

イモリの筋線維再生の基本原理を解明 ～変態と成長が脱分化の封印を解く～

イモリには、一生を通じて肢を再生する能力が備わっています。例えば肢の筋に着目すると、アカハライモリの幼生は、筋幹細胞や筋前駆細胞が再生部の新たな筋を創り出します。一方、変態して成長したアカハライモリでは、切断した肢の多核筋細胞（筋線維）の一部が単核の細胞となって本体の筋線維から分離（この現象を「脱分化」と呼びます）、移動、増殖して再生肢の新たな筋を創り出します。

しかし、変態と成長のいずれが筋線維の脱分化に不可欠な要因なのかは明らかにされていません。

筑波大学生命環境系 千葉 親文 教授、国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学アイソトープ総合センター 竹島 一仁 准教授（研究当時）らの研究グループは、イモリの変態と成長を人為的にコントロールした条件下で、肢再生過程における筋線維の挙動を追跡しました。その結果、筋線維の脱分化には、体の変態と成長の組み合わせが必要であることが明らかになりました。さらに、変態前の幼生の筋を体外に取り出し、筋線維の挙動を培養下で追跡したところ、変態前の筋線維にも脱分化能力があることが分かりました。

これらの結果は、イモリの筋線維が生来、脱分化能力を持っていること、しかしその能力が発揮されるためには体の変態と成長の両方が必要であることを示しています。

本研究成果は、イモリが持つ高度な脱分化能力の基本原理を解明し、将来の再生医療への応用に向けた技術開発に貢献するものと期待されます。

研究代表者

筑波大学生命環境系

千葉 親文 教授

名古屋大学アイソトープ総合センター

竹島 一仁 准教授（研究当時）

研究の背景

ヒトを含む四肢動物（4本足の脊椎動物）は一般に、水生期^{注1}（両生類では幼生期、爬虫類や鳥類では胚期、哺乳類では胎児期）には高い再生能力を持ち、体のさまざまな部位を再生できますが、陸生期（両生類では変態後、爬虫類や鳥類では孵化後、哺乳類では出生後のライフステージ）になると、再生能力を低下させるか完全に失ってしまいます。一方、有尾両生類のイモリは例外的に、一生を通じて体のさまざまな部位を何度でも繰り返し再生できるという特徴があります。

なぜイモリだけが、陸生期でも高い再生能力を維持できるのか。これは、2世紀に渡る生物学の謎であるばかりではありません。イモリの再生原理を、再生能力が低下した出生後のヒトの再生医療に適用するにあたって、必ず解かなければならない問題でもあります。

本研究チームはこれまで、アカハライモリ（*Cynops pyrrhogaster*）の水生期と陸生期の肢再生過程を筋に着目して比較しました（Tanaka et al., Nature Communications 7: 11069, 2016）。その結果、幼生イモリの肢再生過程では、他の両生類の幼生と同様に筋幹細胞／筋前駆細胞^{注2}が再生部の新たな筋を創り出すことを明らかにしました。一方、成体イモリの肢再生過程では、成熟した多核の筋細胞（筋線維）が脱分化^{注3}し、移動、増殖して新たな筋を創り出すことを明らかにしました。

これによりイモリは、陸生期に減退した幹細胞の働きを脱分化で補うことで、成体での肢再生を可能にしていると考えられます。しかし、幹細胞モードから脱分化モードへの切替えが、発生のどの過程によって制御されているのかについては明らかではありませんでした。

研究内容と成果

研究チームはまず、アカハライモリの受精卵に遺伝子を導入する独自技術とゲノム編集技術を適用し、再生中の肢の内部でも筋線維や脱分化細胞の挙動が蛍光標識でライブ観察できるアルビノ^{注4}のアカハライモリを作成しました（図1）。そして、これらのイモリを用いて、発生段階と脱分化との関係を調べました。

アカハライモリの幼生の指は親指と人差し指から先に再生しますが、変態した個体（幼体）では4本の指がほぼ同時に再生するようになります（図2）。両生類にとって変態は、陸地環境に適応するために体をダイナミックにつくり替える発生イベントですが、肢再生時の手指の形態形成様式も水生型から陸生型に切り換わることはたいへん興味深い現象です。

このため研究チームは、変態こそが筋線維に脱分化能力を付与する要因ではないかと予想しました。そこで、アルビノの幼生（齢：2-3ヶ月、全長：約3cm）と幼体（齢：5-6ヶ月、全長：約3-4cm）それぞれの前腕を、その中央で切断し、再生過程における筋線維の動態を観察しました。ところが、いずれの発生段階でも筋線維の脱分化は観察されませんでした。そこで研究チームは、イモリを変態後もそのまま成長させ、どの段階に達すると脱分化が観察されるようになるのか調べました。その結果、イモリが標準的な成体の約半分のサイズ（齢：約13ヶ月、全長：約6cm）に達すると、すべての個体が脱分化を示すようになることを見出しました（図2）。この段階のアカハライモリは性成熟直前で、研究チームは「前青年期」と呼ぶことにしました。

以上の結果から、イモリの筋線維が脱分化を示すには、イモリ自体が前青年期に達する必要があることが明らかになりました。しかし、その条件が、前青年期までの期間すなわち加齢（aging）なのか、あるいは体の成長なのかは明らかではありませんでした。

そこで研究チームは次に、アルビノの幼体（全長：約3cm）を低温下（12°C）で飼育し、体の成長を遅らせる実験を行いました。幼体を150日飼育すると個体の年齢は約12ヶ月とほぼ前青年期に達しますが、全長はいまだ約3.5cmで、ほぼ元の幼生のままでした。この個体を用いて筋線維の追跡を行いました。

たが、脱分化は観察されませんでした。しかし、同じ個体を前青年期に相当するサイズまで成長させると、脱分化が観察されるようになりました。以上から、筋線維が脱分化を介して肢再生に貢献できるようになるには、全長が6 cmになるまで体が成長する必要があることが判明しました。

では、筋線維の脱分化に変態は必要ないのでしょうか。体の成長だけで十分なのでしょうか。

研究チームはこの疑問に答えるために、イモリの変態抑制実験を行いました。アカハライモリの場合、幼生を1リットル当たり0.2 gのチオ尿素（甲状腺ホルモンの合成阻害剤）を含む水で飼育すると、幼生形態のまま成長します（図3）。そこで、アカハライモリの幼生を前青年期に相当する年齢と大きさ（齢：約13ヶ月、全長：約6 cm；巨大幼生と呼ぶ）まで育て、それらの肢再生を調べました。その結果、手指の形態形成様式は水生型のままで、筋線維の脱分化は観察されませんでした。このことは、体の成長だけでは筋線維の脱分化に不十分であることを示しています。

研究チームは次に、巨大幼生を、チオ尿素を含まない普通の水に戻して変態させ、それらの肢再生を調べました。その結果、手指の形態形成様式は予想通り陸生型に転換し、筋線維の脱分化も観察されるようになりました（図3）。研究チームは、これらの結果と通常発生における観察結果を総合し、筋線維が脱分化によって肢再生に貢献するようになるには、体の変態と成長（全長6 cmまで）という二つの要因の組み合わせが必要であると結論づけました。

では、筋線維はどのような仕組みで脱分化能力を獲得するのでしょうか。筋線維は変態により脱分化能力を獲得するが、実はその能力は、細胞を取り巻く環境（細胞外環境）により前青年期まで抑制されているだけなのかも知れません。この可能性を検証するため、研究チームは次に、変態前の幼生の前肢から筋組織を取り出し、筋線維に対する甲状腺ホルモン（チロキシンの活性体：T3）の効果を培養条件下で調べました。その結果、予想に反して、T3がなくても、筋線維が脱分化することが明らかになりました（図4）。具体的には、筋線維に由来する多数の単核細胞が筋組織から遊走する様子や、まれではありますが筋線維がサルコメア構造（収縮に関わる細胞内の構造）を失いつつ形態を変化させ、単核細胞となる様子が観察できました。培養条件を変えるとこれらの細胞が増殖することも明らかになりました。これらの結果から、アカハライモリの筋線維は、変態やその後の成長とは無関係に元々、脱分化能力を保持していると考えられます。なお、本研究により、筋線維から単核細胞が生じる様子が初めて報告されました。

本研究により、イモリの筋線維が生来、脱分化能力を持っていることが明らかになりました。また、その潜在能力は抑制されており、変態と成長によって体が前青年期に達すると抑制から解放されることが明らかになりました。このことは、肢再生における筋創出のメカニズムが、前青年期を境に、幹細胞モードから脱分化モードに切り替わることを意味しています。幼生の体内環境では、筋幹細胞／筋前駆細胞が肢再生のために積極的に活動することが許されていますが、筋線維の脱分化能力は制限されていると考えられます。一方、体が変態して前青年期まで成長すると、変化した細胞外環境が筋幹細胞／筋前駆細胞の働きを制限する一方で、筋線維の脱分化能力を解放すると考えられます（図5）。今後は、筋幹細胞／筋前駆細胞の働きと筋線維の脱分化を制御する細胞外因子について調査する必要があります。

今後の展開

脱分化とは、いったん分化した細胞が分化形質を失い、再び未分化な状態に戻ることを意味します。脱分化自体はヒトでも見られますが、筋線維のように未分化性を失い、ある生理機能のために高度に特殊化した体細胞が外傷部の再生のために脱分化する例は、イモリ以外の四肢動物では確認されていません。本研究成果は、イモリに匹敵する高度な脱分化が他の四肢動物で確認できない原因が、細胞自体の性能の違いなのか、それとも他の四肢動物の細胞にも脱分化能力は潜在しているが、生涯にわたって抑制されているためなのかという、根源的な問題を提起します。研究チームは今後、イモリの筋培養系を改良し、細胞

内外のどのような因子が筋線維の脱分化能力を規定しているか明らかにしていく計画です。また、筋線維由来の脱分化細胞と筋幹細胞／筋前駆細胞を同時に追跡する実験系を構築し、これら 2 種類の筋形成細胞がどのように協力し合いながら肢の再生にコミットしていくのか、それらの性質と発生段階における活性制御メカニズムの詳細を明らかにしていきます。

参考図

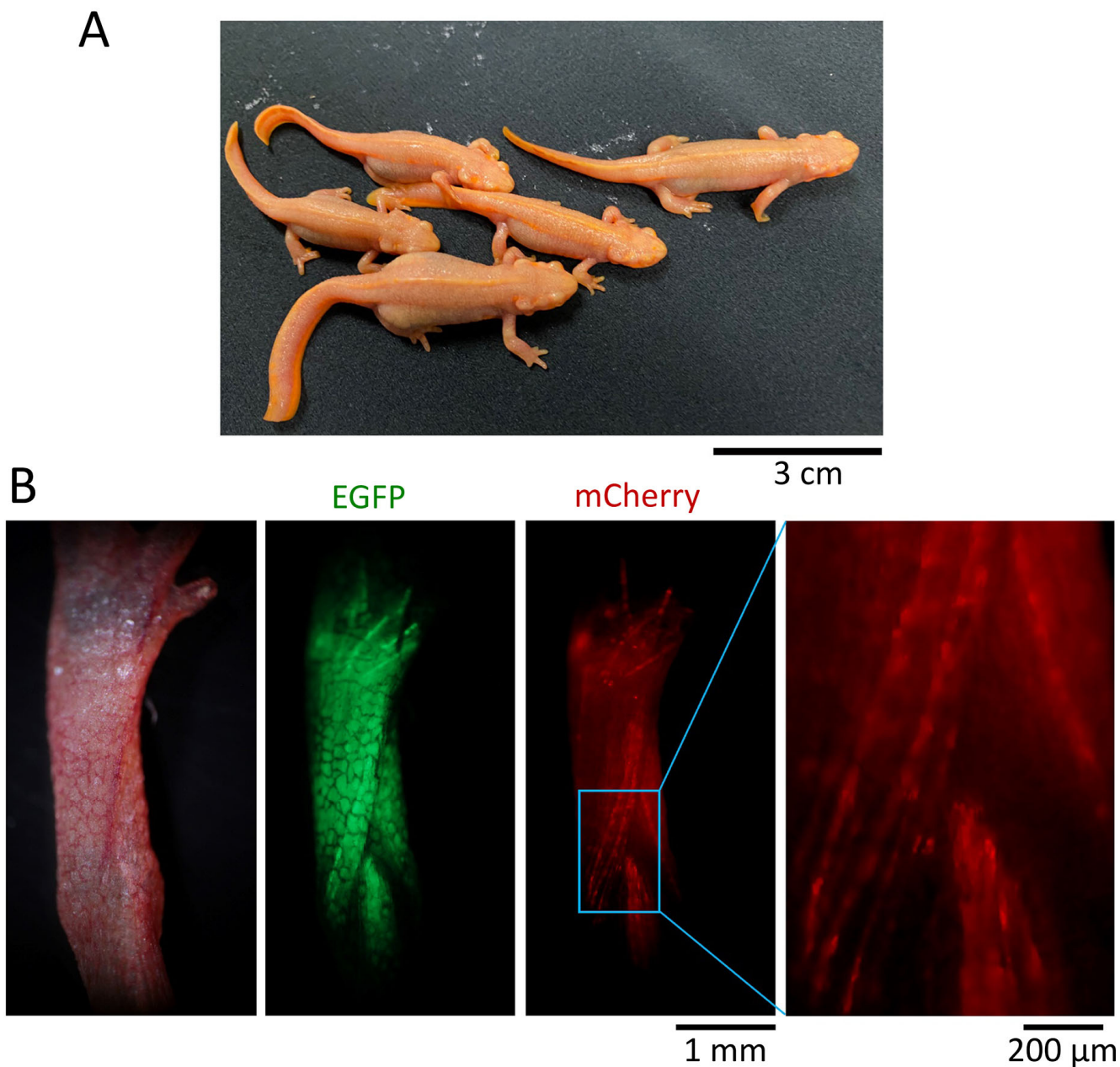


図1 筋追跡用アカハライモリ

A. ゲノム編集と遺伝子導入により作出された筋追跡用のアルビノイモリ。B. アルビノ幼体の前肢。筋線維の核が赤い蛍光タンパク質 mCherry でラベルされます。

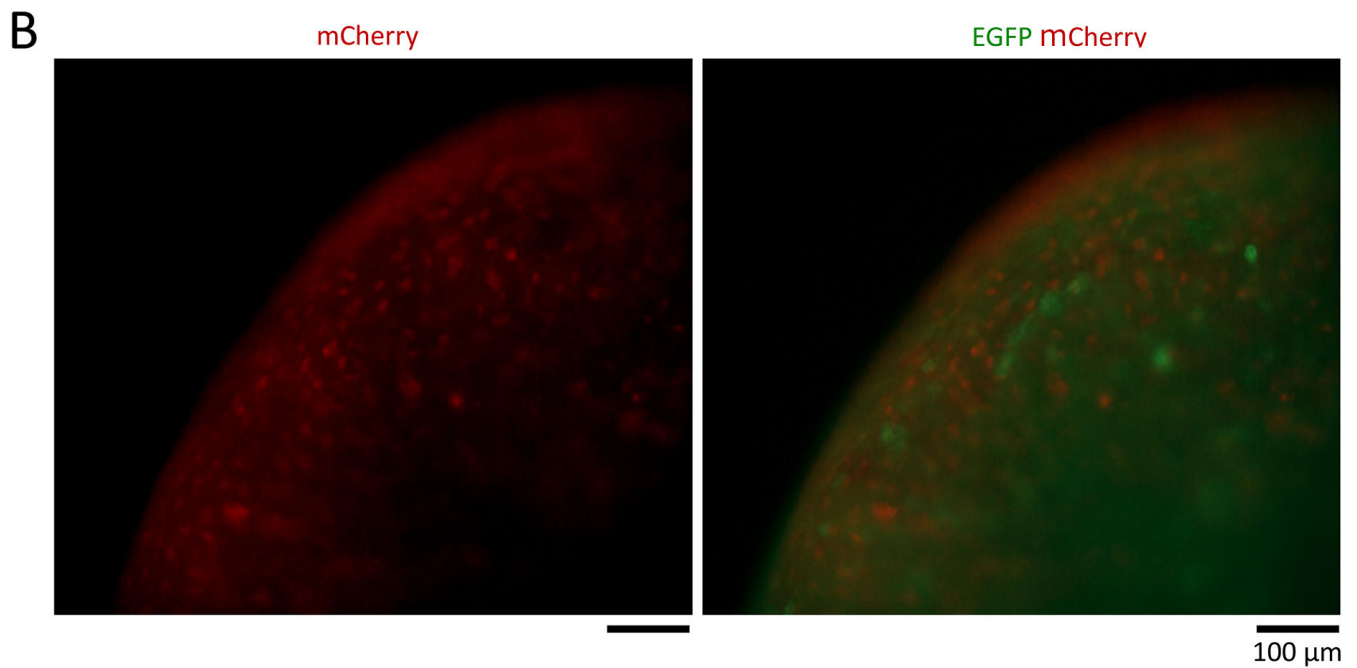
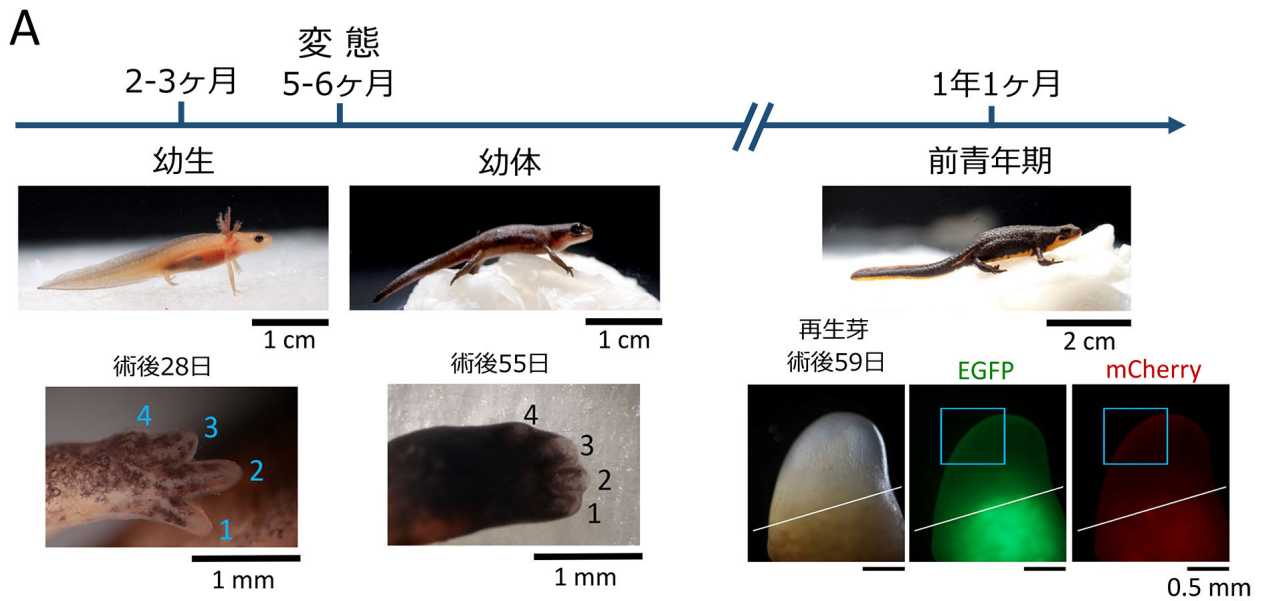


図2 前青年期における筋線維の脱分化

A. イモリの正常な発生過程。下段は再生した前肢の手指および前青年期アルビノイモリの再生芽を示します。B. 前青年期の再生芽（Aの四角）の拡大。mCherryの赤い蛍光が脱分化細胞の核を示します。

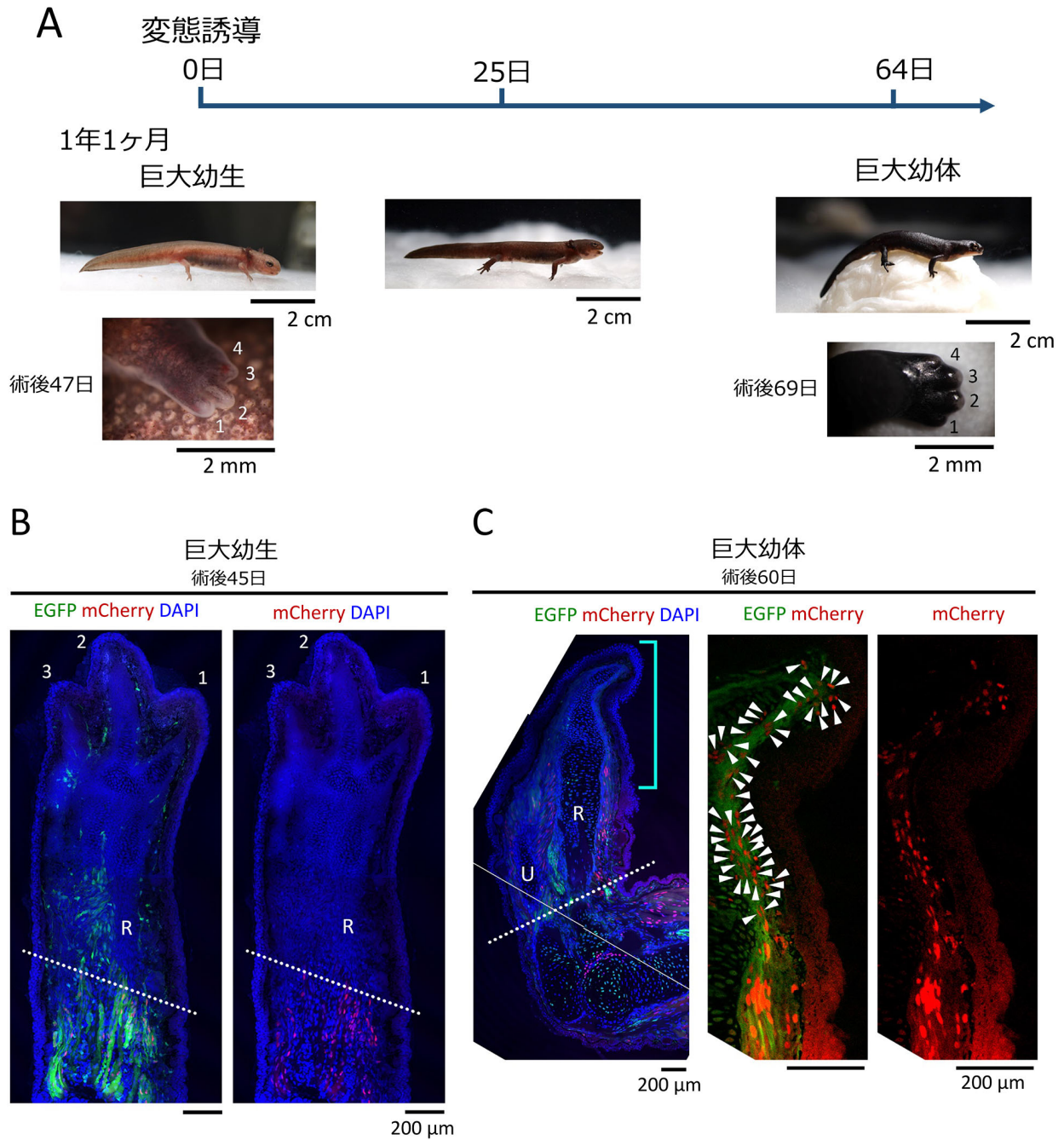


図3 変態抑制個体（巨大幼生）および変態抑制解除後の個体（巨大幼体）における筋線維の追跡

A. 巨大幼生イモリの変態過程。下段は再生した前肢の手指を示します。B. 巨大幼生の再生肢。再生した部分に mCherry の蛍光（筋線維に由来する組織）は観察されません。C. 巨大幼体の再生中の肢。多数の脱分化細胞（矢頭：mCherry 陽性の核）が先端部に遊走しています。

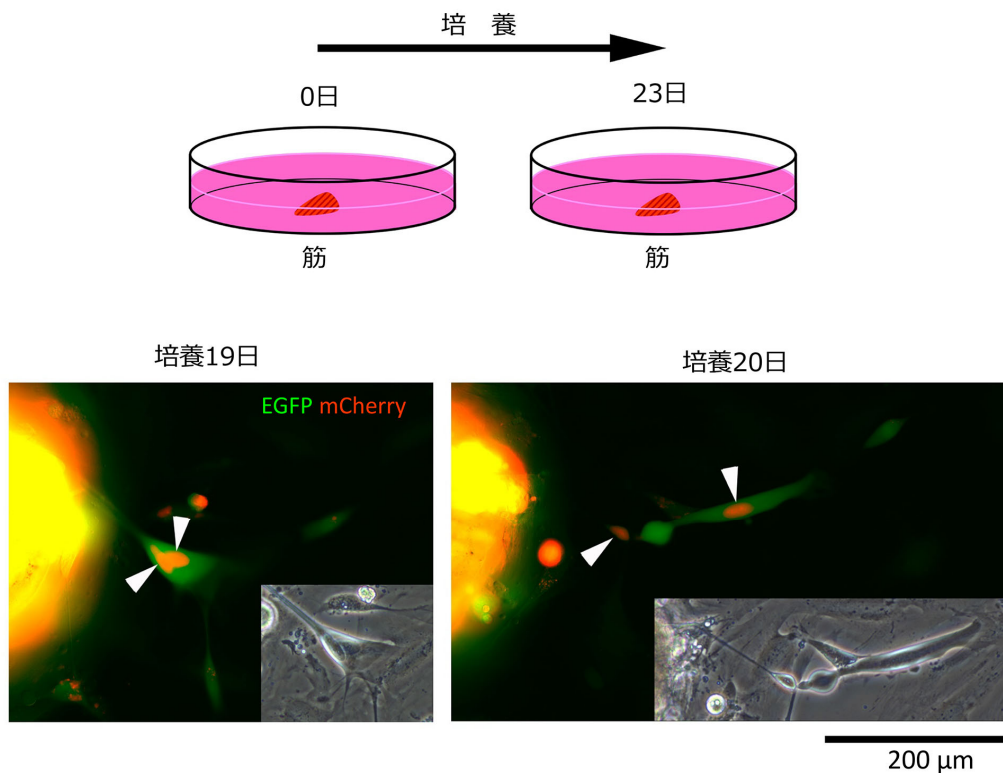


図4 培養下における筋線維の脱分化

変態前の幼生の前肢から筋組織を取り出し培養しました。筋組織が培養皿の底に接着すると、筋組織から筋線維の先端が伸び出し、培養皿の底に接着しました。接着した先端は複数の核(矢頭)を含みますが、伸長するに伴って一部が断片化し、やがて単核の細胞として遊走し始めました。この変化に甲状腺ホルモンは影響しませんでした。

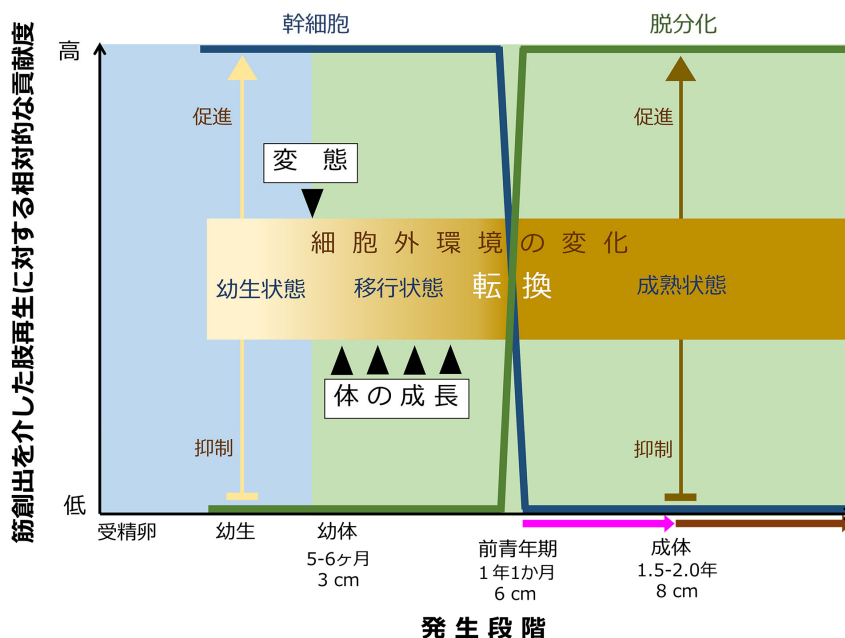


図5 筋の幹細胞と脱分化の肢再生に対する相対的な貢献度が前青年期で逆転するメカニズム(仮説)

幼生の体内環境、特に筋幹細胞や筋線維を取り巻く微環境は、肢再生における筋幹細胞の働きを促進する一方で、筋線維の脱分化能力を抑制しています。体内環境は、変態とその後の成長により変化し、前青年期に達すると、肢再生における筋幹細胞の働きを制限する一方で、筋線維の脱分化能力を解放します。

用語解説

注1) 水生期と陸生期

四肢動物（4本足の脊椎動物）の祖先は、約4億年前に地球上に出現した原始的な両生類であると考えられている。この両生類は、発生の早い時期を、鰓や鰭を持った幼生として水中で暮らし、変態した後は湿った陸地で暮らしていたと考えられている。現生の四肢動物は、基本的にこの特徴を今も残しており、有羊膜類（爬虫類、鳥類、哺乳類を含む）という陸地環境により適応したグループでも、発生の早い時期は卵殻や母体の中の羊水と呼ばれる水の中で成長し、孵化や出生後は陸地で暮らすようになる。ここでは、四肢動物の一生のうち、水中で暮らす期間を水生期、陸地で暮らす期間を陸生期と呼んで区別している。

注2) 筋幹細胞／筋前駆細胞

筋線維に分化する能力のある幹細胞／前駆細胞のこと。骨格筋を構成する細長い線維状の筋細胞（筋線維）は、発生過程で多くの筋芽細胞が融合してできた多核の細胞である。一般に成熟した筋線維は、再び単核となり、分裂し、筋線維を創り出すことはない。そのため、骨格筋には衛星細胞と呼ばれる筋幹細胞／前駆細胞が含まれており、筋線維の代謝更新や補修のために働いている。

注3) 脱分化

いったん分化した細胞が分化形質を失い、再び未分化な状態に戻る。筋の場合は、成熟した筋線維の一部が単核の細胞となって本体の筋線維から分離する現象のことを指す。

注4) アルビノ

全身のメラニン色素合成ができない個体。本研究では、チロシナーゼと呼ばれるメラニン色素合成酵素の遺伝子をゲノム編集技術で破壊することで、アルビノのアカハライモリを創り出した。

研究資金

本研究は、科学研究費補助金（221S0002、80272152、18H04061）の一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 The latent dedifferentiation capacity of newt limb muscles is unleashed by a combination of metamorphosis and body growth.

（イモリの肢筋の潜在的脱分化能力は変態と体の成長の組み合わせによって解放される）

【著者名】 Zhan Yang Yu¹, Shota Shiga¹, Martin Miguel Casco-Robles¹, Kazuhito Takeshima², Fumiaki Maruo¹, Chikafumi Chiba¹

1) 筑波大学生命環境系

2) 名古屋大学アイソトープ総合センター

【掲載誌】 Scientific Reports

【掲載日】 2022年8月1日

【DOI】 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15879-z>

【URL】 <https://www.nature.com/articles/s41598-022-15879-z>