

両生類のように人間は再生できるようになるのか？

“Regenerative human.” Is it mere dream or delusion?

佐藤 伸

Assistant professor, Akira Satoh, Ph.D.

岡山大学異分野融合先端研究コア (RCIS)

Research core for interdisciplinary sciences

有尾両生類（イモリ・ウーパールーパーなど）は高い再生能力を持ち、その高い再生能力は長年研究者の研究対象となってきた。有尾両生類は手足を欠損しても失った構造を回復できる。再生能力は手足にとどまらず、脳、鰓、顎、脊椎、脊髄、尻尾、内臓等多岐にわたって確認されている。このような高い再生能力は有尾両生類だけのものなのであろうか？なぜ人は有尾両生類のように再生できないのか？この答えには二つの可能性を上げることができるだろう。

- 1) 有尾両生類は特殊で、人間にはまねできない。
- 2) 進化の過程で高等脊椎動物は失ったが、有尾両生類では維持されている。

1の場合、人間が有尾両生類のように再生できるようになることは無いだろう。しかし、2の場合、進化の過程で再生の機能が「眠った」のであれば、それを目覚めさせることは不可能ではないだろう。我々は現在までの研究成果から2である可能性が高いことを見いだしている。では、有尾両生類の再生機構はどのようなものであるのかを紹介したい。

ヒトの四肢を切断したときの再生反応と比べると、②の段階で大きな差が既に存在している。切断後有尾両生類は速やかにその切断面を上皮が覆う事ができる。反対に高等脊椎動物は速やかな上皮の移動は起こらない。しかし、その上皮の移動能力の差は既に埋められることが研究で判明している（共同

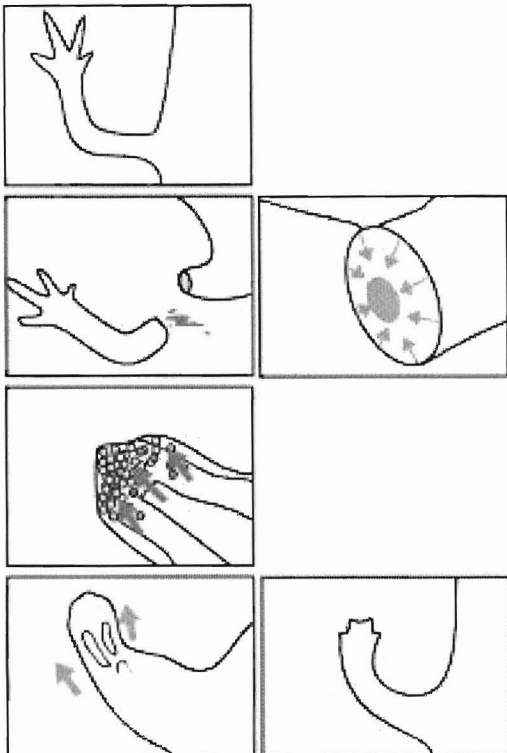


図 1

(1)通常の有尾両生類の前肢。組織構成は人間の四肢の成分とほとんど変わらない。切片の組織像も同じ。

(2)切断による切断面を周囲の上皮が覆う。

(3)切断面周囲より未分化な細胞が産生される。この未分化な細胞は“再生芽細胞”とよばれ、切断面より先端部に形成される「隆起」は“再生芽”と呼ばれる。

(4)再生芽は四肢の「発生過程」を模倣し、構造を再構成する。「発生過程」とは卵の中で起こる受精卵から個体形成までの一連の事象の事である。

研究：近日発表予定)。有尾両生類では切断面の被覆後、切断面にある神経束と移動してきた上皮が相互作用し、上皮が AEC と呼ばれる構造に特殊化される。この特殊化された上皮の成否が、両生類の再生が起こるか起こらないかを決めると考えられる(参考文献 1)。両生類の再生が引き起こされる場合は、上記のような「再生反応」が起こる。では、AEC の誘導が起こらず、再生反応が誘導されなかった場合はどのような反応が起こるのであろうか？ 私たちの研究室では、再生が起こらなかった時の反応に着目して研究を行った。その結果、人間と極めて近い「修復反応が起こる」ことを突き止めた。この研究がなされるまで、有尾両生類は「人とは異なった再生能力しか有さない。したがって、再生に失敗したときは人と同じような修復反応すら起こらない」とも考えられてきた。しかし、私たちの研究によって「有尾両生類もヒトと同じ再生(組織修復)能力を有する。ただ、AEC ができたときには有尾両生類に特徴的な再生が誘導されるだけ」という観点を与えることができた。人と同じ再生能力を有尾両生類が維持していることを示すことで、有尾両生類の再生研究の価値を結果的に高めたと考えることができる。

有尾両生類は腕一本落としても再生できるが、たった 2mm の骨の欠損は再生できないという事実がある(図 2)。この事象に焦点を当てて私たちの研究グループは研究を行った。この時に AEC の誘導は起こっておらず、ひいては有尾両生類に特徴的な再生も誘導されていないことは、分子生物学的手法によって明らかになった(参考文献 1)。この分子生物学的解析の詳細を触れることは避けたい。組織学的な観察からは高等脊椎動物で骨折時に起こる「軟骨カルス形成」と同様の観察像を得ている(図 3)。ヒトなどの高等脊椎動物では骨折や上図のような損傷を骨に与えたときには、その損傷部に軟骨性のカル

スという構造が作られることは周知の事実である(参考 2)。この高等脊椎動物で報告されているカルスと、有尾両生類の骨損傷時のカルス形成を比較した。カルス軟骨の形成プロセスや、細胞増殖等を検定したところ高等脊椎動物のカルス形成と相同のものである可能性が強く示唆された。さらに、これが高等脊椎動物と同様の軟骨カルスであるのであれば、高等脊椎動物で報告されている BMP (bone morphogenic protein) に対する応答性を示すはずである。高等脊椎動物では BMP のインプットによって損傷部に形成される軟骨カルスの著しい増大が観察されている(参考 3)。有尾両生類でも同じ作用を BMP が呈するのかどうかを検証するためにヒトリコンビナント BMP2 を骨の損傷部に適用した。有尾両生類の軟骨性カルスは高等脊椎動物での反応と同様に増大した(図 4)。このことから有尾両生類の骨の損傷時に起こる反応はヒトと同様であることが示唆される。

先述したが、私たちの研究グループは AEC の誘導が有尾両生類特異的な再生の引き金になっていることを見つけている(参考文献 1、4、5)。上記の骨の損傷の場合、通常では AEC は誘導されない。私たちの研究成果が正しければ骨の損傷部に AEC を人為的に誘導してやれば損傷部に有尾両生類特異的な再生反応を促すことができるはずである。AEC とは上皮性の構造で Sp9+, Fgf8+, BrdU- の細胞集団として認識される(参考文献 6、7、図 5)。実際には損傷部を被覆する上皮の最下層が AEC として機能しているようである。この上皮性の AEC は通常では骨の損傷部に直接的に働き掛けることはできない。なぜならば、骨と上皮の間には非常に厚い筋肉層などが存在するため、損傷部と AEC との直接的な接触が妨げられるからである。したがって骨損傷部と上皮を隔てる筋層などの組織を外科的に取り除いた後に AEC を誘導する試みを行った。その結果、修復されなかった骨の損傷が再生している個体を多く認めることができた(図 6)。ヒト型の再生(修復)では骨の損傷は再生できないことは上記のとおりである。ゆえに、損傷部に直接的に作用できる AEC の誘導によって両生類型の再生反応が誘導され、骨の再生が促された可能性が高い。この事実を確認するために分子生物学的なマーカー遺伝子の発現を調べたところ、有尾両生類型の再生に特異的な遺伝子の発現を認めることができた(参考文献 1)。このことからヒト型ではない再生反応系が AEC によって誘導されたと言

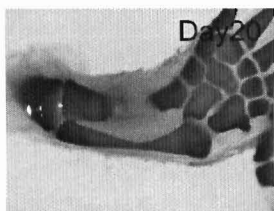


図 2 有尾両生類(ウーパールーパー)は腕丸ごと再生できるがたった 2mm 程度の骨の損傷は再生できない

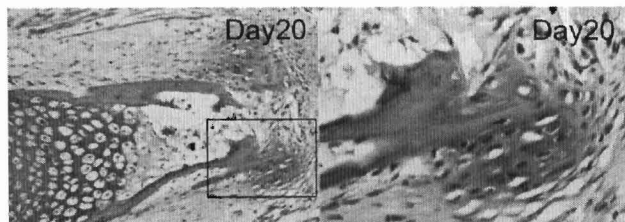


図 3 骨の損傷時に観察されるカルス形成。右は左四角内の拡大図。

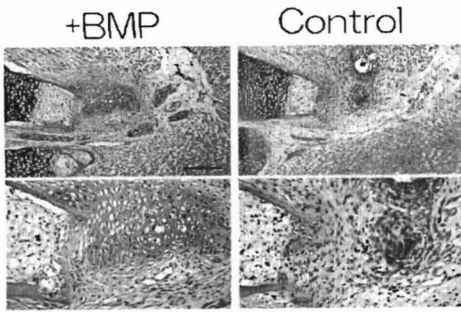


図4 H&Eに加えて Alcian Blueによる組織染色。軟骨は青く染色されている。(左)BMPの添加によって軟骨性のカルス形成が促進されている。(右)Control。

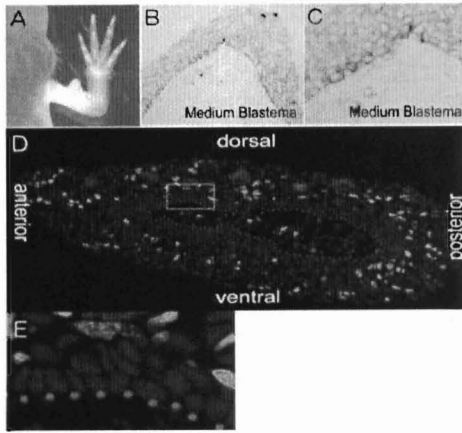


図5 AEC。AECは再生芽(A)の上皮に形成される。(B、C)再生芽の切片。AECはSp9遺伝子発現によって視覚化することができる。(D、E)BrdUのパターン。BrdU+の細胞(緑)は分裂している細胞。青はDAPIによる核染

えるだろう。有尾両生類型の再生の最大の特徴として、「細胞の脱分化」が考えられている。切断前はコラーゲンを産生しているような真皮の細胞が再生過程で「脱分化」し、未分化な細胞へと変貌し、最終的に軟骨を含めた様々な細胞集団へ変わるというものである。この「脱分化」が起こっているのかどうかを確認した。細胞の変化を可視的に追跡するため蛍光タンパク質(GFP)を恒常的に発現している皮膚繊維芽細胞を実験に用いた。このGFP陽性の皮膚繊維芽細胞を骨の損傷部にAECの誘導なしで移植し

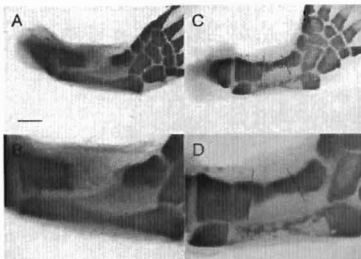


図6 (A、B)Control。骨は再生していない。(C、D)AECを誘導した場合。骨は綺麗に再生される。

た場合、繊維芽細胞は軟骨に分化しない。ところが、このGFP陽性の繊維芽細胞をAECの存在下で骨の損傷部に移植した場合には軟骨への分化を認めることができた(図7)。これらの研究結果からAECの誘導が「高等脊椎動物型の再生(修復)」と「有尾両生類型の再生」の分岐点になっている事が強く示唆される。本研究室では現在、AECに発現する遺伝子を探求し、さらには細胞に「脱分化」を促す因子(Inducers of dedifferentiation; IDE factors)の特定に励んでいる。

AECが二つの再生の分岐点になっているという発見は、高等脊椎動物における四肢再生能力を引き出すヒントになるのではないだろうか?我々高等脊椎動物は切断後にAECを再構成できない。しかし、実は胎児期にはAECに相当する構造を観察することができる。外胚葉性頂堤(AER)と呼ばれるAECに相当する構造は、機能的にAECとほぼ等々であると現在までのところ考えられている。胎児期のごく初期の四肢発生期において、伸長している形態形成中の肢芽(四肢の元になる構造)の上皮に観察される。高等脊椎動物は四肢発生過程の肢芽でも切断するとその失った構造を再生することができないが(図8)、肢芽先端に位置するAERを人為的に切断面に張り付けてやると失った構造を回復することができる。AERとAECが機能的に等価なものであるという事を鑑みれば、有尾両生類型の再生芽高等脊椎動物でも引き起こしうるという事を示す一例なのではないだろうか?

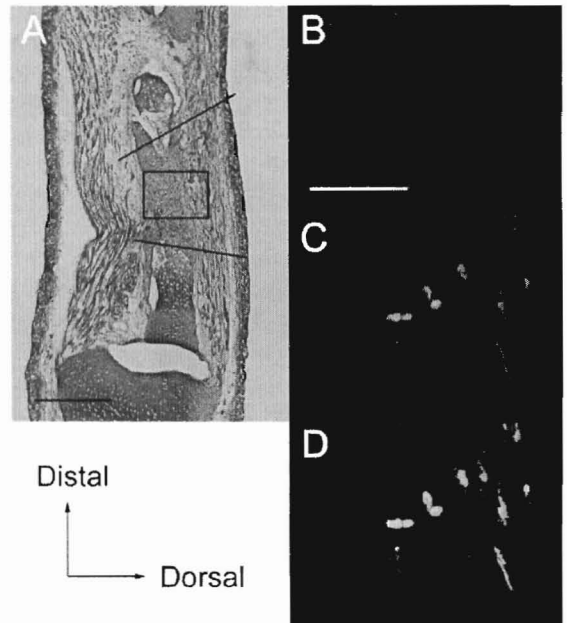


図7 AECの存在下では皮膚繊維芽細胞は多能性を持つ細胞(再生芽細胞)に変貌できる。(A)組織染色像。Linesは骨の損傷部を示す。(B-D)赤色は軟骨。緑は移植された繊維芽細胞。青は核を示す。(D)移植された繊維芽細胞はAECの存在下で軟骨に分化できるようにな

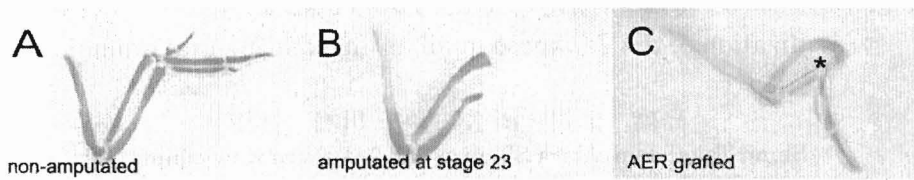


図8 (A)通常のニワトリ前肢の骨格パターン。(B)切断部を切除された場合のニワトリ前肢骨格パターン。(C)切断部にAERを張り付けた時には先端部側の構造が回復される。

有尾両生類と高等脊椎動物の切断後に起こる再生反応の大きな違いはAEC/AERが再構成されるかどうかにある。有尾両生類のAECの再構築プロセスについては私たちの過去の研究によって明らかになりつつある(参考文献6)。このプロセスを参考にして通常切断後にAERの再形成が起こらないニワトリ肢芽でAERの再誘導を試みた。詳細については紙面の都合上割愛させていただくが、損傷後AERを異所的に誘導することに成功している(図9、参考文献8)。重要なことは、このAERの再誘導も有尾両生類で得た知見の応用であるという事である。つまりは、有尾両生類で明らかになった、もしくはこれから明らかにされる知見は高等脊椎動物に応用できる可能性が高いことを示唆しているのではないだろうか?現在のところ私たちの研究グループは高等脊椎動物(マウス)を用いた四肢再生研究にも取り組んでいる。これらの研究成果も有尾両生類の四肢再生研究の知見が大いに役立っている。今後とも有尾両生類と高等脊椎動物との両者において四肢再生研究を推進してゆきたいと考える。

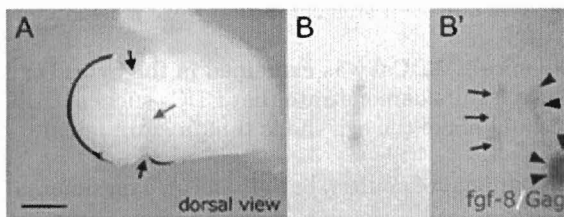


図9 AERを損傷後異所的に誘導することができる。AERの標識遺伝子のFgf-8で異所的に誘導されたAERを可視化している。

最後に

「人が両生類のように再生できるかもしれない。」そんな事を数年前に言っていたら「そんな馬鹿なことがあるものか」と一笑に付されることが多かっただろう。しかし、近年有尾両生類の再生能力は俄かに注目を集めつつある。米国をはじめとして欧州や日本でも大型の研究予算が投じられ始めた。先人達が残した知見がようやく現代生物学と融合し、新しい境地へと昇華しようとしている。私たちの研究グループはこの絶好の機会に恵まれ、鋭意、精力的に

研究活動を行っている。「重箱の隅」ではなく「夢のある研究」を目指すという恩人の言葉を胸に研究活動に勤しんでいる。「夢を抱くものではなく、挑むもの」そんなスタンスで今後もいたいと切に願う。末筆ながら、御研究会には過分な場を設けていただいたうえ、このような寄稿の機会までもうけていただき感謝の言葉もございません。今後のますますのご盛会を心より祈念いたします。また、国枝哲夫・高橋純夫・竹内栄先生方には多大なご尽力を賜りましたことに厚く御礼申し上げます。当研究室の蒔苗亜紀・平田絢子研究員においては研究の推進に多大な貢献をさせていただき深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Satoh A, et al., "Neurotrophic regulation of fibroblast dedifferentiation during limb skeletal regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*)", *Developmental Biology*, 337(2), 444-457, 2010
2. Malizos KN and Papatheodorou LK. "The healing potential of the periosteum molecular aspects.", *Injury*, 36 Suppl 3:S13-9, 2005
3. Hak Dj et al., "Recombinant human BMP-7 effectively prevents non-union in both young and old rats.", *J Orthop Res.*, 24(1):11-20, 2006
4. Satoh A et al., "The Role of Nerve Signaling in Limb Genesis and Agenesis during Axolotl Limb Regeneration", *J. Bone and Joint Surgery*, 91 Suppl 4:90-8, 2009
5. Satoh A et al., "Nerve-induced ectopic limb blastemas in the axolotl are equivalent to amputation-induced blastemas.", *Developmental Biology*, 312(1); 231-244, 2007.
6. Satoh A et al., "Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*)", *Developmental Biology*, 319(2); 321-335, 2008
7. Han MJ, et al., "Expression patterns of Fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl.", *Dev Dyn.* 220(1):40-8, 2001
8. Satoh A et al., "The Apical ectodermal ridge (AER) can be re-induced by wounding, wnt-2b, and fgf-10 in the chicken limb bud", *Developmental Biology*, 342(2):157-68, 2010