

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06944

研究課題名(和文) 指器官再生を目指した器官誘導能を持つ爪間葉の同定と爪器官再生技術の開発

研究課題名(英文) Identification of organ-inductive potential nail mesenchymal cell and development of fundamental method for nail organ regeneration

研究代表者

武尾 真 (Takeo, Makoto)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：50782116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では爪形成能を有する爪間葉およびその誘導メカニズムの同定と、シンプルな器官再生による高次器官再生誘導の概念実証を目的とし、器官誘導能を示す胎児および成体爪器官基部から採取した爪上皮細胞および爪間葉細胞を、器官誘導能を維持したまま培養、数十倍まで増幅する技術確立し、未分化状態の維持及び分化に關与すると考えられるシグナル経路を明らかにした。また、培養細胞から、生体内および生体外で天然爪器官と同様の組織構造及び生化学マーカーを発現する再生爪を構築する技術が確立された。これらの再生爪を指の切断部位に移植を行ったが、明確な指再生の誘導は認められず、移植方法の改善などの必要性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

器官誘導は胎児期に器官誘導能を持つ幹細胞から誘導され、出生後はその器官誘導能は失われると考えられてきた。本研究性は、成体爪器官においても器官誘導能を維持していることを明確に示しており、発生生物学における常識に新たな知見をもたらしたことに学術的意義がある。また、爪器官細胞を数十倍にまで増幅できる技術が確立したことから、先天性疾患や病気、ケガなどによる爪器官の喪失に対する根本的治療の確立につながる事が期待される。さらに、本研究成果は、毛包や爪以外の器官においても成体幹細胞が器官誘導能を維持している可能性を示唆しており、三次元器官再生医療実現のための新たな戦略に大きく貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the organ inductive-potential nail mesenchymal stem cells and proof of concept of induction of higher organ regeneration by simple organ regeneration. To this end, I have established a culture system to expand mesenchymal cells and epithelial cells isolated from the proximal region of nail organ, a nail stem cell niche, maintaining their organ-inductive ability. By using this culture system, I identified molecular pathway involving in the maintenance of stemness. In addition, I develop the method to regenerate nail organ in vivo as well as in vitro, which has similar tissue structure and expression pattern of biomarkers as natural nail organ. Transplantation of regenerated nail organ to the amputation site of digit failed to induce clear digit regeneration, suggesting the need for further improvement of strategy and method to achieve digit regeneration in vivo.

研究分野：再生生物学

キーワード：成体幹細胞 器官誘導 再生 培養 爪 指

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の器官は胎児期において器官誘導能を有する幹細胞の相互作用によって発生し、出生後に病気やケガなどで期間が損傷を受けた場合は再び作り直される(再生する)ことはない。このため、次世代再生医療として三次元器官再生医療の基盤技術の確立が期待されている。

指先はヒトを含む哺乳類の成体において再生できる数少ない器官であり、哺乳類の器官再生を研究する上で非常に適したモデルである。哺乳類の指再生では指の切断後、傷上皮により傷口が覆われ、再生芽と呼ばれる中胚葉性未分化細胞集団が形成され、指骨、爪、神経、血管などが協調的に再生されることにより指先が再生する。しかしながら、両生類とは異なりこの再生能力は指先に限定されており、爪より基部側で指が切断された場合、再生は起こらない。

これまで申請者は、指先の再生には爪幹細胞領域における Wnt シグナルの活性化が重要であること、成体幹細胞が単に新たな細胞を作り出すだけでなく器官全体の再生もオーガナイズすることを明らかにした。しかしながら、指切断に単に爪幹細胞を移植した場合は爪組織の再生は起こらず、そのため指再生も誘導されない。器官形成は上皮・間葉相互作用により誘導されるが、器官誘導能を有する爪間葉の実体が不明であることに加え、成体爪上皮・間葉細胞が器官誘導能を維持しているか明らかになっておらず、解決すべき課題として残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では爪形成能を有する爪間葉およびその誘導メカニズムの同定と、器官再生技術を融合させることにより、シンプルな器官再生による高次器官再生誘導の概念実証を目的とし、(1) 器官誘導能を有する爪間葉の同定と誘導メカニズムの解明、(2) 成体爪間葉幹細胞の同定と器官形成誘導能の解析、(3) シンプルな器官再生の誘導によるより複雑な三次元器官再生誘導の概念実証研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 胚発生期における器官誘導能を有する爪間葉の同定と分子機構の解明

ほぼすべての器官は、初期胚におけるパターン形成により器官形成場が誘導され、この領域において上皮が肥厚し、その直下に真皮凝集塊が形成されることにより場に応じた上皮・間葉相互作用が生じ固有の器官形成が誘導される。そこで、爪器官形成過程において真皮凝集塊がいつ形成されるか明らかにするために発生過程における経時的組織解析を行った。また、爪器官形成に関わるシグナル経路、分子機構を明らかにするために、qPCR および免疫染色による時空間的遺伝子発現解析を行った。

#### (2) 成体爪間葉系幹細胞の同定と器官誘導の解析

これまでの研究により、爪上皮幹細胞が爪器官の基部に局在していることが明らかとなっているが、爪間葉系幹細胞は未だ同定されていない。そこで、爪間葉系幹細胞を同定するために、爪器官の各部位から間葉細胞を取得し、器官原基法を用いて爪上皮との器官原基を作製することにより器官誘導能の解析を行った。また、爪幹細胞の生体外培養系を構築し、培養パラメータを変化させることにより器官誘導能の維持に必要なシグナル経路の検証を行った。さらに、フローサイトメーターを用いて、器官誘導能の異なる培養細胞集団を比較することにより、器官誘導能を有する成体爪幹細胞の同定を試みた。

#### (3) 爪組織再生による指器官再生の概念実証研究

シンプルな器官再生によるより高次の 3 次元器官再生の実証に向け、胎児または成体から採取した爪上皮性幹細胞と間葉系幹細胞を用いて作成した再構成体または再生爪器官を切断後の指に同所的に移植し、爪組織の再生が可能かどうか形態および爪組織のマーカー遺伝子に対する免疫染色により評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 胚発生期における器官誘導能を有する爪間葉細胞も同定と分子機構の解明

爪器官発生過程において、真皮凝集塊の形成時期を明らかにするため、経時的組織学解析を行った。この結果、胎齢 15 日目 (ED15) から DE16 にかけて、予定爪器官形成領域において、真皮凝集塊の形成が確認された。更に、ED17 には真皮凝集塊で裏打ちされた爪上皮が真皮側へと陥入するとともに、成体の爪器官と同様の爪上皮性幹細胞領域マーカーの発現パターンを示すことが明らかとなった。さらに、細胞表面抗原および外胚葉性器官形成にかかわるシグナル経路について免疫組織化学および qPCR による解析を行い、真皮細胞マーカーの候補遺伝子および分子メカニズムの候補遺伝子を見出した。これらの候補遺伝子について機能解析を試みたが、いずれの条件においても爪器官の形成は認められず、胎児性細胞を用いた爪器官再生が困難であることが明らかとなった。

#### (2) 成体爪間葉性幹細胞の同定と器官誘導メカニズムの解析

成体爪幹細胞の同定に向け、器官形成能を維持したまま爪器官由来の上皮細胞および間葉細胞の生体外増幅技術を確立した。この技術を使い、爪器官の存在する指先を基部、中央部、末端

部に分け、各領域から取得した間葉細胞と上皮細胞を増幅し、器官原基法による機能解析を行った結果、爪器官基部から取得した細胞を用いた場合は天然の爪器官と同様の組織学的・生化学的特徴を持った構造が再生された。このことから、爪器官基部領域の中胚葉性細胞集団中に器官誘導能を持つ成体爪間葉性細胞が含まれることが明らかとなった。また、培養条件化において課題(1)において明らかとなった、爪形成に關与すると予想されるシグナル経路について、サイトカインおよび低分子化合物によって活性化状態を変更することにより、爪器官形成に必要なシグナル経路を明らかにした。これらの結果は成体爪幹細胞が器官誘導能を維持していることを明確に示しており、他の器官の成体幹細胞においても器官誘導能が維持されている可能性を示している。

### (3)爪組織再生による指器官再生の概念実証

爪組織再生による指器官再生誘導に向け、再生爪原基と成体爪器官の移植技術の確立を行った。器官原基法により再生した爪器官原基、または成体マウスから外科的に摘出した爪器官をレシピエントマウス指の第1関節と第2関節の間に移植した。生着を確認したのち移植物の末端側で指を切断したところ、再生爪原基から爪様構造の伸長が確認されたが、長期維持はされなかった。一方、移植爪器官を移植した場合は、長期間の爪の持続的な伸長が長期間観察されたことから、爪器官移植技術の基盤は確立できたと考えられる。さらに、移植方法や使用する細胞集団の検討を行い、爪組織再生による指器官再生が可能であるか検証を行ったが、指先再生の誘導は不可能であったことから、爪器官再生による指先誘導にはさらなる検証が必要であることが明らかとなった。

指全体の再生誘導には至らなかったが、今回の研究において器官誘導能を有する爪幹細胞の培養系と再生技術が確立したことから、先天性疾患や病气、ケガなどによる爪器官の喪失に対する根本的治療の確立につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武尾 真
2. 発表標題 爪上皮性幹細胞による指再生の誘導
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武尾 真、辻 孝
2. 発表標題 幹細胞を用いた皮膚器官系の再生
3. 学会等名 第72回日本人類学会大会（招待講演）
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
研究分担者	辻 孝  (Tsuji Takashi)  (50339131)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー   (82401)	

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
---------	---------