

国立研究開発法人理化学研究所

事業実施期間：開始 平成30年4月1日～終了 令和2年3月31日

申請者役職・氏名 研究員 武尾 真

研究・事業名

指・四肢再生技術開発に向けた概念実証研究

交付申請内容

研究・事業の目的及び意義

次世代の再生医療として3次元器官再生医療の実現が期待されているが、四肢再生を可能とする基盤技術は未だ確立されていない。本研究グループではこれまでに高精度の細胞操作技術である「器官原基法」を開発し、機能的な毛包や歯の再生を実証してきた。本研究では、「器官原基法」によるマウス成体での指再生誘導法を確立するとともに、再生に必要な細胞種の同定を行う。本研究により、哺乳類成体における指・四肢再生技術の開発に向けた新たなコンセプトの実証と基盤技術の確立が期待される。

研究・事業の方法及び手段

本研究グループは、これまでに胚発生過程で器官のもととなる器官原基を生体外で再現する「器官原基法」を開発し、機能的な毛包や歯、分泌腺の再生に世界に先駆けて成功している (*Nature Methods*. 2007, *PNAS*. 2009, *PLoS ONE*. 2011, *Nature Commun*. 2012, *Sci. Rep.* 2012)。

加えて、爪上皮幹細胞と指先再生の分子メカニズムを明らかにし、爪器官が指全体の再生を誘導することを示し、哺乳類成体においても指・四肢再生が可能であることを示した (*Nature*. 2013)。しかしながら、この再生能力は指先に限定されており、より基部側で指が切断された場合再生は起こらない。一方、四肢のもととなる胎児期の肢芽(四肢の器官原基)は全体を再生できる能力を持っていることが知られている。これらの結果は、適切な細胞集団があれば哺乳類成体においても指全体や四肢再生が可能であることを示唆している。そこで本研究ではこの可能性を確かめるために以下の研究を行う。

1. 器官原基法による肢芽再生方法の確立

肢芽の再構成方法を確立するために、各発生段階のマウス

胎児の肢芽から上皮および間葉細胞を単離し、「器官原基法」により再生肢芽原基を作製する。作製した原基をマウスの成体内に移植し、経時的な組織学的解析を行うことにより肢芽再生可能な肢芽の発生段階を特定する。

2. 再生肢芽原基移植による成体マウスでの指再生誘導の概念実証

マウス胎児細胞を用いて作成した再生肢芽原基を切断した成体マウスの指に移植し、再生に与える影響を、特に骨、神経、血管の再生に焦点を当て、組織学的、定量的に解析を行う。組織学的に解析する。成体マウスの指の切断は基部一末端軸に沿って複数の位置で行い、再生可能な切断位置を明らかとすることにより、哺乳類成体において指再生が可能か検証を行う。

3. 指再生に必要な細胞集団の同定

指再生誘導が可能な発生段階の肢芽を組織学的特徴に従い複数の領域に分けて再生肢芽原基を作製することにより、指再生に必要な細胞集団の位置を推定する。推定された領域と他の領域で遺伝子発現プロファイルを次世代シーケンスにより比較し、再生誘導能を持つ領域の細胞で発現量の高い細胞表面抗原を特定する。フローサイトメーターを用いて、これらの表面抗原を発現する細胞を分取し、器官誘導能を評価することにより指再生に必要な細胞の特定を行う。

研究・事業の特徴(新規性、独自性等)

器官再生に関する研究は、すでに組織工学の分野で数十年にわたり研究が進められたものの、その実現は達成されなかった。近年、生体環境を再現した環境で成体組織幹細胞を培養することによりほとんどすべての器官から微細組織(オルガノイド)を形成できることが示された。しかしながら、指・四肢オルガノイド形成の報告はされていない。また、これらのオルガノイドは数ミリ程度と非常に小さく、また、器官全体としての構造も機能も回復するには至っておらず、移植可能なレベルに達するには多くの課題が残されている。

申請者の所属する研究室は、生体外で上皮性幹細胞と間葉性幹細胞を高密度で区画化して配置する器官原基法を開発し、歯や毛包、外分泌腺を生体内で構造的にも機能的にも完全に再生させることが可能であることを実証した。さらに、申請者は哺乳類数少ない再生可能な器官である指先再生のメカニズムを明らかにし、爪器官がより高次の指先の再生を誘導することを見出した。

再生医療の実現のためには、基礎生物学的な研究に加え、基礎研究のための新たな解析技術の開発や、ヒトへの応用へ向けた生物医工学的研究の融合と、互いへの分野へのフィードバックが必要不可欠である。申請者の基礎生物学的研究の知識と経験と生物医工学的研究に大きな実績を有する研究室のノウハウが融合することにより、独自の視点に立ったより効率的な研究と、新たなイノベーションの創出が期待される。

研究・事業により期待される効果

哺乳類の器官は様々な細胞からなる複数の組織が三次元的配置することにより形作られる。現在の再生医療は筋肉や骨、血管、神経などの二次元的組織の移植にとどまっており、次世代再生医療として3次元器官再生医療の基盤技術の確立が期待されている。しかし、ほとんど全ての器官は胎児期に発生し、器官再生誘導能のある幹細胞は胎児期にのみ存在しており、成体での器官形成機構が解析できないという本質的な問題が存在する。このため、胚発生過程での器官形成メカニズムや、両生類などのヒトとは進化的に大きく隔たった再生力の強い動物の再生メカニズムを基に哺乳類成体での3次元器官の再生を目指すという戦略が広く取られている。しかしながら、現在までのところこれらの戦略により哺乳類成体において3次元器官を再生し得るという実証は無い。

本研究では哺乳類における数少ない再生可能な器官である指再生をモデルとすることで、哺乳類での器官再生の実証が得られるとともに、器官再生に向けてより実際的な基盤技術の開発と新たな戦略がもたらされるものと期待される。本研究課題の達成は、先天的・後天的な指の喪失に対し、革新的・根本

的な治療法を実現し、患者のQOLを大きく改善するばかりではなく、内在性の再生機構とバイオエンジニアリングの融合による3次元器官再生の誘導という新たな戦略の実証なり、次世代の革新的な再生医療である3次元器官再生医療の実現に大きく貢献することが期待される。

実績報告内容

研究・事業の内容及び目標達成状況

本研究は哺乳類成体における指・四肢再生技術の開発に向けた新たなコンセプトの実証と基盤技術の確立を最終目標として、「器官原基法」によるマウス成体での指再生誘導法を確立し、再生に必要な細胞種の同定を目的として以下の研究を行った。

1. 器官原基法による肢芽再生方法の確立

四肢の基となる肢芽再生方法確立に向け、胎児期の肢芽から上皮および間葉の細胞を単離し、器官原基法により再生肢芽を作製した。再生肢芽の発生能を評価するため、複数の生体外培養条件または複数の生体内移植条件を検討したところ、組織学的評価においていずれの培養方法においても肢芽の成長は見られるものの、適切な四肢パターンは見られず、再生可能な肢芽の発生段階を特定するには至らなかった。

2. 再生肢芽原基移植による成体マウスでの指再生誘導の

概念実証

爪器官再生による指先再生誘導の可能性を明らかにするために、爪器官再生方法の確立を行った。成体マウスの爪器官細胞を用いて再生爪器官原基を作製し、異所的または同所的に移植を行ったところ、天然爪と同様の構造を有する爪様構造の発生が観察された。再生爪器官原基を切断後の成体マウス指に移植したところ、移植物の生着は確認されたが指全体の再生は認められなかった。

3. 指再生に必要な細胞集団の同定

マウス成体において爪器官誘導能を有する上皮性幹細胞および間葉性幹細胞を明らかにするため、細胞表面抗原マーカーのスクリーニングを行い、複数のマーカー候補遺伝子を同定した。また、これらの幹細胞を、器官誘導能を維持したまま、増幅する生体外培養方法を確立した。

今後の展開

本研究により、器官原基法により作成した再生肢芽原基は生体外および生体内で成長可能であることが示唆された。これまでの先行研究から、四肢のパターニング過程においては複数の形態形成因子やエピジェネティック制御、生体リズム、ダイナミックな細胞動態の関与が示されている。今後、上記のパターニングメカニズムがどのように生み出され、協調的に働くのかを明らかにするとともに、再生肢芽原基においてこれらのメカニズムを再現する方法を確立することにより、正常発生可能な機能的な肢芽再生技術の確立が期待される。

また、本研究において成体マウス爪器官由来細胞が、爪器官形成能を持つことが明らかになったとともに、器官形成能を維持したまま爪器官由来上皮性幹細胞と間葉性幹細胞を増幅する培養方法が確立された。これらの結果は、ヒト成体の爪器官由来細胞も同様の能力を有している可能性を示しており、無爪症や外傷による先天的および後天的爪器官欠損に対する根本的な治療法の開発に繋がると期待される。現在、ヒト爪器官由来細胞を用いた研究を進めるとともに、複数の医療機関および大学との共同研究の準備を進めている。

これまでに、筋肉や骨、血管、神経、表皮などの指や四肢を構成する二次元的組織が構築されている。本研究において、爪器官を作り出すことが可能となったことから、これらの組織、器官を生体外で統合することによる、機能的な指、四肢再生の実現性が高まったと考えられる。これらの組織の統合には従来の生物学的アプローチからでは難しいと考えられるため、マイクロ・ナノデバイスなどの異分野領域の研究者との共同研究の準備を進めている。