

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06270

研究課題名(和文)四肢再生系を応用したマウス関節再生能力の評価

研究課題名(英文)Evaluation for the ability of joint regeneration in mice

研究代表者

遠藤 哲也(Endo, Tetsuya)

愛知学院大学・教養部・准教授

研究者番号：90399816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまずマウスの指の関節軟骨が生後約3週間かけて成熟すること、その際には関節において相対している先端側の骨と基部側の骨の関節軟骨同士の相互作用が必要であることを明らかにした。さらに成熟過程にある中節骨の基部側半分を切り出し、基部先端部をひっくり返して元の場所に戻す移植実験を行うと、中節骨の切断部位に、本来関節ではない場所であるにも関わらず関節軟骨と思われる組織が作られることが分かった。これは切断部位に隣接している正常な関節軟骨からの何らかの作用を受けて作られたものと考えられる。以上の結果は、少なくとも生後しばらくの間マウスは指関節を再生する能力を潜在的に持っている可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで四肢再生能力は両生類に限定され、哺乳類においてはほとんどないと考えられてきた。しかし本研究によって哺乳類も潜在的に関節再生能力を持つことが示唆された。今後はその仕組みや、哺乳類が再生能力を発揮できない原因を明らかにし、両生類などと比較することで、再生能力の進化的起源に関する知見が得られるものと考えられる。

社会的意義としては関節の再生医療実現へ向けた基盤的知見となることが期待される。加齢に伴う変形性関節症の増加は深刻な社会問題となっており、関節の再生医療への期待は大きい。本研究の成果をさらに発展させることにより、新たな関節再生の方法を提案することができるのではないかとと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that it takes approximately three weeks after birth for digit articular cartilage (AC) to mature in mice, and that interaction between AC of the distal and proximal bones in a joint is necessary during this process. Next, we performed an experiment in that the proximal half of the middle phalange (P2) was dissected, inverted proximodistally and put back to the original position in neonatal mice. Cartilaginous tissues were newly formed at the interfaces between the AC of the inverted graft and the cut edge of the distal half of the P2 and between the cut edge of the graft and the AC of the proximal phalange, which show some of characteristics of AC. The results in this study suggest that the ectopic AC-like tissues were induced by some signal from the adjacent normal AC. It is also suggested that mice, at least for some time after birth, potentially possess the ability to regenerate joint structures.

研究分野：再生生物学

キーワード：再生 関節 関節軟骨 四肢 関節再生 四肢再生

1. 研究開始当初の背景

四肢再生のモデル動物である有尾両生類(イモリなど)は、どの位置で切断しても元と同じ形態で、機能的な手足を再生する。これまで四肢再生能力の評価は主に形態レベルで行われ、骨パターンによって判断されてきた。しかし再生肢が機能的であることは、骨以外の組織も同様に再生し、さらにその様々な組織が正しく基部の残存部と再接続していることを意味する。すなわち骨と骨が靭帯で連結され、先端の骨と基部側の筋肉が腱を通じてつながる関節のような複雑な構造も再生しているわけである。一方、不完全再生動物である無尾両生類(カエル)で四肢を切断すると、基部残存部の骨から連続した、関節構造のない棒状軟骨(スパイク)しか再生できない。つまり関節は再生できないと思われてきた。しかし最近になって、肘関節において基部の骨(上腕骨)の関節面に傷を付けないようにして、骨と骨の間で切断すると(骨セグメント間での切断)、スパイクと上腕骨の間に関節様の隙間が作られ、さらに基部から伸びる腱がスパイクに接続することが報告された(引用文献)。このことからカエルの再生芽は関節を再生する能力を持つこと、またそのためには基部側残存部の骨関節面との相互作用が必要であることが分かる。

哺乳類において四肢再生能力はさらに限定的で、マウスにおいては指先の P3 骨(末節骨[最先端の骨]:図 1a を参照)の 2 分の 1 程度なら再生できるのみである。P2 骨(中節骨[先端から 2 番目の骨])を切断しても再生できないが、切断面に BMP を局所投与すると、P2 の先端部だけを再生誘導できる。ただし関節を越えた先の構造(P3 骨)は再生できず、カエルのスパイクのように長く伸びることもない。つまりマウスでは切断に反応して再生芽を形成できる位置に限りがあり、人為的に誘導された再生芽の能力にも限界があるため、マウスの関節再生能力について厳密に調べられることはなかったのが現状である。

	四肢再生	切断位置別の関節再生	
		セグメント内	セグメント間
イモリ	+	+	+
カエル	スパイク	-	+
マウス	指先のみ	-	- (本当か?)

2. 研究の目的

上述のようにマウスでは四肢切断に反応して再生芽を作ることができないため、四肢を切断せずに関節再生能力を評価できる実験系を開発する。その実験系を用いて、両生類の四肢で見られるような関節再生能力が哺乳類(マウス)においても保存されているかどうかを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

- (1) マウス指関節軟骨の生後成熟の過程を明らかにするため、生後 1 日目から経時的に後肢・指関節の組織切片を作成した。組織切片は hematoxylin/eosin/alcian blue 染色(HEA)、型コラーゲン(Col II)、Proteoglycan 4(PRG4)に対する抗体染色を行い、組織の変化を可視化した。
- (2) 指関節軟骨の生後成熟において、相対する関節軟骨間の相互作用が必要かどうかを明らかにするため、生後 1 日目のマウス(ddY 系統)後肢・基節骨(P1)の関節軟骨を傷つけないように中節骨(P2)を除去し(図 1b)、P1 関節軟骨の変化を経時的に観察した。
- (3) 骨折部位に作られる軟骨組織を関節軟骨に誘導できないかを調べるため、P2 骨の基部側半分を切り出し、基部-先端部方向に 180 度回転させてから元の位置に移植し直す実験を行った(図 1c)。実験には生後 1 日目の個体を用いた。

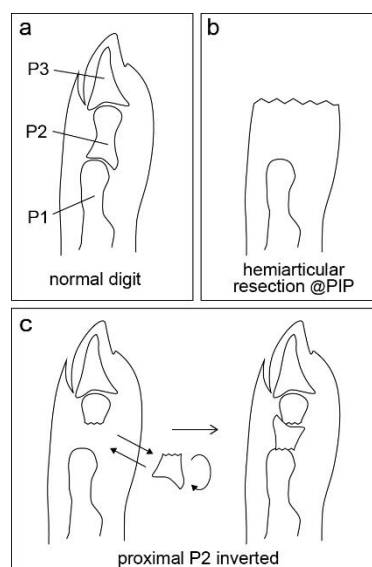


図 1

4. 研究成果

- (1) マウス指関節の関節軟骨は生後約 3 週かけて成熟する

Col II と PRG4 の免疫染色の結果、成熟したマウス指関節軟骨は、PRG4 が分布する表層部分と Col II が分布する内側の層の少なくとも 2 層から成ることが分かった。しかし生後すぐの段階では、まだそのような層構造は完成していない。PRG4 は比較的早い段階から関節軟骨最外層に分布しているのが見られる(図 2c, f,

i)。一方 Col II は、初めは骨端の縁に沿った広い範囲で分布が見られるが、そこから生後 22 日目までの間に、関節軟骨の内層(骨化領域との境界部)に徐々に限局していくことが分かった(図 2b, e, h)。PRG4 と Col II が分布する領域で見ると、この時点で関節軟骨の生後成熟は完了するものと思われる。

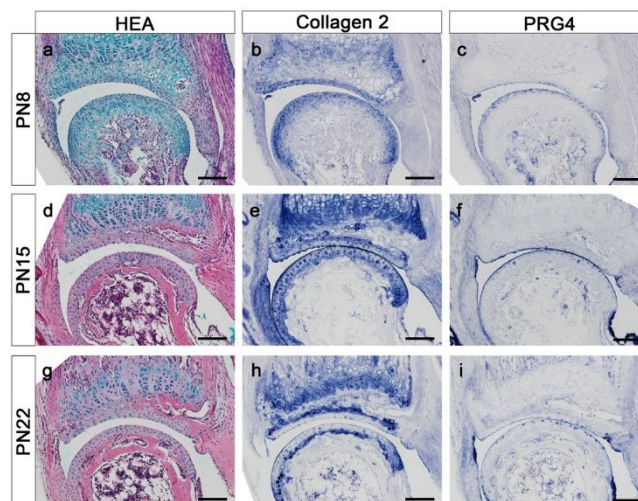


図 2

(2) 関節軟骨の生後成熟には関節を作るもう一方の関節軟骨との相互作用が必要である

生後 1 日目のマウス後肢・基節骨(P1)の関節軟骨を傷つけないように中節骨(P2)を除去した後、P1 骨の関節軟骨を経時的に観察した。その結果、生後 22 日目になっても Col II は関節軟骨の全体に分布しており、正常な指で見られるような関節軟骨内層への限局は見られなかった(図 3e)。一方で P2/P1 関節に外科用メスを挿入しているが P2 骨を除いていない対照実験では PRG4 と Col II の分布は正常であった(図 3g-i)。以上のこ

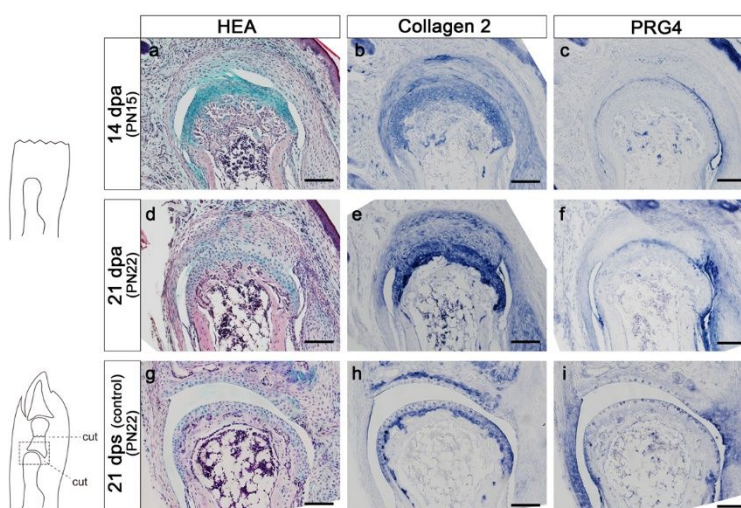


図 3

ことから、関節軟骨の生後成熟においては、関節腔を挟んで相対する関節軟骨同士の相互作用が必要であると考えられる(図 5a)。

(3) マウス新生児の指では外科的操作で異所的な関節軟骨様構造を誘導することができる

(2)で考察した関節軟骨間の相互作用を利用して、骨折時に作られる軟骨組織を関節軟骨へと誘導できないかを調べるために、以下の実験を行った。まず P2 骨の基部側半分を切り出し、基部-先端部方向に 180 度回転させてから元の位置に移植し直した(Invert 実験: 図 1c)。生後 1 日目のマウスでこの実験を行った結果が図 4 である。これにより移植片の持つ関節軟骨と移植先の P2 骨切断末端(図 4g1 の四角枠内を参照)、移植片の持つ切断末端と移植先の P1 骨の関節軟骨が接する状態(図 4g2 の四角枠内を参照)を作り出すことができる。骨の切断末端には軟骨塊が形成されるが、通常の骨折治癒においてこの軟骨は関節軟骨マーカである Col II や PRG4 を発現することはなく(図 4a, c, e)、骨折治癒が進むとともに徐々に硬骨に置き換わる。一方で Invert 実験を行うと関節軟骨と隣接させた骨切断末端に形成される軟骨では、Col II と PRG4 の局在が確認でき、またその分布のパターンも正常関節軟骨で見られるのと同様のパターン(外層に PRG4 が、内側に Col II が局在する)であることが分かった(図 4d, d, f-m)。このことから、骨が切断された部位に作られる軟骨塊が隣接する関節軟骨からのシグナルを受けて、関節軟骨へと分化したのではないかと考えられる(図 5b)。

これらの結果は 2020 年に Regenerative Engineering and Translational Medicine 誌に発表された(引用文献)。

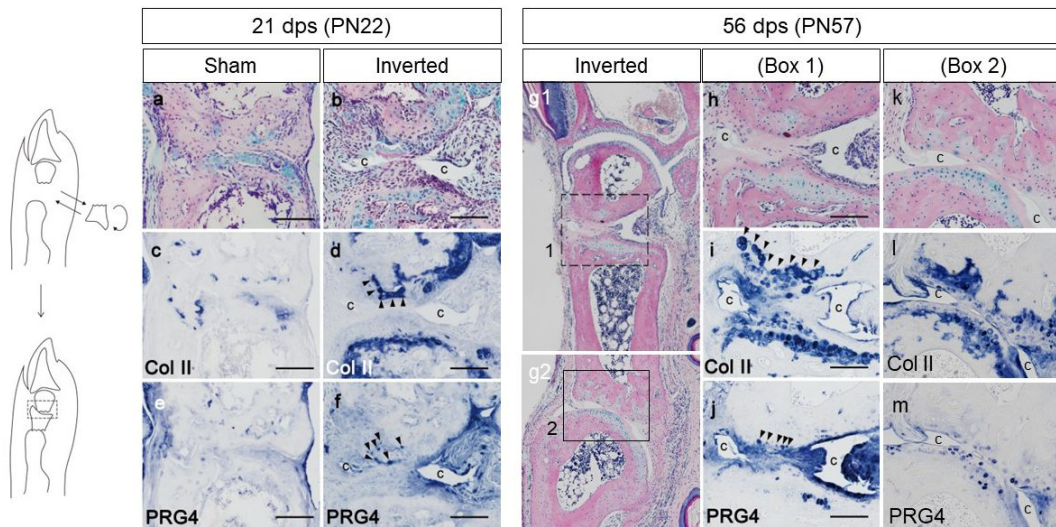


図 4

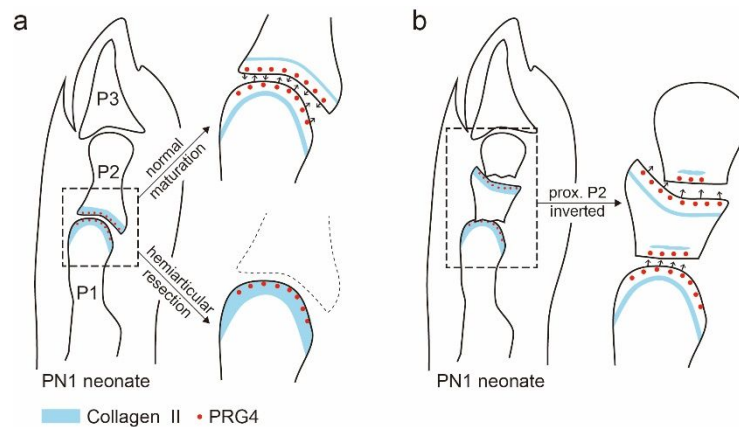


図 5

以上の結果は、少なくとも生後 1 日目のマウスの指には異所的に関節軟骨を形成することができる細胞が存在すること、またその細胞を関節軟骨へと分化させるシグナルも存在することを示している。すなわちマウス新生児の指は潜在的には少なくとも部分的な関節再生能力を持っていることが示唆される。このことはヒトにおいて関節の再生医療を実現する上で重要な知見になると思われる。またこれまで再生能力はないとされてきた指先よりも基部側の部位において再生と思われる現象を観察できる実験系が確立したことで、従来とは異なる角度から指再生研究を進めることができるようになると思われる、学術的にも意義のある成果が得られたと考えている。今後はこの関節様構造を形成する細胞の由来やシグナルの正体について明らかにしていきたい。

< 引用文献 >

Tsutsumi et al., 2016, *Regeneration*, 3, 1-13

Miura et al, 2020, *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 6, 373–382

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miura, Shinichirou Tsutsumi, Rio Agata, Kiyokazu Endo, T	4. 巻 6
2. 論文標題 Maturating Articular Cartilage Can Induce Ectopic Joint-Like Structures in Neonatal Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Engineering and Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 373-382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40883-020-00176-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤哲也、三浦慎一郎
2. 発表標題 古典的テクノロジーで隠れた再生能力を評価する - マウスにおける関節再生 -
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀田正和, 松原遼, 遠藤哲也, 阿形清和
2. 発表標題 マウス関節再生に参画が期待される細胞の同定
3. 学会等名 日本発生物学会第52回大会(大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松原遼, 遠藤哲也, 井上武, 角田瑛, 阿形清和
2. 発表標題 MMP に着目したマウスとイペリアトゲイモリ四肢切断時応答の差異
3. 学会等名 日本動物学会 第89回大会(代替大会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三浦 慎一郎 (Miura Shinichirou)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------