

平成 22 年 4 月 6 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791391

研究課題名（和文） 歯髄における F g f 1 8 シグナルの機能解析とその臨床的展開

研究課題名（英文） Mechanisms of Fgf18 Signaling in the Tooth Pulp

研究代表者

大井 智恵 (OHI CHIE)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30431935

研究成果の概要（和文）：

Fibroblast growth factor (Fgf) 18 は Fgf8 ファミリーに属する成長因子であり、骨・軟骨形成に重要な働きを担っていると考えられている。Fgf18 は歯髄において発現が高いことがラット歯髄組織を用いた DNA アレイにより明らかになった。しかし、Fgf18 が歯髄組織においてどのような機能を担っているのかはいまだ不明である。今回、歯髄組織の発生に伴って Fgf18 がどのような発現様態をとりうるのか、Fgf18 ノックアウトマウスにおいてはどのようなフェノタイプを示すのかについて検討した。マウス歯胚における Fgf18 の mRNA 発現を、Fgf18 特異的な DIG ラベル RNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法にて検討したところ、蕾状期には発現はほとんど認められなかったが、帽状期、鐘状期には将来歯髄に分化する組織である歯乳頭ならびにエナメル質形成に関与する内エナメル上皮に発現が認められた。同部位においては、Fgf18 のリセプターである Fibroblast growth factor receptor (Fgfr) 2c および 3c も発現していることが確認され、この部で Fgf18 を介したシグナルが働いている可能性が示唆された。また、培養歯髄細胞においても Fgf18 発現が RT-PCR 法により確認された。さらに Fgf18 により歯髄細胞の増殖が促進された。Fgf18 の歯髄細胞増殖促進効果は Fgf2 と同等であった。一方、Fgf18 添加によりアルカリフォスファターゼ等の硬組織形成マーカーの発現は歯髄細胞において抑制される傾向にあった。以上の結果より、Fgf18 は歯髄細胞の増殖に特に強く関与し、歯髄組織のホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Fibroblast growth factor (Fgf) 18 is a member of Fgf8 family, and it is relating to the bone and cartilage formation. I revealed that Fgf18 was highly expressed in rat dental pulp tissues using cDNA macro-array. I hypothesized that Fgf18 had important roles in pulpal differentiation and function.

Expression of Fgf18 in the pulpal and tooth development was evaluated at first. In

situ hybridization using a specific probe of Fgf18 revealed that Fgf18 expression was first observed in the dental papillae of cap and bell stages. No expression of Fgf18 was detected in the bud stage. Fgf receptor 2c and 3c, which are receptors against Fgf18, was also detected in the dental papillae of cap and bell stages, which suggested that the Fgf signaling induced by Fgf18 was actively working in the dental papillae of these stages. Application of FGF18 to the pulpal cells promoted cell growth *in vitro*. The cell growth induced by FGF18 was similar to that induced by FGF2. Expression of mineralizing markers, such as alkaline phosphatase, was down-regulated by FGF18. These data indicated that major function of Fgf18 should be pulpal cell growth, and it may be one of important factors to maintain the pulpal homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	300,000	0	300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	480,000	2,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学

1. 研究開始当初の背景

歯を口腔内で長く機能させるためには健全な状態の歯髄を保存することが重要である。しかし臨床においては、う蝕や破折等の理由でやむを得ず抜髄に至る例が少なくない。その原因として歯髄の炎症のコントロールが不可能であること、象牙質の誘導が困難であることがあげられる。歯髄は本来さまざまな外来侵襲に対して修復象牙質を形成する機能を有しているが、歯髄組織に含まれると考えられている前駆細胞から象牙芽細胞への分化、そして石灰化組織形成に至る機序は明らかにされていない。発生過程においての象牙芽細胞の分化では上皮間葉相互作用が重要な働きを担っているが、歯髄細胞は単独であっても象牙芽細胞へ分化する能力を有している。したがって、歯髄細胞のプロパティを解明することは、象牙芽細胞への分化の機序の解明に寄与できるものと期待される。今回、歯髄組織に特に強く発現しているFGF18について、その機能に関する知見を

深めるとともに、その臨床応用への展望について検討する。

2. 研究の目的

- (1) FGF18 は、全身組織の中で本当に歯髄組織に高い発現が観察されるのか。
- (2) FGF18 が機能するためのリセプターは発現しているのか。
- (3) FGF18 および FGFR 発現の歯髄組織における局在はどうか。
- (4) 歯の発生過程において、FGF18 および FGFR の発現動態はどうなっているのか。
- (5) FGF18 が欠損している場合に、歯および歯髄の分化はどう影響を受けるのか。
- (6) FGF18 は *in vitro* において、歯髄細胞の象牙芽細胞の分化を誘導するのか。

3. 研究の方法

- (1) FGF18, FGFR 発現: PCR, rPCR

(2) FGF18, FGF α 発現細胞の局在: *in situ* hybridization

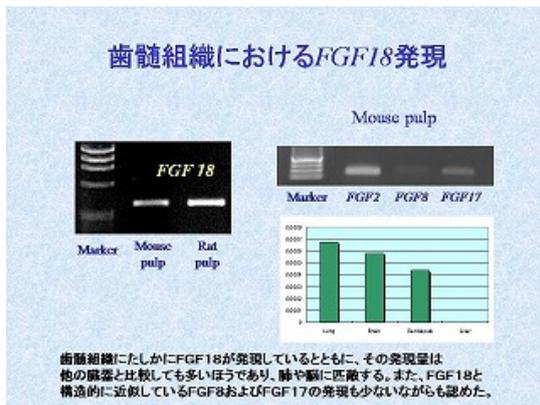
(3) FGF18 の歯および歯髄組織発生における関与: FGF18KO マウス

(4) *in vitro* における FGF18 の機能: 培養歯髄細胞へのふりかけ実験

4. 研究成果

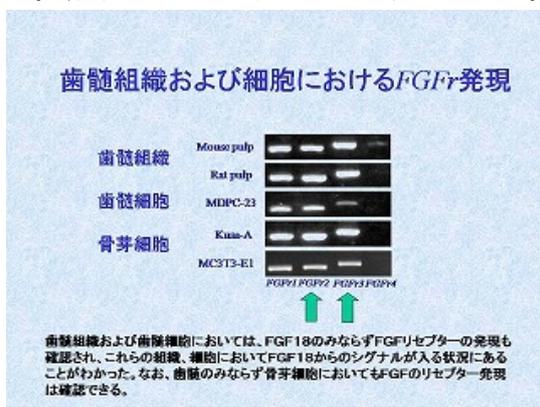
(1) 歯髄組織における Fgf18 発現

歯髄組織において Fgf18 は強く発現しており、全身の組織と比較しても肺、筋に匹敵する。また、Fgf8 ファミリーの中で最も強く発現している。



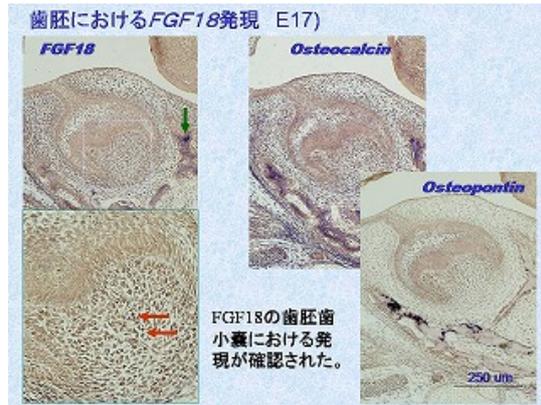
(2) 歯髄組織における Fgf リセプター発現

歯髄組織および歯髄細胞においては、Fgf リセプターのうち 1 から 3 の発現が高かった。骨芽細胞でも同様の傾向が認められた。



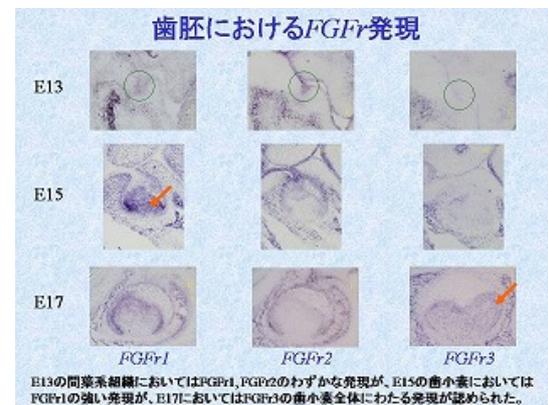
(3) Fgf18 の歯胚における発現

鐘状期における歯胚、歯乳頭における Fgf18 発現が確認された。



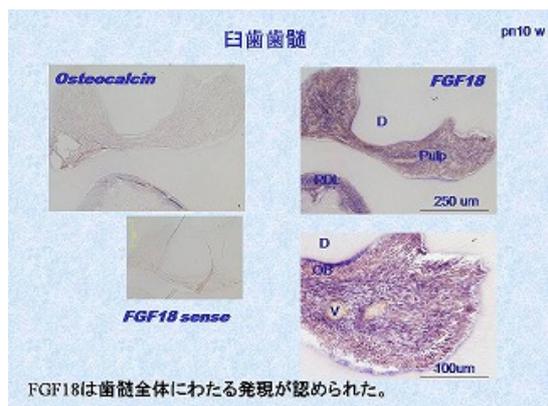
(4) 歯胚における Fgf リセプター発現

Fgf リセプターの発現は、蕾状期より認められた。Fgf18 が結合するリセプター 2 および 3 は歯乳頭における発現が認められた。



(5) 歯髄組織における Fgf18 発現

成熟歯髄組織においても Fgf18 の発現が認められることが明らかになった。

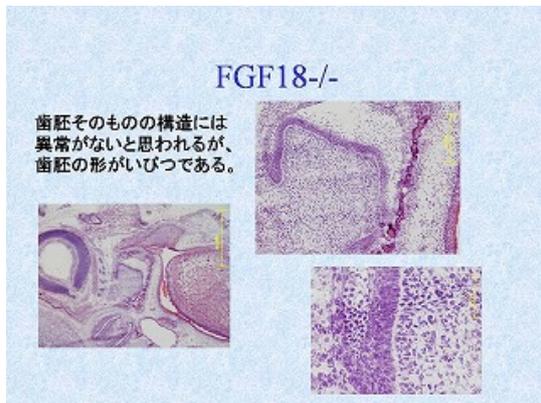


(6) Fgf18KO マウスにおける歯の発生

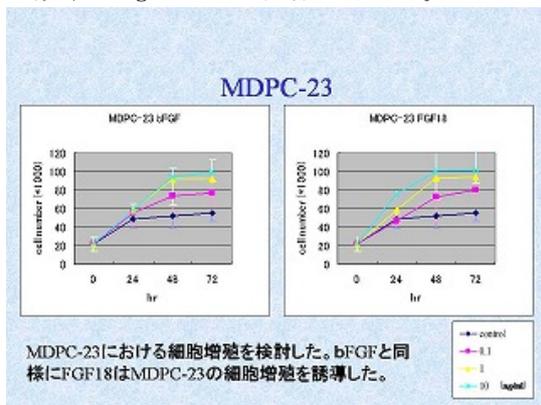
Fgf18KO マウスにおいて、上顎および下顎の歯の形成は阻害されていた。



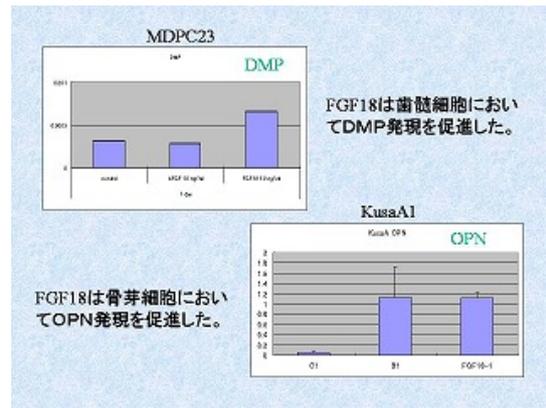
(7) Fgf18KO マウスにおける歯胚の発育
Fgf18KO マウスにおいても歯胚の形成はされたことから、歯の発生と Fgf18 は関連が低いと考えられる。象牙芽細胞の配列がやや乱れているが、細胞自体の構成に変化は認められない。



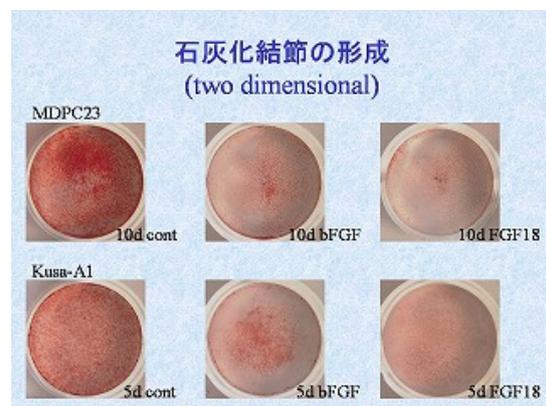
(8) 歯髄細胞に対する Fgf18 の作用
歯髄細胞の増殖を Fgf18 は促進したが、その効果は Fgf2 とほぼ同様であった。



(9) Fgf18 添加による遺伝子発現の変動
歯髄細胞は Fgf18 添加により、Dmp1 発現が増加した。骨芽細胞は Opn 発現が増加した。



(10) 石灰化結節の形成
歯髄細胞および骨芽細胞の石灰化結節の形成は、Fgf18 添加により阻害された。



- (11) 結果のまとめ
- ① FGF18 は、全身組織の中で歯髄組織に高い発現が観察された。
 - ② FGF18 が機能するためのリセプターは歯髄組織および歯髄細胞に発現していた。
 - ③ FGF18 は、歯胚において歯乳頭細胞に発現が認められた。また、成熟歯髄組織においては、歯髄細胞に発現が認められた。一方、FGF リセプターの発現に関して、特に FGF3 の発現が歯胚発生後期 (E17) の歯乳頭において認められた。
 - ④ FGF18KO マウスにおいては、歯および歯胚の形成は抑制されている傾向にあった。
 - ⑤ FGF18 は *in vitro* において、歯髄細胞の DMP 発現を促進する傾向にあった。
 - ⑥ 以上の結果より、歯および歯髄の発生に FGF18 は正の方向に関与していると考えられた。また、歯髄細胞の象牙芽細胞分化にも関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally-induced rat periapical lesions., Kawashima N., Suzuki N., Yang G., Ohi C., Okuhara S., Kawanishi H., Suda H., Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 103, 707-711, 2007.

[学会発表] (計 5 件)

1. 象牙芽細胞分化における Sp7 による dentin sialophosphoprotein 発現誘導, 川島伸之、許セイ、岩田隆紀、周夢宇、瀧本晃陽、小泉悠、大井智恵、高橋里美、鈴木規元、須田英明, 日本再生医療学会 広島国際会議場 平成 22 年 3 月 18 日
2. Expression of Sp7 in the rat dental pulp, Kawashima N., Zhou M., Takimoto K., Koizumi Y., Ohi C., Takahashi S., Suzuki N., Suda H., 2009 Autumn Scientific Meeting of Korean Academy of Conservative Dentistry, Jeju, Korea, Nov. 13, 2009.
3. Role of Mef2c signaling in osteoblast differentiation, N. Kawashima, S. Takahashi, J. Xu, S. Okuhara, H. Wang, C. Ohi, N. Suzuki, H. Suda, 2008 Autumn Scientific Meeting (130th) of Korean Academy of Conservative Dentistry, Seoul, Nov. 28-29, 2008.
4. Notch Signaling in the Dental Pulp, N. KAWASHIMA, S. TAKAHASHI, S. OKUHARA, C. OHI, H. SUN, H. WANG, J. XU, K.-I. KATSUBE, S. ARANY, A. NAKATA, T. SUGIYAMA, and H. SUDA, International Association for Dental Research, Toronto, July 2-5, 2008.
5. Tooth development in FGF18 deficient mice, Chie OHI, Nobuyuki KAWASHIMA, Hideaki SUDA,

International Association for Dental Research, New Orleans, March 24, 2007.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大井 智恵 (OHI CHIE)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30431935

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし