

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592587

研究課題名（和文） RNA干渉を用いた下顎のパターン形成期におけるFGF受容体機能の分子生物学的解析

研究課題名（英文） An analysis of the role of FGF receptors in early mandibular patterning by using RNA interference

研究代表者

寺尾 文恵（TERAO FUMIE）

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：10510018

研究成果の概要（和文）：

ラット胎生期下顎隆起におけるFGF受容体（FGFR）遺伝子の発現パターンを検討した。さらに下顎隆起由来細胞の高密度培養においてFGFシグナルを活性化したところ、FGF-FGFRシグナルの下流にあるERK(extracellular signal-regulated kinase)のリン酸化の亢進が認められた。また、FGFR2cのshort hairpin RNA (shRNA)ベクターを下顎培養器官へ導入したところ、メッケル軟骨形態の変化が認められた。以上の結果より、FGF受容体は胎生期下顎の形態形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the gene expression pattern of FGFR genes in early mandibular development in rats. In the mandibular cell micromass culture, the activation of FGF-FGFR signal by recombinant FGF treatment enhanced endogenous ERK (extracellular signal-regulated kinase) phosphorylation. The transfection of induced by the electroporation of an Fgfr2c short hairpin RNA (shRNA) vector altered the shape of Meckel's cartilage. These results indicate that FGFR plays an important role during early mandibular morphogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：矯正・小児系歯学

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：FGF受容体 下顎隆起 器官形成 RNA干渉

1. 研究開始当初の背景

FGFRには1～4型の4種類のホモログが存在し、選択的スプライシングによる数多くのア

イソフォームが同定されている。Fgfr遺伝子の突然変異が、ヒトでは軟骨無形成症やクルーゾン症候群、アペール症候群、ジャクソン・ワイス症候群など、頭蓋骨間の縫合の早期癒合を引き起こすことから、FGFRは、軟骨形成、頭蓋顔面の骨格形成において重要な役割を果たしていると考えられている。哺乳動物ではさらに、胎生期の顔面領域では、これらのFgfr遺伝子が時間的・空間的に特徴的な発現パターンを示すことが知られている。ことに、Fgfr2はアイソフォームによって間葉細胞のみに発現しているもの、あるいは上皮細胞のみに発現しているものがあることが報告されている(Mina et al. 2007)。このように、個々のFGF受容体とリガンドであるFGFとがそれぞれに特徴的な空間的発現パターンを有することでFGFシグナル伝達系が領域特異的な組織分化の制御に貢献し、顎顔面骨格のかたちや大きさの決定に重要な役割を果たしているものと考えられる。

これまで、申請者らは独自に開発した胎生期ラット下顎器官培養系に対するエレクトロポレーション法による遺伝子導入によりFibroblast growth factor 10 (FGF10)が発生期の下顎隆起の形態形成において重要な役割を果たすことを示した。胎生期下顎隆起の上皮および内部の間葉にはFGF10以外にも様々なFGFが発現し、下顎のパターン形成に関わっており、この時間的空間的なFGFによる制御はFGF受容体を介して行われている。本研究では、このFGF受容体に注目し、FGF受容体を介したシグナル伝達経路が下顎の形態形成を制御する分子メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

本研究は、顎顔面の形態形成において重要な役割を果たすと考えられているFGFR1およびFGFR2の下顎器官形成における表現型への関与と、そのメカニズムを解明する事を目的として、そのメッケル軟骨の形態形成に果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)FGFR 遺伝子と軟骨分化マーカー遺伝子の発現パターン解析

実験動物として胎齢 12 日の SD 系ラットを使用し、実体顕微鏡下にて胎仔から下顎隆起部を摘出、改良型 Trowell 法により器官培養を行う。培地にはアスコルビン酸添加無血清 BGJb 培地を用いる。培養開始後 3 時間、1、2、

3 および 4 日目培養器官を 4% パラフォルムアルデヒド溶液にて固定し Whole mount *in situ* hybridization 法を用いて FGFR 遺伝子および軟骨細胞特異的遺伝子の発現パターンの変化について検討する。

(2)下顎隆起由来細胞の高密度培養

ラット胎仔より摘出した下顎隆起部から側方部を摘出し、細胞を分散させ、 2×10^7 cell/ml に再懸濁し、24 穴培養プレートに 20 μ l ずつ滴下し、CO₂ インキュベーター内で 5%CO₂, 37°C 下で 3 時間培養を行った後に、10% ウシ胎仔血清含有の DMEM 培地を 1ml 加えた。翌日、ヒトリコンビナント FGF10 蛋白を添加した培地へと交換する。

(3)FGF シグナルとその下流にある ERK の活性化解析

下顎隆起側方部由来の高密度培養を行った細胞より、Na-orthovanadate, NaF, aprotinin, leupeptin および phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 含有のバッファーを用いてタンパクを抽出する。タンパク濃度は MicroBCA protein assay kit を用いて測定し、12.5%SDS-PAGE に泳動後、ニトロセルロースメンブレンへ転写し、western blotting 法による解析を行う。まず、ERK-1/2 について、総量を確認するために非リン酸化 ERK 抗体を用いて化学発光法により検討する。さらにこのメンブレンより抗体を除去し、新たにリン酸化 ERK1/2 抗体を用いて解析を行う。

(4) shRNA の導入と下顎隆起器官培養

胎齢 12 日のラット胎仔より下顎隆起を摘出し、器官培養する。培養開始 3 時間後にエレクトロポレーション法および microinjection 法により ratFGFR2 の shRNA ベクターを下顎隆起側方部に遺伝子導入する (図 1)。

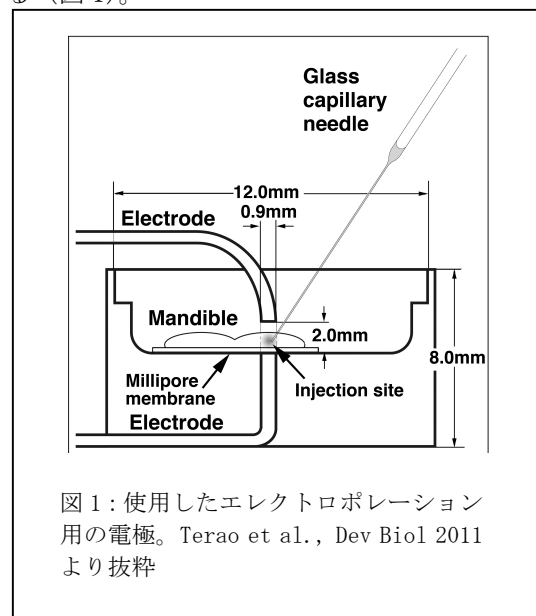


図 1: 使用したエレクトロポレーション用の電極。Terao et al., Dev Biol 2011 より抜粋

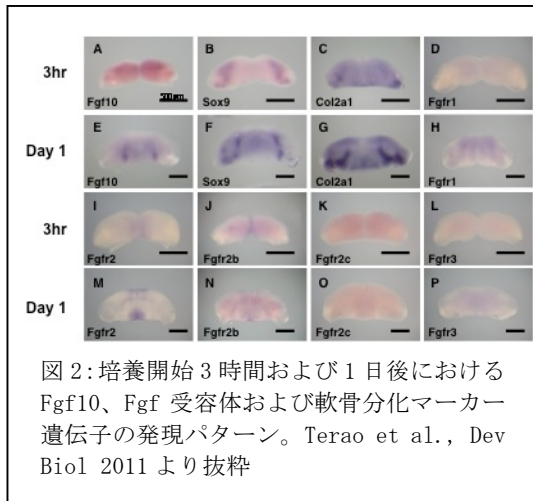
(4) アルシアンブルー染色法による検討

培養開始後 1, 2, 3, 4 および 7 日目にアルシアンブルー染色を施し、メッケル軟骨の形態を観察する。

4. 研究成果

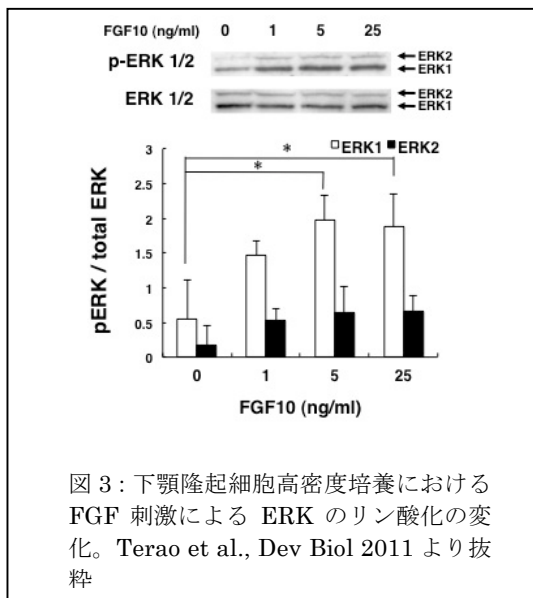
(1)FGFR の WMISH

FGFR1、FGFR2およびFGFR3 の発現パターンを解析した。FGFR2については、スプライシングバリエーションであるFgfr2bとFgfr2cについても解析を行った。FGFR1 およびFGFR2 は、器官培養開始時にあたる胎齢 1 2 日目の下顎隆起において間葉系細胞に発現が認められた。FGFR2b は上皮に弱く発現が認められ、FGFR2c も弱く発現が認められた (図2)。



(2)FGF 添加による ERK の活性化の変化

側方部下顎隆起由来細胞の高密度培養に FGF10 タンパクを添加することにより、FGF 刺激を加えたところ、FGF-FGFR シグナルの下流にある ERK のリン酸化が促進された (図3)。



(3)FGFR の shRNA ベクター作製とエレクトロポレーション法による局所的 FGFR 阻害

FGFR2c の shRNA ベクターを作製し、培養した下顎隆起の側方部へインジェクション、エレクトロポレーションを行った。その後 7 日間培養し、アルシアンブルー染色を行った結果、shRNA ベクター導入領域において、メッケル軟骨形態の変化が認められた (図 4 矢印)。これにより、Fgfr2c がメッケル軟骨形成において、何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。



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 8 件)

- (1) Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats. Dev. Biol. 350, 337-347, 2011 査読有り
- (2) Takahashi I, Terao F, Suzuki M, Kawamura H, Takano-Yamamoto T. Mandibular body lengthening by distraction osteogenesis for correction of skeletal class II problems with an impacted premolar. J. Oral. Maxillofac. Surg. 68, 2893-2902, 2010. 査読有り
- (3) Takahashi I, Kawamura H, Takano-Yamamoto T Combined maxillary and mandibular midline and mandibular ramous distraction osteogenesis for treatment of a Class II patient with use of implants as orthodontic anchorages. Am J Orthod Dentofac Orthop. 137, 412-423, 2010. 査読有り
- (4) Takahashi I, Masuda T, Kohsaka K, Terao F, Anada T, Sasano Y, Takano-Yamamoto

- T, Suzuki O Molecular Mechanisms of Mechanical Stress Response during Chondrogenesis J Biochem Sci Eng. 4, 307-317, 2009. 査読有り
- (5) Sato S, Tsuchiya M, Komaki K, Kusunoki S, Tsuchiya S, Haruyama N, Takahashi I, Sasano Y, Watanabe M Synthesis and intercellular transportation of type I procollagen during functional differentiation of odontoblast. Histochem Cell Biol. 131, 583-591, 2009. 査読有り
- (6) Hagiwara Y, Ando A, Chimoto E, Tsuchiya M, Takahashi I, Sasano Y, Onoda Y, Suda H, Itoi E Expression of collagen type I and II on articular cartilage in a rat knee contracture model. Connect Tissue Res. 51, 22-30, 2010. 査読有り
- (7) Shimonishi M, Takahashi I, Terao F, Komatsu M, Kikuchi M Induction of MMP-2 at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. J Periodontal Res. 45, 309-316, 2010. 査読有り

〔学会発表〕 (計 6 件)

- (1) Terao F, FGF10 contributes Meckel's cartilage formation in early mandibular development. 2011 年 8 月 8, 9 日 The 6th International Workshop on Nano-,Bio- and Amorphous Materials, Zao, Miyagi
- (2) 第 29 回日本骨代謝学会学術集会優秀ポスター賞
寺尾文恵、高橋一郎、三谷英稔、春山直人、笹野泰之、鈴木治、山本照子. 胎生期下顎形成期における FGF10 によるメッケル軟骨形態の制御、2011 年 7 月 28-30 日、第 29 回日本骨代謝学会学術集会、大阪
- (3) Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T: Fibroblast growth factor 10 and Meckel's cartilage formation in the early mandibular morphogenesis. 第 5 回口腔組織の再生・再建医療研究国際シンポジウム, February 5, 2010, Fukuoka, Japan
- (4) 出口徹、寺尾文恵、菅原康代、片岡伴記、山城隆、山本照子 ミニスクリューを固定源として用いたラビアルおよびリンガルブラケット装置による臨床評価の比較・検討 第 69 回日本矯正歯科学会大会 2010 年 9 月 29 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

- (5) 高坂久美子、高橋一郎、益田泰輔、寺尾文恵、鈴木治、山本照子 機械的伸展刺激は ERK-1/2 の活性化を介して軟骨細胞分化を阻害する 第 69 回日本矯正歯科学会大会 2010 年 9 月 29 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (6) Takahashi I, Masuda T, Kohsaka K, Terao F, Anada T, Sasano Y, Takano-Yamamoto T, Suzuki O Intracellular signal transduction during mechano-response in differentiating chondrocytes. JSPS-KO SEF Asian Core Program, Nano/Amorphous Materials and Interface Science Symposium 2009.8.7 Tohgatta, Miyagi.

〔図書〕 (計 1 件)

Takahashi I, Masuda T, Kohsaka K, Terao F, Anada T, Sasano Y, Takano-Yamamoto T, Suzuki O.

Molecular mechanisms of the response to mechanical stimulation during chondrocyte differentiation. Interface Oral Health Science 2009 53-59, 2010 Springer, New York.

〔その他〕

<http://www.ortho.dent.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 文恵 (TERAO FUMIE)

九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：10510018

(2) 研究分担者

高橋 一郎 (TAKAHASHI ICHIRO)

九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：70241643