

論文の内容の要旨

論文題目

Study of immune responses that impair the tail regenerative ability of *Xenopus laevis* tadpoles during the refractory period

(アフリカツメガエル幼生の再生不応期に尾再生能を阻害する免疫応答に関する研究)

氏名 直良 悠子

器官再生能は様々な動物に見られるが、その程度は動物種や発生段階、器官の種類により異なる。しかしなぜ、こうした再生能に違いがあるのかに関しては不明な点が多い。私が研究対象としたアフリカツメガエル（無尾両生類）は幼生（オタマジャクシ）期に尾や肢の再生能をもつ。通常、幼生尾を切断すると約1週間で元通りの尾が再生されるが、発生過程において、再生能力が一過的に失われる時期（再生不応期）があることが近年報告された（図1A-C）（Beck *et al.*, 2003）。先行研究により、再生不応期と可能期では、尾切断端で異なるサイトカイン遺伝子が発現すること、また不応期の個体を免疫抑制剤（FK506 など）処理すると再生能が回復することが見いだされた（図1D, E）。さらに私は、修士課程の研究で、不応期に様々な免疫関連遺伝子が発現し始めることを見出した。一方、免疫細胞の働きを抑える制御性 T 細胞のマーカー遺伝子は不応期が終わってから発現する。以上の知見は、ツメガエル幼生尾では免疫応答が再生能を規定する一要因となることを示している。すなわち不応期では、免疫細胞が再生芽の増殖細胞を「非自己」と認識して排除するため、再生能が阻害される可能性がある（Fukazawa *et al.*, 2009）。しかしながら、具体的に再生芽細胞を攻撃する免疫細胞の種類や、それが標的とする「非自己」分子など、再生能を規定する免疫応

答に関する分子機構は明らかではない。そこで本研究では、この分子機構を解明することを目的とした。

再生能を規定する免疫応答に関する分子を探索する上で、私は、再生能の有無に連動して幼生の尾切断端で発現変動する新規遺伝子に着目し、これら遺伝子を **Differential Display (DD)** 法を用いて網羅的に探索することとした。探索にあたり、まず、不応期の尾切断 24 時間後の **FK506** 処理群（再生能あり）と無処理群（**DMSO** 群、再生能なし）を用意した（図 2）。これにより、同一の発生ステージでありながら再生能に違いのある個体群を創り出すことができ、単に不応期と可能期を比較するだけでは避けられなかった、発生段階に依存して発現変動する遺伝子を検出する可能性を回避した。さらに **FK506** 処理自体による遺伝子発現変化（薬物の副作用など）を検出する可能性を回避するため、可能期の尾切断 24 時間後の **FK506** 処理群と無処理群も解析に供した（図 2）。また尾切断により発現変動する遺伝子候補を得るため、不応期と可能期で尾切断直後の個体群も解析に供した。

探索の結果、3 種の候補遺伝子断片（クローン#1, 2, 3）を得た（表 1）。クローン#1 は **phytanoyl-CoA dioxygenase** 遺伝子に相同性を示す遺伝子で、不応期の尾切断後 24 時間（再生能なし）でのみ発現上昇した。クローン#2 はデータベース未登録の新規遺伝子で、クローン#1 同様に、不応期の尾切断後 24 時間（再生能なし）でのみ発現上昇した。クローン#3 は **C-type lectin** 様配列を含み、不応期の尾切断後 24 時間 **FK506** 処理（再生能あり）でのみ発現上昇した。

得られた候補遺伝子について、(A) 発生過程、(B) 不応期尾切断後 **FK506** 処理／無処理下での発現パターンを定量的 **RT-PCR** 法を用いて解析した。クローン#1 は発生段階では不応期選択的に発現した（図 3A）。また不応期の尾切断後にも一過的に発現上昇し、この発現上昇は **FK506** 処理により抑制された（図 3B）。さらに、不応期個体の組織ごとの発現量を比較すると、免疫細胞を多く含む血球分画において有意に高い発現が検出された（図 4）。これらの結果は、クローン#1 が不応期選択的に出現する一方で、尾切断端では一過的に出現し再生能に対して阻害的に働く免疫関連因子をコードする可能性を示唆している。次に機能解析のため、2 細胞期胚にモルフォリノアンチセンスオリゴ (**MO**) を顕微注入し、遺伝子ノックダウンを行ったところ、**MO** 注入群では対照 (**5mis-pair MO** 注入と無処理) 群とは異なり、発生過程でそのほとんどが死亡した（図 5）。このことは、クローン#1 が発生過程でも重要な働きをもつことを示唆している。こうした因子の候補として、不応期に再生芽細胞を攻撃する免疫細胞で発現、機能する因子が考えられる。クローン#1 のノックダウン個体では初期発生過程で十分な量の免疫細胞が確保できず、生体防御機構が破綻することにより生存率が低下した可能性がある。

クローン#2 は発生過程では顕著な発現変動は検出されなかったが、不応期の尾切断後では FK506 無処理群（再生能なし）で発現上昇した。クローン#2 は、決定した塩基配列が既知の遺伝子配列に相同性を示さず、さらに、配列内に明らかな ORF も見出されないことから、尾切断後に免疫細胞が標的に対して応答する際に遺伝子発現調節などに機能する機能性 RNA（non-coding RNA）をコードする可能性があると考えている。

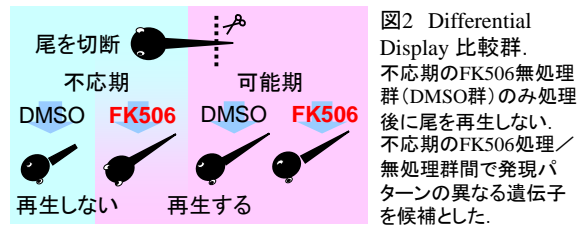
クローン#3 は発生段階ではクローン#1 と同様に、発生初期にはほとんど発現しないものの、不応期で発現増強した（図 3A）。また DD 法の結果とは異なり、定量的 RT-PCR 法の結果では、不応期の尾切断後 48 時間にかけて、FK506 処理、無処理のいずれでも緩やかに発現上昇した（図 3B）。不応期では自己反応性の免疫細胞が体内を巡ると考えられ、これにより傷害された一部の組織が恒常的に再構築されていると予想される。また、尾切断後も一部の組織の再構築が起きる。したがって、クローン#3 は組織の再構築に関わる因子である可能性がある。

以上の知見から、再生不応期で尾切断後に生じる分子機構として次のようなモデルを考えている。オタマジャクシの尾を切断すると、切断端では破壊された組織の再構成と再生芽での細胞増殖が起きる。クローン#3（C-type lectin）はこの破壊された組織の再構成に関わる可能性がある。しかしながら不応期では、クローン#1 を発現するような自己反応性の免疫細胞が、クローン#2（non-coding RNA）などによる遺伝子発現調節を受けて再生芽の増殖細胞を「非自己」と認識し、攻撃する。したがって再生が阻害される、というものである（図 6）。

本研究は免疫応答と再生能との関連の分子基盤を解析した最初の研究である。特にクローン#1 は、再生芽の増殖細胞を「非自己」として攻撃する免疫細胞そのもので発現している可能性があり、再生を阻害する免疫応答の実態を解明する上で非常に重要な鍵となる可能性がある。今後、本研究で明らかとなった分子基盤を、再生能の異なる他種の生物においても解析することで、再生能の規定要因の解明や、延いては再生能の賦活化などへと応用されることが期待される。



図1. アフリカツメガエルの尾再生能力
A.アフリカツメガエル発生過程と再生能の変化. B,C.再生可能期(B), 不応期(C)に尾を切断した幼生. D,E.不応期に切断し, FK506処理した尾(D)と対照(E). B-Eは切断後1週間. 矢じりは切断端を示す. Scale bar=2mm



#	定量結果				断片長	
	0hpa	24hpa		0hpa		24hpa
		DMSO	FK506	DMSO	FK506	
1	□	■	□	□	□	194 bp
2	□	■	□	□	□	236 bp
3	□	■	□	□	□	491 bp

表1. DD法で得られた候補遺伝子断片の発現パターン模式図
DD法では, 不応期の尾切断直後(0 hours post amputation, hpa), 尾切断後24時間FK506無処理(DMSO) / 処理と, 可能期の0 hpa, 尾切断後24時間FK506無処理(DMSO) / 処理の6群間で発現パターンを比較した. 表では, 得られた候補の定量結果を模式的に表した. 白マスは発現が低いことを, 黒マスは発現が高いことを示す.

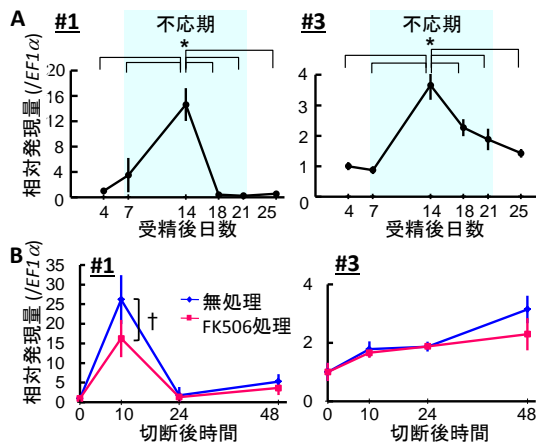


図3. 候補遺伝子断片の発現解析
(A)発生過程における全身での発現変動. (B)不応期尾切断後のFK506処理/無処理下における尾切断端での発現変動. *: $P < 0.01$, Tukey-Kramer method. †: $P < 0.05$, student's t -test. (mean \pm SEM, $n = 4$) 発現量は $EF1\alpha$ の発現量により補正し, 1日目(A), 0時間後(B)の発現量を1とした相対発現量で示した.

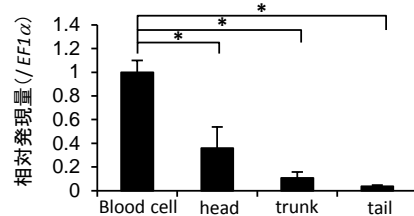


図4. #1の組織ごとの発現量
不応期幼生の血球分画および頭部, 胸部, 尾部間で遺伝子発現量を比較した. *: $P < 0.01$, Dunnett's test. (mean \pm SEM, $n = 4$) 発現量は $EF1\alpha$ の発現量により補正し, 血球分画の発現量を1とした相対発現量で示した.

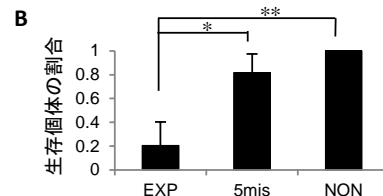
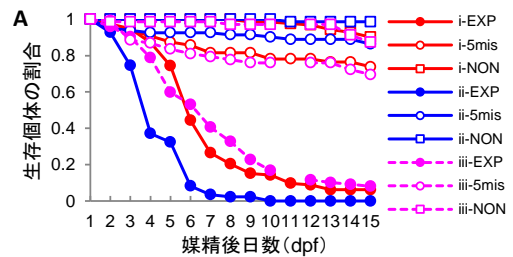


図5. #1MO注入胚の生存割合
(A) MO注入後15日目までの生存個体の割合の変化. i, ii, iiiは試行の回数を表す. EXP: #1に対するMO, 5mis: 5mis-pair control, NON: uninjected (B) 媒精後8日目(不応期開始期)における生存個体の割合. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Dunnett's test.

