

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592113

研究課題名（和文）

発生と再生過程での FGF と BMP の相互作用解明から骨再生制御治療システムへの応用
研究課題名（英文）Analysis of regulation system by FGF and BMP in the bone development and regeneration

研究代表者

河井 まりこ（KAWAI MARIKO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40379839

研究成果の概要：先天性異常や外傷あるいは腫瘍などで欠失した骨の再生治療は患者の生活の質(Quality of Life :QOL)を高める上で非常に重要である。これまでの治療は自家骨移植や人工骨による外科的治療法が主であり、患者への負担が非常に大きいものである。われわれは生体本来の骨の再生過程あるいは発生過程における骨誘導因子などの成長因子の相互作用をニワトリ胚における遺伝子操作技術ならびにマウスの遺伝子改変動物を用いて明らかにすることで新たな骨再生治療法への応用を目指した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：解剖学(発生学を含む), 再生医学
 科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科
 キーワード：発生、再生、骨

1. 研究開始当初の背景

われわれは骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein: BMP)に着目した骨再生遺伝子治療の確立を目指して来た。しかし、単一の遺伝子のみでは時間的かつ空間的な制御機構を組み込むことが困難で、単に”骨ができた”という段階に留まり、臨床応用につなげることが難しいと思われた。一方、生体内での実際に行われている骨再生や骨発生過程では BMP のみならず、他の成長因子による相互作用による緻密な制御機構を有した再生ある

いは発生過程を経て骨が形成される。これらの制御機構の全容は明らかになっておらず、特に線維芽細胞増殖因子である FGF は BMP による骨誘導現象において、少量ではその作用を増強させ、一方、多量では逆にその作用を減弱させるという、量依存的に関与することが知られているものの、そのメカニズムについての全容は明らかではない。

2. 研究の目的

BMP による骨誘導過程において、FGF がその作用を増強あるいは減弱させるという現象

について、そのメカニズムを明らかにする。また、骨誘導過程のみならず、骨発生過程における FGF と BMP の相互作用による時空的制御機構を明らかにする。具体的には FGF のシグナル経路に着目し、この経路に BMP の関与があるかどうかを解析していく。これらの結果を骨再生治療法での時空的制御機構への応用に結びつけていく。

3. 研究の方法

(1) FGFR1, FGFR2, sprouty の遺伝子抑制あるいは過剰発現状態でのニワトリ顎骨ならびに頭蓋顔面骨形成の表現型の同定: 骨発生過程での FGF と BMP との相互作用を明らかにするため、胚における遺伝子操作が比較的容易なニワトリ胚を用いて、FGF のシグナル関連因子の遺伝子の過剰あるいは抑制状態での骨形成過程の表現型をまず、明らかにする。

(2) 顎骨ならびに顎顔面骨発生過程における FGF 関連因子ならびに BMP 遺伝子の発現パターンの解析: (1) におけるニワトリ胚における FGF シグナルの過剰あるいは抑制状態での骨発生過程において、FGF 関連因子ならびに BMP の遺伝子発現パターンを *in situ hybridization* により解析する。

(3) Fgfr コンディショナルノックアウト動物における骨形成能の同定: マウスにおける Fgfr1 コンディショナルノックアウトマウスにおける骨発生過程を野生型マウスとの比較により、表現型を同定する。

(4) fgfr コンディショナルノックアウトマウスの骨形成過程における FGF ならびに BMP 関連因子の遺伝子発現パターンの解析: *in situ hybridization* にて FGF ならびに BMP 関連因子の遺伝子発現パターンを明らかにする。

(5) Fgfr1 コンディショナルノックアウト動物からの細胞樹立と骨誘導の評価: FGF 受容体のコンディショナルノックアウトマウスから未分化間葉系細胞ならびに骨芽細胞の

単離を行う。これらの細胞を長期培養し、骨誘導能の評価を組織学的ならびに生化学的に行う。

(6) Fgfr 1 コンディショナルノックアウト細胞の骨誘導過程における FGF ならびに BMP シグナル関連因子の遺伝子発現パターンの解析: 骨誘導あるいは骨再生過程での FGF と BMP との相互作用を解析するため、(5) で樹立したこれらの細胞の骨誘導過程における FGF ならびに BMP 関連因子の遺伝子発現パターンを解析する。

(7) 樹立細胞での FGF と BMP との相互作用解析: (5) にて樹立した細胞において、リコンビナント BMP タンパクを添加し、その骨誘導の変化を組織学的ならびに生化学的に解析を行う。

4. 研究成果

(1) FGFR1, FGFR2, sprouty の遺伝子抑制あるいは過剰発現状態でのニワトリ顎骨ならびに頭蓋顔面骨形成の表現型: FGFR1 ならびに FGFR2 をニワトリ胚にて抑制した場合、図に示すようにコントロール群と比較し、FGFR1、FGFR2 の発現を抑制したニワトリ胚での顎顔面骨の形成は下顎長が短く、一部の骨欠損、さらに上顎骨においても一部骨欠損が認められた。また、FGF シグナリングの下流因子である sprouty を過剰発現した場合には、上顎骨の一部骨欠損に加え、下顎骨の形成において、骨欠損ならびに弯曲が認められた。また、図 2 に示すように、FGF シグナルの抑制側の下顎骨ではコントロール側に比較し、組織学的に未熟な骨形成を示した。また、矢状断面においては上顎骨の一部欠損も認められたが、上顎骨においては、下顎骨のような未熟な骨形成ははっきりと認められなかった。また、sprouty の過剰発現胚における骨形成能の組織学的解析により、下顎骨の弯曲が認められたものの、骨形成において

はメッケル軟骨ならびに骨基質においても大きな違いは認められなかった。

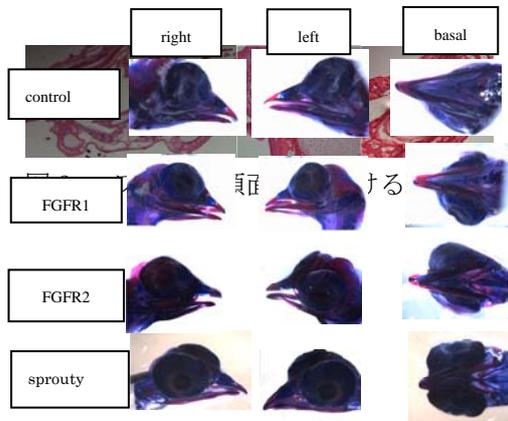


図 1 ニワトリ顎顔面骨格標本

(2) 顎骨ならびに顎顔面骨発生過程における FGF 関連因子ならびに BMP 遺伝子の発現パターン:ニワトリ胚における FGF シグナルの過剰あるいは抑制状態において、FGF ならびに BMP 関連因子の遺伝子発現解析を行ったところ、RunX2 の遺伝子発現にコントロール群との差を認めた。

(3) Fgfr コンディショナルノックアウト動物における骨形成能:マウスにおける FGF シグナルの抑制状態においてもニワトリと同様な表現型が認められるかを解析した結果、頭蓋骨においては野生型と比較し、その骨長に有意な差を認め、また、生化学的解析においても骨形成能の低下が認められた。

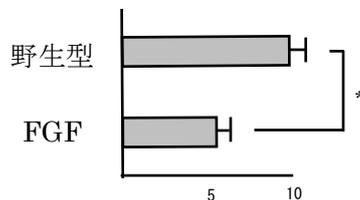


図 3. 骨形成能の測定

(4) fgfr コンディショナルノックアウトマウスの骨形成過程における FGF ならびに BMP 関連因子の遺伝子発現パターン:FGF ならびに BMP 関連因子、さらに骨形成関連因子について、その遺伝子発現パターンを解析した結果、

FGFR 3 ならびに FGF18 の発現が野生型と比較し、有為な差を認めた。

(5) Fgfr1 コンディショナルノックアウト動物からの細胞樹立と骨誘導:樹立した細胞を 2-3 週間の長期培養を行った結果、図 4 に示すように野生型から樹立した細胞と比較し、変異型マウスからの細胞は骨誘導能が低いことが示された。

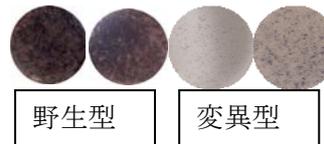


図 4.細胞培養系の骨誘導能

(6) Fgfr 1 コンディショナルノックアウト細胞の骨誘導過程における FGF ならびに BMP シグナル関連因子の遺伝子発現パターン:野生型と比較し、変異型の細胞では、骨誘導過程において、FGFR3 の発現ならびに MAPK 関連因子の発現に差が認められた。

(7) 樹立細胞での FGF と BMP との相互作用:樹立した細胞を用いて、骨誘導培地で培養を開始する時点で BMP を添加した場合、図で示すように、野生型の細胞は BMP 添加により、骨誘導能が高まった。一方、変異型細胞では BMP 添加時においても、大きな骨誘導能変化が認められなかった。

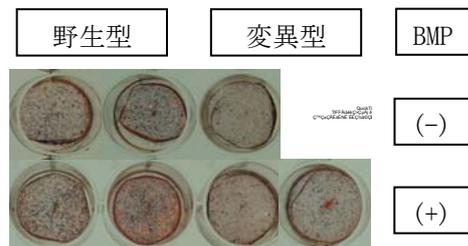


図 5.BMP と FGF との関係性

これらの結果から、FGF シグナルの抑制下における骨誘導においては、BMP による骨誘導能の増強が認められなかった。一方、BMP による骨誘導能においては、少量の FGF はその骨誘導能を高め、多量の FGF は BMP による骨

誘導能を低下させる。今回、FGF のシグナルがノックアウトされた状態ではBMPによる骨誘導能の救済がなされないことが示唆された。一方、骨発生過程におけるニワトリ胚やマウスを用いた実験系においては、FGF の他のファミリーや受容体の関与が大きいことが示唆された。以上より、FGF シグナルは骨発生過程ならびに骨誘導、再生過程において、その抑制ならびに過剰状態においては骨形成能の低下を引き起こす。また、FGF シグナルを遮断すると、BMP による骨誘導能のリカバリーが認められず、BMP は FGF と共通のシグナル経路を有し、また、より上流での相互作用が存在す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4件)

- (1) 河井まりこ、秦 正樹、山本敏男、FGF とBMPの相互作用による骨誘導制御システムの構築. 医薬ジャーナル. 19. 46-48. 2008.
- (2) 河井まりこ、中高齢者の口腔・咀嚼機能向上を目的とした日帰り歯槽骨再生治療法の確立. Pro. Daiwa Sec. Health. Fund. 33. 125-130. 2008.
- (3) 河井まりこ、非侵襲性遺伝子治療用でバイスを用いた歯槽骨再生モデルの確立. 生物学に関する試験研究論集. 22. 94-100. 2007.
- (4) 河井まりこ、チタン表面へのサイトカイン固定化による細胞内シグナル伝達制御機能を有した骨再生型インプラントの開発. Res. Papers. Suzuken. Mem. Fund. 25. 57-61. 2007.

[学会発表] (計4件)

- (1) 河井まりこ、山本敏男、神経堤細胞による顎顔面骨形成過程でのFGFシグナリングの影響. 第114回日本解剖学会総会. 2009. 3.

岡山.

- (2) 河井まりこ、山本敏男、頭蓋骨形成におけるFGFシグナリングの影響. 第26回日本骨代謝学会総会. 2008. 10. 大阪
- (3) 河井まりこ、山本敏男、頭蓋骨形成におけるFGFシグナリングの影響. 第50回歯科基礎医学会総会. 2008. 9. 東京.
- (4) 河井まりこ、山本敏男、神経冠細胞を由来とする頭蓋顔面発生におけるFGFシグナルの役割. 第113回日本解剖学会総会. 2008. 3. 大分

[その他]

山陽新聞. 2009. 3. 6. 記事掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河井 まりこ (KAWAI MARIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40379839

(2) 研究分担者

山本 敏男 (YAMAMOTO TOSHIO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30107776

(3) 連携研究者

秦 正樹 (HATA MASAKI)

兵庫医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号:10446057

山本 博充 (YAMAMOTO HIROMITSU)

京都大学・大学院医学系研究科・研修員

研究者番号:60378776