

論文審査の結果の要旨

氏名 深澤 太郎

失われた器官や付属肢を再形成する「再生」は多くの動物種で観察されるが、その程度（再生能）は動物種や器官、発生ステージにより異なる。例えば、無尾両生類の幼生（オタマジャクシ）の尾を切断すると、表皮・血管・筋肉だけでなく脊索・脊髄を含む構造が再生されるが、成体（カエル）の四肢を切断した場合には十分な再生は起きない。また、哺乳類では肝臓を除き高度な再生能をもつ器官は報告されていない。再生機構の解明は、基礎生物学のみならず応用医学の観点からも重要な研究課題であるが多様な再生能の理由、つまり再生能を規定する要因については、長い間、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こと（「再生不応期」：stage 45～47）が報告された。ツメガエル幼生は、不応期以前(stage ~ 42：「前期可能期」)と、以降のステージ (stage 49～：「後期可能期」) では尾を切断しても再生するが、不応期では尾の切断面を上皮が覆う（傷が治癒する）だけで尾は再生しない。論文提出者は修士課程において、ツメガエル幼生の不応期と後期可能期で、尾で切断後の発現パターンが異なる遺伝子を探索し、40種類の候補遺伝子を得た。博士課程ではこれら遺伝子の解析から前期・後期可能期と不応期で異なる免疫応答が起きていることを示し、さらに免疫応答を人為的に抑制することで不応期の再生能を賦活化できることを示した。本論文は2章立てで構成されており、第1章では前期・後期可能期と不応期での免疫応答の相違を調べている。

第1章では、先ず40種類の候補遺伝子の内、6種類について実際に発現変動することを確認した。相同性検索の結果、この内、既知遺伝子と相同性をもつ3種類の遺伝子は全て免疫関連遺伝子であった。そこ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で発現量を比較したところ、異なる発現変動パターンを示す遺伝子が多数見いだされた。このことから、前期・後期可能期と不応期とでは切断後の尾で異なる免疫応答が起きると考えられた。特に、後期可能期で発現上昇する遺伝子は、切断後早い時期（切断5～15時間）に一過的に発現上昇したが、不応期で発現上昇する遺伝子は、何れも比較的遅い時期（切断15時間後以降）に慢性的に発現上昇した。一方、前期可能期で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。このように、不応期で見られた遅延性の免疫応答は前期・後期可能期には見られなかったことから、不応期では慢性的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が考えられた。

第2章では、不応期で免疫抑制することで人為的に再生能が賦活化できるか調べている。先ず、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：FK-506・cyclosporin A）で処理したところ、いずれの場合でも再生能は顕著に回復した。さらに、単球/マクロファージ、好中球、B細胞、T

細胞の発生に必要な哺乳類の転写因子 PU.1 の *Xenopus* ホモログについて、アンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) による翻訳阻害を行ったところ、不応期の幼生尾の再生能は有意に回復することが分かった。以上の結果は、不応期では再生を阻害するような免疫応答が起きており、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であることを強く示唆している。

一方、不応期から後期可能期に発育が進むと再生能が再び獲得されることから、後期可能期では不応期で起きる免疫応答を抑制する仕組みが存在すると期待された。哺乳類では、様々な免疫細胞の活性を抑制する「制御性 T 細胞」のマーカー遺伝子として *foxp3* が同定されている。そこでツメガエルから *foxp3* を新たにクローニングし、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、創傷部位に *foxp3* 陽性の血球様細胞が認められた。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する可能性が考えられた。

以上、本研究では器官再生能への免疫応答の関与を初めて直接的に示した。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、再生の最初期過程の分子機構の理解にも大きく貢献すると期待される。なお、本論文の研究は直良悠子・國枝武和・久保健雄との共同研究であるが論文提出者が主体となって実験を計画し、遂行したもので、論文提出者の寄与が十分であると判断できる。従って、博士 (理学) の学位を授与できると認める。