

病理学 2

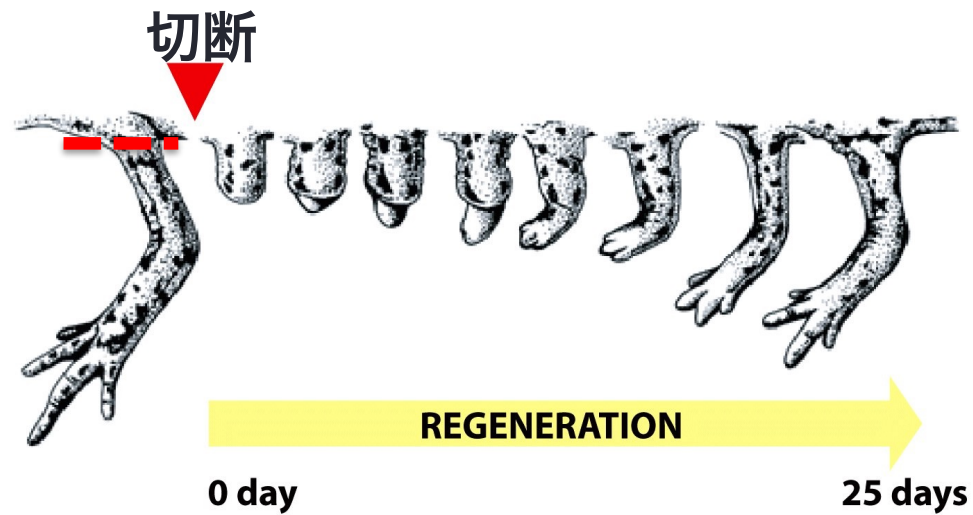
組織再生

フロンティア医学研究所組織再生学部門

三高 俊広

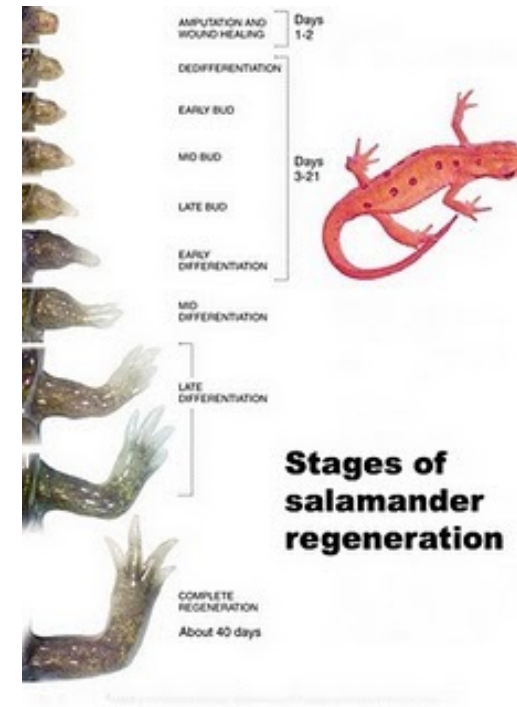
両生類の肢再生

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



“ヒトの体は再生するだろうか？”

ヒトの指は再生するか？



NO

指が生えてくることはない

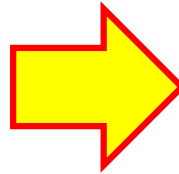
「再生」の定義

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

ヒトの指の再生

切断された指は再生しないが

繋ぐことはできる
(機能的に再生することは可能)

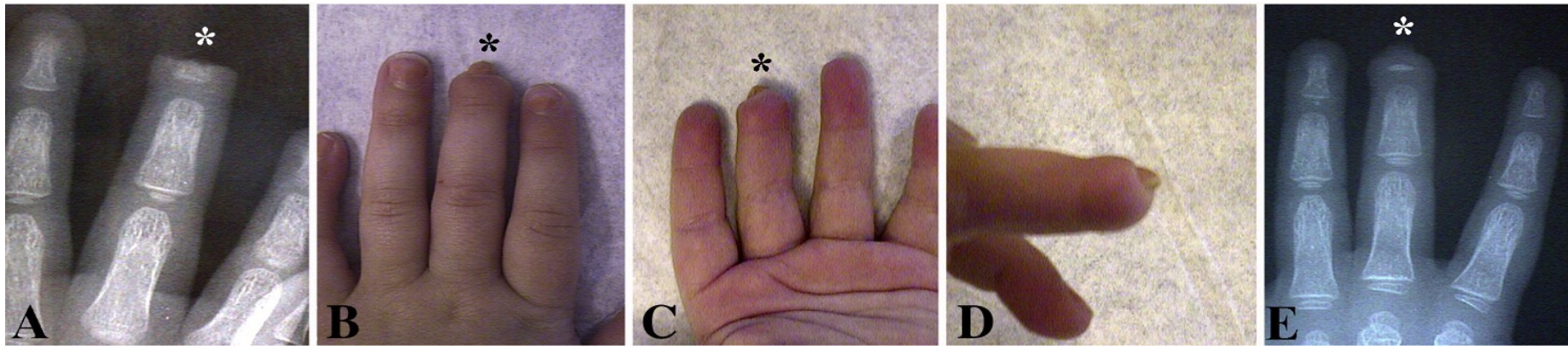


弘前大学整形外科HPより

定義の上では、「再生」とは言わない

ほ乳類の指先の再生

2歳の子供が指先を切断してしまった



Han M et al. Dev Biol 315(1): 125-135 (2008)

爪の一部がちょっとだけ再生

組織再生

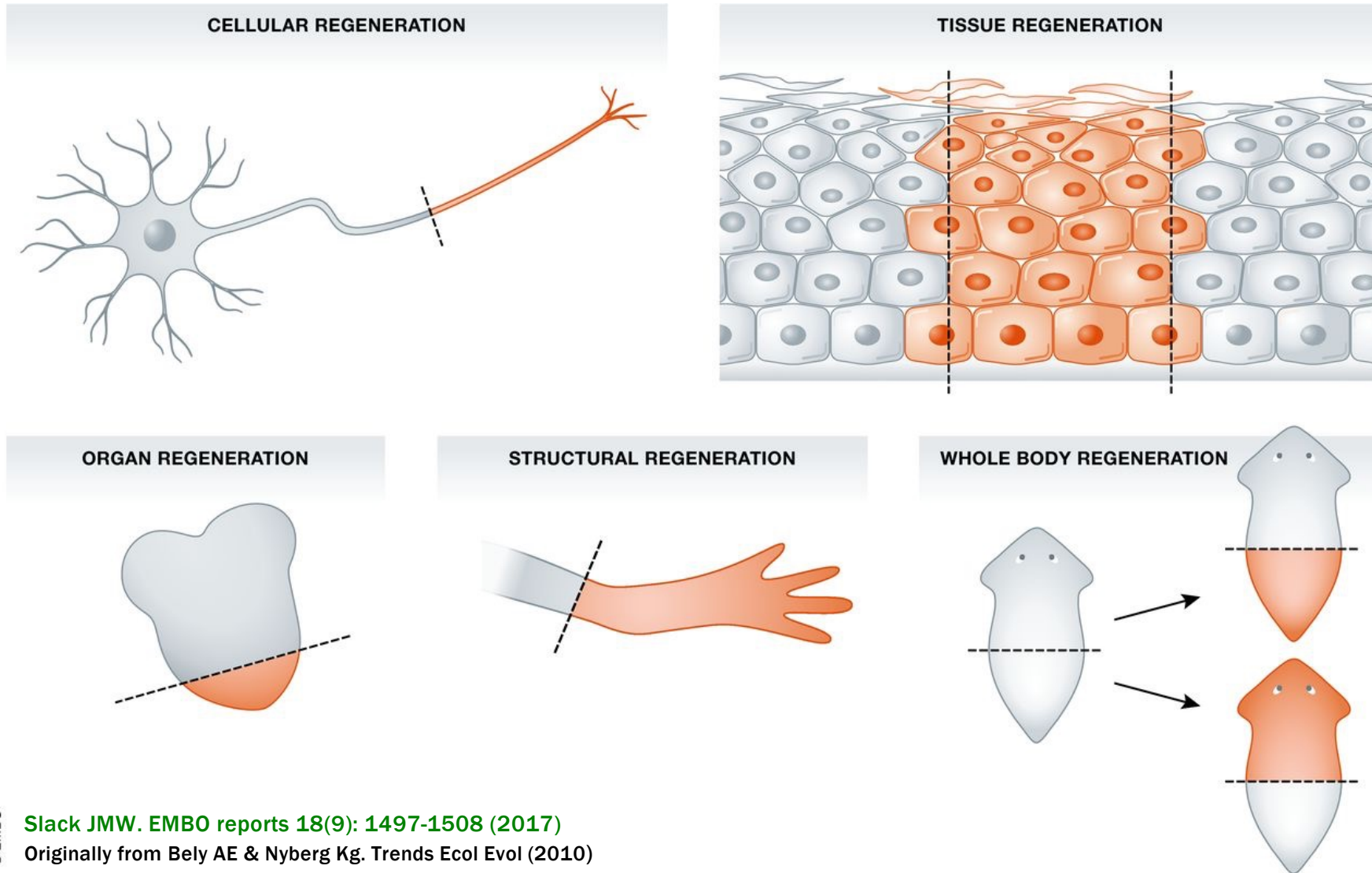
ほ乳類においても条件が整えば組織の再生が起こる可能性がある

動物における再生の仕組みについて考えるのが本講義の目的

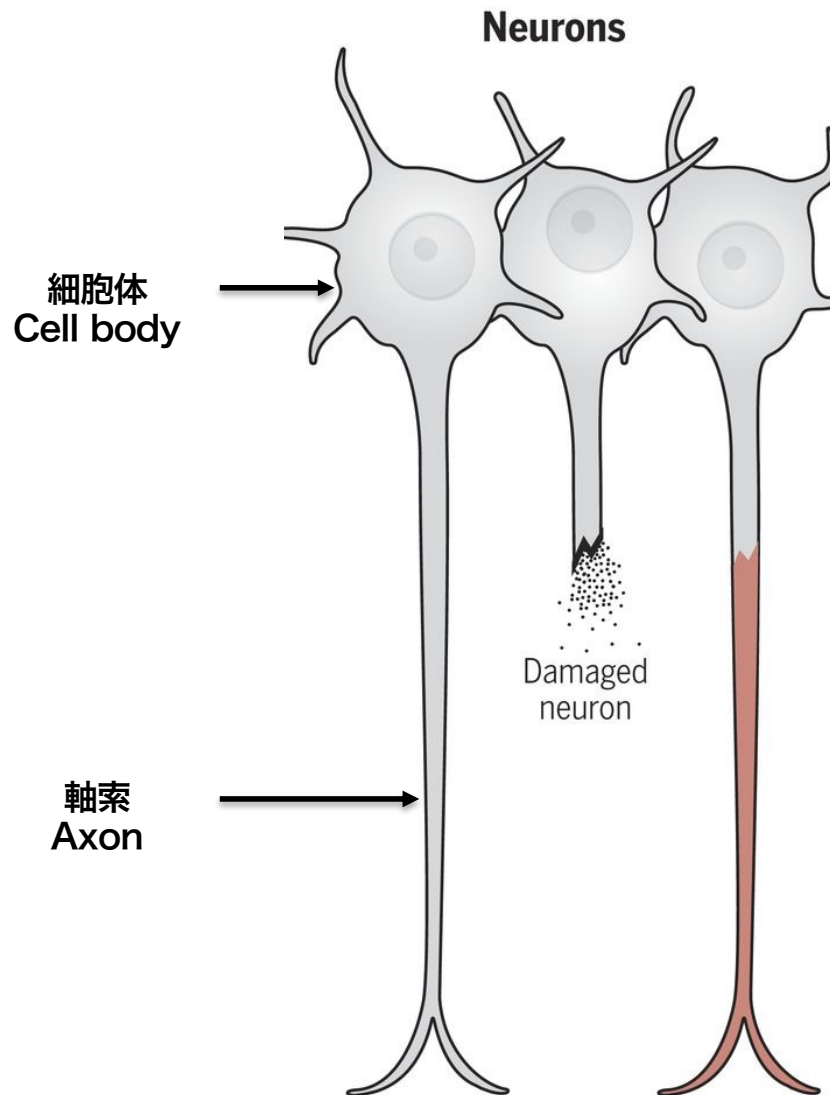
- | | |
|----------------------------|-------|
| 1. Cellular Regeneration | 1 細胞 |
| 2. Tissue Regeneration | 多細胞 |
| 3. Organ Regeneration | 器官・臓器 |
| 4. Structural Regeneration | 個体の一部 |
| 5. Whole body Regeneration | 個体全体 |

The five types of regeneration in animals

動物における “再生 Regeneration”



1. Cellular Regeneration



神経細胞は基本的に再生しない

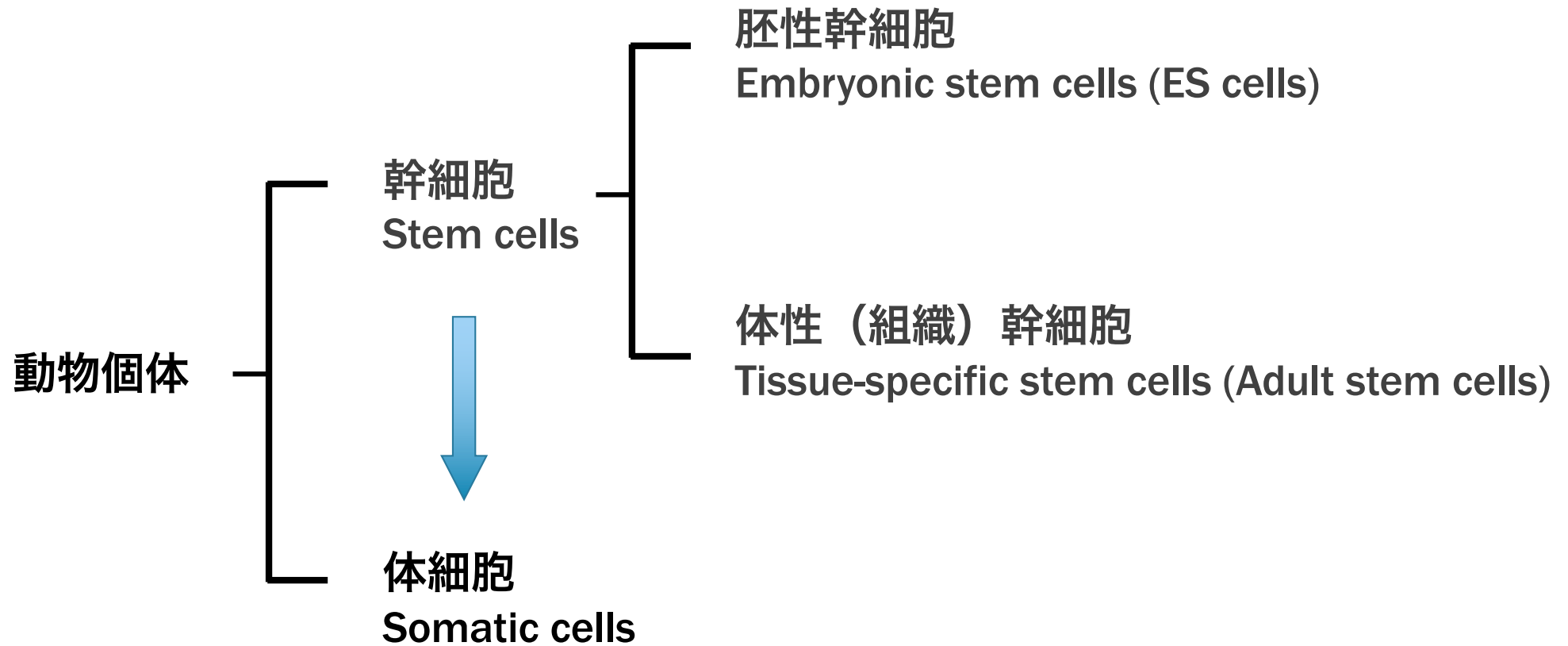
中枢神経系と末梢神経系では異なる

末梢神経系においては

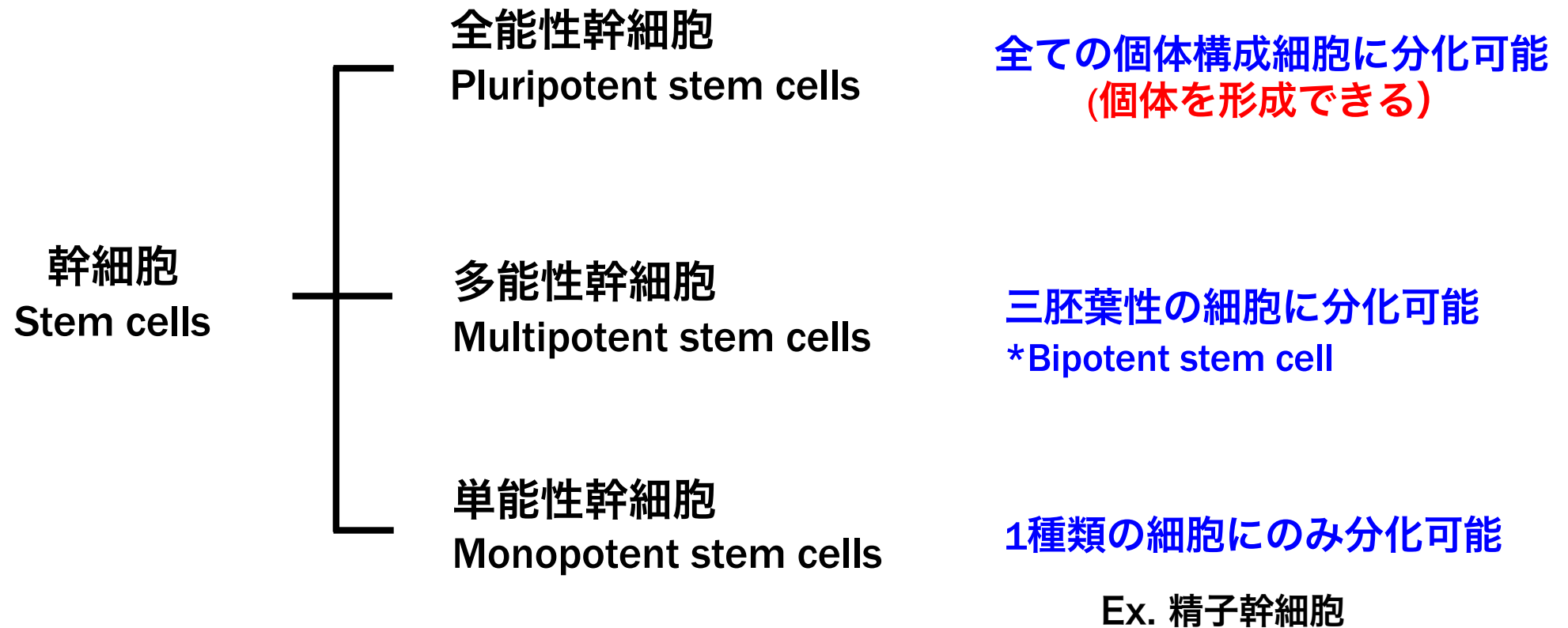
細胞体が無傷であれば、軸索が切断されても
再生可能である

Tang SK & Marshall WF. Science 2017

体を構成する細胞

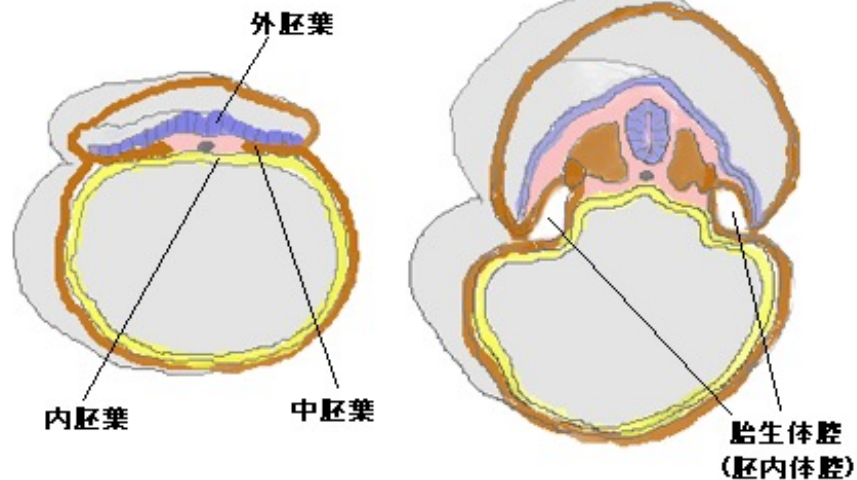


分化の多能性（方向性）



三胚葉分化

受精卵 → 胞胚 → 三胚葉



外胚葉
Ectoderm

- 皮膚
 - 感覺器
 - 神經
- 汗・脂腺
毛

中胚葉
Mesoderm

- 筋肉
- 骨
- 結合組織
- 心臟・血管
- 脾臓・リンパ管
- 腎臓・尿管
- 性腺

内胚葉
Endoderm

- 消化管
- 消化腺(唾液腺等)
- 肝臓、脾臓
- 喉頭・気管
- 肺
- 腹膜・胸膜
- 膀胱・尿道

幹細胞 (Stem Cells)

- 全能性幹細胞 (Pluripotent [totipotent] stem cells)

全ての細胞に分化可能な細胞（個体を形成できる）

- ES細胞 Embryonic stem cells
- iPS細胞 Induced pluripotent stem cells

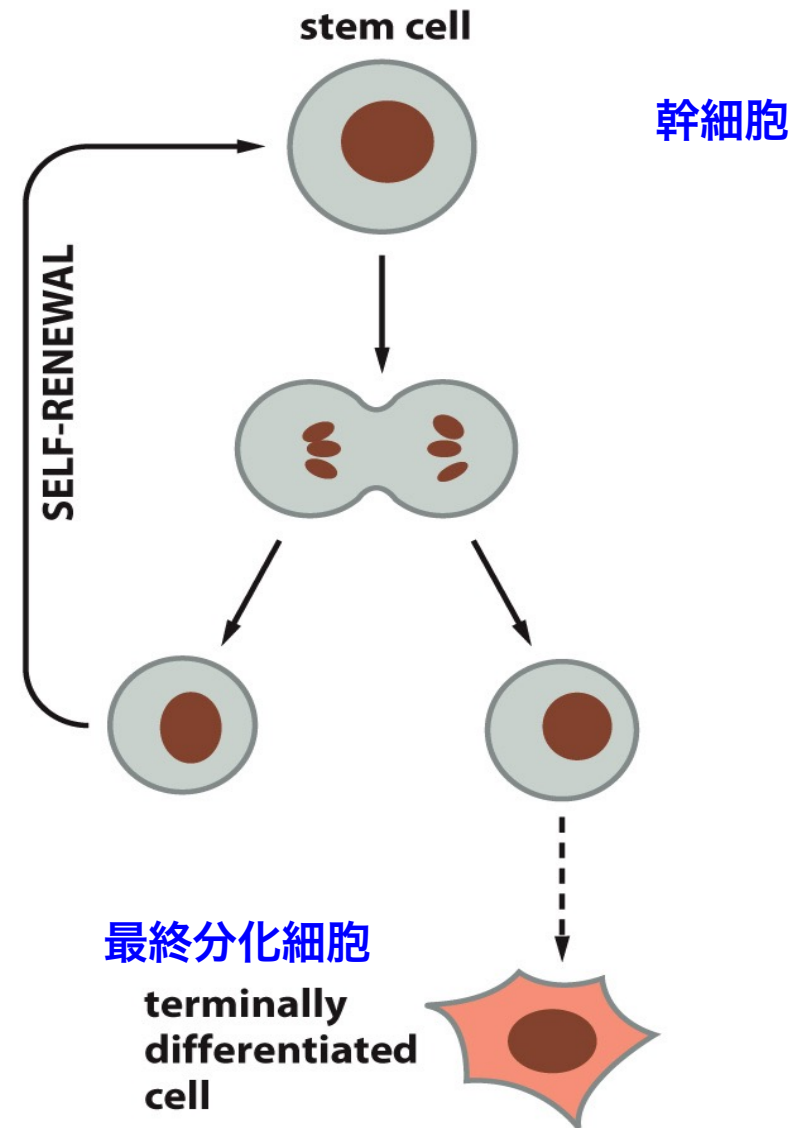
- 多能性幹細胞 (Multipotent stem cells)

三胚葉性の細胞に分化する能力を持つ細胞

- 造血幹細胞 Hematopoietic stem cells
- 間葉系幹細胞（骨髄、脂肪、臍帯） Mesenchymal stem cells

幹細胞の特徴

- ・ 未分化能の維持（自己保持能）
- ・ 自己複製能
- ・ 嬢（分化）細胞の供給



Molecular Biology of the Cell 6th Ed

幹細胞の細胞周期

(大元の) 幹細胞の細胞周期の特徴

静止期 (G0-G1) にある

造血幹細胞の場合

S, G2, M期の細胞: 5%以下
G0期: 75%

Allsopp R, et al. J Exp Med, 193:917 (2001)

Dormantな状態
(潜伏している)



幹細胞 (Stem cells)



実際に増えている幹細胞

→ Transit-amplifying (TA) cells



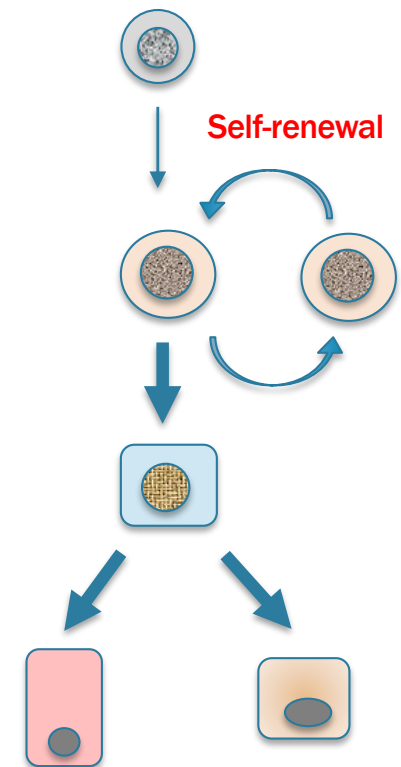
単能性幹細胞



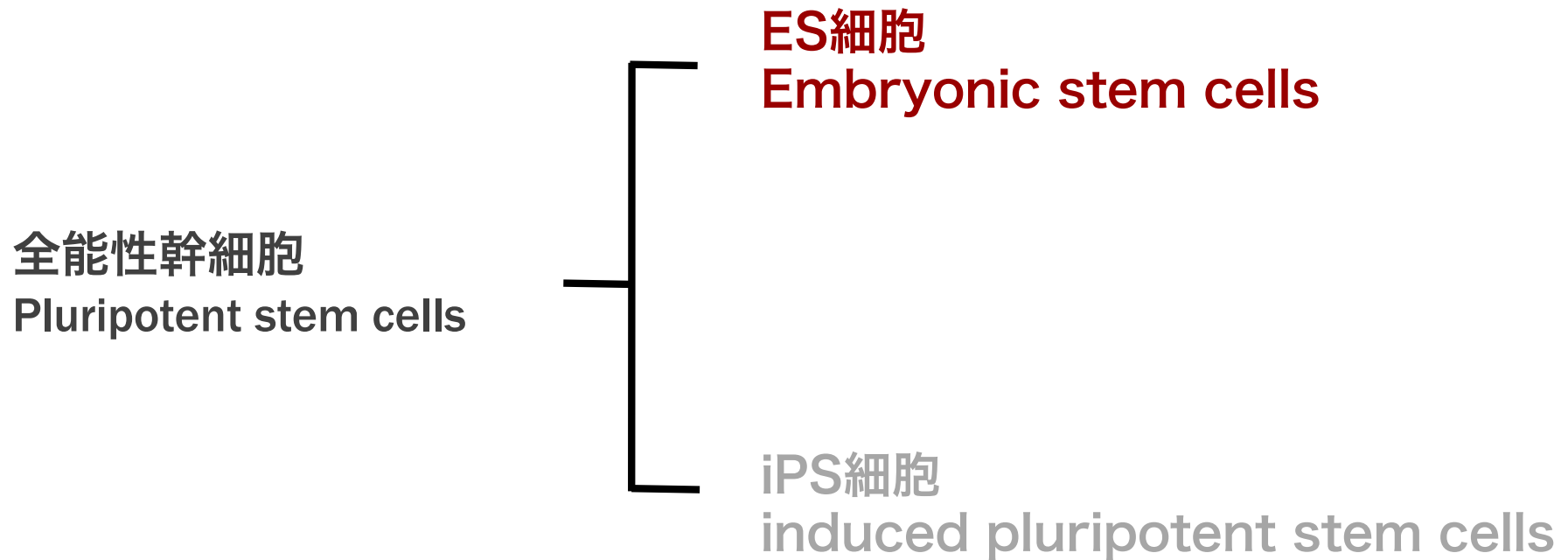
前駆細胞 (Progenitor cells)



分化細胞 (Differentiated cells)

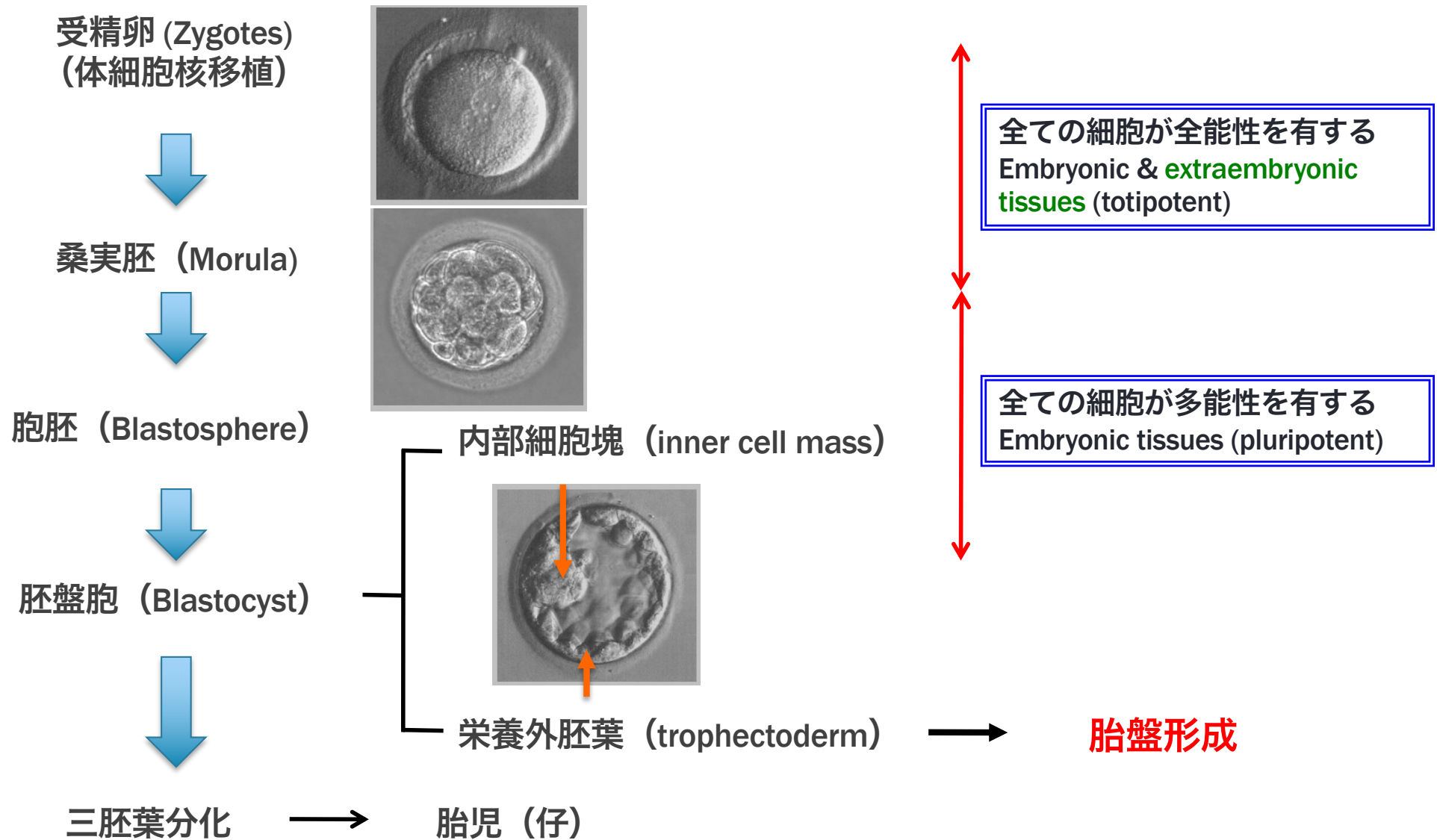


全能性幹細胞

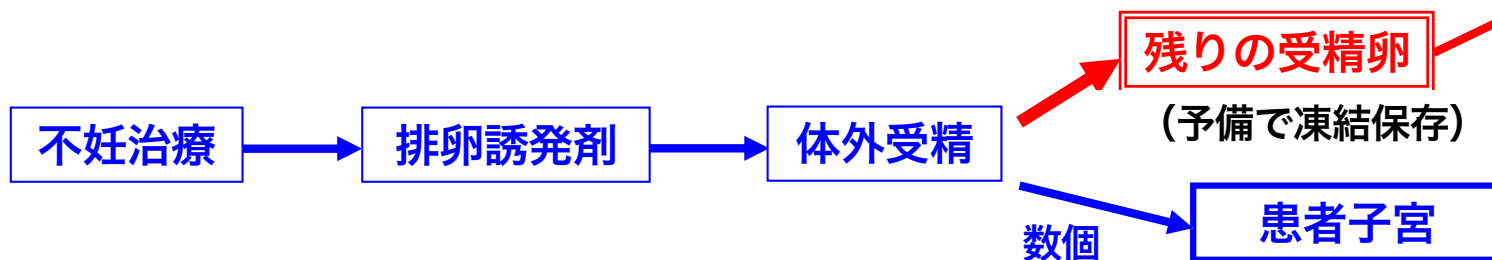
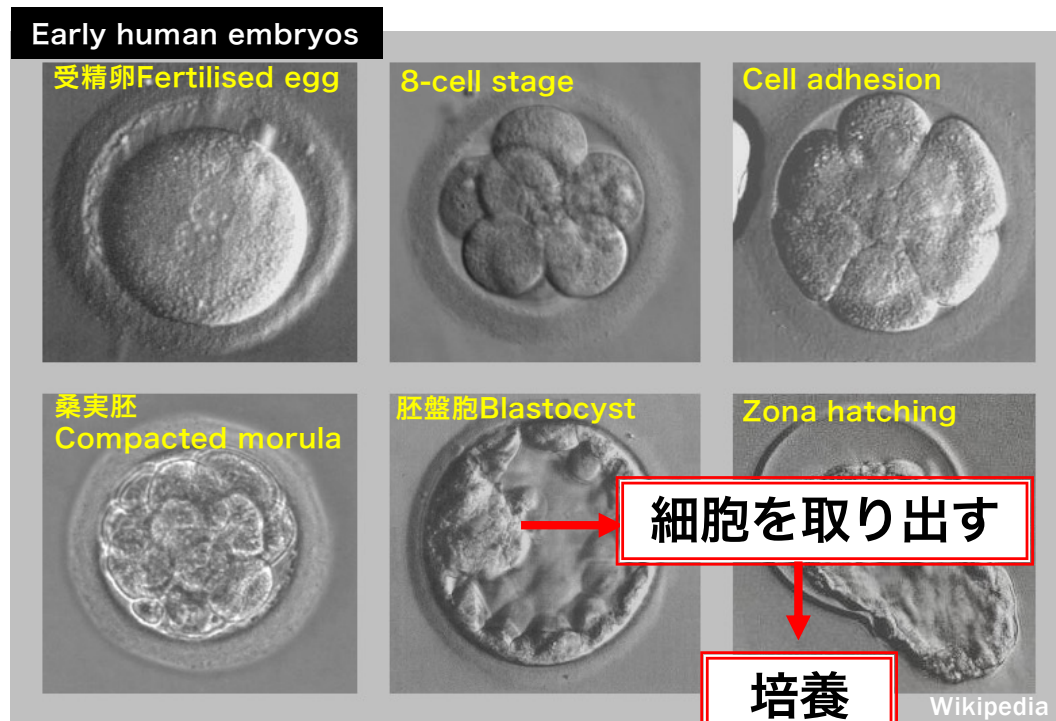
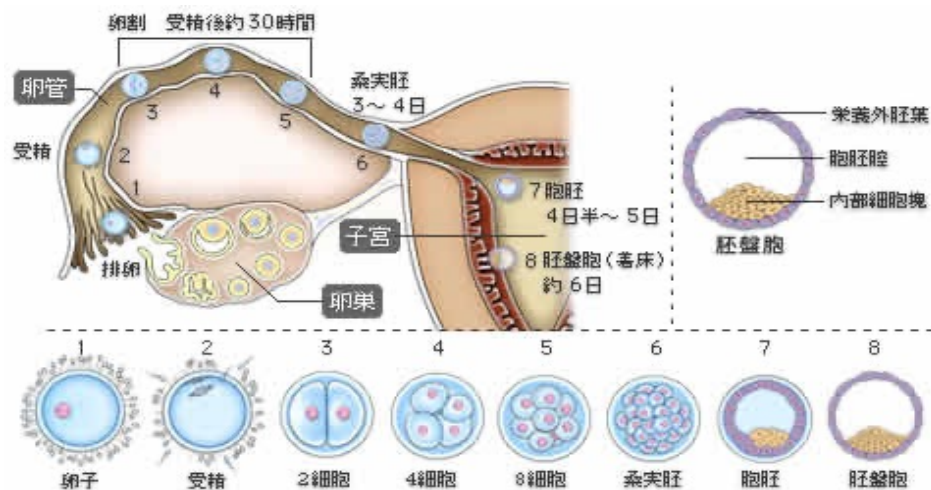


＊ 全ての細胞に分化可能な細胞（個体を形成できる）

胚性幹細胞 – Pluripotent stem cells



ES細胞の樹立方法



ES細胞の問題点

- **倫理的問題点** 不妊治療に用いられなかった受精卵を使用する
 - 受精卵の滅失（ヒトに成長する可能性をなくすこと）の問題
 - 健康なボランティアからの未受精卵の提供の問題
- **技術的問題点** ほぼ全てのクローンには何らかの欠陥が見つかったている；
テロメア長が短い、エピジェネティック異常
- **拒絶反応が起こる** ES細胞由来の細胞は、患者のMHCと異なる可能性が高い
- **腫瘍（奇形腫）形成の可能性**

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



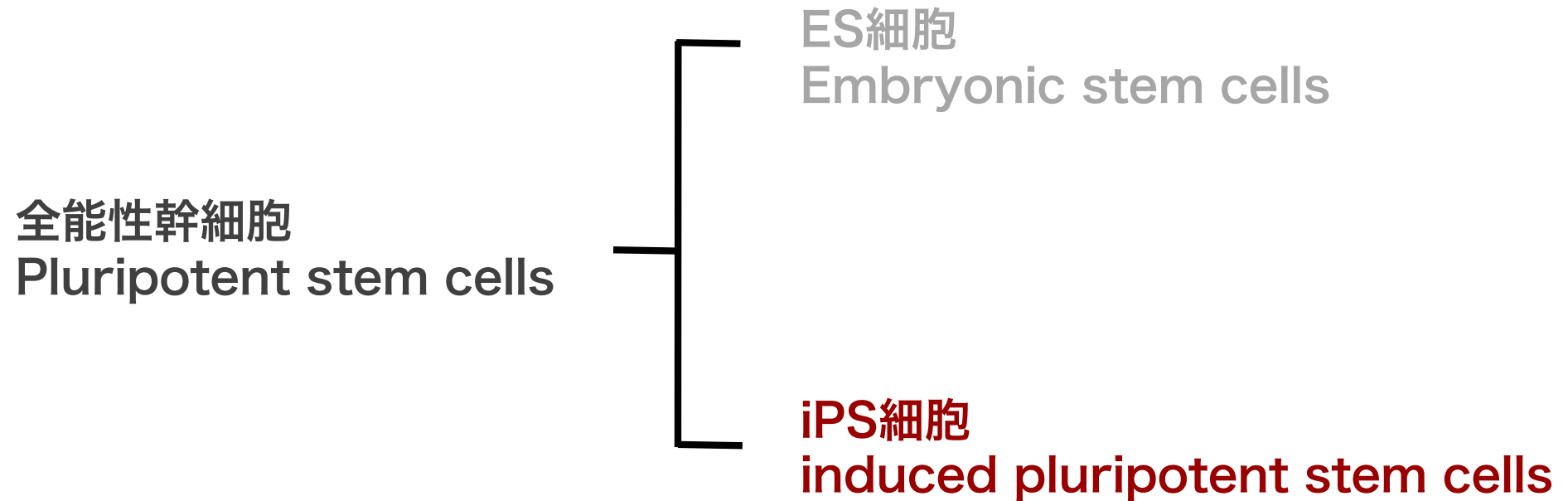
3 胚葉由来の細胞・組織からなる

胚性幹細胞の証明

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

Induced-Pluripotent Stem Cells – iPS細胞



Induced-Pluripotent Stem Cells – iPS細胞

2006年8月



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)

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

Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

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

*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 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, Oct3/4, Sox2, c-Myc and Klf4, under ES cell culture conditions. Unexpectedly, Nanog was dispensable for the generation of pluripotent stem 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

or by fu
et al., 20
contain
to soma
play imp
also pla
somatic
Seve
et al.

山中4因子

- Oct3/4
- Sox2
- C-Myc
- Klf4

upregula
1999; N
c-myc (K
β-catenin (Kielman et al., 2002; Sato et al., 2004), have been shown to contribute to the long-term maintenance of the ES cell phenotype and the rapid proliferation of ES cells in culture. In addition, we have identified several other genes that are specifically expressed in ES cells (Maruyama et al., 2005; Mitsui et al., 2003).

In this study, we examined whether these factors could induce pluripotency in somatic cells. By combining four selected factors, we were able to generate pluripotent cells, which we call induced pluripotent stem (iPS) cells, directly from mouse embryonic or adult fibroblast cultures.

RESULTS

We selected 24 genes as candidates for factors that induce pluripotency in somatic cells, based on our hypothesis that such factors also play pivotal roles in the maintenance of ES cell identity (see Table S1 in the Supplemental Data available with this article online). For

Please cite this article in press as: Takahashi et al., Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors, Cell (2007), doi:10.1016/j.cell.2007.11.019



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 Megumi Narita,^{1,2} Tomoko Ichisaka,^{1,2} Kiichiro 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

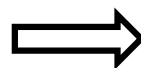
DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019

山中伸弥 京都大学教授 2012年ノーベル生理学・医学賞

iPS細胞が何故これほど期待されたのか？

ヒトES細胞の問題点

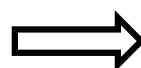
・ 受精卵を破壊する



iPS細胞

破壊しない
(倫理的問題の回避)

・ 拒絶反応が起こる



患者細胞由来iPS細胞の作製
(免疫拒絶の回避)

・ 腫瘍（奇形腫）形成の可能性

ヒトES細胞



子宮内に戻せばクローン人間の可能性

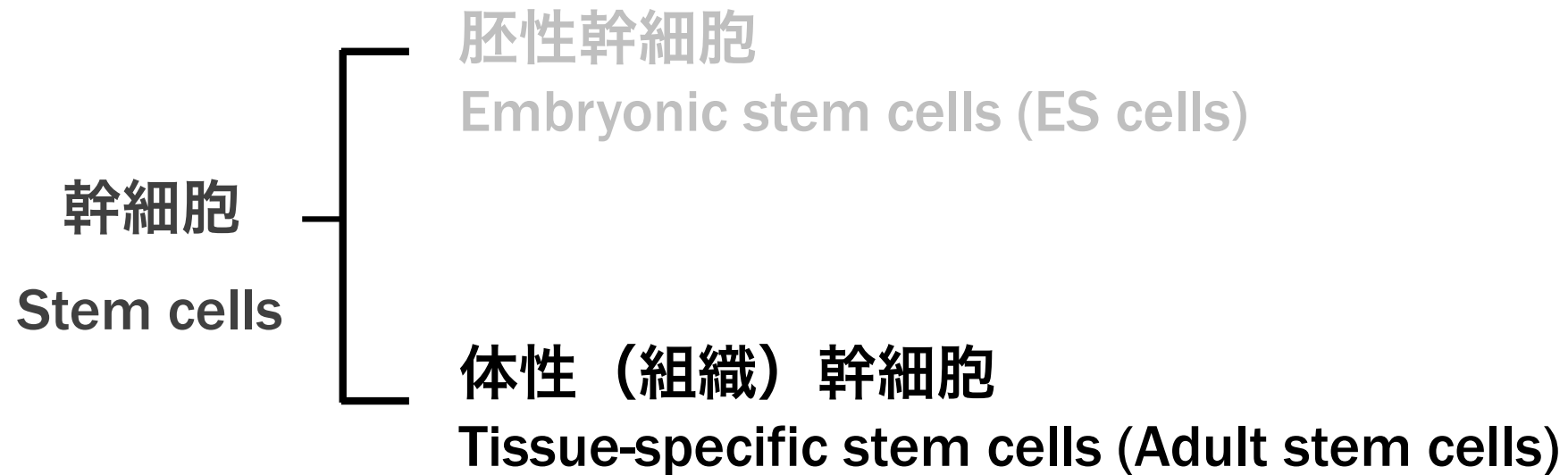
iPS細胞作成期間



iPS細胞バンク

2. Tissue Regeneration

2. Tissue Regeneration



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・爪・毛
 - 小腸
 - 血球
 - 子宮内膜
- 条件再生系組織 (Conditionally renewal system)
 - 肝臓
 - 結合組織
 - 血管
 - 平滑筋
- 非再生系組織 (non-renewal system)
 - 神経細胞
 - 骨格筋
 - 心筋

生理的再生系組織 Physiologically renewal system

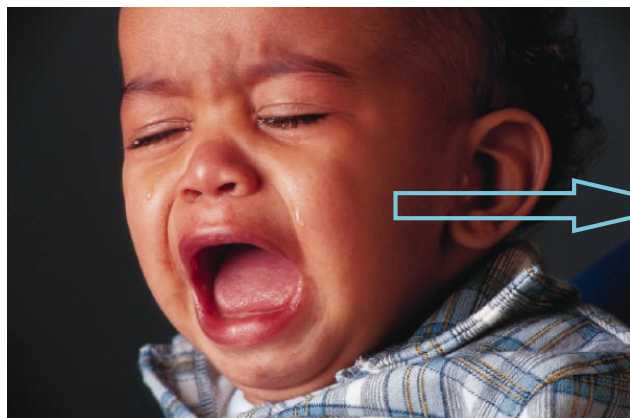
- 皮膚：
 - 約 **1 ヶ月**
- 爪：
 - 0.1 mm/日 再生するのに3ー6ヶ月
- 血液：
 - 赤血球 **120日**
 - 顆粒球 ~2週間
 - T細胞 4~6ヶ月 B細胞 数日~ 年
 - 血小板 **10日**
- 小腸：
 - 吸収上皮細胞 **2~4日**
- 子宮内膜：
 - 28ー30日周期（月経周期）

組織幹細胞 (Stem cells) が細胞を生み出している

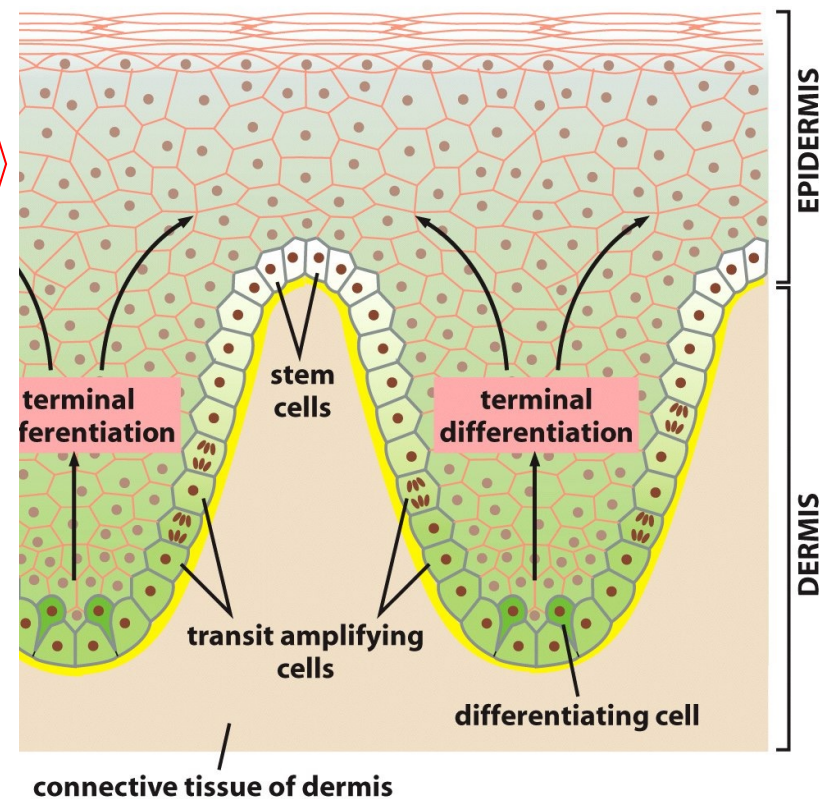
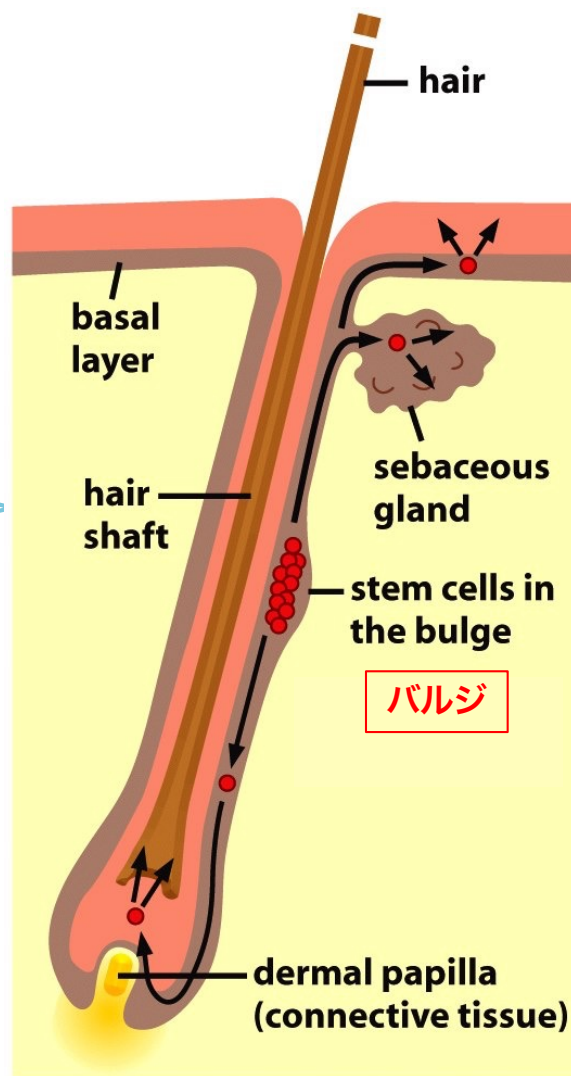
2. Tissue Regeneration

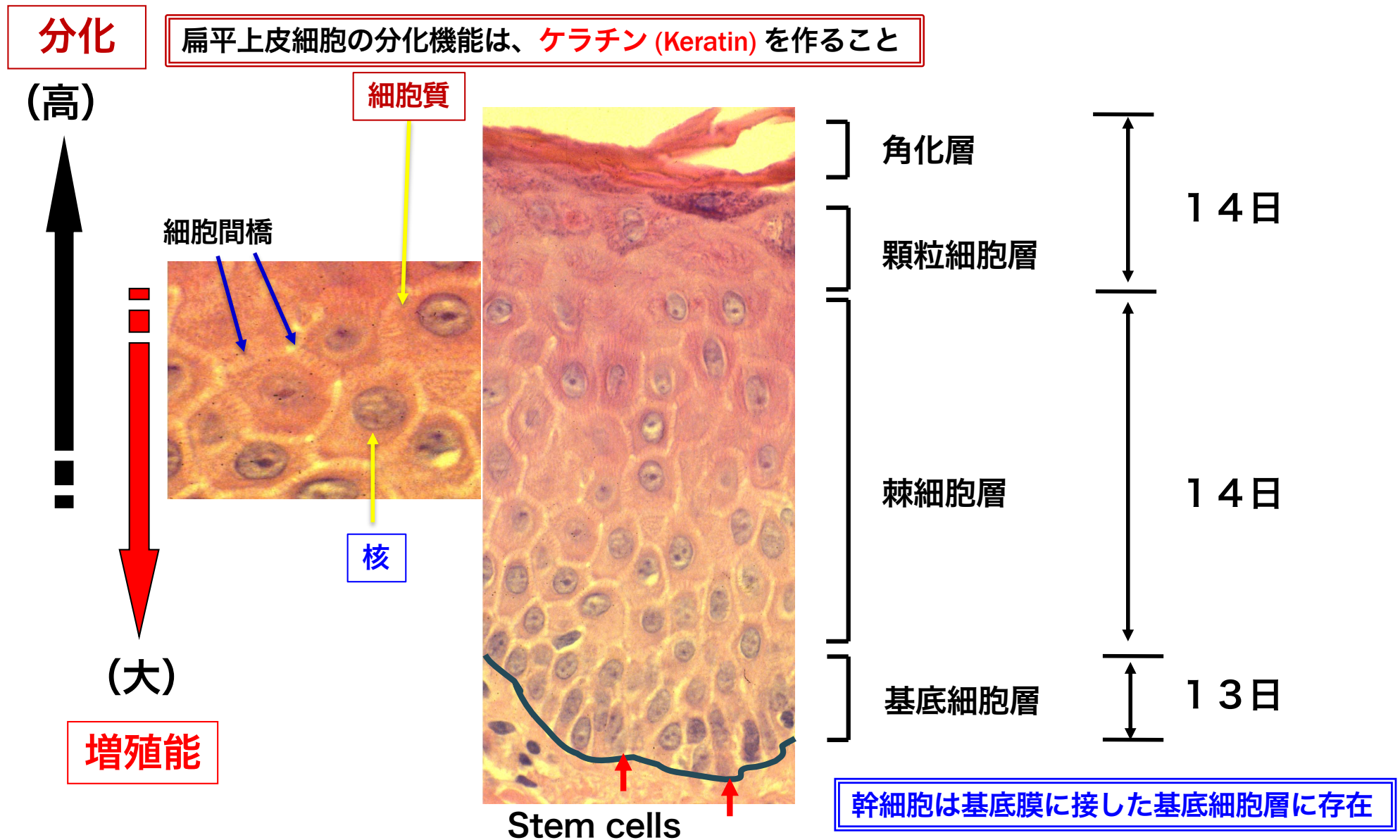
ヒトの皮膚組織

生体
Human body



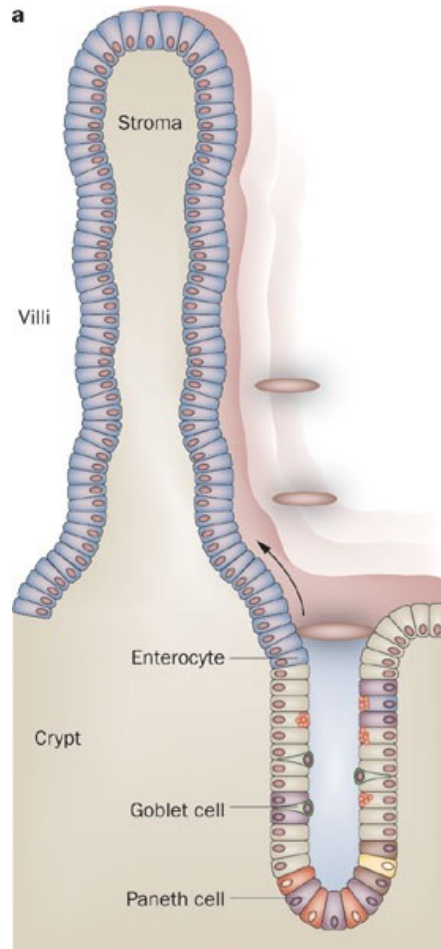
Molecular Biology of the Cell 5th Ed から引用





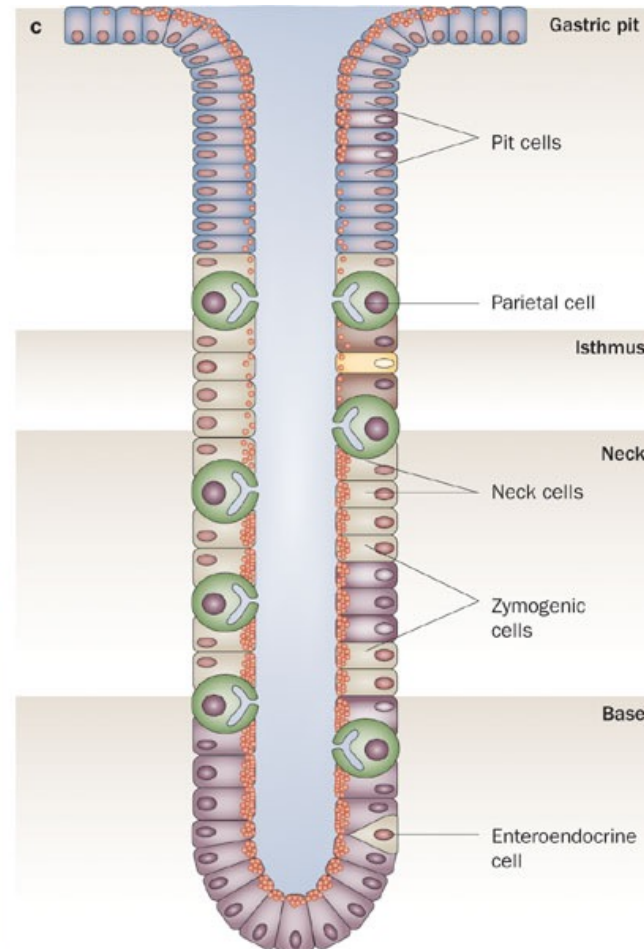
消化管組織における幹細胞の種類と存在部位

Intestine



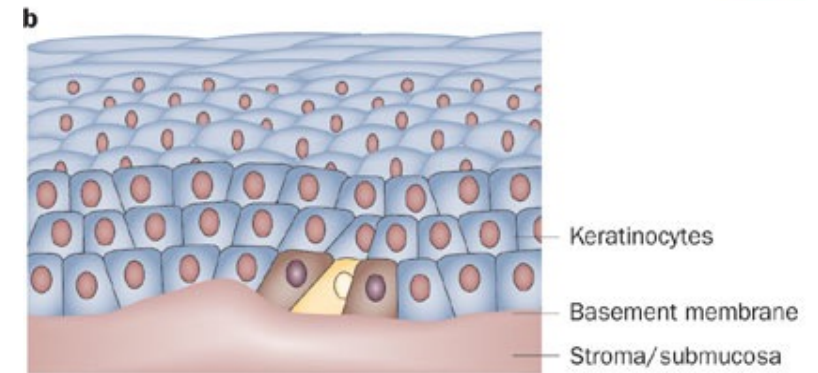
小腸腺窩底部に存在するパネート細胞はniche細胞で隣接して幹細胞が存在

Stomach

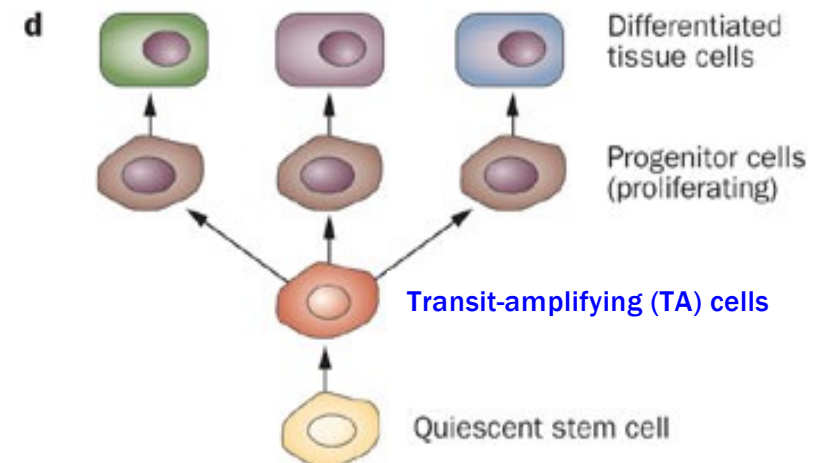


胃では、幹細胞は峡部に存在

Esophagus

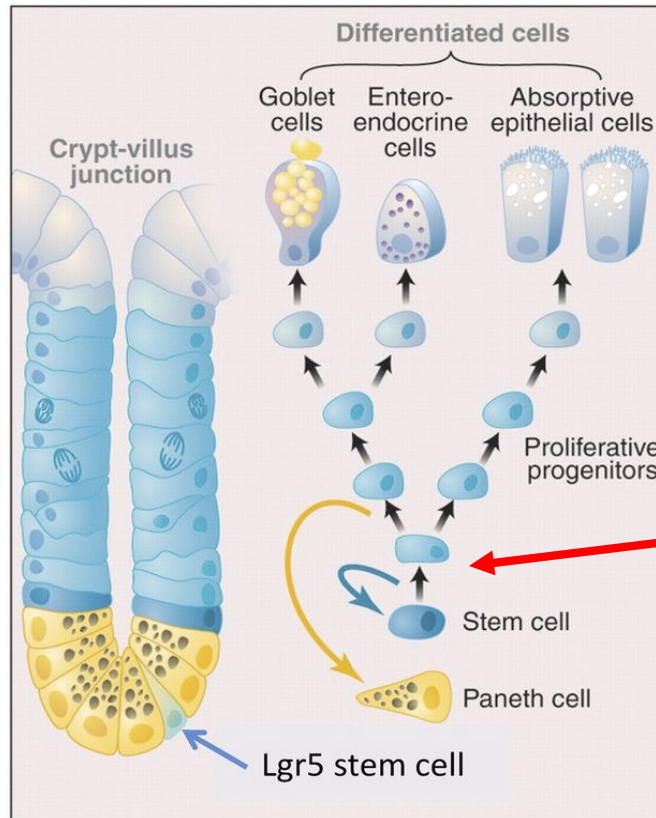
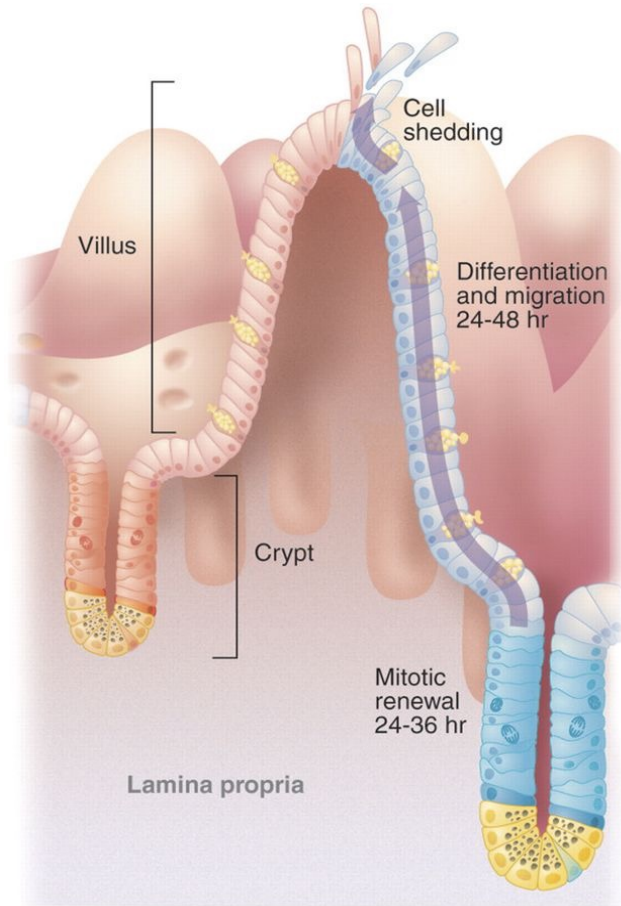


食道では、幹細胞は基底膜直上に存在



小腸 - Small Intestine

小腸の吸収上皮細胞の寿命：2~4日



Differentiated cells

15 TAs x 16~32 = 240~480 cells/日

TA cells

産生 16~32 cells/TA cell/日

Lgr5⁺-CBC cells

~15 cells at a crypt bottom

Lgr5⁺ cells

Multipotent stem cells at crypt bottom

Lgr5⁺ cells

Quiescent, rarely dividing

Marked Lgr5⁺ cells persist for the lifetime of a mouse

古い細胞は次々と剥がれおち、消化吸収後の食べかすとともに便として排泄される
(一日あたり、ヒトでは 10^{11} 個、マウスでは 2×10^8 個の細胞が失われていく)

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



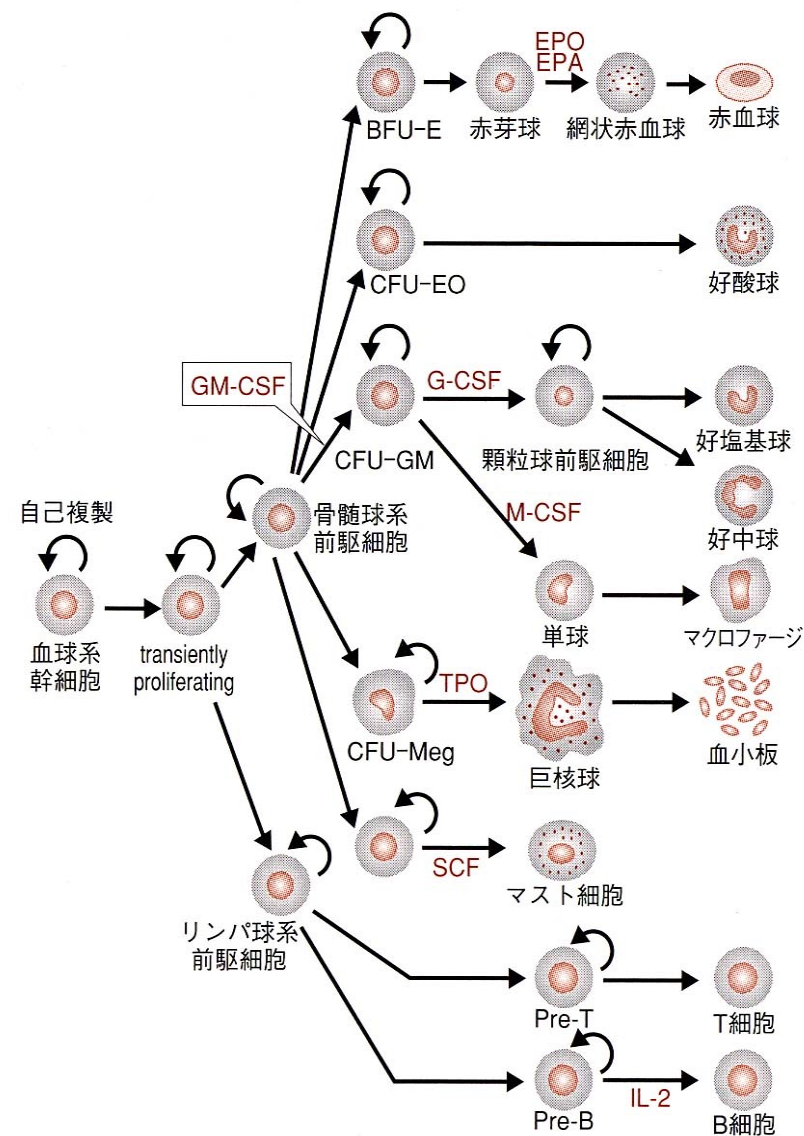
造血幹細胞 Actively cycling (primed)

有核細胞

4×10^6 細胞

赤血球

2.4×10^8 細胞



非再生系組織の再生 — 神経

Homeostasis of Neurons in the brain

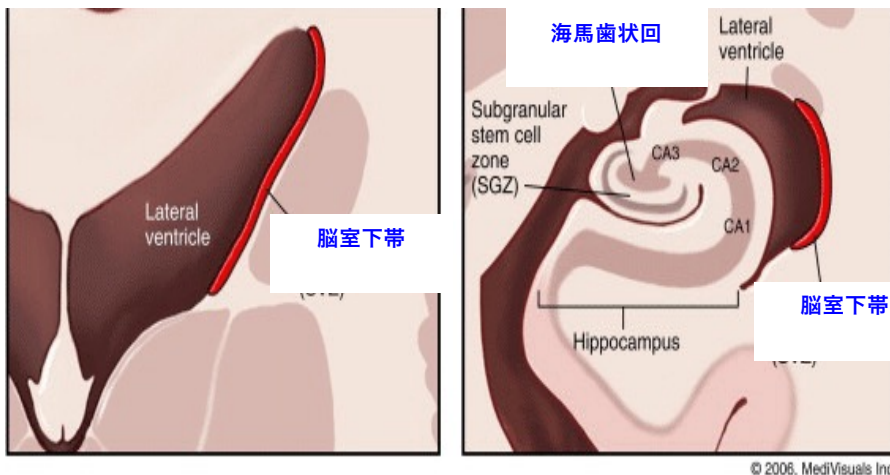
原則、脳・脊髄にある中枢神経は再生しない

一部の神経細胞は再生する

抹消神経は再生可能

成体における中枢神経系の神経幹細胞存在部位

- 脳室下帯 (Subventricular zone of the lateral ventricle (**SVZ**))
- 海馬歯状回 (Subgranular zone of the dentate gyrus within the hippocampus (**SGZ**))



Barani IJ et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007

Neural stem cells (NSCs; GFAP-positive astrocytes)

- Long-term self-renewal
- Proliferative potential
- The ability to differentiate into the 3 main CNS cell types:



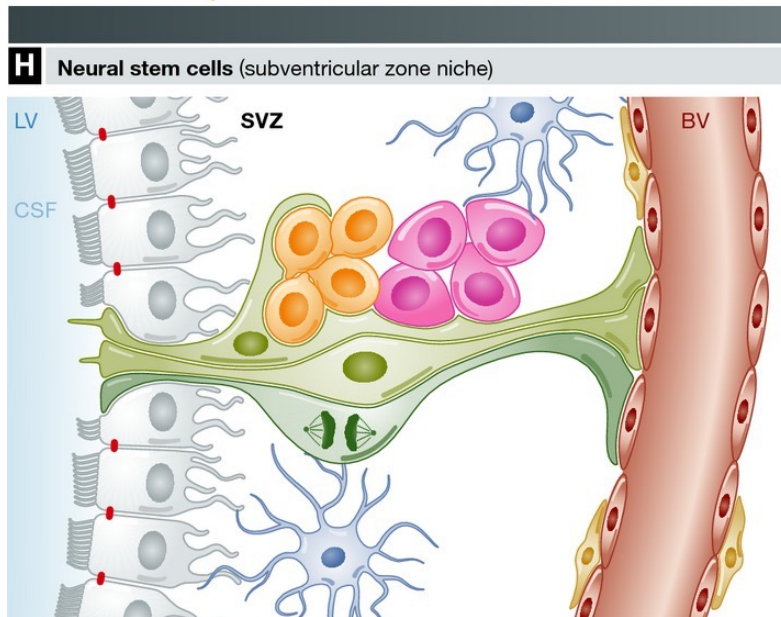
Glial fibrillary acidic protein (GFAP) ⁺

- Neurons
- Astrocytes
- Oligodendrocytes

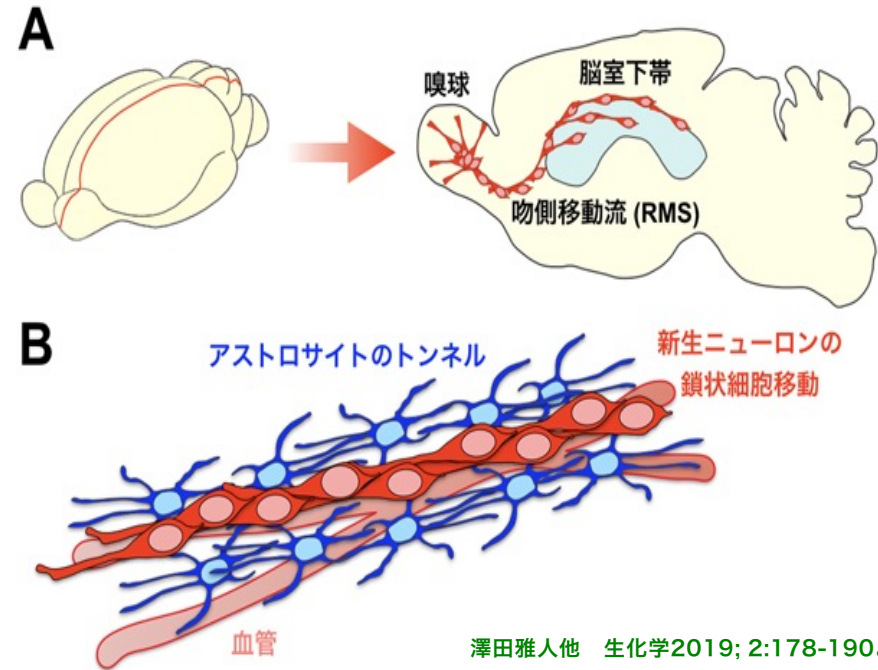
Homeostasis of Neurons in the brain

新生ニューロンの移動

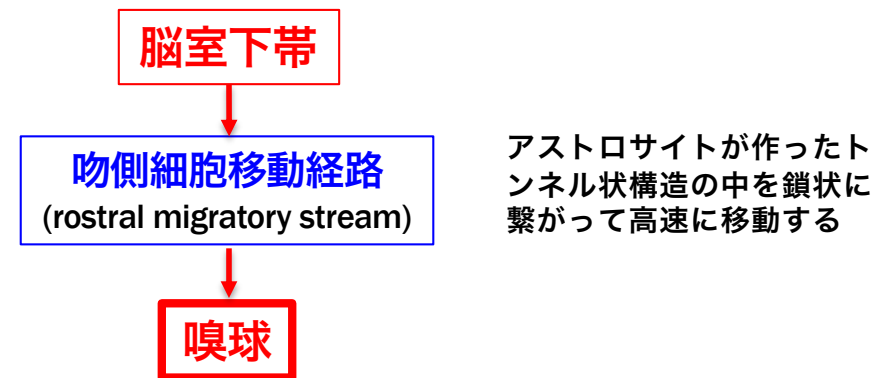
Subventricular zone of the lateral ventricle (SVZ)



Wabik A & Jones PH. EMBO J 34; 1164-1179 (2015)



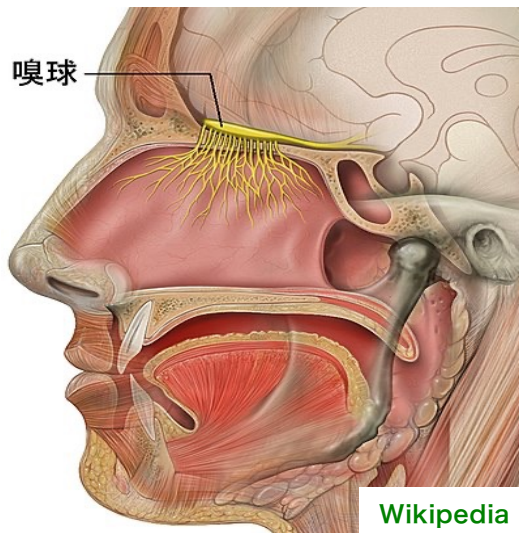
澤田雅人他 生化学2019; 2:178-190より



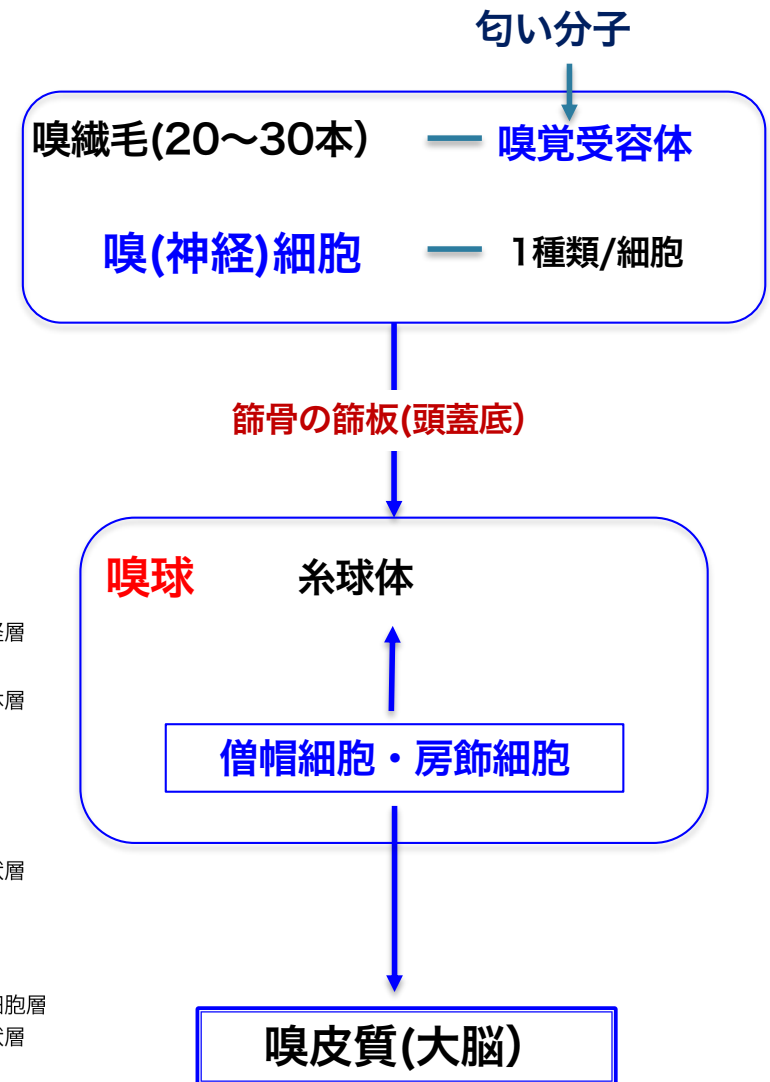
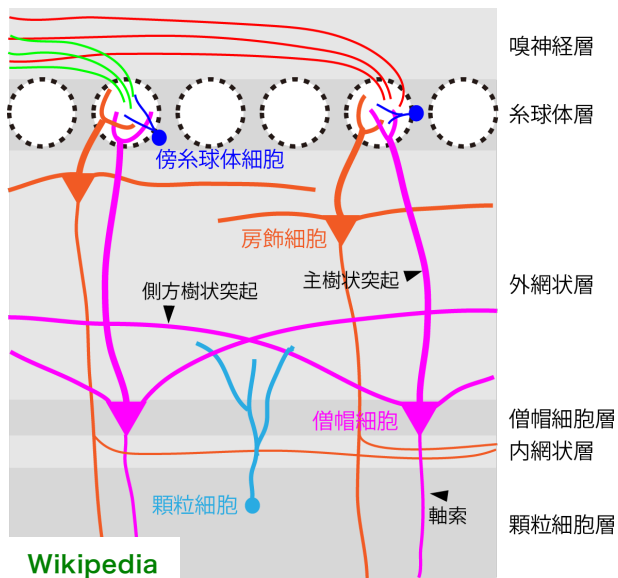
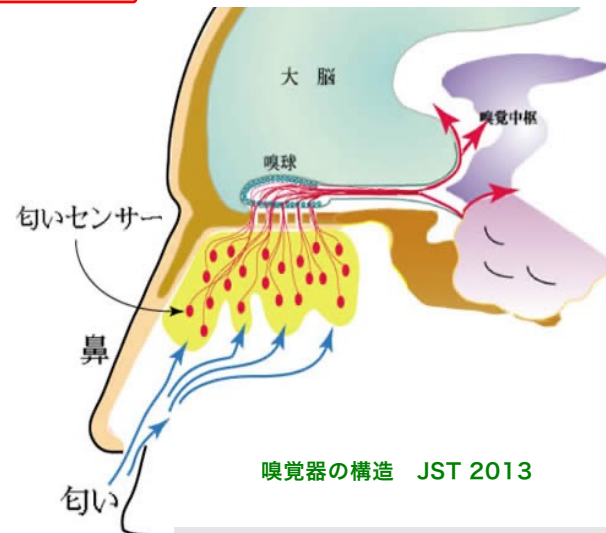
嗅球 (Olfactory bulb)

嗅神経細胞は生涯に渡って再生

寿命：30～120日

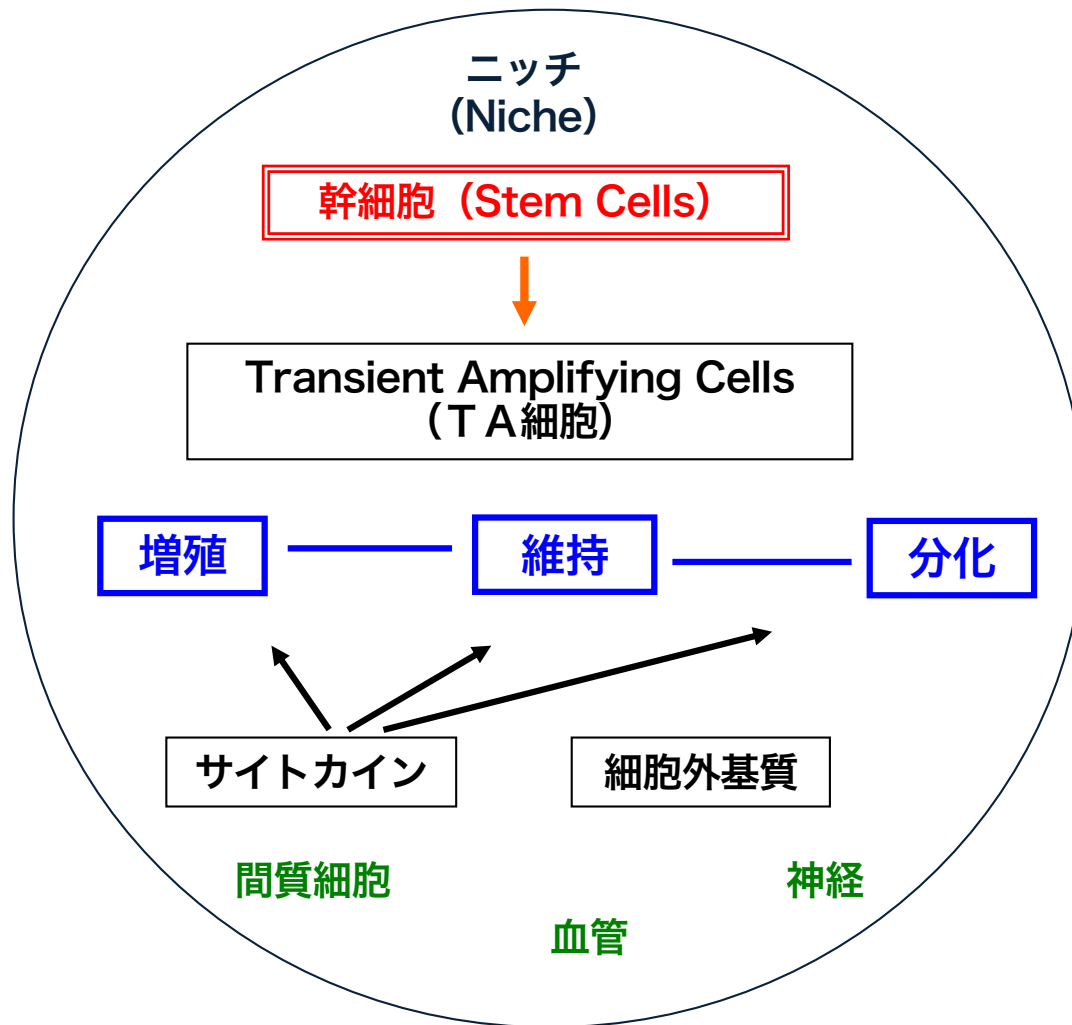


- ・ 介在細胞（顆粒細胞・傍系球体細胞）は新生する
- ・ 僧帽細胞・房飾細胞は再生しない



ニッチ (niche)

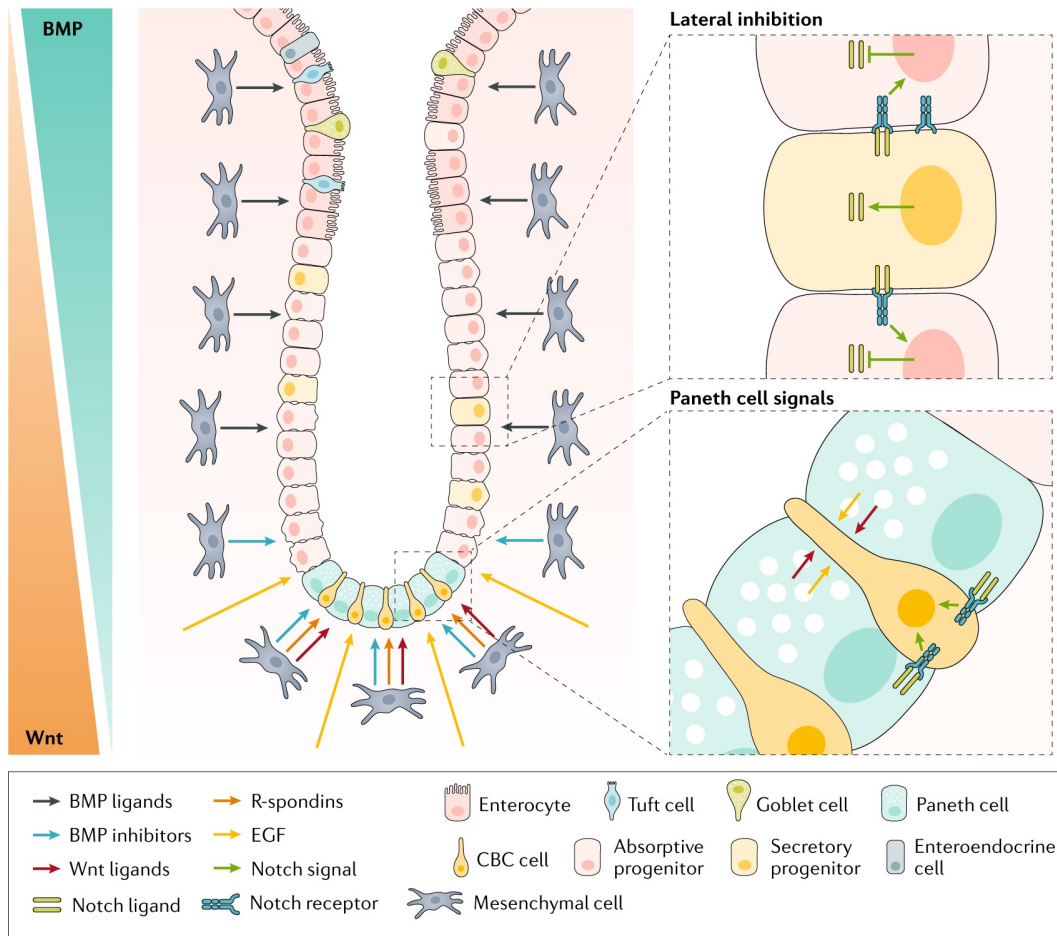
幹細胞の増殖・分化・維持に必要な環境



Niche components

- **Stromal support cells**
Act through short-range signals, which include secretion of soluble factors or membrane adhesion
- **Blood vessels**
Provide nutritional support, convey long-range signals from other sources, and allow cell trafficking from and toward the niche
- **Neural inputs**
Integrate signals from different sources and often contribute to stem cell mobilization
- **Extracellular matrix**
Provide mechanical support and biochemical signals
 - Organizing stem cell positioning
 - Governing chemical signals
 - Creating gradients that guide stem cell fate

Intestinal stem cell niche



1つのcrypt内に存在するLgr5⁺ stem cellsの数は、パネート細胞 (Paneth cells) の数に依存し、平均15細胞

小腸幹細胞の維持に必要な因子

間葉系細胞 mesenchymal cells

- R-spondin (WNT signaling)
- EGF (TGF- α)
- Noggin (BMP signaling inhibitor)



小腸幹細胞
(Lgr5陽性細胞)



- WNT3
- EGF (TGF- α)
- DLL1 & DLL4 (Notch ligands)

パネート細胞

創傷治癒

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

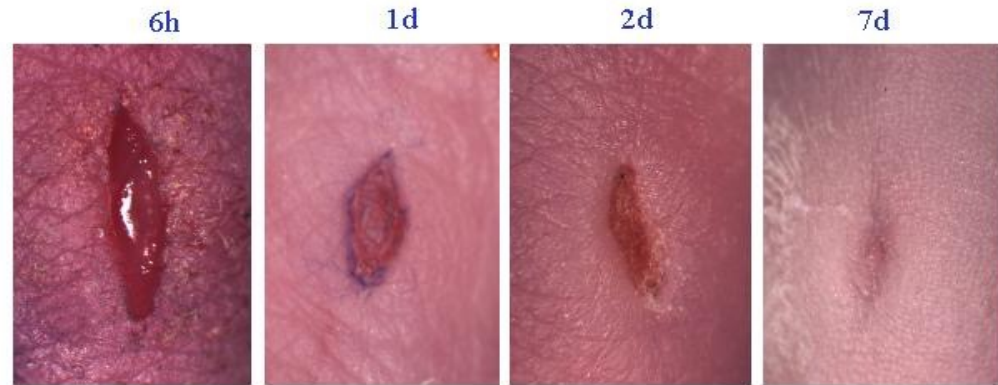
*線維： 生体内の繊維については「**線維**」が使われる

再生と修復 (Regeneration and Healing)

再生する場合

切創 (手術創)

Control



再生しない場合



やけど後の肥厚性拘縮



一年後自然治癒

Wound Healing Center Homepageより

受傷後、組織内で細菌が増殖するには6~8時間必要とされる。この時間が創閉鎖の目安とされる“**Golden time**”と呼ばれる

創傷治癒形式

➤ 1次治癒

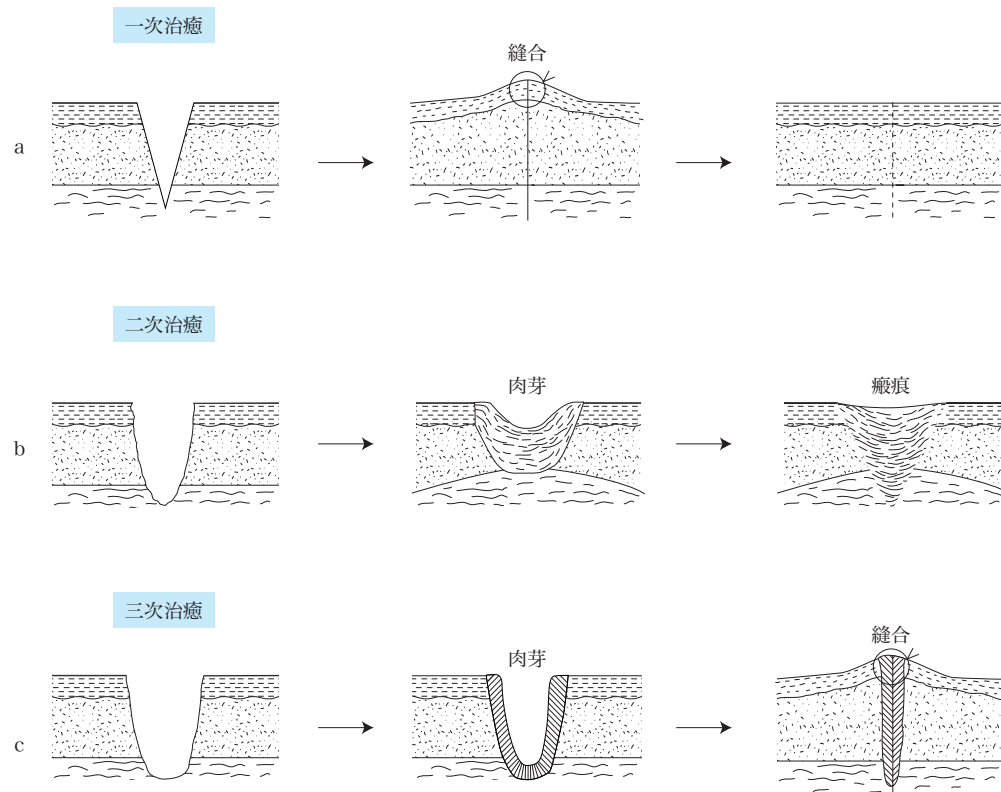
鋭い刃物や手術などで切った傷は縫合すると、化膿しないかぎり細い1本の線の傷が残るが、治癒までの期間が短くきれいに治る。**Golden time**内にある創は合併症を併発する事なく1次縫合可能な治癒形式

➤ 2次治癒

皮膚の欠損が大きい創や、汚染の著しい創、**Golden time**が過ぎた感染創に対しては、縫合できないので開放創のままとして治癒過程を進める場合

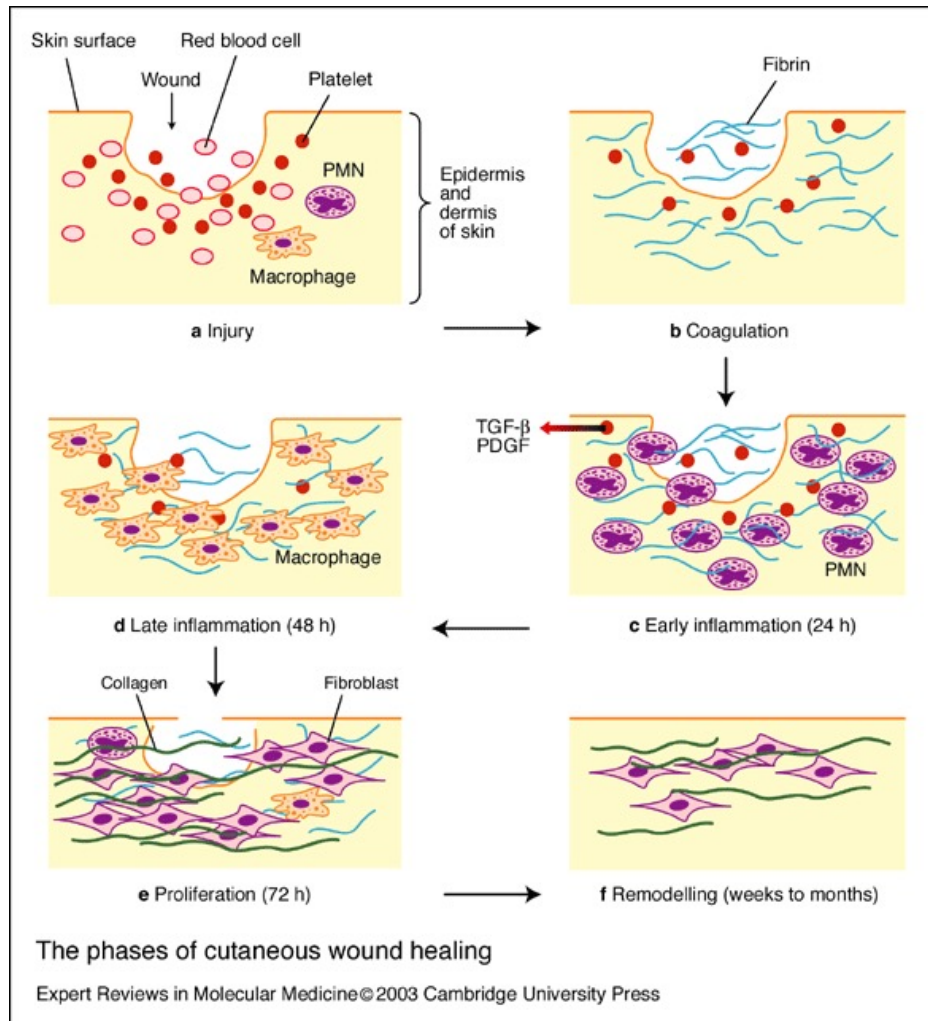
➤ 3次治癒

2次治癒で、主に感染を伴う創傷に対して意図的に一定期間開放創として処置し、創が清浄化した後に縫合閉鎖する場合



〈出典〉遠藤幸男他：創傷の治癒過程と創傷管理，臨牀看護，18(5)，p.1-11，1992.

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
- 腫脹、発熱、発赤、疼痛（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

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詰状、線条状の硬い組織（良性線維増殖性病変）

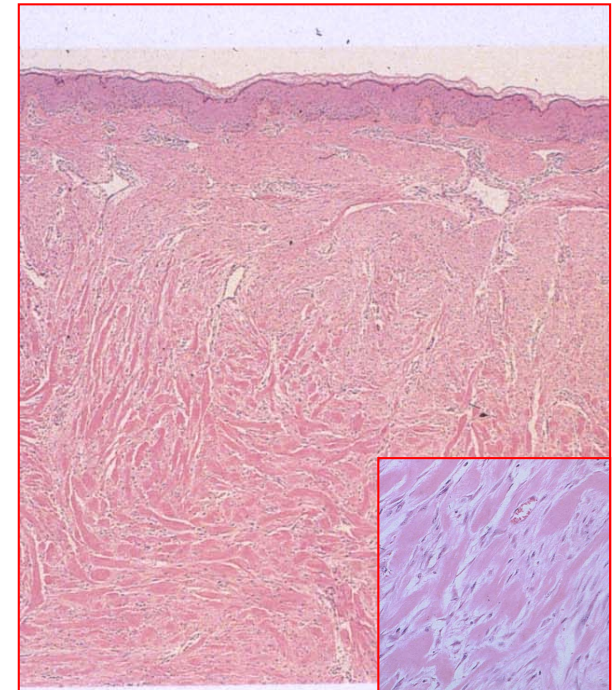
内因性・外因性： 放射線被曝者や若い女性、精巣摘出患者に多い



胸部外科手術跡



ピアース跡



真皮に膠原線維

3. Organ Regeneration

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。

肝再生 Liver Regeneration

ラット 2/3 部分肝切除 Partial Hepatectomy (PH)

Higgins & Anderson Arch Pathol (1931)

EXPERIMENTAL PATHOLOGY OF THE LIVER

I. RESTORATION OF THE LIVER OF THE WHITE RAT FOLLOWING PARTIAL SURGICAL REMOVAL *

GEORGE M. HIGGINS, Ph.D.

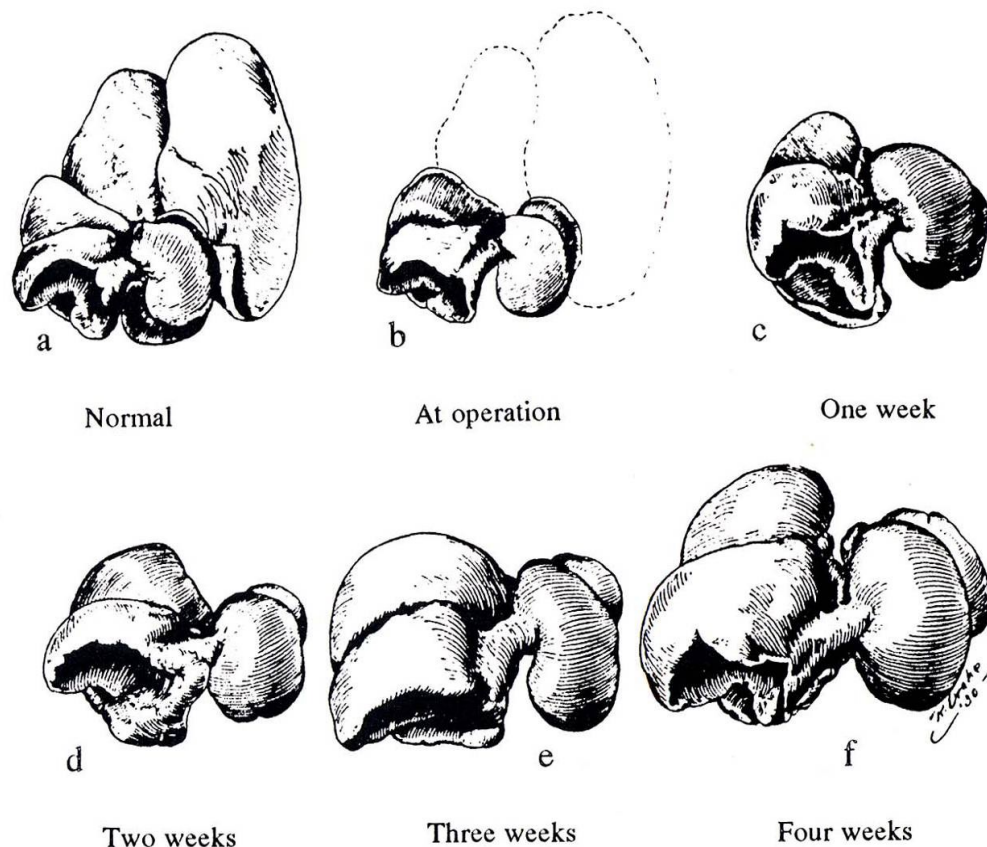
AND

REUBEN M. ANDERSON, M.D.

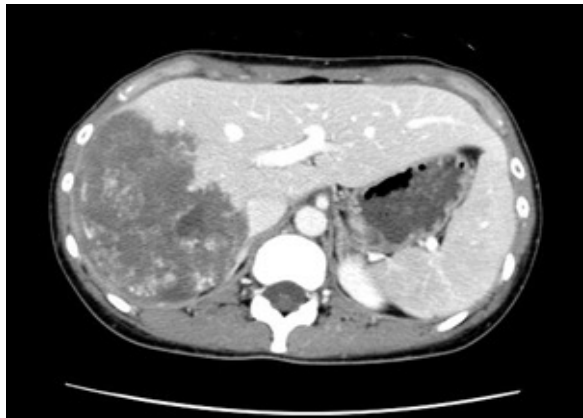
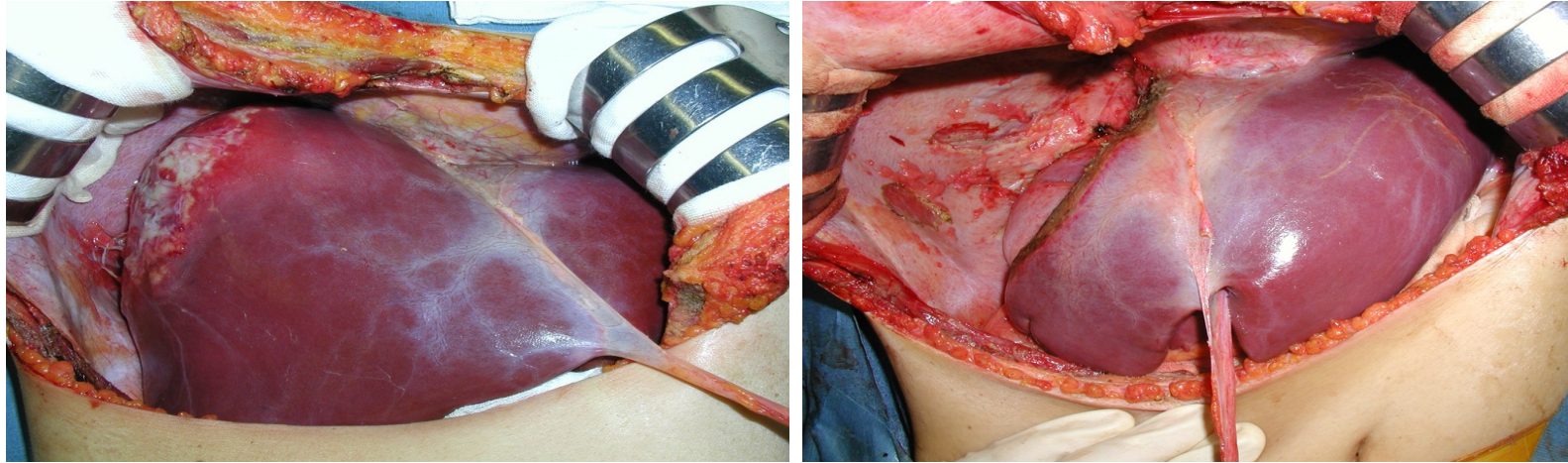
Fellow in Surgery

ROCHESTER, MINN.

Since on the surgical removal of from 65 to 75 per cent of the hepatic parenchyma compensatory hyperplasia of the remaining lobes follows so rapidly, the questions arise (1) whether a liver so quickly restored performs the usual hepatic functions in a manner to make it comparable to a normal liver, (2) whether the glycogenic function and the bile-secreting function are as effective in the new parenchyma and (3) whether the defense mechanism, or its detoxifying activity, is any less effective in a recently restored liver than in a normal one. These questions, as well as many others, must be answered before knowledge of the liver is complete. Before physiologic or pathologic studies of this sort are possible, complete data must be available concerning such pertinent facts as: (1) when restoration begins following partial removal, (2) when it is most active, and (3) when it is complete, or when the normal ratio of the weight of the liver to the weight of the body is restored.



肝臓は再生する臓器



術前



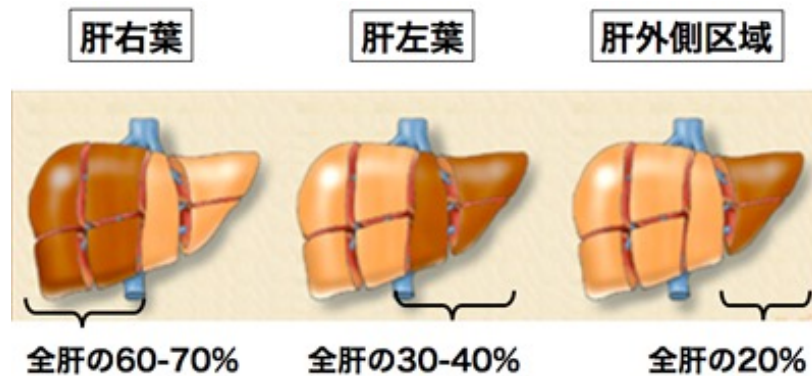
術後1ヶ月



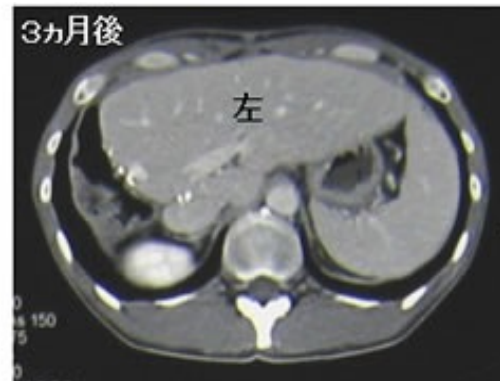
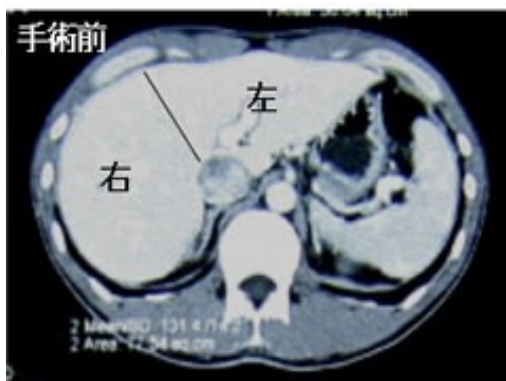
術後5年

ヒト生体肝移植

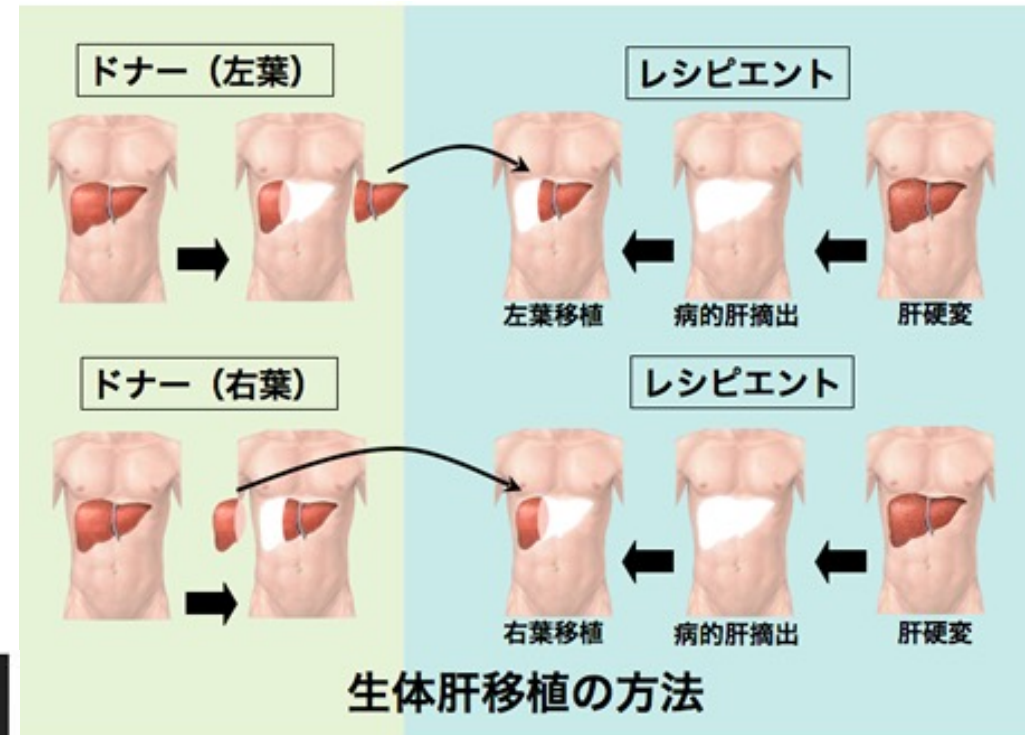
手術方法



Donor肝臓の再生



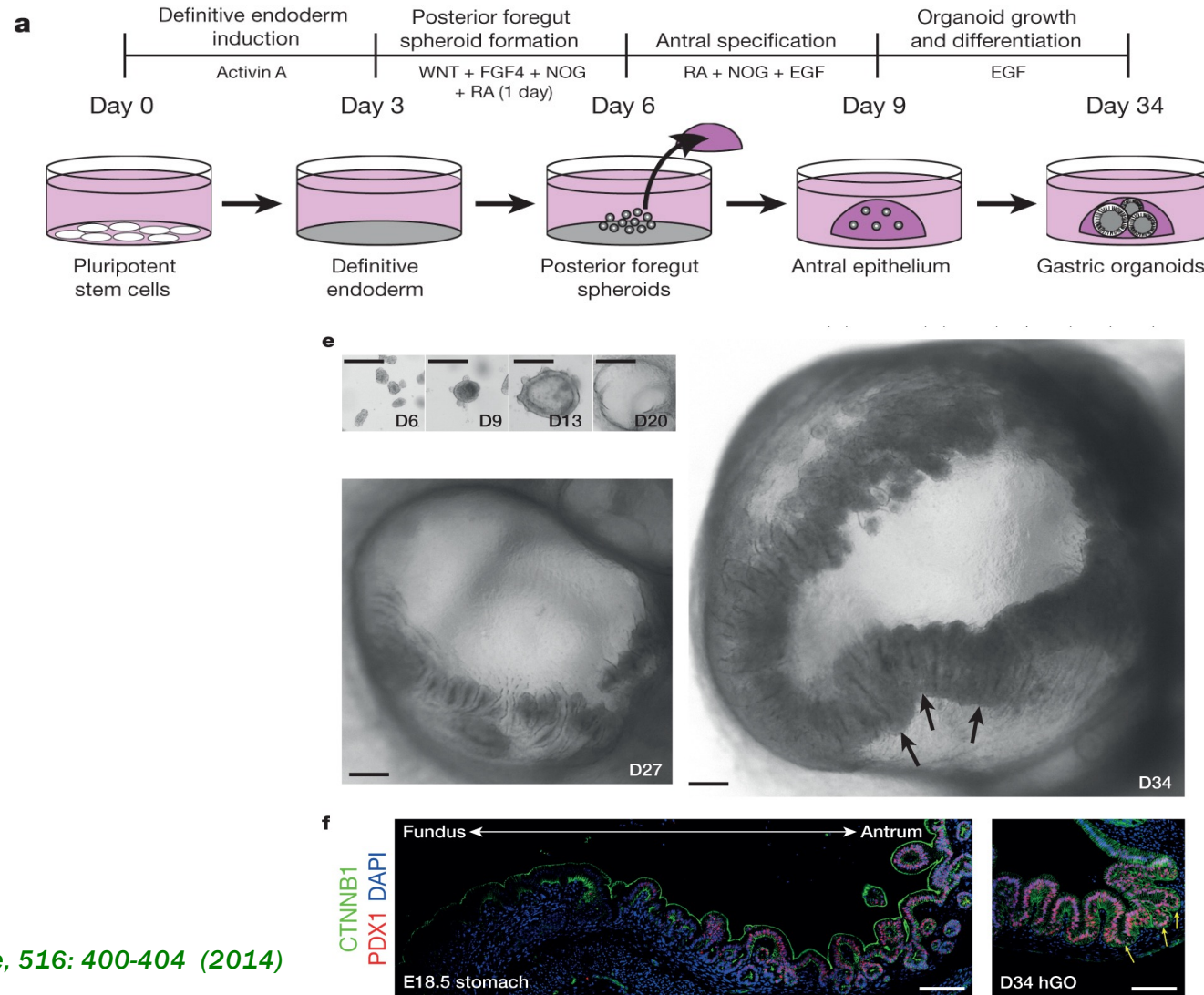
<奈良医大HPより>



徳島大学外科HPより

全能性幹細胞からの組織・臓器形成法

全能性幹細胞 (Pluripotent stem cells) 由来ヒト胃組織

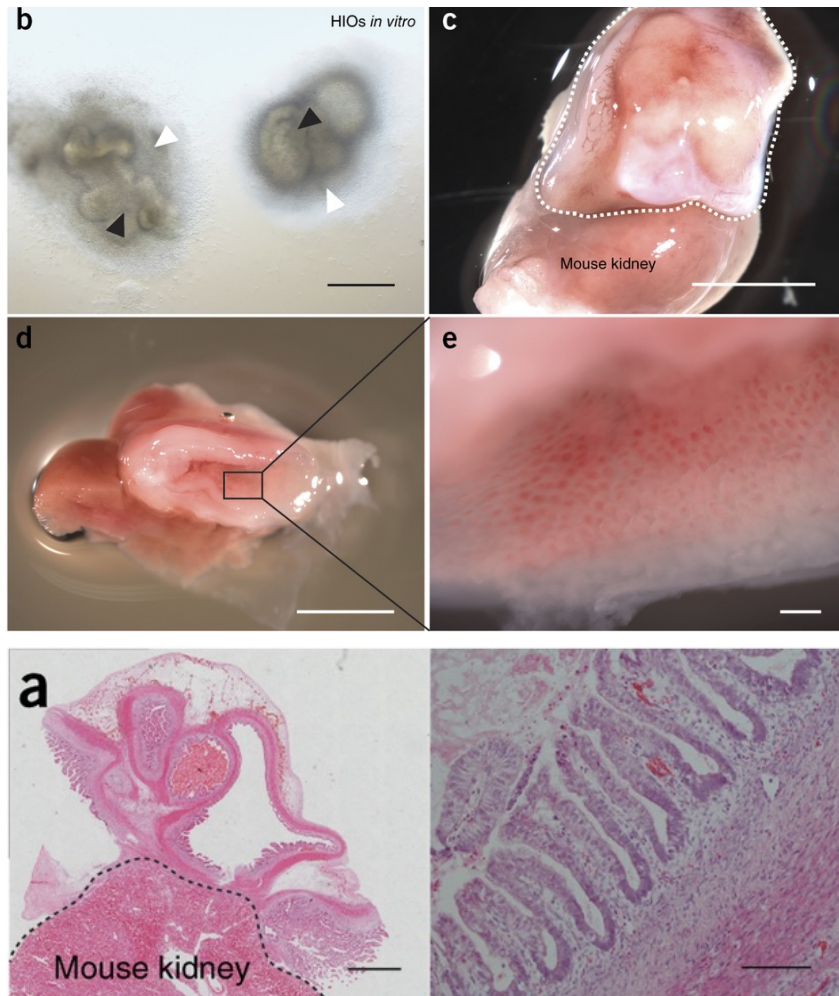


McCracken KW et al. *Nature*, 516: 400-404 (2014)

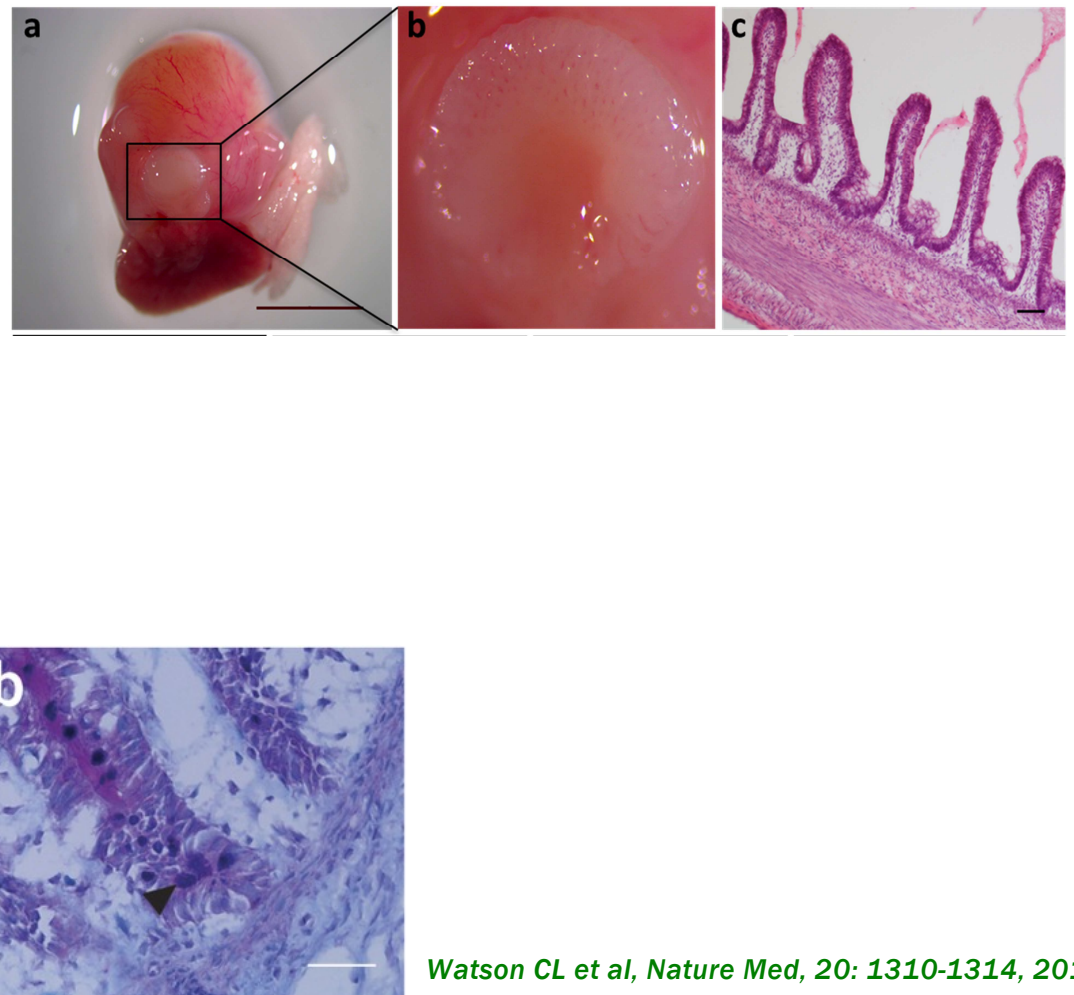
3. Organ Regeneration

全能性幹細胞 (Pluripotent stem cells) 由来小腸組織

Human ES細胞由来



Human iPS 細胞 由来

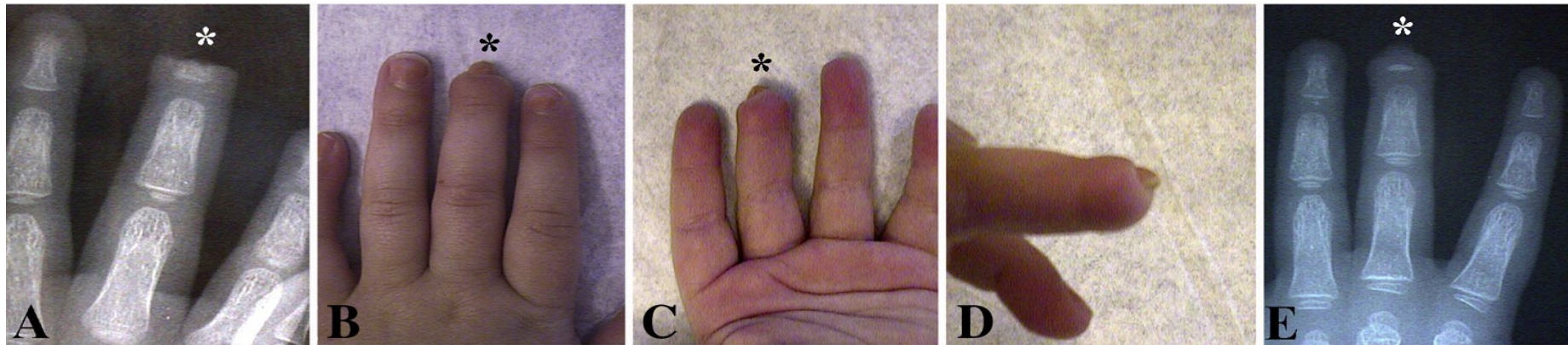


Watson CL et al, *Nature Med*, 20: 1310-1314, 2014

4. Structural Regeneration

ほ乳類の指先の再生

2歳の子供が指先を切断してしまった



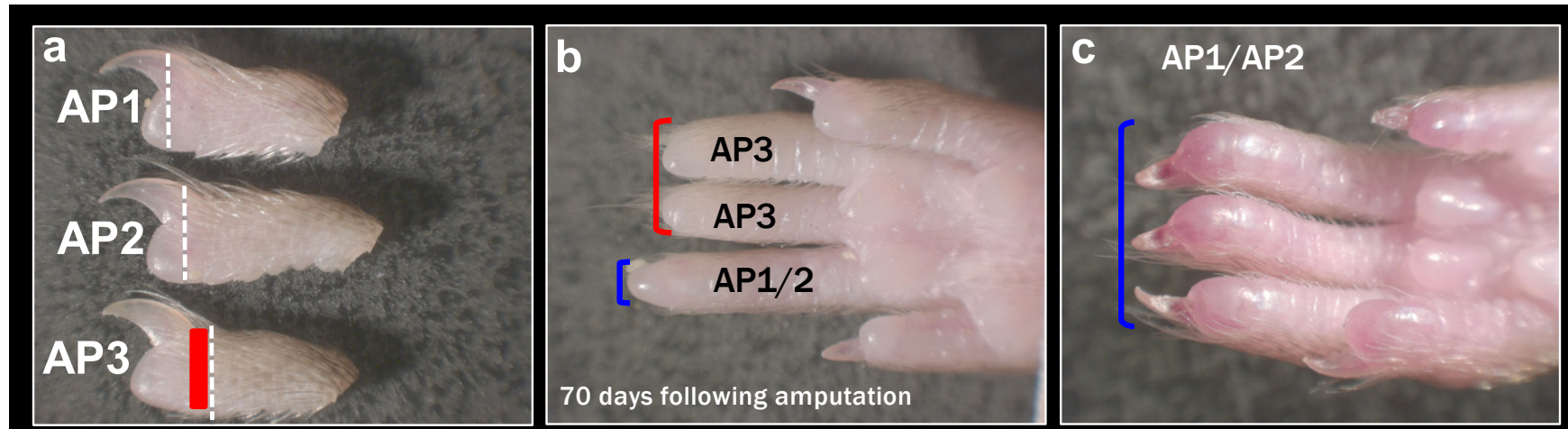
Han M et al. Dev Biol 315(1): 125-135 (2008)

爪の一部がちょっとだけ再生

ヒト (ほ乳類) の指は再生しない？

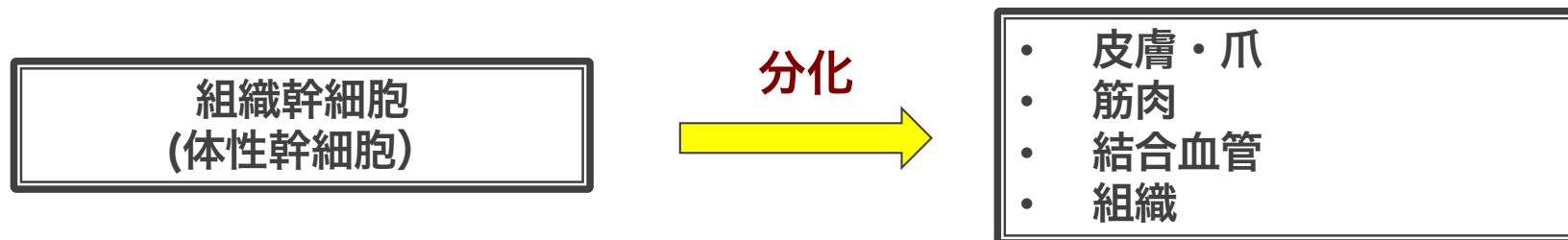
マウスの指先の再生

2011年のNatureに、**マウスの指先が再生することを証明する**、論文が出た



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

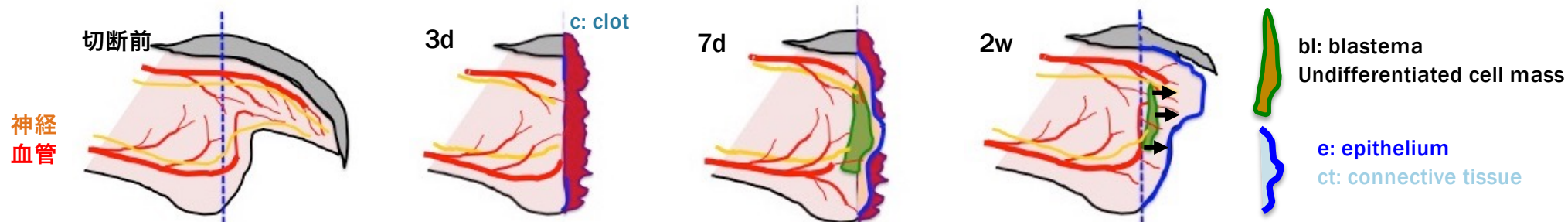
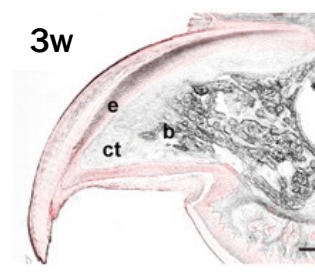
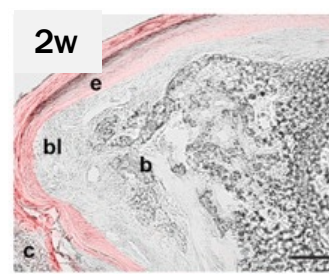
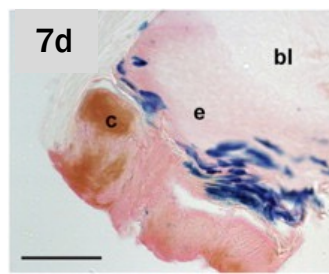
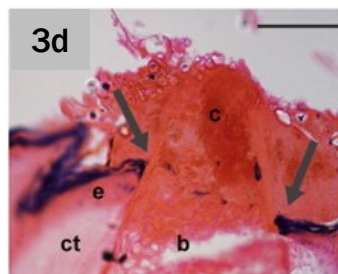
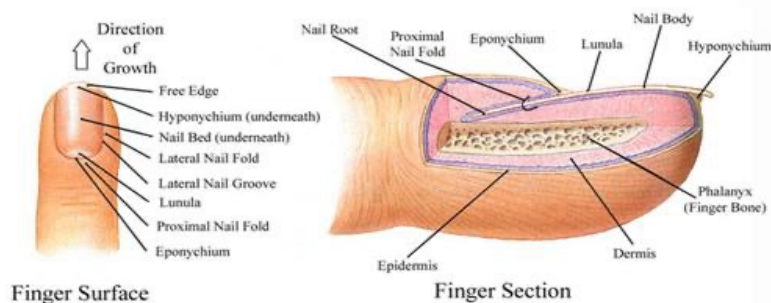
AP2-3の部分に**それぞれの組織を作る細胞（組織幹細胞）**が存在する



4. Structural Regeneration

マウスの指先の再生

In rodents and humans, multi-tissue regeneration occurs if the digit tip is removed **distal to the nail bed**



Blastema

間葉系細胞の集合体
Mesenchymal cells

様々な組織の**前駆細胞**が集まっている

Schwann cell precursors

- 血管
- 骨・軟骨
- 皮膚
- 結合組織

Lehoczky JA et al, Proc Nat Acad Sci USA 2011
Johnston AP et al, Cell Stem Cell 2016

5. Whole body Regeneration

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

ほとんどの動物のクローンが作成されている

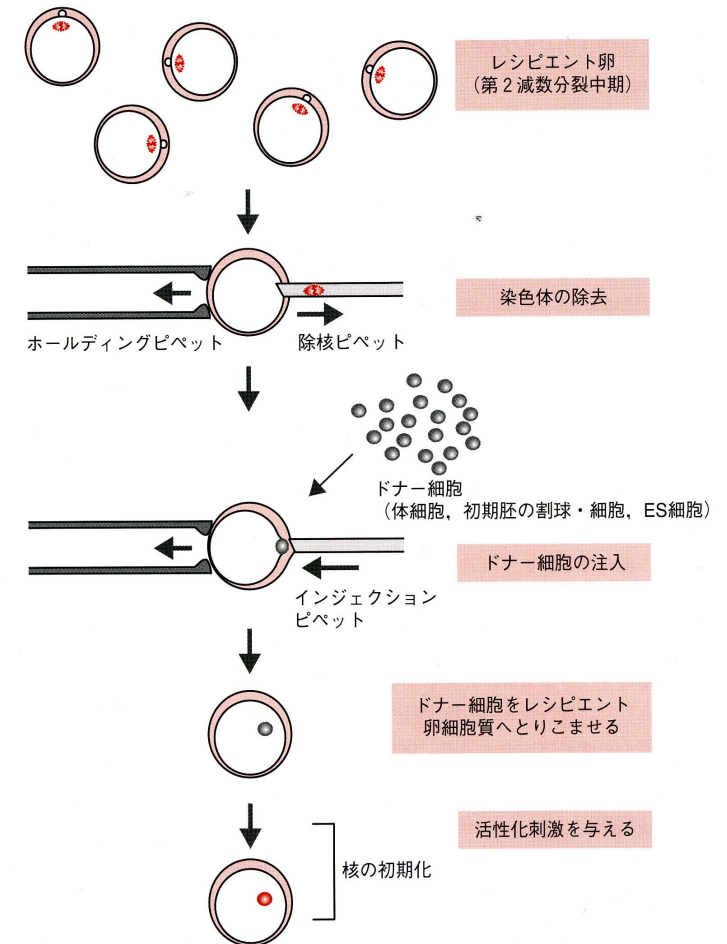


図1 ◆核移植の概略