

論文審査の結果の要旨

氏名 辻岡 洋

本論文は 2 章からなる。第 1 章はツメガエル幼生尾の再生芽に特異的に発現する遺伝子の探索について、第 2 章はインターロイキン 11 の尾の再生における役割について述べられている。

研究の背景は以下の通りである。失った器官の構造と機能を回復する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により異なる。脊椎動物の中では哺乳類と比較すると、魚類や両生類は高い器官再生能をもつ。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 幼生は尾切断後、1 週間程度で脊索、筋肉、脊髄など多様な組織を含む尾を再生させることができ、脊椎動物の器官再生のモデルとして用いられている。多くの脊椎動物で器官再生を担う細胞は、細胞系譜に拘束された組織幹細胞であるが、どのようにしてそれら組織に由来する幹・前駆細胞が誘導され、その未分化・分化状態が協調的に制御されるのかは不明であった。本論文ではこの問題の解決を目指して、ツメガエル幼生尾の再生の分子機構の解析がなされている。

第1章では、ツメガエル幼生尾の再生の分子機構を調べるため、再生芽の増殖細胞を FACS で単離し、mRNA-seq 法により、再生芽増殖細胞 (4X) に選択的に発現する遺伝子を網羅的に探索した。対照としては、再生芽に含まれる非増殖細胞 (2X) と尾芽胚の増殖細胞 (4X) を用いた。その結果、再生芽選択的な発現を示す遺伝子を 10 同定したが、中でもインターロイキン 11 (*il-11*) は最も顕著な再生芽選択性を示した。Whole mount *in situ* hybridization の結果、*il-11* は尾再生芽で BrdU 陽性の増殖細胞の一部に発現することが分かった。

第 2 章では、ツメガエル幼生尾の再生において *il-11* が果たす役割の解析がなされた。まず、*il-11* の発現と尾再生のプロセスの相関を調べるため、*il-11* の発現を定量的 RT-PCR により調べた。その結果、*il-11* の発現は尾切断後 2 時間で誘導され、再生芽に増殖細胞が集積する切断後 3 日目より後も持続した。また、その局在を whole mount *in situ* hybridization で調べると、切断後 3 日目以降、再生芽の先端で持続的に発現していたことから、未分化な増殖細胞の誘導・維持に関与する可能性が考えられた。次に、*il-11* が尾再生に必要なかを、CRISPR/Cas9 法を用いたノックダウン実験により調べた。*il-11* を標的とする guide RNA と *cas9* mRNA を受精卵に注入し、発育した幼生

(F₀ 世代)の尾を切断し、再生への影響を調べたところ、*il-11* の異なる部位を標的とした 2 種類のノックダウン群とともに、コントロール群よりも有意に再生尾が短縮した。また、ノックダウン群で同時に Tet-on 法により *il-11* を強制発現すると、再生阻害効果がほぼ完全に消失したことから、*il-11* が尾再生に必要なことが示唆された。これは大変興味深い結果である。

さらに、*il-11* が尾再生のどの過程に必要なのか調べるため、ノックダウン群とコントロール群の切断尾で発現量に差がある遺伝子を mRNA-seq で網羅的に探索した。その結果、ノックダウン群では脊索、筋、感覚神経の一部の未分化マーカーの発現が低下していたことから、*il-11* は尾切断後、複数の組織に由来する幹・前駆細胞の増殖誘導や増殖した未分化細胞の維持に関わる可能性が考えられた。最後に、*il-11* の発現がこれら複数の組織由来の幹・前駆細胞の増殖誘導や維持に十分であるかを調べた。Tet-on 法を用いて正常な尾に *il-11* を強制発現したところ、正常尾であるにも関わらず、脊索、筋、感覚神経の一部の未分化マーカーの発現が mock 発現群と比べて有意に高い、あるいは高い傾向があることがわかった。このことから、尾切断という刺激がなくても *il-11* の発現のみで、複数の組織由来の幹・前駆細胞の増殖が誘導されることが示唆された。

本研究によって初めて、*il-11* が器官再生において、複数の組織由来幹・前駆細胞の増殖誘導や未分化細胞の維持を担う要となる分子であることが示唆された。これは再生生物学分野で、国際的にも独創的で学術的意義の高い研究成果である。今後、尾切断の刺激がどのように *il-11* の発現を誘導するのか、また IL-11 が幹・前駆細胞増殖誘導や維持に働くメカニズムの研究が進むことで、無尾両生類の器官再生の分子機構の全貌に迫れると期待される。

なお、本論文は深澤太郎、國枝武和、加藤由起、白髭克彦、久保健雄(以上、東京大学)との共同研究ではあるが、論文提出者が主体となって研究戦略の策定、実験、実験結果の解釈、論文執筆をおこなったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。