

博士論文審査報告書

氏名	奥村 晃成
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博理第121号
学位授与報告番号	甲第370号
学位授与年月日	令和2年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題目	アフリカツメガエル幼生尾部再生をモデルとした傷表皮細胞の遺伝子発現に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 城 宜 嗣 (副査) 教授 八 田 公 平 (副査) 教授 梅 園 良 彦 (副査) 教授 林 利 憲 (広島大学 両生類研究センター) (副査) 准教授 餅 井 真

1. 論文内容の要旨

両生類の四肢や尾部が切断されると、まずは創傷部に傷表皮が形成され、その後に、傷表皮の一部が多層化した Apical epidermal cap (AEC) が形成される。AEC は分泌性のシグナル因子を産生し、直下に存在する細胞の増殖や分化を誘導することで、再生は進行していく。しかしながら、これまでに AEC を特徴づける遺伝子はよくわかっていなかった。その理由として、AEC は非常に少数の細胞からなるため、AEC 細胞を効率よく単離し解析する工夫が必要であった。申請者は、アフリカツメガエル幼生の尾部再生過程において、EGFP が傷表皮と AEC で特異的に発現するトランスジェニックシステムを活用して、セルソーターにより EGFP 陽性細胞を分取し、次世代シーケンサーによる遺伝子の網羅的定量発現解析を行うことを目的とした。

本研究では、まずは尾部組織からの細胞の解離条件の検討から始まり、最終的には、次世代シーケンシングにより、再生の進行過程に応じて、傷表皮および AEC で発現が有意に変動する 8,017 遺伝子の同定に成功した。これらの遺伝子の遺伝子オントロジー用語に基づいて遺伝子オントロジー解析を行なった結果、再生進行にともなって、傷表皮と AEC の細胞状態が刻々と変化していく様子がわかった。さらに、この遺伝子発現リストから分泌性シグナル因子をコードする 148 遺伝子を抽出し、そのうち発現レベルが特に高い 33 候補遺伝子を得た。その中から、AEC 形成時期である再生 2~3 日目で特に強く発現する遺伝子について、Whole mount *in situ* hybridization による発現解析を行った結果、7 遺伝子 (*mdk*, *fstl*, *slit1*, *tgf β 1*, *bmp7.1*, *angpt12*, *egfl6*) が尾部の AEC で強く発現することがわかった。さらに、このうちの 5 遺伝子 (*mdk*, *fstl*, *slit1*, *tgf β 1*, *bmp7.1*) は四肢 AEC でも共通に発現することがわかった。一方で、残りの遺伝子は尾部 AEC 特異的に発現する遺伝子 (*angpt12*, *egfl6*) であった。最後に、これまでに四肢 AEC で重要な役割がある

とされている *fgf8* は、尾部 AEC では発現していないことも次世代シーケンシングによる定量解析から明らかとなった。

本研究は、これまで不明であった AEC を特徴づける新規遺伝子を複数同定することに成功しており、脊椎動物の再生原理を理解する上で大変重要な発見である。本論文の内容は、*Development Growth and Differentiation* 61: 447-456, (2019) (doi: 10.1111/dgd.12635) に掲載された。

2. 論文審査結果

これまでに、AEC を含む再生組織を用いたトランスクリプトーム解析は行われていたが、再生組織は非常に多様な細胞種からなるため、AEC における遺伝子発現プロファイルを解明することは非常に困難であった。本論文において奥村氏は、トランスジェニック系統とセルソーターを活用することによって、この問題を解決し、単一細胞種特異的な網羅的遺伝子発現解析を初めて可能とした。バイオインフォマティクスにより、傷表皮および AEC の遺伝子発現プロファイルを解読し、それらの細胞状態を理解し、さらには、四肢と尾部に共通に発現する分泌性の AEC 因子の存在を世界で初めて明らかにした。また、AEC において、四肢および尾部では異なる分泌性因子が発現していることも世界で初めて明らかにした。これらの成果は、脊椎動物の再生原理を理解する上で大変重要な発見であり、将来の再生医療に貢献できる可能性を鑑み、評価に値する。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。また、令和 2 年 1 月 30 日、論文内容およびこれに関連する事項について諮問を行った結果、合格と判定した。

博士論文審査報告書

論文題目：アフリカツメガエル幼生尾部再生をモデルとした傷表皮細胞の遺伝子発現に関する研究

申請者：奥村 晃成

1. 論文内容の要旨

両生類の四肢や尾部が切断されると、まずは創傷部に傷表皮が形成され、その後に、傷表皮の一部が多層化した Apical epidermal cap (AEC) が形成される。AEC は分泌性のシグナル因子を産生し、直下に存在する細胞の増殖や分化を誘導することで、再生は進行していく。しかしながら、これまでに AEC を特徴づける遺伝子はよくわかっていなかった。その理由として、AEC は非常に少数の細胞からなるため、AEC 細胞を効率よく単離し解析する工夫が必要であった。申請者は、アフリカツメガエル幼生の尾部再生過程において、EGFP が傷表皮と AEC で特異的に発現するトランスジェニック系統を活用して、セルソーターにより EGFP 陽性細胞を分取し、次世代シーケンサーによる遺伝子の網羅的定量発現解析を行うことを目的とした。

本研究では、まずは尾部組織からの細胞の解離条件の検討から始まり、最終的には、次世代シーケンシングにより、再生の進行過程に応じて、傷表皮および AEC で発現が有意に変動する 8,017 遺伝子の同定に成功した。これらの遺伝子の遺伝子オントロジー用語に基づいて遺伝子オントロジー解析を行なった結果、再生進行にともなって、傷表皮と AEC の細胞状態が刻々と変化していく様子がわかった。さらに、この遺伝子発現リストから分泌性シグナル因子をコードする 148 遺伝子を抽出し、そのうち発現レベルが特に高い 33 候補遺伝子を得た。その中から、AEC 形成時期である再生 2~3 日目で特に強く発現する遺伝子について、Whole mount *in situ* hybridization による発現解析を行った結果、7 遺伝子 (*mdk*, *fstl*, *slit1*, *tgfβ1*, *bmp7.1*, *angpt12*, *egf16*) が尾部の AEC で強く発現することがわかった。さらに、このうちの 5 遺伝子 (*mdk*, *fstl*, *slit1*, *tgfβ1*, *bmp7.1*) は四肢 AEC でも共通に発現することがわかった。一方で、残りの遺伝子は尾部 AEC 特異的に発現する遺伝子 (*angpt12*, *egf16*) であった。最後に、これまでに四肢 AEC で重要な役割があるとされている *fgf8* は、尾部 AEC では発現していないことも次世代シーケンシングによる定量解析から明らかとなった。

本研究は、これまで不明であった AEC を特徴づける新規遺伝子を複数同定することに成功しており、脊椎動物の再生原理を理解する上で大変重要な発見である。本論文の内容は、*Development Growth and Differentiation* 61: 447-456, (2019) (doi: 10.1111/dgd.12635) に掲載された。

2. 論文審査結果

これまでに、AECを含む再生組織を用いたトランスクリプトーム解析は行われていたが、再生組織は非常に多様な細胞種からなるため、AECにおける遺伝子発現プロファイルを解明することは非常に困難であった。本論文において奥村氏は、トランスジェニック系統とセルソーターを活用することによって、この問題を解決し、単一細胞種特異的な網羅的遺伝子発現解析を初めて可能とした。バイオインフォマティクスにより、傷表皮およびAECの遺伝子発現プロファイルを解読し、それらの細胞状態を理解し、さらには、四肢と尾部に共通に発現する分泌性のAEC因子の存在を世界で初めて明らかにした。また、AECにおいて、四肢および尾部では異なる分泌性因子が発現していることも世界で初めて明らかにした。これらの成果は、脊椎動物の再生原理を理解する上で大変重要な発見であり、将来の再生医療に貢献できる可能性を鑑み、評価に値する。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和2年1月30日、論文内容およびこれに関連する事項について諮問を行った結果、合格と判定した。

主査：城 宜 嗣



副査：八 田 公 平



：梅 園 良 彦



：林 利 憲



(広島大学 両生類研究センター、教授)

：餅 井 真

