

## 66. 器官再生における Hippo シグナル経路の重要性の解明

横山 仁

弘前大学 農学生命科学部 分子生命科学科 動物生理学講座

Key words : Hippo シグナル経路, 四肢再生, アフリカツメガエル, 局所的な発現誘導, サイズ調節

### 緒言

Hippo シグナル経路はサイズ調節や発ガンへの関与から近年注目を集めている<sup>1)</sup>。しかし両生類の四肢再生のような3次元的な器官の再生における役割はこれまで良くわかっていなかった。我々はこれまでのアフリカツメガエルを用いた研究で Hippo の下流因子である Tead や Yap の機能を全身で阻害し、四肢<sup>2)</sup>や尾<sup>3)</sup>の再生におけるこれら分子の必要性を示してきた。しかし再生中の四肢の領域に局限した機能阻害はこれまで行うことができなかった。そのため、再生中の領域で働く Tead や Yap が再生される四肢のサイズ調節に直接関与していることを示すために、四肢領域のみでこれら分子の機能を操作する実験を企画した。本研究では主に Tead に注目して、その機能を四肢領域で特異的に阻害する実験を行った。また四肢に局限した遺伝子発現の誘導技術を確立することで、これまで困難だった Tead や Yap の機能活性化を再生中の四肢で実現することを目指した。

### 方法

本研究で用いた動物はアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) である。我々はこれまで熱ショックプロモーターの下に目的の遺伝子を連結した遺伝子組換え (Tg) ツメガエルを作製し、その個体全体に熱ショックを与えることで、好きなタイミングで目的の遺伝子を発現させる実験を行ってきた<sup>2, 3)</sup>。本研究では四肢に局限して遺伝子発現を誘導するために、金属プローブの温度を一定にコントロールできる温冷負荷装置 (図 1A) を利用した<sup>4)</sup>。金属プローブをツメガエル個体の四肢領域に押し当てることで (図 1B)、この領域に局限した遺伝子発現を誘導した。

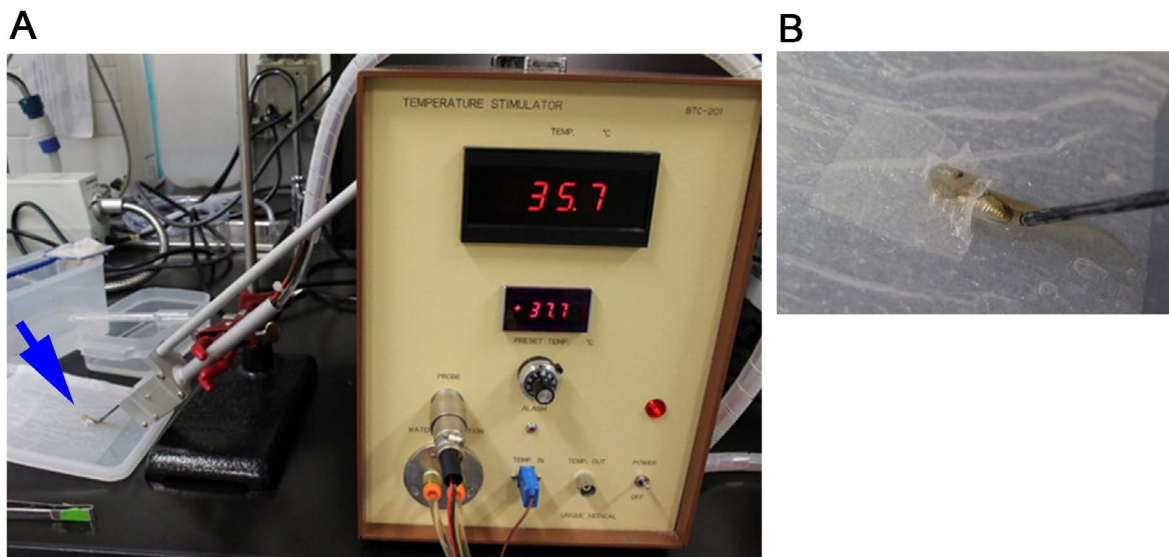


図1. 温冷負荷装置による局所的な発現誘導

- (A) 温冷負荷装置により実際にツメガエル幼生に局所的熱ショックを与えている様子。青色の矢印は金属プローブと幼生を示している。
- (B) 金属プローブと幼生の箇所を拡大した画像。

本研究では四肢（肢芽）を切断されてもほぼ完全な四肢を再生できる幼生期のツメガエル<sup>5)</sup>個体を用いて実験を行った。まず熱ショックプロモーター（*Xenopus laevis hsp70 promoter*）の下流に GFP 標識したドミナントネガティブ型の Tead (dnTead) を連結した Tg ツメガエルを利用して局所的な Tead の機能阻害を行った。さらに Tead や Yap の局所的な機能活性化実験を行うための布石として、ヘッジホッグシグナル経路を活性化する shh を GFP で標識した上で熱ショックプロモーターにつないだ Tg ツメガエルを作製し、これに対しても温冷負荷装置を用いて四肢領域に局限した発現誘導を行った。

## 結果

はじめにツメガエルの幼生の後肢の肢芽（後肢芽）の片方に対して温冷負荷装置によって dnTead を局所的に発現させ、Tead の機能を阻害する実験を行った。まず発生段階 52 (Nieuwkoop & Faber の発生段階<sup>6)</sup>) の左後肢芽において dnTead を発現させ、その直後に肢芽を切断して再生を行わせた。ここでは肢芽を予定運命<sup>7)</sup>を参考にヒジ付近で切断して再生を行わせた。GFP のみを発現させたコントロールの Tg 個体においては、後肢は正常に再生した (図 2A-C)。これに対して GFP 標識した dnTead を発現させた Tg 個体においては、多くの例で四肢再生がほぼ完全に阻害された (図 2D-F)。次に同様に肢芽を切断したツメガエル個体に対して、切断後 3 日目になってから温冷負荷装置を押し当てて GFP または dnTead を発現させる実験を行った。その結果、GFP のみを発現させたコントロール個体では後肢が正常に再生したのに対して (図 2H-J)、dnTead を発現させた個体では再生への阻害効果が見られた (図 2K-M)。その一方で切断直後に dnTead を発現させた例のような再生への完全な阻害効果は見られず、四肢の骨格要素は完全にそろっているが指骨の部分のみで欠損が見られるなどの再生阻害効果が見られた。

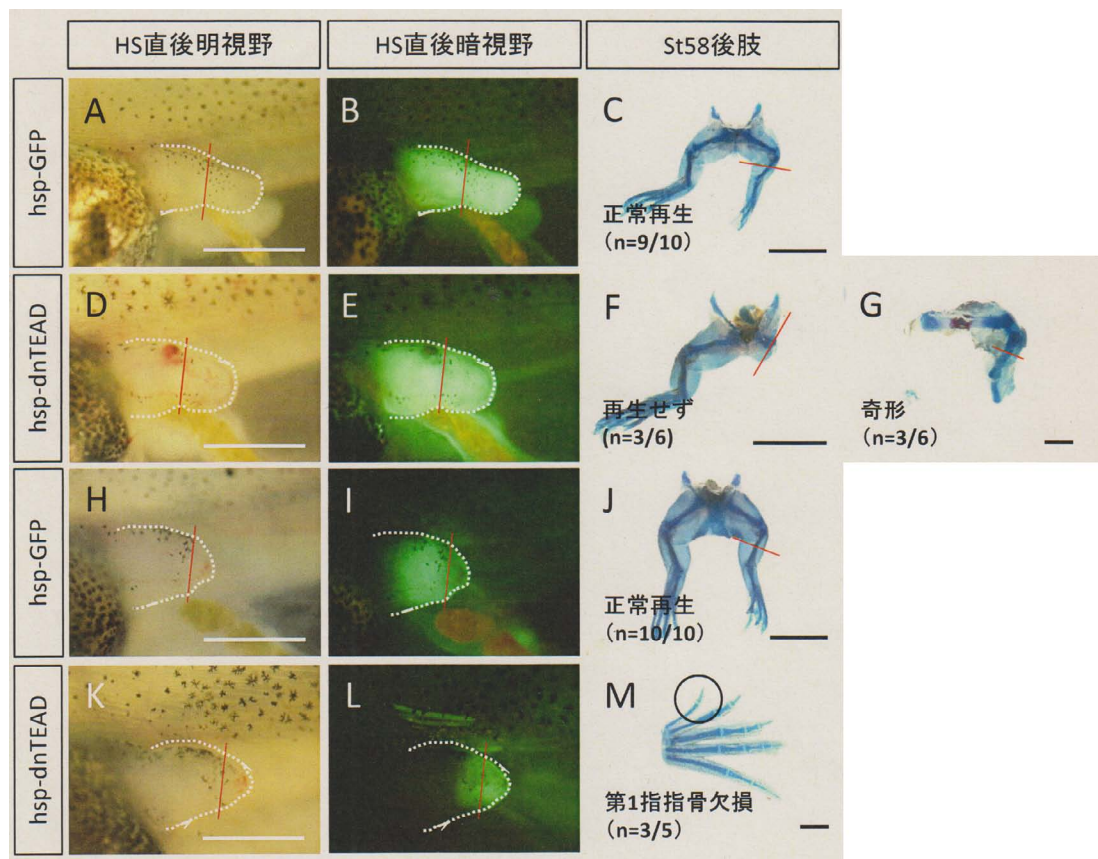


図2. 四肢再生における Tead の機能阻害

発生段階 52 (St52) のツメガエル幼生において左後肢芽を切断して再生を行わせた。その後 St58 にて固定して再生の結果を判定した。(A, B, C, H, I, J) GFP のみを発現させたコントロール個体。(D, E, F, G, K, L, M) GFP 標識された dnTead を発現させた個体。(C, F, G, J, M) アルシアンブルーによる軟骨染色で、四肢の骨格パターンが分かるようにした。赤の実線は切断位置を示す。

(A, B, D, E, G, H, I, K, L) Scale bar = 1 mm; (C, F, J) Scale bar = 5 mm.

さらにより再生が進んだ切断後 6 日目と 9 日目にも同様の実験を行ったところ Tead を阻害してもほとんどの例で四肢の骨要素は全て形成された。一方で再生した四肢のサイズを計測して比較したところ、dnTead を切断後 6 日目に発現させたケースにおいては GFP を発現させたコントロールに対して四肢サイズが有意に小さくなることが観察された。このことから再生がある程度進行した段階において Hippo シグナル経路が再生される四肢のサイズ調節に関与していることが示唆される。

我々はここで述べたような Tead の機能阻害 (loss of function) の実験と共に Tead や Yap の機能を四肢再生において活性化させる (gain of function) 実験を企画していたが、活性型の Tead および Yap 遺伝子が発生中の胚ですこしでも起きてしまうと個体の生存を脅かすことがこれまでの予備実験から示唆されていた。そこで四肢の中でも特に領域を限局して発現を誘導する技術を確認する必要があると考えた。まず、限局した発現誘導がきちんと実施できることを確認するため、発生中の四肢 (肢芽) において前後軸を制御することが報告されている shh 遺伝子をツメガエル幼生の肢芽の前側で局所的に発現させる実験を行った (図 3A)。ニワトリ胚やマウス胚では肢芽の前側で shh を発現させると四肢の前側に重複肢が形成される。温冷負荷装置による局所的な熱ショックの条件を工夫することによりツメガエル肢芽で前側のみで発現誘導することに成功した。そしてその結果、四肢の前側に重複肢を作らせることができた (図 3B)。

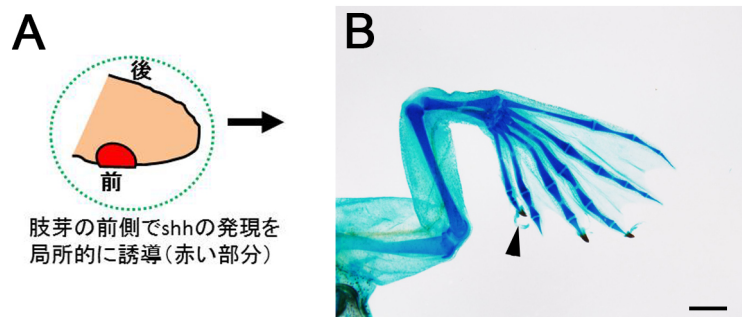


図 3. 肢芽の前側に限局した shh の発現誘導実験

(A) 温冷負荷装置により発生段階 51-52 のツメガエル後肢芽に対して前側のみで shh の発現を誘導した。(B) その結果、前側に矢尻で示すような重複肢が形成された。

Scale bar = 1 mm.

また、これらの実験とは別に、熱ショック依存的に GFP を発現する Tg ツメガエルと GFP を発現しないツメガエル個体間で移植実験を行うことで、皮下組織由来の細胞のみが熱ショックに反応して GFP を発現するツメガエル個体を作製することに成功した。この個体を利用して、変態後のツメガエルにおいて、皮下組織由来の細胞が皮膚再生に寄与することを実証した<sup>8)</sup>。

## 考 察

本研究の成果により両生類の器官再生の研究における、温冷負荷装置を利用した局所的な発現誘導技術の有効性がさらに実証された。Hippo シグナル経路の下流因子である Tead の機能を四肢のみで阻害した実験では、再生がやや進行した時期に Tead を阻害すると再生された四肢のサイズの減少が見られたことから、この時期におけるサイズ調節への直接の関与が示唆された。また shh を四肢の中でも特定の領域（前側）のみで発現させ重複肢を形成させる実験の成功から、ツメガエル幼生の肢芽という比較的小さな器官原基の中でも局所的な発現誘導が可能であることがわかった。そして同様の技術を用いれば近い将来に Tead や Yap の gain of function の実験が実施可能であることが示唆された。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は東北大学生命科学研究科の田村宏治教授と山形大学医学部の越智陽城准教授である。特に田村教授の研究室の大学院生である小林託也さんに多くの協力をいただいた。最後に本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Hayashi S, Yokoyama H, Tamura K. Roles of Hippo signaling pathway in size control of organ regeneration. *Dev Growth Differ.* 2015;57(4):341-51. Epub 2015/04/13. doi: 10.1111/dgd.12212. PubMed PMID: 25867864.
- 2) Hayashi S, Tamura K, Yokoyama H. Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for *Xenopus* limb bud regeneration. *Dev Biol.* 2014;388(1):57-67. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.01.018. PubMed PMID: 24491818.
- 3) Hayashi S, Ochi H, Ogino H, Kawasumi A, Kamei Y, Tamura K, et al. Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Dev Biol.* 2014;396(1):31-41. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.018. PubMed PMID: 25284091.
- 4) Kawasumi-Kita A, Hayashi T, Kobayashi T, Nagayama C, Hayashi S, Kamei Y, et al. Application of local gene induction by infrared laser-mediated microscope and temperature stimulator to amphibian regeneration study. *Dev Growth Differ.* 2015;57(9):601-13. Epub 2015/10/29. doi: 10.1111/dgd.12241. PubMed PMID: 26510480.
- 5) Dent JN. Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J Morphol.* 1962;110:61-77. Epub 1962/01/01. doi: 10.1002/jmor.1051100105. PubMed PMID: 13885494.

- 6) Nieuwkoop, P.D., & Faber, J.: Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, New York, 1994.
- 7) Tschumi PA. The growth of the hindlimb bud of *Xenopus laevis* and its dependence upon the epidermis. *J Anat.* 1957;91(2):149-73. Epub 1957/04/01. PubMed PMID: 13416124; PubMed Central PMCID: PMC1244934.
- 8) Otsuka-Yamaguchi R, Kawasumi-Kita A, Kudo N, Izutsu Y, Tamura K, Yokoyama H. Cells from subcutaneous tissues contribute to scarless skin regeneration in *Xenopus laevis* froglets. *Dev Dyn.* 2017 Aug;246(8):585-597. doi: 10.1002/dvdy.24520. Epub 2017 Jun 15. PubMed PMID: 28618059.