

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 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592482

研究課題名（和文）口腔上皮由来幹細胞による粘膜再生は線維芽細胞増殖因子により加速する

研究課題名（英文）

FGF signaling accelerate epithelial regeneration by Oral Epithelial Stem Cells

研究代表者

井上 雅裕（INOUE MASAHIRO）

大阪歯科大学・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：50159993

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、FGFR2b/FGF10 シグナルの口腔粘膜の治癒・再生への役割を解明することにある。本課題の結果から、1) FGFR2b シグナルの減弱により、粘膜の形成が菲薄化すること、2) FGF10 過剰発現により、基底細胞層の多層化により、粘膜上皮の過形成・肥厚が生じること、3) FGF10 過剰発現が重層扁平上皮の基底層の増殖により強く働くことが明らかとなった。膀胱の移行上皮からも同様の結果を得ていることから、FGFR2b/FGF10 シグナルは、粘膜基底層に存在する口腔上皮由来幹細胞の増殖を誘導し、粘膜創傷の治癒を加速すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Fibroblast growth factor-10 (FGF-10) is a known epithelial mitogen in several organ systems, such as the lung, that acts in a bidirectional paracrine manner and acts exclusively through a subset of receptors such as FGFR2b. However, its role in oral epithelial regeneration is unknown. We investigated the role of FGFR2b/FGF-10 signaling in oral epithelial wound healing using FGF-10 overexpression (OE) and FGFR2b attenuation/knock-down (KD) transgenic mice. The present results suggested that, 1) Under-developing of the epithelial layer was noted in the FGFR2b KD mice, whereas over-developing was noted in the FGF-10 OE mice. 2) FGF10 overexpression initiated the parakeratosis of oral epithelium or urothelium and 3) FGF10 overexpression worked the proliferation of the basal laminae in the stratified squamous epithelium and transitional epithelium. Form these results, FGF-10/FGFR2b signaling appears to play an active proliferation in Oral Epithelial Stem Cells, and accelerate the regenerative capacity of the oral epithelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
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、口腔上皮、幹細胞、粘膜再生

1. 研究開始当初の背景

歯の喪失は、咬合、咀嚼、発音などの口腔機能に著しい障害を与える。一般的に歯の欠損には、義歯による補綴治療が行われているが、機能の回復は乏しく、義歯装着による異物感や審美性の低下のため、患者の満足度は低い。これに替わる歯科インプラント治療は、より天然歯に近い機能と審美性の回復が可能となり、患者の Quality of Life (QOL) を高めることができる。しかしインプラント治療は、上顎洞や下槽管などの解剖学的構造や骨量の問題により、その適応は著しく制限されている。これまで、インプラント治療の適応範囲を広げるために、骨の再生について多くの研究が行われてきた。しかしながら、その骨を覆う口腔粘膜の再生についての研究はあまりない。一方、線維芽細胞増殖因子 (FGF) が粘膜組織の形成・治癒に大きな影響を与えるなど多くの報告があるが、FGF が口腔粘膜の治癒・再生過程にどのように関与するか、FGF を用いた粘膜再生の臨床応用につながる基礎的研究は、現在までのところ国内・国外通じて解明されていない。FGF を臨床に活用し、口腔粘膜の治癒・再生を著しく早めることが可能となれば、骨再生誘導法の成功率を向上、インプラント治療の適応が拡大すると考えられる。すなわち FGF の口腔粘膜の治癒・再生への関与の解明が、FGF を用いた口腔粘膜再生の治療法開発／臨床応用の進歩を産み、歯科インプラント治療の適応範囲の拡大に多大な貢献をもたらすことができると考えた。

2. 研究の目的

近年、表皮や毛根組織に、上皮由来幹細胞が存在し、その幹細胞は基底層に存在することが明らかとなっている。その中でも、FGFr2b/FGF10 シグナルは、傍分泌の成長因子／レセプター間の特異的なシグナルとして、肺や歯などの体内の種々の臓器の形成において、重要な役割を果たすことが明らかとなっている。しかしながら、この FGFr2b/FGF10 シグナルが、口腔粘膜の再生にどのような役割を果たすかは、未だ明らかとなっていない。本研究は、FGFr2b シグナルの減弱および FGF10 の過剰発現を引き起こす遺伝子改変マウスを用いて実験的粘膜創傷モデルを作成し、その粘膜再生の治癒過程を観察することで、FGFr2b/FGF10 シグナルが口腔粘膜再生にどのような影響を与えるかを明らかにするとともに、FGFr2b/FGF10 シグナルが口腔上皮由来の幹細胞の分化・増殖にどのような役割を果たすかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

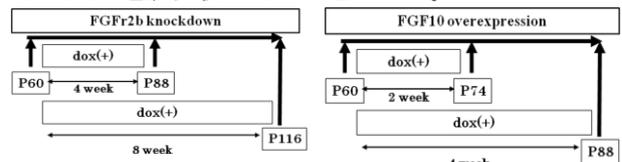
(1) FGFr2b シグナル減弱マウスと FGF10 過剰発現マウスの供与

FGFr2b シグナル減弱 (ノックダウン) マウス (sFGFr2b KD) と FGF10 過剰発現マウス (FGF10 OE) は、ロサンジェルス子供病院ベルーシ准教授より供与を受けた。本遺伝子改変マウスは、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、DOX 飼料投与 48 時間後より、sFGFr2b KD では FGFr2b シグナルを誘導的かつ可逆的に減弱させ、FGF10 OE では FGF10 を誘導的かつ可逆的に過剰発現させることが可能となる。実験の対照群としては、同腹子の野生型マウス (Control) とした。

なお、本研究は大阪歯科大学・動物実験委員会の承認を受けて行った (承認番号第 11-03027 号)。

(2) FGFr2b/FGF10 シグナルが粘膜上皮に与える影響

① 出生 60 日後の sFGFr2b KD と FGF10 OE に、DOX の投与により、FGFR2b シグナルの減弱と FGF10 の過剰発現を誘導した。FGFR2b シグナル減弱は期間を 4・8 週に、FGF10 過剰発現は 2・4 週とした。



② FGFr2b/FGF10 シグナルの粘膜上皮への影響を明らかにするために、重層扁平上皮である口腔粘膜は舌背の粘膜上皮を、比較対象として移行上皮である膀胱の尿路上皮について組織学的検討を行った。

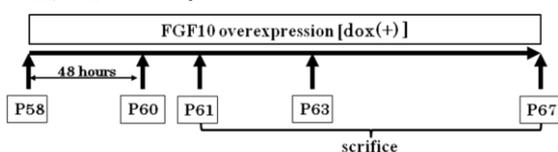
③ FGFr2b FGF10 シグナルの上皮への影響を明らかにするために、FGF10 過剰発現 2・4 週後に、安楽死させたマウスから膀胱を摘出し、分子生物学的検討 (semi-quantitative PCR) を行った。

(3) FGF10 の過剰発現が口腔粘膜の再生に与える影響

① 出生 58 日後の FGF10 OE に、DOX の投与を 48 時間行うことで、FGF10 過剰発現を惹起させた。

② FGF10 OE の舌背部に Acu-Punch® を用いて直径 1mm の実験的粘膜欠損を形成した。

③ 粘膜創傷治癒過程における FGF10 過剰発現の影響を経時的に観察するために、粘膜欠損形成、1、3、7 日後に安楽死させたマウスから舌組織を採取し、組織学的解析 (HE 染色) を行った。

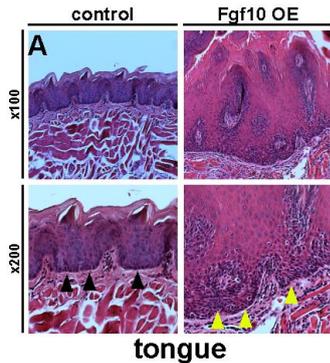


4. 研究成果

(1) FGFR2b/FGF10 シグナルが粘膜上皮に与える影響

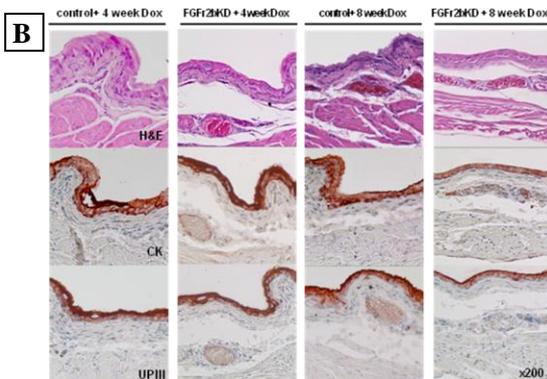
① 口腔粘膜上皮に与える影響

FGFR2b/FGF10 シグナルの口腔粘膜上皮への影響を明らかにするために、舌背の粘膜上皮について組織学的検討を行った結果、FGFR2b シグナルの減弱は、4・8 週後とも上皮に組織学的な変化は認められなかった。これに対して、図 A に示すように、FGF10 過剰発現は control に比べて、口腔粘膜上皮の基底細胞層の多層化と中間層の肥厚化を惹起した。

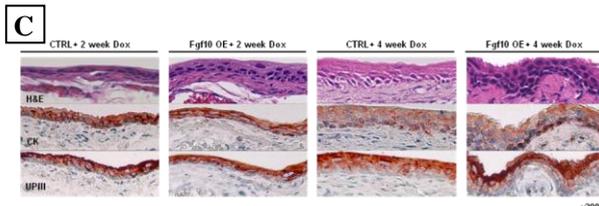


② 尿路上皮に与える影響

FGFR2b/FGF10 シグナルの粘膜上皮への影響を明らかにするために、移行上皮である膀胱の尿路上皮について組織学的検討を行った結果、FGFR2b シグナル減弱は、図 B に示すように 4、8 週後ともに、control に比べて上皮を菲薄化させた。

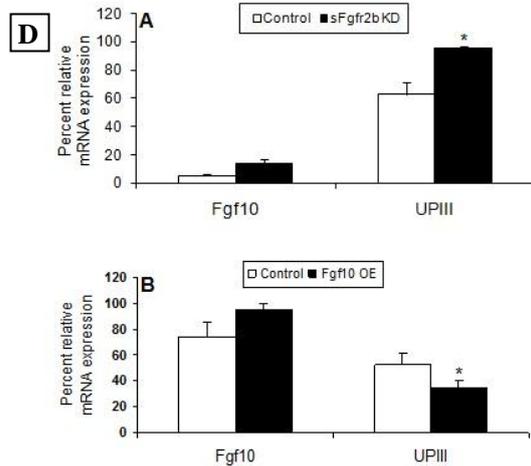


これに対して、FGF10 過剰発現は、図 C に示すように 2、4 週後では、口腔粘膜上皮の結果と同様に、control と比較して基底細胞層の多層化と中間層の肥厚化を惹起した。



尿路上皮では、尿路上皮の分化マーカーである Uroplakin III (UP III) の免疫科学染色を行ったが、組織学的には control と比較し

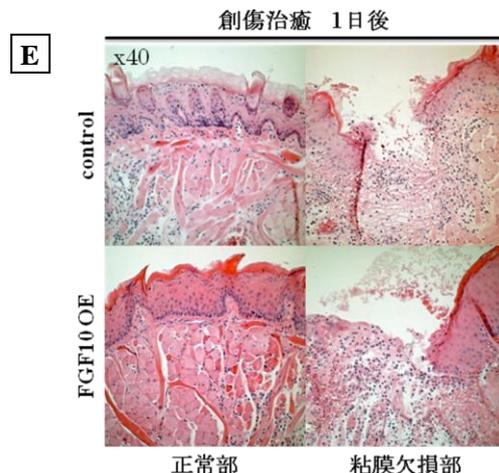
て明瞭な差が認められなかったため、FGFR2b/FGF10 シグナルが尿路上皮の分化に与える影響を明らかにすることを目的として、FGFR2b シグナル減弱・FGF10 過剰発現をそれぞれ 4 週間誘導した後に、マウスを安楽死させ膀胱を摘出し、分子生物学的検討 (semi-quantitative PCR) を行った。この結果、sFGFR2b KD では UP III の RNA 発現量に有意な増加を認めたのに対して、FGF10 OE では有意な減少を認めた (図 D)。



以上①～③の結果から、FGFR2b シグナル減弱により粘膜上皮は菲薄化するが、これは FGFR2b シグナル減弱が上皮細胞のターンオーバーを抑制するために上皮内の未分化層が減少するためと推察された。これに対して、FGF10 過剰発現は粘膜上皮の基底細胞層の多層化と中間層の肥厚化を惹起したのに対して、FGF10 過剰発現は上皮細胞のターンオーバーを活性化させるために、基底細胞層などの未分化細胞がより増殖したと推察された。

以上から、FGFR2b/FGF10 シグナルは、上皮の粘膜基底層の細胞増殖の恒常性を維持すると推察された。

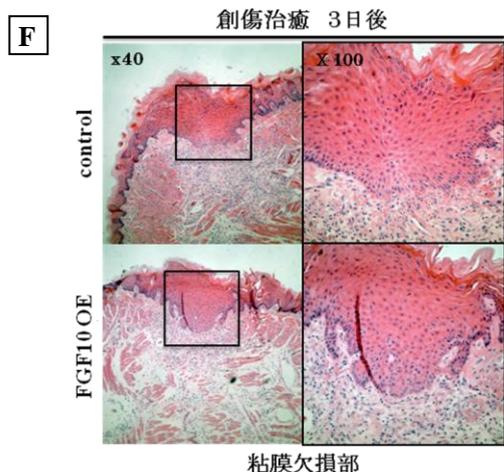
(2) FGF10 の過剰発現が口腔粘膜の再生に与える影響



マウスの舌背部に直径 1mm の実験的粘膜欠損を形成し、FGF10 過剰発現の粘膜創傷治癒過程への影響を組織学的に検討した結果、創傷治癒 1 日後では、正常部の舌の粘膜上皮は、FGF10 過剰発現により、control に比べて FGF10 OE では基底細胞層の多層化していた (図 E)。しかしながら、粘膜欠損部では、control、FGF10 OE に組織学的に差は認められなかった。

創傷治癒 3 日後では、control に比べて FGF10 OE では基底細胞層の多層化が進み、強拡大像において、FGF10 OE の基底細胞層は正常像にほぼ近い組織像を呈していた。

(図 F)。これらの結果から、FGF10 の過剰発現は、口腔粘膜上皮の基底細胞層に強く働き、治癒を促進すると考えられた。



FGFR2b/FGF10 シグナルの口腔粘膜の治癒・再生への役割を解明することを目的として本研究を行った結果、FGFR2b/FGF10 シグナルは、上皮の粘膜基底層の細胞増殖の恒常性を維持すると考えられた。また、FGFR2b/FGF10 シグナルは、粘膜基底層に存在する未分化細胞の増殖をコントロールすると考えられ、FGF10 過剰発現は、粘膜上皮の基底層に存在するとされる口腔上皮由来幹細胞に強く働きかけ、粘膜再生を加速すると考えられた。

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 2 件)

- ① Kurosaka H, Islam MN, Kuremoto K, Hayano S, Nakamura M, Kawanabe N, Yanagita T, Rice DP, Harada H, Taniuchi I, Yamashiro T, Core binding factor beta functions in the maintenance of stem cells and orchestrates continuous

proliferation and differentiation in mouse incisors, Stem Cells, 査読有、29 巻、2011、1792-1803、

DOI: 10.1002/stem.722

- ② Parsa S, Kuremoto K, Seidel K, Tabitai Irani R, MacKenzie B, Yamaza T, Akiyama K, Branch J, Koh C, Al Alam D, Klein OD, Bellusci S, Signaling by FGFR2b controls the regenerative capacity of adult mouse incisors, Development, 査読有、137 巻、2010、3743-3752、
DOI: 10.1242/dev.051672

[学会発表] (計 6 件)

- ① 呉本晃一, 前田照太, 西崎 宏, 岡崎定司、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, Maeda T, Inoue M, Etoh T, Okazaki J, Mechanical Stress on Bone Surrounding Short Implants studied by FEA, The 89th General Session & Exhibition of the IADR, 2011 年 3 月 17 日、San Diego Convention Center (USA)
- ③ Kuremoto K, Yamazon J, Choi IS, Lee KH, Bellusci S, Warburton D, Koh K, A Potential Role for FGF-10 / FGFR2b Signaling in Bladder Homeostasis, 2010 AAP National Conference & Exhibition, 2010 年 10 月 2-5 日、The Moscone Center (USA)
- ④ 黒坂 寛, 早野 暁, 呉本晃一, 原田英光, 山城 隆、歯の発生及びエナメル芽細胞分化における core-binding factor β (Cbfb) の役割について、第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010 年 9 月 22 日、タワーホール船堀 (東京)
- ⑤ Kuremoto K, Parsa S, Tabitai Irani R, MacKenzie B, Yamaza T, Akiyama K, Koh C, Al Alam D, Bellusci S, 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 Kurosaka H, Hayano S, Kuremoto K, Harada H, Nurul I, Taniuchi I, Yamashiro T, Exploring the roles of core-binding factor β (Cbf β) in tooth development and ameloblast physiology, 2010 Gordon Research Conferences Craniofacial

Morphogenesis & Tissue Regeneration、
2010年4月12日、Renaissance Tuscany
Il Ciocco Resort (Italy)

- ⑦ Kuremoto K, Maeda T, Okazaki J、
Influence Of Mechanical Loads On Bone
Surrounding Short Implants Studied By
Finite Element Analysis、
International College of
Prosthodontists 13th Biennial
Meeting、2009年9月10日、The Westin
Grand Cape Town Arabella Quays (South
Africa)
- ⑧ 呉本晃一, 前田照太, 嶋村清次, 三海正
人, 井上雅裕, 江藤隆徳, 岡崎定司、有
限要素法によるショートインプラント
の強度解析、日本補綴歯科学会 第118
回学術大会、2009年6月6-7日、京都
国際会議場 (京都市)
- ⑨ Yamazon J, Chung S, Kang D, Kokorowski
P, Kuremoto K, Koh C、Fibroblast growth
factor 10-mediated delay in bladder
wound healing in inducible transgenic
mice、American Urological Association
2009 Annual Meeting、2009年4月26
日、McCormick Place (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 雅裕 (INOUE MASAHIRO)
大阪歯科大学・歯学部附属病院・准教授
研究者番号：50159993

(2) 研究分担者

呉本 晃一 (KUREMOTO KOH-ICHI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教
研究者番号：90319583

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