

機関番号：33902

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009～2010

課題番号：21770244

研究課題名（和文） マウス四肢再生を目指した皮膚繊維芽細胞と人工傷表皮に関する研究

研究課題名（英文） Characterization of the skin fibroblast, and induction of the artificial wound epidermis aiming for limb regeneration in mice

研究代表者

遠藤 哲也 (ENDO TETSUYA)

愛知学院大学・教養部・講師

研究者番号：90399816

研究成果の概要（和文）：

両生類で見られる四肢再生を哺乳類でも実現することができるかを調べるために、マウス四肢の皮膚繊維芽細胞の性質を調べ、また四肢再生において重要な組織である傷表皮をマウスの四肢にもつくり出すことができるかどうかを調べた。特に後者に関しては、器官培養という特殊な環境であれば、両生類の四肢につくられる傷表皮に似た構造を、切断したマウスの四肢や尾部につくり出すことが可能であることが明らかになった。この結果はマウス新生児においても両生類の四肢再生初期に見られるイベントを再現できる可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

To clarify if mammals can be induced to regenerate their limbs like amphibians do, two things were examined in neonatal mice as below. 1) Do skin fibroblasts maintain pattern formation potency? 2) Can the amphibian-type wound epidermis be formed on the amputation stump? In the organ culture system, even in mice, the amputation surface was covered by thin epidermal sheet within a few days, and the morphology of the sheet was similar to the amphibian-type wound epidermis. Those results suggest that the early events of amphibian limb regeneration might be inducible in neonatal mice

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,900,000 円	870,000 円	3,770,000 円
平成 22 年度	700,000 円	210,000 円	910,000 円
年度			
年度			
年度			
総 計	3,600,000 円	1,080,000 円	4,680,000 円

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：四肢再生、器官再生

1. 研究開始当初の背景

これまで有尾両生類の四肢再生系は、器官の完全再生のモデルシステムとして長年に亘り研究されてきた。有尾両生類は手足を切断されても、形態的にも機能的にも切断前のオリジナルと違わぬ手足を作りなおすこと

ができるからである。これまで我々は、有尾両生類における四肢再生が3段階から成り立ち(創傷治癒→再生芽形成→パターン形成)、各段階移行に必要な因子(神経因子と切断面上の皮膚繊維芽細胞が持つ位置価の多様性(極性))を元にして、それぞれを明確に区別し、独立して解析できることを明らかにした

Endo et al., 2004, Dev. Biol. 270, 135-145.)。以来、我々のグループは、再生における神経の働きと再生芽細胞の起源としての皮膚繊維芽細胞の性質にターゲットを絞って研究を進めてきた。

一方で四肢切断後に rod 状の構造(スパイク)しか作れない一部の無尾両生類(アフリカツメガエル等)は、有尾両生類とスパイクすら再生できない我々哺乳類の間をつなぐモデル動物として、特に日本国内で研究が進んでいる。これまでに少なくともいくつかのパターン形成遺伝子発現が正常パターンを作る発生過程の発現とは異なることが示されており、上記の第2段階から第3段階への移行に有尾両生類との違いがあることが分かっている。我々も、特にスパイクの前後軸形成不全と sonic hedgehog 遺伝子の発現の関係を明らかにしている(Endo et al., 2000, Dev. Biol. 220, 296-306.)。

以上のことを考え合わせると、ヒトを含めた哺乳類における四肢再生の可能性を考えるときのポイントは大きく二つ、「どうやって再生芽を作るか(いかにして再生 competent な細胞を供給するか)」と「再生芽細胞に、どうやってパターンを作らせるか」に大別することができる。これら両生類から得られた多くの知見を応用することで、哺乳類の四肢を再生させようとする研究が、本研究に先立って米国で始まっていた。米国では国防総省・国防高等研究計画局(DARPA)のプログラムとして、二つのグループに大型の研究費が与えられ、このうち Ken Muneoka 教授(Tulane 大学)が率いるグループは、マウスの「指先」の再生に関して大きな成果を得ていた。その一方で、より複雑なパターン形成を必要とする「手足全体」の再生に関しては彼らはまだ研究を行っておらず、哺乳類の四肢を指先よりも基部側で切断した際の再生反応に関する研究では東北大学の井出宏之名誉教授が先行しているという状況であった(Masaki & Ide, 2007)。

2. 研究の目的

我々はこれまで自らが明らかにしてきた両生類四肢の再生機構を哺乳類の四肢に適用することで哺乳類がどのような反応を示すかを調べ、ひいては前腕・上腕レベルで切断された四肢の再生誘導を目指すのが本研究の目的である。次の二つについて解析を進めた。

(1) 繊維芽細胞

両生類四肢再生において皮膚繊維芽細胞は、前述のように成体になっても位置価を保持し、再生芽細胞の最大の供給源である。

しかし「成体における位置価の保持」というのは両生類特異的なことではなく、最近では哺乳類の成体においても繊維芽細胞が位置価マーカー(主に Hox)を発現し続けていることが分かってきた(Rinn et al., 2008)。そこで本研究では、マウス新生児・前肢の皮膚繊維芽細胞を単離し、この繊維芽細胞が発生中の肢芽間充細胞で見られるような性質を保持しているかどうかを調べる。具体的には、基部先端部軸方向に異なる2つのレベルから単離した繊維芽細胞を高密度で混合培養し、2つの細胞間で細胞選別が起きるかどうかを観察した。

(2) 人工傷表皮の構築

マウスでは四肢を切断された場合、或いは単に皮膚に創傷を作った場合、出血の結果作られる血餅が物理的な障壁となり、傷が治る最終段階まで表皮は傷口を覆うことができない。両生類では傷口はすぐに傷表皮によって覆われ、傷表皮は神経から放出される FGF7 によって再生芽形成に必須な表皮(AEC)へと活性化される。

そこでまずマウス前肢切断面上に何らかの方法で人工的に傷表皮を作る事ができないかを調べる。そしてさまざまな成長因子を作用させることで、この傷表皮を AEC へと誘導することができないか、AEC マーカー遺伝子の発現量の変化を調べた。

3. 研究の方法

本実験は全て DDY 系統の新生児マウスを用いて行われた。

(1) 前腕切断による骨肥大形成の観察

マウス生後1日目(PN1)の新生児前肢を前腕中央部分で切断し、4週間に亘って経時的にサンプリングしてアリザリンレッド/アルシアンブルー(AR/AB)染色を行い、骨パターンを観察した。また生後1日目、7日目、15日目の新生児前肢を、同様に前腕中央部分で切断し、切断後7日目の骨パターンを比較した。

(2) 繊維芽細胞間の相互作用解析

PN1 マウスの前腕を根元から切除し、さらにここから、基部の端より2mmほどの皮膚(D)と、手のひらの最も基部のパッドから基部方向へ2mmの皮膚を切り取った(P)。皮膚裏側の脂肪組織を眼科バサミで除去した後、デイスパーゼ処理により表皮と真皮を分離した。真皮をさらにコラーゲナーゼ処理して繊維芽細胞を解離した。

D細胞とP細胞のいずれかを CellTracker Green でラベルした後、培養皿に立てたペニ

シリナカップ内に両細胞を高密度で播種し、細胞が培養皿に定着した頃にカップを外して、細胞選別の有無を観察した。

(3)人工傷表皮の誘導

①解離表皮細胞と脇腹表皮組織の移植

PN1 マウスの体幹部から皮膚を切り取り、ディスペーゼ処理により表皮と真皮に切り分けた。表皮はさらにトリプシン/EDTA 液で処理し、表皮細胞を単離した。表皮細胞は蛍光色素の PKH26 でラベルした後、MCDB153 培地に高密度で懸濁した。移植のホストとなるマウスの準備のため、まず PN1 マウス前肢を手首付近で切断した。さらに皮膚を基部側に向けて下ろして骨を露出させ、橈骨と尺骨の中間部分で切断した。皮膚を元に戻してできたポケット内に、表皮細胞の懸濁液を注入し、切り口を医療用接着剤で閉じて、細胞が切断面に定着するのを待った。

脇腹表皮組織の移植は、脇腹から切り取ってきた表皮組織を、前腕部中央の切断面上に直接移植した。

両実験とも、移植後 7 日目にサンプリングし、組織切片化して移植細胞・移植片の観察を行った。

②器官培養系における傷表皮の形成

PN1 マウスから前腕部を切断し、背側から 2x2mm 四方の皮膚を切り取って、「窓」をあけた。前腕部は培養液の浸透が良くなるように橈骨と尺骨より腹側の組織を全て切り落とし、「かまぼこ」状にした。培養液には 10% FBS 入りの DMEM を用い、CO₂ インキュベーター内で浮遊培養した。

切断した前肢切断面上における傷表皮の形成を調べる際には、前腕部中央部を厚さ 1.5mm 程度の「切り株」状になるように切り出し、培養した。

③尾部組織を用いた器官培養実験

生後 1 日目新生児もしくは 6 日目の新生児から尾部を切断し、ここから切断面の直径が 1.5-2.0mm になる部分を厚さ 1.0-1.5mm で「切り株」状に切り出した。これを②と同じ培地で培養した。

培養した組織は 1, 2, 3 日目に採取し、一部は 0.1% trypan blue 液で死細胞を染色し、残りは組織切片化して、傷表皮形成の様子を観察した。

4. 研究成果

(1) 前腕切断による骨肥大形成の観察

①PN1 マウスの前腕における骨肥大形成

繊維芽細胞と傷表皮に関する 2 つの解析に先立って、マウス前肢を切断した時にどのような変化が見られるか、骨のパターンを中心にして経時的な変化を観察した。

PN1 マウスの前肢を前腕中央部で切断すると、3 日目には切断された骨の周囲に軟骨が形成されてくる。軟骨領域は肥大を続ける一方、切断から 5 日目には軟骨部分の内側から硬骨化が始まっているのが確認できるようになる。切断後 7 日目には、明らかな骨肥大が形成されているのが分かる(図 1)。

図1 骨肥大の形成過程(生後1日目で切断)



前肢の切断に反応しておこる骨肥大形成は、他の日齢においても観察できるが、日齢が進むにつれて肥大の程度は低下する傾向にあった(図 2)。

今回観察された骨肥大は基本的には骨折治癒における骨肥大と同じものと考えられる。しかしながら、より若い新生児ほど肥大の程度が大きかったことは、一般的に若い個体ほど再生能力が高いと考えられていることと対応しているように思われる。

このように若い新生児ほど高い骨形成能を持つことから、この能力を、切断によって失われた骨パターンを再生させるために利用できることを期待して、以降の実験は基本的に PN1 の新生児マウスを用いて行った。

図2 異なる日齢での骨肥大形成



(2) 繊維芽細胞の培養

基部先端部軸 (PD 軸) 方向に異なるレベルから単離した前肢の皮膚繊維芽細胞を混合培養し、採取した場所ごとに選別を起こすかどうかを調べた。しかし皮膚由来の細胞は明らかに複数種存在し、その細胞ごとの細胞塊は観察できたものの、PD 軸の違いに位置に対応した選別を観察することはできなかった。

複数種ある細胞から、できるだけ単一種に近い状態の細胞を用いて同様の実験を行おうと、継代培養を行ったが、細胞継代を経るに従って細胞の繊維化が進んでしまい、選別実験に移行させることはできなかった。

(3) 人工傷表皮の誘導

① 解離表皮細胞や脇腹表皮組織の移植

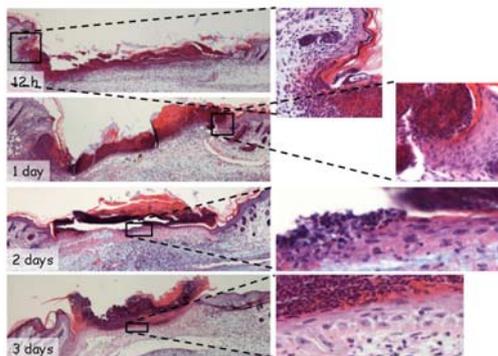
体幹部から単離した解離表皮細胞の懸濁液を、切断した前腕につくった皮膚ポケット内に注入したが、麻酔から覚めた新生児が激しく動くことにより、表皮細胞は切断面上に期待どおりに定着しなかった。プラスチックカラムをポケットに挿入することにより、定着の効率を上げようと試みたが、マウスが手足を動かす際にカラムが外れてしまい、改善には至らなかった。

次に前肢切断面を覆うのに十分な大きさの表皮組織を脇腹から採取し、これを直接切断面上に移植する実験を行った。移植後7日目に観察したところ、移植表皮が切断面上に定着していることが確認できた。しかし組織切片化して観察すると、表皮は本来の層構造をとっておらず、表皮細胞の分化のバランスが崩れてしまっていることが分かった。移植という操作を経たため、表皮-間充織間の相互作用が途絶えたしまったか、または前肢切断面の間充織とは十分に相互作用できなかったことが理由であると考えられた。いずれにしても傷表皮が形成されたとするには不十分な結果であると考え、細胞や組織の移植による傷表皮形成を断念し、②の実験に移行した。

② 器官培養系における傷表皮の形成

上記のように、当初計画していた解離表皮細胞の移植や、脇腹からの表皮組織の移植では、期待していた傷表皮の形成は難しいことが分かった。そこで改めて創傷治癒過程における傷表皮の形成過程を観察した(図3)。

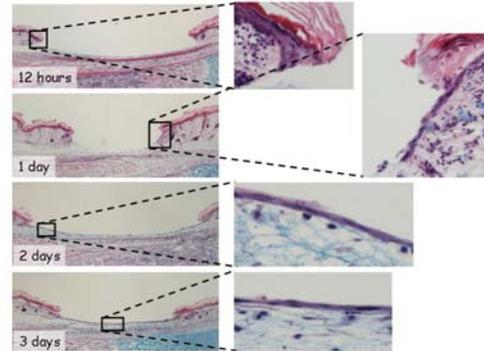
図3 創傷治癒における傷表皮形成(*in vivo*)



皮膚を切り抜いて創った創傷部の表面には血餅が形成される。創傷から24時間ほどで傷末端の表皮が移動を初め、血餅の下に潜るようになり、創傷部を覆い始める。両生類

では傷表皮は約24時間で傷口を完全に覆ってしまうため、これに比べるとマウスの傷表皮形成はかなり遅いといえる。そこで血餅が生成されない状況下で、マウス傷表皮の形成に影響が出るかどうかを調べるため、傷を創った前腕部を器官培養系に持ち込んだ(図4)。

図4 創傷治癒における傷表皮形成(*in vitro*)

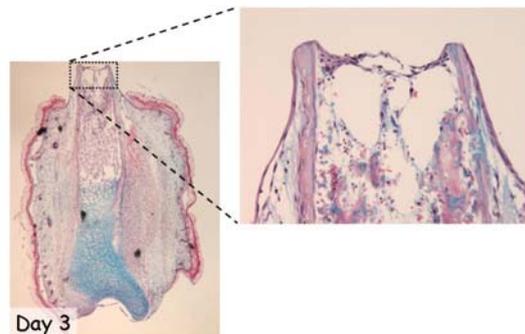


器官培養系において、表皮細胞は創傷から12時間の時点ですでに移動を開始していることが確認できた。傷表皮が傷口を完全に覆うまでには3日ほどかかり、これは*in vivo*で必要とする日数と大きな違いはなかった。ただし器官培養系で形成される傷表皮は、表皮細胞一つ一つにおける核の割合が高く、おそらくは基底層由来の未分化な表皮細胞によってつくられていることを示唆していた。

この結果は、血餅の有無だけが傷表皮形成を阻害する要因であることの証明には成らないが、何らかの条件さえ満たせばマウスの創傷治癒過程でも両生類型に似た傷表皮を形成する能力を持っていることを示唆している。

次に、前腕中央部分を「切り株状」に切り取り、器官培養を行った。その結果、創傷治癒の器官培養と同じように、傷表皮の速やかな形成が観察され、培養開始から3日目には切断面中央にある骨の末端部分までも表皮細胞が到達していることが分かった(図5)。図4のように表面が平坦な創傷部だけでなく、図5のような、切断面から骨が突き出たような場合も、傷表皮は形成可能であった。

図5 切断前肢の器官培養

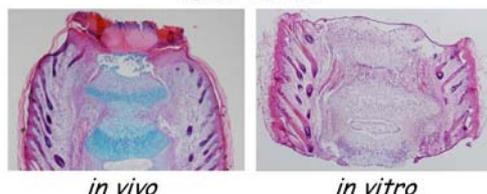


③ 尾部組織を用いた器官培養実験

以上の実験は、マウス四肢表皮が両生類型の傷表皮を形成できる可能性を示したという意味で非常に重要な結果であったが、一方でマウスの四肢は中央の骨などの組織と皮膚の結合が緩いため皮膚の収縮が起こりやすく、安定した条件で実験を行い、結果を比較することが観察することが難しい。そこで骨と皮膚の結合がより密な尾部組織を用いて、器官培養実験を行った。両生類では尾部再生における再生芽形成と伸長も、四肢再生と同様の仕組みで行われると考えられている。皮膚の収縮が四肢よりも少ないと期待できることから、傷表皮形成については、尾部組織の方が観察しやすいと考えられた。

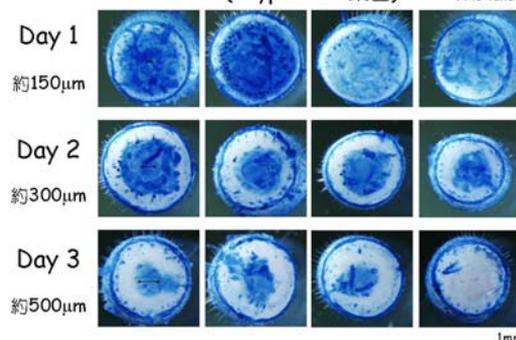
尾部先端を切断すると、切断面上に血餅が形成され、切断から3日目の段階で傷表皮が血餅の下へ潜り込んでいるのが観察されたが、傷表皮をつくる表皮細胞は細胞質の割合が高く、未分化様の細胞はあまり含まれていなかった。一方で培養した尾部の切断面上に形成された傷表皮は、②の培養創傷治療で形成されたものと同じ、核の割合が高い細胞1-2層から形成されていた(図6)。

図6 *in vivo*と*in vitro*における傷表皮形成の比較
切断から3日目



培養尾部における傷表皮形成の速さを調べるために、培養後に whole-mount の trypan blue 染色を行った(図7)。傷表皮は切断/培養開始から1日目には切断面周辺部から約150 μ mほど内側まで形成されていた。これが2日目には約300 μ m、3日目には約500 μ mのところまで広がっていた。組織切片上では図6にあるように、切断/培養開始から3日目には傷表皮が切断面上を完全に覆っているように見えたが、実際に3日目の時点で傷表皮が完全に閉じていたのは4例中1例のみであった。しかしこの一例が示すように、何らかの条件が揃えば、培養下で傷表皮は3日以内の形成可能であると考えられる。傷表皮形成の最適条件を探すと共に、各種成長因子を培養液中に添加することで、傷表皮形成までの時間を短縮できないか、また傷表皮の形態や遺伝子発現をAEC様にするのができないか、試みた。FGF1, FGF2, FGF7, FGF10, TGF β 1, TGF β 3をテストしたが、いずれもコントロールと大きな差は生じなかった。

図7 培養尾部組織における傷表皮の形成
(Trypan blue染色) *PN6 tails



以上の結果は、両生類・四肢再生の最も早い段階で形成される傷表皮を、マウスの新生児においても形成可能である可能性を示唆している。

今後は、傷上皮の形成を *in vivo* において実現し、さらに両生類・四肢再生の神経因子(FGFなど)を添加することで、傷表皮からAECを誘導することができるかを調べていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 哲也 (ENDO TETSUYA)

愛知学院大学・教養部・講師

研究者番号：90399816