった二つの組織種の関係だけで四肢の再生(過剰肢形成)が惹起できることが明らかになったことは、当研究領域にとっては大きな成果であった。



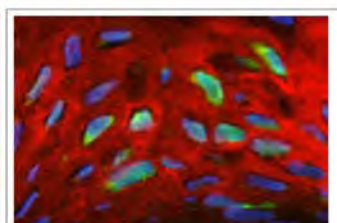
この二つの組織関係によって四肢再生が惹起可能であるとして、その分子生物学的な背景はおおよそどのような物であろうか？これを追求するため、次世代シーケンサーを用い、異なる条件下での比較解析を行った。ゲノム情報のない非モデル生物でのトランスクリプトーム解析であるため、今現在も綺麗なデータベースとは言えない状況であることは否めない。しかし、その中からでも再生惹起にかかわる候補となるキーワードを拾う事ができた。1. ECM の分解 2. FGF-Signaling である。

まず、シーケンシングの解析結果をもとに、ECM の分解酵素の発現や FGFR(FGF 受容体)の発現を解析した。結果、シーケンシングの結果を裏付けるように、探索した関連遺伝子の発現は再生条件下で高く、非再生条件下では低いことが明らかになった。この二つの条件(ECM の分解と FGF-Signaling)が再生に必須かどうかを検証するために阻害剤を用いて、それぞれのシグナリングカスケードの阻害実験を行い、再生プロセスへの関与を検証した。確かに、それぞれの阻害剤によって再生プロセスは抑制されることが明らかになった。次に、この両者が再生の反応を惹起できるのかを検証した。非再生条件である「単純な皮膚損傷」を作成し、そこに

ECM の分解活性と FGF-Signaling のインプット(FGF2&FGF8 の添加)を行った。その結果、四肢再生時に形成される「再生芽」(再生芽細胞の集合体)と呼ばれるドーム状の構造の誘導に成功した(左図)。切片を作成し、より詳細な検証をしたところ、確かに形態的にも遺伝子発現パターンからも再生芽細胞と言えるであろう集団を観察すること



ができた。これが本当に再生芽細胞としての特性を備えるのであれば、繊維芽細胞に由来する再生芽細胞は結合組織系譜内での多能性を示すはずである。そこで、軟骨への分化転換能を検証するために、この誘導された構造の間充細胞を採取し骨の損傷部に移植した。骨の損傷部では高等脊椎動物同様に初めに活発な軟骨の増殖が起こる。このプロセスにおいて



FGF2&8によって誘導された構造の間充細胞を骨損傷部に移植。軟骨形成能を検証した。(赤)軟骨(T2コラーゲン) (緑)移植細胞。

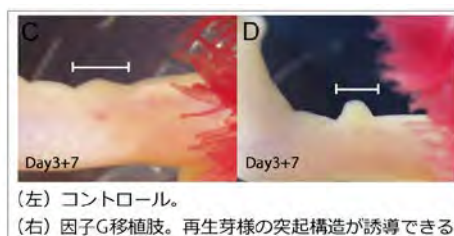
では皮膚繊維芽細胞を単に移植しても軟骨への分化転換は観察されないことは有尾両生類でも高等脊椎動物でも証明済みである。しかし、ECMの分解促進とFGFsの添加によって得られた構造の間充細胞を移植した場合は、移植細胞の軟骨への参加を観察することができた(左図)。これらのことから、FGF2&8インプットとECMの分解によって、非再生条件を再生条件に転換できることが強く示唆された。言い換えれば、in vivoレベルで繊維芽細胞らに少なくとも軟骨分化能を持たせる事ができる条件を発見したといえるだろう。

神経の参画なしに、再生反応を惹起するという事こそが長きにわたって求められている課題である。上記研究成果は、まさにその回答になりうるものであり、四肢再生領域における250年の謎の回答として非常に大きな進展であると確信している。

## 2-2 因子GとFGF-Signalingが引き起こす「差」から、脱分化メカニズムに迫る

上記研究のプロセスにおいて、非常に面白い現象を発見した。それは因子Gというタンパク質をもちいても、上記同様に再生反応を惹起しているような現象を観察できた事である(右図)。

250年間探し求められてきた、再生反応惹起に関連する因子がかくも素早く複数見つかった事は、過剰肢付加モデルの優位性と我々の研究の方向性の正しさを改めて証明するものであると考える。この構造を解析してゆくうちに非常に興味深い事項が明らかになってきた。それは、「脱分化」して



(左) コントロール。(右) 因子G移植肢。再生芽様の突起構造が誘導できる

いないという事である。因子Gによって誘導される再生芽様の構造体は軟骨への分化ができないことが明らかになった。それだけではなく、軟骨への分化能を呈するような「普通」の再生芽で発現している遺伝子発現を欠くことも明らかになった。因子Gに加えてFGF2&8を添加した場合は、再生芽細胞の性質を有する細胞が現れることも確認している。FGF2&8も因子Gも同じような反応を引き起こせるものの、分化調節といった観点からは異なる反応を示すことが明らかになった。

これまでの研究は主にin vivoの結果であり、in vitroでの観察のように個々の細胞の振る舞いを直接的に検証できた訳ではないことが大きな欠点である。これを現段階では完全に解決するところまでは残念ながら到達できなかった。しかし、in vivoとin vitroを組み合わせながら、細胞個々がどのような変遷をたどるのかを検証しようとする試みを始めている。残念なことに、さきがけ期間中には最適な培養条件を発見するには至らなかったが、~1週程度であれば培養細胞を維持することはできる。そこで、培養細胞を上記再生惹起物質(?)とともに培養し、その後in vivoの条件に移して検証するという実験方法を考えた。皮膚繊維芽細胞を培養し、そこにFGF2&8または因子Gを加えることで、皮膚繊維芽細胞に軟骨分化能を付与できるかと

うかを検証した。単なる皮膚の培養細胞は、軟骨の形成に参加できない。ところが、FGF2&8とともに培養した皮膚繊維芽細胞は、移植先で軟骨の形成に参画できることが明らかになった。さらに、in vivoでの解析結果に矛盾なく、因子G処理した繊維芽細胞は軟骨形成に参画しないことも明らかになった。これらの結果は、高等脊椎動物では非常に難しいとされる皮膚繊維芽細胞からの軟骨誘導が、「再生可能動物」である有尾両生類では比較的容易に行えることを示唆する。これが、両者の再生能力の差につながるのかどうかは今後の検討課題である。

これらの研究成果が、「発生時間の巻き戻し」に相当するかは、正直なところ全く答えられてはいない。確かに、四肢再生時に発生プロセスでは発現し正常(成熟)肢においては発現しない遺伝子などが再発現する事や、発生プロセスに生じるような分化可塑性を有する細胞は現れる様ではある。しかし、それが本当の意味で「巻き戻し」にあたるかどうかは今後の検討課題となることは自覚しており、鋭意努力したい。

### 3. 今後の展開

細胞一個単位での解析にたどり着くことが急務である。そうでない限り、幹細胞の関与など「脱分化ではない経路」の関与の否定ができないためである。培養系をより発達させ細胞個々の振る舞いを観察したい。

また、ここでの発見は当該領域内では非常に大きな発見にあたると考えている。240年間解き明かさなかった再生惹起メカニズムが、少なくともその一側面を初めて見せたからである。今後は、この領域をリードするために国際的な研究体制を構築してゆきたいと考える。研究の方向性には自信を得たので、今の成果をより Precise(領域会議で繰り返し指摘されました)なものに昇華させてゆく努力を行う。

### 4. 自己評価

本研究期間において、自分なりに非常に満足いく成果を得たと確信している。確かに、研究としても未熟さを否定できない部分は自覚している。しかしながら、今後5年の足場を築くことは確実にできたと思う。少なくとも長きにわたって明らかにされなかった再生開始のメカニズムの一端を明らかにできたことは、(現在未発表ではあるが)海外からも大きな反響を得ている。今後は、自分に足りない部分は領域会議で十二分に痛感したので、いただいた数々のご助言を基に、より良い科学者を目指す。

### 5. 研究総括の見解

これまで日本の貢献の多い両生類再生研究を担う若手として採択した。再生研究としての一定のレベルの業績を上げ、また専門誌に論文を発表しており、業績としては評価できる。本人の能力から考えると、当然の結果と言える。ただ、この分野の根本問題を整理し、それを独自の方法で解き、新しい分野を開拓すると言う点では、もう一度原点に戻って考え直してみる事も重要ではないかと思う。

### 6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Spatiotemporal regulation of keratin 5 and 17 in the axolotl limb”, Moriyasu M., Makanae A, and **Satoh A.**, *Dev. Dyn.*, 241(10):1616–24, 2012.
2. (Review) Early regulation of axolotl limb regeneration., Makanae A. and **Satoh A.**, *Anat Rec (Hoboken)*, 295(10), 1566–74, 2012.
3. Collagen reconstitution is inversely correlated with induction of limb regeneration in *Ambystoma mexicanum.*, **Satoh A.**, Hirata A and Makanae A., *Zoolog. Sci.*, 29(3), 191–197, 2012
4. Blastema induction in aneurogenic state and Prrx-1 regulation by MMPs and FGFs in *Ambystoma mexicanum* limb regeneration., **Satoh A.**, Makanae A. Hirata A. and Satou Y., *Dev. Biol.*, 355(2), 263–274, 2011.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)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)

2011、NHK BS 「いのちドラマチック、驚異の再生能力」に出演