

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11804

研究課題名(和文)骨軟骨由来新規可溶性FGF受容体の機能解析と骨軟骨再生への応用

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel soluble FGF receptor from bone and cartilage and application to osteochondral regeneration

研究代表者

香川 和子(Kagawa, Kazuko)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：60432671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨・軟骨再生に応用可能な基盤的知見獲得を目的とし、新規の可溶性FGF受容体(可溶性FGFR2-IIIb)の研究を行った。

可溶性FGFR2-IIIbは、マウス頭頂骨、下顎頭軟骨、四肢長管骨の骨頭軟骨に発現していた。軟骨前駆細胞株ATDC5と前骨芽細胞株MC3T3-E1は従来の膜型FGFR2-IIIbを発現せず、可溶性FGFR2-IIIbのみを発現していた。

可溶性FGFR2-IIIbを過剰発現したATDC5細胞は、コントロールより高い細胞増殖能を示した。また、FGF10添加により増殖能は更に促進された。この細胞では、FGF10添加時にMAPK/ERKシグナル伝達経路の活性化が亢進されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨・軟骨疾患は、歯科関連疾患の大きな割合を占める。骨再生療法や骨移植が歯科でも行われているが、適応の制限、不十分な予知性等の問題があり、より安全で侵襲の少ない再生療法の開発が希求される。

線維芽細胞増殖因子(FGF)やFGF受容体(FGFR)は細胞の増殖分化や生存、移動に関与することが知られている。FGF2を用いた歯周組織再生材が実用化されており、これはFGF-FGFRシグナルが骨軟骨再生に密接に関連していることを示す。

本研究で得られた、新規可溶性FGFR2-IIIbの骨・軟骨細胞への影響やそのシグナル伝達に関する基礎的知見は、今後、より有効な骨・軟骨再生療法の開発へ繋がる可能性をもつ。

研究成果の概要(英文)：We studied a novel soluble FGF receptor (soluble FGFR2-IIIb) to obtain fundamental knowledge that can be applied to bone and cartilage regeneration.

The soluble FGFR2-IIIb that lacks the transmembrane and tyrosine kinase domains was expressed in calvaria, condylar cartilage, and cartilage of limb long bones in mice. The chondroprogenitor cell line ATDC5 and the preosteoblast cell line MC3T3-E1 did not express conventional FGFR2-IIIb, but only soluble FGFR2-IIIb.

The ATDC5 cells overexpressing soluble FGFR2-IIIb showed higher proliferative ability than control cells, and the addition of FGF10 further promoted proliferation. Furthermore, overexpression of soluble FGFR2-IIIb enhanced the activation of the MAPK/ERK signaling pathway by the addition of FGF10.

研究分野：歯学

キーワード：骨・軟骨再生 線維芽細胞増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

骨・軟骨疾患は、歯科関連疾患の大きな割合を占めることが知られている。軟骨組織の損傷がもたらす顎関節症の治療法には、保存的療法や、改善が見られない場合の外科的療法があるが、現時点では治療方法が確立されているとは言いがたい。また骨では、歯槽骨吸収を伴う成人性歯周炎や欠損補綴としてのインプラント治療において、様々な骨再生療法や自家骨・人工骨移植による骨造成が行われているが、適応症例の制限、不十分な予知性などの問題点が残っている。顎口腔領域において、より安全で侵襲の少ない骨・軟骨再生療法の開発が希求されている。

線維芽細胞増殖因子 (FGF) は FGF 受容体 (FGFR) と結合して細胞内にシグナルを伝達し、細胞増殖・分化や生存、移動に関与することが知られている。近年、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) の局所投与が歯周組織再生に有効であることが、動物実験により明らかになった (村上ら, 2003)。続いて行われた大規模な臨床試験からは、ヒトの 2 および 3 壁性歯槽骨欠損に対して、有意な歯槽骨新生を誘導し得ることが確認された。その後、FGF2 は 2016 年に歯周組織再生材として実用化されており、これらのことは FGF-FGFR シグナルが骨再生に密接に関連していることを示している。

FGFR は 7 種類存在する。これまでに報告されている FGFR のひとつであり、細胞膜上に存在する従来の膜型 FGFR2-IIIb とは異なった、新規の可溶性 FGFR2-IIIb が特定の骨・軟骨組織に存在することを申請者は確認した (香川ら, 2015)。また、FGF10 は FGFR2-IIIb と結合してシグナル伝達を行うことが知られているが、この FGF10 をマウスで過剰発現させたところ、可溶性 FGFR2-IIIb が発現しない鼻中隔軟骨は肥大化し、発現する下顎頭軟骨は矮小化した (香川ら, 2014)。また、このマウスの頭蓋骨や四肢長管骨は劣形成を生じることも認められた (香川ら, 2014)。これらのことから、可溶性 FGFR2-IIIb は骨・軟骨細胞に影響を与えることが推測される。申請者は、この新たに発見したタンパク質を骨・軟骨再生療法の開発へ、更には新規の人工骨開発へと応用するという着想を得た。

## 2. 研究の目的

可溶性 FGFR2-IIIb の FGF-FGFR シグナル伝達における役割や、骨・軟骨細胞へ与える具体的な作用等といった、まだ明らかになっていない特性を解明する。そこから得た知見をもとに、骨・軟骨の両組織にとって安全で低侵襲な新規の治療法を探索することが、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

研究 1 では、マウスの各部位の骨・軟骨や主要組織における、可溶性 FGFR2-IIIb を含めた各 FGFR と、可溶性 FGFR2-IIIb のリガンドである FGF10 の発現について、さらなる精査を行う。正常な ICR マウス新生仔を実験動物とし、骨、軟骨に加え、脳、心臓、肺、肝臓などの主要な組織を採取する。これらの組織より RNA を抽出し、RT-PCR により各 FGFR と FGF10 の遺伝子発現解析を行う。また、マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞とマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞においても同様の解析を行う。

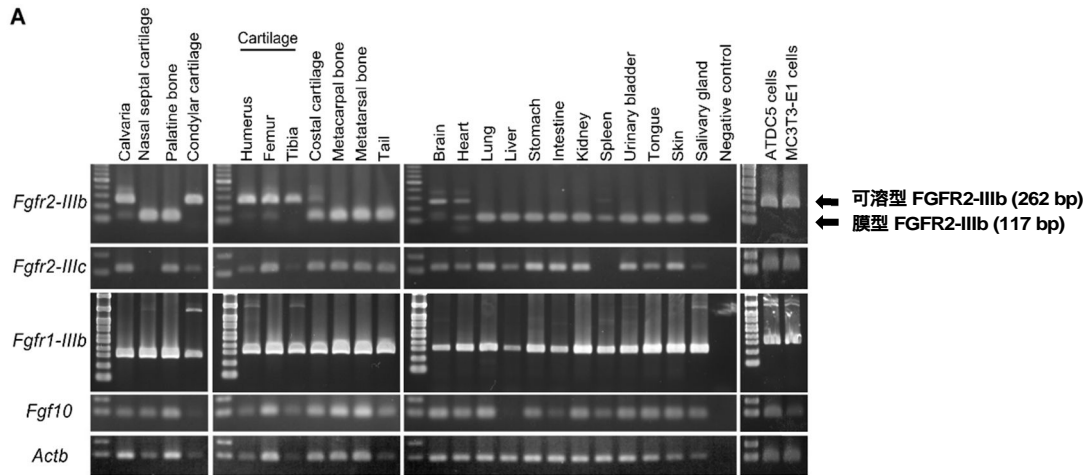
研究 2 では、可溶性 FGFR2-IIIb を過剰発現する軟骨前駆細胞の性質を解析することで、可溶性 FGFR2-IIIb が軟骨前駆細胞に与える影響を探索する。まず、マウス軟骨前駆細胞 ATDC5 細胞に遺伝子導入を行い、可溶性 FGFR2-IIIb を過剰発現する ATDC5 細胞を作製する。また、ベクターのみを遺伝子導入した ATDC5 細胞をコントロールとする。これらの細胞を用い、遺伝子発現、タンパク発現、細胞増殖能の解析を行う。また、リガンドとなる FGF10 を添加した際の細胞増殖能の変化も調査する。

研究 3 では、可溶性 FGFR2-IIIb のシグナル伝達機構における役割の解明を行う。培養細胞は、研究 2 で作製したコントロールと、可溶性 FGFR2-IIIb の過剰発現する細胞を用いる。これらの細胞を培養し、FGF10 を添加した後のタンパク質を抽出して、ウエスタンブロッティングによりリガンド刺激時の細胞のシグナル伝達に与える影響を調べる。

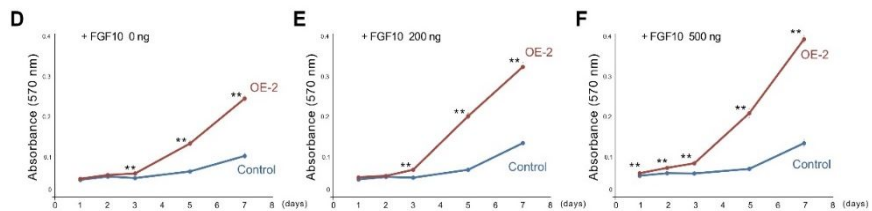
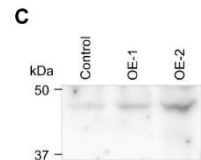
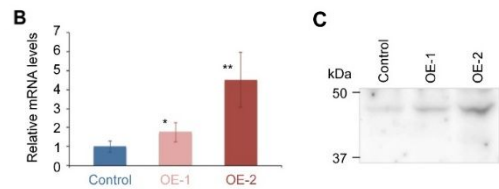
#### 4. 研究成果

研究 1 において、マウス各部位の骨・軟骨や主要組織における、可溶性 FGFR2-IIIb を含めた各 FGFR と、可溶性 FGFR2-IIIb のリガンドである FGF10 の発現について精査を行った。

正常な ICR マウス新生仔を実験動物とし、骨、軟骨に加え、脳、心臓、肺、肝臓などの主要な組織から抽出した RNA を用いて RT-PCR による遺伝子発現解析を行ったところ、可溶性 FGFR2-IIIb が頭頂骨、下顎頭軟骨、四肢長管骨の骨頭軟骨に発現していることが明らかになった。加えて、骨・軟骨組織以外にも、脳、心臓に可溶性 FGFR2-IIIb の発現が認められた。これらの組織における FGFR1-IIIb と FGFR2-IIIc、FGFR2-IIIb のリガンドとなる FGF10 の発現も確認した。マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞とマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞においても同様の解析を行ったところ、これらの細胞は、従来の膜型 FGFR2-IIIb ではなく可溶性 FGFR2-IIIb を発現していることが明らかになった (図 A)。



研究 2 では軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞に可溶性 FGFR2-IIIb を過剰発現させ、ベクターのみを導入した細胞の性質と比較し、可溶性 FGFR2-IIIb が軟骨前駆細胞に与える影響を解析した。可溶性 FGFR2-IIIb を遺伝子導入した ATDC5 細胞 (OE-1 と OE-2) は、コントロールより高い可溶性 *Fgfr2-IIIb* の発現を認めた (図 B)。また、これらの細胞において、FGFR2-IIIb のタンパク発現量も増加していた (図 C)。そこで、より高い可溶性 *Fgfr2-IIIb* の発現レベルを示す OE-2 とコントロールを用いて、培地に FGF10 を添加した場合の細胞増殖能を測定した。OE-2 は、コントロールより高い細胞増殖能を示した (図 D)。FGF10 を添加すると細胞増殖能はさらに高くなることが明らかになった。また、添加する FGF10 の濃度が高いほど、細胞増殖能は亢進した (図 E, F)。



研究 3 では、研究 2 で作製した OE-2 とコントロールを用いて、可溶性 FGFR2-IIIb のシグナル伝達機構における役割の探索を行った。細胞培養した OE-2 とコントロールに FGF10 を添加し、タンパク質を抽出してウエスタンブロット法により細胞の MAPK/ERK シグナルを評価した。プレリミナリーなデータでは、コントロールでは FGF10 添加後 10 分で MAPK/ERK シグナル伝達経路における ERK のリン酸化が認められた。これと比較し、OE-2 では FGF10 添加後 5 分で ERK のリン酸化がコントロールより大きく亢進した。このことにより、可溶性 FGFR2-IIIb の過剰発現は FGF10 添加時の MAPK/ERK シグナル伝達経路を活性化し、細胞内により多くのシグナルを伝達したことを示唆している。

各種 FGFR は細胞膜上で二量体を形成している。リガンドとなる各 FGF は、7 種の FGFR のサブタイプの中から最も親和性の高い FGFR と結合し、細胞内にシグナルを伝達することが知られている。FGF10 と最も親和性の高い受容体は FGFR2-IIIb であり、その次は FGFR1-IIIb と親和性が高い。

新規に見出された可溶型 FGFR2-IIIb は、デコイとしてこれらの FGF-FGFR 結合を阻害するか、逆に、細胞膜上の親和性の高い他 FGFR と二量体を形成して FGF-FGFR 結合を亢進する可能性が想定されていた。今回の研究結果は、FGFR1-IIIb といった FGF10 と親和性のある他 FGFR と可溶型 FGFR2-IIIb が二量体を形成し、細胞内により多くのシグナルを伝達している可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横井美有希, 呉本晃一, 岡田信輔, 香川和子, 津賀一弘
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子受容体2b減弱が象牙芽細胞の分化および象牙質形成に与える影響
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 第127回学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	津賀 一弘  (Tsuga Kazuhiro)  (60217289)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授   (15401)	
研究分担者	吉子 裕二  (Yoshiko Yuji)  (20263709)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授   (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------