

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592229

研究課題名（和文） FGF10 が下顎器官形成に果たす役割に関する分子発生的研究

研究課題名（英文） Roles of FGF10 on organogenesis in early mandibular development

研究代表者

高橋 美嘉子（TAKAHASHI MIKAKO）

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60241642

研究成果の概要：

本研究では、ラット胎仔下顎隆起の器官培養系にエレクトロポレーション法により Fgf10 遺伝子を側方部に過剰発現させた時にのみメッケル軟骨の形態に影響を与え、長軸方向の長さを増大させることを示した。また、FGF10 タンパクは下顎隆起側方部由来の細胞の軟骨細胞分化を促進した。これらのことから、FGF10 は胎生期下顎隆起において領域特異的にメッケル軟骨の形態および大きさを制御しているものと推察された。

交付額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,300,000 | 0       | 1,300,000 |
| 2007年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,400,000 | 630,000 | 4,030,000 |

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：器官形成 FGF10 器官培養 下顎隆起 遺伝子導入

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの顎顔面の形態的バリエーションは、その発生から成長発育の期間を通して形づくられる。このバリエーションのうち、重度の骨格的異常を顎変形症として形態学的に

診断し、顎矯正外科治療の対象とする。しかしながら、この形態診断法は成長を終了した個体に対する表現型の診断であり、その原因や発生のメカニズムに対しては全く関心が払われていない。したがって、成長期に顎変

形症が疑われる症例においては、不確実な診断により非可逆的な侵襲を加えられ、患者のQOLの著しい低下を惹起してしまうことが社会問題化している。これらの問題を解決し、成長期の早い時期に診断を行うために、顎変形症の表現型を決定づける遺伝的因子の解析が急がれるが、そうした研究は進んでいないのが現状である。

## 2. 研究の目的

顎顔面に表現型が発現されると予測される種々の因子について、表現型とその発現のメカニズムを解析することを最終的な目的として、実験的に顎顔面形態の異常を誘発する実験系を確立し、分子発生物学的手法を用いて、下顎の形態形成のメカニズムを解析した。

FGF、BMP、TGF $\beta$ 、Endothelin あるいは EGF 等は下顎の器官形成期において下顎骨の内側に発生し、そのテンプレートとなるメッケル氏軟骨の形態に影響を与える因子と考えられ、BMP、TGF $\beta$ 、Endothelin あるいは EGF についてはその可能性が示唆されてきている (Shum et al. 1993)。一方で FGF は四肢胚や脳の形態形成において重要な働きが示されているにもかかわらず、下顎の形態形成に果たす役割については全く知られていない。本研究は、四肢胚においてその大きさの決定やパターン形成に非常に重要な役割を果たすことが知られている FGF10 の下顎の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ことを目的として、そのメッケル氏軟骨の形態形成に果たす役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物と器官培養

本研究では、実験動物として胎齢 12 日の SD 系ラットを使用した (図 1A)。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で実体顕微鏡下にて、胎仔から下顎隆起部を摘出した。そして、PBS をもちいて数回洗浄した後、ミリポアメンブレン上に静置した。改良型 Trowell 法により、5% CO<sub>2</sub>、37°C において、100U のペニシリン・ストレプトマイシンと 100mg/ml L-アスコルビン酸 (Sigma, St Louis, USA) を添加した無血清 BGJb 培地にて器官培養をおこなった。培地は毎日交換し、培養を行う期間は 3 時間から 1 週間とした。

### (2) 遺伝子導入

エレクトロポレーションによる遺伝子導入には CUY21 遺伝子導入装置を用い、導入電極を自作した。器官培養開始 3 時間後に、発現ベクター (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) を実体顕

微鏡下にてマイクロインジェクションし、生理食塩水内でエレクトロポレーションを行った (図 1)。遺伝子導入は、左右の下顎隆起が癒合した正中部 1/3 (中央部) と側方 1/3 (側方部) の二つの領域を区別して実施した (図 1B)。発現ベクターとしては pCMS- $\Delta$ EGFP (enhanced green fluorescent protein)-Fgf10 を用い、Mock ベクターには pCMS- $\Delta$ EGFP-EGFP を使用した。エレクトロポレーションの条件を最適化するために、EGFP を発現する種々の長さの発現ベクターを調製し、異なる電圧条件で遺伝子導入 24 時間後の遺伝子発現について検討した。

### (3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

器官培養 1, 2, 4, 7 日目の下顎隆起より total RNA の抽出を行った。また、遺伝子導入後、1 日から 7 日間の器官培養を行った下顎隆起を、Fgf10 遺伝子導入側と、導入を行わない対照側との二つに分割し、それぞれの部分から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。SuperScript II 逆転写酵素による逆転写により、cDNA を作製した。GenBank に登録されているラット cDNA の配列をもとに、Fgf10, Fgfr1, Fgfr2, Fgfr2b, Fgfr2c, Fgfr3, Sox9 および Col2a1 のプライマーを作製した。また、EGFP のプライマーは pCMS-EGFP ベクターの塩基配列をもとに作製した。DNA ポリメラーゼは Taq DNA ポリメラーゼを使用した。半定量 RT-PCR については、2% アガロースゲル上に泳動したそれぞれの増幅産物のバンドの optical density (OD) をデジタルカメラによって撮影した像から算出し、GAPDH の遺伝子発現を内部基準として、それぞれ特異的増幅産物との比として計算した。

PCR によって得られた遺伝子増幅産物を pCRIITOP0 ベクターにサブクローンし、TOP10' 大腸菌にトランスフォームして増幅し、プラスミドを回収し、塩基配列を決定した。これらのプラスミドを *in situ* ハイブリダイゼーションのための cRNA プロブ作製のためのテンプレートとした。

### (4) cRNA プロブの作製

Fgf10, Fgfr1, Fgfr2, Fgfr2b, Fgfr2c, Fgfr3, Sox9, Col2a1 および Aggrecan の部分長のフラグメントを挿入したプラスミドベクターを使用し、通法に従ってジゴキシゲニン標識の cRNA プロブを作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法による遺伝組織化学的解析に使用した。

### (5) *in situ* ハイブリダイゼーション法

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法 (WMISH) では、4% PFA, pH7.4 PBS を用いて、培養器官を 4°C 下にて 12 時間

の浸漬固定を行った。

WMISH については通法にしたがって行った。70°C 下で cRNA プローブをハイブリダイズさせ、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を反応させ、抗体を洗浄、NBT/BICP を基質としてアルカルフォスファターゼ活性を検出した。反応染色後は 0.2% グルタルアルデヒド含有 4% パラホルムアルデヒドにて 1 時間後固定を行い、デジタルカメラを用いて実体顕微鏡下で撮影を行った。

パラフィン切片に対する in situ ハイブリダーゼーション法 (SISH) では、4% PFA/0.5% グルタルアルデヒド PBS を用いて固定を行った。SISH は、従来の方法に従って行った。薄切した切片をキシレンにて脱パラフィン後、エタノール系列にて水和し、0.2N 塩酸に常温下で 20 分間浸漬した。PBS にて切片を洗浄した後、37°C、20 分間 20ug/ul のプロテアーゼ K にて前処理し、その切片を 100% エタノールにて脱水後、風乾した。ハイブリダーゼーションバッファーにセンスあるいはアンチセンスプローブを添加し、これを切片上に滴下し、45°C にて 16 時間ハイブリダイズを行った。切片を 50% ホルムアミド/2xSSC で洗浄し、RNase A (Sigma) にて処理し、さらに、50% ホルムアミド/1xSSC で洗浄した。それぞれの洗浄は 1 時間とし、その後、切片を洗浄し、5% ウシ血清アルブミン溶液にて非特異的反応の阻害を行い、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を反応させ、抗体を洗浄、NBT/BICP を基質としてアルカルフォスファターゼ活性を検出した。再び PBS にて洗浄後、10% 中性ホルマリンにて 10 分間固定後、0.5% メチルグリーン溶液にて核染を行い、切片を乾燥、封入し、光学顕微鏡下で観察を行った。

#### (6) アルシアンブルー染色

軟骨の形態を観察するために、培養器官のホルマウントアルシアンブルー染色を行った。ラット下顎隆起器官培養においては、まず、培養 1, 2, 4, 7 日目の下顎隆起を PBS で洗浄し、0.04% アルシアンブルー 8GX 酢酸エタノールで染色後、1% 水酸化カリウム・グリセリン混合液に浸漬し、透明化を行った。下顎隆起部細胞高密度培養においては、室温下で酢酸エタノールによる 15 分間の固定後、水和し、4°C 下で 0.5% アルシアンブルー 8GX in 0.1M HCl によって染色した。染色後はデジタルカメラによる撮影を行い、アルシアンブルー染色陽性である軟骨結節 (ノジュール) の面積を Image J software を用いて計測した。

#### (7) 三次元画像構築

ホルマウントアルシアンブルー染色後、脱水・パラフィンに包埋した。厚さ 7µm の水平断連続切片を作製し、再びアルシアンブルー染色を行った。つづいて、光学顕微鏡下で写真を撮影し、メッケル軟骨のアルシアンブルー染色陽性領域のみを抽出し、二値化した画像へと変換した。連続した画像を Imaris 4 ソフトウェア上で三次元構築した。また、Image J software を用いて染色されたメッケル軟骨の長さを計測した。

#### (8) 下顎隆起部細胞の高密度培養

摘出した下顎隆起部を、PBS 下にて中央部と側方部に 3 分割し、細胞を分散した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて  $2 \times 10^7$  cells/ml となるように再懸濁した。24 穴培養プレートに 20µl ずつ滴下し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で、5% CO<sub>2</sub>、37°C 下で 3 時間培養を行った後に、10% ウシ胎仔血清、100U ペニシリン・ストレプトマイシン添加の DMEM 培地を 1ml 加えた。翌日、ヒトリコンビナント FGF10 タンパクを 1, 5, 25 ng/ml の濃度で添加し、2 日おきに培地交換を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ラット下顎隆起器官培養と遺伝子導入

本研究では、まず、エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入法の確立と実験条件の最適化および導入用電極の開発を行った。この結果、組織傷害が少なく、十分な遺伝子発現が間葉内に認められるエレクトロポレーション法とマイクロインジェクション法を併用した、局所的遺伝子強制発現のための条件を確立することができた (図 1)。

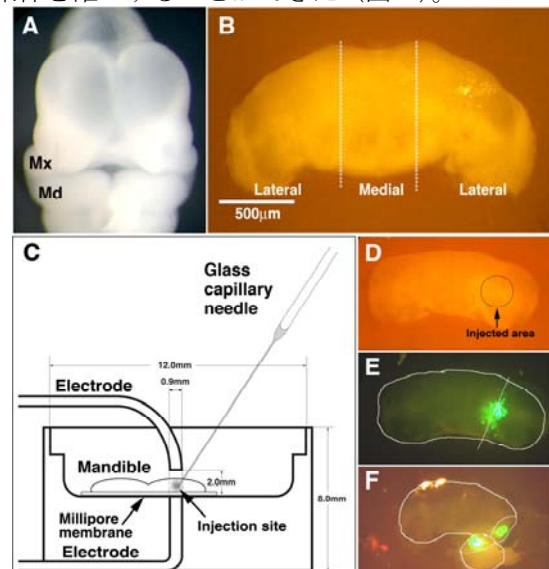


図 1. 胎生期ラット下顎隆起と遺伝子導入に用いた電極、および EGFP 発現ベクター導入後 24 時間の下顎隆起内部間葉内における EGFP の発現

(2) Fgf 遺伝子の強制発現におけるメッセル軟骨形態の変化

下顎隆起側方部における Fgf10 遺伝子導入により、導入側におけるメッセル軟骨形態に変化が認められ (図 2)、軟骨分化マーカーである Sox9, Col2a1 遺伝子の発現量が増加し、メッセル軟骨の形態変化が惹起された。

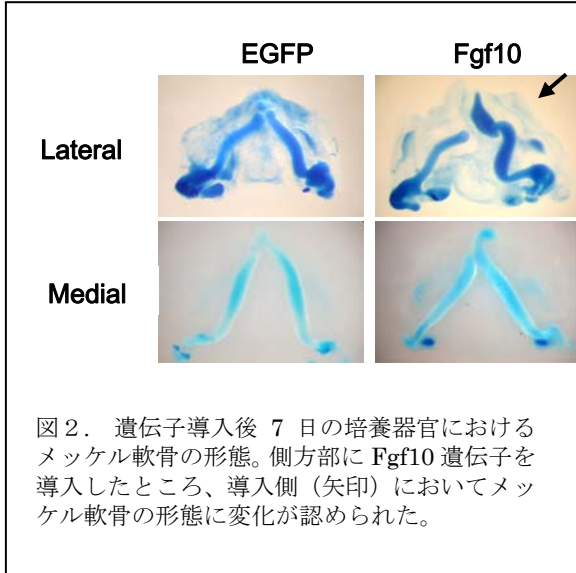


図 2. 遺伝子導入後 7 日の培養器官におけるメッセル軟骨の形態。側方部に Fgf10 遺伝子を導入したところ、導入側 (矢印) においてメッセル軟骨の形態に変化が認められた。

(3) 下顎隆起由来細胞の高密度培養における FGF10 タンパクの影響

下顎隆起中央部・側方部由来の細胞を用いて、それぞれ 7 日間の高密度培養を行い、軟骨分化に対する FGF10 タンパクの影響を検討した。側方部由来の細胞では、ヒトリコンビナント FGF10 タンパク質添加により、アルシアンブルー陽性の軟骨ノジュールの面積が増加し、中央部由来の細胞では、軟骨ノジュールの形成が認められなかった (図 3)。

本研究により、下顎隆起間葉内の FGF10 は、領域特異的にメッセル軟骨の分化を促進し、メッセル軟骨の形態と長さの決定に寄与していることが示された。また、下顎隆起器官培養法とエレクトロポレーション法を組み

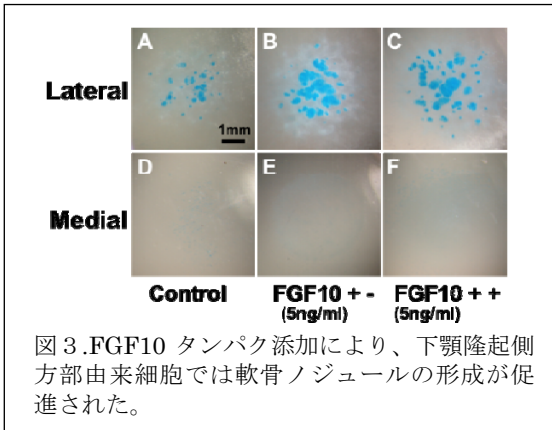


図 3. FGF10 タンパク添加により、下顎隆起側方部由来細胞では軟骨ノジュールの形成が促進された。

合わせた新しい実験系の確立により、さまざま

な顎顔面形態異常の表現型とその発症メカニズムの解明、さらには、矯正歯科医療のみならず多くの歯科医療における診断および治療法の開発に貢献していくものと思われる。

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)

- ① Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Suzuki O, Sasano Y, Takano-Yamamoto T. Application of electroporation to mandibular explant culture system for gene transfection. *Interface Oral Health Science 2007*: 179-180, Watanabe M, Okuno O, 2007, Interface Oral Health Science 2007, Springer, New York USA. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Utilizing Gene Electroporation and Role of FGFs in Mandibular Development. 2008年7月2-5, The 86<sup>th</sup> Annual Meeting for International Association for Dental Research. Toronto, Canada.

- ② 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. 下顎の器官形成期における FGF のメッセル軟骨の形態形成に果たす役割. 2008年3月1日, 第4回高機能インターフェイス下顎カンファレンス, 仙台

- ③ 寺尾文恵, 高橋一郎, 三谷英稔, 春山直人, 鈴木治, 笹野泰之, 山本照子. 下顎器官培養系におけるエレクトロポレーション法による遺伝子導入の応用. 2007年9月19-21日, 第66回日本矯正歯科学会大会, 大阪

- ④ Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Takano-Yamamoto T. Application of electroporation to mandibular explant culture system for gene transfection. 2007年2月18-19日, International Symposium for Interface Oral Health Science. Sendai, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 美嘉子 (TAKAHASHI MIKAKO)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号: 60241642

(2) 研究分担者

高橋 一郎 (TAKAHASHI ICHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：70241643

寺尾 文恵 (TERAO FUMIE)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：10510018