

博士論文

メキシコサラマンダーにおける  
皮膚のコラーゲン線維構造と再生機構の解析

2023年3月

榎本 玲菜

岡山大学大学院

自然科学研究科

## 目次

緒言.....	2
第一章：真皮におけるコラーゲン線維構築過程の解析 .....	14
要旨.....	15
序論.....	16
結果.....	19
考察.....	34
材料と実験方法 .....	37
第二章：真皮コラーゲン線維構造の再生機構の調査 .....	46
要旨.....	47
序論.....	48
結果.....	50
考察.....	64
材料と実験方法 .....	67
第三章：神経によるコラーゲン線維構造回復メカニズムの解明.....	74
要旨.....	75
序論.....	76
結果.....	78
考察.....	90
材料と実験方法 .....	93
総括.....	99
謝辞.....	105
引用文献 .....	108

## 緒言

## 皮膚再生研究の重要性

身体全体を覆う「皮膚」のおかげで、私たちの身体は外部環境から守られている。皮膚はバリア機能を持つだけでなく、外見にも関与することから、健康と美容の両面から多くの関心が払われてきた。外傷、熱傷、凍傷、紫外線など、私たちの皮膚は常に様々な危険にさらされている。健康で美しい皮膚を守り、人々の quality of life (QOL)を高めるためには、皮膚科学の理解を深め、皮膚創傷に対する有効な治療法を開発することが必要である。

## 皮膚の構成

皮膚は、表皮と真皮で構成される(図 0-1)。表皮は外胚葉由来の角化細胞(keratinocyte)から成る組織で、角化細胞同士がデスモソーム(desmosome)、ギャップ結合(gap junction)、ヘミデスモソーム(hemidesmosome)で結合することで、外界と身体の内部が遮断されている。真皮との境界面にあたる基底層には幹細胞が存在しており、それらが増殖を繰り返すことで、表皮の恒常性が維持される。一方の真皮では、中胚葉または神経堤由来の線維芽細胞(fibroblast)が中心的に働き、多くの細胞外マトリクス(extracellular matrix, ECM)を産生している。真皮のECMは、膠原線維(コラーゲン)、弾性線維(エラスチン、フィブリリンなど)、基質(プロテオグリカンなど)で構成されており、これらが協調的に働くことで、皮膚の強靭性や弾性、湿潤性が保たれている。真皮上層部のECM

では細い線維が疎に存在しており，反対に，下層部では太い線維が密に走行している。  
こうした真皮上層部のことを，哺乳類では乳頭層 (papillary dermis)，両生類では海綿層  
(*stratum spongiosum*) と呼び，真皮下層部はそれぞれ，網状層 (reticular dermis)，緻密  
層 (*stratum compactum*) と呼ぶ。このように，皮膚の基本構造は哺乳類から両生類まで  
広く保存されている (Abe et al., 2020)。

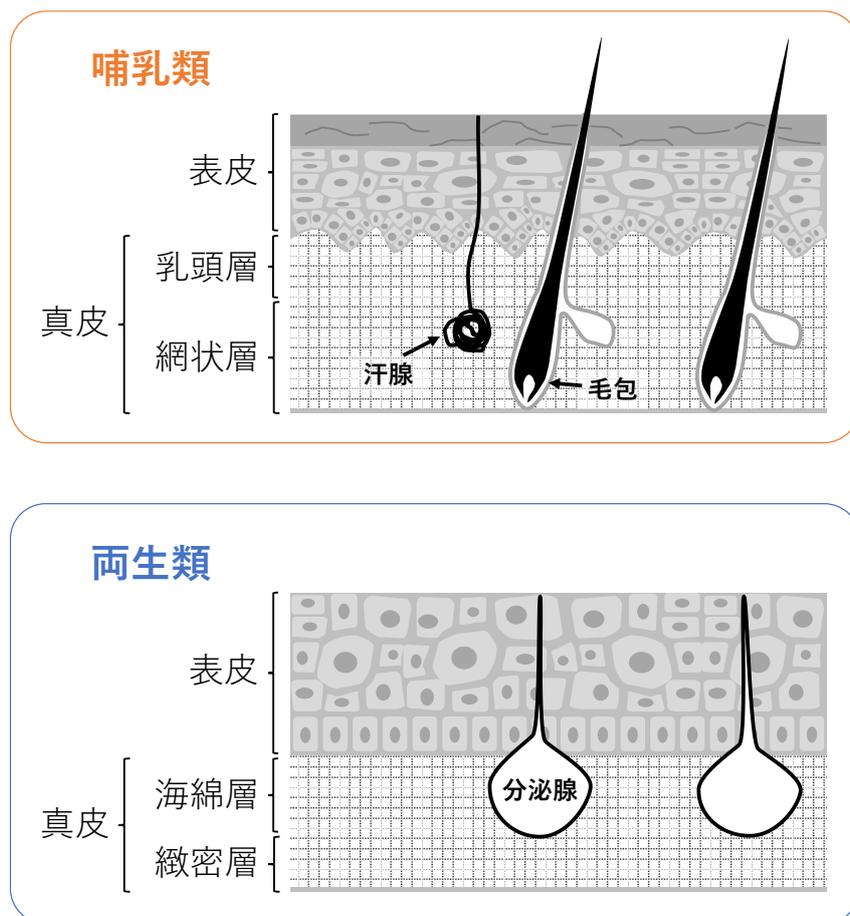


図 0-1. 皮膚の基本構造は，脊椎動物内で広く保存されている

## 真皮における I 型コラーゲンの役割

I 型コラーゲンは、真皮 ECM 中で最も豊富に存在しているタンパク質である。ヒトのコラーゲンファミリーは現在までに 28 種類報告されており、これらのコラーゲン分子はいずれも三重らせん構造をとる (Birk and Bruckner, 2005; Gordon and Hahn, 2010; Ricard-Blum, 2011)。分子同士の重合の仕方はコラーゲンのタイプによって異なり、線維型、膜結合型、ネットワーク型などが存在する。I 型コラーゲンは線維型に分類される長鎖のタンパク質であり、2 本の  $\alpha 1$  鎖 (COL1A1) と 1 本の  $\alpha 2$  鎖 (COL1A2) で三重らせんを形成する (図 0-2)。三重らせん同士が重合することで、直径 10-300 nm の細線維 (fibril) となり、細線維がさらに重合することで直径 0.5-3 $\mu$ m の線維 (fiber) を形成する。I 型コラーゲンは、皮膚の他に、腱、靭帯、骨にも豊富に存在し、各組織の強度を支えている (Sherman et al., 2015)。

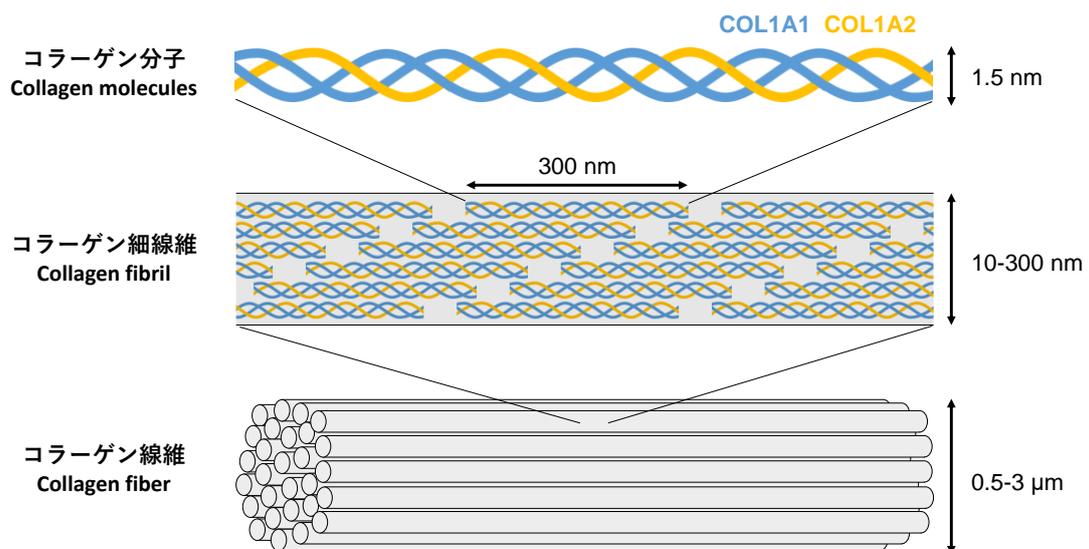


図 0-2. I 型コラーゲン線維の構造

## 真皮のコラーゲン線維構造に関する先行研究

真皮にコラーゲン線維が豊富に含まれることは、哺乳類 (Fisher et al., 2008; Fligel et al., 2003; Sherman et al., 2015; Ushiki, 2002) のみならず、爬虫類 (Kandyel et al., 2021) や、両生類 (Felsemburgh et al., 2009; Lévesque et al., 2010; Seifert et al., 2012), 魚類 (Morris et al., 2018) に至るまで、様々な動物で確認されている。真皮のコラーゲン線維構造を解析するための手法としては、これまでに走査型電子顕微鏡法 (scanning electron microscopy, SEM) (Tsuji et al., 1979) や、透過型電子顕微鏡法 (transmission electron microscopy, TEM) (Birk et al., 1991), 二光子顕微鏡を用いた第二高調波発生 (second-harmonic generation, SHG) (Jiang et al., 2011; Williams et al., 2001) などが利用されてきた。

上記3手法は、いずれも非染色でコラーゲン線維構造を可視化できる手法である。SEM や TEM は組織表面の微細構造の観察に適した手法である一方、SHG は組織内部の構造も観察可能であり、かつ未固定サンプルに対しても適用することができる。非侵襲的に組織内部のコラーゲン線維を可視化できるため、生体コラーゲンを観察するための有効な手段として注目されている。このような観察法を用いた先行研究によって、これまでにヒト、ブタ、ゼブラフィッシュにおいて、真皮下層部 (網状層または緻密層) のコラーゲン線維が格子状の構造を取ることが報告されている (Meyer et al., 1982; Morris et al., 2018; Ueda et al., 2019)。しかし、格子状のコラーゲン線維が真皮内で編まれる仕組みについては未解明であった。

本研究の第一章では、透明度の高いメキシコサラマンダー (*Ambystoma mexicanum*) の皮膚を対象に、一細胞レベルでコラーゲン線維を可視化することで、コラーゲン線維の構築過程を観察した。

### 真皮線維芽細胞の多様性

線維芽細胞とは、結合組織において膠原線維や弾性線維を産生する間葉系の細胞を指し、その定義は極めて大雑把である。線維芽細胞全般で発現するマーカー遺伝子としては、*Vim*, *Coll*, *Pdgfra* などが知られているが、血管内皮細胞や骨芽細胞といった線維芽細胞以外の細胞でも発現するため、線維芽細胞を正確に定義することは難しい (Driskell and Watt, 2015)。また、真皮の線維芽細胞の発生起源は身体の部位によって異なり、顔は神経堤から、四肢は側板中胚葉から、背中では沿軸中胚葉から発生する。さらに、同じ部位の線維芽細胞であっても、いくつかの亜集団が存在し、それぞれに異なる遺伝子発現パターンを示すことが報告されている (Driskell and Watt, 2015; Driskell et al., 2013; Fries et al., 1994; Philippeos et al., 2018; Rinkevich et al., 2015; Rognoni and Watt, 2018)。このように、真皮線維芽細胞は不均一で多様な細胞集団であることが分かっているが、各亜集団の機能の詳細は多くが謎のまま残されている。

本研究の第一章では、メキシコサラマンダーにおいて、真皮 ECM の主成分である I 型コラーゲン線維の構築を担う線維芽細胞の、形態的特徴を明らかにした。

## 哺乳類と両生類の皮膚再生能力の違い

私たちヒトの皮膚再生能力は極めて限定的である。表皮までの浅い傷であれば元通りに再生することができるが、真皮深くまで傷が到達する場合には癒痕（scar）が形成され、傷跡として残ってしまう（Xue and Jackson, 2015）。この癒痕は、損傷刺激を受けた線維芽細胞が、コラーゲンを無秩序かつ過剰に産生することによって作られる。癒痕組織が一度形成されると、その後毛包や分泌腺などの皮膚付属器は再形成されなくなり、結果的に皮膚機能の低下に繋がってしまう（図 0-3）。そのため、重度の皮膚損傷にも対応できる治療法を確立するためには、癒痕形成を阻害する方法を見つける必要がある。

ヒトとは異なり、カエルやメキシコサラマンダーなどの両生類の場合は、表皮と真皮の全層を切除するような深い傷を負った場合でも、皮膚付属器を含む組織を再形成することができる（Lévesque et al., 2010; Seifert et al., 2012; Yokoyama et al., 2011）（図 0-3）。そのため、両生類は完全に皮膚を再生できると考えられてきた。しかしそれは、あくまで組織学上のマクロな視点からの評価であり、ECM の微細構造に焦点を当てたミクロな観察は行われていなかった。両生類の皮膚再生の完全性を確かめるためには、ミクロな視点に基づく再評価が必要だと考えられる。

本研究の第二章では、メキシコサラマンダーの修復真皮におけるコラーゲン線維構造を解析し、完全な元通りにはなっていないことを発見した。さらに、神経由来のシグナルが、皮膚損傷部のコラーゲン線維構造の再生を誘導することも明らかにした。

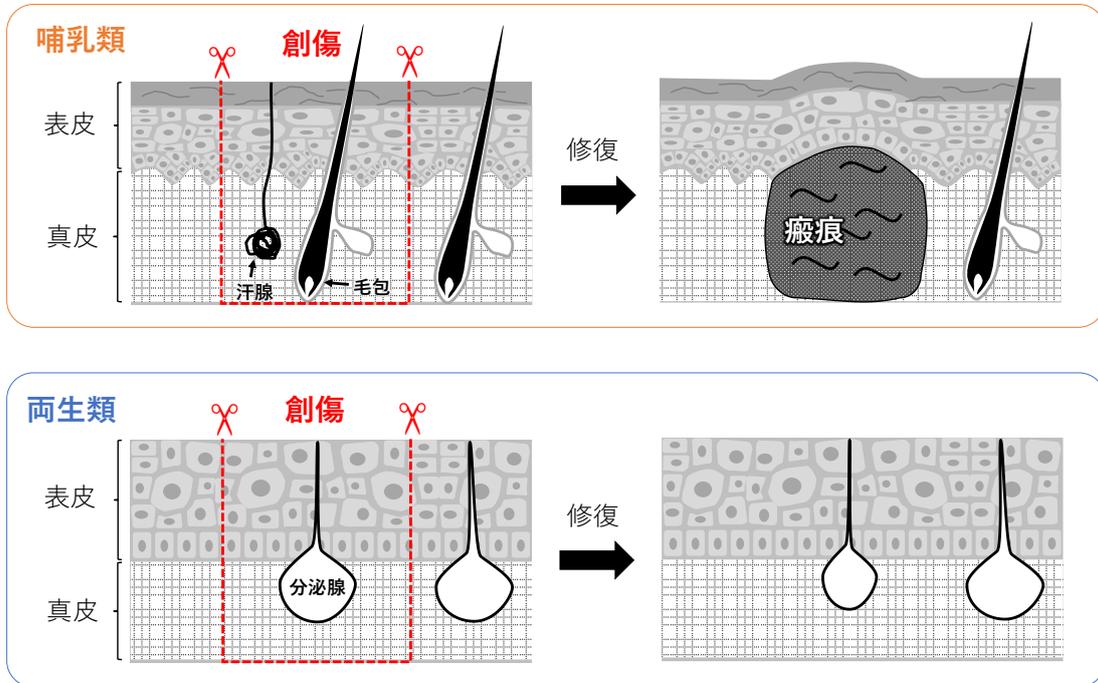


図 0-3. 組織学的観察による、哺乳類と両生類の皮膚修復の比較

哺乳類の場合は、真皮層に瘢痕が形成され、毛包などの皮膚付属器は失われる。一方の両生類では、皮膚付属器を含む真皮層が再形成される。

## 有尾両生類の優れた器官再生能力と、神経の再生効果

メキシコサラマンダーやイモリなどの有尾両生類は、四肢や尾など様々な器官を再生できるが、それらの器官再生の初期過程において、「神経」の存在が不可欠であることが古くから指摘されていた (Satoh et al., 2018; Singer, 1952)。メキシコサラマンダーの例では、四肢、尾、歯、外鰓において、再生に神経が寄与することが報告されている (Endo et al., 2004; Makanae et al., 2016a, 2020; Mullen et al., 1996; Saito et al., 2019)。このうち特に研究が進んでいる四肢再生について、再生の流れと神経の役割を概説すると以下のようになる。はじめに、四肢が切断を受けると、24 時間以内に傷口が表皮（傷上皮）で覆われる。つづいて、真皮、軟骨、筋肉などから脱分化した細胞が表皮の下に集まり、再生芽 (blastema) と呼ばれるふくらみが生じる。その後再生芽が伸長し、骨格パターンを再形成し、最終的に元の形状の四肢に戻る (図 0-4)。有尾両生類は通常、上記の流れで四肢を再生する。しかし、四肢切断の前に神経を切除すると、再生芽が形成されなくなり、そのまま四肢再生が阻害される。また反対に、四肢の皮膚損傷部に神経切断面を配置させると、その場所に異所的な再生芽が作られる (Bodemer, 1958) (図 0-5A)。ちなみに、この皮膚損傷部に、異なる位置値を持つ皮膚を追加で移植すると、再生芽の伸長とパターン形成 (過剰肢形成) が誘導されることも分かっている (Endo et al., 2004) (図 0-5B)。このように、神経は「再生芽形成」という再生過程の初期において、重要な役割を果たす存在として注目されている (Satoh et al., 2018; Singer, 1952)。



図 0-4. メキシコサラマンダーの四肢再生過程

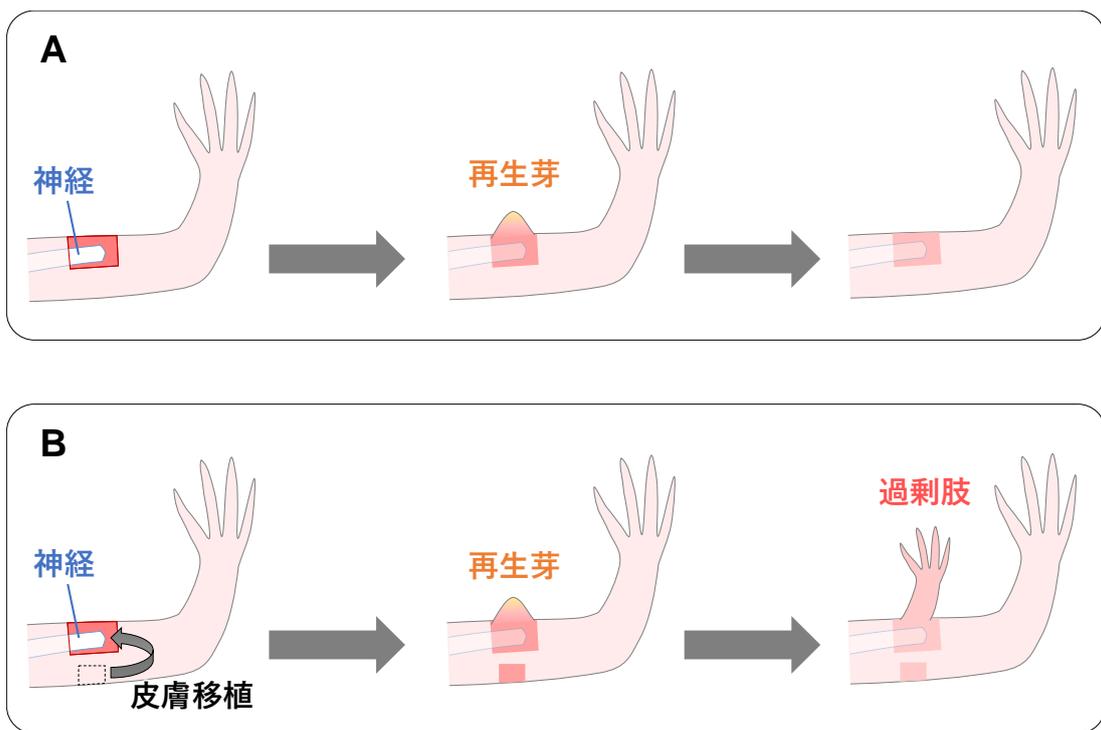


図 0-5. 神経による異所性再生芽形成

(A) 四肢の皮膚損傷部に、神経切断面を配置させた場合

(B) 四肢の皮膚損傷部に、神経切断面と、逆位置の皮膚を移植した場合

器官再生における神経の重要性をふまえて、再生を直接的に支配する神経因子を同定するための研究がこれまで盛んに行われてきた。先行研究で神経由来の候補因子として報告されたものには、nerve growth factor (NGF), glial growth factor (GGF), fibroblast growth factor (FGF), transferrin, neuregulin-1 (NRG1), bone morphogenic protein (BMP) などが挙げられる (Brockes and Kintner, 1986; Farkas et al., 2016; Makanae et al., 2013; Mullen et al., 1996; Munaim and Mescher, 1986; Weis and Weis, 1970)。特に、FGF と BMP に関しては、近年の所属研究室の研究から、神経の代わりに FGF2, FGF8, BMP2 (または BMP7) の 3 タンパク質を投与するだけで、過剰肢形成を誘導できることが明らかとなった (Makanae et al., 2014)。また、皮膚損傷部に FGF2 と FGF8 のみを投与した場合でも異所性再生芽形成が起こった (ただし、その後退縮した) ことから、特に FGF が再生初期の再生芽形成を支配していると考えられる。FGF と BMP による再生効果は、尾や歯、外鰓など四肢以外の器官でも確かめられており (Makanae et al., 2016a, 2020; Saito et al., 2019), 加えて最近の研究により、FGF と BMP の共投与が真皮線維芽細胞の脱分化を誘導することも明らかとなった (Sato et al., 2022)。このように、有尾両生類の器官再生に深く関わる神経由来の再生因子として、特に FGF や BMP の効果が近年盛んに調べられてきた。

本研究の第三章では、メキシコサラマンダーの皮膚再生における神経の作用を、再生芽形成を司る FGF シグナルに着目しながら深掘りした。

※本博士論文に掲載した研究結果の多くは、2022年に iScience 誌から出版した論文 “Lattice-patterned collagen fibers and their dynamics in axolotl skin regeneration” (Kashimoto et al., 2022) と、2023年に Developmental Biology 誌から出版した論文 “FGF signaling induces the regeneration of collagen fiber structure during skin wound healing in axolotls” から抜粋したものである (Kashimoto et al., 2022, 2023a)。

## 第一章

### 真皮におけるコラーゲン線維構築過程の解析

## 要旨

第一章において私は、真皮におけるコラーゲン線維の構築過程を詳しく調べた。皮膚のハリや強靭性は、真皮に豊富に存在する I 型コラーゲン線維によって支えられており、このことは哺乳類から両生類、魚類に至るまで脊椎動物全体で保存されている。また、ヒトやゼブラフィッシュの先行研究は、真皮のコラーゲン線維が格子状の構造をとっていることも明らかにしている。しかしながら、どのような細胞がどのようにしてこれらのコラーゲン線維を構築しているのか、詳しいことは分かっていなかった。コラーゲンなどの結合組織を産生する細胞は一般に「線維芽細胞」と呼ばれるが、その定義は曖昧である。真皮線維芽細胞の中には様々な亜集団が存在することが報告されているものの、コラーゲン構築の実働を担う細胞集団の同定には至っていない。本研究では、透明度の高い皮膚を持つメキシコサラマンダーにおいて I 型コラーゲンを蛍光標識することで、真皮のコラーゲン産生細胞の形態的特徴を明らかにした。その結果、コラーゲン産生細胞は自身の細胞仮足を格子状に発達させ、その仮足に沿って格子状のコラーゲン線維を編み上げていることが分かった。さらに、コラーゲン産生細胞には、格子と柱を作る細胞と、格子のみを作る細胞の二種類が存在することも明らかとなった。これらの細胞が協調的に働いて美しい格子構造を密に編み上げることで、皮膚の強度やしなやかさが保たれていると考えられる。本研究では、真皮のコラーゲン構築における細胞形態と線維構造の一致性を発見し、皮膚科学に新しい知見をもたらした。

## 序論

表皮と真皮からなる皮膚の基本構造は、脊椎動物全体で保存されている（図 0-1）。

真皮 ECM にコラーゲンが豊富に含まれる点も、同様に動物種間で共通している (Felseburgh et al., 2009; Kandyel et al., 2021; Lévesque et al., 2010; Morris et al., 2018; Ushiki, 2002)。先行研究から、ヒト、ブタ、ゼブラフィッシュにおいて、真皮下層部（網状層または緻密層）のコラーゲン線維が格子状の構造を取ることが示されていたが (Meyer et al., 1982; Morris et al., 2018; Ueda et al., 2019), 格子状のコラーゲン線維が生体内でどのようにして編まれているのかは、よく分かっていなかった。コラーゲンなどの結合組織を産生する細胞は一般に「線維芽細胞」と呼ばれるが、その定義は曖昧である (Driskell and Watt, 2015)。真皮線維芽細胞の中には様々な亜集団が存在することが報告されているものの、コラーゲン構築の実働を担う細胞集団の同定には至っていない (Driskell and Watt, 2015; Driskell et al., 2013; Fries et al., 1994; Philippeos et al., 2018; Rinkevich et al., 2015; Rognoni and Watt, 2018)。また、コラーゲン構築過程の観察を難しくする要因の一つに、皮膚組織の不透明性が挙げられる。毛や色素細胞の存在は、*in vivo* の顕微鏡観察において大きな障壁となる。そこで本研究では、透明度の高い皮膚を持つメキシコサラマンダーを観察対象とし、真皮の I 型コラーゲン線維が構築される過程を一細胞レベルで解析した。

I型コラーゲンは、2本の $\alpha 1$ 鎖 (COL1A1) と1本の $\alpha 2$ 鎖 (COL1A2) で三量体を形成する (図 0-2)。転写・翻訳された COL1A1 と COL1A2 は、小胞体内で三重らせんを含む構造 (プロコラーゲン) を形成してから、ゴルジ体を経由して細胞外に分泌される (Canty and Kadler, 2005)。その後、N末端とC末端に存在する非三重らせん領域が分離され、成熟したコラーゲンとなる。こうして作られたコラーゲン分子同士が重合することで、高い強度を持つコラーゲン線維となる (Sherman et al., 2015)。本研究では、I型コラーゲンを可視化するために、N末端側に緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) を融合させた I型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の発現ベクター (*GFP-Colla2*) を作製した (図 1-1)。コラーゲンの分泌過程では、上記の通りN末端とC末端で切断が生じるため、COL1A2 タンパク質を蛍光標識するにあたって、N末端の切断領域を除去した *Colla2* 遺伝子配列に GFP 配列を結合させるという工夫を施した。人工的に発現させた GFP-COL1A2 は、内在性の COL1A1 と三量体を形成することで、GFP 標識された I型コラーゲン分子として細胞外に分泌され、新しく作られた線維の中に組み込まれていく。

本研究で開発した上記のコラーゲン可視化手法は、一細胞レベルでの観察を可能にするものである。これまでコラーゲン線維構造解析に用いられてきた SEM, TEM, SHG などの技術は、コラーゲン線維全体を可視化するものであり、特定の細胞から分泌されたコラーゲンだけを特異的に可視化する技術ではない (Birk et al., 1991; Jiang et al., 2011; Tsuji et al., 1979; Williams et al., 2001)。そのため、微細な線維構造を捉えることはできて

も、どのようにして細胞がそれらの微細構造を編み上げているのかは分かっていなかった。今回私は、*GFP-Colla2* を細胞内で発現させることで、新生コラーゲンを蛍光標識し、一細胞レベルのコラーゲン線維構造を捉えた。

第一章では、メキシコサラマンダーの真皮コラーゲンについて、線維構造とその構築過程を詳細に解析した。緒言でも述べた通り、真皮に存在する線維芽細胞は非常に多様であり、どのような線維芽細胞が実際にコラーゲン線維の構築に携わっているのかは、よく分かっていなかった。そのため、今回の研究でコラーゲン産生細胞の姿を捉えられたことは、皮膚科学の発展にとって大きな一歩となるだろう。

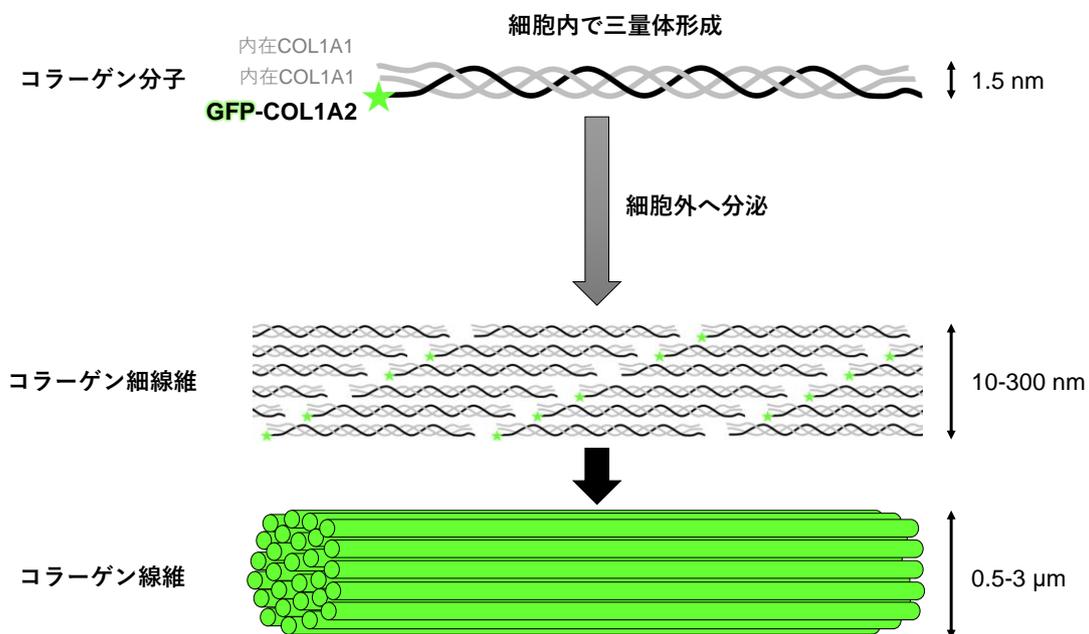


図 1-1. I 型コラーゲンの蛍光標識

コラーゲン分子は細胞内で三量体を形成してから、細胞外へ分泌され、細胞外で重合を繰り返し、太いコラーゲン線維を形成する。

## 結果

### メキシコサラマンダーの真皮 ECM の構造解析

メキシコサラマンダーの皮膚の全体的な ECM 構造を確かめるために、四肢背側の皮膚を対象に観察を行った (図 1-2)。

皮膚組織切片の Picrosirius red 染色では、真皮コラーゲン層を XZ 平面の画像で示した (図 1-2A, B)。Picrosirius red 染色を施した組織は、非偏光下ではコラーゲンが濃い赤色に (図 1-2A)、偏光下では I 型コラーゲンは赤色、III 型コラーゲンは緑色に発色する (図 1-2B)。先行研究でも報告されていた通り (Seifert et al., 2012)、メキシコサラマンダーの真皮は、コラーゲン密度の低い上層部の海綿層 (*stratum spongiosum*) と、コラーゲン密度の高い下層部の緻密層 (*stratum compactum*) で構成されていることが示された。どちらの層も主成分は I 型コラーゲンだが、海綿層では緻密層と比べて III 型コラーゲンの比率が高くなっていた。

次に、脱細胞化した真皮 ECM を対象に、XY 方向の線維配向を確認した (図 1-2C-E)。

図 1-2C に示しているのは、脱細胞化した真皮 ECM の明視野写真である。全体に縦方向と横方向の線が走っている様子が分かる。さらに微細な構造を観察するために行った SEM 撮影では、コラーゲン線維の一本一本が整列している様子を捉えた (Fig. 1-2D, E)。

その結果、コラーゲン線維が縦方向に整列する層と横方向に整列する層が重なって存在することで、格子パターンに見えていることが分かった。このような二方向性線維の積

層構造は、先行研究で報告されていた TEM 画像とも合致する (Seifert et al., 2019)。

つづいて、二光子顕微鏡を用いた SHG イメージングで、コラーゲン特異的なシグナルを検出した (図 1-2F,G)。二光子顕微鏡撮影は、基礎生物学研究所バイオイメージング解析室の亀井保博 RMC 教授と野中茂紀准教授のご指導の下で行った。撮影に用いたサンプルは、固定処理のみを施した皮膚で、脱細胞化処理は行っていない。SHG イメージングは、コラーゲン特異的な三重らせん状の非中心対称性構造を可視化する技術である (Yasui et al., 2004)。二光子レーザーを受けたコラーゲン線維からは、レーザー光の半波長の光が SHG 光として発生する。非侵襲的に組織内部のコラーゲン線維を可視化できるため、生体コラーゲンを観察するための有効な手段として注目されている。ただし、SHG イメージングの弱点として、照射レーザーに対して垂直方向に配向するコラーゲン線維は検出することができないため、注意が必要である。今回の SHG イメージングの結果、真皮の緻密層ではコラーゲン線維が水平方向に美しい格子パターンをとっていることが確認できた (図 1-2F)。一方で、海綿層のコラーゲン線維は特定の配向性を持たず、波状にうねった構造をとることが分かった (図 1-2G)。

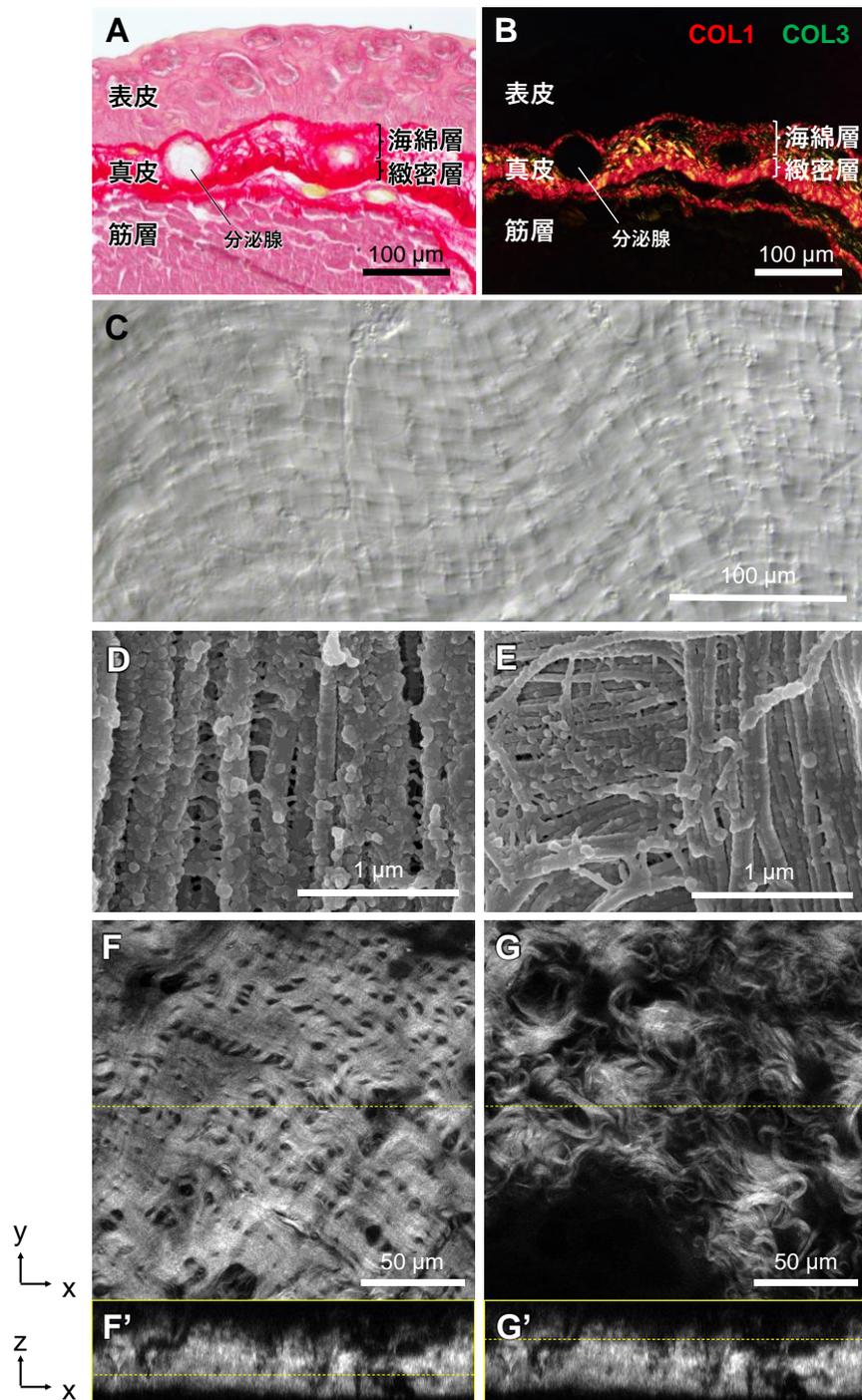


図 1-2. メキシコサラマンダーの真皮 ECM の構造

(A, B) 皮膚切片の Picrosirius red 染色を行い、非偏光下(A)と偏光下(B)で撮影した。

(C) 脱細胞化した真皮 ECM を明視野で撮影した。

(D, E) 脱細胞化した真皮 ECM の SEM 画像。

(F, G) 真皮の緻密層(F)と海綿層(G)の SHG 画像。F', G'は F, G の XZ 画像。F, G と F', G' 中の黄色の点線は、それぞれ XZ 画像と XY 画像の位置を示す。

図 1-2 では四肢の皮膚のコラーゲン線維構造を示した。身体他の部位の皮膚も同様の格子構造をとっているか確かめるために、メキシコサラマンダーの背中、腹、頭の皮膚についても同様に、SHG イメージングによる観察を行った (図 1-3)。その結果、どの部位の皮膚でも共通して、緻密層のコラーゲン線維は格子構造をとることが確認できた。

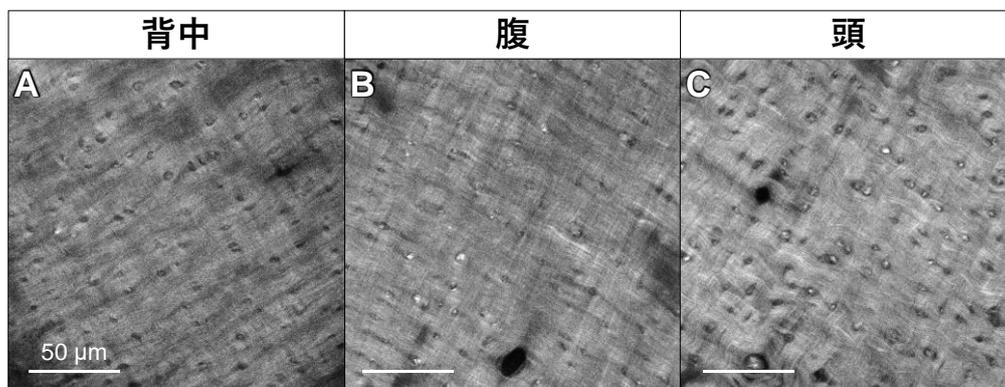


図 1-3. 様々な身体部位における真皮コラーゲン線維の構造

- (A) 背中 of 皮膚の SHG 画像
- (B) 腹 of 皮膚の SHG 画像
- (C) 頭 of 皮膚の SHG 画像

## I型コラーゲン線維構造の一細胞解析

真皮におけるコラーゲン産生過程を一細胞レベルで観察するために、新生I型コラーゲンを蛍光標識するシステムを構築した(図1-1)。具体的には、メキシコサラマンダーのI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子にGFP配列をつないだプラスミドベクター*GFP-Coll1a2*を作製し、エレクトロポレーション法を用いて真皮の細胞に導入した(図1-4)。過去には、ゼブラフィッシュの皮膚やマウスの骨のコラーゲンを対象に、蛍光分子融合コラーゲンを発現するトランスジェニック動物を用いて、コラーゲン線維構造の観察が行われている(Kamel-ElSayed et al., 2015; Morris et al., 2018)。本研究では、先行研究を参考にしつつ、メキシコサラマンダーの真皮の一部の細胞で一過的に蛍光分子融合コラーゲンを発現させることで、一細胞レベルでコラーゲン線維構造を解析することに成功した。

序論で述べた通り、コラーゲン前駆体(プロコラーゲン)のN末端およびC末端に存在する非三重らせん領域(プロペプチド、テロペプチド)は、分泌過程において切断・除去されて、成熟したコラーゲン分子となる。プロコラーゲンの切断位置は、哺乳類などの先行研究によって同定されている(Fessler and Fessler, 1978)。メキシコサラマンダーの*Coll1a2*遺伝子配列をヒトやマウスの配列と並べてみると、これらは高い相同性を持つことが分かる(図1-4A)。したがって、メキシコサラマンダーのプロコラーゲンにおいても、ヒトやマウスと同じ位置(図1-4A中の赤い点線)で切断が生じると予想される。そこで、図1-4Bに示すように、*GFP-Coll1a2*を設計した。メキシコサラマンダー

*Colla2* のコーディング領域から、予想N末端プロペプチド・テロペプチド領域を除去し、GS リンカーを用いてN末端側に GFP をつないでいる。この *GFP-Colla2* を恒常発現性の CMV プロモーターの下流に配置したプラスミドベクターを、エレクトロポレーション法を用いて四肢の真皮細胞に局所的に導入した (図 1-4C)。プラスミドベクターは真皮中の全細胞に導入されるのではなく、細胞種に関わらずランダムにいくつかの細胞に導入される。しかし、コラーゲンの三量体を形成するためには、細胞内で内在的に COL1A1 タンパク質が産生されている必要がある。人為的に過剰発現させた *GFP-COL1A2* と内在性の COL1A1 が組み合わさることで、初めて三量体が形成され、細胞外に分泌されるのである。すなわち、プラスミドベクターの導入は細胞種に関係なく起こるが、I 型コラーゲン産生能を内在的に持つ線維芽細胞に *GFP-Colla2* 発現ベクターが導入された場合にのみ、その細胞が産生する I 型コラーゲン線維が蛍光標識されるということである。このシステムを用いて、線維芽細胞が産生するコラーゲン線維の構造を、一細胞レベルで観察した。

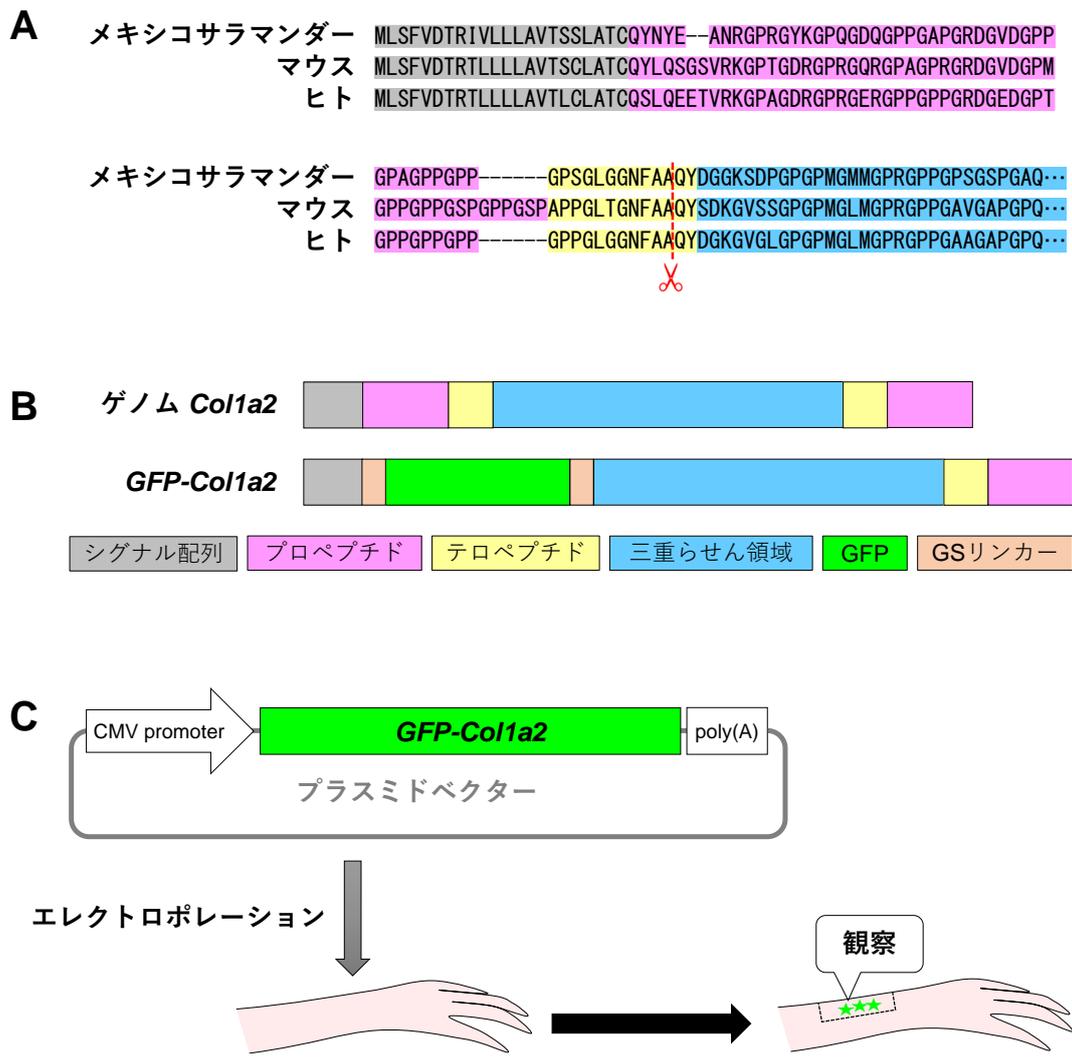


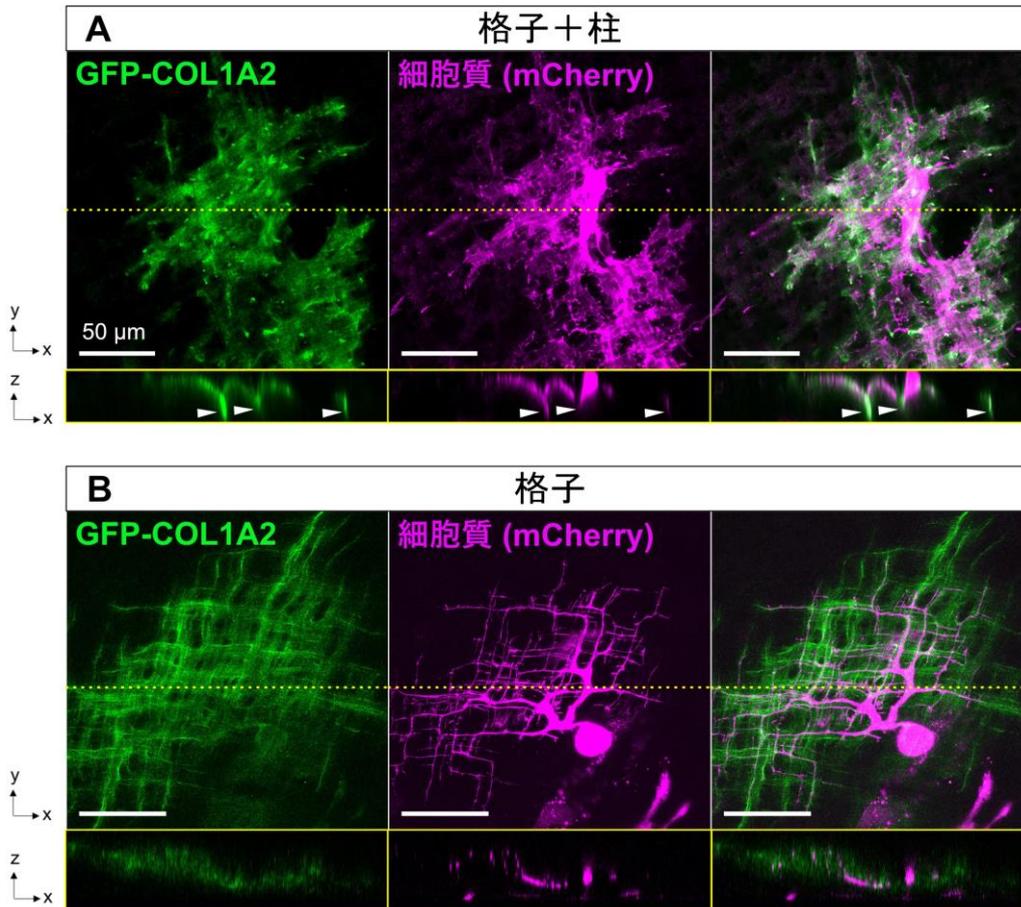
図 1-4. *GFP-Col1a2* プラスミドベクターの設計

(A) メキシコサラマンダー，マウス，ヒトの *Col1a2* 遺伝子における，コーディング領域の N 末端配列の比較。赤い点線はプロコラーゲンの切断位置を示す。

(B) メキシコサラマンダーのゲノム *Col1a2* と，人工的に作製した *GFP-Col1a2*。

(C) *GFP-Col1a2* プラスミドベクターの概略図と，観察までの流れ。

はじめに、新生 I 型コラーゲン線維構造と細胞形態を詳細に観察するために、*GFP-Coll1a2* 発現ベクターと共に、細胞質内で赤色蛍光タンパク質 mCherry を発現させるプラスミドベクターを真皮細胞に導入した。そして 5 日後に、皮膚を回収・固定し、真皮側から共焦点顕微鏡で観察した (図 1-5A, B)。すると、格子状の細胞仮足に沿って、格子状のコラーゲン線維が構築されていることが分かった。さらに、コラーゲン産生細胞には、①格子構造と柱構造をあわせ持つ細胞 (図 1-5A) と、②格子構造のみからなり柱構造を持たない細胞 (図 1-5B) の二種類が存在することも明らかとなった。いずれについても、直径数百 nm の細線維レベルで構造を捉えることができた。



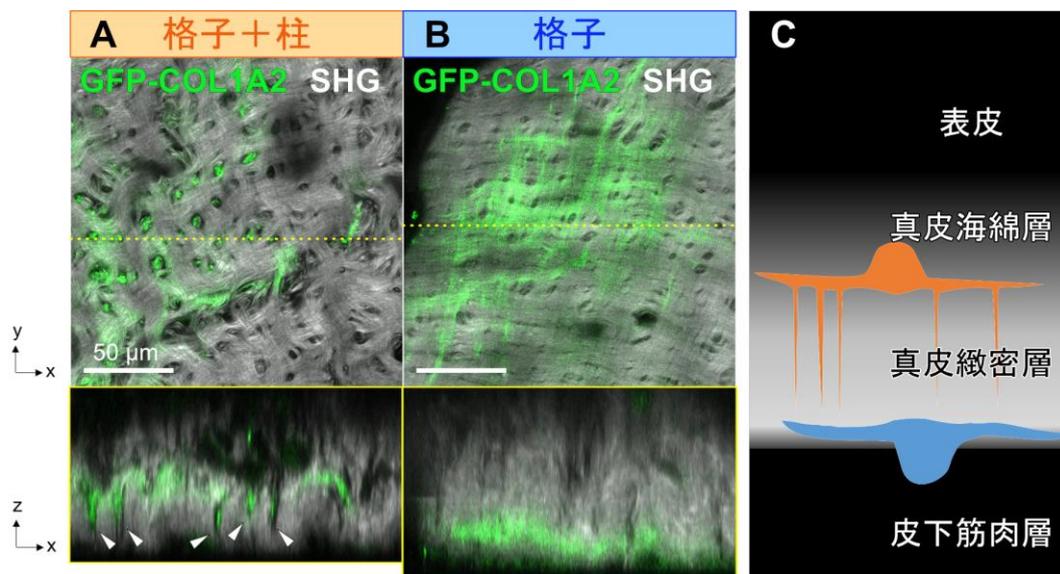
**図 1-5. I 型コラーゲンの線維構造と産生細胞の形態の観察**

GFP-COL1A2 (緑) によって新生 I 型コラーゲンを, mCherry (マゼンタ) によって細胞質を蛍光標識した。それを, 共焦点顕微鏡で Z-stack 撮影し, 最大輝度合成で重ね合わせた。黄色点線は XZ 画像の位置を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

**(A)** 格子構造と柱構造をあわせ持つコラーゲン産生細胞。XZ 画像中の白い矢頭は, 柱構造を示す。

**(B)** 格子構造のみ持つコラーゲン産生細胞。

さらに、真皮コラーゲン層中の細胞の位置関係を調べるために、二光子顕微鏡を用いて GFP-COL1A2 シグナルと SHG シグナル（全コラーゲン）を同時に撮影した（図 1-6）。その結果、格子構造と柱構造を持つコラーゲン産生細胞①は、真皮緻密層の上層部に存在し、深部に向かって柱を伸ばしていることが明らかとなった（図 1-6A）。一方、格子構造のみを持つコラーゲン産生細胞②は、真皮緻密層の最下層部に存在していることが分かった（図 1-6B）。また、本システムでは *GFP-Coll1a2* の過剰発現系を使っているが、GFP で標識されたコラーゲン線維は周囲のコラーゲン線維と配向性が一致していることから、正しくコラーゲン線維を可視化できていると考えられる。

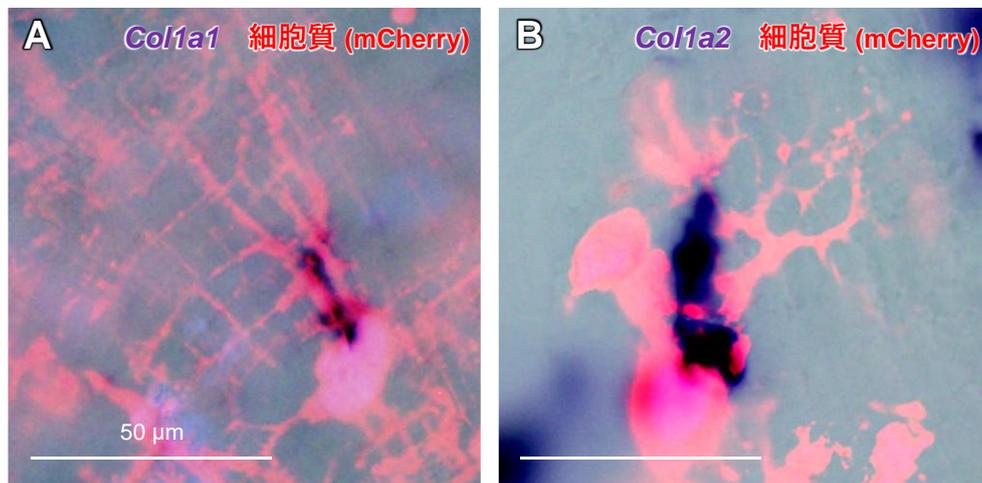


**図 1-6. 二種類のコラーゲン産生細胞の位置関係**

二光子顕微鏡で GFP-COL1A2（緑）と SHG シグナル（白）を同時に検出した。黄色点線は XZ 画像の位置を示す。

- (A) 格子構造と柱構造をあわせ持つ細胞。XZ 画像中の白い矢頭は、柱構造を示す。
- (B) 格子構造のみを持つ細胞。
- (C) 柱構造を持つ細胞（オレンジ）と持たない細胞（青）の位置関係の模式図。

加えて、格子形態を持つ細胞が確かに I 型コラーゲン産生細胞であることを検証するために、*in situ hybridization* で *Colla1* と *Colla2* の mRNA 発現を確認した (図 1-7)。細胞形態を可視化するために mCherry 発現ベクターを導入し、その 5 日後に皮膚を回収・固定し凍結包埋した。凍結ブロックを水平方向 (XY 方向) に切り出した切片に対して、*Colla1* プローブまたは *Colla2* プローブを用いた *in situ hybridization* と、mCherry の免疫蛍光染色を施し、光学顕微鏡で観察した (各遺伝子あたり n=4)。その結果、真皮組織中の格子状細胞が確かに I 型コラーゲンを発現していることが示された。



**図 1-7. 格子状細胞における I 型コラーゲン発現**

細胞質を mCherry (赤) で標識し、*in situ hybridization* で I 型コラーゲンの mRNA 発現 (紫) を確かめた。スケールバーは 50 μm。

**(A)** 格子状細胞は *Col1a1* を発現する。

**(B)** 格子状細胞は *Col1a2* を発現する。

次に、メキシコサラマンダーの皮膚の透明性を活かし、*in vivo* ライブイメージングでコラーゲン線維の構築過程を観察した（図 1-8）。*GFP-Coll1a2* 発現ベクターと *mCherry* 発現ベクターをエレクトロポレーション法で共導入し、翌日にライブイメージングを行った。生体内の深部の構造を捉えるために、撮影には二光子顕微鏡を用いた。観察の結果、細胞が格子状の仮足を伸ばした先でコラーゲンが分泌され（図 1-8A）、新たに構築されたコラーゲン線維は仮足の退縮後もその場に残る様子が捉えられた（図 1-8B）。このことから、コラーゲン産生細胞は格子状の仮足を伸び縮みさせながらコラーゲン線維を構築していることが明らかとなった。

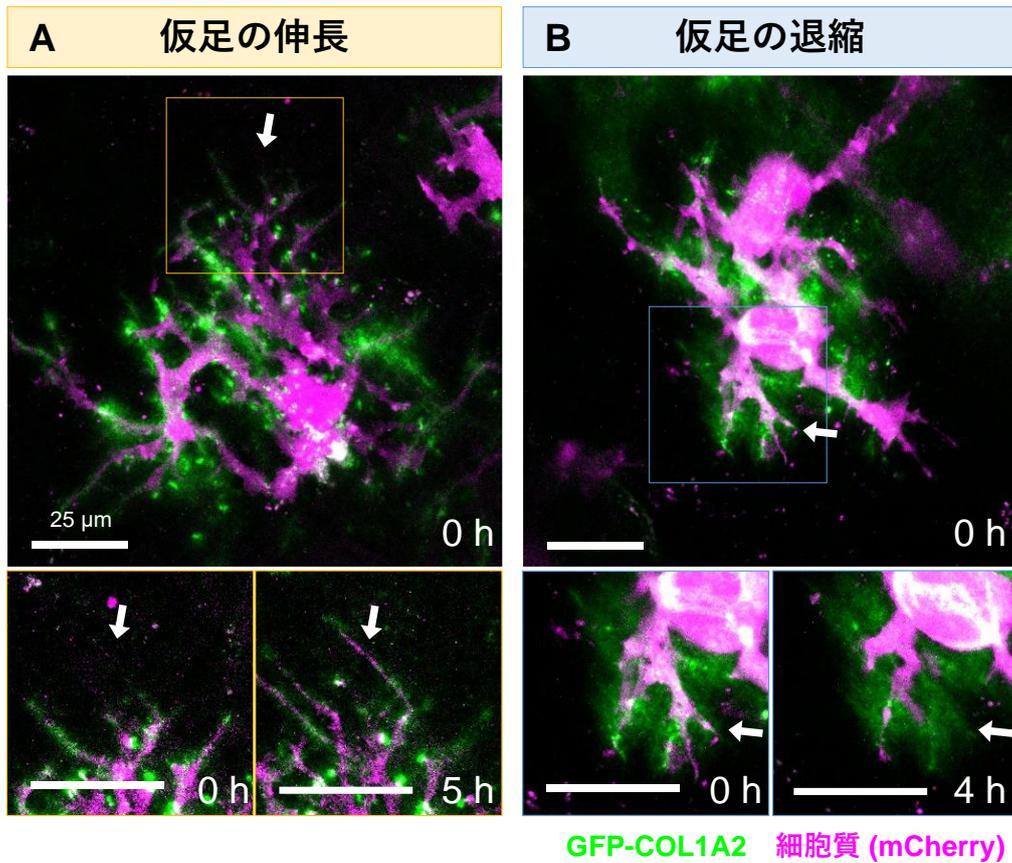


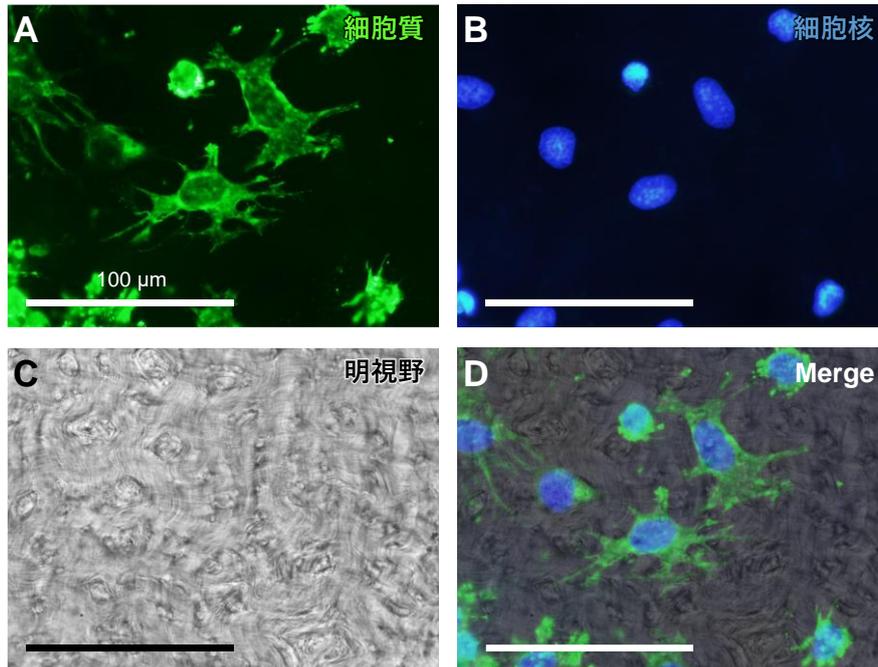
図 1-8. 真皮コラーゲン線維の構築過程の *in vivo* ライブイメージング

新生コラーゲンを GFP-COL1A2 (緑) で、細胞質を mCherry (マゼンタ) で蛍光標識し、二光子顕微鏡で経時的に観察した。上図は、Z-stack 画像を最大輝度合成したものの。スケールバーは 25  $\mu\text{m}$ 。

**(A)** コラーゲン産生細胞は格子状の仮足を伸長させながらコラーゲンを分泌していた。矢印の先で仮足の伸長とコラーゲン分泌が見られる。

**(B)** コラーゲン産生細胞の仮足が存在していた場所 (矢印) にコラーゲン線維の蓄積が見られた。

最後に、細胞が自律的に格子形態をとっているのか、あるいは周囲のコラーゲン線維の格子構造に合わせて細胞が格子形態をとるのか、原因と結果の関係を明らかにするために、*in vitro* において真皮 ECM 上に真皮線維芽細胞を播種し、細胞形態を観察した (図 1-9)。足場となる真皮 ECM には脱細胞化処理を施し、その上に播種する線維芽細胞は GFP トランスジェニック動物から採取した。そして、ECM 上に細胞を播種してから 5 日後に固定と GFP の免疫染色および核染色を行い、光学顕微鏡で撮影した。真皮組織由来の線維芽細胞は *in vitro* においても仮足を細かく伸ばしたものの、真皮コラーゲン層中で見られるような格子形態はとらなかった。仮足の配向は ECM の配向と一致していないことから、足場構造に対して非依存的に、細胞仮足の形態が決まることが示唆された。すなわち、真皮組織において、コラーゲン産生細胞は自律的に格子形態を作っていると考えられる。



**図 1-9. *In vitro* における足場構造と細胞形態の関連性の検証**

GFP トランスジェニック動物由来の真皮線維芽細胞（緑）を，脱細胞化した真皮 ECM 上に播種し，5 日後に光学顕微鏡で細胞形態を観察した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

**(A)** 細胞質全体で発現する GFP を指標に，細胞形態を捉えた。細胞は仮足を伸ばすが，格子形態はとらない。

**(B)** Hoechst33342 で染色した細胞核。

**(C)** 明視野下で撮影した足場 ECM。

**(D)** A-C の重ね合わせ画像。仮足の配向は ECM の配向と一致しない。

## 考察

第一章では、メキシコサラマンダーの真皮におけるコラーゲン線維の構造と、その構築過程を詳細に調べた。

皮膚のコラーゲン線維の構造自体は、これまでも多くの研究者によって調べられており、ヒト、ブタ、ゼブラフィッシュなど様々な脊椎動物において、真皮下層部（網状層または緻密層）のコラーゲン線維が格子状の構造を取ることが示されていた (Meyer et al., 1982; Morris et al., 2018; Ueda et al., 2019)。本研究の観察対象であるメキシコサラマンダーも同様に、真皮緻密層においてコラーゲン線維が格子構造をとることから、真皮コラーゲン線維の格子構造は種普遍的なものだと考えられる (図 1-2, 図 1-3)。

ところが、これまでの研究では、格子状のコラーゲン線維が構築される仕組みについては解き明かされていなかった。今回、新生 I 型コラーゲンを一細胞レベルで蛍光標識することで、はじめて真皮コラーゲン線維の構築過程を可視化することに成功した (図 1-4, 図 1-5, 図 1-6, 図 1-8)。過去にも、蛍光分子融合コラーゲンをを用いたコラーゲンの可視化は、ゼブラフィッシュの皮膚組織やマウスの骨組織、ヒトの骨芽細胞などを対象に行われていた (Kamel-ElSayed et al., 2015; Lu et al., 2018; Morris et al., 2018)。しかし、前者二研究については、蛍光分子融合コラーゲンをゲノムに組み込んだトランスジェニック動物を用いているため、一細胞レベルでコラーゲン産生の様子を捉えることはできていなかった (Kamel-ElSayed et al., 2015; Morris et al., 2018)。また、後者の *in vitro* 研究

では、生体内ならではの組織立った構造は捉えていない (Lu et al., 2018)。本研究では、真皮において局所的かつ一過的に蛍光分子融合コラーゲンを発現させることで、皮膚組織のコラーゲン線維構造を一細胞レベルで観察することを可能にした。そして観察の結果、コラーゲン産生細胞自体が格子状の仮足を発達させることで、真皮緻密層に特徴的な格子状の線維構造を編み上げていることを明らかにした。また、一度単離した真皮線維芽細胞を格子状の脱細胞化 ECM 上に播種し直した場合には、格子形態を持つ細胞が現れなかったことから、細胞形態は足場構造非依存的に決まっていることが示唆された (図 1-9)。これらの観察結果から、コラーゲン産生細胞は自律的に格子形態を生み出し、それによりコラーゲン線維を格子状に構築していることが明らかとなった。

詳しく観察を進める中で、コラーゲン産生細胞には、①格子構造と柱構造をあわせ持つ細胞と、②格子構造のみからなり柱構造を持たない細胞の、二種類が存在することも判明した (図 1-5)。生体内のコラーゲンを非侵襲的に観察する手法として注目される SHG イメージングは、垂直方向の線維構造を検出することができないという弱点を持つため、本研究で柱構造の存在を発見できたことは、蛍光標識技術を用いた観察の賜物だと言える。上記の二種類のコラーゲン産生細胞について、さらに位置関係を調べたところ、②の格子のみの細胞は真皮緻密層の最下層領域に存在している一方で、①の柱を持つ細胞は真皮緻密層と海綿層の境界付近に存在し、緻密層を貫くように柱を立てていることが分かった (図 1-6)。このことから、①の細胞が立てたコラーゲンの柱を中心に、

②の細胞が格子状のコラーゲン線維を積層させることで、美しい格子構造を密に編み上げているのではないかと想像できる。このような二種類のコラーゲン産生細胞の協調的な働きによって、皮膚の強度やしなやかさを支える構造が作られているのだと考えられる。これまで、真皮線維芽細胞の多様性が示される一方で (Driskell and Watt, 2015; Driskell et al., 2013; Fries et al., 1994; Philippeos et al., 2018; Rinkevich et al., 2015; Rognoni and Watt, 2018), コラーゲン構築の実働を担う細胞集団の同定には至っていなかったことをふまえると、本研究で真皮コラーゲン産生細胞の形態的特徴と位置関係を明らかにできたことは、皮膚科学の理解を深める重要な一歩だといえる。

本研究では、二種類の異なる形態を持つコラーゲン産生細胞が、真皮コラーゲン層の構築に寄与していることを明らかにしたが、これらの細胞が格子や柱の形態をとる仕組みについては未だ不明なままである。今後の研究では、二種類のコラーゲン産生細胞のそれぞれについて、細胞形態を決定付ける機構や、細胞の発生過程を明らかにしていく必要があるだろう。

## 材料と実験方法

### 実験動物

本研究では、メキシコサラマンダー (*Ambystoma mexicanum*) を用いて実験を行った。野生型個体は広島大学両生類研究センターまたは浜松生物教材から、GFP トランスジェニック個体 (*CAG::GFP*) は *Ambystoma Genetic Stock Center* から入手した。飼育水温は 22°C 前後に保った。実験には、鼻から尾までの長さが 10-16 cm の個体を使用した。動物の飼育管理および実験は、岡山大学動物実験委員会のガイドラインおよび動物飼育マニュアルに従って実施した。基礎生物学研究所にて実施した実験については、基礎生物学研究所のガイドラインに従った。また、メキシコサラマンダーは外来生物に該当するため、ワシントン条約および名古屋議定書に従って管理した。全ての動物実験は、事前に MS222 (Sigma) の 5% 溶液を用いて動物に麻酔をかけてから実施した。

### Picrosirius red 染色による組織学的解析

はじめに、回収した四肢サンプルを固定するために、室温の 4% PFA/PBS 溶液中で一晩振とうした。その後、4°C の G-Chelate Quick (Geno Staff) で 3 日間脱灰処理を行い、サンプルを純水 (MilliQ 水) で洗ってから、G-Chelate-NT (Geno Staff) に移し、4°C で一晩置いて脱灰反応を停止させた。次に、パラフィン包埋装置 CT-Pro20 (Geno Staff) を用いて、サンプルの脱水とパラフィン包埋を行った。室温で 70% エタノールに一晩、100%

エタノールに一晩、50%エタノール/G-NOX (Geno Staff) に3時間、100% G-NOX に9時間浸して、サンプルを脱水した。それを、9時間かけてパラフィン置換し、包埋した。包埋したブロックから、RX-860 (Yamato) を用いて厚さ 10  $\mu\text{m}$  の切片を切り出し、スライドガラスに貼り付けた。切片は、G-NOX で10分間 $\times$ 2回、100%エタノールで15分間、70%エタノールで15分間、水で10分間処理することで脱パラフィン化した後、Picrosirius Red Stain Kit (Polysciences) を用いて、マニュアル通りに染色した。具体的には、溶液 A (リンモリブデン酸溶液) に2分間浸し、水洗し、溶液 B (Picrosirius red 染色液) に60分間浸し、溶液 C (0.1 N 塩酸) に2分間浸し、70%エタノールに45秒間浸した。染色した切片は、100%エタノールに5分間 $\times$ 2回、G-NOX に10分間 $\times$ 2回浸すことで脱水し、ソフトマウント (富士フイルム和光純薬) で封入した。そして、四肢組織切片の背側皮膚領域を、光学顕微鏡 BX61 (Olympus) とカラーカメラ DP72 (Olympus) を用いて撮影した (図 1-2A, B)。Picrosirius red 染色を施した組織は、非偏光下においてコラーゲンが明るい赤色を発する。さらに、偏光下では、I型コラーゲン (赤色) とIII型コラーゲン (緑色) を識別することができる。

### 脱細胞化皮膚組織を用いた真皮 ECM の構造解析

皮膚の脱細胞化手順は以下の通りである。はじめに、メキシコサラマンダーの四肢から、手術用のハサミとピンセットを用いて皮膚を剥離し、ピンセットで表皮を除去した。

その後、純水で洗浄し、4°Cの2 M 尿素液中に1週間置くことで脱細胞化し、純水で洗浄した。尿素液は、脱細胞化処理を開始した翌日と3日後に新しい液に交換した。

光学顕微鏡観察用のサンプルは、ソフトマウントで封入し、光学顕微鏡 BX61 とカラーカメラ DP72 を用いて撮影した (図 1-2C)。SEM 解析用のサンプルは、30% スクロース/PBS で置換してから、O.C.T. compound (サクラファインテック) で凍結包埋し、CM1850 cryostat (Leica) を用いて厚さ 16  $\mu\text{m}$  で切り出した。それを、花市電子顕微鏡技術研究所に送付し、SEM 解析してもらった (図 1-2D, E)。

### SHG イメージングによるコラーゲン線維構造解析

メキシコサラマンダーの四肢背側 (図 1-2F, G, 図 1-6) または、背中 (図 1-3A), 腹 (図 1-3B), 頭 (図 1-3C) から、手術用のハサミとピンセットを用いて皮膚を剥離した。回収した皮膚サンプルを真っ直ぐに固定するために、重石を乗せた状態で4% PFA 液中で5分間静置し、さらに1時間4% PFA 液中で振とう固定した。その後、TBSTで10分間 $\times$ 3回洗浄した皮膚サンプルを、スライドガラス上に真皮深層側を観察面に向けた状態で置き、Fluoromount (DBS) を用いて封入した。撮影には、基礎生物学研究所の倒立型二光子顕微鏡 TCS SP8 MP (Leica) を用いた。InSight DeepSee femtosecond infra-red laser (Spectra-Physics) を用いて波長 900 nm のレーザー光を照射し、435-485 nm のバンドパスフィルタを介して波長 450 nm の SHG シグナルを検出した。同時に GFP シグナルを

検出する際には、500-550 nm のバンドパスフィルタを併用した (図 1-6)。XZ 画像の構築などの画像処理は、画像解析ソフト Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いて行った。

### **GFP-Coll1a2 プラスミドベクターの設計, 導入, 観察**

真皮の新生 I 型コラーゲンを一細胞レベルで可視化するために、GFP-Coll1a2 を発現するプラスミドベクターを作製した (図 1-4)。pCS2 プラスミドをベースに、恒常発現性の CMV プロモーター下流にシグナル配列, GS リンカー (アミノ酸配列は (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>), AcGFP, GS リンカー, メキシコサラマンダー *Coll1a2* から N 末端のプロペプチドとテロペプチドを除去した配列, SV40 poly A をつなげた。また、同時に細胞形態を可視化するために、pCS2 プラスミドをベースとし、CMV プロモーター下流に mCherry, SV40 poly A をつなげたプラスミドベクターを利用した。

真皮の細胞に上記のプラスミドベクターを導入するために、ファストグリーンで染色したプラスミド溶液 (0.4-2 µg/µl) を、ガラス針で真皮に注入し、NEPA21 (NEPA GENE) を用いてエレクトロポレーションを行った。その際、電圧 20 V, パルス長 50 ms, インターバル 950 ms で 10 回電気を流した。

固定サンプルの観察にあたっては、遺伝子導入の 5 日後に皮膚を回収し、4% PFA で固定した (図 1-5, 図 1-6)。このとき、重石を乗せて平らにした状態で 5 分間静置してから、1 時間振とう固定することで、皮膚サンプルの歪みを最小限にとどめた。その後、

TBST で 10 分間×3 回洗浄し，GFP 抗体を用いた免疫染色により，GFP シグナルを増強させてから，顕微鏡観察を行った。また，mCherry については，免疫染色によるシグナル増強を行わなかった。GFP の免疫染色は以下の手順で行った。固定した皮膚サンプルをブロッキングバッファー（TBST に 0.5% blocking reagent (Roche) を溶かした溶液）に室温で 1 時間浸し，その後，ブロッキングバッファーで 500 倍希釈した 1 次抗体の抗 GFP 抗体（ウサギ由来，MBL, Cat# 598）を用いて 4°Cで一晩処理した。その後，サンプルを TBST で 20 分×8 回洗浄し，ブロッキングバッファーに 1 時間浸してから，ブロッキングバッファーで 500 倍希釈した 2 次抗体の Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ抗体（Thermo Fisher, Cat# A32731）を用いて室温で 2 時間処理した。TBST で 20 分×8 回洗浄した後，皮膚サンプルをスライドガラス上に真皮深層側を観察面に向けた状態で置き，Fluoromount を用いて封入した。撮影には，岡山大学の倒立型共焦点顕微鏡 FV1200 (Olympus) または基礎生物学研究所の倒立型共焦点顕微鏡 TCS SP8 MP を用いた。Z-stack 画像の重ね合わせや XZ 画像の構築などの画像処理は，Fiji を用いて行った。

コラーゲン線維の構築過程を捉えるための *in vivo* ライブイメージングでは，遺伝子導入の翌日に観察を行った（図 1-8）。顕微鏡は，共焦点顕微鏡に比べて生体組織深部の撮影を得意とする二光子顕微鏡 TCS SP8 MP を用いた。900 nm の二光子レーザーで励起し，GFP シグナルの検出には 500-550 nm のバンドパスフィルタを，mCherry シグナルの検出には 580.5-653.5 nm のバンドパスフィルタを用いた。

### ***In situ* hybridization** による I 型コラーゲンの発現解析

格子状の仮足を持つ細胞が I 型コラーゲンを産生する細胞であることを確認するために、mCherry で細胞質を標識した皮膚サンプルを対象に、メキシコサラマンダーの *Colla1* (AXOLOTL-OMICS, Am\_2.2, AC\_02200027944.1) と *Colla2* (AXOLOTL-OMICS, Am\_2.2, AC\_02200044881.1) に対する DIG 標識アンチセンス RNA プローブを用いた *in situ* hybridization を実施した (図 1-7)。はじめに、SP6 または T7 RNA polymerase (TaKaRa) と DIG NTPs (Roche) を用いて cDNA の逆転写を行い、次に加水分解によりフラグメント化することで、RNA プローブを作製した。サンプル作製から観察までの流れは、以下の通りである。まず、エレクトロポレーション法により mCherry 発現ベクターを四肢の真皮細胞に導入し、その 5 日後に皮膚サンプルを回収し、4°C の 4% PFA/PBS で一晩固定した。その後、30%スクロース/PBS で置換し、O.C.T. compound で包埋し-80°C で凍結した。CM1850 cryostat を用いて、凍結ブロックから厚さ 20 µm の水平切片を切り出し、スライドガラスに貼り付けた。凍結切片は、PBST で 5 分間×2 回洗浄した後、5 µg/ml の proteinase K (Thermo Fisher) で室温で 20 分間処理し、PBST で 5 分間×2 回洗浄してから、4% PFA/PBS で室温で 30 分間後固定した。再度 PBST で 5 分間×2 回洗浄し、*Colla1* または *Colla2* の DIG 標識 RNA プローブを含むハイブリダイゼーション液 (50%ホルムアミド/5×SSC (pH 5.0)/50 µg/ml tRNA/0.1% CHAPS/100 µg/ml Heparin/1×Denhardt's solution/10 mM EDTA (pH 8.0)/0.1% Tween 20) で 62.5°C で一晩処理した。つづ

いて、洗浄液 1 (50%ホルムアミド/5×SSC (pH 5.0)) で 62.5°Cで 15 分間×2 回、洗浄液 2 (50%ホルムアミド/2×SSC (pH 5.0)) で 62.5°Cで 15 分間×3 回、TBST で室温で 10 分間洗浄し、ブロッキングバッファーに室温で 30 分間浸してから、ブロッキングバッファーで 1000 倍希釈した AP 標識抗 DIG 抗体 (Roche, Cat# 11093274910) を用いて 4°Cで一晩処理した。その後、TBST で室温で 10 分間×4 回洗浄し、NTMT (100 mM NaCl/100 mM Tris-HCl (pH 9.5)/0.1% Tween 20) に 37.5 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (ナカライテスク) と 37.5 µg/ml nitro blue tetrazolium chloride (富士フイルム和光純薬) を加えた発色液中で遮光状態で室温で 2 時間発色させ、TE 液で発色を停止させた。次に、mCherry の免疫染色を行った。*In situ* hybridization を行ったサンプルを、TBST で室温で 10 分間×3 回洗浄し、ブロッキングバッファーに室温で 30 分間浸してから、ブロッキングバッファーで 500 倍希釈した 1 次抗体の抗 mCherry 抗体 (ウサギ由来, CST, Cat# 43590) で 4°Cで一晩処理した。その後、TBST で室温で 5 分間×3 回洗浄し、ブロッキングバッファーに室温で 15 分間浸してから、ブロッキングバッファーで 500 倍希釈した 2 次抗体の Alexa Fluor 594 標識抗ウサギ抗体 (Thermo Fisher, Cat# A-21207) で室温で 2 時間処理した。さらに、125 ng/ml Hoechst 33342 Solution (ナカライテスク)/TBST に室温で 5 分間浸すことで核を染色し、TBST で室温で 5 分間×4 回洗浄してから Fluoromount で封入した。封入したサンプルは、光学顕微鏡 BX61 とカラーカメラ DP72 を用いて撮影した。

## 真皮 ECM 上での細胞培養

真皮コラーゲン産生細胞に特徴的な格子形態の自律性を調べるために、真皮 ECM 上に真皮線維芽細胞を播種して細胞形態を観察した (図 1-9)。細胞培養の足場となる ECM は、皮膚組織を脱細胞化することで用意した (前述)。尿素液で脱細胞化した皮膚組織は、RQ1 DNase (Promega) で 37°C で 30 分間処理することで残存 DNA を分解した後、純水で洗浄し、培養皿上に防水性接着剤バスコーク N (セメダイン) で貼り付けた。培養用の線維芽細胞は、GFP トランスジェニック個体の四肢の皮膚から採取した。はじめに、回収した皮膚をハサミで細かく刻み、次に 0.5% collagenase (富士フイルム和光純薬)/70%PBS で室温で 4 時間処理し、同量の 0.5% Trypsin/0.05%EDTA/PBS を加えて室温で 30 分間処理した。そして、細胞懸濁液を 40  $\mu$ m cell strainer (Falcon) に通すことで、細胞を単離回収した。細胞懸濁液と同量の培養液 (50%Glutamax DMEM/10% FBS/ 40% DDW/ 0.01M HEPES (pH. 7.5)/0.3 mg/ml Gentamycin) を加えることで Trypsin の酵素反応を停止させ、培養液で 2 回洗浄してから、プラスチック製の培養皿 (Falcon, #3001) 上に播種し、0.5  $\mu$ g/ml のマイコプラズマ除去剤 MC210 (ワケンビーテック) を添加した培地を用いて 27°C, 5% CO<sub>2</sub> で 1 日間培養した。表皮の角化細胞はプラスチック製の培養皿に接着しない性質を持つため、この工程で除去することができる。浮遊細胞を洗い流してから、接着細胞を回収し、用意しておいた真皮 ECM 上に播種し直した。培地交換は毎日行い、培養を開始してから 5 日後に、培養液を 4% PFA/PBS に置換し、室温で

10 分間置くことで細胞を固定した。固定した細胞を TBST で 5 分間×3 回洗浄してから、ブロッッキングバッファー中で室温で 30 分間置き、ブロッッキングバッファーで 500 倍希釈した 1 次抗体の抗 GFP 抗体（ウサギ由来）で室温で 2 時間処理した。TBST で 5 分間×4 回洗浄し、2 次抗体の Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ抗体（500 倍希釈）と Hoechst 33342（1 µg/ml）を含むブロッッキングバッファーで室温で 2 時間処理した。その後、TBST で 5 分間×4 回洗浄してから、真皮 ECM ごと培養皿からはがし、スライドガラスに移して Fluoromount で封入した。封入したサンプルは、光学顕微鏡 BX61 とカラーカメラ DP72 を用いて撮影した。

## 第二章

### 真皮コラーゲン線維構造の再生機構の調査

## 要旨

第二章では、コラーゲン線維の格子構造を指標に、メキシコサラマンダーの皮膚再生能を再評価した。メキシコサラマンダーは、ヒトやマウスとは異なり、皮膚に深い傷を負った場合でも分泌腺などの皮膚付属器を再形成できることから、完全に皮膚を再生できると考えられていた。しかし、本研究でメキシコサラマンダーのコラーゲン線維構造を解析したところ、皮膚修復後の組織では元の格子構造が回復せず、代わりに無秩序な波状の線維が傷領域を埋めていることが判明した。また、傷領域ではコラーゲン産生細胞自体も格子形態をとっていないことが分かった。これらの観察結果は、メキシコサラマンダーの皮膚再生が不完全であることを示しており、従来の定説を覆す発見である。

第二章の後半では、メキシコサラマンダーの皮膚完全再生を達成するための方法を探った。メキシコサラマンダーは四肢を再生できることから着想を得て、四肢切断後に形成される再生肢上の皮膚を観察したところ、コラーゲン線維の格子構造が回復していることが分かった。そこで、四肢再生の開始を支配することで知られる「神経」を皮膚損傷部に配向させたところ、コラーゲン線維の格子構造が回復することが明らかとなった。すなわち、神経が皮膚の完全再生を誘導する効果を持つことが示唆された。この発見は、メキシコサラマンダーと同じく皮膚を再生できないヒトにおいても、皮膚再生を誘導するためのヒントになると期待される。

## 序論

第一章では、損傷前の真皮コラーゲンが格子構造をとることを示した。この第二章では、コラーゲン線維の構造を指標に、メキシコサラマンダーの皮膚再生能を再評価した。

私たちヒトの皮膚再生能力は極めて限定的で、真皮深くまで傷が到達する場合には瘢痕が形成され、傷跡として残る (Xue and Jackson, 2015) (図 0-3)。また、瘢痕が形成された場所では、毛包や分泌腺などの皮膚付属器は消失してしまう。一方、メキシコサラマンダーやカエルなどの両生類の場合は、表皮と真皮の全層を切除するような深い傷を負った場合でも、皮膚付属器を含む組織を再形成することができる (Lévesque et al., 2010; Seifert et al., 2012; Yokoyama et al., 2011) (図 0-3)。そのため、これまでは組織学的な観点から、両生類は完全に皮膚を再生できるものとして扱われてきた。しかし、修復真皮の ECM 構造に着目した詳しい解析はこれまで行われておらず、ECM 構造も含めて元通りに再生できるのかは確かめられていなかった。本研究では、メキシコサラマンダーの修復真皮におけるコラーゲン線維構造を解析し、損傷前とは異なる線維構造をとっていることを発見した。すなわち、コラーゲン線維構造に着目して見れば、両生類も哺乳類と同様に「真皮を再生できない」ということになる。では、どうすればコラーゲン線維構造も含めた完全な皮膚再生が実現するのだろうか？

メキシコサラマンダーやイモリなどの有尾両生類は、非常に高い器官再生能力を持つ動物として知られている。特に四肢再生は、長年多くの研究者の注目を集めてきた

(Brockes, 1997; Spallanzani, 1769)。四肢は骨・軟骨，筋肉，神経など様々な組織を含む器官であり，そこには皮膚も含まれる。そこで私は，「四肢切断後に再形成される再生肢上の皮膚は，損傷前と同様のコラーゲン線維構造をとる可能性があるのではないだろうか？」と考え，検証を行った。その結果，再生肢の皮膚コラーゲン線維は，予想通り損傷前と同様の格子構造をとることが明らかとなった。皮膚単独の損傷の場合はコラーゲン線維構造が回復しない一方で，四肢全体の損傷ではコラーゲン線維が元通りに回復するのはなぜだろうか？ここで私は，「神経」に着目した。四肢の中心付近には太い神経束が走っており，四肢切断時には神経束も損傷を受ける。一方，皮膚単独損傷時には神経束は損傷を受けない。両生類の器官再生に関する先行研究から，四肢，尾，歯など複数の器官において，神経由来のシグナルが再生開始に寄与することが報告されていた(Endo et al., 2004; Maden and Holder, 1984; Makanae et al., 2016b, 2020; Singer, 1952)。これらのことから，「神経には皮膚の再生効果もあるのではないか？」という仮説を立て，検証実験を行った。

## 結果

### 皮膚損傷後の真皮コラーゲン線維構造の観察

はじめに、メキシコサラマンダーの皮膚損傷後の修復過程を観察した。手術用のハサミとピンセットを用いて、四肢背側の皮膚に2 mm 角の傷を作った。この際、筋層には傷を付けずに、表皮と真皮の全層を切除した。そして、皮膚損傷後 50 日目まで経時的な観察を行った。50 日目の段階でも外見から損傷領域を判別することができる (図 2-1A)。皮膚組織切片の Picrosirius red 染色画像を見ると、損傷後 50 日で真皮のコラーゲン層や分泌腺が、損傷前と同じ様に回復していることが確認できた (図 2-1B)。損傷後 20 日目の時点では、コラーゲンが損傷真皮領域の全体にほぼ均一に広がっているが、50 日目では真皮上層部の海綿層と真皮下層部の緻密層が見分けられるほどに回復している。また、分泌腺は 20 日目の時点で既に再形成され始めていた。これらの観察結果は、先行研究と一致するものであり (Lévesque et al., 2010; Seifert et al., 2012), 組織学的な観点に基づくと、メキシコサラマンダーの皮膚は再生できているように見受けられる。

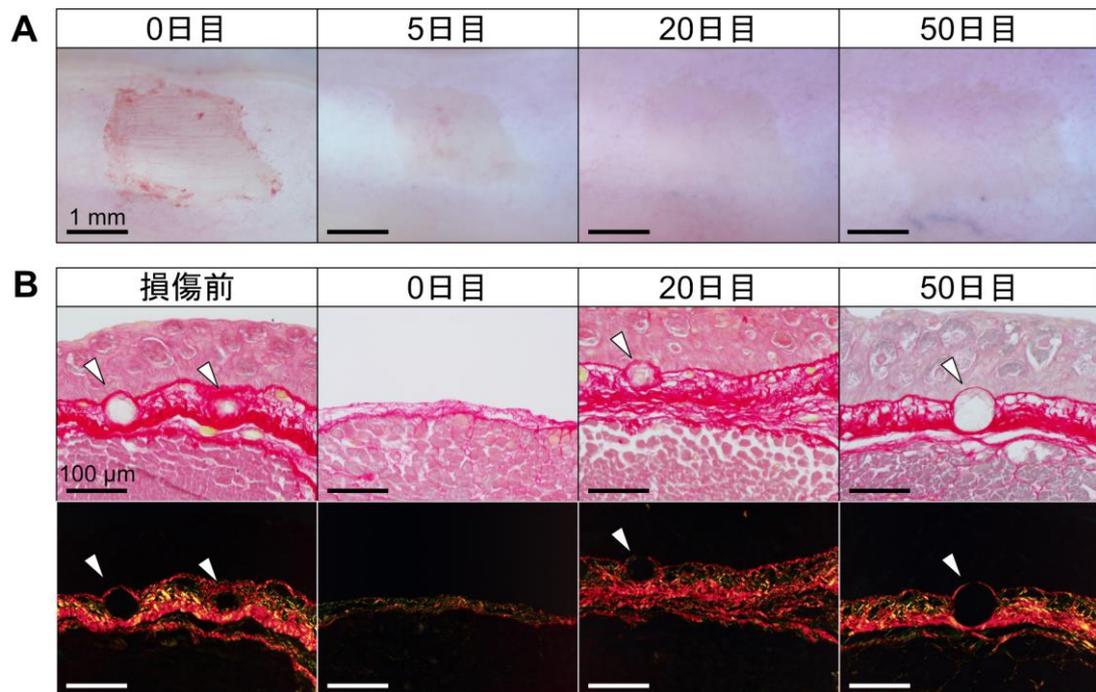
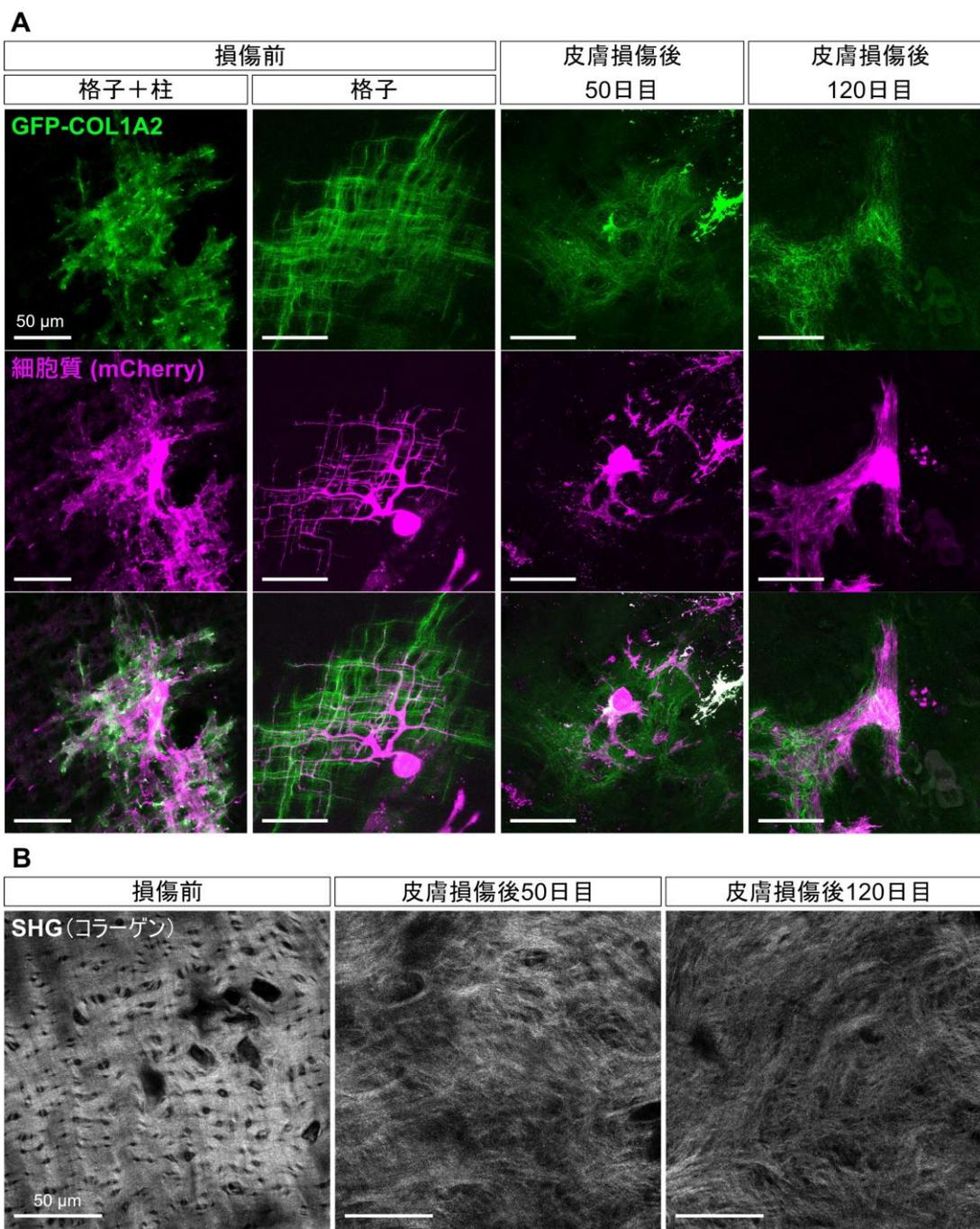


図 2-1. 皮膚損傷後 50 日目までの経時観察

(A) 皮膚損傷部の実体写真。

(B) Picrosirius red 染色を施した皮膚切片を、非偏光下（上段）と偏光下（下段）で撮影した。偏光下では、I 型コラーゲンが赤色、III 型コラーゲンが緑色に発色する。矢頭は分泌腺を示す。

次に、皮膚損傷部におけるコラーゲン線維の構造と細胞形態を損傷前と比較した。第一章で示した通り、損傷前の真皮コラーゲン線維は格子構造をとる（図 1-2, 図 1-3, 図 1-5）。皮膚損傷から 50 日後、すなわち組織学上は再生が完了しているとみなされる時期において、コラーゲン線維の構造を *GFP-Coll1a2* による蛍光標識（図 2-2A）と、二光子顕微鏡を用いた SHG イメージング（図 2-2B）によって解析した。*GFP-Coll1a2* 発現ベクターは、サンプル回収の 5 日前の皮膚損傷後 45 日目にエレクトロポレーション法により真皮細胞に導入した。皮膚損傷後 50 日目に回収した皮膚サンプルは、PFA で固定した後、共焦点顕微鏡で観察した。*GFP-Coll1a2* を用いた一細胞観察の結果からも SHG イメージングによるコラーゲン線維全体の観察結果からも、損傷部ではコラーゲン線維が格子構造をとっておらず、無秩序かつ縮れた線維が広がっていることが分かった。また、細胞自体も格子形態を失っていることが確認できた（図 2-2A）。さらに、50 日目が再生途中の段階である可能性を考えて、皮膚損傷後 120 日目にも同様の観察を行った。120 日目の結果も 50 日目と同様で、コラーゲン産生細胞も再構築されたコラーゲン線維も格子構造をとっていなかった。つまり、皮膚損傷後の真皮層のコラーゲン線維は、空間を穴埋めしているにすぎず、完全な皮膚再生とは言えないことが示された。



**図 2-2. 皮膚損傷前と損傷後におけるコラーゲン産生細胞および線維の構造比較**  
**(A)** 共焦点顕微鏡で撮影したコラーゲン産生細胞（Z-stack 画像の最大輝度合成画像）。緑は GFP-COL1A2 を，マゼンタは細胞質（mCherry）を示す。  
**(B)** 二光子顕微鏡で撮影した SHG 画像（一スライス画像）。

エレクトロポレーション法による蛍光標識技術を用いた観察では、一部の細胞しか標識できないというデメリットがある。そこで、GFPを全細胞で発現するトランスジェニック個体を用いることで、組織全体の細胞形態を観察した(図2-3)。真皮コラーゲン層中の細胞形態を明らかにするために、二光子顕微鏡を用いてSHGシグナルとGFPシグナルを同時に捉えた。第一章でも示した通り、損傷前の無傷の真皮には、二種類の格子状コラーゲン産生細胞が存在する(図1-5, 図1-6, 図2-2A)。緻密層の上層部に存在し、格子と柱を形成する細胞と(図1-5A, 図1-6A)、柱構造を持たず、緻密層の最下層部で格子状の仮足を伸ばす細胞である(図1-5B, 図1-6B)。GFPトランスジェニック個体を用いた観察でも、第一章で見られたものと同様の形態を捉えることができた(図2-3A, B)。それに対し、皮膚損傷50日後の真皮層に存在する細胞は、いずれも格子形態をとらず、無秩序に仮足を伸ばしていた(図2-3C)。

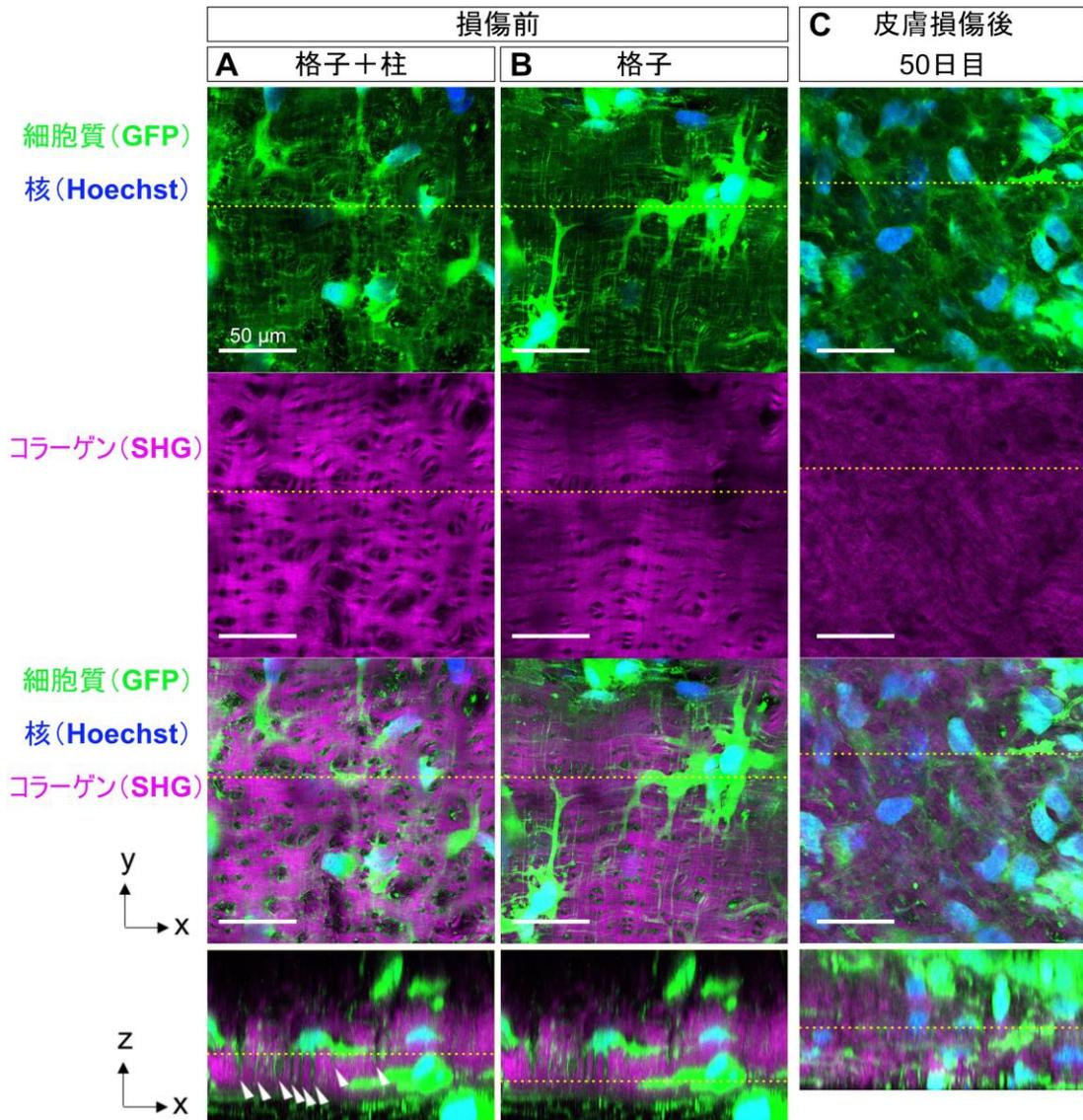


図 2-3. 皮膚損傷前と損傷後の真皮コラーゲン層における細胞形態の比較

GFP トランスジェニック個体を用いて、二光子顕微鏡下で真皮のコラーゲン線維構造 (SHG, マゼンタ) と細胞形態 (GFP, 緑) を観察した。核は Hoechst (青) で染色した。XY 画像はいずれも Z-stack 画像 4 スライス分の最大輝度合成画像である。XY/XZ 画像中の黄色点線は、XZ/XY 画像のそれぞれの位置を示す。

(A) 無傷の真皮緻密層の上層部。格子状と柱状の仮足を持つ細胞が存在する。XZ 画像中の矢頭は柱状構造を示す。

(B) 無傷の真皮緻密層の下層部。格子状の仮足を持つ細胞が存在する。

(C) 皮膚損傷後 50 日目の真皮層。細胞は無秩序に仮足を伸ばしており、コラーゲン線維も格子構造をとっていない。

#### 四肢切断後の再生肢における真皮コラーゲン線維構造の観察

メキシコサラマンダーは四肢再生能を持つことで知られており、四肢を切断しても数か月で元の骨格パターンを持つ四肢を再形成することができる（図 0-4, 図 2-4A）。四肢切断 50 日後には器官全体の伸長と指のパターン再生がみられ、切断前とよく似た形態をとった。さらに、切断後 20 日目と 50 日目の四肢の皮膚組織を Picrosirius red 染色で観察したところ、20 日目の時点ではまだ薄いコラーゲン層が存在するだけだが、50 日目では分泌腺も含む厚みのあるコラーゲン層が再構築されていることが確認できた（図 2-4B）。そこで、切断後 50 日目の真皮コラーゲン線維構造を、SHG イメージング（図 2-4C）と *GFP-Coll1a2* を用いた一細胞蛍光標識（図 2-4D）により観察した。すると、無傷の真皮と同様の格子状のコラーゲン線維が構築されていることが分かった。また、mCherry 発現により可視化したコラーゲン産生細胞の形態も、コラーゲン線維の配向と同じく格子状になっていた。これらのことから、四肢全体の再生に伴って、皮膚のコラーゲン線維構造が正しく再構成されていることが示された。

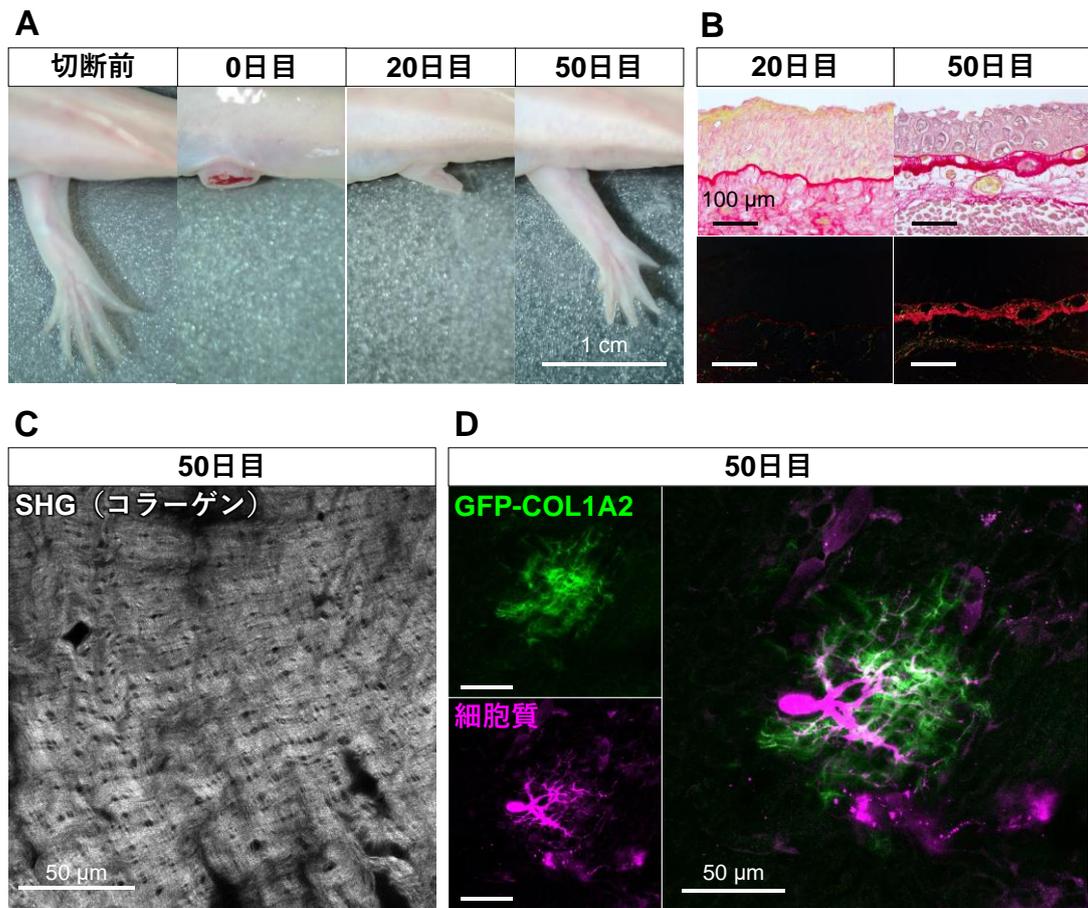


図 2-4. 再生肢上の真皮コラーゲン線維構造の観察

(A) 四肢再生過程の実体写真。

(B) 再生肢の皮膚組織を Picrosirius red で染色し、非偏光下（上段）と偏光下（下段）で撮影した。偏光下の赤色は I 型コラーゲンを示す。

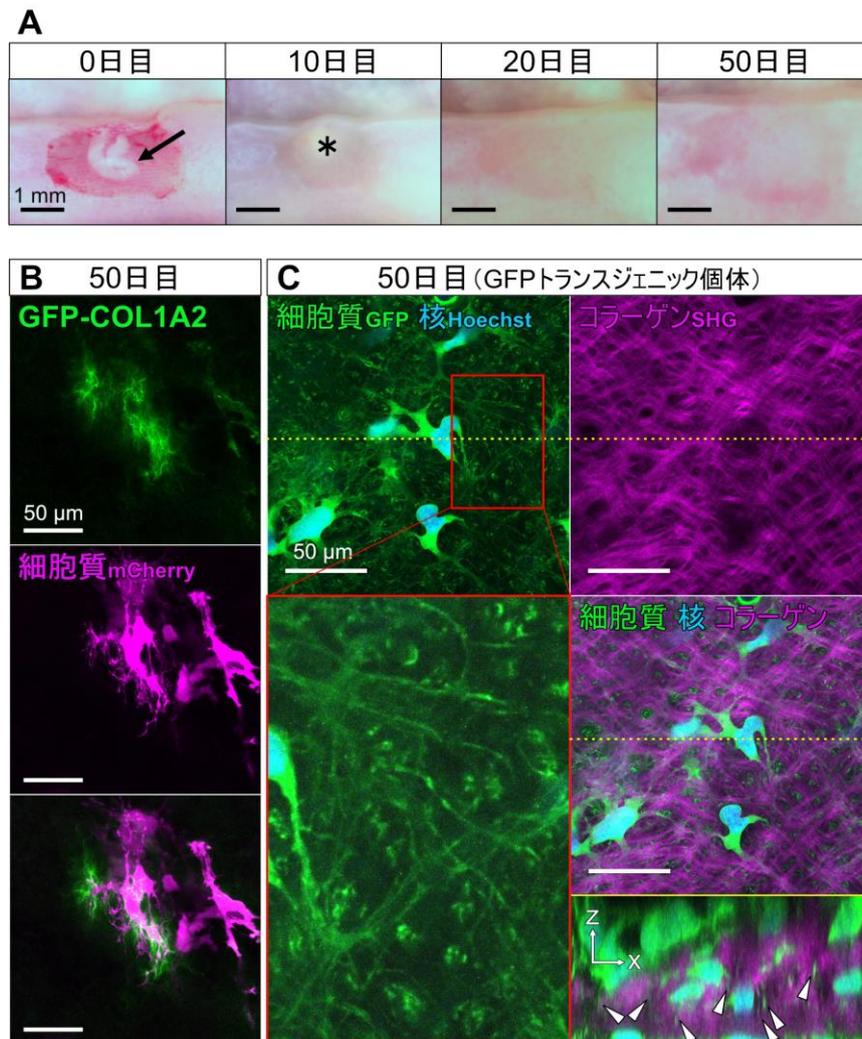
(C) 四肢切断後 50 日目の再生肢の真皮 SHG 画像。

(D) 四肢切断後 50 日目の再生肢の真皮における、GFP-COL1A2 で標識した I 型コラーゲン（緑）と、mCherry で標識した細胞質（マゼンタ）。共焦点顕微鏡で撮影した Z-stack 画像を最大輝度合成した。

## 神経の皮膚再生効果の検証

皮膚単独損傷と四肢切断の違いとして、私は「神経」に着目した。なぜなら、両生類の器官再生に関する先行研究から、神経由来のシグナルが様々な器官において再生の開始を支配することが示されていたからである (Endo et al., 2004; Maden and Holder, 1984; Makanae et al., 2016b, 2020; Singer, 1952)。四肢切断時には神経も切断され、そこから再生因子が放出される。反面、皮膚単独損傷では大きな神経切断は起こらない。そこで、皮膚単独損傷部に外科的に切断した神経を配向させることで、強制的に神経シグナルを与えた (図 2-5)。すると、術後 10 日前後で、神経配向部にふくらみが生じ、その数日後には退縮した (図 2-5A)。これは、先行研究でも指摘されている現象である (Endo et al., 2004; Satoh et al., 2007)。真皮コラーゲン線維構造の観察は、これまでの実験と同じく術後 50 日目に行った (図 2-5B,C)。GFP-*Colla2* 発現ベクターと mCherry 発現ベクターを用いた観察の結果、コラーゲン産生細胞が格子状の仮足を伸ばしつつある様子が捉えられた (図 2-5B)。さらに、GFP トランスジェニック個体を用いた二光子顕微鏡観察により、真皮コラーゲン線維の全体構造とコラーゲン層中の細胞形態を観察したところ、数多くの細胞が格子状の仮足を伸ばし、その仮足に沿ってコラーゲン線維が格子構造を形成していることが確認できた (図 2-5C)。また、これらの細胞は垂直方向にも仮足を伸ばしており、柱構造も構築していることが示唆された。つまり、神経シグナルは皮膚

損傷部に正常組織中のコラーゲン産生細胞と同質の細胞を誘導する効果を持ち、その結果として損傷前と同様の格子状のコラーゲン線維構造を構築できるのだと考えられる。



### 図 2-5. 神経シグナルの皮膚再生効果の検証

**(A)** 皮膚損傷部に神経を配向させた場合の皮膚修復過程。矢印は神経を、\*は再生芽を示す。

**(B)** 術後 50 日目の真皮。GFP-COL1A2 (緑) で I 型コラーゲンを、mCherry (マゼンタ) で細胞質を蛍光標識した (共焦点顕微鏡で撮影した Z-stack 最大輝度合成画像)。

**(C)** GFP トランスジェニック個体における、術後 50 日目の真皮の二光子顕微鏡画像 (Z-stack 4 スライス分の最大輝度合成画像)。XZ 画像中の矢頭は柱構造を示す。XY 画像中の黄色点線は XZ 画像の位置を示す。

## コラーゲン線維構造の定量解析

より客観的な指標でコラーゲン線維構造を評価するために、SHG 画像を対象として二種類の解析を行った。一つ目はフーリエ変換による線維配向性解析、二つ目はディープラーニングを介した主成分解析 (principal component analysis, PCA) である。

一つ目のフーリエ変換による線維配向性解析は、理研 BDR の渡邊朋信博士との共同研究で進めた。また、基礎生物学研究所の生物画像データ解析トレーニングコース 2021 にて、加藤輝特任助教からご教授頂いた知識も参考にして解析を行った。具体的には、二光子顕微鏡により撮影した SHG 画像連続 5 スライスに対して、それぞれ高速フーリエ変換処理を施し、得られたパワースペクトルから角度ごとの線維配向強度を算出した (図 2-6)。線維の配向性に合わせてピークが現れるため、グラフの二箇所にピーク (図 2-6 右グラフ中の赤矢印) が現れる場合は、線維が二方向に配向していること、すなわち格子状であることを示している。

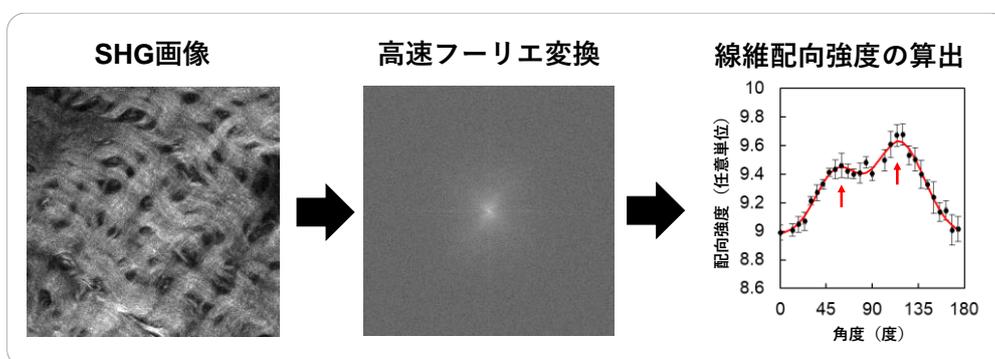


図 2-6. フーリエ変換によるコラーゲン線維配向性解析の概要

解析結果は図 2-7 に示した。無傷、四肢切断 50 日後、皮膚損傷+神経 50 日後の三条件では、二箇所ピークを持つグラフが生成された一方で、神経無しの皮膚損傷 50 日後のグラフにはピークが一箇所しか現れなかった。つまり、前者の三条件ではコラーゲン線維が格子状に配向しており、後者は格子構造をとっていないことが示された。

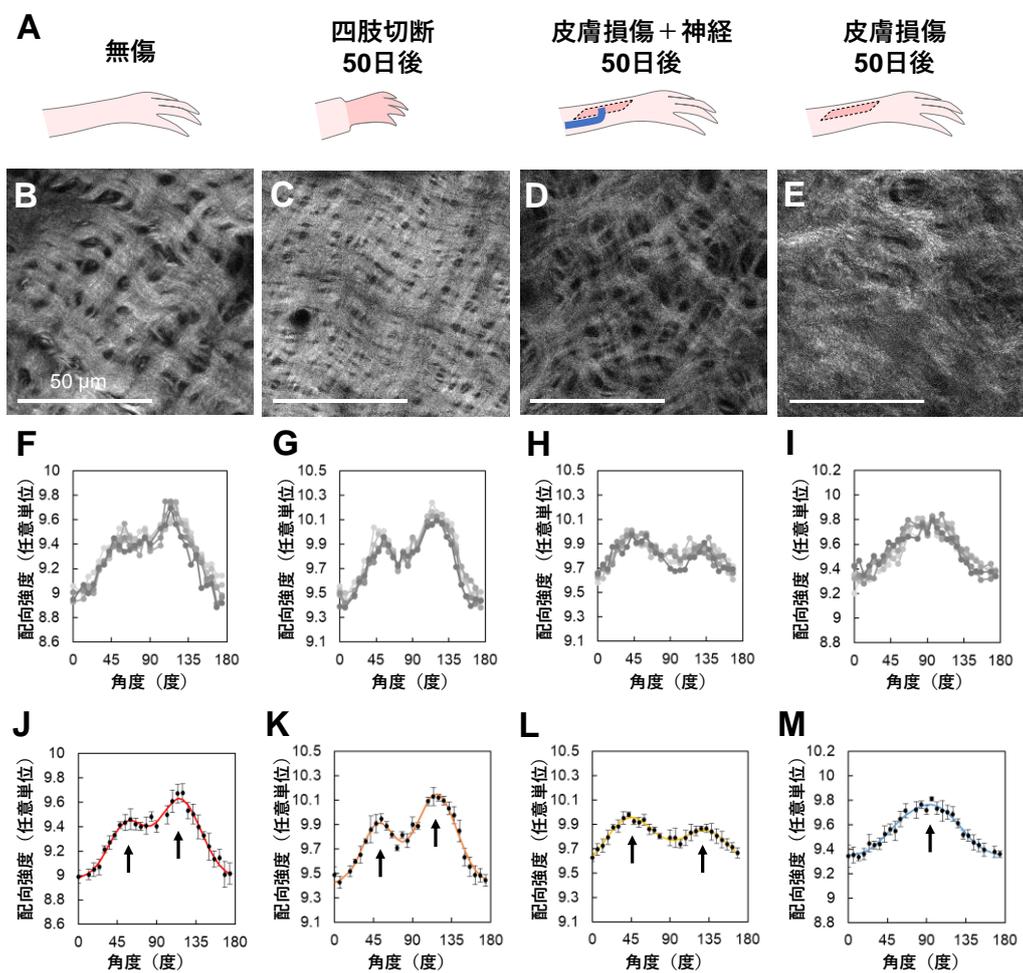
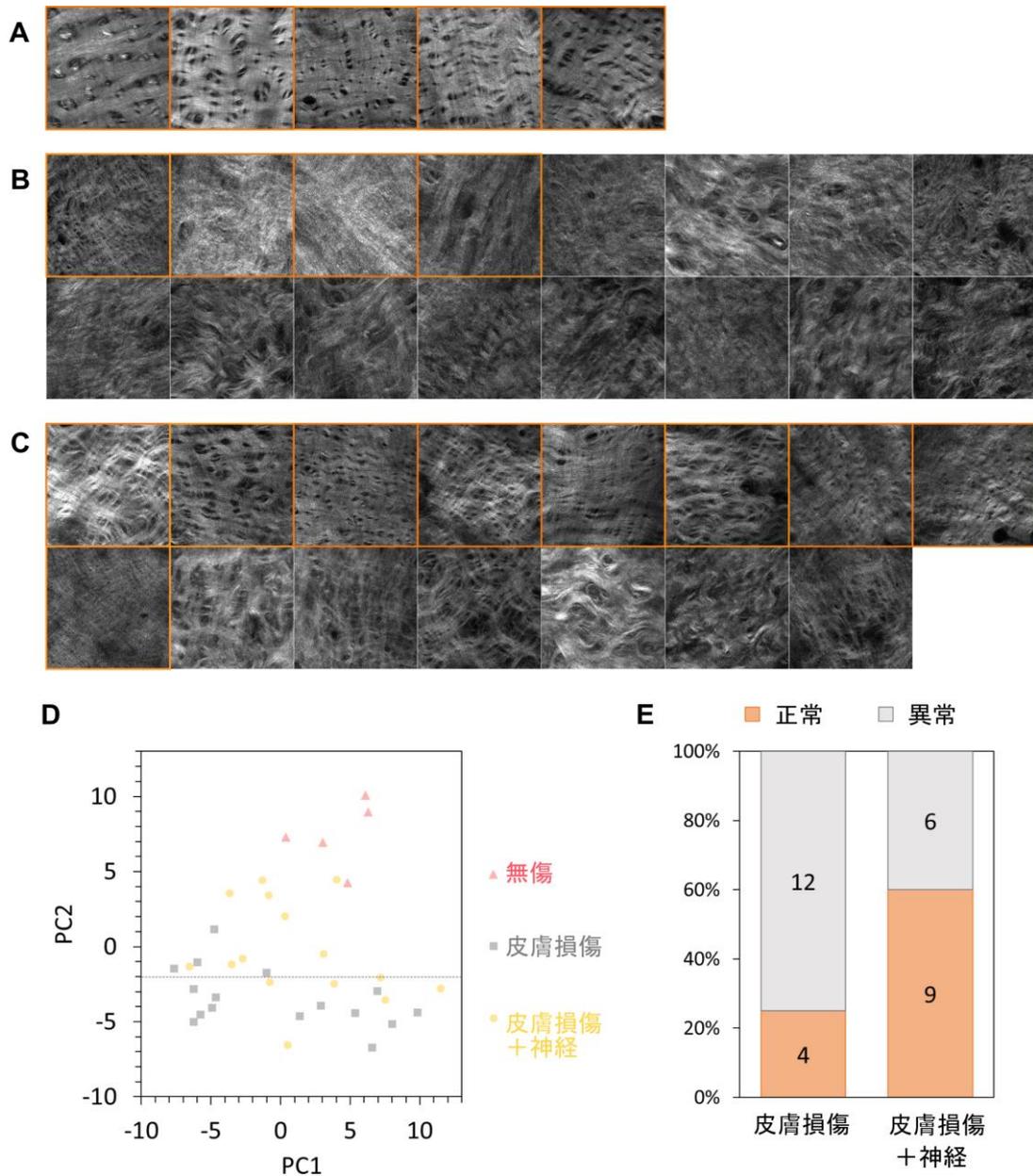


図 2-7. フーリエ変換によるコラーゲン線維配向性解析

- (A) 観察対象の模式図。
- (B-E) 真皮の SHG 画像。
- (F-I) Z-stack 撮影した SHG 画像（連続 5 スライス）のフーリエ変換解析結果。
- (J-M) 5 スライスの平均 ± 標準偏差。矢印は、線維の配向強度が高い角度を示す。

次に、ディープラーニングを介した主成分解析によって、コラーゲン線維構造の評価を行った（図 2-8）。本解析は基礎生物学研究所の近藤洋平助教の協力の下で実施した。解析には、損傷前の無傷真皮（n=5）、皮膚損傷後 50 日目の真皮（n=16）、皮膚損傷時に神経を配向させて 50 日後の真皮（n=15）の三条件、合計 36 枚の SHG 画像を用いた（図 2-8A-C）。これらはいずれも、Z-stack 撮影した連続 4 スライスを最大輝度合成した画像である。はじめに、ImageNet のデータセットで学習を行ったニューラルネットワーク ResNet50 (He et al., 2016) を用いて、SHG 画像から特徴抽出を行った。その後、抽出された特徴量に対して主成分解析を行った（図 2-8D）。その結果、無傷サンプルは概して PC2 値が高く、かつ PC1 値も 0-7 の範囲に収束し、クラスターを形成した。一方で、皮膚損傷サンプルは全体に PC2 値が低く、PC1 値は広く分散する結果となった。皮膚損傷部に神経を与えたサンプルは、無傷サンプルと皮膚損傷サンプルの中間領域に分布した。そこで、PC2 値を指標に、-2 より値が大きいものは無傷の線維構造と類似の「正常線維構造」、-2 以下のものは「異常線維構造」と判定することとした（図 2-8E）。判定の結果、通常の皮膚損傷サンプルでは、正常線維構造と判定されたものは 25%（4/16 サンプル）にとどまり、過半数の 75%（12/16 サンプル）は異常線維構造と判定された。反対に、神経を与えた皮膚損傷サンプルのうち 60%（9/15 サンプル）は正常線維構造と判定された。これらの結果から、神経の存在によって、皮膚損傷後の真皮コラーゲン線維構造が損傷前の状態に近づくことが示された。



**図 2-8. ディープラーニングを介したコラーゲン線維画像の主成分解析**

**(A-C)** Z-stack 撮影した連続 4 スライスの SHG 画像を最大輝度合成した画像。A は、無傷真皮の SHG 画像 (n = 5)。B は、皮膚損傷後 50 日目の真皮 (n = 16)。C は、神経有りの皮膚損傷後 50 日目の真皮 (n = 15)。

**(D)** A-C の画像を主成分解析した結果。PC は principal component の略。

**(E)** D における PC2 値が-2 以上のものを、無傷と類似の正常線維構造と定義し、コラーゲン線維画像 (SHG 画像) を正常と異常に分類した。A-C の画像のうち、正常と判定された画像は朱色で囲った。

## 考察

先の第一章では、メキシコサラマンダーの真皮においてコラーゲン産生細胞と、産生されるコラーゲン線維が、どちらも格子状の形態をとることを明らかにした。第二章では、コラーゲン線維とその産生細胞の格子形態を指標に、メキシコサラマンダーの皮膚が完全には再生されないことを明らかにした。さらに、神経シグナルを与えることで、損傷前と同様の構造にコラーゲン線維を再構築できることも示した。

本章でははじめに、皮膚損傷後に構築されるコラーゲン線維とその産生細胞の形態を観察し、損傷前と比較した。過去の皮膚再生研究では、組織学的観察に基づいて、両生類の皮膚は完全に再生できると考えられていたため (Lévesque et al., 2010; Seifert et al., 2012; Yokoyama et al., 2011), 本研究の開始当初は、皮膚修復に伴ってコラーゲン線維も格子構造を取り戻すのであろうと予想していた。しかし予想は外れ、損傷を受けた真皮は、格子形態をとらない細胞によって産生された無秩序なコラーゲン線維で埋め立てられ、完全な再生が阻害されることが明らかとなった (図 2-2, 図 2-3, 図 2-7, 図 2-8)。この発見は、従来の「両生類は皮膚を再生できる」という定説に意義を唱えるものである。本研究で私は、両生類のメキシコサラマンダーもヒトと同じく皮膚を再生できない動物であることを示した。

私たちヒトは一度四肢を切断してしまうと、その四肢が再び生えてくることは決してない。しかし、メキシコサラマンダーやイモリなどの有尾両生類は、何度でも四肢を再

生することができる (Brookes, 1997; Spallanzani, 1769)。そこで、新しく作られた再生肢の皮膚は、切断前と同じ格子状のコラーゲン線維を持つのではないかと考え、検証実験を行った (図 2-4, 図 2-7)。その結果、予想通りの格子構造を確認することができた。さらに、このときのコラーゲン産生細胞は、切断前と同じく格子状の仮足を伸ばしていることも明らかにした。すなわち、四肢切断後の真皮コラーゲン構築過程では皮膚単独損傷時とは異なる反応が起こっているということである。

四肢切断と皮膚損傷の違いとして、私は「神経」に着目した。四肢切断時には、四肢中心付近を走る太い神経束が損傷を受けるが、皮膚単独損傷時には神経束は損傷を受けない。そこで、神経束の切断面から放出されるシグナルが、皮膚再生を促進するのではないかと考えたのである。神経と器官再生の関係性については、先行研究でも示されている。具体的には、四肢、尾、歯などの器官において、神経由来のシグナルが再生開始に寄与することが報告されている (Endo et al., 2004; Maden and Holder, 1984; Mikanaka et al., 2016b, 2020; Singer, 1952)。本研究では、皮膚損傷部に外科的に神経切断面を配置させることで、神経の皮膚再生効果を検証した (図 2-5, 図 2-7, 図 2-8)。実験の結果、神経存在下ではコラーゲン産生細胞が格子形態を取り戻し、格子状のコラーゲン線維を再構築することが分かった。この際、皮膚損傷部には一時的にふくらみが形成された。この現象は先行研究でも指摘されており、四肢切断面に形成される再生芽と同じく、脱分化細胞の集合体だと考えられている (Endo et al., 2004; Satoh et al., 2007)。そのため、真

皮損傷部に集合した線維芽細胞が神経シグナルを受け取って一度脱分化することで、格子状のコラーゲン産生細胞に分化し直している可能性が考えられる。

本章では、コラーゲン線維構造とコラーゲン産生細胞の形態に関する観察を通じて、神経由来のシグナルが皮膚再生効果を持つことを明らかにした。つづく第三章では、神経シグナルが皮膚再生を誘導する機構を追究した。

## 材料と実験方法

### 実験動物

本研究では、メキシコサラマンダー (*Ambystoma mexicanum*) を用いて実験を行った。野生型個体は広島大学両生類研究センターまたは浜松生物教材から、GFP トランスジェニック個体 (*CAG::GFP*) は *Ambystoma Genetic Stock Center* から入手した。飼育水温は 22°C前後に保った。実験には、鼻から尾までの長さが 10-16 cm の個体を使用した。動物の飼育管理および実験は、岡山大学動物実験委員会のガイドラインおよび動物飼育マニュアルに従って実施した。また、メキシコサラマンダーは外来生物に該当するため、ワシントン条約および名古屋議定書に従って管理した。全ての動物実験は、事前に MS222 (Sigma) の 5%溶液を用いて動物に麻酔をかけてから実施した。

### 皮膚損傷の作製および損傷部への神経の配向

手術用のハサミとピンセットを用いて、四肢背側の皮膚に 2 mm 角の傷を作った。この際、筋層には傷を付けずに、表皮と真皮の全層を切除した。皮膚切除を行った直後、5 日後、20 日後、50 日後において、実体顕微鏡 SZX16 (Olympus) で損傷領域を撮影した (図 2-1A)。また、図 2-5A では、皮膚損傷作製時に四肢の中心付近を通る神経束を途中で切断し、周囲の組織から剥離し、皮下を通して皮膚損傷部に配向させた。手術直後、10 日後、20 日後、50 日後において損傷部を実体顕微鏡で撮影した。

## 四肢切断

手術用のハサミとピンセットを用いて、四肢の上腕部を切断した。この際、切断部では筋収縮が起こり骨の先端部が露出するため、露出した骨を切除することで四肢切断面を平らに調整した。四肢切断前、切断直後、20日後、50日後において、実体顕微鏡 SZX16 で四肢全体を撮影した（図 2-4A）。

## Picrosirius red 染色による組織学的解析

はじめに、回収した四肢サンプルを固定するために、室温の 4% PFA/PBS 溶液中で一晩振とうした。その後、4°C の G-Chelate Quick (Geno Staff) で 3 日間脱灰処理を行い、サンプルを純水 (MilliQ 水) で洗ってから、G-Chelate-NT (Geno Staff) に移し、4°C で一晩置いて脱灰反応を停止させた。次に、パラフィン包埋装置 CT-Pro20 (Geno Staff) を用いて、サンプルの脱水とパラフィン包埋を行った。室温で 70% エタノールに一晩、100% エタノールに一晩、50% エタノール/G-NOX (Geno Staff) に 3 時間、100% G-NOX に 9 時間浸して、サンプルを脱水した。それを、9 時間かけてパラフィン置換し、包埋した。包埋したブロックから、RX-860 (Yamato) を用いて厚さ 10  $\mu\text{m}$  の切片を切り出し、スライドガラスに貼り付けた。切片は、G-NOX で 10 分間  $\times$  2 回、100% エタノールで 15 分間、70% エタノールで 15 分間、水で 10 分間処理することで脱パラフィン化した後、Picrosirius Red Stain Kit (Polysciences) を用いて、マニュアル通りに染色した。具体的に

は、溶液 A（リンモリブデン酸溶液）に 2 分間浸し、水洗し、溶液 B（Picrosirius red 染色液）に 60 分間浸し、溶液 C（0.1N 塩酸）に 2 分間浸し、70%エタノールに 45 秒間浸した。染色した切片は、100%エタノールに 5 分間×2 回、G-NOX に 10 分間×2 回浸すことで脱水し、ソフトマウント（富士フイルム和光純薬）で封入した。そして、皮膚組織の目的の領域を、光学顕微鏡 BX61 (Olympus) とカラーカメラ DP72 (Olympus) を用いて撮影した（図 2-1B, 図 2-4B）。Picrosirius red 染色を施した組織は、非偏光下においてコラーゲンが明るい赤色を発する。さらに、偏光下では、I 型コラーゲン（赤色）と III 型コラーゲン（緑色）を識別することができる。

### ***GFP-Coll1a2* プラスミドベクターを用いた一細胞レベルのコラーゲン線維構造解析**

皮膚損傷部（図 2-2A, 図 2-5B）や再生肢上（図 2-4D）の真皮の I 型コラーゲン線維と細胞形態を一細胞レベルで可視化するために、第一章で開発した *GFP-Coll1a2* 発現ベクター（図 1-4）と mCherry 発現ベクターを用いて観察を行った。はじめに、皮膚サンプルを回収する 5 日前において、プラスミドベクターの導入を行った。例えば、損傷/切断後 50 日目のサンプルについて観察を行う場合には、45 日目がプラスミドベクターの導入日となる。ファストグリーンで染色したプラスミド溶液 (0.4-2 µg/µl) を、ガラス針で真皮に注入し、NEPA21 (NEPA GENE) を用いた電ポレーション法により細胞内に導入した。その際、電圧 20 V, パルス長 50 ms, インターバル 950 ms で 10 回

電気を流した。

回収した皮膚サンプルは、4% PFA/PBS で固定した。このとき、重石を乗せて平らにした状態で5分間静置してから、1時間振とう固定することで、皮膚サンプルの歪みを最小限にとどめた。その後、TBSTで10分間×3回洗浄し、GFP抗体を用いた免疫染色により、GFPシグナルを増強させてから、顕微鏡観察を行った。また、mCherryについては、免疫染色によるシグナル増強を行わなかった。GFPの免疫染色は以下の手順で行った。固定した皮膚サンプルをブロッキングバッファー（TBSTに0.5% blocking reagent (Roche) を溶かした溶液）に室温で1時間浸し、その後、ブロッキングバッファーで500倍希釈した1次抗体の抗GFP抗体（ウサギ由来, MBL, Cat# 598）を用いて4°Cで一晩処理した。つづいて、サンプルをTBSTで20分×8回洗浄し、ブロッキングバッファーに1時間浸してから、ブロッキングバッファーで500倍希釈した2次抗体のAlexa Fluor 488 標識抗ウサギ抗体（Thermo Fisher, Cat# A32731）を用いて室温で2時間処理した。TBSTで20分×8回洗浄した後、皮膚サンプルをスライドガラス上に真皮深層側を観察面に向けた状態で置き、Fluoromount (DBS) を用いて封入した。撮影には、岡山大学の倒立型共焦点顕微鏡FV1200 (Olympus) または基礎生物学研究所の倒立型共焦点顕微鏡TCS SP8 MP (Leica) を用いた。Z-stack画像の重ね合わせやXZ画像の構築などの画像処理は、Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いて行った。

## 二光子顕微鏡を用いた観察

基礎生物学研究所の倒立型二光子顕微鏡 TCS SP8 MP (Leica) を用いて、固定皮膚サンプルにおけるコラーゲン線維構造 (SHG)、細胞形態 (GFP)、細胞核 (Hoechst) を観察した (図 2-2B, 図 2-3, 図 2-4C, 図 2-5C, 図 2-7B-E, 図 2-8A-C)。コラーゲン線維構造の観察は野生型個体, GFP トランスジェニック個体の両方に対して行い, 細胞形態と細胞核の観察は GFP トランスジェニック個体を対象に行った。細胞核は, 皮膚サンプルを 4°C の 1 µg/ml Hoechst 33342 Solution (ナカライテスク)/TBST に一晩浸すことで染色した。皮膚サンプルは TBST で洗浄した後, スライドガラス上に真皮深層側を観察面に向けた状態で置き, Fluoromount を用いて封入した。顕微鏡観察では, 倍率 63 倍の水浸対物レンズ (Leica, HC PL APO 63×/1,20 W CORR CS2) を用い, Z-step size は 0.8 µm に設定し, 1024×1024 ピクセルの画像を取得した。InSight DeepSee femtosecond infra-red laser (Spectra-Physics) を用いて波長 900 nm の二光子レーザーを照射し, 435-485 nm のバンドパスフィルタを介して波長 450 nm の SHG シグナルを検出し, 500-550 nm のバンドパスフィルタを介して GFP シグナルを検出した。Hoechst シグナルについては, 740 nm の照射光で励起し, 435-485 nm のバンドパスフィルタを介して蛍光を検出した。XZ 画像の構築や Z-stack 画像の重ね合わせなどの画像処理は, 画像解析ソフト Fiji を用いて行った。

## フーリエ変換によるコラーゲン線維配向性解析

コラーゲン線維の配向性を定量化するために、フーリエ変換を用いて解析を行った (図 2-6, 図 2-7)。前述のように取得した SHG 画像から、512×512 ピクセルの画像を切り出し、カーネル係数 2 ピクセルのガウシアンフィルタをかけることでゴマ塩ノイズを軽減し、Sobel フィルタをかけることでエッジを強調した。そして、フィルタ処理後の画像に対して、離散高速フーリエ変換 (discrete fast Fourier transform, DFFT) を適用した。得られたパワースペクトルに対して、空間周波数  $r$  が 25-65 ピクセルの領域において角度  $\theta \pm \pi/60$  ラジアン の範囲に ROI (region of interest) を設定し、 $\pi/30$  毎に ROI の平均輝度を算出してグラフ化した。このとき、離散計算の性質上現れるアーチファクトを排除するために、 $\theta=0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$  のデータは除外した。この方法により、5 連続の Z-stack 画像からそれぞれグラフを作成し (図 2-7F-I), それらの平均値±標準偏差を図 2-7J-M で示した。また、一つのグラフにつき二つの正規分布が存在すると仮定して、以下の関数でガウシアンフィッティングを行った。

$$f(\theta) = a_1 \exp\left\{-\frac{(\theta - \theta_1)^2}{2\sigma_1^2}\right\} + a_2 \exp\left\{-\frac{(\theta - \theta_2)^2}{2\sigma_2^2}\right\} + C$$

この数式における  $a_1$  と  $a_2$  は各正規分布の高さを、 $\theta_1$  と  $\theta_2$  は中心を、 $\sigma_1^2$  と  $\sigma_2^2$  は分散を表す定数で、 $C$  は全体のオフセットを表す定数である。

## ディープラーニングを介したコラーゲン線維画像の主成分解析

SHG 画像を対象にディープラーニングを介した主成分解析を行うことで、各条件のコラーゲン線維画像を正常と異常に分類した (図 2-8)。前述の通りに Z-stack 撮影した連続 4 スライスの SHG 画像を最大輝度合成し、 $512 \times 512$  ピクセルのサイズに切り出して、解析に使用した (図 2-8A-C)。損傷前の無傷真皮 ( $n=5$ )、皮膚損傷後 50 日目の真皮 ( $n=16$ )、皮膚損傷時に神経を配向させて 50 日後の真皮 ( $n=15$ ) の三条件で、合計 36 枚の SHG 画像を用いて解析を行った。事前に ImageNet のデータセットで学習を行ったニューラルネットワーク ResNet50 (ResNet50\_Weights.IMAGENET1K\_V2 from torchvision library, version 0.14.0) (He et al., 2016) に対して、これら 36 枚の画像データを適用し、特徴抽出を行った。2048 次元の penultimate layer の神経活性値を算出した。その後、抽出された特徴量に対して線形主成分解析を行った (図 2-8D)。PC2 値を指標に、-2 より値が大きいものは無傷の線維構造と類似の「正常線維構造」、-2 以下のものは「異常線維構造」と定義し、各条件のサンプルを分類した (図 2-8E)。

## 第三章

### 神経によるコラーゲン線維構造回復メカニズムの解明

## 要旨

先の第二章では、神経が皮膚再生効果を持つことを示した。第三章では、神経由来の再生因子として同定されている FGF に着目し、研究を進めた。

コラーゲン線維構造の解析の結果、皮膚損傷部に FGF タンパク質を投与すると、神経を配向させた場合と同様に、格子構造が再構築されることが分かった。すなわち、神経から放出される FGF が皮膚再生誘導因子として機能していることが示された。

次に、神経由来の FGF シグナルが、どのようなメカニズムでコラーゲン線維の格子構造の回復に寄与しているのかを明らかにするために、コラーゲン産生細胞の形態と由来に着目した。マウスやカエルの皮膚修復に関する先行研究から、真皮損傷部の線維芽細胞の多くが皮下組織から遊走してくることが示されていた。そこで、メキシコサラマンダーの真皮損傷部で検証を行ったところ、マウスやカエルと同様に、多くの細胞が皮下組織由来であることが確かめられた。また、神経を与えた場合であっても、真皮損傷部における皮下組織由来細胞と皮膚由来細胞の比率は変わらないことが分かった。さらに、通常の皮膚損傷では、真皮損傷部の細胞は格子形態をとらないが、神経や FGF を与えた場合には、皮下組織由来の細胞が格子状に変化することが明らかとなった。つまり、神経由来の FGF シグナルは、コラーゲン産生細胞が格子形態を獲得するように誘導することで、格子状コラーゲン線維の構築に寄与していると考えられる。

## 序論

先の第二章では、コラーゲン線維構造の観点から、メキシコサラマンダーの皮膚再生が実は不完全なものであることを明らかにし、神経作用によって元通りの格子状のコラーゲン線維を再構築できることを示した。この第三章では、皮膚再生における神経の作用機序を探った。

これまでの研究により、四肢再生の開始には神経から放出される FGF (fibroblast growth factor) が関与することが示唆されていた (Makanae et al., 2014; Mullen et al., 1996; Satoh et al., 2011, 2016)。さらに、近年の所属研究室の研究で、四肢だけでなく、尾、歯、外鰓など複数の器官において、FGF が再生誘導効果を持つことが明らかとなった (Makanae et al., 2016b, 2020; Saito et al., 2019)。これらの研究では、各器官の損傷部に FGF2 および FGF8 を投与すると、再生芽と呼ばれる未分化細胞の集合体が形成されることを示した。また、そこに BMP2 または BMP7 を追加投与すると、再生芽の伸長と器官のパターン形成が誘導されることも示した。本研究では特に、器官再生過程の初期にあたる再生芽形成に関与する FGF に着目し、皮膚再生効果を検証した。

また、先の第一章では、コラーゲン産生細胞自体が格子形態をとることで、格子状のコラーゲン線維を編んでいることを明らかにした。そこで第三章では、真皮の修復に関わるコラーゲン産生細胞の形態と由来についても調査を行った。マウスやカエルの皮膚修復に関する先行研究から、真皮損傷部の線維芽細胞の多くが皮下組織から遊走してく

ることが示されていた (Correa-Gallegos et al., 2019; Otsuka-Yamaguchi et al., 2017)。そのため、メキシコサラマンダーにおいても同様に、皮下組織由来の細胞が真皮の修復に寄与している可能性が高い。また第二章では、神経シグナルを受けた損傷真皮において、コラーゲン産生細胞が格子形態をとることが示されていた (図 2-5B,C)。これらの状態を説明するために、神経シグナルの効果として以下の二つの仮説を考えた。

**【効果 1】** 真皮由来の格子状コラーゲン産生細胞を損傷部へ遊走させる。

**【効果 2】** 皮下組織由来のコラーゲン産生細胞を格子状に変化させる。

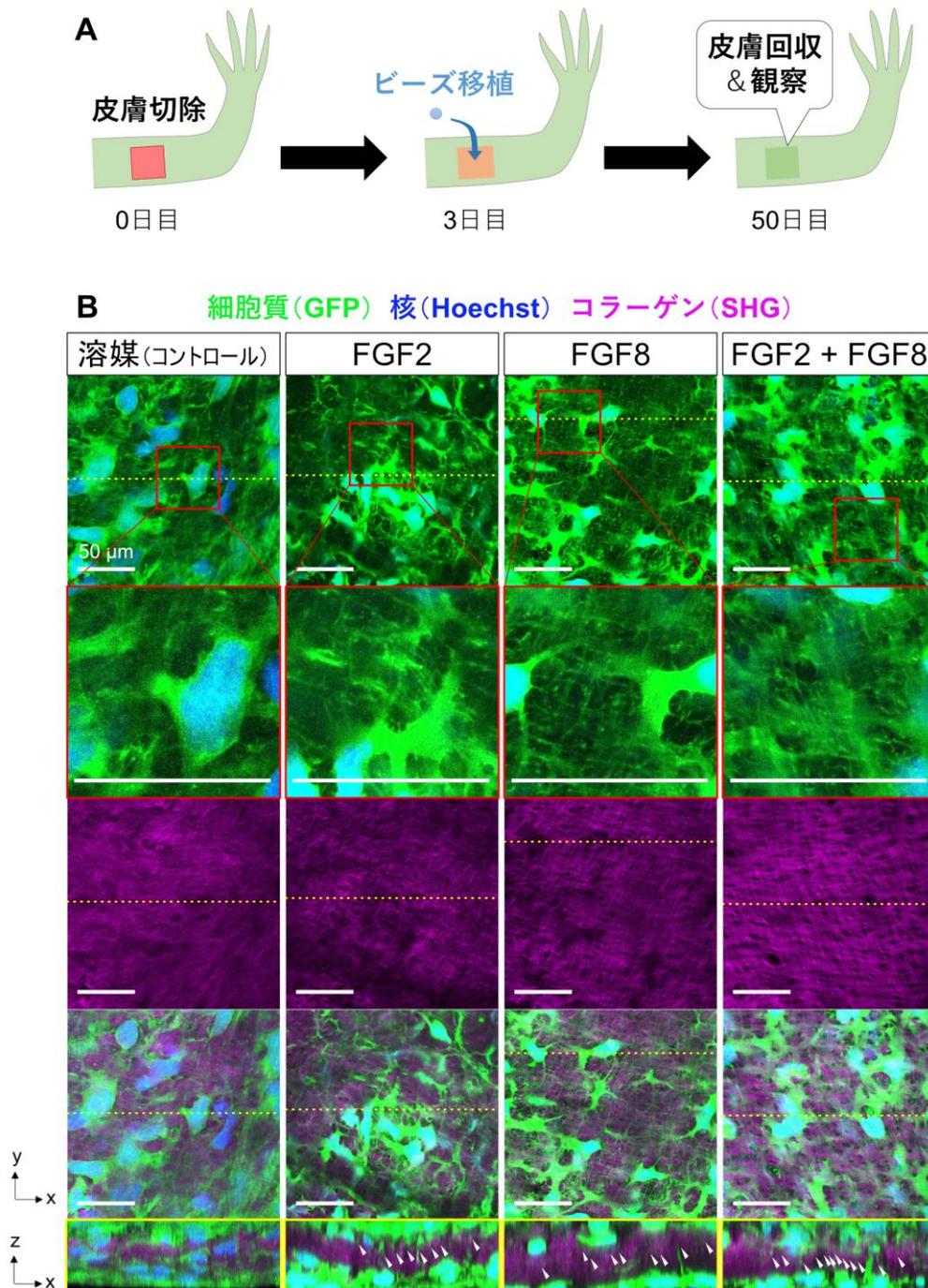
本研究では、上記仮説の検証実験を通じて、メキシコサラマンダーの皮膚再生における神経シグナルの作用機序の解明を試みた。

## 結果

### FGF による皮膚再生効果の検証

メキシコサラマンダーの器官再生に関する先行研究によって神経由来の再生因子として同定された FGF2 と FGF8 の二つの FGF ファミリータンパク質について、皮膚損傷後の真皮コラーゲン線維に対する再生誘導効果を検証した (図 3-1)。皮膚損傷の作製手順は第二章と同様である。はじめに、手術用のハサミとピンセットを用いて四肢背側の皮膚に 2 mm 角の傷を作った。この際、筋層には傷を付けずに、表皮と真皮の全層を切除した。損傷後 1 日以内に、傷口は表皮 (傷上皮) で覆われる。皮膚損傷の 3 日後に、FGF タンパク質を染み込ませたゼラチンビーズを傷上皮の下に移植した。このとき、ゼラチンビーズに染み込ませたタンパク質は、徐々に周囲の環境に放出される (Kashimoto et al., 2023b)。今回、FGF2 と FGF8 の皮膚再生効果を検証するために、①溶媒 (0.1%BSA/PBS)、②FGF2 タンパク質溶液 (1 mg/ml)、③FGF8 タンパク質溶液 (1 mg/ml)、④FGF2 タンパク質と FGF8 タンパク質の混合溶液 (各 0.5 mg/ml) の 4 種類の液体を染み込ませたゼラチンビーズをそれぞれ用意した。損傷後 50 日目に皮膚を回収し、PFA で固定した後、二光子顕微鏡を用いて真皮のコラーゲン線維構造と細胞形態を観察した。本研究では、GFP トランスジェニック個体を用いることで細胞形態を可視化し、SHG イメージングにより真皮のコラーゲン線維構造を捉えた (図 3-1B)。コントロールの溶媒ビーズ①を移植した場合では、コラーゲン線維は無秩序な線維配向を示し、

周囲の細胞の仮足も損傷前のような格子状の形態をとっていなかった。一方、FGF ビーズ②-④を移植した場合には、コラーゲン線維が格子構造を取り戻しており、周囲の細胞も線維に沿って格子状の仮足を張り巡らせていることが確認できた。また、それらの細胞は柱状の構造も持っており、損傷前の真皮緻密層の上層部に存在するコラーゲン産生細胞と類似の形態をとることが分かった。すなわち、皮膚損傷部に FGF シグナルを与えることで、正常真皮中のコラーゲン産生細胞と同質の細胞が誘導され、その結果、格子状のコラーゲン線維が再構築されたのだと考えられる。



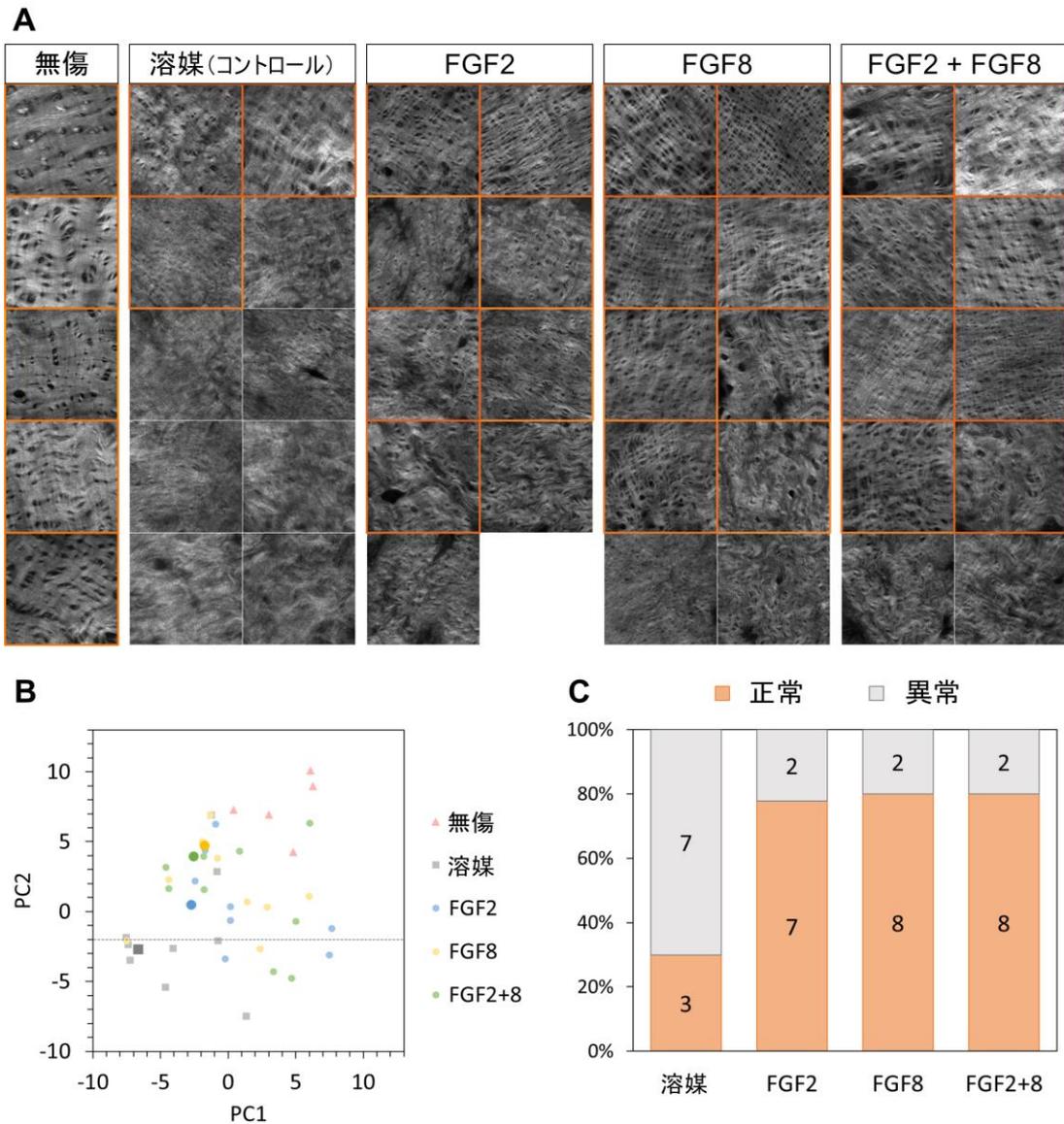
### 図 3-1. FGF タンパク質投与による皮膚再生効果の検証

(A) 実験の流れ。全細胞中で GFP を発現するトランスジェニック個体を用いた。

(B) 二光子顕微鏡下で、皮膚損傷後 50 日目の真皮のコラーゲン線維構造 (SHG, マゼンタ) と細胞形態 (GFP, 緑) を観察した。細胞核は Hoechst で染色した (青)。XY 画像はいずれも Z-stack 画像 4 スライス分の最大輝度合成画像である。XY 画像中の黄点線は XZ 画像の位置を示す。XZ 画像中の矢頭は柱構造を示す。

さらに、FGF の皮膚再生効果を定量的に評価するために、SHG イメージングで取得したコラーゲン線維画像に対して、ディープラーニングを介した主成分解析を行った (図 3-2)。本解析は、第二章に引き続き、基礎生物学研究所の近藤洋平助教の協力の下で実施した。解析の対象とした SHG 画像は、損傷前の無傷真皮 (n=5)、溶媒ビーズを移植した皮膚損傷後 50 日目真皮 (n=10)、FGF2 ビーズを移植した皮膚損傷後 50 日目真皮 (n=9)、FGF8 ビーズを移植した皮膚損傷後 50 日目真皮 (n=10)、FGF2 と FGF8 の混合ビーズを移植した皮膚損傷後 50 日目真皮 (n=10) の五条件、合計 44 画像である (図 3-2A)。Z-stack 撮影した連続 4 スライスを最大輝度合成した画像を解析に用いた。解析の方法は第二章と同様で、ImageNet のデータセットで学習を行ったニューラルネットワーク ResNet50 (He et al., 2016) を用いて、SHG 画像から特徴量を抽出し、得られた特徴量に対して主成分解析を行った。その結果、無傷サンプルは PC2 値の高い領域でクラスターを形成する一方で、溶媒ビーズを移植した皮膚損傷サンプルの PC2 値は全体に低い値となった (図 3-2B)。この結果は、第二章で解析を行ったビーズ移植無し皮膚損傷サンプルの結果と同様である (図 2-8D)。FGF ビーズを移植した皮膚損傷サンプルは、無傷サンプルと溶媒ビーズを移植した皮膚損傷サンプルとの中間領域に分布した (図 3-2B)。これも、第二章で示した神経存在下の皮膚損傷サンプルの結果と類似している (図 2-8D)。そこで第二章と同じく、PC2 値を指標に、-2 より値が大きいものは無傷の線維構造と類似の「正常線維構造」、-2 以下のものは「異常線維構造」と判

定することとした（図 3-2C）。判定の結果，溶媒ビーズを移植した皮膚損傷サンプルでは，正常線維構造と判定されたものは 30%（3/10 サンプル）にとどまり，過半数の 70%（7/10 サンプル）は異常線維構造と判定された。反対に，FGF タンパク質を与えた皮膚損傷サンプルでは，FGF2 単独投与，FGF8 単独投与，FGF2 と FGF8 の混合投与のいずれの場合も，約 80%（FGF2 単独投与の 7/9，FGF8 単独投与の 8/10，FGF2 と FGF8 の混合投与の 8/10）が正常線維構造と判定された。これらの結果から，FGF タンパク質を与えると，神経切断面を配向させた場合と同様に，皮膚損傷部の真皮コラーゲン線維構造が損傷前の正常な状態に近づくことが示された。



### 図 3-2. FGF による皮膚再生効果の定量解析

コラーゲン線維画像に対して、ディープラーニングを介した主成分解析を行った。

**(A)** Z-stack 撮影した連続 4 スライス of SHG 画像を最大輝度合成した画像（無傷,  $n = 5$ ; 溶媒,  $n = 10$ ; FGF2,  $n = 9$ ; FGF8,  $n = 10$ ; FGF2 + FGF8,  $n = 10$ ）。

**(B)** A の画像に対する主成分解析の結果。PC は principal component の略。濃色の大マーカーは、図 3-1B の SHG 画像を示す。

**(C)** B における PC2 値が -2 以上のものを、無傷と類似の正常線維構造と定義し、コラーゲン線維画像（SHG 画像）を正常と異常に分類した。A の画像のうち、正常と判定された画像は朱色で囲った。

## 皮膚再生における皮下組織由来細胞の寄与

マウスやカエルの先行研究から、真皮の修復に皮下組織由来の線維芽細胞が関与していることが示されていたことを受け (Correa-Gallegos et al., 2019; Otsuka-Yamaguchi et al., 2017), 本研究ではメキシコサラマンダーの皮膚修復における皮下組織由来細胞の寄与を調べた (図 3-3)。皮膚組織由来の細胞と皮下組織由来の細胞を識別するために、野生型個体に GFP トランスジェニック個体の皮膚を移植し、その上で 2 mm 角の傷を作った (図 3-3A)。この方法で、通常 of 皮膚損傷と、損傷部に神経切断面を配向させた場合の比較を行った。皮膚移植を行うと、約 1 ヶ月で免疫拒絶が起こり、移植細胞が死滅してしまうため、術後 20 日目でサンプルを回収し、観察を行った。損傷真皮領域を同定するために、Picrosirius red 染色でコラーゲンを可視化した (図 3-3B-E)。Picrosirius red で染色した組織を偏光下で観察すると、I 型コラーゲンを赤色、III 型コラーゲンを緑色で検出することができる (図 3-3D, E)。そして、隣接切片に対して GFP 抗体を用いた免疫染色と Hoechst による細胞核染色を行い (図 3-3F, G)、損傷真皮領域における皮膚組織由来の GFP 陽性細胞数と全細胞数を計測した (図 3-3H)。その結果、神経の有無に関わらず、約半数が皮膚組織由来の細胞であり、もう半数は皮下組織由来であることが分かった (各 n = 5)。神経有り無し条件で *t* 検定を行ったところ、*p* 値は 0.22 となり、この二条件に有意差は見られなかった。すなわち、神経由来のシグナルに、真皮コラーゲン産生細胞の遊走を促進する働きはないことが示唆された。

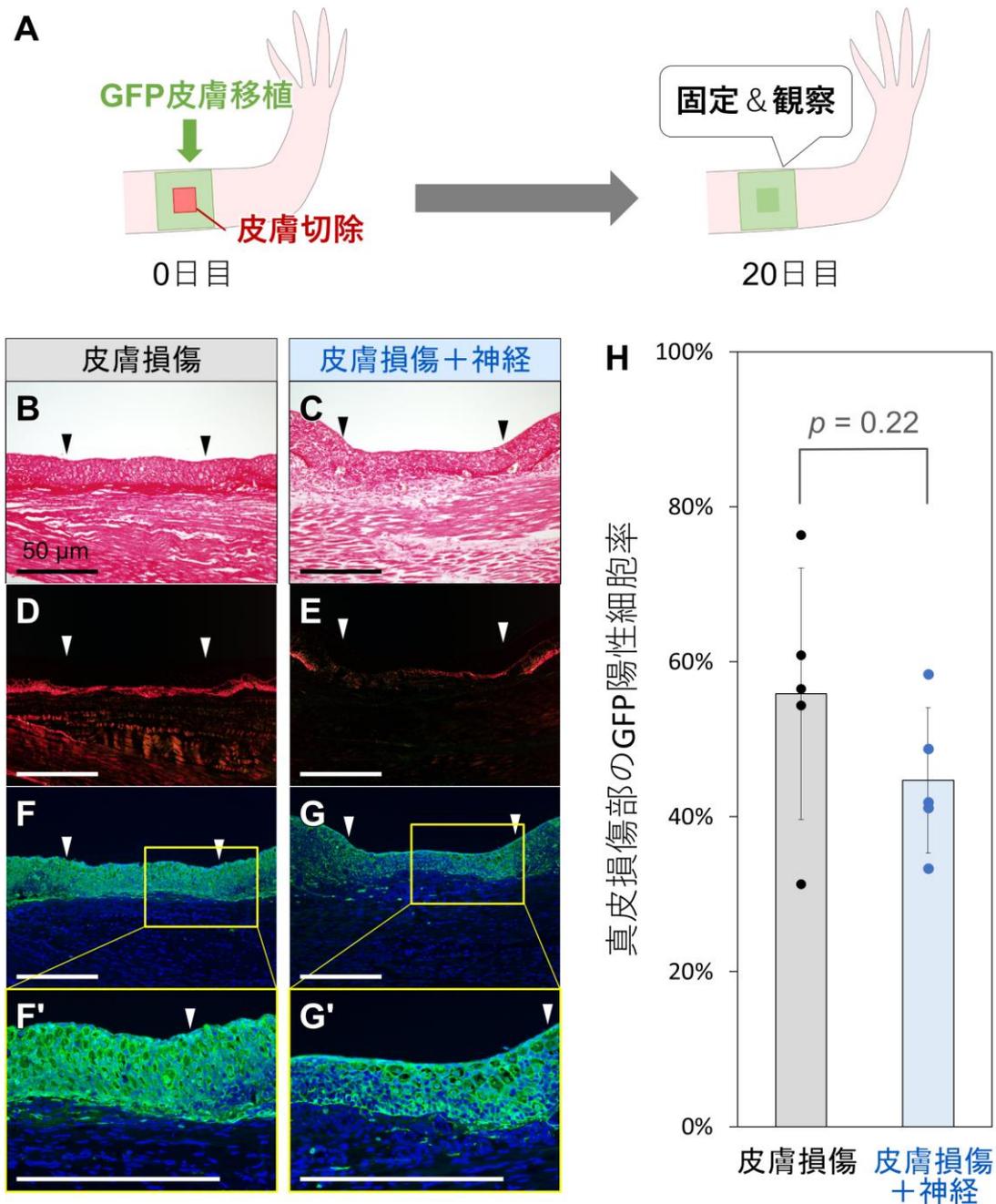


図 3-3. 真皮損傷部における皮下組織由来細胞の寄与

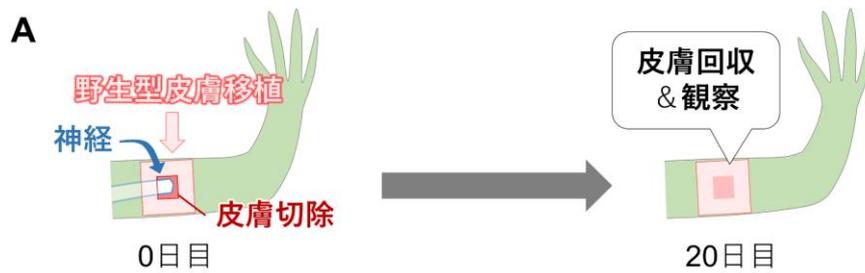
(A) 実験の流れ。

(B-E) 術後 20 日目の組織切片に Picrosirius red 染色を施し、非偏光下 (B, C) と偏光下 (D, E) で観察した。矢頭は傷境界を示す。

(F, G) B-E の隣接切片で、GFP の免疫染色 (緑) と細胞核の Hoechst 染色 (青) を行った。F' と G' はそれぞれ F と G の拡大図。

(H) 術後 20 日目の真皮損傷部における GFP 陽性細胞 (皮膚組織由来細胞) の割合。

次に、「神経シグナルが、皮下組織由来のコラーゲン産生細胞を格子状に変化させる」という仮説を検証した。野生型個体の皮膚を GFP トランスジェニック個体に移植し、その上で皮膚損傷を作ることで、真皮損傷部に遊走してくる皮下組織由来細胞（GFP 陽性）の形態を観察した。皮膚移植と同時に損傷の作製と神経切断面の配向を行い、術後 20 日目に皮膚を回収・固定し、二光子顕微鏡下で観察した（図 3-4A）。第二章で観察した皮膚損傷後 50 日目の真皮コラーゲン線維（図 2-5C）と比較すると不明瞭であるが、術後 20 日目の真皮においても格子状のコラーゲン線維構造を作りつつある様子が SHG 画像から確認できた（図 3-4B）。さらに、GFP 陽性の皮下組織由来細胞が縦横に格子状の仮足を伸ばしている様子も捉えることができた。つまり、「神経シグナルが、皮下組織由来のコラーゲン産生細胞を格子状に変化させる」という仮説が正しいことが示された。



**B** 皮下組織由来の細胞(GFP) 核(Hoechst) コラーゲン(SHG)

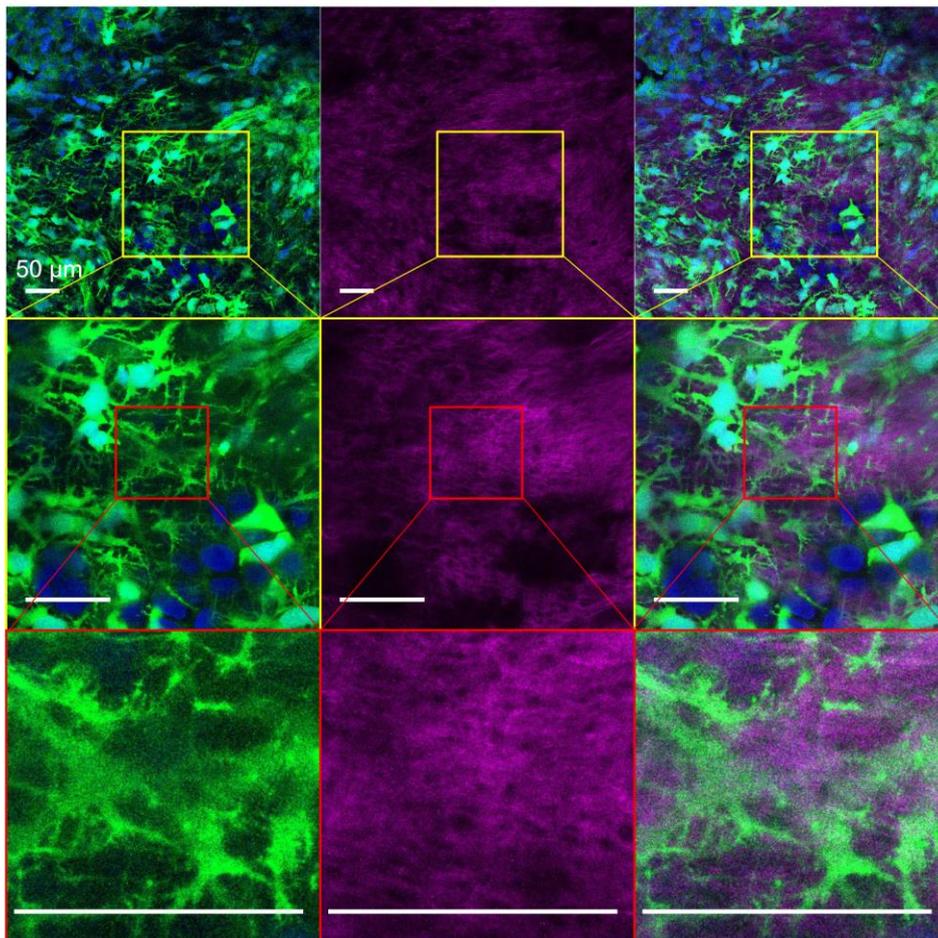


図 3-4. 神経存在下の真皮損傷部における皮下組織由来細胞の形態

(A) 実験の流れ。

(B) 術後 20 日目の真皮損傷部を二光子顕微鏡で撮影した。皮下組織由来細胞の形態を GFP (緑) で、細胞核を Hoechst (青) で、コラーゲン線維を SHG 光 (マゼンタ) で可視化した。上段は 25 倍対物レンズで撮影した 1.6  $\mu\text{m}$  幅の Z-stack 画像 3 スライス分の最大輝度合成画像。中段と下段は、63 倍対物レンズで撮影した 0.8  $\mu\text{m}$  幅の Z-stack 画像 4 スライス分の最大輝度合成画像。

さらに、神経の代わりに FGF タンパク質を投与した場合においても、真皮損傷部に遊走する皮下組織由来細胞の形態を確かめた。実験の手順は図 3-5A に示す通りである。

野生型個体の皮膚を GFP トランスジェニック個体に移植し、同時に皮膚損傷を作製した。その3日後に、傷上皮の下にゼラチンビーズを移植した。移植したゼラチンビーズは、①溶媒 (0.1%BSA/PBS)、②FGF2 タンパク質溶液 (1 mg/ml)、③FGF8 タンパク質溶液 (1 mg/ml)、④FGF2 タンパク質と FGF8 タンパク質の混合溶液 (各 0.5 mg/ml) の4種類の液体をそれぞれ染み込ませたものである。皮膚損傷後 20 日目において、皮膚サンプルを PFA 固定し、二光子顕微鏡下で観察した。条件①の、FGF タンパク質を含まないコントロールビーズを移植した場合は、真皮損傷部における皮下組織由来の GFP 陽性細胞は格子形態をとらず、無秩序に仮足を広げていた (図 3-5B)。反対に、条件②-④の、FGF タンパク質を含むビーズを移植した場合には、神経を配向させた場合と同様に、皮下組織由来細胞が格子状の細かい仮足を伸ばしていた。そして、その仮足に沿うようにコラーゲン線維が格子構造をとっている様子を確認できた。これらの結果から、真皮損傷部に遊走してくる皮下組織由来のコラーゲン産生細胞は本来格子構造をとらないが、FGF シグナルを受けると格子形態を獲得することが示唆された。



**B** 皮下組織由来の細胞(GFP) 核(Hoechst) コラーゲン(SHG)

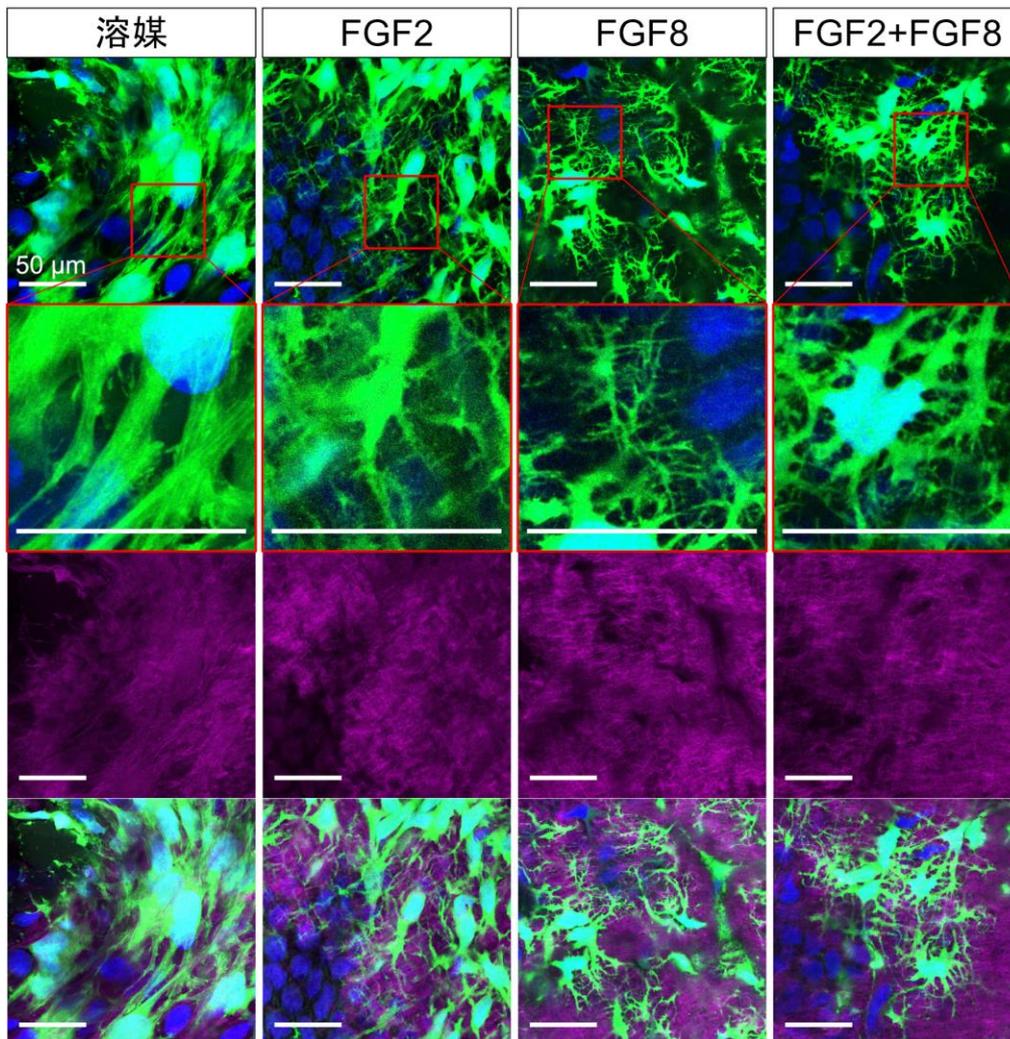


図 3-5. FGF 存在下の真皮損傷部における皮下組織由来細胞の形態

(A) 実験の流れ。

(B) 皮膚損傷後 20 日目の真皮損傷部を二光子顕微鏡で撮影した。皮下組織由来細胞の形態を GFP (緑) で、細胞核を Hoechst (青) で、コラーゲン線維を SHG 光 (マゼンタ) で可視化した。いずれも Z-stack 画像 4 スライス分の最大輝度合成画像。

## 考察

この第三章では、第二章から引き続き、コラーゲン線維構造とコラーゲン産生細胞の形態に着目しながら、神経が皮膚再生を誘導する仕組みを調べた。

はじめに、FGF シグナルの皮膚再生効果の検証を行った。神経は、有尾両生類の器官再生研究の歴史の中で、再生開始を支配する存在として注目されてきた (Endo et al., 2004; Maden and Holder, 1984; Makanae et al., 2016b, 2020; Singer, 1952)。本研究で注目した FGF は、神経由来の四肢再生因子として研究されてきた分泌因子である (Makanae et al., 2014; Mullen et al., 1996; Satoh et al., 2011, 2016)。また、近年の所属研究室の研究により、四肢だけでなく、尾、歯、外鰓など複数の器官においても、FGF が再生誘導効果を持つことが明らかとなっている (Makanae et al., 2016b, 2020; Saito et al., 2019)。具体的には、FGF2 と FGF8 のタンパク質を投与することで、再生芽が形成されることが分かっていた。そこで、この第三章は FGF2 と FGF8 の皮膚再生効果の検証からはじめた。その結果、神経切断面を皮膚損傷部に配向させた場合と同様に、FGF タンパク質の投与によって、格子状のコラーゲン線維を再構築できることが明らかとなった (図 3-1, 図 3-2)。FGF2 タンパク質と FGF8 タンパク質をそれぞれ単独投与した場合も混合投与した場合も、同等の再生効果が見られた。また、このとき周囲の細胞はコラーゲン線維に沿って格子状の仮足を伸ばしていた。これらの結果から、神経切断面から放出される FGF タンパク質が、格子状のコラーゲン産生細胞を誘導することで、コラーゲン線維の格子

構造が再構築されることが示唆された。

次に、真皮の修復に関わるコラーゲン産生細胞の形態と由来について調査を行った。マウスやカエルの皮膚修復に関する先行研究は、真皮損傷部の線維芽細胞の多くが皮下組織から遊走してくることを示していた (Correa-Gallegos et al., 2019; Otsuka-Yamaguchi et al., 2017)。そこで、メキシコサラマンダーの真皮損傷部において、皮下組織からの細胞遊走を調べたところ、約半数の細胞が皮下組織由来であることが分かった (図 3-3)。すなわち、皮下組織から真皮損傷部に、本来の真皮コラーゲン産生細胞とは異なる性質の細胞が流入するために、本来の格子構造とは異なる無秩序なコラーゲン線維が作られてしまうのだと考えられる。神経由来の FGF シグナルによって、格子状のコラーゲン産生細胞が誘導される仕組みとして、以下の二つが考えられる。

**【仮説 1】** 真皮由来の格子状コラーゲン産生細胞が損傷部へ遊走する。

**【仮説 2】** 皮下組織由来のコラーゲン産生細胞が格子状に変化する。

実験の結果、皮膚損傷部に神経を与えた場合と与えなかった場合とで、真皮損傷部に遊走される皮下組織由来細胞比率は変わらないことが分かり、仮説 1 は否定された (図 3-3)。そこで次に、神経または FGF タンパク質の存在下の真皮損傷部において皮下組織由来細胞の形態を確認したところ、確かに格子状の仮足を伸ばしていることが明示され、仮説 2 が正しいことが証明された (図 3-4, 図 3-5)。これにより、通常の皮膚損傷時には無秩序なコラーゲン線維を産生することしかできない皮下組織由来のコラーゲン産

生細胞が、神経由来の FGF シグナルを受けて真皮コラーゲン産生細胞様の格子形態を獲得することが示唆された (図 3-6)。

このように、第三章では神経が皮膚再生を誘導する機構の一端を明らかにした。今後の研究では、コラーゲン産生細胞が格子形態を獲得するための詳しい分子機構の解明が望まれる。

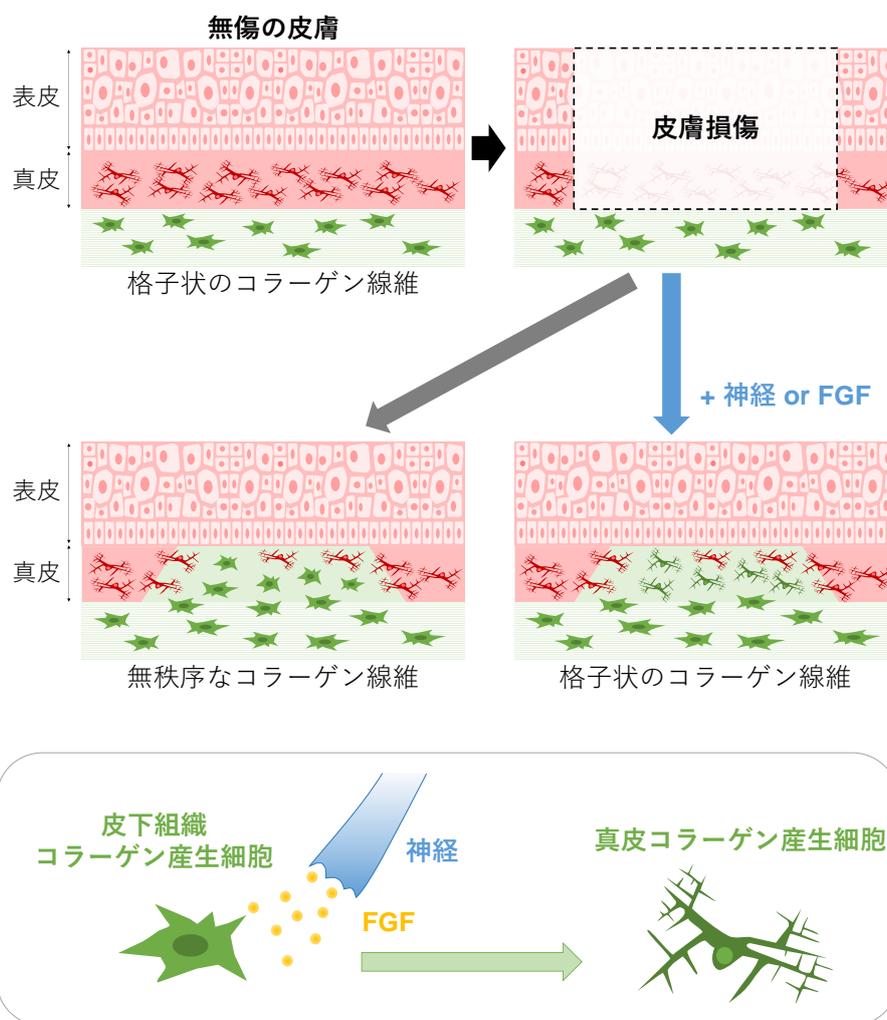


図 3-6. 神経由来の FGF が真皮損傷部のコラーゲン線維構造を再生する仕組み

## 材料と実験方法

### 実験動物

本研究では、メキシコサラマンダー (*Ambystoma mexicanum*) を用いて実験を行った。野生型個体は広島大学両生類研究センターまたは浜松生物教材から、GFP トランスジェニック個体 (*CAG::GFP*) は *Ambystoma Genetic Stock Center* から入手した。飼育水温は 22°C前後に保った。実験には、鼻から尾までの長さが 10-16 cm の個体を使用した。動物の飼育管理および実験は、岡山大学動物実験委員会のガイドラインおよび動物飼育マニュアルに従って実施した。また、メキシコサラマンダーは外来生物に該当するため、ワシントン条約および名古屋議定書に従って管理した。全ての動物実験は、事前に MS222 (Sigma) の 5%溶液を用いて動物に麻酔をかけてから実施した。

### 皮膚損傷の作製およびゼラチンビーズの移植

本研究で登場する皮膚損傷は全て、2 mm 角の皮膚切除を示す。手術用のハサミとピンセットを用いて、皮下の筋層には傷を付けずに、四肢背側の表皮と真皮の全層を切除した。皮膚損傷を作製してから 3 日後において、損傷部の隣接部にハサミで切り込みを入れ、そこからピンセットを差し込むことで傷上皮の下に空間を作り、ゼラチンビーズを移植した (図 3-1, 図 3-2, 図 3-5)。過去の文献に記載されている通りの手順でゼラチンビーズを作製し (Kashimoto et al., 2023b), 300-500  $\mu\text{m}$  のサイズのビーズを選んで使用

した。移植用のビーズは、一度乾燥させてから、各溶液を染み込ませた。コントロールビーズには、溶媒である 0.1% BSA (TaKaRa, Cat# SD0010) を染み込ませ、FGF2 ビーズには 1 mg/ml の FGF2 タンパク質 (R&D, Cat# 3139-FB) を、FGF8 ビーズには 1 mg/ml の FGF8 タンパク質 (R&D, Cat# 423-F8) を、FGF2 + FGF8 の混合ビーズには各 0.5 mg/ml の FGF2 タンパク質と FGF8 タンパク質を含んだ 0.1% BSA 溶液を染み込ませた。

#### 皮膚損傷の作製および損傷部への神経の配向

前述の通り 2 mm 角の皮膚損傷を作製し、同時に四肢の中心付近を通る神経束を途中で切断し、皮下を通して神経切断面を皮膚損傷部に配向させた。

#### 皮膚移植

約 5 mm 角の皮膚片を野生型または GFP トランスジェニック個体の四肢背側から剥がし取り、GFP トランスジェニックまたは野生型個体の同じ位置に移植した (図 3-3, 図 3-4, 図 3-5)。2 mm 角の皮膚損傷の作製は、皮膚移植と同時に行った。皮膚移植後は、約 5 時間動物を氷上に静置し、皮膚の接着を待った。損傷部へ神経を配向させる手術は皮膚移植と同時に行い (図 3-3, 図 3-4)、ビーズ移植は皮膚移植および皮膚損傷作製の 3 日後に行った (図 3-5)。皮膚移植から約 1 ヶ月で免疫拒絶が起こり、移植細胞が死滅するため、サンプル回収はそれより前の皮膚移植後 20 日目に行った。

## 二光子顕微鏡を用いた観察

基礎生物学研究所の倒立型二光子顕微鏡 TCS SP8 MP (Leica) を用いて、固定皮膚サンプルにおけるコラーゲン線維構造 (SHG)、細胞形態 (GFP)、細胞核 (Hoechst) を観察した (図 3-1, 図 3-2, 図 3-4, 図 3-5)。回収した皮膚サンプルは、4% PFA/PBS で固定した。このとき、重石を乗せて平らにした状態で 5 分間静置してから、1 時間振とう固定することで、皮膚サンプルの歪みを最小限にとどめた。細胞核は、皮膚サンプルを 4°C の 1 µg/ml Hoechst 33342 Solution/TBST に一晩浸すことで染色した。皮膚サンプルは TBST で洗浄した後、スライドガラス上に真皮深層側を観察面に向けた状態で置き、Fluoromount (DBS) を用いて封入した。顕微鏡観察では、基本的に倍率 63 倍の水浸対物レンズ (Leica, HC PL APO 63×/1,20 W CORR CS2) を用い、Z-step size は 0.8 µm に設定し、1024×1024 ピクセルの画像を取得した。図 3-4B の上段のみ、倍率 25 倍の水浸対物レンズ (Leica, HCX IRAPO L 25×/0.95 W 0.17) を用いて、Z-step size 1.6 µm で撮影を行った。いずれの場合も、InSight DeepSee femtosecond infra-red laser (Spectra-Physics) を用いて波長 900 nm の二光子レーザーを照射し、435-485 nm のバンドパスフィルタを介して波長 450 nm の SHG シグナルを検出し、500-550 nm のバンドパスフィルタを介して GFP シグナルを検出した。Hoechst シグナルについては、740 nm の照射光で励起し、435-485 nm のバンドパスフィルタを介して蛍光を検出した。XZ 画像の構築や Z-stack 画像の合成などの画像処理には、画像解析ソフト Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いた。

## ディープラーニングを介したコラーゲン線維画像の主成分解析

SHG 画像を対象にディープラーニングを介した主成分解析を行うことで、各条件のコラーゲン線維画像を正常と異常に分類した (図 3-2)。前述の通りに Z-stack 撮影した連続 4 スライスの SHG 画像を最大輝度合成し、 $512 \times 512$  ピクセルのサイズに切り出して、解析に使用した (図 3-2A)。損傷前の無傷真皮 ( $n=5$ )、溶媒ビーズを移植した皮膚損傷後 50 日目真皮 ( $n=10$ )、FGF2 ビーズを移植した皮膚損傷後 50 日目真皮 ( $n=9$ )、FGF8 ビーズを移植した皮膚損傷後 50 日目真皮 ( $n=10$ )、FGF2 と FGF8 の混合ビーズを移植した皮膚損傷後 50 日目真皮 ( $n=10$ ) の五条件で、合計 44 枚の SHG 画像を用いて解析を行った。事前に ImageNet のデータセットで学習を行ったニューラルネットワーク ResNet50 (ResNet50\_Weights.IMAGENET1K\_V2 from torchvision library, version 0.14.0) (He et al., 2016) に対して、これら 44 枚の画像データを適用し、特徴抽出を行った。2048 次元の penultimate layer の神経活性値を算出した。その後、抽出された特徴量に対して線形主成分解析を行った (図 3-2B)。PC2 値を指標に、-2 より値が大きいものは無傷の線維構造と類似の「正常線維構造」、-2 以下のものは「異常線維構造」と定義し、各条件のサンプルを分類した (図 3-2C)。

## Picrosirius red 染色と免疫染色

皮膚移植および皮膚損傷作製を行ってから 20 日後の四肢サンプルを回収し、室温の

4% PFA/PBS 溶液中で一晩振とうさせた (図 3-3)。その後、室温の 10% EDTA (pH 8.0) で一晩脱灰処理を行い、室温の 30%スクロース/PBS で 6 時間かけて置換し、O.C.T. compound (サクラファインテック) で包埋し-80°Cで凍結した。CM1850 cryostat (Leica) を用いて、凍結ブロックから厚さ 12  $\mu\text{m}$  の切片を切り出し、スライドガラスに貼り付けた。

Picrosirius red 染色用の切片は TBST に 5 分間×2 回浸して洗浄した後、Picrosirius Red Stain Kit (Polysciences) を用いて、マニュアル通りに染色した (図 3-3B-E)。具体的には、溶液 A (リンモリブデン酸溶液) に 2 分間浸し、水洗し、溶液 B (Picrosirius red 染色液) に 60 分間浸し、溶液 C (0.1 N 塩酸) に 2 分間浸し、70%エタノールに 45 秒間浸した。染色した切片は、100%エタノールに 5 分間×2 回、G-NOX に 10 分間×2 回浸すことで脱水し、ソフトマウント (富士フイルム和光純薬) で封入した。そして、皮膚損傷領域を、光学顕微鏡 BX61 (Olympus) とカラーカメラ DP72 (Olympus) を用いて撮影した。Picrosirius red 染色を施した組織は、非偏光下においてコラーゲンが明るい赤色を発する。さらに、偏光下では、I 型コラーゲン (赤色) と III 型コラーゲン (緑色) を識別することができる。

Picrosirius red 染色用切片の隣接切片を用いて、GFP の蛍光免疫染色と核染色を行った (図 3-3F,G)。切片は TBST に 5 分間×2 回浸して洗浄した後、室温で 30 分間ブロッキングバッファー (TBST に 0.5% blocking reagent (Roche) を溶かした溶液) に浸し、ブ

ブロッキングバッファーで 500 倍希釈した 1 次抗体の抗 GFP 抗体 (ウサギ由来, MBL, Cat# 598) を用いて 4°C で一晩処理した。その後, TBST で室温で 5 分間×3 回洗浄し, 室温で 15 分間ブロッキングバッファーに浸してから, ブロッキングバッファーで 500 倍希釈した 2 次抗体の Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ抗体 (Thermo Fisher, Cat# A32731) を用いて室温で 2 時間処理した。さらに, 125 ng/ml Hoechst 33342 Solution (ナカライテスク) /TBST に室温で 5 分間浸すことで核を染色し, TBST で室温で 5 分間×4 回洗浄してから Fluoromount で封入した。封入したサンプルは, 光学顕微鏡 BX61 とカラーカメラ DP72 を用いて撮影した。GFP シグナルと Hoechst シグナルの重ね合わせは, 画像解析ソフト Fiji を用いて行った。

さらに, 真皮損傷領域における GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞の数を計測し, GFP 陽性 (= 皮膚組織由来) 細胞の率を算出した (図 3-3H)。1 サンプルあたり 3 視野で GFP 陽性細胞率を計算し, その平均値をプロットした。通常の皮膚損傷と神経有りの皮膚損傷の二条件でそれぞれ 5 サンプルずつ計測を行い, 平均値±標準偏差を棒グラフで表した。二条件間で両側 Student's *t*-test を行い, *p* 値を求めた。

## 総括

本研究は、メキシコサラマンダー (*Ambystoma mexicanum*) を用いて、これまで脊椎動物で不明であった真皮コラーゲン産生細胞の形態的特徴を同定し、さらに皮膚再生を誘導するメカニズムを明らかにしたものである。

皮膚はI型コラーゲンを主体とする真皮を有し、ハリや強靭性など皮膚特性の多くはこのコラーゲンによって支えられている。皮膚の基本的な組織構成や特性は哺乳類から両生類、魚類に至るまで脊椎動物全体で保存されており、I型コラーゲンを豊富に含有する点も共通である (Felseburgh et al., 2009; Fisher et al., 2008; Fligiel et al., 2003; Lévesque et al., 2010; Morris et al., 2018; Seifert et al., 2012; Sherman et al., 2015; Ushiki, 2002)。

また、ヒト、ブタ、ゼブラフィッシュにおいて、真皮下層部（網状層または緻密層）のコラーゲン線維が格子状の構造をとっていることも明らかになっている (Meyer et al., 1982; Morris et al., 2018; Ueda et al., 2019)。しかしながら、どのような細胞がどのようにして幾何学的なコラーゲン線維構造を編み上げているのかという点は、未だ不明であった。コラーゲンなどの結合組織を産生する細胞は一般に「線維芽細胞」と呼ばれるが、その定義は曖昧である。真皮線維芽細胞の中には様々な亜集団が存在することが報告されているものの、コラーゲン構築の実働を担う細胞集団の同定には至っていない (Driskell and Watt, 2015; Driskell et al., 2013; Fries et al., 1994; Philippeos et al., 2018; Rinkevich et al., 2015; Rognoni and Watt, 2018)。本研究の第一章では、メキシコサラマンダーの皮膚の透明性を活かし、真皮でコラーゲンを産生する線維芽細胞の形態的特徴を明らかにし

た。具体的には、メキシコサラマンダーの真皮において新生 I 型コラーゲンを蛍光標識する技術を開発し、一細胞レベルで真皮コラーゲンの産生過程を観察した。その結果、コラーゲン産生細胞は自身の細胞仮足を格子状に発達させ、その仮足に沿って格子状のコラーゲン線維を編み上げていることが分かった。さらに、コラーゲン産生細胞には、格子と柱を作る細胞と、格子のみを作る細胞の二種類が存在することも明らかとなった。これらの細胞が協調的に働いてコラーゲン線維の格子構造を密に編み上げることで、皮膚の強度やしなやかさが保たれていると考えられる。本研究は、真皮のコラーゲン構築における細胞形態と線維構造の一致性を明らかにし、皮膚科学にとって新しい知見をもたらした。

真皮のコラーゲン構築機構を明らかにした成果を活かし、つづく第二章では、皮膚再生研究へと展開させた。メキシコサラマンダーやイモリなどの有尾両生類は四肢や尾、心臓、脳など様々な器官を再生することができる (Joven et al., 2019)。そのため、皮膚も当然再生できるものとして扱われてきた。哺乳類とは異なり、有尾両生類は分泌腺などの皮膚付属器を再形成できることから、完全に皮膚を再生できると考えられていた (Lévesque et al., 2010; Seifert et al., 2012; Yokoyama et al., 2011)。しかし、本研究でメキシコサラマンダーのコラーゲン線維構造を解析したところ、皮膚修復後の組織では元の格子構造が回復せず、代わりに無秩序な波状の線維が傷領域を埋めていることが判明した。また、傷領域ではコラーゲン産生細胞自体も格子形態をとっていないことが分かった。

これらの観察結果は、メキシコサラマンダーの皮膚再生が不完全であることを示しており、従来の定説を覆す発見である。

メキシコサラマンダーの皮膚が再生しないという発見を受け、メキシコサラマンダーの皮膚完全再生を達成するための方法を探った。メキシコサラマンダーもヒトと同じく皮膚を再生できないことは、裏を返せば、メキシコサラマンダーの皮膚を再生できれば、ヒトの皮膚再生にも応用できる可能性があるということである。上述の通り、メキシコサラマンダーは四肢を失っても再び四肢を作り直すことができる。そこで、再生肢上の皮膚のコラーゲン線維構造を解析したところ、四肢再生前と同様の格子構造をとっていることが分かった。これは、皮膚単独の損傷では皮膚を再生できないが、四肢全体が損傷を受けた場合には皮膚が完全に再生されるということを意味する。四肢切断と皮膚単独損傷の違いとして、私は「神経」に着目した。過去の四肢再生研究から、神経由来のシグナルが四肢再生の開始を支配することが示されていたためである (Sato et al., 2018; Singer, 1952)。四肢切断時には神経も切断され、そこから再生因子が放出される。反面、皮膚単独損傷では大きな神経切断は起こらない。そこで、この神経の関与の差異が皮膚コラーゲン再生の成否を握っていると考えたのである。実際に、皮膚単独損傷部に外科的に切断した神経を強制的に配向させたところ、予想通りコラーゲン線維の格子構造が回復することが分かった。さらに、神経由来の再生因子として近年同定された fibroblast growth factor (FGF) (Makanae et al., 2014; Sato et al., 2016) を投与した場合にも、

同様の皮膚再生効果が見られることを明らかにした。以上の結果から、メキシコサラマンダーにおいて、神経から放出される FGF が「皮膚再生誘導因子」として機能していることが示唆された。

神経由来の FGF シグナルが、どのようなメカニズムでコラーゲン線維の格子構造の回復に寄与しているのかを明らかにするために、第三章では、コラーゲン産生細胞の形態と由来に着目してさらなる研究を進めた。マウスやカエルの皮膚修復に関する先行研究から、真皮損傷部の線維芽細胞の多くが皮下組織から遊走してくることが示されていた (Correa-Gallegos et al., 2019; Otsuka-Yamaguchi et al., 2017)。メキシコサラマンダーで検証したところ、マウスやカエルと同様に、真皮損傷部の細胞の多くが皮下組織由来であることが確かめられた。また、神経を与えた場合であっても、真皮損傷部における皮下組織由来細胞と皮膚由来細胞の比率は変わらないことが分かった。さらに、通常の皮膚損傷では、真皮損傷部の細胞は格子形態をとらないが、神経や FGF を与えた場合には、皮下組織由来の細胞が格子状に変化することが明らかとなった。つまり、神経由来の FGF シグナルは、線維芽細胞の格子形態獲得に寄与することで、格子状コラーゲン線維の構築を誘導していると考えられる。

本研究では、メキシコサラマンダーを用いて、皮膚のコラーゲン線維構築過程を明らかにし、さらに皮膚再生機構の解明を試みた。今後の研究では、コラーゲン産生細胞が格子形態をとるための詳しい分子機構の解明が望まれる。皮膚コラーゲン線維の格子構

造は多くの動物で保存されているため、本研究で得られた知見は、ヒトの皮膚科学の発展にも繋がると期待できる (Meyer et al., 1982; Morris et al., 2018; Ueda et al., 2019)。今後研究が進めば、ヒトの皮膚再生治療法の開発にも繋がるだろう。本研究が、皮膚の健康を通じて人々の QOL を向上させるための一歩となれば嬉しい。

## 謝辭

はじめに、自由にのびのびと研究できる環境を用意してくださった、指導教官の佐藤伸先生に心より感謝申し上げます。動物の手術をはじめとした実験手技の多くも、佐藤先生に直接ご指導頂きました。また、私は聞き分けの悪い頑固な学生でしたが、多くの時間を割いて、根気強く、議論の相手をしてくださいました。佐藤先生以外にも、佐藤研究室の皆様には、大変お世話になりました。特に、研究室をいつも快適に保ってくださった技術員の岩田玲子さん、3年間を共に過ごし、研究の議論から人生相談まで付き合ってくれた学生の大蘆彩夏さん、古川彩絢さん、山本咲哉くん、本当にありがとうございました。博士後期課程の3年間をこの佐藤研究室で過ごすことができて良かったです。

本研究は、共同研究者の皆様のご尽力に支えられました。特に基礎生物学研究所の亀井保博先生、野中茂紀先生、近藤洋平先生と、理研 BDR の渡邊朋信先生には、大変お世話になりました。亀井先生と野中先生にご指導頂いた顕微鏡撮影技術と、近藤先生と渡邊先生の画像解析技術がなければ、私は本研究を完遂することができませんでした。加えて、2021年に受講した基礎生物学研究所 生物画像データ解析トレーニングコースも、本研究を進める上で大きな助けになりました。加藤輝先生をはじめ、講師とサポート役の先生方に心から感謝申し上げます。

金銭面では、OU フェローシップ (JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム) と大本育英会からご支援頂きました。

博士課程入学以前からお世話になっている皆様にも、この場を借りて感謝申し上げます。学部 1 年生から今までずっとメンターのように頼らせて頂いている篠原満利恵さん、学部時代にご指導頂いた東京大学の長棟輝行先生、河原正浩先生、梅根輝来人さん、鹿島大揮さん、修士課程でご指導頂いた京都大学の戸口田淳也先生、川井俊介先生、西尾恵さん、永田早苗さん、これまでの研究生活で関わった全ての皆様から教わったことを糧に、この博士課程を突き進むことができました。また、博士課程では、数少ない身近な同期として、大坪秋人くん、佐伯望くんの存在に支えられました。学外の友人達にも、勉強会、申請書添削、悩み相談など、様々な場面で助けてもらいました。何より両親は、常に真摯に私の話に耳を傾け、私の選択を全力で応援してくれました。感謝してもしきれません。

最後に、本研究で犠牲となった動物達に最大限の感謝を捧げます。ありがとうございました。

## 引用文献

- Abe, G., Hayashi, T., Yoshida, K., Yoshida, T., Kudoh, H., Sakamoto, J., Konishi, A., Kamei, Y., Takeuchi, T., Tamura, K., et al. (2020). Insights regarding skin regeneration in non-amniote vertebrates: Skin regeneration without scar formation and potential step-up to a higher level of regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *100*, 109–121.
- Birk, D.E., and Bruckner, P. (2005). Collagen Suprastructures. In *Topics in Current Chemistry*, pp. 185–205.
- Birk, D.E., Silver, F.H., and Trelstad, R.L. (1991). Matrix Assembly. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*, (Boston, MA: Springer US), pp. 221–254.
- Bodemer, C.W. (1958). The development of nerve-induced supernumerary limbs in the adult newt, *Triturus viridescens*. *J. Morphol.* *102*, 555–581.
- Brockes, J.P. (1997). Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. *Science*. *276*, 81–87.
- Brockes, J.P., and Kintner, C.R. (1986). Glial growth factor and nerve-dependent proliferation in the regeneration blastema of urodele amphibians. *Cell* *45*, 301–306.
- Canty, E.G., and Kadler, K.E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* *118*, 1341–1353.
- Correa-Gallegos, D., Jiang, D., Christ, S., Ramesh, P., Ye, H., Wannemacher, J., Kalgudde Gopal, S., Yu, Q., Aichler, M., Walch, A., et al. (2019). Patch repair of deep wounds by mobilized fascia. *Nature* *576*, 287–292.
- Driskell, R.R., and Watt, F.M. (2015). Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol.* *25*, 92–99.
- Driskell, R.R., Lichtenberger, B.M., Hoste, E., Kretzschmar, K., Simons, B.D., Charalambous, M., Ferron, S.R., Herculat, Y., Pavlovic, G., Ferguson-Smith, A.C., et al. (2013). Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* *504*, 277–281.
- Endo, T., Bryant, S. V., and Gardiner, D.M. (2004). A stepwise model system for limb regeneration. *Dev. Biol.* *270*, 135–145.
- Farkas, J.E., Freitas, P.D., Bryant, D.M., Whited, J.L., and Monaghan, J.R. (2016). Neuregulin-1 signaling is essential for nerve-dependent axolotl limb regeneration. *Dev.* *143*, 2724–2731.
- Felseburgh, F.A., de Almeida, P.G., de Carvalho-e-Silva, S.P., and de Brito-Gitirana, L. (2009). Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornata*. *Micron* *40*, 198–205.
- Fessler, J.H., and Fessler, L.I. (1978). Biosynthesis of Procollagen. *Annu. Rev. Biochem.* *47*, 129–162.
- Fisher, G.J., Varani, J., and Voorhees, J.J. (2008). Looking Older: Fibroblast Collapse and Therapeutic Implications. *Arch. Dermatol.* *144*, 666–672.
- Fligiel, S.E.G., Varani, J., Datta, S.C., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2003). Collagen Degradation in Aged/Photodamaged Skin In Vivo and After Exposure to Matrix Metalloproteinase-1 In Vitro. *J. Invest. Dermatol.* *120*, 842–848.
- Fries, K.M., Blieden, T., Looney, R.J., Sempowski, G.D., Silvera, M.R., Willis, R.A., and Phipps, R.P. (1994). Evidence of Fibroblast Heterogeneity and the Role of Fibroblast Subpopulations in Fibrosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* *72*, 283–292.
- Gordon, M.K., and Hahn, R.A. (2010). Collagens. *Cell Tissue Res.* *339*, 247–257.
- He, K., Zhang, X., Ren, S., and Sun, J. (2016). Deep Residual Learning for Image Recognition. In *2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, (IEEE), pp. 770–778.

- Jiang, X., Zhong, J., Liu, Y., Yu, H., Zhuo, S., and Chen, J. (2011). Two-photon fluorescence and second-harmonic generation imaging of collagen in human tissue based on multiphoton microscopy. *Scanning* 33, 53–56.
- Joven, A., Elewa, A., and Simon, A. (2019). Model systems for regeneration: salamanders. *Development* 146, 0–2.
- Kamel-ElSayed, S.A., Tiede-Lewis, L.M., Lu, Y., Veno, P.A., and Dallas, S.L. (2015). Novel approaches for two and three dimensional multiplexed imaging of osteocytes. *Bone* 76, 129–140.
- Kandyel, R.M., Elwan, M.M., Abumandour, M.M.A., and El Nahass, E.E. (2021). Comparative ultrastructural-functional characterizations of the skin in three reptile species; *Chalcides ocellatus*, *Uromastix aegyptia aegyptia*, and *Psammophis schokari aegyptia* (FORSKAL, 1775): Adaptive strategies to their habitat. *Microsc. Res. Tech.* 84, 2104–2118.
- Kashimoto, R., Furukawa, S., Yamamoto, S., Kamei, Y., Sakamoto, J., Nonaka, S., Watanabe, T.M., Sakamoto, T., Sakamoto, H., and Satoh, A. (2022). Lattice-patterned collagen fibers and their dynamics in axolotl skin regeneration. *iScience* 25, 104524.
- Kashimoto, R., Kamei, Y., Nonaka, S., Kondo, Y., Yamamoto, S., Furukawa, S., Ohashi, A., and Satoh, A. (2023a). FGF signaling induces the regeneration of collagen fiber structure during skin wound healing in axolotls. *Dev. Biol.* 498, 14–25.
- Kashimoto, R., Furukawa, S., Yamamoto, S., and Satoh, A. (2023b). Bead Implantation and Delivery of Exogenous Growth Factors. In *Salamanders*, A.W. Seifert, and J.D. Currie, eds. (Humana), pp. 209–216.
- Lévesque, M., Villiard, É., and Roy, S. (2010). Skin wound healing in axolotls: a scarless process. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* 314B, 684–697.
- Lu, Y., Kamel-El Sayed, S.A., Wang, K., Tiede-Lewis, L.M., Grillo, M.A., Veno, P.A., Dusevich, V., Phillips, C.L., Bonewald, L.F., and Dallas, S.L. (2018). Live Imaging of Type I Collagen Assembly Dynamics in Osteoblasts Stably Expressing GFP and mCherry-Tagged Collagen Constructs. *J. Bone Miner. Res.* 33, 1166–1182.
- Maden, M., and Holder, N. (1984). Axial characteristics of nerve induced supernumerary limbs in the axolotl. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 193, 394–401.
- Makanae, A., Hirata, A., Honjo, Y., Mitogawa, K., and Satoh, A. (2013). Nerve independent limb induction in axolotls. *Dev. Biol.* 381, 213–226.
- Makanae, A., Mitogawa, K., and Satoh, A. (2014). Co-operative Bmp- and Fgf-signaling inputs convert skin wound healing to limb formation in urodele amphibians. *Dev. Biol.* 396, 57–66.
- Makanae, A., Mitogawa, K., and Akira, S. (2016a). Cooperative inputs of Bmp and Fgf signaling induce tail regeneration in urodele amphibians. *Dev. Biol.* 410, 45–55.
- Makanae, A., Mitogawa, K., and Satoh, A. (2016b). Cooperative inputs of Bmp and Fgf signaling induce tail regeneration in urodele amphibians. *Dev. Biol.* 410, 45–55.
- Makanae, A., Tajika, Y., Nishimura, K., Saito, N., Tanaka, J., and Satoh, A. (2020). Neural regulation in tooth regeneration of *Ambystoma mexicanum*. *Sci. Rep.* 10, 9323.
- Meyer, W., Neurand, K., and Radke, B. (1982). Collagen fibre arrangement in the skin of the pig. *J. Anat.* 134, 139–148.
- Morris, J.L., Cross, S.J., Lu, Y., Kadler, K.E., Lu, Y., Dallas, S.L., and Martin, P. (2018). Live imaging of collagen deposition during skin development and repair in a collagen I – GFP fusion transgenic zebrafish line. *Dev. Biol.* 441, 4–11.
- Mullen, L.M., Bryant, S.V., Torok, M.A., Blumberg, B., and Gardiner, D.M. (1996). Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development* 122, 3487–3497.

- Munaim, S.I., and Mescher, A.L. (1986). Transferrin and the trophic effect of neural tissue on amphibian limb regeneration blastemas. *Dev. Biol.* *116*, 138–142.
- Otsuka-Yamaguchi, R., Kawasumi-Kita, A., Kudo, N., Izutsu, Y., Tamura, K., and Yokoyama, H. (2017). Cells from subcutaneous tissues contribute to scarless skin regeneration in *Xenopus laevis* froglets. *Dev. Dyn.* *246*, 585–597.
- Philippeos, C., Telerman, S.B., Oulès, B., Pisco, A.O., Shaw, T.J., Elgueta, R., Lombardi, G., Driskell, R.R., Soldin, M., Lynch, M.D., et al. (2018). Spatial and Single-Cell Transcriptional Profiling Identifies Functionally Distinct Human Dermal Fibroblast Subpopulations. *J. Invest. Dermatol.* *138*, 811–825.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a004978–a004978.
- Rinkevich, Y., Walmsley, G.G., Hu, M.S., Maan, Z.N., Newman, A.M., Drukker, M., Januszyk, M., Krampitz, G.W., Gurtner, G.C., Lorenz, H.P., et al. (2015). Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science.* *348*.
- Rognoni, E., and Watt, F.M. (2018). Skin Cell Heterogeneity in Development, Wound Healing, and Cancer. *Trends Cell Biol.* *28*, 709–722.
- Saito, N., Nishimura, K., Makanae, A., and Satoh, A. (2019). Fgf- and Bmp-signaling regulate gill regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Biol.* *452*, 104–113.
- Satoh, A., Gardiner, D.M., Bryant, S. V., and Endo, T. (2007). Nerve-induced ectopic limb blastemas in the axolotl are equivalent to amputation-induced blastemas. *Dev. Biol.* *312*, 231–244.
- Satoh, A., Makanae, A., Hirata, A., and Satou, Y. (2011). Blastema induction in aneurogenic state and Prrx-1 regulation by MMPs and FGFs in *Ambystoma mexicanum* limb regeneration. *Dev. Biol.* *355*, 263–274.
- Satoh, A., Makanae, A., Nishimoto, Y., and Mitogawa, K. (2016). FGF and BMP derived from dorsal root ganglia regulate blastema induction in limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Biol.* *417*, 114–125.
- Satoh, A., Mitogawa, K., and Makanae, A. (2018). Nerve roles in blastema induction and pattern formation in limb regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* *62*, 605–612.
- Satoh, A., Kashimoto, R., Ohashi, A., Furukawa, S., Yamamoto, S., Inoue, T., Hayashi, T., and Agata, K. (2022). An approach for elucidating dermal fibroblast dedifferentiation in amphibian limb regeneration. *Zool. Lett.* *8*, 1–17.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682.
- Seifert, A.W., Monaghan, J.R., Voss, S.R., and Maden, M. (2012). Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates. *PLoS One* *7*, e32875.
- Seifert, A.W., Cook, A.B., and Shaw, D. (2019). Inhibiting fibroblast aggregation in skin wounds unlocks developmental pathway to regeneration. *Dev. Biol.* *455*, 60–72.
- Sherman, V.R., Yang, W., and Meyers, M.A. (2015). The materials science of collagen. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* *52*, 22–50.
- Singer, M. (1952). The Influence of the Nerve in Regeneration of the Amphibian Extremity. *Q. Rev. Biol.* *27*, 169–200.
- Spallanzani, L. (1769). Reproduction of the legs in the Aquatic Salamander. In *An Essay on Animal Reproduction [Prodromo Di Un’Opera Da Imprimersi Sopra Le Riproduzioni Animal]*, pp. 68–82.

- Tsuji, T., Lavker, R.M., and Kligman, A.M. (1979). A New Method For Scanning Electron Microscopic Visualization Of Dermal Elastic Fibres. *J. Microsc.* *115*, 165–173.
- Ueda, M., Saito, S., Murata, T., Hirano, T., Bise, R., Kabashima, K., and Suzuki, S. (2019). Combined multiphoton imaging and biaxial tissue extension for quantitative analysis of geometric fiber organization in human reticular dermis. *Sci. Rep.* *9*, 10644.
- Ushiki, T. (2002). Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint. *Arch. Histol. Cytol.* *65*, 109–126.
- Weis, J.S., and Weis, P. (1970). The effect of nerve growth factor on limb regeneration in *Ambystoma*. *J. Exp. Zool.* *174*, 73–78.
- Williams, R.M., Zipfel, W.R., and Webb, W.W. (2001). Multiphoton microscopy in biological research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *5*, 603–608.
- Xue, M., and Jackson, C.J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv. Wound Care* *4*, 119–136.
- Yasui, T., Tohno, Y., and Araki, T. (2004). Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light. *Appl. Opt.* *43*, 2861.
- Yokoyama, H., Maruoka, T., Aruga, A., Amano, T., Ohgo, S., Shiroishi, T., and Tamura, K. (2011). Prx-1 expression in *xenopus laevis* scarless skin-wound healing and its resemblance to epimorphic regeneration. *J. Invest. Dermatol.* *131*, 2477–2485.