

論文内容の要旨

論文題目 **Study on the immune responses that determine organ regenerative ability in vertebrate**
(脊椎動物の器官再生能を規定する免疫応答に関する研究)

氏名 深澤 太郎

失われた器官や付属肢を再形成する「再生」という現象は多くの生物種で観察されるが、その程度（再生能）は種や器官、発生ステージなどにより様々である。例えば無尾両生類では、幼生であるオタマジャクシの尾は切断に対し表皮・血管・筋肉は元より脊索・脊髄の再形成という高度な再生能を示すが、成体であるカエルの四肢が切断された場合は、指を欠いた構造が再形成されるに留まる。一方、哺乳類においては肝臓を除き高度な再生能を示す器官は報告されていない。再生機構の解明は、基礎生物学は元より応用医学においても重要な研究課題であるが、このように再生能が多様である理由、つまり再生能を規定している要因については長らく謎であった。

近年、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 幼生尾において一過的に再生能が失われる時期（「再生不応期」: stage 45~47）があることが報告された。ツメガエル幼生尾は、再生不応期より以前(stage ~42、「前期可能期」)と不応期以降のステージ (stage 49~、「後期可能期」) においては切断した際に脊髄を含む高度な再生能を示すが、不応期においては傷口を上皮が覆うのみに留まり、尾は再生されない。私は修士課程において、ツメガエル幼生尾の不応期と後期可能期の尾で切断後の発現変動パターンの異なる遺伝子を探索し、候補となる遺伝子を 40 種類得た。博士課程では、まずこれら候補遺伝子のうち 6 種類が実際に発現変動していることを確認した。全長配列を決定し、相同性検索を行ったところ、既知遺伝子と相同性を示したものは全て免疫関連遺伝子であった (表 1、図 1)。そこで再生能と免疫応答の関連を解析する目的で、他の免疫関連遺伝子についても前期・後期可能期と不応期とで発現量を比較したところ、異なる変動パターンを示す遺伝子が多数見いだされた (図 2)。このことから、前期・後期可

能期と不応期では、尾の切断に際して異なる免疫応答が起きていると考えられた。後期可能期において発現上昇した遺伝子では、切断後の早い時期（切断5～15時間）に一過的な発現上昇が見られたが、不応期において発現上昇する遺伝子では、比較的遅い時期（切断15時間後以降）に慢性的な発現上昇が見られた。前期可能期においては有意な発現変動が観察されないか、発現量が検出限界以下であった。不応期における遅延性の免疫応答は前期・後期可能期では見られなかったことから、私は不応期では慢性的な免疫応答が起きており、これが再生を阻害している可能性を考えた。そこで、尾を切断した不応期の幼生を4種類の免疫応答抑制剤（NF- κ B経路阻害剤 Celastrol・IKK inhibitor VII、NF-AT経路阻害剤 FK506・cyclosporin A）で処理したところ、いずれにおいても再生能は顕著に回復した（図3）。FK506については、ツメガエル幼生においても実際に免疫応答を抑制することを確認した（図4）。さらに、哺乳類において単球/マクロファージ、好中球、B細胞、T細胞の正常な発生に必要であることが示されている転写因子 PU.1の *Xenopus* ホモログについて、2種類のアンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)による翻訳阻害を試みたところ、両者において不応期における再生能は対照群に対し有意に回復することが分かった（図5）。このMOの顕微注入は不応期である Stage 46において機能的な白血球を減少させることが、汎白血球マーカー *cd45* の発現解析（図6）から確認された。これらことから、不応期には再生に阻害的に働く免疫応答が起きていることが強く示唆された。以上の結果は、ツメガエル幼生尾では損傷に対する免疫応答の違いが発生ステージ依存の再生能を規定する一因となっていることを示している。

一方、不応期から後期可能期に发育段階が進むと再び再生能が獲得されることから、私は後期可能期では不応期で起きている免疫応答を抑制する仕組みが存在する可能性を考えた。哺乳類では、T細胞の中には様々な免疫細胞の活性を抑制する「制御性T細胞」が存在し、そのマーカー遺伝子として FoxP3 が同定されている。そこでツメガエルにおいて未同定であった *foxp3* をクローニングし、前期/後期可能期と不応期における尾切断後の発現量の変動を比較したところ、後期可能期では不応期より著しい一過的な発現上昇が見られた（図7A）。また、後期可能期では創傷部位に *foxp3* 陽性の血球様細胞の存在が認められた（図7B）。このことから、後期可能期では傷口に制御性T細胞が浸潤し、再生に阻害的に働く過剰な免疫応答を抑制している可能性が考えられた。

本研究は、器官再生能への免疫応答の関与を初めて直接的に示すものである。本研究は、発生ステージに依存した再生能の違いのみならず、器官再生の分子機構の最初期過程の理解にも大きく貢献するものと期待している。

遺伝子名	機能	発現細胞 (哺乳類)
<i>cathelicidin like</i>	抗菌ペプチド	創傷上皮、好中球
<i>CXC chemokine receptor 2 (CXCR2)</i>	発現細胞の走化性に関与	創傷上皮、好中球、単球
<i>Ras and Rab interactor 3 (RIN3)</i>	エンドサイトーシスに関与	単球、ナチュラルキラー細胞
EST (2種)	一塩基置換が多く非翻訳 RNA の可能性	
unknown	185 アミノ酸をコードする新規遺伝子	

表 1 Differential display 法により得られた再生可能期と不応期とで発現パターンの異なる遺伝子

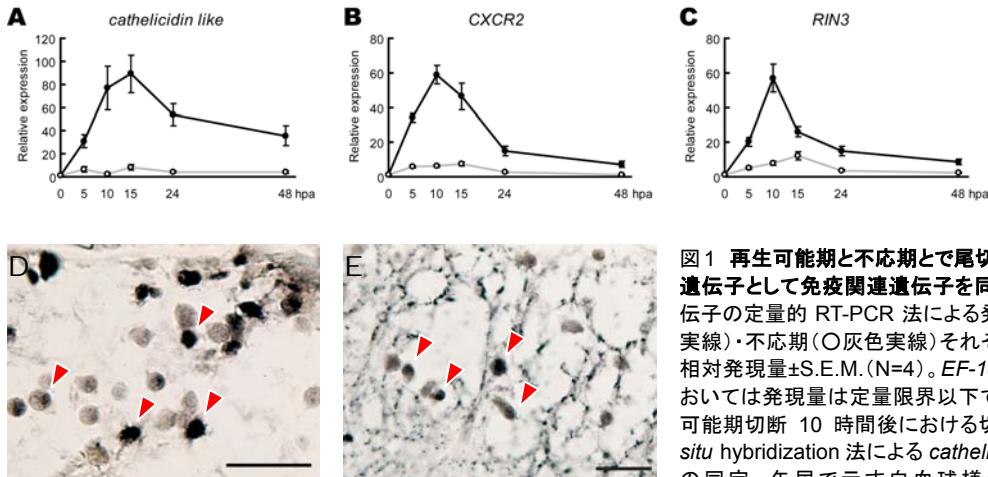


図 1 再生可能期と不応期とで尾切断時の発現変動パターン異なる遺伝子として免疫関連遺伝子を同定。(A-C)(表1)のうち免疫関連遺伝子の定量的 RT-PCR 法による発現変動の比較。後期可能期(●黒実線)・不応期(○灰色実線)それぞれの切断直後の発現量を1とした相対発現量±S.E.M.(N=4)。EF-1 α の発現量で補正。前期可能期においては発現量は定量限界以下であった(データは示さない)。(D,E)可能期切断 10 時間後における切断面付近の組織切片を用いた *in situ* hybridization 法による *cathelicidin like*(D)、*CXCR2*(E)発現細胞の同定。矢印で示す白血球様の球形の細胞で発現していた。Bar=30 μ m

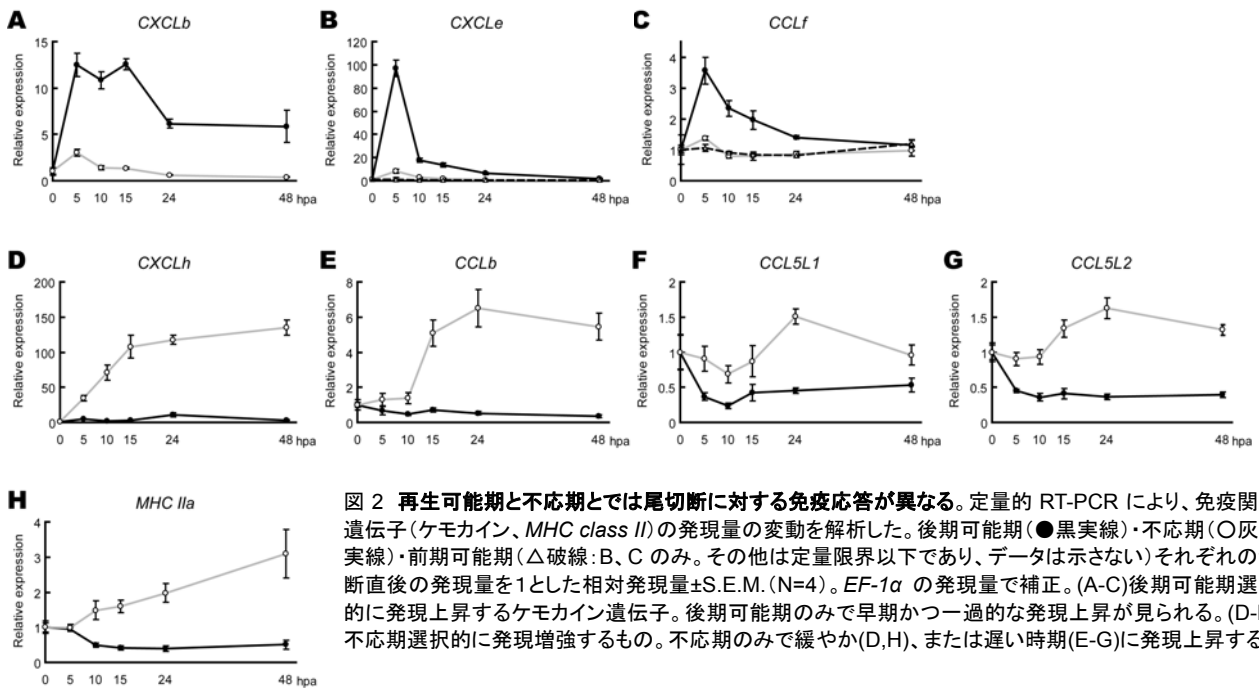


図 2 再生可能期と不応期とでは尾切断に対する免疫応答が異なる。定量的 RT-PCR により、免疫関連遺伝子(ケモカイン、*MHC class II*)の発現量の変動を解析した。後期可能期(●黒実線)・不応期(○灰色実線)・前期可能期(Δ 破線:B、Cのみ。その他は定量限界以下であり、データは示さない)それぞれの切断直後の発現量を1とした相対発現量±S.E.M.(N=4)。EF-1 α の発現量で補正。(A-C)後期可能期選択的に発現上昇するケモカイン遺伝子。後期可能期のみで早期かつ一過的な発現上昇が見られる。(D-H)不応期選択的に発現増強するもの。不応期のみで緩やか(D,H)、または遅い時期(E-G)に発現上昇する。

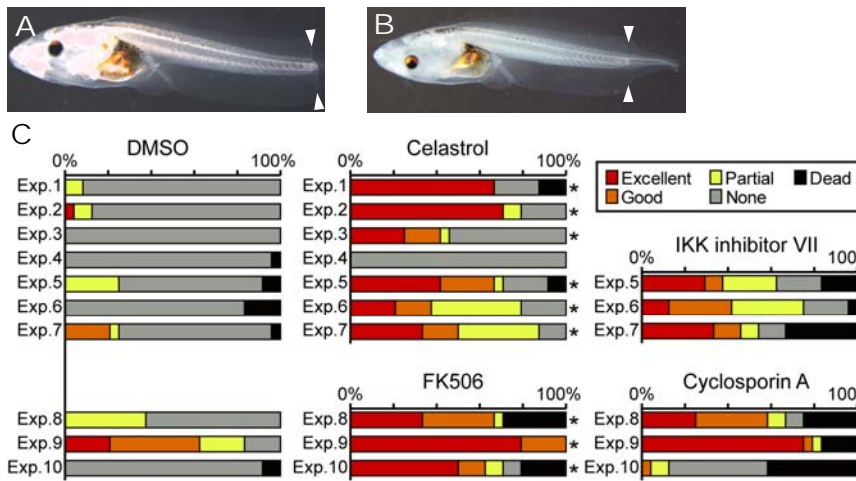


図3 免疫応答の抑制により再生不応期の再生能は回復する。(A,B)再生不応期幼生の尾を切断後 DMSO(A)、Celestrol(NF- κ B 経路阻害剤)処理(B)し、1週間後の個体。矢尻は切断位置。(C)各種免疫応答阻害剤処理の不応期での再生能への影響。不応期24個体について、NF- κ B 経路阻害剤(Celestrol,IKK inhibitor VII)、NF-AT 経路阻害剤(FK506,cyclosporine A)処理1週間後の幼生の再生の程度を示す。■ヒレ・筋肉・脊索・脊髄を含む再生尾を形成、■前者(■)に準ずるが再生尾が短い、■一部組織を欠くか軸が歪んでいる、■全く再生尾を形成しない、■死亡。* $p < 0.003$ (DMSO 処理群との χ^2 検定)。

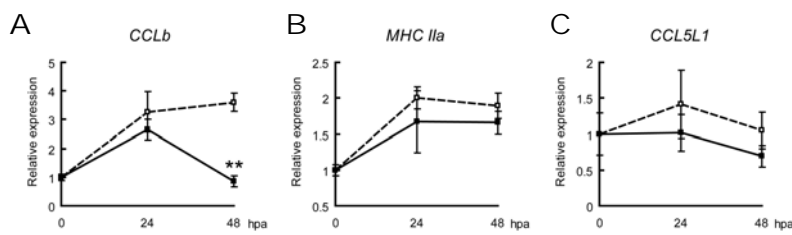


図4 FK506 はツメガエル幼生においても免疫応答を抑制する。(A-C)再生不応期の個体を尾切断後 FK506 処理(■実線)ないし DMSO 処理(□破線)した際の、再生不応期選択的ケモカイン遺伝子・MHC class IIa 遺伝子の発現量変動を定量的 RT-PCR により解析した。それぞれの切断直後の発現量を1とした相対発現量 \pm S.E.M. (N=4) で表す。EF-1 α の発現量で補正。** $p < 0.001$ (t 検定)。

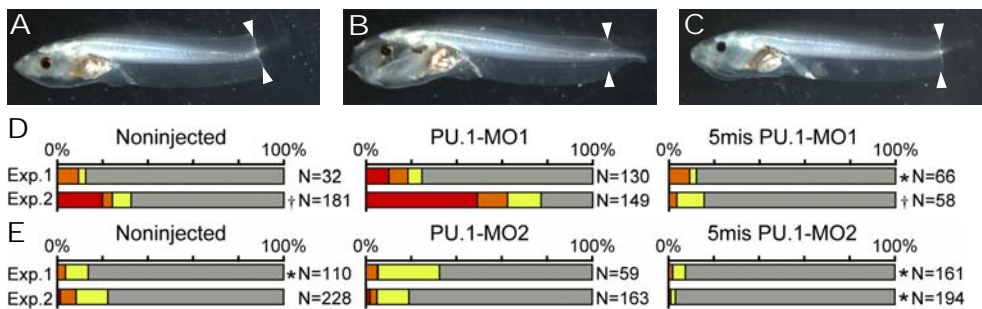


図5 転写因子 PU.1 のモルフォオリゴによるノックダウンにおいても再生不応期の再生能は回復する。(A,B,C)受精卵に PU.1 に対するモルフォオリゴ(PU.1-MO1)を注入した群(B)、5塩基ミスマッチ置換を導入した PU.1-MO1(5mis PU.1-MO1)を注入した対照群(C)、ないしは何も注入していない対照群(A)を不応期まで育て尾切断、一週間後。2回目の実験においてそれぞれの群で最も出現頻度の高い表現型を示した個体を例示。(D)注入しない/PU.1-MO1/5mis PU.1-MO1 注入各群の尾切断1週間後の再生の程度。再生程度評価は図3に準ずる。(E)PU.1 の別領域を標的とした PU.1-MO2/5mis PU.1-MO2 を用いた実験。他の条件は(D)に準ずる。* $p < 0.05$, $\dagger p < 10^{-12}$ (実験群と対照群間での χ^2 検定)。

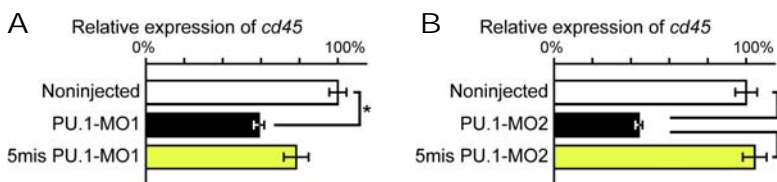


図6 MO 注入は不応期における機能的な白血球を減少させる。(A,B)MO を注入後ステージ46(不応期)まで飼育し汎白血球マーカーである cd45 の個体全体での発現量を qRT-PCR により解析した。MO 無注入群の発現量を100%とした相対発現量 \pm S.E.M. (N=3-4) で表す。EF-1 α の発現量で補正。* $p < 0.01$ (t 検定)

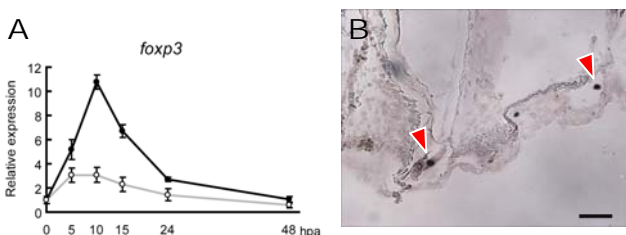


図7 foxp3 は後期可能期選択的に発現上昇する。(A)新規に同定した *X. laevis* foxp3 遺伝子の定量的 RT-PCR 法による発現変動の比較。後期可能期(●黒実線)・不応期(○灰色実線)それぞれの切断直後の発現量を1とした相対発現量 \pm S.E.M. (N=4)。EF-1 α の発現量で補正。前期可能期においては発現量は定量限界以下であった(データは示さない)。(B)後期可能期尾切断10時間後における切断面付近切片を用いた foxp3 in situ hybridization 像。矢尻は foxp3 陽性白血球様細胞を示す。Bar=50 μ m