

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592993

研究課題名(和文) 組織幹細胞を用いたドライマウスの新しい治療法の開発

研究課題名(英文) New treatment of dry mouth with tissue stem cells

## 研究代表者

大山 順子 (Ohyama, Yukiko)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70294957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞を用いてドライマウスの症状を改善させることを目的とし、唾液腺の分化を誘導する成長因子の検討を行った。

線維芽細胞増殖因子(FGFs)は唾液腺発生過程で分枝形成を促進させるサイトカインで、その受容体(FGFR)の中で特にFGFR2は唾液腺形成との関連性が示唆されている。われわれは、胎仔唾液腺にFGF2を作用させることでFGF2cが唾液腺の発生に重要であること、さらにFGF2bとFGF2cのオートクライン作用を介したシグナル伝達の相互作用が分枝形成を制御する作用機構を確認した。

研究成果の概要(英文)：To improve the symptoms of dry mouth using mesenchymal stem cells, we examined the growth factors that induce differentiation of the salivary glands.

Fibroblast growth factors (FGFs) are cytokines that activate branching morphogenesis for salivary gland (SG) development and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is one of the FGF receptors and especially is thought to be related with SG development. We demonstrated the importance of FGFR2c in SG development by treatment of embryos with FGF2 and an efficient mechanism by which signaling crosstalk between FGFR2b and FGFR2c regulate branching morphogenesis via interaction with autocrine factors.

研究分野：口腔外科学

キーワード：ドライマウス 唾液腺分化 FGF 唾液腺再生

## 1. 研究開始当初の背景

ドライマウスはシェーグレン症候群(SS)、放射線障害、加齢、薬剤性など種々の原因で発生するが、近年その患者数は増加している。口腔乾燥のみならず、味覚障害、摂食障害、誤嚥性肺炎の原因になるなど QOL の著しい低下の原因となり、高齢化社会の進む日本においては治療法の確立が急務である。しかしながら現時点では SS や放射線障害によるドライマウスに対してムスカリン受容体アゴニストの投与を行う以外は保湿剤の使用などによる症状緩和以外の方法がないのが現状である。

近年 ES 細胞(胚性幹細胞)や iPS 細胞(人工多能性幹細胞)さらに組織幹細胞と呼ばれる細胞の存在も明らかになり、これらの幹細胞を用いた研究に伴い、再生療法の研究が急速に進歩してきており、新たな治療法として脚光を浴びている。

本研究では種々の疾患で行われているように、間葉系幹細胞をモデルマウスに移植して用いて症状改善のメカニズムを探り、最終的にドライマウスの症状改善をはかることを目的としたが、その過程で幹細胞を唾液腺への分化方向へと誘導する必要が生じてきた。

## 2. 研究の目的

多くの上皮性器官の形成は、発生の時期によって特定の間葉組織との相互作用が行われており、様々な調節性分子の影響を受けながら最終的に器官特異的な構造や機能を獲得する。特に、上皮芽の増殖と分枝として定義される分枝形成は、唾液腺、肺、腎臓、膵臓、乳腺などの発達性上皮性器官における基本的かつ不可欠な発生過程であり、その発達は多くの増殖因子による多様な調節機構によって厳密に制御されていることが多くの研究から明らかとされてきている。しかしながら、これまでさまざまな増殖因子を始めとする調節性分子と唾液腺発生との関連性が示唆されているにもかかわらず、その調節機構は未だ明らかとなっていない。

線維芽細胞増殖因子(FGF)は唾液腺の分枝形成に関わる主要な増殖因子の1つと考えられている。FGFは23種類のファミリーから成る増殖因子で、分枝形成を含む発達過程において必須である。これらのFGFはその特異的な受容体(FGFR)との結合の組み合わせによって多様な機能制御機構を構築している。FGFRは現在1から4までの4つのファミリーの存在が明らかとなっており、FGFR2のアイソフォームの一つであるFGFR2b(FGFR2 b)欠損マウスやFGFR2遺伝子改変マウスでは唾液腺の発達不全が認められ、FGF10欠損マウスでは唾液腺、胸腺、下垂体の欠損が認められる。一方、もう一つのアイソフォームであるFGFR2c(FGFR2 c)と唾液腺の分枝形成の関連性については報告がない。

そこで間葉系幹細胞を唾液腺への分化方向へと誘導してモデルマウスに移植するその条件設定を行う目的で胎生期マウス顎下腺発育(分枝形成)におけるFGFR2cの役割について検討した。

## 3. 研究の方法

1) 各胎齢における FGFR アイソフォームの mRNA 発現: E12.5-18.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基から Total RNA を抽出し RT-PCR 法にて増幅しアガロースゲルにて電気泳動を行った。

2) FGF10 と FGF2 の分枝形成に対する影響の解析: E13.5 の胎仔マウスから抽出した顎下腺原基に対して、FGF10 (100 ng/mL) または FGF2 (100 ng/mL) 溶媒のみを加えた群、FGF10 または FGF2 で処理をした群、PD16570 (100 nM) 存在下に FGF10 または FGF2 を作用させた群を設定し 48 時間器官培養を行った。培養開始から 1 時間後と 48 時間後の分枝形成数を顕微鏡にて撮影した。

3) FGFR2c を介したシグナルによる分枝形成の促進作用: E13.5 の胎仔マウスから抽出した顎下腺原基に対して、FGF10 (100 ng/mL) または FGF2 (100 ng/mL) 溶媒のみを加えた群、FGF10 または FGF2 で処理をした群、FGFR2c 中和抗体 (400 ng/mL) 存在下に FGF10 または FGF2 を作用させた群を設定し、48 時間器官培養を行い、培養開始から 1 時間後と 48 時間後の分枝数を測定した。また、FGFR2c 中和抗体の存在下もしくは非存在下に FGF2 処理を行い、48 時間器官培養後組織破碎液から抽出した上清を調製し、ウエスタンブロッティング法にて解析した。

4) FGF10 のオートクラインと FGF2c を介したシグナルの関連性: E12.5-18.5 の各胎生期マウス顎下腺原基、FGFR2c 中和抗体 (400 ng/mL) の存在下もしくは非存在下で、外因性の FGF2 処理を行い、48 時間の器官培養を行った組織からリアルタイム PCR 法を用いて *Fgf10* の発現量の解析を行った。さらに、FGF10 中和抗体 (50 ng/mL) 存在下もしくは非存在下に FGF2 (100 ng/mL) 処理を行い、48 時間の器官培養を行い、培養開始から 1 時間後と 48 時間後の分枝数を計測した。

## 4. 研究成果

1) 各胎齢における FGFR アイソフォームの mRNA 発現量の比較

各胎齢 (E12.5-18.5) のマウス顎下腺原基における各 *Fgfr* の mRNA 発現量は、胎生 E12.5-13.5 の顎下腺原基では、その他の *Fgfr* アイソフォームの mRNA 量と比較して、*Fgfr2b* と *Fgfr2c* が強く発現し E14.5 以降で著明に減少した (図 1)。

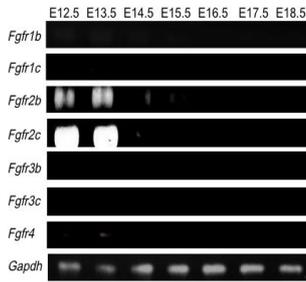


図 1. 各胎齢における FGFR アイソフォームの mRNA 発現量の比較

## 2) マウス唾液腺における FGF10 と FGF2 の分枝形成に対する影響

次に、FGF10 と FGF2 が唾液腺の分枝形成に与える影響を検討した。

FGF10 を単独で処理した群と FGFR の阻害剤である PD161570 の存在下で FGF10 を処理した群、FGF10 の溶媒のみの対照群で 48 時間器官培養を行ったところ、対照群と比較して、FGF10 単独群では分枝形成数が増加したが、PD 161570 処理群では分枝数が増加せず（図 2A）対照群と FGF10 群、および FGF10 単独群と PD 161570 で処理した群の間の分枝数に有意差を認めた（図 2B）。

一方 FGFR2c と結合することが知られる FGF2 を単独で処理したものと、PD161570 の存在下に FGF2 で処理したものを、対照群で 48 時間器官培養を行ったところ、対照群と比較して、FGF2 単独群では形成された分枝数が増加したが、PD 161570 で処理した群では、この分枝形成数の増加が抑制され（図 2C）分枝形成数は対照群と FGF2 群、および FGF2 単独群と PD 161570 群の間にはそれぞれ有意差を認めた（図 2D）。

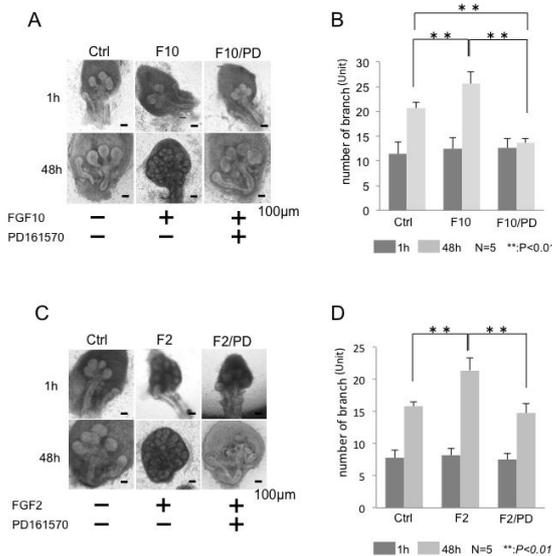


図 2. FGFR2 を介した唾液腺分枝形成の促進作用

(A)(B)は FGF10 処理、(C)(D)は FGF2 処理下での器官培養開始から 1 時間、48 時間後の顕微鏡像(A)(C)と分枝数(B)(D)。

## 3) FGFR2c を介したシグナルによる分枝形成の促進作用

さらに FGFR2c と唾液腺の分枝形成数の関連性を確認するために、FGFR2c の特異的中和抗体が分枝形成数に与える影響について検討した。外因性の FGF10 または FGF2 で処理した群、FGFR2c 中和抗体存在下に FGF10 または FGF2 で処理した群、および FGF10 または FGF2 の溶媒のみを加えた対照群を設定し、48 時間器官培養を行ったところ、FGF10 単独群では、対照群と比較して分枝形成数が増加したが、FGFR2c 中和抗体を添加しても有意な変化は認められなかった（図 3B）。一方、FGF2 単独群では対照群と比較して分枝形成数が増加し、この分枝形成数の増加は FGFR2c の中和抗体存在下では抑制された（図 3D）。すなわち、FGF2 による唾液腺の分枝形成促進作用は、FGFR2c を介したシグナル伝達に関わっていることが示された。FGF2 は FGFR2c に結合し、その結果、細胞増殖などに重要な分子である ERK をリン酸化することが知られている。そこで、マウス顎下腺原基への FGF2 処理における ERK のリン酸化状態についてウエスタンブロッティング法にて検討した。その結果、FGF2 単独の処理を行った群で ERK のリン酸化を認めた。また、FGFR2c の中和抗体存在下では、この FGF2 によるリン酸化は認められなかった（図 3E）。

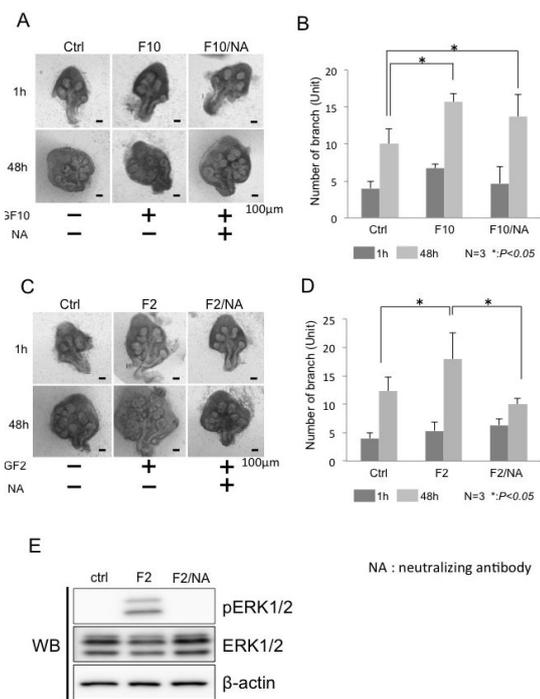


図 3. FGFR2c を介したシグナルによる分枝形成の促進作用

(A)(B)は FGF10 処理、(C)(D)は FGF2 処理下での器官培養開始から 1 時間、48 時間後の顕微鏡像(A)(C)と分枝数(B)(D)。(E) FGFR2c 中和抗体の存在下もしくは非存在下に FGF2 処理を行い、48 時間器官培養後のウエスタンブロッティング。

#### 4) FGF10 のオートクラインと FGF2c を介したシグナルの関連性

最後に FGFR2c シグナルが唾液腺の分枝形成を促進する作用機序について検討した。FGF を含めた多くの増殖因子がパラクラインやオートクラインを誘導する作用をもつ。これによって、標的組織の分化や細胞増殖が活性化され、非常に迅速かつ正確な分枝形成が可能となる。胎生期の唾液腺発生においても、FGF2 による FGFR2c を介したシグナルの活性化によって新たに FGF10 が産生されているのではないかと考えた。

E12.5-18.5 の各胎生期マウス顎下腺原基の *Fgf10* の発現量は他の時期と比較して、E12.5-13.5 において増加を認めた (図 4A)。次に FGFR2c 中和抗体の存在下もしくは非存在下で、外因性の FGF2 処理を行い、48 時間の器官培養を行い *Fgf10* の発現量を解析したところ、対照群と比較して FGF2 処理群は *Fgf10* の発現量の増加を認めた。またこの促進作用は FGFR2c 中和抗体存在下では認められなかった (図 4B)。さらに FGF10 中和抗体存在下もしくは非存在下に FGF2 処理を行い、48 時間の器官培養を行い、培養開始から 1 時間後と 48 時間後のマウス顎下腺原基を顕微鏡下に観察、撮影した (図 4C)。また形成された分枝数を計測したところ、FGF2 によって処理をしたものでは対照群と比較して分枝形成数が増加し、この分枝形成数の促進作用は FGF10 の中和抗体存在下では抑制された (図 4D)。したがって FGFR2c シグナルによって産生された FGF10 は共に発現している FGFR2b を介して分枝形成を促進していることが示唆された。

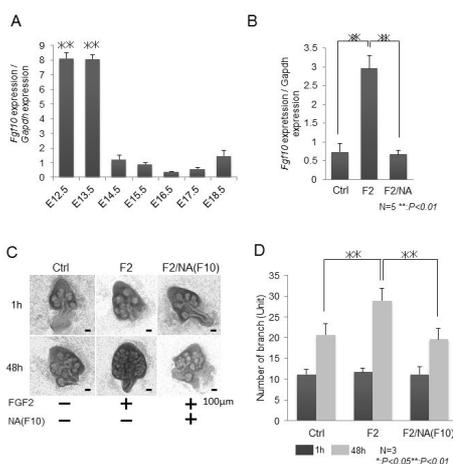


図 4. *Fgf10* 発現量と FGFR2c シグナルの関連性

E12.5-18.5 の各胎生期マウス顎下腺原基の *Fgf10* の発現量の解析 (A)。FGFR2c 中和抗体 (400 ng/mL) の存在下もしくは非存在下で、外因性の FGF2 処理を行い、48 時間の器官培養を行った後の *Fgf10* の発現量の解析した (B)。FGF10 中和抗体 (50 ng/mL) 存在下もしくは非存在下に FGF2 (100 ng/mL) 処理を行い、器官培養開始から 1 時間後と 48 時間後のマウス顎下腺原基像 (C) と分枝数 (D)。

以上の結果から、FGFR2b と FGFR2c の両受容体を介したシグナルによって、迅速かつ正確な分枝形成を可能とする効率的な制御機構を構築していると考えられた。

今回の結果から幹細胞でも同様の制御機構を検討して、幹細胞から唾液腺組織への分化を誘導して移植を行うことで、唾液腺再生を効率的に行うことができ、再生唾液腺を用いたドライマウスの治療を行うための一助と考えている。

#### 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)

Shibuya M, Ohyama Y et al. (9人中4番目): Efficient regulation of branching morphogenesis via fibroblast growth factor receptor 2c in early-stage embryonic mouse salivary glands. Differentiation, (査読有) 2016 May 17. pii: S0301-4681(15)30084-0. doi: 10.1016/j.diff.2016.05.005.

[学会発表](計1件)

渋谷 南他、マウス唾液腺分枝形成における FGFR2c の発現と上皮間葉転換の関連性、第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会、愛知県・名古屋市

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大山 順子 (OHYAMA, Yukiko)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 70294957

##### (2) 研究分担者

城戸 瑞穂 (KIDO, Mizuho)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号: 60253457

梶岡 俊一 (KAJIOKA, Shunichi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号: 90274472