## 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

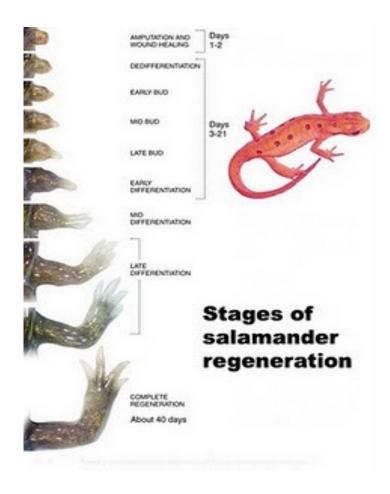
## 両生類の肢再生





メキシコサンショウウオ (アホロートル、ウーパールーパー)

## サンショウウオの上肢の再生



NatureNew Story, Aug 08, 2010

## 「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

## 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

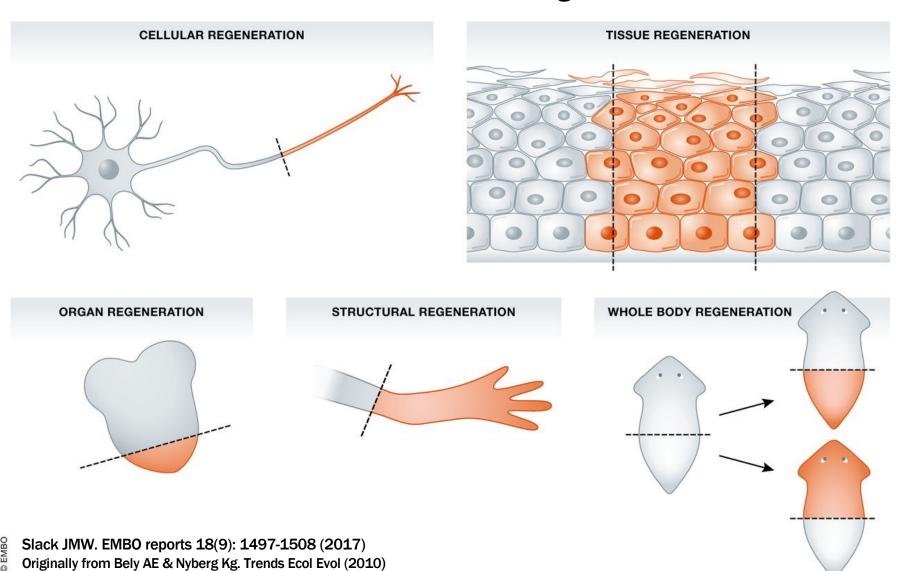
3. Organ Regeneration 器官·臟器

4. Structural Regeneration 個体の一部

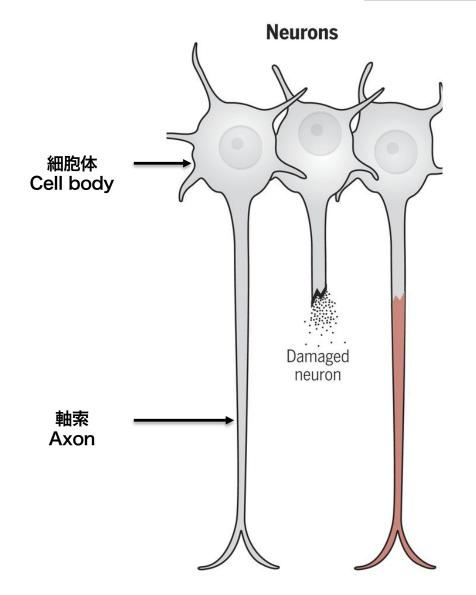
5. Whole body Regeneration 個体全体

## Five types of regeneration in animals

## 動物における "再生 Regeneration"



2023年12月7日 病理学2



## 神経細胞は基本的に再生しない

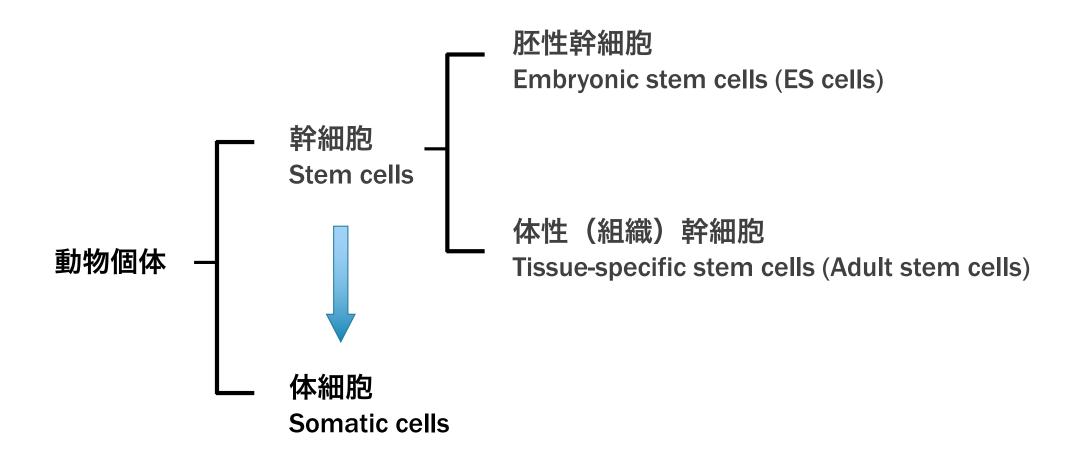
中枢神経系と末梢神経系では異なる

末梢神経系においては

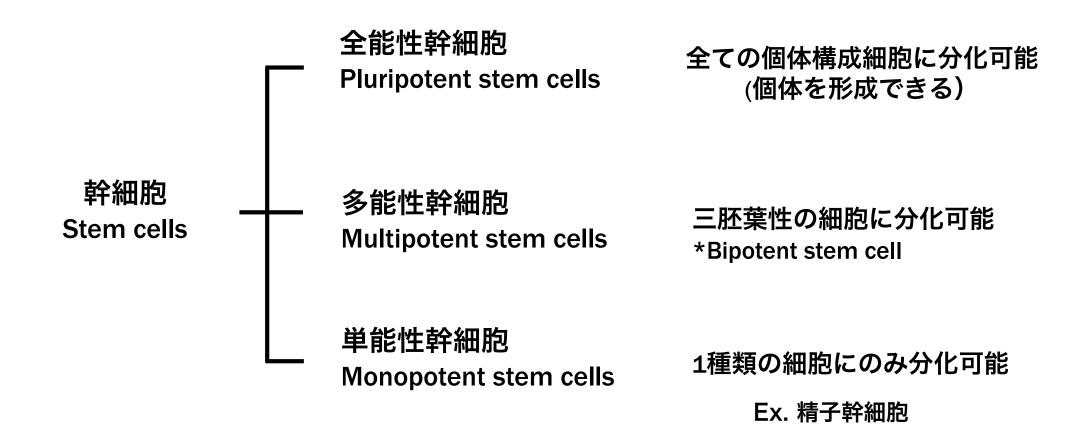
細胞体が無傷であれば、軸索が切断されても 再生可能である

Tang SK & Marshall WF. Science 2017

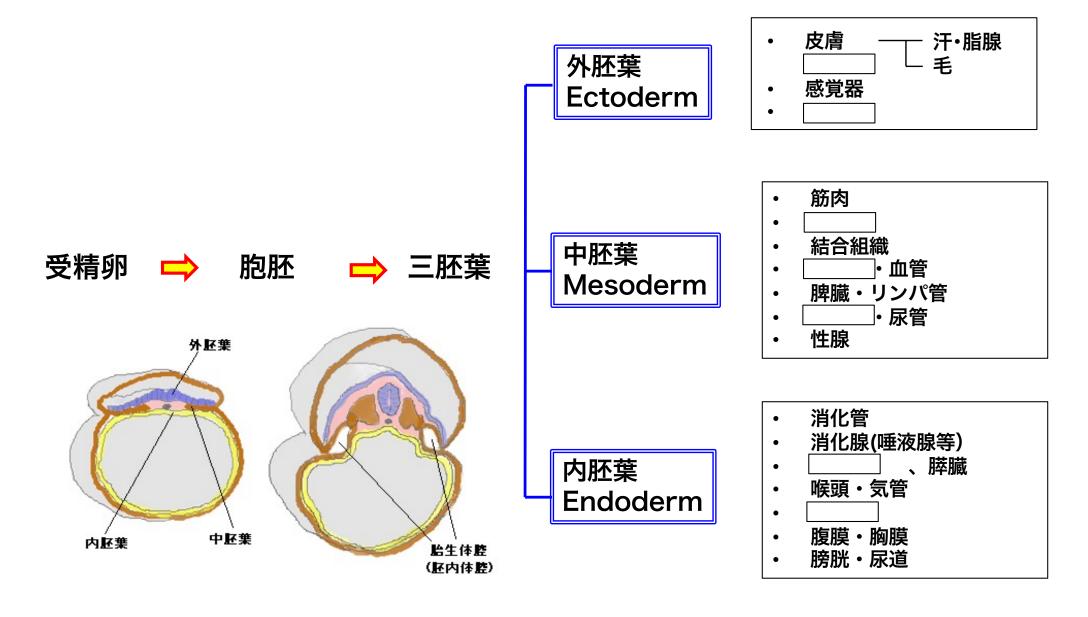
## 体を構成する細胞



## 分化の多能性(方向性)



## 三胚葉分化



## <u>幹細胞 (Stem Cells)</u>

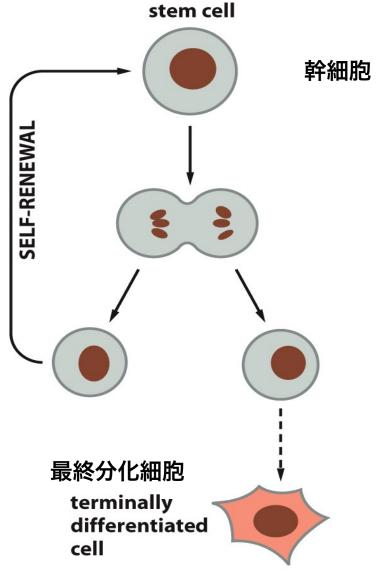
• 全能性幹細胞 (Pluripotent stem cells)

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(GO-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

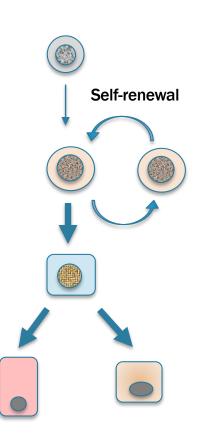


単能性幹細胞 ─────── 前駆細胞 (Progenitor cells)

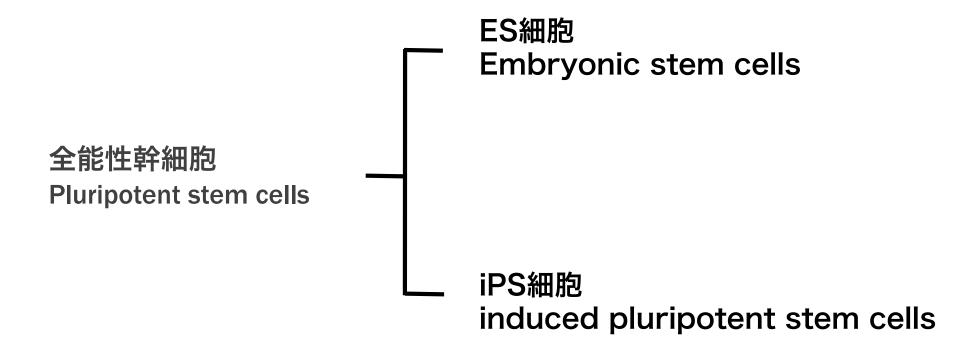


それぞれの組織で主要な 機能を担っている細胞

分化細胞(Differentiated cells)

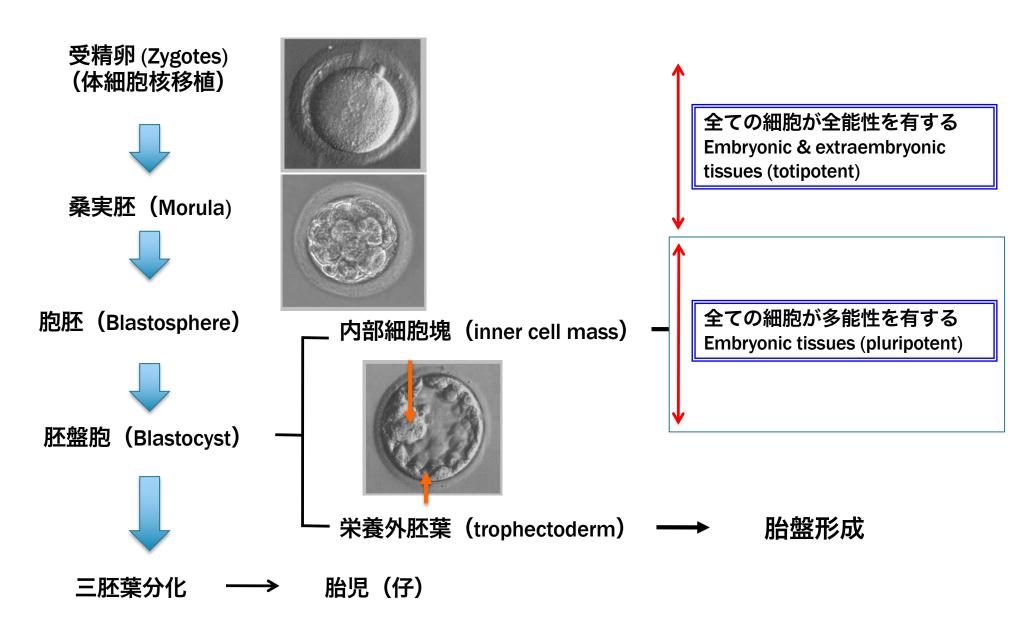


## 全能性幹細胞

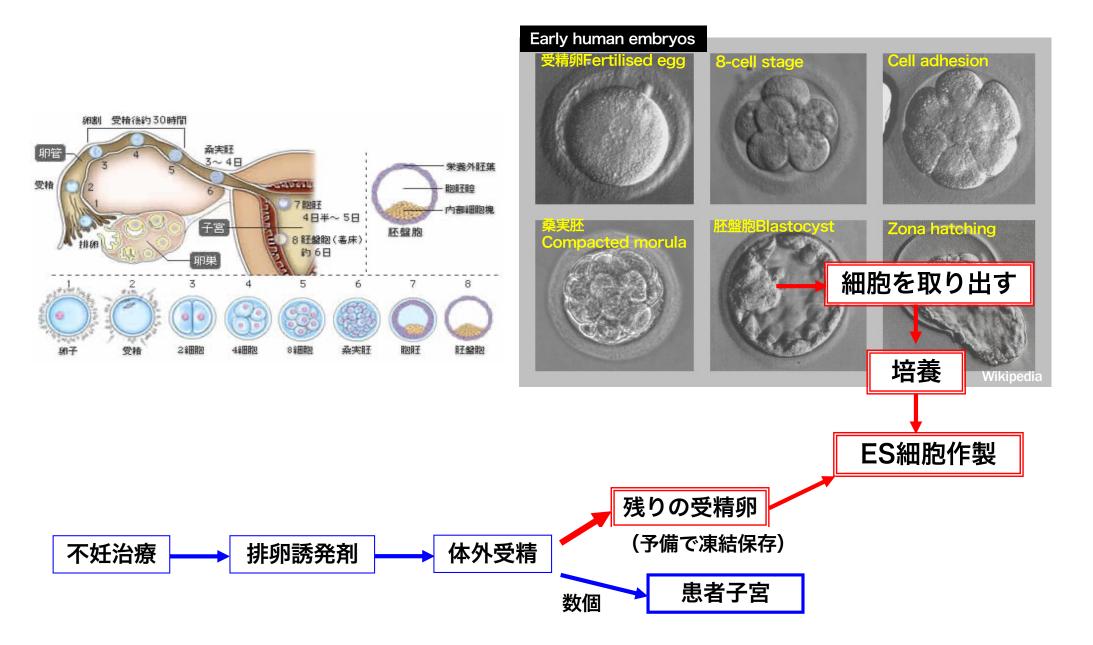


\* 全ての細胞に分化可能な細胞(個体を形成できる)

## <u> 胚性幹細胞 – Embryonic stem cells</u>



## 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HLAと異なる可能性が高い (Human Leukocyte Antigen)

・腫瘍(奇形腫)形成の可能性

ヒトの

でよく見られる

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



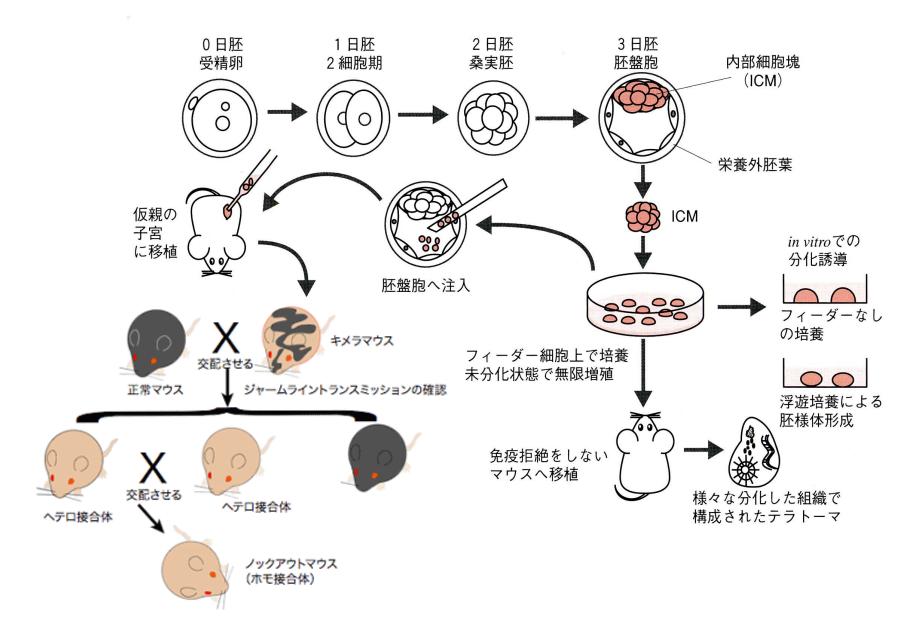
3胚葉由来の細胞・組織からなる (Wikimedia Commons; Ovary)

## 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

## ES細胞 (Embryonic Stem Cells)



## 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 Yamanaka1,2,\*

- <sup>1</sup> Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
- <sup>2</sup>CREST, 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-M and Klf4, under ES cell culture cond Unexpectedly, Nanog was dispensal 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 diseases, spinal cord iniurv, and diabetes (Thomson

## 山中4因子

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

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

Cell

#### 2007年11月

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

Kazutoshi Takahashi, <sup>1</sup> Koji Tanabe, <sup>1</sup> Mari Ohnuki, <sup>1</sup> Megumi Narita, <sup>1,2</sup> Tomoko Ichisaka, <sup>1,2</sup> Kiichiro Tomoda, <sup>3</sup> and Shinya Yamanaka <sup>1,2,3,4,\*</sup>

- <sup>1</sup>Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
- <sup>2</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan
- <sup>3</sup>Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA 94158, USA
- <sup>4</sup>Institute 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 iPS細胞 破壊しない ・受精卵を破壊する (倫理的問題の回避) 患者細胞由来iPS細胞の作製 ・拒絶反応が起こる (免疫拒絶の回避) iPS細胞作成期間 ・腫瘍(奇形腫)形成の可能性 ヒトES細胞 iPS細胞バンク 子宮内に戻せばクローン人間の可能性

## 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

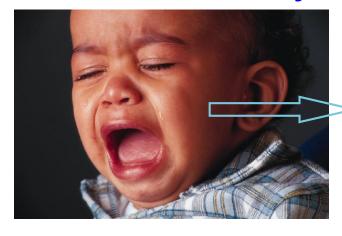
# 生理的再生系組織 Physiologically renewal system

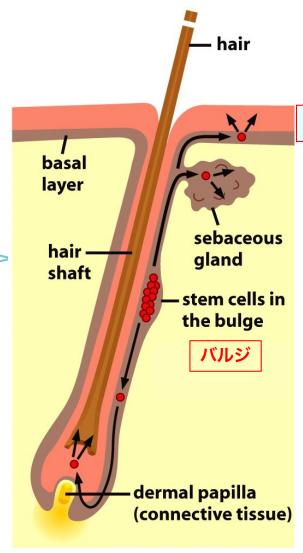
- 皮膚: 約1ヶ月
- ・ 爪:・ 0.1 mm/日 再生するのに3-6ヶ月
- 血液: 赤血球 旦颗粒球 ~ 2 週間
  - T細胞 4~6ヶ月 B細胞 数日~ 年
  - 血小板 \_\_\_\_\_日
- 小腸: ・ 吸収上皮細胞 日
- 子宮内膜: 28-30日周期(月経周期)

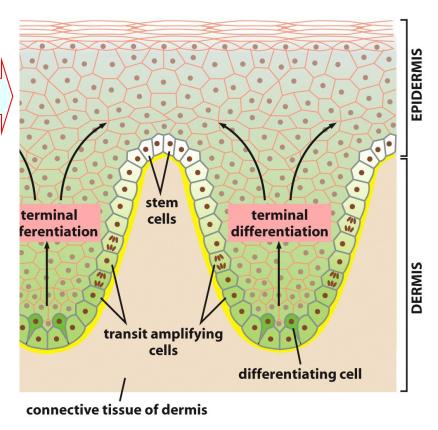
組織幹細胞 (Stem cells) が細胞を生み出している

## ヒトの皮膚組織

生体 Human body



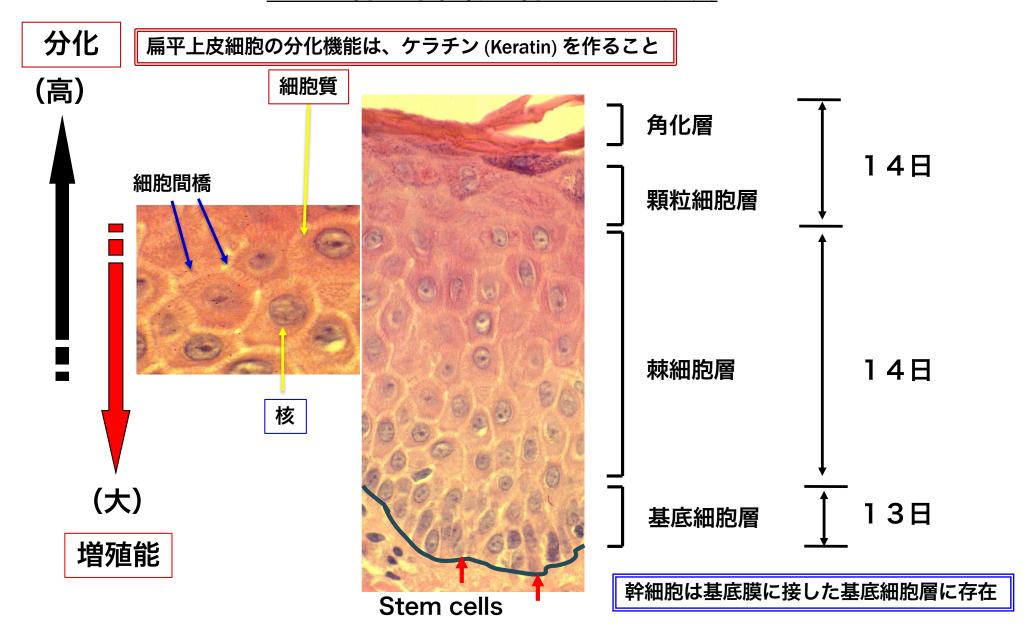




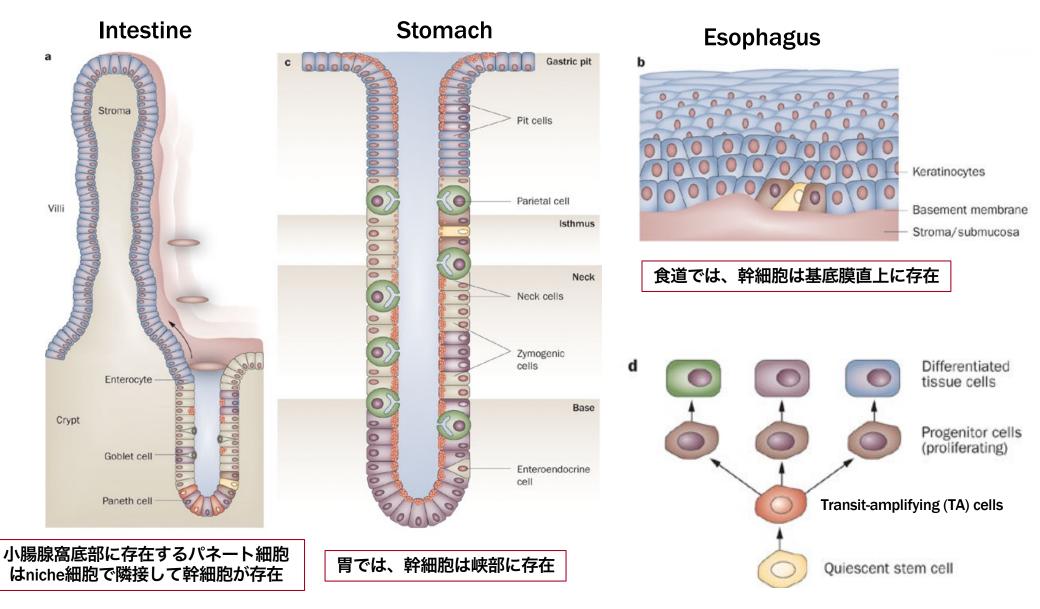
Molecular Biology of the Cell 5<sup>th</sup> Ed から引用

バルジに存在する幹細胞は、毛·皮膚·皮脂腺細胞 の幹細胞になる

## 生理的再生系組織の再生 - 表皮

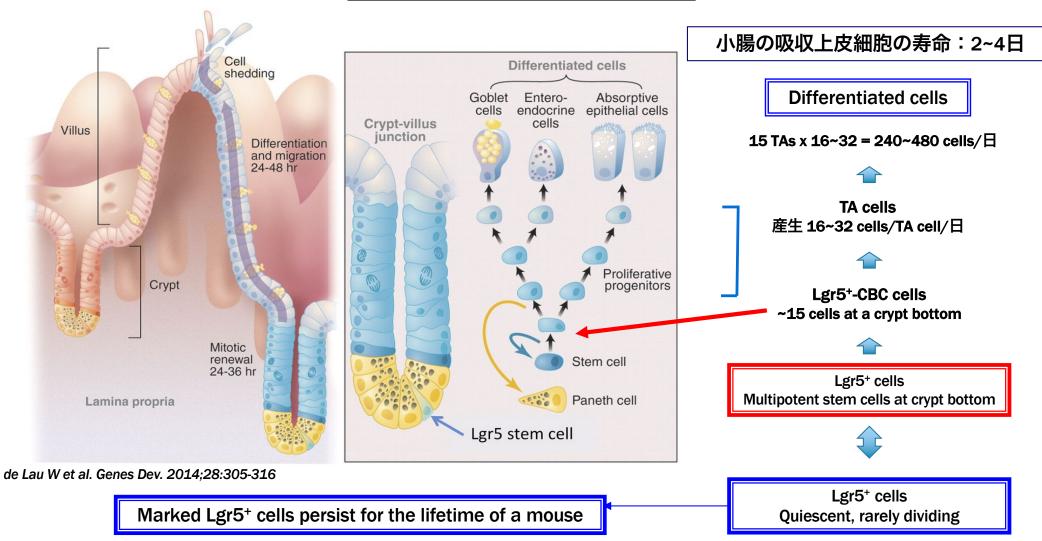


## 消化管組織における幹細胞の種類と存在部位



Quante M & Wang TC, Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 6, 724 (2009)

## 小腸 - Small Intestine



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<sup>11</sup>個、マウスでは2x10<sup>8</sup>個の細胞が失われていく)

## 生理的再生系組織の再生 ー 血球

## 造血組織

胎児期:

成体: 骨髄

<u>マウス骨髄中の造血幹細胞の頻度:</u> 200 ~1000 cells

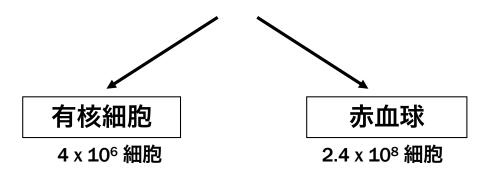
(<0.1% of CD133+ cells)

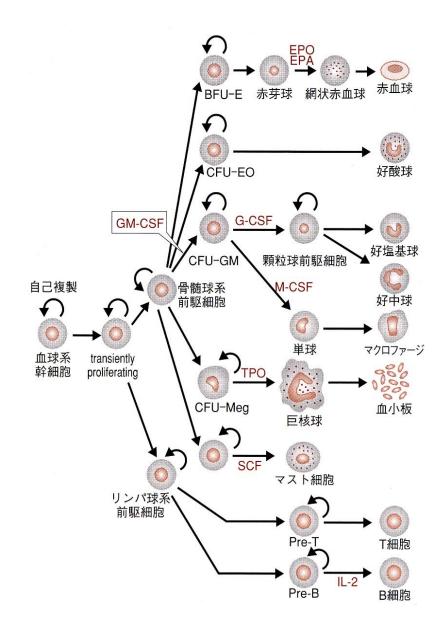
Long-term quiescent (reserved: backup)

HSCs: 1 division/145 days



造血幹細胞 Actively cycling (primed)





## 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): 733-742.

- ・ 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?

世界最長寿者: フランス人女性 ジャンヌ・カルマン 122歳(1875–1997)

日本最長寿者: 田中 カ子(かね) 119歳 (1903-2022)

## 非再生系組織の再生 ー 神経

#### Homeostasis of Neurons in the brain

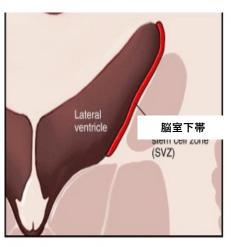
原則、脳・脊髄にある中枢神経は再生しない

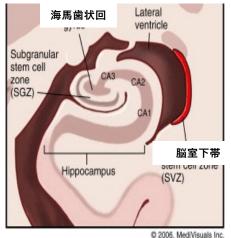
一部の神経細胞は再生する

末梢神経は再生可能

### 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:



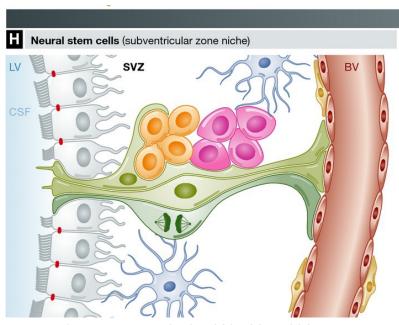
Glial fibrillary acidic protein (GFAP) +

- Neurons
- Astrocytes
- Oligodendrocytes

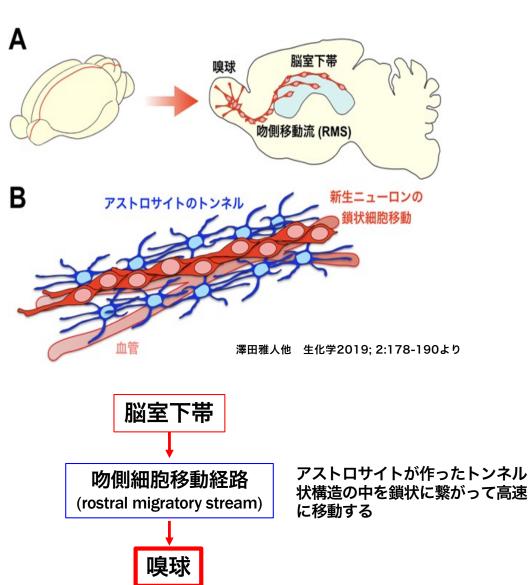
#### **Homeostasis of Neurons in the brain**

## 新生ニューロンの移動

#### **Subventricular zone of the lateral ventricle (SVZ)**



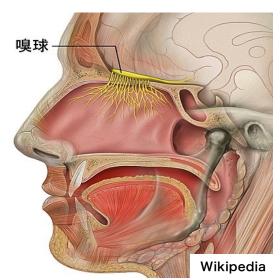
Wabik A & Jones PH. EMBO J 34; 1164-1179 (2015)



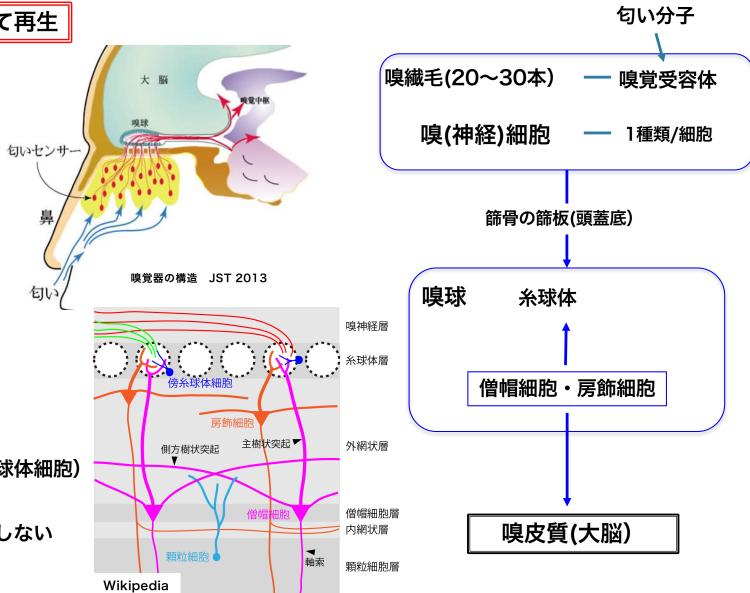
## <u>嗅球 (Olfactory bulb)</u>

嗅神経細胞は生涯に渡って再生

寿命:30~120日

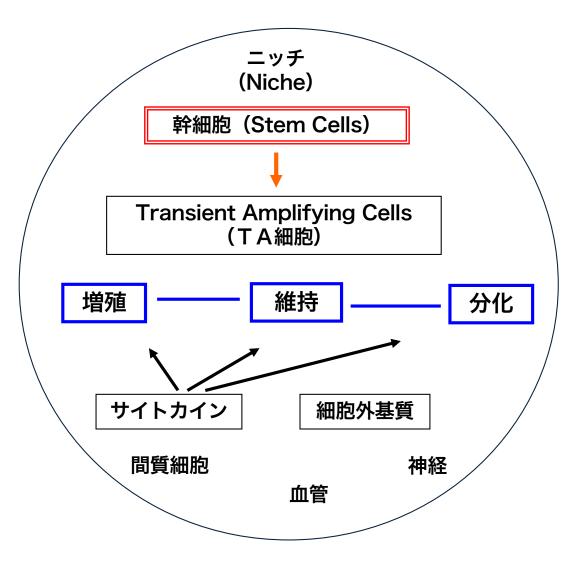


- 介在細胞 (顆粒細胞・傍糸球体細胞) は新生する
- 僧帽細胞・房飾細胞は再生しない



## <u>ニッチ (niche)</u>

## 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

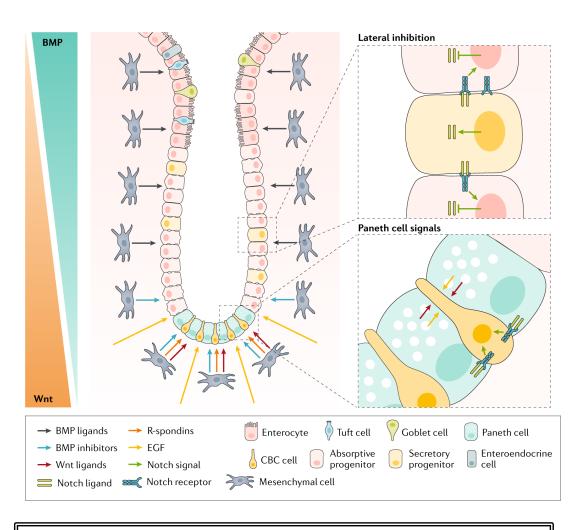
Integrate signals from different sources and often contribute to stem cell mobilization

#### 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- $\alpha$ )
- Noggin (BMP signaling inhibitor)



小腸幹細胞 (Lgr5陽性細胞)



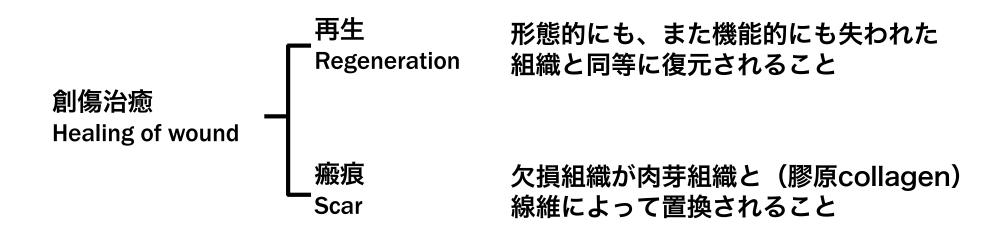
- WNT3
- EGF (TGF- $\alpha$ )
- DLL1 & DLL4 (Notch ligands)

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

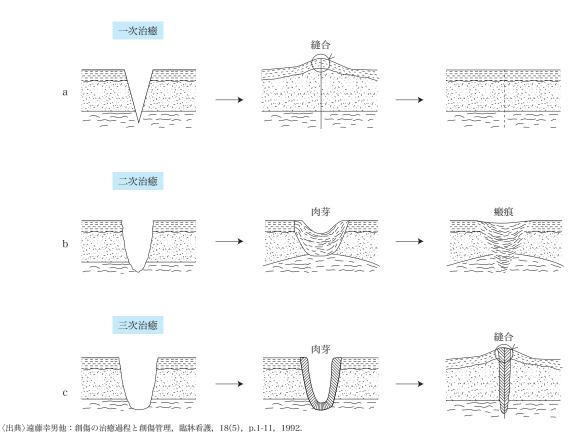
創傷治癒 Healing of wound 損傷部位が元の組織と同等に復元するか(再生)、瘢痕 (Scar)を残して修復(Repair)される機転



\*線維: 生体内の繊維については「線維」が使われる

## 創傷治癒形式

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 "と呼ばれる"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。 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

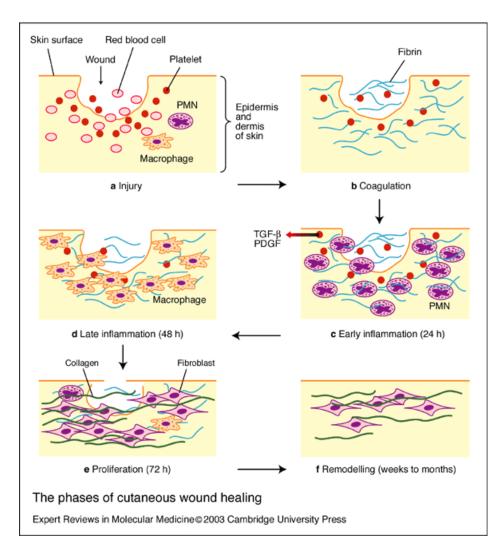
> 2次治癒

皮膚の欠損が大きい創や、汚染の著しい創、 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

## 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:增殖期(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

- ・コラーゲンの産牛と分解が平衡化
- ・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)

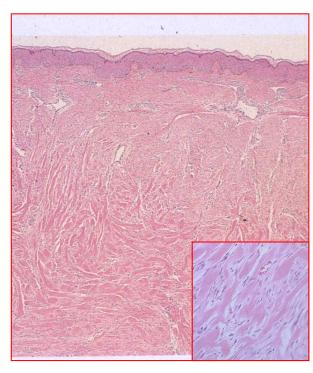
内因性・外因性: 放射線被曝者や若い女性、精巣摘出患者に多い



胸部外科手術跡



ピアース跡



真皮に膠原線維

# <u>肝臓の再生 Liver Regeneration</u>



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  ${\tt PARTIAL SURGICAL REMOVAL*}$ 

GEORGE M. HIGGINS, Ph.D.

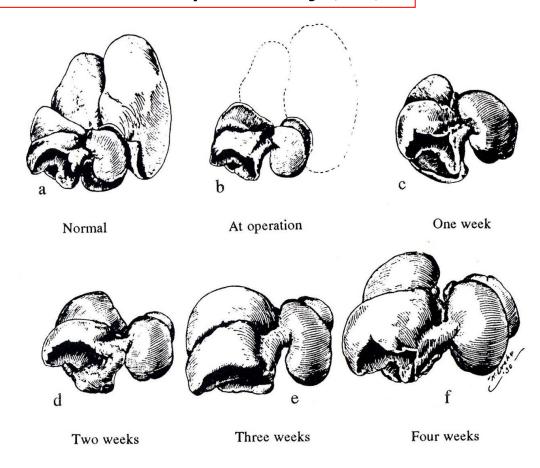
AND

REUBEN M. ANDERSON, M.D.

Fellow in Surgery

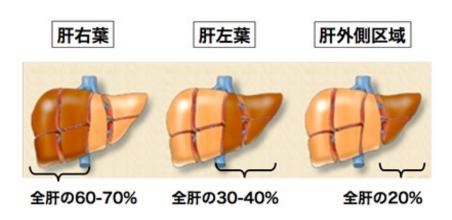
ROCHESTER, MINN.

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.

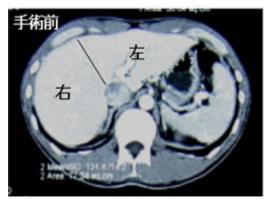


# ヒト生体肝移植

### 手術方法

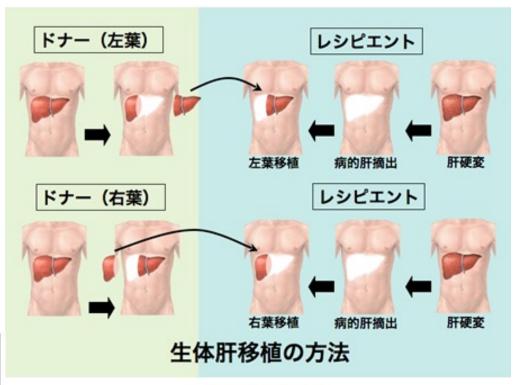


#### Donor肝臓の再生



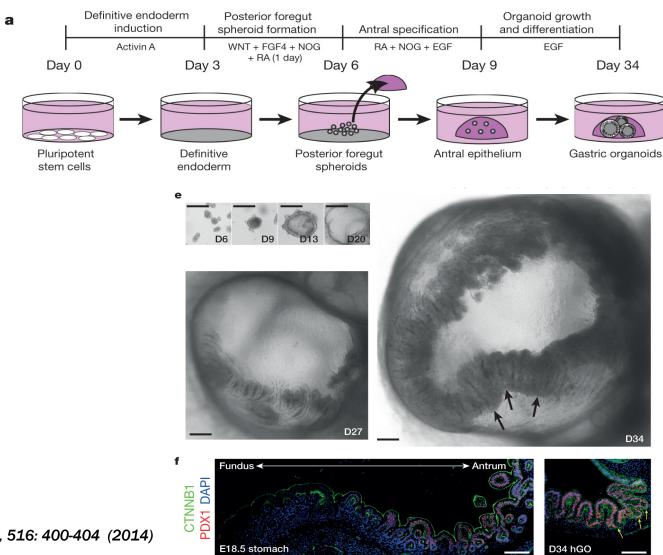


<奈良医大HPより>



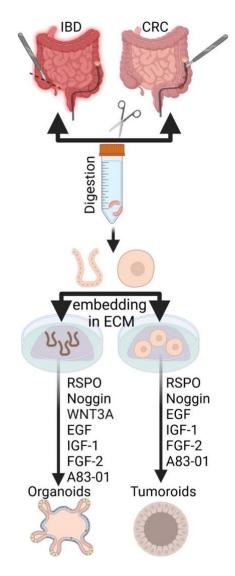
徳島大学外科HPより

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

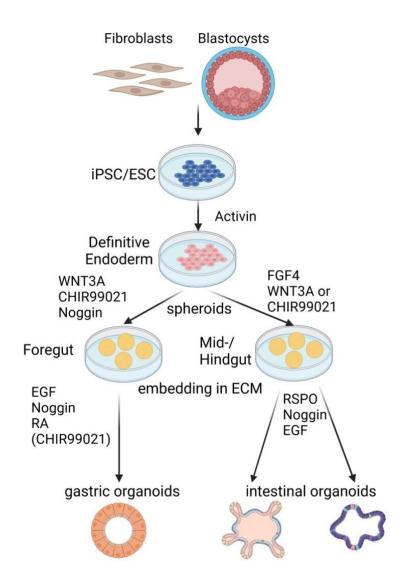


McCracken KW et al. Nature, 516: 400-404 (2014)

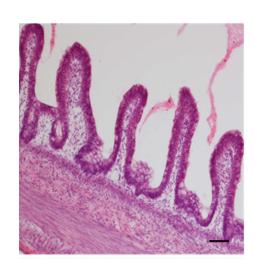
### 疾患由来小腸オルガノイドの作成方法

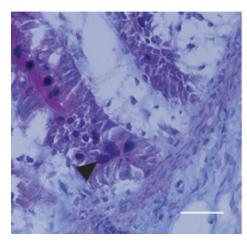


IBD: Inflammatory bowel diseases CRC: Colorectal cancer



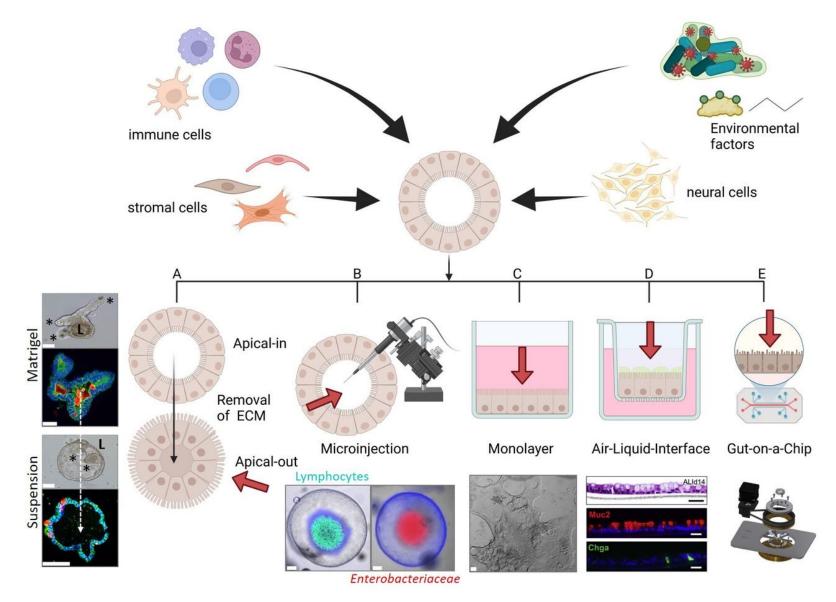
Günter C et al. Gut, 2022;71: 1892-1908





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

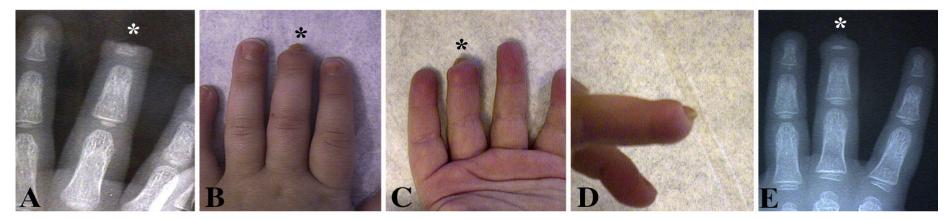
# オルガノイドの応用



Günter C et al. Gut, 2022;71: 1892-1908

# 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

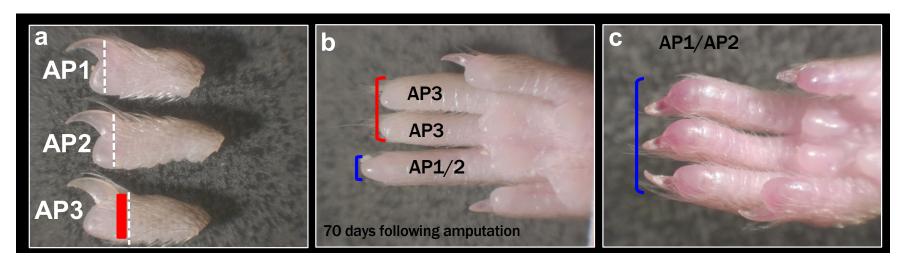


Han M et al. Dev Biol 315(1): 125-135 (2008)

### 爪の一部がちょっとだけ再生

# 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

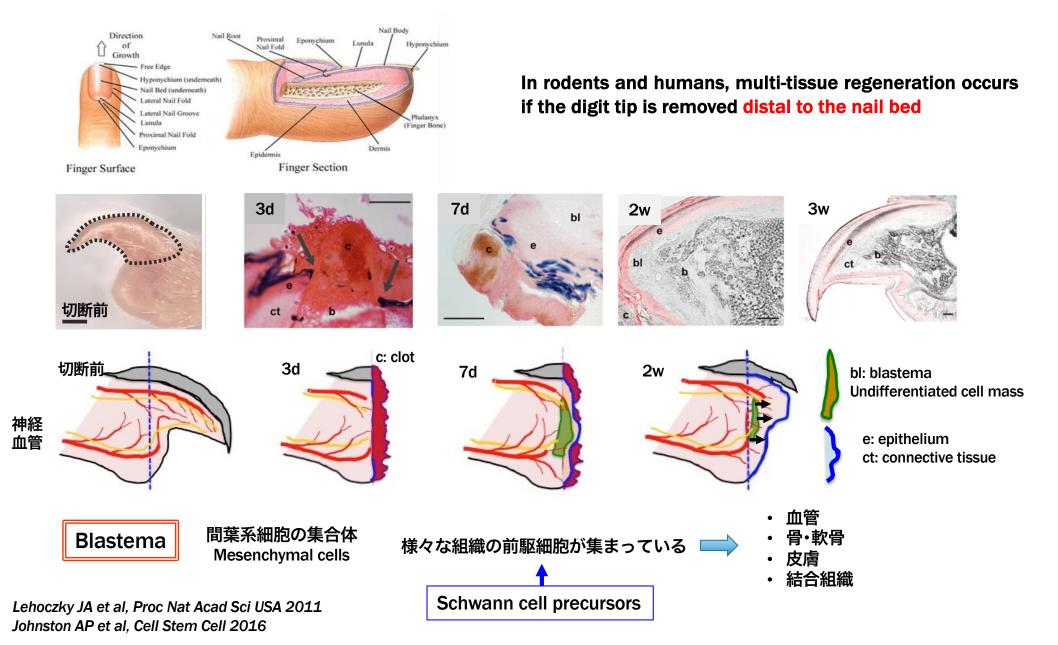


Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip Rinkevich Y, Lindau P, Ueno H, Longaker MT, Weisman IL. Nature 476: 409-414 (2011)

### 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

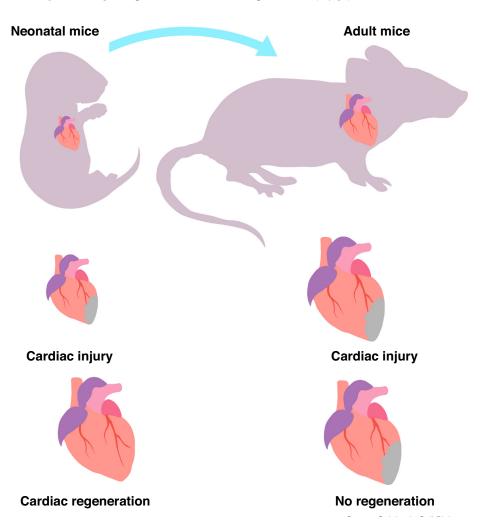
### マウスの指先の再生



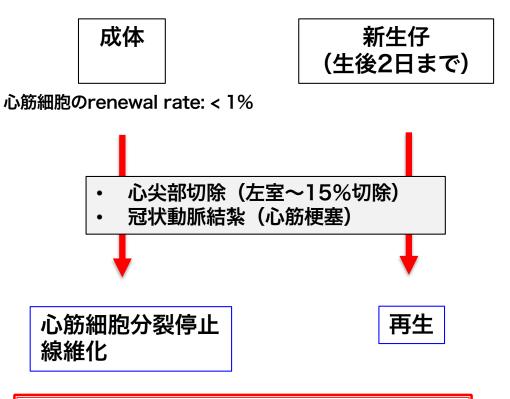
#### **4. Structural Regeneration**

### 心臓の再生

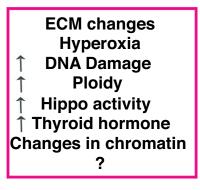
哺乳動物(マウス・ブタ)の心臓再生



Deshmukh v et al. Curr Opin Cell Biol 2019: 61; 79-85



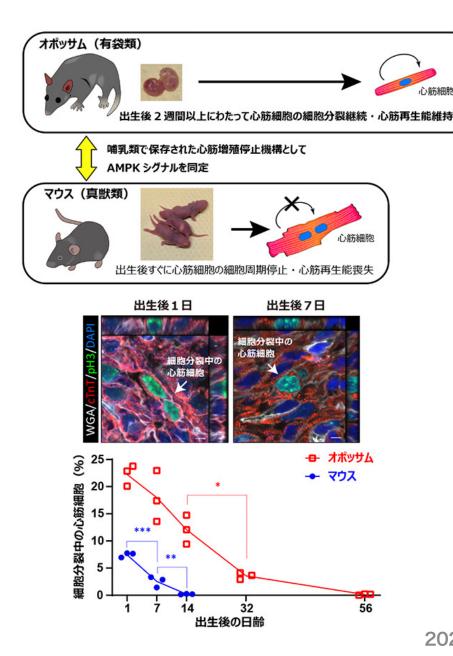
低酸素状態から高酸素状態への急激な環境変化



#### 4. Structural Regeneration

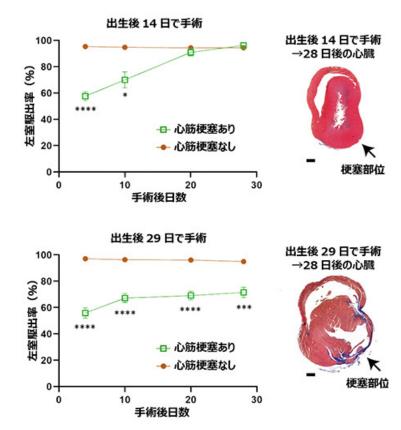
### オポッサムの心臓再生

Nishiyama C et al. Prolonged myocardial regenerative capacity in neonatal opossum. Circulation 2022; 146:125-139



有袋類のハイイロジネズミオポッサムの新生仔は、生後2週間以上 経っても、心臓を再生する能力を維持している

- ・ 心筋細胞の分裂能力は、生後2週でもマウス新生仔1日目と同程度
- 生後2週目に心筋梗塞を起こしても、左室駆出率は20日後にはコントロールレベルに戻る
- ・ AMPKシグナルの誘導が心筋細胞の細胞分裂を誘導している



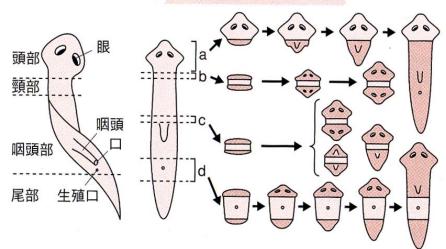
#### **5. Whole body regeneration**

# プラナリアの再生

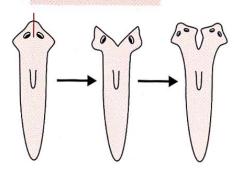
### 扁形動物







#### C)双頭のプラナリア





### 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. lan 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

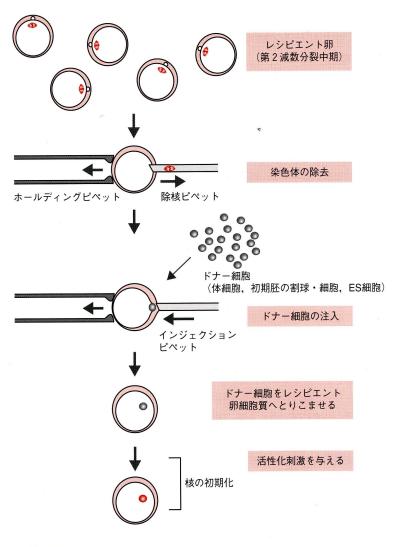


図1◆核移植の概略