

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592413

研究課題名（和文）口蓋および歯の発生、形態形成への線維芽細胞増殖因子の役割の解明

研究課題名（英文） Basic and Clinical Studies of FGF Signaling at tooth and Plate Development

研究代表者

高森 一乗 (TAKAMORI KAZUNORI)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：60256899

研究成果の概要（和文）：

FGF signal では肺、四肢等での上皮・間充実組織の相互作用が明らかとされているが、口蓋ならびに歯の発生・形態形成においては不明な点が多い。

我々は、FGFR1、R2 を上皮組織特異的に欠損したマウス、ヒトで FGFR1 遺伝子異常を呈する Kallmann 症候群の歯科的所見を、さらに細胞内の FRS2 $\alpha$  の部分欠損マウスを検討したところ、FGF signal の上皮・充実組織の相互作用が歯や口蓋の発生、形態形成に重要な役割を果たす事が明らかとなり、その機構の詳細な検討は、これらの疾患の原因究明ならびに治療法の確立へつながるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Fgf signal was curial role of epithelial and mesenchymal tissue interaction on lung and limbs. However, it was not well understand of the tooth and palate development.

We evaluate of role of FGF epithelial and mesenchymal tissue interaction in the tooth and palate development by FGFR1 and R2 conditional knockout mouse, FRS2 $\alpha$  knockout mouse, and Kallmann syndrome patient.

Obtain results suggested that FGF reciprocal tissue interaction was important role of both organ development and differentiation. These data was usefulness for search of a pathogenesis and establishment of therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯科・矯正・小児系歯学

キーワード：FGFシグナル, FGFR, 口蓋形成, Kallmann 症候群, FRS2 $\alpha$ , 歯牙形成

## 1. 研究開始当初の背景

(1)申請者は、海外において、*Fgfr1*ならびに *Fgfr2* の上皮細胞特異的に欠損したコンディショナル変異マウスを作成し、特徴ある phenotype を得ることに成功した。

(2)FGFR の細胞内シグナル経路は、Ras/MAPK、

PLC (Phospholipase C $\gamma$ ) /Ca<sup>2+</sup>、および PI3K/Akt の 3 経路が知られている。

しかし、頭蓋顔面の骨ならびに歯の発生、形態形成への役割については検討されておらず、その詳細は明らかではない。

以上の様に、現在 FGF シグナルの顎顔面、

口蓋ならび歯の発生・形態形成への関与についてはいまだ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

申請者は、コンディショナル変異マウスや、その細胞内シグナル伝達に重要とされる *Frs2α* を部分欠損したマウスの供与を受けて解析を行う。加えて、マウスで得られた変異を確認すべくヒトの Kallmann 症候群の顎顔面ならびに口腔内検索を行う事を目的とする。

### (1) 上皮特異的な *Fgfr1*CKO マウスの検索

*Fgfr1* コンディショナル KO マウスにおいては、歯のエナメル質の欠損が生じることならびに口蓋裂が生じることが明らかとなった。これらの原因を明らかにする。

### (2) Kallmann 症候群の顎顔面ならびに歯科的検索

同症候群の口腔内検索を行い、歯の欠損と一部エナメル質の形成不全を疑わせる臨床所見を検討する。遺伝的変異と表現型の関係ならびに、一部抜去歯の解析を行いその詳細を検討する。

### (3) 上皮特異的な *Fgfr2* CKO マウスの検索

*Fgfr2* コンディショナル KO マウスにおいては、歯の発生異常と口蓋裂を認めた。その詳細を検討する。

### (4) *Frs2α* 部分欠損マウスの検索

*Frs2α* 部分欠損マウスにおいては、口蓋、歯、顎顔面の形態形成への FGF 細胞内シグナル伝達の影響を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 上皮特異的な *Fgfr1*CKO マウスの検索

微細構造的な特徴を把握するため走査型電子顕微鏡にて加えて、透過型電子顕微鏡にてエナメル芽細胞の形態的变化などの検索を行い、*Fgfr1* のエナメル質形成への影響を形態学的に把握する。

加えて組織的な検索として、特にエナメル芽細胞の細胞活性ならびにアポトーシスを検索する目的で、BrdU や TUNEL 染色ならびに Caspase 染色を行いその細胞の挙動を確認する。各ステージでのエナメルタンパクの発現やそれに関連する MMP 等 mRNA の変化を検索する。また、各 FGF の変化を RT-PCR 法にて確認する。その詳細は、マイクロダイセクション法等を応用し、詳細に確認する。

### (2) Kallmann 症候群の顎顔面ならびに歯科的検索

研究の趣旨に同意が得られた、Kallmann 症候群の家族の口腔内診査ならびに、エックス線診査を行い、遺伝子変異と表現型の関係す

なわち Genotype-phenotype relationship を、加えて GH, GnRH 等各ホルモンの分泌量等との口腔内所見との関係を検討する。また、抜去乳歯または永久歯を提供してもらい、歯質の石灰化の状態をエックス線解析、形態的特徴をマイクロフォーカス CT 等で検討する。(3) 上皮特異的な *Fgfr2* CKO マウスの検索

同マウスにおいては、歯の発生異常と、口蓋裂が観察された。骨染色であるアリザリンレッド、アルシヤンブルーを用いて E16.5、E18.5 などの Embryonic Stage さらには出生時、出生後の各時期の染色を行い顎顔面、頭蓋骨への発生、形態形成への *Fgfr2* の影響を検索する。

歯の発生初期に関与するとされる *Pitx2*, *Fgf8*, *Bmp4* 等の各遺伝子発現の局在を In situ にてその量的変化を RT-PCR 法を応用し検索する。

口蓋部においては、形態組織的な観察を各週齢で行い、口蓋棚の伸張、挙上時、癒合各ステージのどの時期に問題があるのか、また、その細胞活性ならびにアポトーシス等の増殖やその分化の挙動に関しての検索を行う。

### (4) *Frs2α* 部分欠損マウスの検索

本マウスは胎生期 E18.5 で致死する個体が多い為、E12.5, E14.5, E16.5, E18.5 各ステージのノックアウトならびに野生型個体の頭部をホルマリン固定後、通法に従って連続切片を作成し、歯、頭蓋骨の発生、形成を確認する。同時に、得られた各ステージの embryo を用いて、マイクロ CT にて顔面ならびに頭蓋骨を検索し、石灰化の状態や面積等を解析ソフトウェアで確認し野生型マウスと比較検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 上皮特異的な *Fgfr1*CKO マウスの検索

本マウスにおいては、Amelogenesis Imperfecta (AI) が観察された事より、歯面の微細構造を検索し、その形態的特徴を明らかにした。加えて、分子生物学的検索より、各エナメルタンパクの分泌障害が観察され、上皮における *Fgfr1* の発現がエナメル質形成に重要な役割を果たしていることを明らかとした。これらの知見は従来報告されておらず、FGFR1 がヒトの AI やその発症遺伝子群に大きな影響を与えているものと考えられる。本研究は 2008 年 Journal of Dental Research に掲載された(雑誌論文①)。現在、海外共同研究先とヒト AI の FGFR1 変異検索、顎顔面、口腔の再生治療への応用に関して検討している。

### (2) Kallmann 症候群の顎顔面ならびに歯科的

## 検索

Kallmann 症候群の家族の口腔内診査ならびに、エックス線診査を行い検討したところ、本症候群においては、喪失歯数が多い事に加え、著しい咬耗が観察された。歯の先天性欠損・エナメル質形成不全・歯根の短小の臨床所見に加え、患者の抜去乳歯の石灰化状態、形態的特徴をマイクロフォーカス CT 等で検討したところ乳前歯には著しい咬耗が観察され、石灰化の程度が不良であることが明らかとなった。FGFR1 の遺伝子変異部位や内分泌検査所見との関係について詳細に検討し、その結果の一部を学会発表(第 26 回日本障害者歯科学会総会および学術大会)した。

患者より提供された抜去歯を用いて咬合による影響を受けにくい歯頸部において  $\mu$  CT にて詳細に検索を行ったところ、前歯においては石灰化の状態が低下している事が明らかとなった。一方、臼歯においてはその影響は少なかったが、歯質の厚みにおいては前歯ならびに臼歯ともに対象者に比べ薄い事が明らかとされた。以上の結果より、歯質の石灰化状態の不良ならびに歯質の厚みが薄い事が、本症候群の咬耗等の原因として考えられた。今後モデル動物ならびにヒトにおける原因の究明と、その分子生物学的機構など詳細な検討を継続する必要があると考えられた。

(3) 上皮特異的な *Fgfr2* CKO マウスの検索  
*Fgfr2* コンディショナル KO マウスにおいては、歯ならびに口蓋形成の各発育ステージでの変化を病理組織学的ならびに In situ Hybridization 等も併用し、関連遺伝子の発現変化を含め詳細に検討した。上皮の *Fgfr2* が歯ならびに口蓋の形態形成に重要な役割を果たしており、その制御遺伝子の役割も一部解明された。その成果は 2009 年に論文掲載された(雑誌論文②)。

(4) *FRS2*  $\alpha$  部分欠損マウスの検索

胎生期の同マウスをマイクロ CT にて検索したところ、野生型マウスと比較して石灰化状態は不良であった。病理組織学的検索したところ、本欠損マウスにおいては、口蓋裂が見られることが明らかとなった。加えて、歯においては野生型マウスと比べて胎生一日程度の形成の遅れが観察され、象牙芽細胞の分化不全、エナメル質ならびに象牙質の形成不全が観察された。

2010 年その一部を学会発表(第 47 回日本小児歯科学会大会ならびに 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologist)を行った。細胞分化能とアポトーシスを E12.5、E13.5、E14.5、

E15.5、E17.5 の各ステージにおいて検査したところ、細胞分化能の低下が本マウスの病態の誘因と考えられた。歯ならびに口蓋裂におけるその分子生物学的機構、下流の遺伝子制御に関しては本研究期間中にはその確証を得られるような結果はなかったが、現在成長因子、接着因子の発現差を中心に検討を続けている。

その詳細を 2010 年に Gordon Research Conference on Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration にて 2011 年に 89th IADR にて発表を行った。

## 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 2 件)

①R Hosokawa, X Deng, K Takamori, X Xu, M Urata, P Bringas Jr., Y Chai, Epithelial specific requirement of FGFR2 signaling during tooth and palate development, J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 査読有, 312B (4), 2009, 343-50

②K. Takamori, R. Hosokawa, X. Xu, X. Deng, P. Bringas, Jr., Y. Chai, Epithelial Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Regulates Enamel Formation, Journal of Dental Research, 査読有, 2008, 87・3, 238-243

[学会発表] (計 5 件)

①Kazunori Takamori, *FRS2* is important role of Palate Development and Tooth Differentiation, 89th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research General Session and Exhibition, 3/19/2011, San Diego, California, U.S.A

②Kazunori Takamori, Masataka Ito, Junko Imaki, Noriko Goto, Shigeru Watanabe, *FRS2*  $\alpha$  is curial role of the Palate Development and Odontogenic Cells Differentiation, 2010 Gordon Research Conference on Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration, 4/13/2010, Ciocco in Lucca (Barga), Italy

③高森一乗, 渡部 茂 (共同研究者: 大山建司, 緒方 勤, 長谷川奉延)、Kallmann 症候群の歯科学的検索、第 26 回日本障害者歯科学会総会および学術大会、平成 21 年 10 月 31 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

④K Takamori, M Ito, J Imaki, N Goto, S

Watanabe, Craniofacial and tooth phenotypes of *FRS2*  $\alpha^{2F/2F}$  mice, 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 平成21年5月30日, 朱鷺メッセ(新潟市)

⑤高森一乗, 渡部 茂, 共同研究者: 伊藤正孝, 今城純子, 後藤典子, *FRS2*  $\alpha$  部分欠損マウスの口蓋ならびに歯の形態形成に関して、第47回日本小児歯科学会大会、平成21年5月15日、大阪大学コンベンションセンター (大阪市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高森 一乗 (TAKAMORI KAZUNORI)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号: 60256899