

氏 名 杉浦 奈央

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2506 号

学位授与の日付 2024 年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 イモリにおける関節再生に寄与する細胞の同定と追跡

論文審査委員 主 査 藤森 俊彦
基礎生物学コース 教授
阿形 清和
基礎生物学コース 教授
東島 眞一
基礎生物学コース 教授
林 利憲
広島大学 両生類研究センター 教授

博士論文の要旨

氏 名：杉浦 奈央

論文題目：イモリにおける関節再生に寄与する細胞の同定と追跡 (Trial for tracking and identification of the cells participating in joint regeneration using the newt *Pleurodeles waltl*)

Newts are well known for their remarkable regenerative abilities, capable of regenerating functional elbow joints even after amputation at the joint level. The joint serves as the connection between two paired bony tissues and requires harmonious integration with surrounding tissues such as tendons, ligaments, and muscles to facilitate functional flexion and extension movements. Although the mechanism of joint regeneration remains unclear in newts, previous studies have hinted at the potential involvement of cells derived from residual tendon tissue in articular cartilage regeneration.

Here, a serum-free tissue culture system for tendons was established to explore cell dynamics during joint regeneration using the Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*). By combining tendon tissue and regeneration-related factors, it is possible to more clearly visualize cell proliferation and cell migration by regeneration-related factors. Fibroblast Growth Factor (FGF) is produced by nerve and wound epithelia and is known to be an important signaling molecule for blastema formation. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) has been reported to potently induce fibroblast migration, which is required for blastema formation. Culturing isolated tendons in this system, stimulated by regeneration-related factors, such as FGF and PDGF, led to robust cell migration and proliferation. Moreover, cells proliferating in an FGF-rich environment differentiate into Sox9-positive chondrocytes upon Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7) introduction. Conversely, in the case of tendon-derived cells that proliferated in the medium containing PDGF, Sox9-positive cells were suppressed. Thus, it was demonstrated that the response to BMP7 differed according to the regeneration-related

factors added to the medium, and their combination, and FGF-BMP7 added medium induced Sox9-positive chondrocyte-like cells. These findings suggest that FGF-stimulated cells from tendons may aid joint cartilage regeneration during functional elbow joint regeneration in newts.

Interestingly, this was similarly observed not only in newts, but also in mice and chickens in our laboratory although these animals cannot regenerate functional joint. These animals, being warm-blooded creatures, form a scab using blood clotting factors released from platelets to stop bleeding after amputation, suggesting that a significant amount of PDGF might be released in the wound area. Formation of a scab may also block wound epidermal formation, providing an FGF-poor environment to the wound area. Thus, it is possible that they might not be able to fulfill their potential to differentiate into cartilage due to PDGF-rich and FGF-poor conditions. Further analysis is required, but if this is the case in all animal species, it suggests that joint regeneration might be possible in non-regenerating animals in the future.

In summary, I developed a tissue culture system using newt tendons, which could be used to check their responsiveness to regeneration-related factors. Cell migration and proliferation were visualized and the effects of each factor were observed. This tissue culture method can also be easily applied as a system to observe the responsiveness and induced differentiation of other periarticular tissues depending on factors and combinations. It is speculated that this approach could contribute to the study of periarticular tissues.

To validate these *in vivo* schemes, *in vivo* cell fate tracking should be carried out using genetically modified newts, *Pleurodeles waltl*. I focused on the *scleraxis* (*scx*) gene that is a marker gene of the tendon. The full genomic structure of the *scx* gene in *P.waltl* was not yet known, but I have now determined the gene structure. The coding sequence contains the *scx*-specific bHLH domain, adjacent parts are highly conserved between animal species, concluding it is the *scx* gene in *P.waltl*. The variation in *scx*

expression during joint regeneration showed that *scx* is highly expressed in the early regeneration stages. Cell tracking of *scx*-expressing tendon cells is therefore useful. Therefore, I planned to generate genetically modified newts for cell tracking with fluorescently labeled *scx*-positive tendon cells using two strategies: Knock-in and transgenic. Since the knock-in embryos generated by the CRISPR/Cas9 method were lethal, I decided to generate transgenic animals expressing a fluorescent protein under the tendon-specific enhancers, in addition to the knock-in method. If the transgenic line; labeling of *scx*-positive tendon cells can be established, it could be combined with a tissue culture system in the future to enable various analyses, including cell tracking. Therefore, if the newly developed tissue culture system and the identified tendon marker gene *scx* can be used to explain the role of tendons during joint regeneration both *in vitro* and *in vivo*, it will be a powerful tool for elucidating the mechanisms of joint regeneration in newts in the future.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 杉浦 奈央

Title
論文題目 イモリにおける関節再生に寄与する細胞の同定と追跡

本研究では、イベリアトゲイモリを用いて、右前肢の肘関節で切断した時に、機能的な関節を再生するメカニズムを解明し、関節を再生できない生き物でも関節を再生できるようになるかどうかを検討した。特に、関節軟骨の再生に着目し、どのような細胞から関節軟骨が再生されるのか、どのようなメカニズムで関節軟骨を再生する細胞が産み出されるのかに焦点を当てて研究を展開した。具体的には、先行研究によって再生関節軟骨が腱組織由来である可能性が示唆されたことから、成体のイベリアトゲイモリの関節部の腱組織を単離し、それを組織培養する培養法を確立し、再生関連因子(FGF、PDGF、BMP)を培養液に添加して、細胞の増殖・遊走・分化能を調べて、腱の細胞から軟骨の細胞が産み出される条件があるかどうかの検討を行った。

イベリアトゲイモリは、新規モデル生物として継代飼育・ゲノム解読・ゲノム編集などが確立された再生研究用の実験動物と知られているが、組織培養法が確立されていないことから、学位出願者はまずは組織培養法の確立から実験を始めた。イベリアトゲイモリの腱の組織片がシャーレに生着しにくいこと、ゲノムサイズが大きいため細胞の増殖速度が極めて遅いことなどから、組織培養法の確立にかなりのエネルギーと時間が要した。最終的に細胞外基質としてラミニンが入ったマトリゲル(iMatrix 511 silk)をコートしたシャーレに腱組織片を Type(I)-A コラーゲンに包埋して培養することで生着率が高く、早期に遊走細胞が出現する組織培養条件の開発に成功した。また、この組織培養法の特色として無血清培地を用いた培養法である点が挙げられる。その結果、添加する再生関連因子の効果が極めて鮮明にわかるようになったことが利点となった。

この新規に確立された組織培養法によって、FGF と PDGF とともに腱組織細胞の活発な増殖・細胞遊走を刺激することを明らかにした。また、FGF と PDGF を同時に添加した場合において顕著なシナジックな効果が見られなかった。約4週間それらの因子を添加した培地で細胞増殖刺激を行なった細胞に、それらの因子を取り除いてから更に BMP を添加した培地で2週間培養したところ、FGF 刺激を与えて増殖した細胞から軟骨様の細胞が出現してくることを見出した。この軟骨様細胞が軟骨細胞であるかを検証するために、軟骨細胞のマーカーである Sox9 に着目し、抗 Sox9 抗体を用いた免疫染色をしたところ、組織片から遊走してきた細胞の約60%が Sox9 陽性細胞に分化していることが明らかとなった。一方、PDGF を添加した培養条件下で増殖した細胞からは Sox9 陽性細胞の出現は見出されなかった。さらに FGF だけではなく、PDGF も添加して増殖刺激をおこなった細胞からも Sox9 陽性細胞の出現が見出されなかった。また、それらの細胞から RNA を抽出して

各種の軟骨関連・腱関連遺伝子について定量 PCR 解析を行ったところ、FGF 単独で増殖刺激した細胞では、BMP 添加によって関節軟骨のみならず腱細胞の分化マーカーの強い発現が検出された。一方、FGF に PDGF も添加して増殖刺激した細胞に BMP を添加した場合には軟骨細胞や腱細胞の分化は検出されず線維芽細胞へと分化したことが示唆された。

以上の結果から、FGF によって増殖刺激を受けた腱組織由来の細胞は、BMP によって軟骨へと分化転換すること、一方 PDGF は FGF 同様に腱由来細胞を増殖刺激するものの、BMP による軟骨への分化転換は誘導されないことが明らかになった。さらに、FGF と PDGF の両方の存在下で増殖した細胞でも活発な軟骨分化が見られなかったことから、PDGF は腱由来細胞からの軟骨分化に対して抑制的に作用することが示唆された。

今回の発見によって、イベリアトゲイモリの関節部の切断後に機能的な関節が残存部から再生されるメカニズムについて、次のような考察ができるようになった。すなわち、関節部の切断後に血小板から放出される PDGF によって残存部の細胞が活発な増殖刺激を受け再生芽を形成した後に、再生芽から FGF が産生されることで残存部の細胞に新たな増殖刺激が与えられ、さらに残存部の関節軟骨からの BMP の放出を促進することで、残存部を覆った腱組織由来細胞が軟骨細胞へと分化転換すると考えられた。その結果、残存部と相補的な形の関節軟骨が再生部分に形成され、かつその関節軟骨は残存部から伸びてきた腱の中に作られることで、機能的な関節を自己組織化・再生できると考えられた。複雑な機能と構造をもつ関節の再生を、初めて細胞レベル・分子レベルでイメージできるようにした研究として高く評価できる。

さらに、このイベリアトゲイモリの腱組織培養によって観察された細胞ダイナミクスはニワトリやマウスの腱組織片の組織培養によっても同様に観察されている(堀田ら未発表)ことから、関節再生が見られないニワトリやマウスなどにおいても将来的に関節を再生できるようになるかもしれない、という将来に夢を与える結果となったことも評価される。すなわち、恒温動物であるニワトリやマウスでは、切断後の大量出血を阻止するために血液凝固反応が活発に行われるが、その結果として血小板から多量の PDGF が放出されることが予想される。また、血栓によって傷口を塞ぐことで FGF の発現誘導も抑えられることとなり、PDGF-rich で FGF-poor な細胞環境が残存部の細胞に提供され、その結果、関節の切断面が線維性の構造物で覆われることも説明できるようになる。一方、変温動物であるイモリやカエルでは、傷口は傷上皮で覆われて閉じることで PDGF-poor で FGF-rich な環境が創出され、その結果、残存部から増殖・遊走してきた腱や靭帯由来の細胞が関節軟骨へと分化し、残存部の骨や筋肉と強固に繋がれた関節軟骨が再生すると説明できる。すなわち、再生できる動物と再生できない動物の差は、細胞自律的な違いではなく、切断後に起きる細胞が置かれる環境の違いによる可能性を示唆したことで、今後の再生医療研究にも新たな視点を開くことが期待される研究となった。

イペリアトゲイモリを用いた実験系を開発したのは、*in vivo*の関節再生過程でも腱由来細胞が関節軟骨に分化することを遺伝子改変イモリによって直接的に証明できる点であろう。そこで出願者は腱細胞のマーカー遺伝子として知られる *scleraxis(scx)*遺伝子に着目した。従来のイペリアトゲイモリの遺伝子/ゲノム・データベースでは見出すことができなかった *scx* 遺伝子について、最近の HiFi ロングリード・シーケンサーによって見出すことに成功し、その構造解析をするとともに、*knock-in(KI)*法および *transgenic(TG)*法による *in vivo*での腱細胞標識を試みた。残念ながら、まだ、*KI*法・*TG*法のどちらについてもその作製に成功はしていない。特に *KI*法については、*scx* 遺伝子の *knock-out* 個体の多くが幼生致死となったことから、*KI*イモリの作製の困難が予想された。一方で、*scx* 遺伝子のプロモーター/エンハンサー候補領域の探索に成功したことから、今後、それらの候補領域をドライバーとして蛍光タンパク質遺伝子を腱細胞特異的に発現させることで、*in vivo*の関節再生過程においても、蛍光標識された腱細胞から関節軟骨が再生することを証明されることを期待したい。

生体内での関節再生過程で腱細胞が関節軟骨細胞に寄与することの証明には至らなかったが、組織培養系を確立したことで、イモリにおいて腱細胞が関節軟骨細胞に分化転換できることを証明しただけでなく、その分化転換を引き起こす条件を見つけたことで、関節再生の新たなメカニズムの発見をもたらした。博士論文の内容のほとんどが既に国際誌に掲載決定されており、国際的にも評価されている。以上により審査委員会は、本論文が博士学位の授与に相応しい研究であると認定した。なお、審査会については令和6年1月24日に、基礎生物学研究所の第一セミナー室で行った。