

病理学2

組織再生

フロンティア医学研究所組織再生学部門

三高 俊広

平成28年11月1日 病理学2

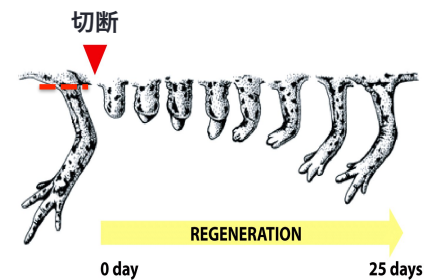
学習項目

1. 再生とは
2. 組織幹細胞
3. 全能性幹細胞
4. 再生医学

平成28年11月1日 病理学2

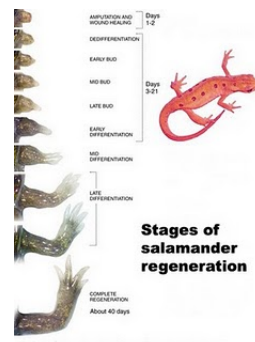
イモリ（両生類）の下肢の再生

イモリの下肢の再生



Molecular Biology of the Cell 5th から引用

サンショウウオの上肢の再生



- 肩の付け根の神経が損傷されれば再生されない

平成28年11月1日 病理学2

“ヒトの体は再生するだろうか？”

平成28年11月1日 病理学2

「再生」の定義

形態的にもまた機能的にも、失われた組織と同等に復元されること

平成28年11月1日 病理学2

ヒトの足は再生するか？

NO



事故により切断した左足

平成28年11月1日 病理学2

ヒトの指の再生

指を切っても

繋ぐことはできる
(機能的に再生することは可能)



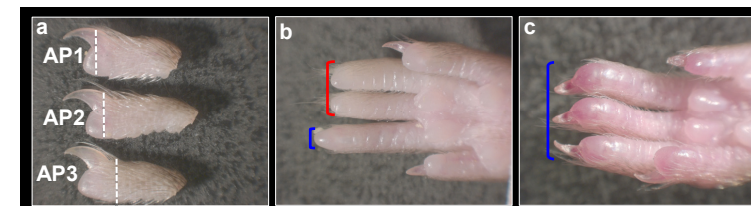
弘前大学整形外科HPより

But… 指が生えてくることはない

ヒト (ほ乳類)の指は再生しない、と考えられてきました

平成28年11月1日 病理学2

マウス指先の再生



Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip
Rinkevich Y, Lindau P, Ueno H, Longaker MT, Weissman IL. Nature 476: 409-414 (2011)

A wide range of tissue stem/progenitor cells contribute towards the restoration of the mouse distal digit

AP2-3の部分に様々な**組織幹細胞**が存在する



平成28年11月1日 病理学2

組織再生

ほ乳類においても条件が整えば組織の再生が起こる可能性がある

ヒトでも再生する臓器・組織がある

平成28年11月1日 病理学2

肝臓の再生 Liver Regeneration



Prometheus Bound, Peter Paul Rubens (Philadelphia 美術館蔵)

ギリシア神話の時代

Prometheus

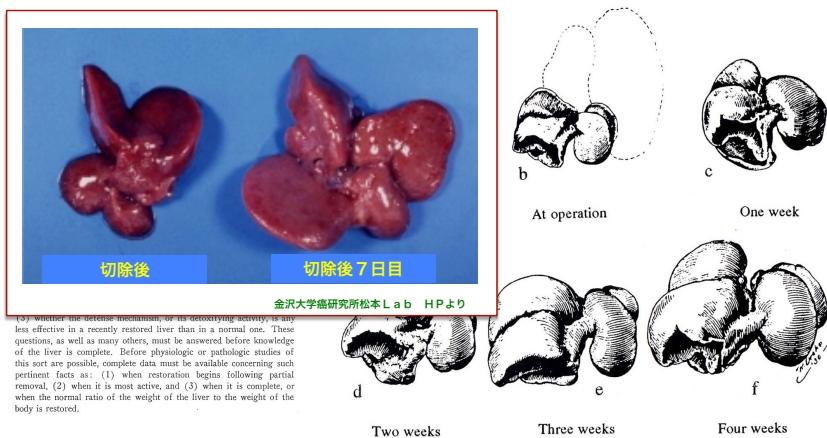
ギリシア神話

人間に火を与えたことで、Zeusの怒りをかい、コーカサスの山の岩に鎖で繋がれ、永遠に大鷲に肝臓をついばまれる刑に処された。Prometheusは不死の身であったので肝臓は翌朝には元に戻ってしまう。死ぬことも出来ず、毎日、永遠に苦しむ。

平成28年11月1日 病理学2

肝再生 Liver Regeneration

ラット2/3部分肝切除 Partial Hepatectomy (PH)



平成28年11月1日 病理学2

ヒトには寿命がある



細胞にも寿命がある



構成細胞数を一定に保つ



恒常性の維持 (Homeostasis)

恒常性維持－ホメオスターシス (Homeostasis)

ヒトの成体は 約60兆 (6×10^{13}) 個の細胞からなる

個々の細胞は寿命がある

老いた細胞は死に、分裂によって新しい細胞に置き換わる

ヒトの体の細胞は、数年でほぼ全て入れ替わる

再生と細胞死のバランス

臓器・組織の大きさは、成体では一定

細胞死 > 新生細胞

*新生しない細胞

神経細胞
卵細胞

老化

臓器・組織の萎縮

平成28年11月1日 病理学2

ヒト正常組織の恒常性維持・再生

・生理的再生系組織 (Physiologically renewal system)

皮膚・毛、小腸、血球

・条件再生系組織 (Conditionally renewal system)

肝臓、結合組織、血管内皮、平滑筋

・非再生系組織 (non-renewal system)

神経細胞、骨格筋、心筋

平成28年11月1日 病理学2

生理的再生系組織 Physiologically renewal system

組織幹細胞 (Stem cells) が細胞を生み出している

- ・皮膚：
 - ・ 約1ヶ月
- ・爪：
 - ・ 0.1 mm/日 再生するのに3-6ヶ月
- ・毛髪：
 - ・ 約10万本 50-100本/日脱毛 2-6年成長
- ・血液：
 - ・ 赤血球 120日
 - ・ 顆粒球 ~2週間
 - ・ T細胞 4~6ヶ月 B細胞 数日~数ヶ月
 - ・ 血小板 10日
- ・小腸：
 - ・ 吸収上皮細胞 2~4日
 - ・ 杯細胞 3~5日
 - ・ Paneth cells 約30日
- ・子宮内膜：
 - ・ 28-30日周期
- ・精子：
 - ・ ~64日

平成28年11月1日 病理学2

幹細胞 (Stem Cells)

幹細胞
Stem cells

全能性幹細胞
Pluripotent stem cells

- ・ Embryonic stem (ES) cells
- ・ induced Pluripotent Stem (iPS) cells

個体を作る

組織 (体性) 幹細胞
Tissue-specific stem cells (Adult stem cells)

組織を作る

平成28年11月1日 病理学2

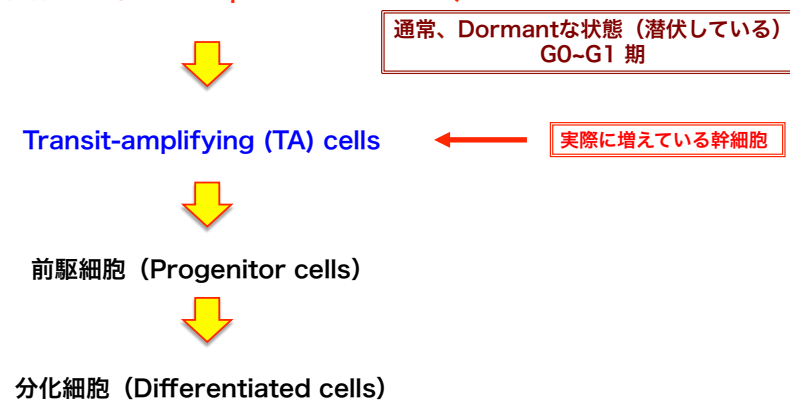
幹細胞 (Stem Cells)



平成28年11月1日 病理学2

組織幹細胞の特性

組織幹細胞 (Tissue-specific Stem cells)

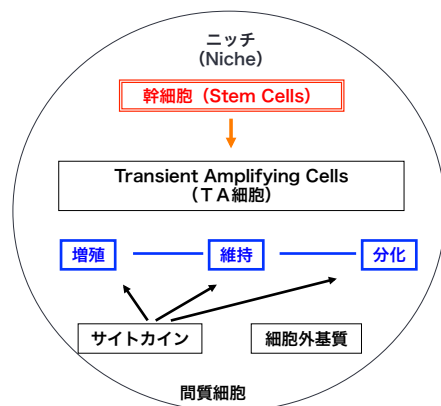


平成28年11月1日 病理学2

ニッチ (niche)

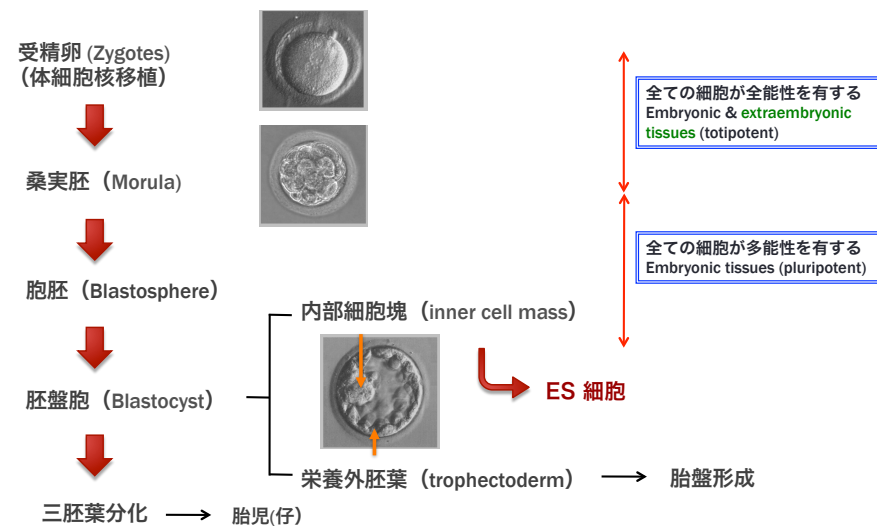
幹細胞の増殖・分化・維持に必要な環境：サイトカインと間葉細胞 (ストローマ細胞)

骨髄の構造と造血環境



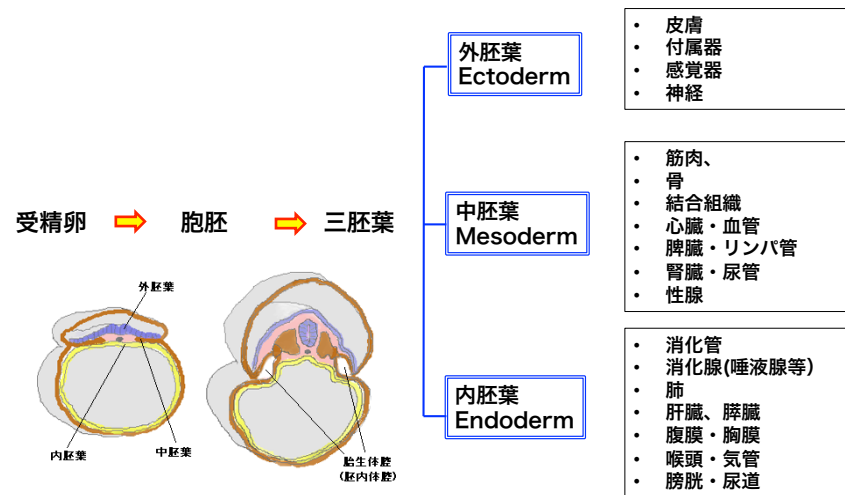
平成28年11月1日 病理学2

発生 — 胚性幹細胞 (Pluripotent stem cells)



平成28年11月1日 病理学2

三胚葉分化



平成28年11月1日 病理学2

再生医学の知識を応用して最初に行われた治療法は何か？

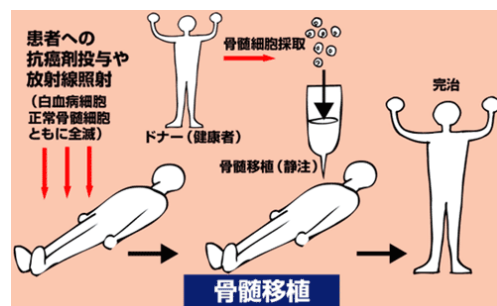
平成28年11月1日 病理学2

骨髄移植

骨髄移植が必要な病気

血液の病気

白血病
再生不良性貧血
骨髄異形成症候群
先天性免疫不全症候群



平成28年11月1日 病理学2

Example 1

血液の再生

血液の再生

造血組織

胎児期： 肝臓
成体： 骨髄

マウス骨髄中の造血幹細胞の頻度：

200 ~ 1000 cells
($<0.1\%$ of CD133⁺ cells)

Long-term quiescent (reserved: backup)
HSCs: 1 division/145 days

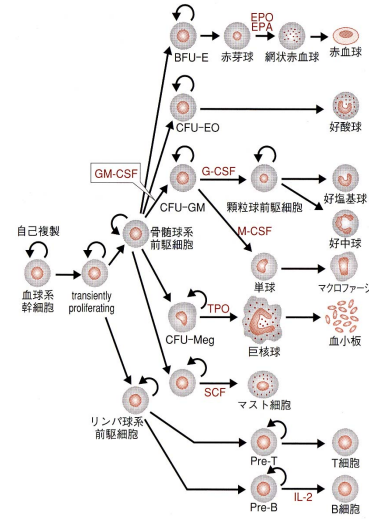
造血幹細胞 Actively cycling (primed)

有核細胞

4×10^6 細胞

赤血球

2.4×10^8 細胞



平成28年11月1日 病理学2

老化に伴う幹細胞枯渇

115歳で亡くなった女性の献体から判ったこと

Holstege H et al. Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. Genome Res. 2014 May;24(5):733-42.

- 末梢血中の白血球は、たった2個の造血幹細胞由来であった
- 白血球のtelomere長は、脳神経細胞に比較して17倍短かった

Most hematopoietic stem cells may have died from 'stem cell exhaustion,' reaching the upper limit of stem cell divisions."

Stem cell exhaustion is a likely cause of death at very old ages?

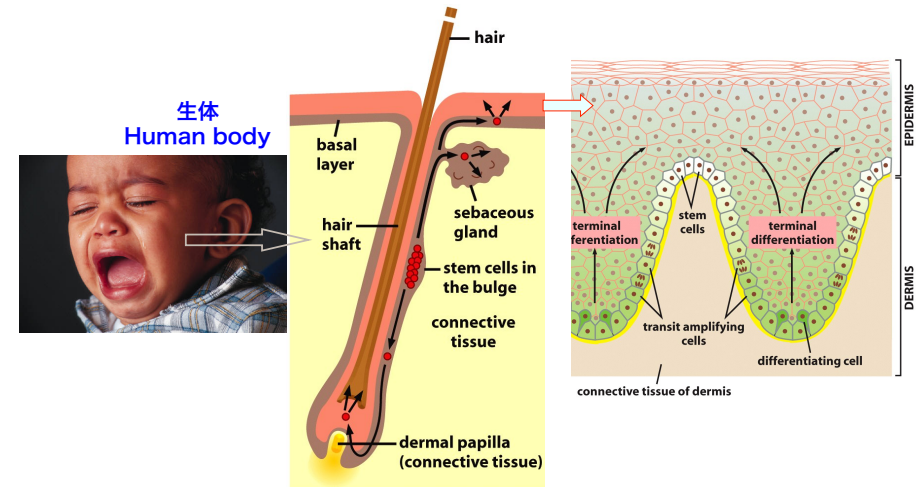
平成28年11月1日 病理学2

Example 2

皮膚の再生

平成28年11月1日 病理学2

ヒトの皮膚組織



Molecular Biology of the Cell 5th から引用

平成28年11月1日 病理学2

生理的再生系組織の再生　－　表皮



Example 3

小腸の再生

皮膚の再生



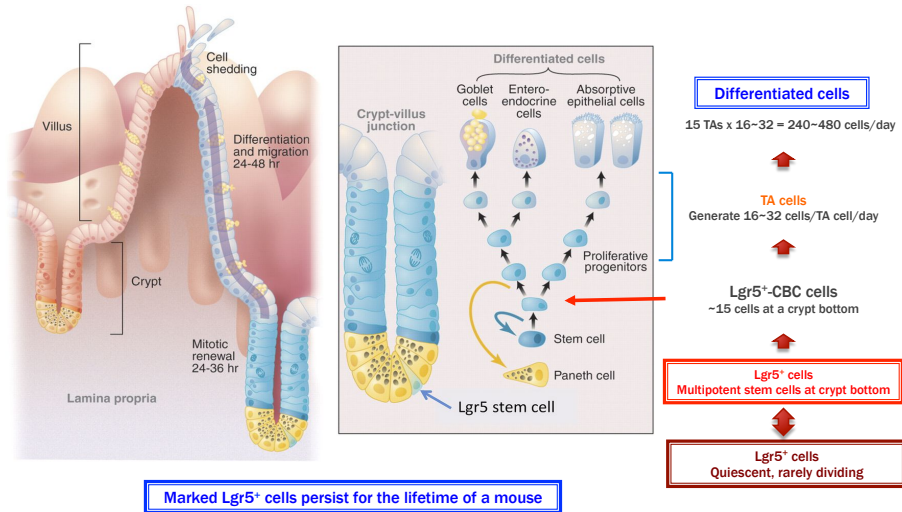
生理的再生系組織の再生 — 小腸



平成28年11月1日 病理学2

Paneth cellsは、nicheとして働いている

Small Intestine

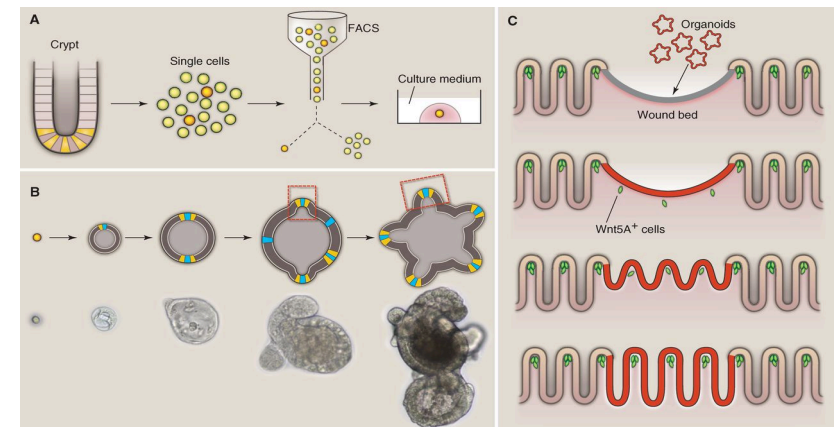


de Lau W et al. *Genes Dev.* 2014;28:305-316

平成28年11月1日 病理学2

Mini-gut culture system

1個のLgr5⁺ CBC cellsから小腸組織(organoid)を作る



T Sato, and H Clevers. *Science* 2013;340:1190-1194

ヒト正常組織の恒常性維持・再生

・生理的再生系組織 (Physiologically renewal system)

皮膚・毛、小腸、血球

・条件再生系組織 (Conditionally renewal system)

肝臓、結合組織、血管内皮、平滑筋

・非再生系組織 (non-renewal system)

神経細胞、骨格筋、心筋

平成28年11月1日 病理学2

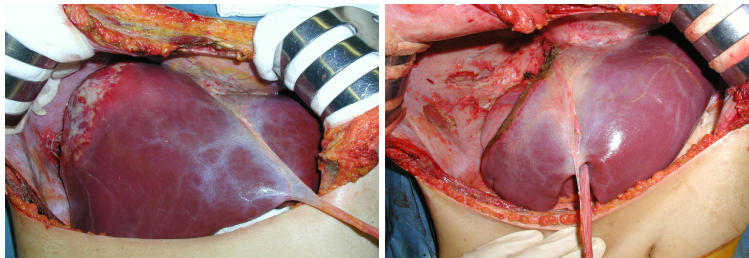
条件再生系組織 Conditionally renewal system

・肝再生 Liver Regeneration

・創傷治癒 Healing of wound

平成28年11月1日 病理学2

肝臓は再生する臓器



術前

術後1ヶ月

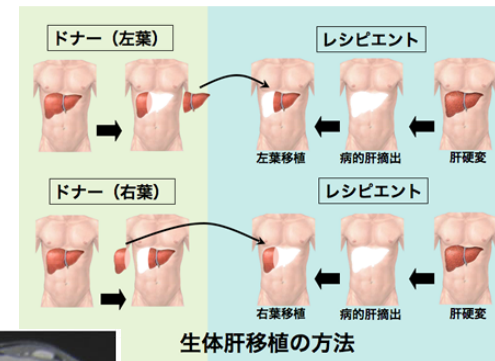
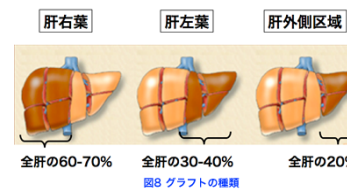
術後5年

平成28年11月1日 病理学2

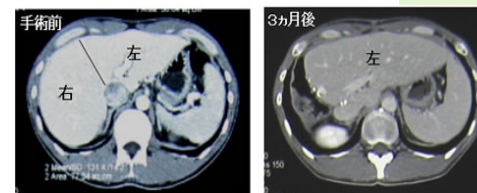
怪我をしたら必ず直る（再生する）か？

ヒト生体肝移植

手術方法



徳島大学外科HPより



<奈良医大HPより>

平成28年11月1日 病理学2

再生する組織 — 皮膚

切創



平成28年11月1日 病理学2

再生しない場合



アキレス腱手術



上腕の3度の熱傷

表皮化と拘縮により自然治癒



やけど後の肥厚性拘縮



一年後自然治癒

Wound Healing Center Homepageより

平成28年11月1日 病理学2

傷の治り方に違いがあるのは何故か？

再生する

VS

再生しない

- ・創傷の大きさ・深さ
- ・場所
- ・臓器・組織
- ・幹細胞の有無
- ・治療法
- ・年齢
- ・？

平成28年11月1日 病理学2

創傷治癒 Healing of wound

創傷 (Wound) : 体表面や体内臓器組織の損傷又は欠損

創傷治癒
Healing of wound

損傷部位が元の組織と同等に復元するか (再生)、
瘢痕(Scar)を残して修復(Repair)される機転

創傷治癒
Healing of wound

再生
Regeneration

形態的にも、また機能的にも失われた
組織と同等に復元されること

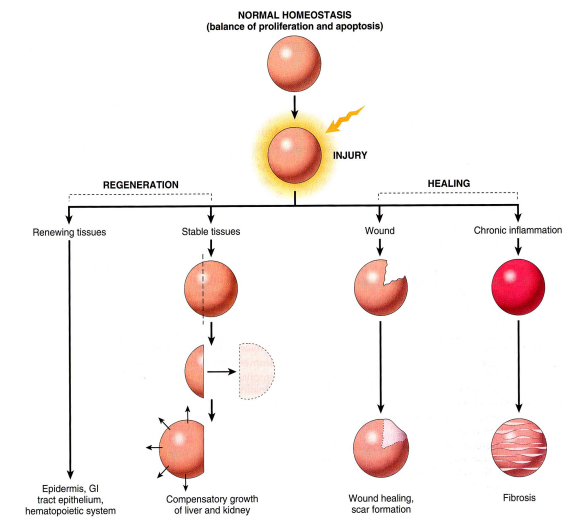
瘢痕
Scar

欠損組織が肉芽組織と (膠原collagen)
線維によって置換されること

*線維： 生体内の繊維については「線維」が使われる

平成28年11月1日 病理学2

再生と修復 (Regeneration and Healing)



平成28年11月1日 病理学2

けがをすると人の体はどう反応するか？

ナイフで手を切ってしまった

血が出る（出血）

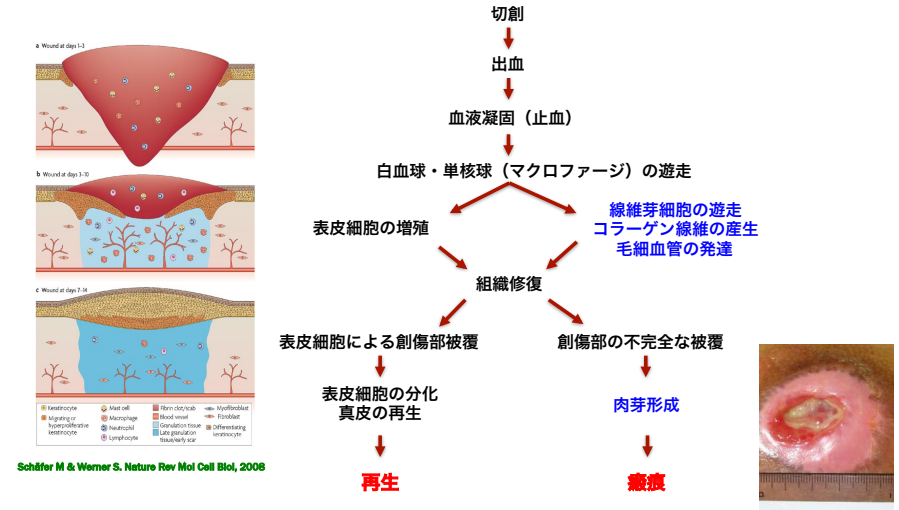
血が止まる（血液凝固）

傷口が熱くなって腫れて痛む（炎症）

治癒する

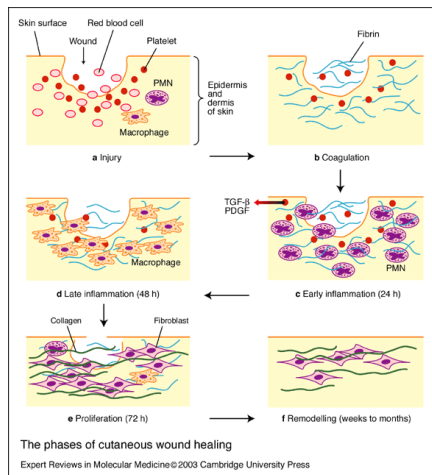
平成28年11月1日 病理学2

傷の治り方（創傷治癒過程）



平成28年11月1日 病理学2

創傷治癒過程と肉芽組織 Granulation



第一期：炎症反応期

受傷後4, 5日

- 血液凝固により止血し、血小板から放出されたサイトカインにより、好中球、リンパ球、単核球の遊走が起こる
- 単核球が貪食細胞（マクロファージ）になり、放出するサイトカインにより線維芽細胞の遊走を促進する（炎症の四徴）が起こる

第二期：増殖期（肉芽形成期）

受傷後～1, 2週

- 線維芽細胞による膠原線維（コラーゲン）産生
- 毛細血管の発達
- 肉芽組織形成

第三期：安定期

- コラーゲンの産生と分解が平衡化
- 細胞成分の減少
- 瘢痕化(Scar formation)

器質化
Organization

平成28年11月1日 病理学2

ケロイド(Keloid)

創傷治癒過程で膠原（コラーゲン）線維が過剰に作られることによっておこる

皮膚から盛り上がった腸膵状、線条状の硬い組織（良性線維増殖性病変）

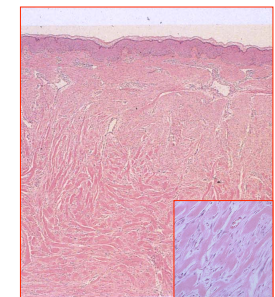
内因性・外因性：放射線被曝者や若い女性、精巣摘出患者に多い



胸部外科手術跡



ピアース跡



真皮に膠原線維

平成28年11月1日 病理学2

皮膚の再生医療

傷をきれいに治す（再生）ためにどのような方法が考えられるか？

表皮の細胞が増殖して傷口をできるだけ早く被覆できるようにする

- 傷口を小さくする
- 線維化しないように表皮細胞を補填する
 - 健常部から皮膚を取って移植する
 - 他人の皮膚を移植する
 - 自分の皮膚を作って移植する

再生医療

平成28年11月1日 病理学2

日本で最初の再生医療製品

自家培養表皮ジェイス®

ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
Japan Tissue Engineering (J-TEC)



H21年保険適用

8 cm x 10 cm (80 cm²)
(成人男性体表面積の0.5%)

306,000円/枚

<適応>

重症熱傷
深達度II度+III度>30%

平成28年11月1日 病理学2

ヒト正常組織の恒常性維持・再生

- 生理的再生系組織 (Physiologically renewal system)

皮膚・毛、小腸、血球

- 条件再生系組織 (Conditionally renewal system)

肝臓、結合組織、血管内皮、平滑筋

- 非再生系組織 (non-renewal system)

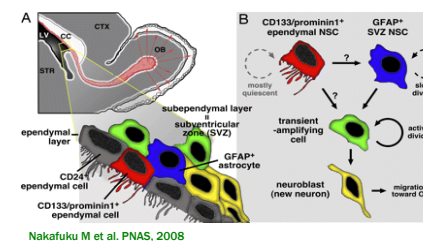
神経細胞、骨格筋、心筋

平成28年11月1日 病理学2

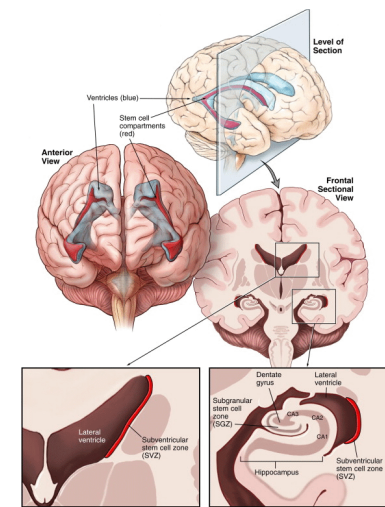
非再生系組織の再生 — 神経

中枢神経系の神経幹細胞

- 海馬歯状回
- 脳室周囲（側脳室）
- 嗅球



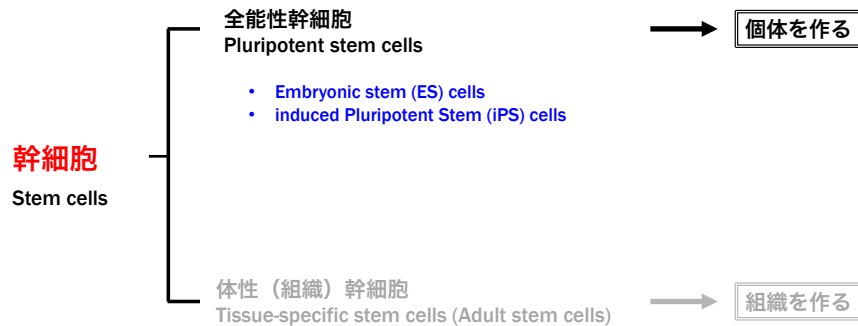
Nakafuku M et al. PNAS, 2008



Barani IJ et al. Int J radiat Oncol biol Phys, 2007

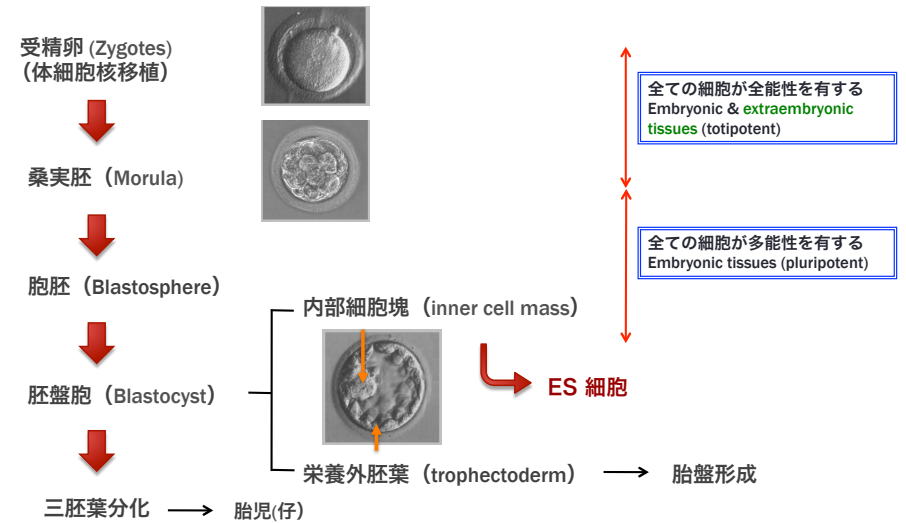
平成28年11月1日 病理学2

幹細胞 (Stem Cells)



平成28年11月1日 病理学2

胚性幹細胞 - Pluripotent stem cells



平成28年11月1日 病理学2

Induced-Pluripotent Stem Cells - iPS細胞

2006年8月

Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi,¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,3,4*}
¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan
³Cornea, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8593, Japan
⁴DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024

SUMMARY
Differentiated cells can be reprogrammed to an embryonic-like state by transfer of nuclear contents into oocytes or by fusion with embryonic stem (ES) cells. Little is known about factors that induce this reprogramming. Here, we demonstrate induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic or adult fibroblasts by introducing four factors, Oct4, Sox2, c-Myc, and Klf4, under ES cell culture conditions. Unexpectedly, Nanog was dispensable. These cells, which we designated iPS induced pluripotent stem cells, exhibit the morphology and growth properties of ES cells and express ES cell marker genes. Subcutaneous transplantation of iPS cells into nude mice resulted in tumors containing a variety of tissues from all three germ layers. Following injection into blastocysts, iPS cells contributed to mouse embryonic development. These data demonstrate that pluripotent stem cells can be directly generated from fibroblast cultures by the addition of only a few defined factors.

INTRODUCTION
Embryonic stem (ES) cells, which are derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, have the ability to grow indefinitely while maintaining pluripotency and the ability to differentiate into cells of all three germ layers (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Human ES cells might be used to treat a host of diseases, such as Parkinson's disease, spinal cord injury, and diabetes (Thomson

Oct3/4
Sox2
C-Myc
Klf4

体細胞から全能性幹細胞を作ることができた (iPS細胞：人工多能性幹細胞)

2007年11月

Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi,¹ Koji Tanabe,¹ Mari Ohnuki,^{1,2} Megumi Narita,^{1,2} Tomoko Ichisaka,^{1,2} Kichiro Tomoda,³ and Shinya Yamanaka^{1,2,3,4,*}
¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan
³Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA 94158, USA
⁴Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
*Correspondence: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp
DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019

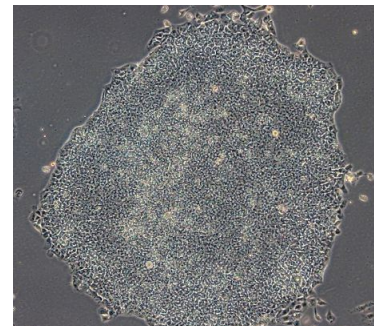
SUMMARY
Successful reprogramming of differentiated human somatic cells into a pluripotent state would

issues is to induce pluripotent status in somatic cells by direct reprogramming (Yamanaka, 2007). We showed that induced pluripotent stem (iPS) cells can be generated from mouse embryonic fibroblasts (MEFs) using only a few defined factors. Here, we show that

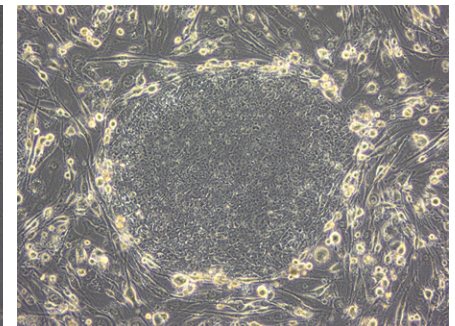
平成28年11月1日 病理学2

ヒトiPS細胞

Human ES cells



Human IPS cells

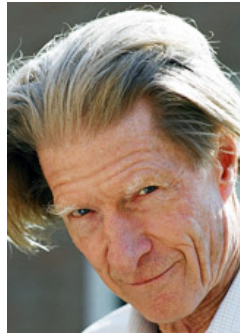


平成28年11月1日 病理学2

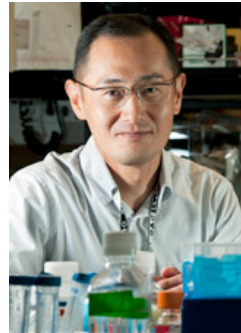
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012

was awarded jointly to **Sir John B. Gurdon** and **Shinya Yamanaka**

"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"



体細胞核移植による
reprogramming



遺伝子による
reprogramming

平成28年11月1日 病理学2

IPS細胞誕生までの背景

(1) Somatic cell nuclear transfer 体細胞核移植 (Cloning)

未受精卵に体細胞の核を移植すると遺伝子は初期化される

Differentiated cells retain the same genetic information as early embryonic cells

1975: cloned frogs ← Prof. J. B. Gurdonカエルの皮膚細胞核移植

1996: cloned sheep "Dolly" ← Dr. I. Wilmutの乳腺細胞核移植

(2) Pluripotent stem cell lines such as ES cells の研究が進んでいた

(3) 初期化遺伝子が同定されていた

(4) 転写因子 (transcription factors) が細胞の運命決定の "Master gene"

MyoD (1987): Formation of myofibers in fibroblasts

C/EBP α (2004): B & T lymphocytes to macrophages

平成28年11月1日 病理学2

体細胞核移植 - クローン動物の作製

体細胞核移植卵が産仔へ発生する割合
0.1~5%

核の由来	分化の程度	遺伝子の修飾	核移植後の個体への発生能
初期胚	-	-	正常個体
ES細胞	-	- ~ +	正常個体、産後直死
胎仔期生殖細胞	-	+	胎仔期で死滅
分化した体細胞	+	- (?)	形態形成異常、産後直死 正常個体
体性幹細胞	+ or -	- (?)	?

クローン羊ドリー

英国ロスリン研究所
Dr. Ian Wilmut
6歳雌羊乳腺細胞の核移植
約270回目

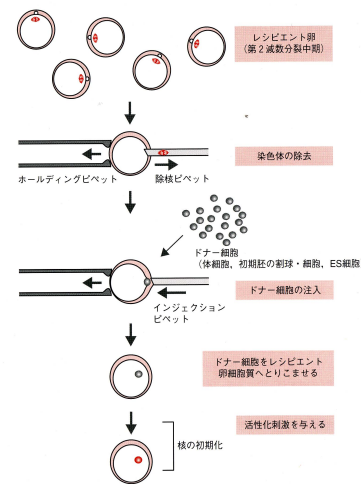


図1 ◆核移植の概略

平成28年11月1日 病理学2

核移植 による再生医療

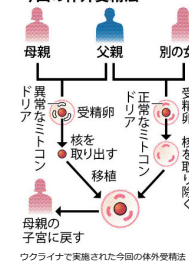


体外受精

遺伝親3人、不妊治療でも 2人妊娠 ウクライナ

毎日新聞 2016年10月12日 東京朝刊

ウクライナで実施された 今回の体外受精法



不妊治療を目的に、受精卵から両親の遺伝情報を含む核を別の受精卵に移す方法で、ウクライナの病院で依頼した女性が、3人の遺伝子を持つ子を妊娠したことが分かった。13日に米ニューヨークで始まる生殖技術の国際大会で発表される。先月末に米国の医師らが遺伝的に3人の親を持つ男児の出生に成功したことが判明したが、遺伝病対策が目的だった。今回は不妊治療のため、より安全性や倫理的な問題を巡り議論を呼びそう。

英科学誌ニューサイエンティストが報じた。ウクライナの首都キエフの不妊治療施設のチームは、第三者の健康な卵子を使った受精卵から核を除き、依頼者の受精卵の核を移植する「前核移植」と呼ばれる体外受精の方法で、女性2人の妊娠に成功した。胎児は現在、26週と20週で来年初めにも出産予定という。

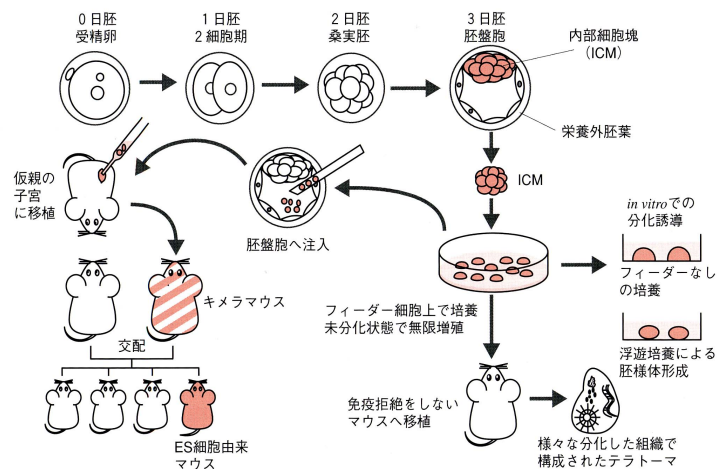
この手法は、細胞のエネルギー源を合成しているミトコンドリアが、加齢などで機能低下して不妊になるとする考えに基づき、健康なミトコンドリアと置き換えることで「卵子の若返り」を図るとされる。ミトコンドリアには核とは別に独自のDNAがあり、母親からのみ継承されるため、子どもは3人の遺伝子が受け継がれる。

米国の医師らが実施したのは、遺伝性のミトコンドリア病で流産が続く母親の核を、除核した第三者の卵に移植して受精させる方法だった。無事出産すればこの手法では世界初とみられる。

生殖補助医療に詳しい北海道大の石井哲也教授(生命倫理)は「生まれてくる子の健康にどんな影響が出るか分からず、子の福祉に反している。受精卵を破壊する点でも問題だ。不妊治療目的で広まれば、社会問題に発展する」と指摘する。【千葉紀和】

平成28年11月1日 病理学2

ES/iPS細胞 (Pluripotent Stem Cells)



平成28年11月1日 病理学2

細胞のPluripotency

細胞が全能性 (Pluripotency) を持つことを示すには？

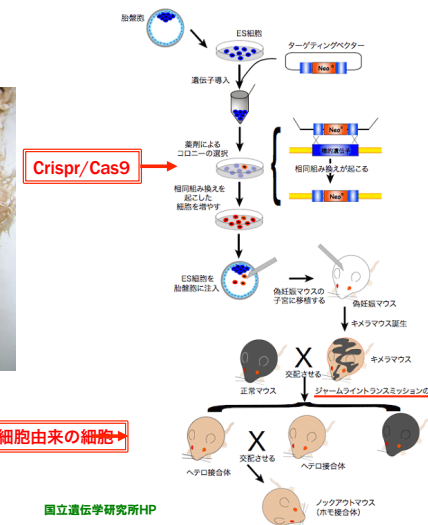
細胞を胚盤胞 (Blastocyst) に入れると正常発生し、キメラ動物になる

平成28年11月1日 病理学2

Knockout Mice



精子か卵子にES/iPS細胞由来の細胞



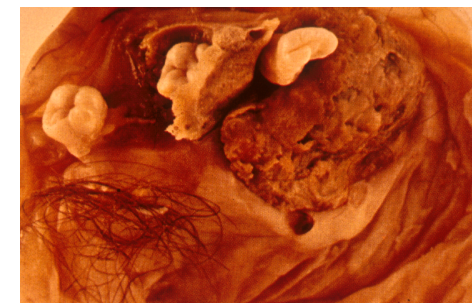
国立遺伝学研究所HP

平成28年11月1日 病理学2

Pluripotent stem cellsの問題点

・腫瘍 (奇形腫) 形成の可能性

奇形腫 Teratoma



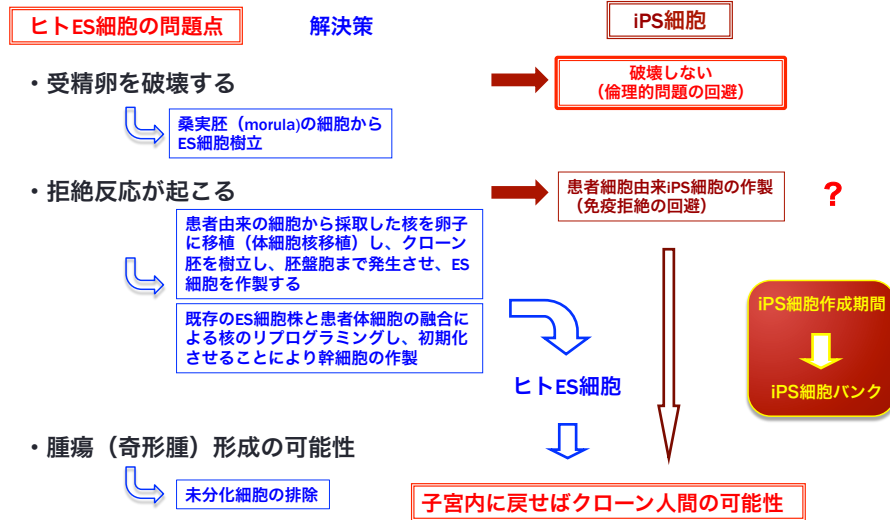
3胚葉由来の細胞・組織からなる

未分化な細胞を本来の組織とは別の部位に移植すると奇形腫 (Teratoma)が形成される

ヒトの卵巣・精巣腫瘍でよく見られる

平成28年11月1日 病理学2

IPS細胞が何故これほど期待されるのか？



平成28年11月1日 病理学2

Key Point 2

- ・幹細胞には、胚性幹細胞と体性（組織）幹細胞がある
- ・幹細胞は分化可能な細胞の種類から、全能性、多能性、単能性に分けられる
- ・幹細胞は、①自己複製能、②自己保持能、③娘（分化）細胞の供給能、を有する

平成28年11月1日 病理学2

Key Point 1

ヒトの体において

- ・正常組織は、その再生の仕方から3つに大別される
 - ・生理的再生系組織
 - ・条件再生系組織
 - ・非再生系組織
- ・創傷が治癒する過程には2種類ある。
 - 再生 (Regeneration) と修復 (Repair) → 元通りなるか、瘢痕 (Scar) を残すケロイド (Keloid) 形成
- ・創傷治癒は、炎症期、肉芽形成（組織 Granulation）期を経る
- ・再生するか否かは、組織と創傷の程度及び治療法による

平成28年11月1日 病理学2

Key Point 3

体性（組織）幹細胞

- ・生理的再生系組織において存在が明瞭
 - ・血液、皮膚、消化管において研究が進んでいる
- ・通常静止期にあり、細胞分裂は通常抑制されている
- ・TA細胞が分裂し分化細胞を供給する
- ・条件再生系組織においても組織の新陳代謝は起こっており、幹細胞も存在するが、分化細胞を供給しているか否か現時点ではよくわかっていない
- ・非再生系組織においても幹細胞は存在する
- ・幹細胞の増殖・分化・維持に必要な微小環境をニッチ (niche) という

平成28年11月1日 病理学2

多能性幹細胞 Pluripotent stem cells

- 全能性を持つ – 全ての組織の細胞に分化可能
- ES細胞、iPS細胞がある
- 再生医療への応用が期待されている
- 胚性幹細胞の利用には克服すべき問題点がある
 - 倫理的な問題
 - 技術的な問題
 - 腫瘍（奇形腫）形成