

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：33902

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22124006

研究課題名（和文）哺乳類における四肢再生系の構築

研究課題名（英文）The study of limb regeneration ability in mammals

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） 68,800,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトなどの哺乳類での四肢再生実現を目指して、マウスと四肢再生モデル動物である両生類との間で、四肢切断に対する反応性の違いを比較した。両生類では四肢を切断されると再生芽が形成され、失われた部分を再生する。マウスでは再生芽は作られないが、残された基部側の組織では骨の切断端に軟骨カルスが作られ、また特定の条件下では切断面を傷表皮が速やかに覆うなど、両生類と同様の反応が起きていることが分かった。一方で、切断面で再生する神経の軸索を調べた結果から、両生類では神経からの因子に依存して起きる現象が、マウスでは起きてないことが示唆された。この違いが、両者の再生能力の違いを生み出す原因であると考えられる。

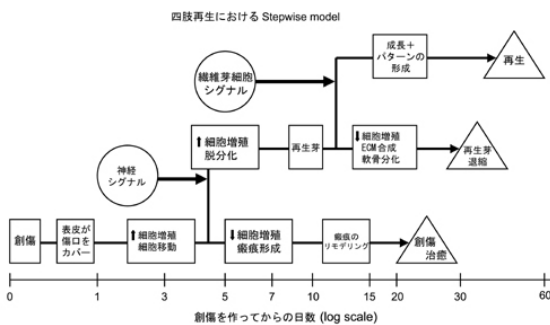
研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism of limb regeneration that differs between mammals (non-regenerative) and amphibians (regenerative), responses to limb amputation were compared between mice and African clawed frogs. The frogs can form a regeneration blastema that eventually develops into a lost part of the amputated limb, although mice cannot. In mice, however, cartilaginous calluses are formed around the cut edge of the amputated bones in the limb stump; and the amputation surface is covered by the wound epidermis rapidly in certain conditions, both of which occur and are thought to be important for limb regeneration in amphibians. On the other hand, the wound epidermis is well-innervated in the frogs, but the one in mice is not. Since blastema formation is nerve-dependent, whether or not nerves can interact with the wound epidermis might be one of the key processes to separate successful nerve-dependent blastema formation in the frogs and failure in mice.

研究分野：発生生物学

キーワード：四肢再生 創傷治癒 骨折治癒 両生類 哺乳類 器官再生 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

これまで器官再生のモデルとして長年に亘って研究されてきた四肢再生は、主に有尾両生類を用いて行われてきた。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。これまで筆者らは、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(図1)。



< 図 1 >

有尾両生類が四肢の完全再生のモデルであるのに対して、ツメガエルを代表とする無尾両生類は、不完全再生のモデル動物といえる。ツメガエル成体では四肢切断後に rod 状の構造(スパイク)しか形成できないからである。ツメガエルでは前述した「四肢再生の3段階」のうち、最後のパターン形成の仕組みに異常があると考えられる。このスパイク形成においては、これまでいくつかのパターン形成遺伝子の発現が、発生過程の発現とは異なることが示されている。

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」と「再生芽細胞に、どうやってパターンを作らせるか」に絞ることができる。

近年、再生医療研究の進展には目覚ましいものがあるが、そのほとんどは細胞移植技術を用いたものであり、細胞分化に関する研究が中心である。しかしながら再生させようとしている器官や組織は三次元的な「かたち」を持っている。本研究が始まった当初、「かたち」を意識した再生医療研究は、あまり行われていない状況にあった。まして手足という複雑な構造を丸ごと再生させることを目指した挑戦的な研究はなかった。

2. 研究の目的

本研究では再生研究に「かたち」の概念を

改めて導入し、哺乳類における四肢の再生を目指した。

前述のように四肢再生モデル動物である有尾両生類から得られた知見から、四肢再生過程は「創傷治癒」・「再生芽形成」・「パターン形成」の3段階から成り、これらを順に移行していくことが分かってきた(図1)。このモデルを適用すると、四肢を切断された哺乳類は創傷治癒過程で再生のカスケードを停止した状態なのではないかと推測できる。本研究では、哺乳類(マウス)が四肢を再生できない原因が「再生芽形成」と「パターン形成」を制御する仕組みの中にあると仮定した。これらを分子生物学的かつ網羅的に解析し、両生類の四肢再生機構と比較することで、再生できない原因となっている要因を探った。またその原因を改善することで、マウスの四肢上に再生芽を形成し、ここから四肢のパターンを再生させることを目指した。

3. 研究の方法

本実験は全て DDY 系統のマウス新生児を用いて行われた。新生児前肢を前腕中央部分で切断し、カルスを形成させた。再生モデル動物としては、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)を用いた。ツメガエルは前述のように不完全再生のモデルであるが、再生芽を形成することはできる。本研究では再生芽形成モデルとして、マウスと比較した。変態直後の小個体を使用し、マウスと同様に前肢を前腕中央部で切断して再生芽を形成させた。

(1) 傷表皮誘導実験

器官培養

マウス新生児(生後1日目)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。

Hydrocolloid シート

創傷治癒における Hydrocolloid シートの影響を見る実験では、マウス新生児の前腕中央部の皮膚を内径1.5mmのバイオブシールドで取り除き、その上に小さく切った市販の Hydrocolloid シートを貼り付け、テガダームによって固定した。

(2) 再生阻害実験

マクロファージ除去実験

マウスでは、生後0, 1, 2日目に3日間連続で、Clodronate 内包 liposome (Clo-lipo) を前腕部に直接注射し、生後2日目のうちに前肢を切断した。ツメガエルでは前肢切断の3, 2, 1日前から Clo-lipo を前肢に注射し、3回目の注射の翌日に切断を行った。

除神経肢におけるカルス形成

マウスでは2種類の除神経実験を行った。

まず一つ目は両生類で行われている手法と同じで、前肢切断と同時に前肢に侵入する神経束を脇の下部分で可能な限り切断した。二つ目の実験では、より確実に神経の影響を排除するために、前腕中央で切断した前肢切り株部分から、皮膚以外の内部組織を切除し、それを脇の下の皮下に移植した(図 5 のイラストを参照)。

ツメガエルでは、前肢切断と同時に、肩の部分で前肢に侵入する神経束を全て切断した。

(3) 傷表皮における神経分布の解析

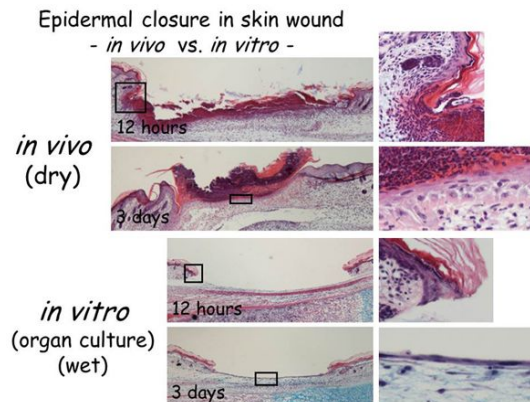
マウス、ツメガエル共に、まず上腕部の皮膚をくりぬくことで小さな創傷部を作った。次に前腕神経を肘付近で切断し、基部側の神経切断末端を引っ張り出して、神経の切断末端を最初に作った創傷内へ配置した(図 6A 参照)。

4. 研究成果

両生類の四肢再生では切断に反応して様々なイベントが起こり、その結果として再生芽が形成される。再生芽を形成できないマウス(新生児を使用)と再生芽を形成できるツメガエル(不完全再生モデル; 変態直後の小個体を使用)の四肢において、切断に伴って起きるイベントを詳細に比較解析し、再生芽形成の有無を分ける仕組みを考察した。それによって以下のことが明らかになった。

(1) マウスでも wet な環境であれば傷表皮は迅速に作られる

両生類では四肢の切断後数時間から 1 日以内に切断面が傷表皮で覆われるのに対し、マウス新生児は血餅が作られることなどが原因で、傷表皮の形成には数日以上時間がかかり、また形態も一定にならない。これは四肢の皮膚の一部を切り抜いて作った創傷部でも同じである。しかしそのようなマウス創傷部の器官培養を行うと、傷口が両生類様のきれいな傷表皮で覆われることが分かった(図 2)。すなわち傷表皮を形成する能力に、マウスと両生類の間で大きな差はないと思われる。



< 図 2 >

培養のような wet な環境を in vivo でも実現するために、hydrocolloid シートを創傷上に固定する実験系を確立した。これによってマウス in vivo においても、1-2 日できれいな傷表皮を作らせることに成功した(図 3: 写真は創傷形成後 4 日目の肥厚した傷表皮)。すなわちマウスでも wet な環境を作ることができれば、両生類と同じように迅速に傷表皮を作ることが可能であることが分かった。

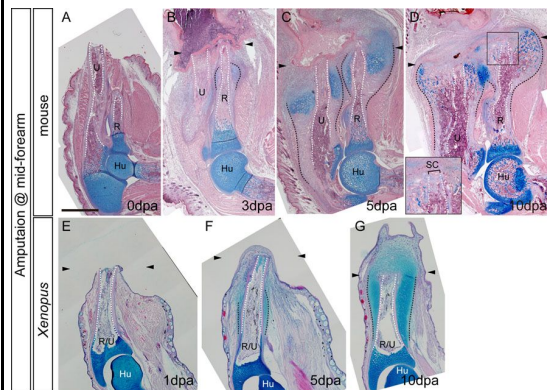
Hydrocolloid bandage helps the epidermis to close the wound surface



< 図 3 >

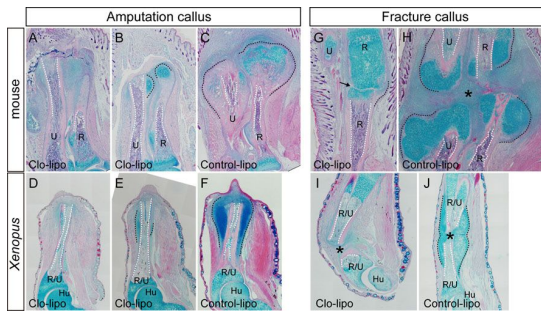
(2) 骨切断端に作られる「切断カルス」は、マウス・両生類に共通の再生反応である

マウス新生児の前肢を切断した際に見られる変化の中で最も顕著なものに、骨の切断端における軟骨カルス(切断カルス)の形成が挙げられる。両生類との比較によって、同様の軟骨カルスはツメガエルやアホロートル(完全再生モデル)にも作られることが分かった(図 4: マウス[上段]とツメガエル[厳談]の写真のみ)。カルスの形態に近いツメガエルとマウス間でさらなる比較を行ったところ、以下の 2 点が明らかとなった。



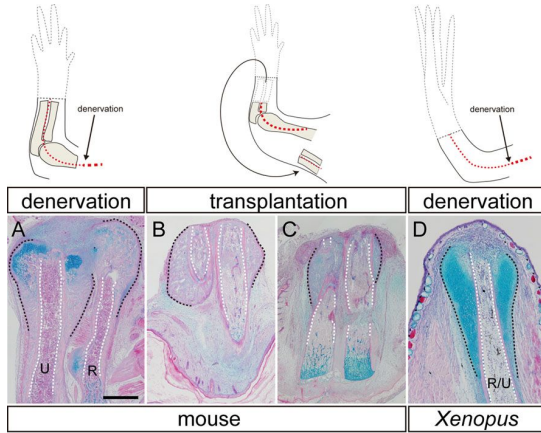
< 図 4 >

切断とほぼ同時に一過的なマクロファージ除去試薬である Clo-lipo を投与することによって、両動物で切断カルス形成が阻害された(図 5A-F)。このことから両動物の切断カルス形成の初期段階には、マクロファージの存在が必要であるという共通点があることが分かる。またマクロファージ除去によって、骨折時に作られるカルスの形成も阻害されることが分かった(図 5G-J)。



< 図 5 >

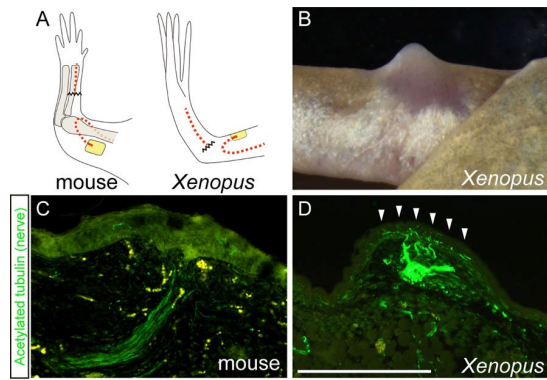
両動物において切断カルスは、前肢を除神経した状態でも形成された(図 6A: マウス; 図 6D: ツメガエル)。またマウス前肢前腕部の皮膚以外の組織を腕から切り離した上で、体幹部付近の皮下に移植した場合にも、大きさなどは小さいものの、カルス自体は形成されていた(図 6B, C)。これらのことから少なくとも切断カルスの形成開始は、神経非依存的に起きると言える。



< 図 6 >

(3) 両生類の傷表皮には多くの再生軸索が侵入するが、マウス傷表皮には軸索は侵入しない

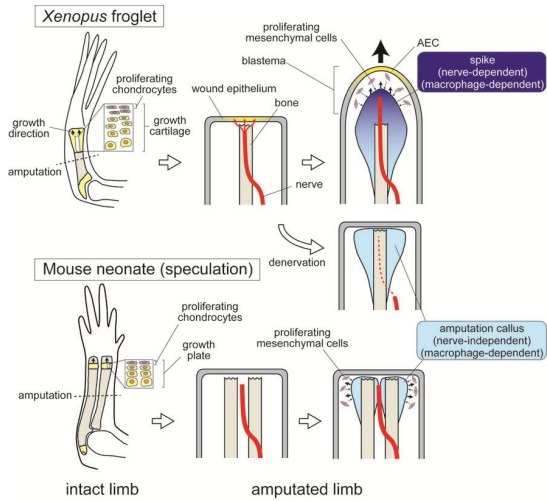
上記 2 点はツメガエルとマウスにおいて共通に見られる再生イベントであったが、両者の間で見られる切断直後の差として、傷表皮に対する神経軸索の侵入の有無があることを、ALM 実験(図 7A)によって見出した。ツメガエルで ALM 実験を行うと創傷部から再生芽が形成される(図 7B)。ツメガエルにおいては再生芽形成に先立って、切断面付近の神経末端から伸びる再生軸索が傷表皮内へと大量に侵入する(図 7D)。一方マウス新生児では、傷表皮内に軸索はほとんど確認できなかった(図 7C)。ツメガエルの再生において神経は、傷を覆った直後の傷表皮を、再生芽の伸長に必要な AEC と呼ばれるシグナルセンターへと変化させる。マウス傷表皮では AEC マーカー遺伝子の発現は確認できない。これらのことより神経軸索の侵入が起きないことが、マウスでは AEC が作られないことの原因ではないかと考えられる。



< 図 7 >

以上の成果をもとにマウスで再生芽を形成できない原因をモデル化し、図 8 に示した。

四肢再生モデル動物であるツメガエルと再生できない動物であるマウスのどちらも、四肢切断に反応して速やかに傷口を傷表皮で覆う能力を持っている。また骨の切断末端では、マクロファージの存在下で軟骨カルスが形成される。ツメガエルでは切断された神経の末端から再生する軸索が直上の傷表皮へと侵入し、これによって傷表皮は AEC へと分化する。軟骨カルスは AEC からの作用を受けて、先端部方向へ増殖し再生芽が形成され、最終的にスパイクが作られる。一方でマウスでは、再生軸索が傷表皮へと侵入しない。そのため傷表皮は AEC へと変化できず、再生芽も伸長できないと考えられる。



< 図 8 >

(4) 増殖因子等の投与によるマウス再生芽誘導の試み

両生類で再生芽形成に関与するとされる様々な因子(BMP, FGF, B10, Hh agonist など)を投与することで、マウス切断前肢に再生芽を誘導することを試みた。しかしこれまでのところ再生芽様の構造、もしくは骨構造を誘導できたのは、既に東北大学・井出宏之らによって報告されている BMP だけであった。これらの因子は主に間充織側に作用することが予想されるため、因子の作用を受けて再生芽を作るべき間充織細胞に、因子を受容し再

生芽形成へ向けて反応する能力がない可能性が考えられる。

(5)今後の展望

本研究では、マウス新生児の前腕切断部に再生芽を作らせることは成功しなかったものの、再生芽を形成できない原因の解明に向けては、一定の方向性を示すことができた。

本研究から得られたツメガエルに関する知見を考え合わせると、ツメガエルの四肢を切断したときに作られるスパイクは、切断カルスが先端部方向へ伸長したものである可能性が考えられる。本研究によってツメガエルとマウスに作られる切断カルスは同等のものであると示されたことから、マウスも「スパイクを作る材料となる細胞」は持っていると考えられる。スパイクのように一定方向に骨を伸ばせるようになることは、骨折治療などの医療の観点からも重要である。

今後、まず目指すべきことは、再生芽伸長に関わる因子(AEC 因子)をマウスに与えることで、切断カルスの成長を先端部方向へ制御し、スパイク様の構造を作ることであると考ええる。そのためにはマウス間充織細胞が、なぜそのような因子に対してほとんど反応しないのかを明らかにしていく必要がある。その上で、持続的に AEC 因子を作用させるために、マウスで AEC 形成を誘導する方向へ展開すべきだろう。スパイクの形成を実現した上で、最終的にそのスパイクに四肢としてのパターンを持たせる研究へと向かうべきだと考える。

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 4 件)

Miura, S., Takahashi, Y., Satoh, A., Endo, T., Skeletal Callus Formation is a Nerve-independent Regenerative Response to Limb Amputation in Mice and Xenopus., *Regeneration*, 査読有、accepted

Endo, T., Gardiner, D. M., Makanae, A., *Satoh, A., The accessory limb model: An alternative experimental system of limb regeneration., *Methods in Molecular Biology*, 査読無、1290 巻、2015、101-113

Egawa*, S., Miura*, S., Yokoyama, H., Endo, T., and Tamura, K. (*:co-first authors), Growth and differentiation of a long bone in limb development, repair and regeneration., *Dev. Growth Differ.*, 査読有、56 巻、2014、410-424

Mitogawa, K., Hirata, A., Moriyasu, M., Makanae, A., Miura, S., Endo, T., Satoh, A., Ectopic blastema induction by nerve deviation and skin wounding: a new regeneration model in *Xenopus laevis*, *Regeneration*, 査読有、2014、26-36、DOI: 10.1002/reg2.11

[学会発表](計 8 件)

<国内学会>

三浦慎一郎、遠藤哲也、四肢再生反応におけるマクロファージの影響、第 14 回日本再生医療学会、2015、3、19、横浜市・パシフィコ横浜

三浦慎一郎、遠藤哲也、マウスとツメガエルの四肢再生反応におけるマクロファージ除去の影響、日本動物学会第 85 回大会、2014/9/11、仙台市・東北大学

三浦慎一郎、遠藤哲也、両生類との比較から得られるマウスの四肢再生に向けた課題、第 13 回日本再生医療学会総会、2014/3/5、京都市・国立京都国際会館

三浦慎一郎、遠藤哲也、再生上皮形成の有無から見たマウス四肢再生能、日本動物学会第 84 回大会、2013/9/28、岡山市・岡山大学

三浦慎一郎、遠藤哲也、Comparative study of limb regeneration between amphibians and mammals、第 46 回日本発生生物学学会大会、2013/5/30、島根市・くにびきメッセ

三浦慎一郎、遠藤哲也、両生類との比較から探るマウスの四肢再生能、日本動物学会、2012/9/15、大阪市・大阪大学豊中キャンパス

<国際学会>

Miura, S. and Endo, T., Differences in Limb Regeneration Ability between Mammals and Amphibians: Toward Successful Regeneration in Mammals., CDB Symposium 2014 Regeneration of Organs: Programming and Self-Organization, 2014 年 3 月 10-12 日、神戸市・発生再生科学総合研究センター

Endo, T., Conceptual Shift of Limb Regeneration -From Amphibians to Mammals-, The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting "from Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)", 2011/11/24-26、神戸市・発生再生科学総合研究センター

〔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・准教授

研究者番号：90399816