

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592294

研究課題名（和文）線維芽細胞増殖因子が歯髄幹細胞の機能と分化を制御する

研究課題名（英文）FGFR2b signaling controls the differentiation and function of Dental Pulp Stem Cells

研究代表者

呉本 晃一（KUREMOTO KOH-ICHI）

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90319583

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、線維芽細胞増殖因子（FGF）の歯髄幹細胞（DPSCs）および口腔上皮由来幹細胞（DESCs）の機能と分化に関する役割を解明することにある。本課題の結果から、1）FGF 受容体 II 型遺伝子（FGFR2b）シグナルは、DPSCs よりも DESCs の分化に大きな影響をおよぼすこと、2）FGFR2b シグナルは DESCs の恒常性維持には関与しないこと、3）FGFR2b シグナルは DESCs のエナメル芽細胞への分化過程を決定づける役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Rodent incisors regenerate throughout the animal lifetime as a result of the continuous deposition of enamel, the hardest component of the tooth, by ameloblasts. Putative dental epithelial stem cells (DESCs) reside at the base of the incisors in a structure called the cervical loop (CL). The DESCs can self renew and give rise to ameloblast progenitor cells (APCs), which proliferate and differentiate into ameloblasts producing enamel. In this study, we explored the role of Fibroblast Growth Factor Receptor 2b (FGFR2b) signaling during incisor homeostasis in the adult mice. FGFR2b signaling plays a critical role in the regenerative capacity of adult incisors by controlling the proliferation of transit amplifying APCs, but not by regulating the survival of DESCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：FGF、歯髄幹細胞、象牙質再生

## 1. 研究開始当初の背景

歯の再生治療は、現在の歯科医療において最も注目されている課題であり、その確立は、高齢社会における国民の健康増進に大きな役割を果たすものと考えられる。

研究代表者はこれまでに、出生後の線維芽細胞増殖因子受容体 II 型遺伝子（FGFR2b）減弱が、象牙芽細胞分化ならびに象牙質形成

に大きな影響を与える所見を得ていた。しかしながら FGF の歯の硬組織（エナメル質・象牙質）形成への関与についての研究は、国内・国外において未だなかった。

本研究の目的は、FGF の歯髄幹細胞の機能と分化に関する役割を解明することにある。本研究結果は、自己由来の歯髄幹細胞を利用した歯根象牙質再生の基盤となり、バイオ人

工歯根開発／臨床応用に多大な貢献もたらすと考えられた。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞の発見以来、国民の再生医療に対する関心と要望は非常に高い。マウスでは幹細胞を用いて歯全体を組織工学的に再生する方法が報告され、バイオ再生歯実現へ大きく歩み出している。すでにヒト歯髄・歯根膜由来幹細胞を用いた象牙質・歯髄・セメント質・歯根膜再生が技術的に可能となっているが、歯髄に存在し、象牙質を作り出す歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells; DPSCs) とエナメル質を作り出す口腔上皮由来幹細胞 (dental epithelial stem cells; DESCs) と FGF の関わりについての研究は、あまり行われていない。本研究は、DPSCs と DESCs の分化過程における FGFR2b の役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究には、テトラサイクリン系抗生物質ドキシサイクリン混合飼料 (DOX) の投与により、FGFR2b を誘導的かつ可逆的にノックダウン (KD) させる遺伝子改変マウス (DTG) を用いた。対照群は、同腹子の野生型マウス (Control) とした。実験モデルは、歯の形成・形態維持のメカニズムを知る上で大変有用な実験モデルとされているマウス切歯とした。(大歯大・動物実験委員会 承認番号第 10-02035 号)

### (1) FGFR2b シグナルが DPSCs と DESCs 分化に与える影響

DPSCs の象牙芽細胞への分化と DESCs のエナメル芽細胞への分化における FGFR2b シグナルの関与を観察するために、出生後 14 日 (P14) 後から出生後 90 日 (P90) にかけて、DOX を投与し、FGFR2bKD を行った。次に、P14 から、FGFR2bKD を 4 週行った後 (出生後 42 日; P42) に、安楽死させたマウスから、上下顎切歯部を摘出し、形態学的観察 (micro CT) および組織学的解析 (HE 染色・細胞増殖解析; BrdU assay) を行った。また FGFR2b シグナルの減弱による、FGFR シグナル下流遺伝子と口腔上皮マーカー遺伝子の変化を in situ hybridization を用いて、検討を行った。

### (2) FGFR2b シグナルが DPSCs と DESCs 生存に与える影響

DPSCs と DESCs の細胞生存における FGFR2b シグナルの関与を観察するために、P14 から、4 週間 DOX を投与し、FGFR2bKD を行った後、DOX 投与を中止し、その後、マウス切歯の形態変化を観察および組織学的解析 (HE 染色) を行った。

## 4. 研究成果

### (1) FGFR2b シグナルが DPSCs と DESCs 分化に与える影響

FGFR2b シグナルを KD させた DTG では、Control に比べてエナメル形成不全が生じ、

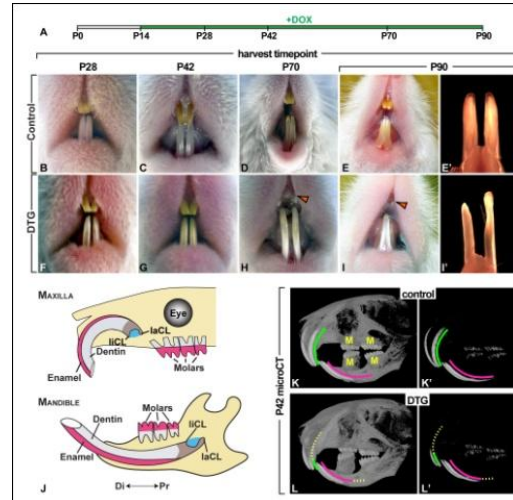


図 1 長期間にわたる FGFR2b シグナル減弱によるマウス切歯のエナメル質の消失

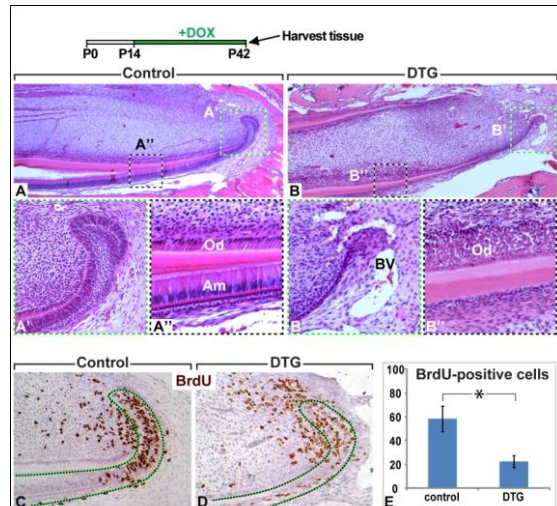


図 2 FGFR2b シグナル減弱 (4 週) によるエナメル質形成とエナメル芽細胞前駆細胞 (APCs) の細胞増殖抑制

P70 (FGFR2bKD 8 週間) では、上顎切歯が、自然脱落する表現型が認められた (図 1; B-I')。

4 週間 FGFR2b シグナルを KD させた DTG では、Control に比べてエナメル形成不全が生じ、エナメル質量の減少が micro CT で確認された (図 1; K-L') が、象牙質形成は正常であった。

組織学的解析からは、DESCs の細胞塊である Cervical Loop (CL) は、Control, DTG とも存在したが、Control では、CL から連続す

るエナメル芽細胞層が確認できたものの、DTG ではエナメル芽細胞層は認められず、CL からのエナメル芽細胞の分化抑制が認められた (図 2 ; A-B)。DPSCs から分化したとされる象牙芽細胞層は、細胞配列に若干の乱れは認められるものの、象牙質形成は行われていた (図 2 ; A-B)。また BrdU assay の結果から、DTG 群では CL 内で増殖抑制が認められた (図 2 ; C-E)。

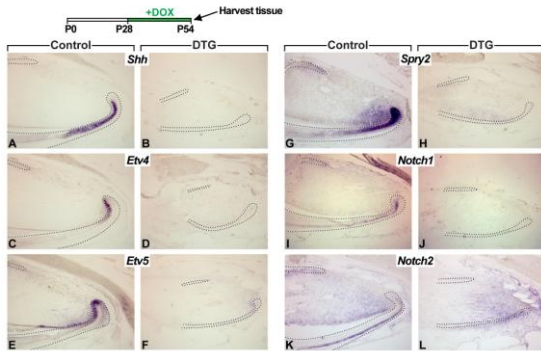


図 3 出生後の FGFR2b 減弱による FGFR 下流シグナル遺伝子の発現低下と口腔上皮マーカー遺伝子の変化

In situ hybridization の結果、切歯の発生過程において、FGF シグナルの直接的な標的遺伝子としてよく知られている Sonic hedgehog (SHH) は、Control では、エナメル芽前駆細胞からエナメル芽細胞にかけて高いレベルで発現していた (図 3 ; A)。これに対して、DTG では著しく Shh の発現は減少していた (図 3 ; B)。また FGF の直接的な標的と考えられている、ets variant 4 (Etv4) や ets variant 5 (Etv5) は、Control ではエナメル芽前駆細胞からエナメル芽細胞にかけて発現していたが (図 3 ; C, E)、DTG では発現は抑制されていた (図 3 ; D, F)。また別の FGF シグナルの直接的な標的遺伝子として知られている Sprouty 2 (Spry2) は、Control において、唇側の CL に強く発現していたが (図 3 ; G)、DTG ではその発現は著しく減少していた (図 3 ; H)。この Etv4 と ETV5 の遺伝子発現の抑制から、DTG の CL における表現型は、FGFR2b シグナルの減弱によって生じていることが確認された。さらに、唇側の CL において、FGFR2b の減弱は、標的遺伝子である Shh と Spry2 に、直接的な影響が働いていることが明らかとなった。また、口腔上皮由来幹細胞のマーカーの一つとして考えられている Notch 1 は、Control ではその発現が認められたが (図 3 ; I)、DTG では発現の抑制が認められた (図 3 ; J)。

(2) FGFR2b シグナルが DPSCs と DESCs 生存に与える影響

4 週間 FGFR2b シグナルを KD させた DTG では、KD 中止後 4 週 (P70) で上顎前歯が一旦、

抜け落ちるものの、P91 には、再萌出を始め、P120 には、元通りに生え揃うことが明らかとなった (図 4 ; B-0)。

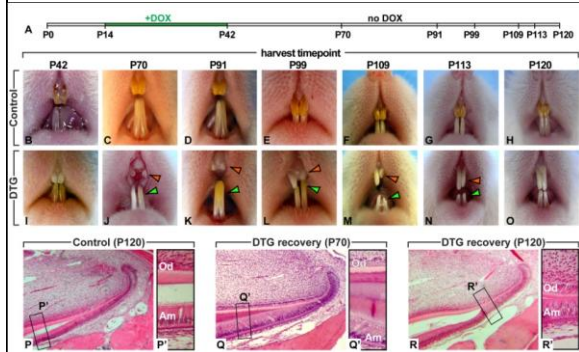


図 4 FGFR2b シグナル復元後のマウス切歯の再生

組織学的解析 (図 4 ; P-R') からは、CL は、Control、DTG recovery とも存在し、CL から連続するエナメル芽細胞層が確認できた。これは、FGFR2b シグナルが減弱した状態でも DESCs は生存・維持すること、FGFR2b シグナルが回復することで、DESCs のエナメル芽細胞前駆細胞 (ameloblast progenitor cells; APCs) へ、さらには APCs からエナメル芽細胞への分化が再開され、エナメル質が再形成され、歯が再萌出したと考える。

本研究から得られた結果を図 5 に示す。

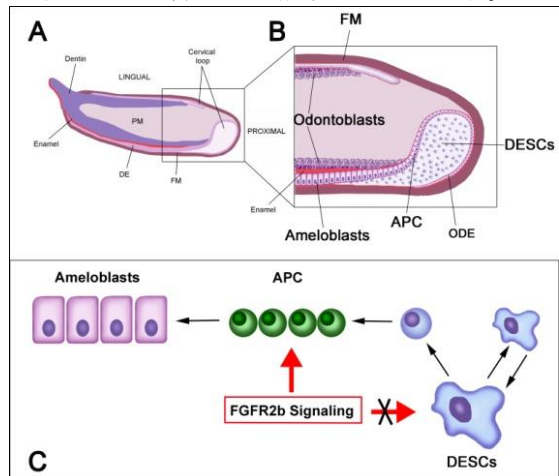


図 5 FGFR2b シグナルの DESCs の恒常性維持と分化に関する役割

(2007 年 Wang 他 図改編)

図に示すように、

- ① FGFR2b シグナルは、DPSCs よりも DESCs の分化に大きな影響をおよぼすこと
- ② FGFR2b シグナルは DESCs の恒常性維持 (homeostasis) には関与しないこと
- ③ FGFR2b シグナルは DESCs のエナメル芽細胞への分化過程を決定づける役割を果たすことが明らかとなった。
- ④ DESCs のエナメル芽細胞への分化過程

においては、Shh や Spry2 の遺伝子が直接的に深く関与していることが明らかとなった。

今後、DESCs の分化を誘導する FGFR2b 関連遺伝子 (Shh・Spry2) の探索は、自己由来の幹細胞を利用したバイオ人工歯根開発に必要な、エナメル質再生の実現に大きく貢献すると考えられる。

## 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 Parsa S, Kuremoto K, Seidel K, Tabitatai Irani R, MacKenzie B, Yamaza T, Akiyama K, Branch J, Koh C, Al Alam D, Klein O.D., Bellusci S, Signaling by FGFR2b controls the regenerative capacity of adult mouse incisors、Development、査読有、137 巻、2010、3743-3752

[学会発表] (計 2 件)

- ① 呉本晃一 他、線維芽細胞増殖因子が口腔上皮由来幹細胞の機能と分化を制御する、日本補綴歯科学会 第 120 回記念学術大会、2011 年 5 月 22 日、広島国際会議場 (広島市)
- ② Kuremoto K 他、FGFR2b signaling and ameloblast stem cells in mouse incisor regeneration、88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research、2010 年 7 月 17 日、Centre Convencions Internacional Barcelona (Spain)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

呉本 晃一 (KUREMOTO KOH-ICHI)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90319583

### (2) 研究分担者

前田 照太 (MAEDA TERUTA)

大阪歯科大学・歯学部附属病院・教授

研究者番号：10103110

### (3) 連携研究者

山座 孝義 (YAMAZA TAKAYOSHI)

九州大学・歯学部・助教

研究者番号：80304814