

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)

(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
(The program for technological innovation of regenerative medicine)

研究開発課題名： (日本語) 発生フィールドの再起動による器官レベルの再生

(英語) Organ regeneration by local reactivation of developmental field

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人岡山大学 異分野融合先端研究コア 准教授 佐藤 伸

所属 役職 氏名： (英語) Okayama Univ. Research Core for Interdisciplinary Sciences
Associate Prof. AKIRA SATOH

実施期間： 平成28年11月21日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 発生フィールドの先起動による器官レベルの再生の誘導

開発課題名： (英語) Induction of developmental field for organ regeneration

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人岡山大学 大学院自然科学研究科 准教授 坂本 浩隆

所属 役職 氏名： (英語) Okayama Univ. Graduate School of Natural Sciences and Technology
Associate Prof. HIROTAKA SAKAMOTO

分担研究 (日本語) 非再生動物における器官再生誘導因子” FGF8+FGF2+BMP7” の効果検証

開発課題名： (in vivo)

(英語) Assessment of organ regeneration inducers in non-regenerative animals

II. 成果の概要（総括研究報告）

阿形清和教授（学習院大学理学部生命科学科大学院自然科学研究科）、坂本浩隆准教授（岡山大学大学院自然科学研究科）らのグループとともに、有尾両生類（イモリ・メキシコサラマンダー）において顕著な効果をあらわす器官再生誘導物質（FGF2+FGF8+BMP7）の効果検証を *in vitro*, *in vivo* の両面から行った。

本年度は、イモリ細胞において FGF2+FGF8+BMP7 によって惹起される遺伝子カスケードを明らかにするために培養細胞を使用した実験を立ち上げた。初めに総括である佐藤らのグループがイモリ線維芽細胞の培養系を確立した。イモリの細胞培養系はこれまで確固たる条件設定がなされておらず、長期の細胞培養は不可能であった。しかし、近年鳥取大学の林らのグループが心筋細胞について培養条件を見出しており、それを参考に検討し、40% GlutaMax DMEM, 10% FBS, 50% water, 0.01M HEPES (pH 7.0), 30 µg/ml Gentamycin の条件でイモリ線維芽細胞の培養が可能である事を見出した。獲得したイモリ線維芽細胞は4か月間を超える期間を培養し、今なお継続している。この継続した培養から得られるイモリ線維芽細胞に器官再生誘導因子である FGF2+FGF8+BMP7 を添加し、当該因子が動かす遺伝子カスケードの詳細を明らかにする計画である。本年度は、佐藤らのグループが異なる培養条件においてイモリ線維芽細胞から RNA 試料を取得し、阿形らのグループが得られた RNA 試料について次世代シーケンシングを実行した。

In vivo の観点からの研究は、佐藤・坂本のグループ（岡山大学）によって遂行した。再生誘導物質である FGF2+FGF8+BMP7 をニワトリおよびマウスの四肢損傷箇所に添加して再生反応を検証する実験を遂行する計画であるが、マウスについては岡山大学の規定に則り動物実験に関する倫理審査申請を行い、承認された。審査期間中には、マウスの四肢再生実験において世界的に著名なテキサス大学の Ken Muneoka 博士に指導を仰ぎ、当グループの成果と先方の成果、これからの実験計画の状況を説明し助言を仰いだ。また、マウスに関する実験のノウハウを享受し、3月にパイロット実験として手技を確立した。ニワトリに関する再生誘導実験では、前述の再生物質の一部を添加し、再生反応の初期ではないが後期プロセスを確実に動かすことを見出した。本成果は、再生の開始というプロセスを動かせれば、鳥類においても両生類同様の再生反応を進行させるベースラインが存在している事を示す画期的な成果であると考えられる。

The genetic cascades, which are driven by the organ regeneration inducers, have been challenged. This project has been run by Satoh group (Okayama Univ.), Agata group (Gakushuin Univ.), and Sakamoto group (Okayama Univ.).

In vitro analysis has been performed to investigate a detail gene cascade induced by the regeneration inducers, FGF2+FGF8+BMP7. In our previous study, we determined that FGF2+FGF8+BMP7 could induce organ regenerations in some amphibian species. Regeneration processes are actually “re-development”. Thus, if a slight different angle of a view is taken, FGF2+FGF8+BMP7 can induce a developmental field in an adult body. Cells become embryonic character during the process. However, the gene cascades activated by the regeneration inducers have been unknown. Our research goal is to determine the gene cascades, which make redevelopment possible. First, we had to establish a culture condition for newt cells because no established culture condition for newt cells existed. Dr. T. Hayashi, Tottori Univ., has been pioneered a culture condition for newt myocytes. So, we refer to his knowledge, we succeeded in establishing fine culture condition for newt fibroblasts. The condition is as follows; 40%GlutaMax DMEM, 10% FBS, 50% water, 0.01M HEPES (ph 7.0), 30µg/ml Gentamycin. In this condition, newt fibroblasts have been grown for over four months. Satoh group was collecting RNA sample from the cultured newt fibroblasts in various protein conditions. Agata group ran the deep sequencing analysis.

Whether the regeneration inducers can induce regeneration reactions in amniotes was also challenged in this project. Satoh and Sakamoto group (Okayama Univ.) take this part. We have put FGF2+FGF8+BMP7 onto damaged limbs/limb buds of a mouse and a chick embryo. Regarding to the mouse experiments, we need to obtain an approval to our research design carefully since the expecting experiments involve some of relatively painful surgical procedures. The approval was obtained in the end of the financial year. A pilot experiment was performed. Before the pilot experiment, I visited to Dr. Muneoka, who is the expert of mouse digit regeneration study. His constructive advices helped to set our experimental procedures. As for chick limb bud regeneration, we have started performing some of experiments and got positive results on this. We will brush up our results in the next financial year.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「器官再生誘導物質の応用例と展望」、口頭、佐藤伸、第 16 回日本再生医療学会、2017/3/8、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 高校生に向けたアウトリーチ活動、佐藤伸、第 16 回日本再生医療学会、2017/3/9、国内

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)

(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
(The Program for Technological Innovation of Regenerative Medicine)

研究開発課題名： (日本語) 発生フィールドの再起動による器官レベルの再生

(英語) Organ regeneration by local reactivation of developmental field

研究開発担当者 (日本語) 学習院大学 理学部生命科学科 教授 阿形 清和

所属 役職 氏名： (英語) Gakushuin Univ., Professor, KIYOKAZU AGATA

実施期間： 平成 28 年 11 月 21 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 様々な動物細胞における器官再生誘導因子に対するシグナルカスケードの差異の解明(*in vitro*)

開発課題名： (英語) Evaluation of regeneration cascades triggered by FGF+BMP *in vitro*

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立大学法人岡山大学・異分野融合先端研究コア・佐藤 伸 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 高校生学会体験企画プログラム特別セミナー「再生可能動物の再生メカニズムに迫る」, 阿形清和, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/03/09, 国内

(4) 特許出願
該当なし