

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792089

研究課題名(和文) 繊維芽細胞増殖因子の発現を介した血小板由来増殖因子による唾液腺形態形成の制御

研究課題名(英文) Platelet-derived growth factor receptor regulates salivary gland morphogenesis via fibroblast growth factor expression

研究代表者

山本 晋也 (YAMAMOTO SHINYA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90514729

研究成果の概要(和文)：

マウス顎下腺の器官培養において、PDGF-AA あるいは PDGF-BB を添加すると、その受容体は間葉に存在しているのにも関わらず、唾液腺組織の上皮細胞増殖が亢進し、分岐形態形成が促進され、PDGF-A 及び B siRNA を用いて PDGF mRNA 発現の抑制を行なった場合、上皮組織での細胞増殖が抑えられ分岐形態形成が減少した。一方、PDGF-AA は FGF3 と FGF7 の発現を誘導し、PDGF-BB は FGF1、FGF3、FGF7 及び FGF10 の発現を誘導した。しかし PDGF-A 及び B siRNA は FGF3、FGF7、FGF10 の発現を抑制した。この結果は、PDGF が顎下腺間葉における FGF の発現を制御していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：

A coordinated reciprocal interaction between epithelium and mesenchyme is involved in salivary gland morphogenesis. The submandibular glands (SMGs) of Wnt1-Cre/R26R mice have been shown positive for mesenchyme, whereas the epithelium is beta-galactosidase-negative, indicating that most mesenchymal cells are derived from cranial neural crest cells. Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor alpha is one of the markers of neural crest-derived cells. In this study, we analyzed the roles of PDGFs and their receptors in the morphogenesis of mouse SMGs. PDGF-A was shown to be expressed in SMG epithelium, whereas PDGF-B, PDGFRalpha, and PDGFRbeta were expressed in mesenchyme. Exogenous PDGF-AA and -BB in SMG organ cultures demonstrated increased levels of branching and epithelial proliferation, although their receptors were found to be expressed in mesenchyme. In contrast, short interfering RNA for Pdgfa and -b as well as neutralizing antibodies for PDGF-AB and -BB showed decreased branching. PDGF-AA induced the expression of the fibroblast growth factor genes Fgf3 and -7, and PDGF-BB induced the expression of Fgf1, -3, -7, and -10, whereas short interfering RNA for Pdgfa and Pdgfb inhibited the expression of Fgf3, -7, and -10, indicating that PDGFs regulate Fgf gene expression in SMG mesenchyme. The PDGF receptor inhibitor AG-17 inhibited PDGF-induced branching, whereas exogenous FGF7 and -10 fully recovered. Together, these results indicate that fibroblast growth factors function downstream of PDGF signaling, which regulates Fgf expression in neural crest-derived mesenchymal cells and SMG branching morphogenesis. Thus, PDGF signaling is a possible mechanism involved in the interaction between epithelial and neural crest-derived mesenchyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 ・ 矯正・小児系歯学

キーワード：(1) 発生・分化 (2) 器官培養 (3) マウス顎下腺 (4) 増殖因子 (5) シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

再生医療の進歩により各組織から多分化能を有する幹細胞が同定され、その応用がなされつつある。口腔組織においては、歯や唾液腺組織の再生療法の開発は重要なテーマであるが、現在の歯科治療においては人工物による修復に頼らざるをえず、唾液腺疾患に関しては対処療法に終始しているのが現状である。最近、胎児期の歯胚由来細胞を人工的に再構成することで、Bio-tooth と呼ばれる歯の形成に成功している<sup>1)</sup>が、臨床応用にはいくつかの問題点を解決していかなければならず、唾液腺に関してはその組織構築のメカニズムや、再生治療への足がかりも得られていない。

2. 研究の目的

唾液腺の形態発生は、胎生期における上皮細胞と神経堤由来の細胞集団との相互作用によってその形態を構築する。この過程において、唾液腺の分岐形態形成は、多種多様な増殖因子や栄養因子によって制御されていることが予想される。今回、申請者が着目した血小板由来増殖因子 (PDGF) は、平滑筋細胞、繊維芽細胞、グリア細胞のマイトジェンとして同定され、様々な組織において上皮-間葉相互作用を制御するパラクラインの増殖因子として知られている。PDGFは胎生初期の肺、腎臓、精巣など唾液腺の発生過程と類似した器官において、その形態形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。この発生過程の類似性を考慮すると、PDGFが唾液腺の発生においても重要な役

割を果たしていることが予想されるが、その詳細については全く明らかにされていない。そこで本研究では、マウス顎下腺の器官培養システムを用いて顎下腺の形態形成における PDGF の機能解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス顎下腺器官培養を用いた PDGF の機能解析

胎生 13.5 日目の ICR マウスから顎下腺を採取し、ポリエチレンテレフタレートフィルター上で器官培養を行う。器官培養液として DMEM/F12 を使用し、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、150 µg/ml ascorbic acid 及び 50 µg/ml transferrin を添加する。PDGF は生体内でホモダイマーあるいはヘテロダイマーの 2 量体を形成する。抗 PDGF 抗体を用いる実験では、抗 PDGF-AA 抗体および抗 PDGF-BB 抗体を使用し、これらを培養液中に添加して 48 時間器官培養を行う。PDGF シグナル伝達抑制実験では、PDGF 受容体リン酸化抑制剤として AG17 (Calbiochem) を用い、上記同様培養液に添加後 48 時間器官培養を行う。

RNA 干渉実験は siRNA を用いて行う (stealth™ Select 3 RNAi, Invitrogen)。マウス顎下腺に Oligofectamine (Invitrogen) を使用し、200 nM 二本鎖 siRNA を遺伝子導入する。コントロールのマウス顎下腺には、同濃度の negative control duplex (stealth™ RNAi negative control kit, Invitrogen) を遺伝子導入する。siRNA

による発現抑制効果は、RT-PCR による発現レベルで確認を行う。

培養した顎下腺は培養 24 時間後と 48 時間後に実体顕微鏡下にて写真を撮影し、唾液腺小胞数を計測する。各実験は少なくとも 3 回以上行う。

#### (2) BrdU 取り込み実験による細胞増殖能についての検討

PDGF タンパクあるいは抗 PDGF 抗体を培養液に添加して 24 時間培養後、100  $\mu$ M BrdU (BrdU Labeling and Detection kit 1, Roche) を含む培養液で 37°C、30 分間培養を行う。そして PBS で 5 分間 3 回洗浄し、70%エタノールで 4°C 下 3 時間固定を行う。その後パラフィン切片を作成し、抗 BrdU 抗体で 37°C 下 3 時間反応させ、洗浄後 2 次抗体を常温で 1 時間反応させる。細胞の核を propidium iodide (PI) で染色後、蛍光顕微鏡 (BZ-8000、Keyence) にて解析を行う。蛍光発色した核を計測し、BrdU / PI を算出し、グラフ化して細胞増殖能の比較検討を行う。

#### (3) Real-time PCR を用いた PDGF シグナル伝達と FGF 分子に関する解析

顎下腺器官培養において、外因性に PDGF の過剰投与あるいは機能抑制を行う。48 時間器官培養後、TRIzol reagent を用いてそれぞれ total RNA を回収する。そして Superscript III 逆転写酵素によって total RNA から相補的 DNA を合成する。その後、間葉組織に発現する FGF について各遺伝子に特異的なプライマーと SYBR green I (Roche) を用いて Real-time PCR を行う。

#### 4. 研究成果

Wnt1-Cre/R26R マウスの顎下腺に X-gal 染色を行うと、間葉組織は  $\beta$ -galactosidase 陽性であったが、その一方で上皮組織は陰性であった。この結果はほとんど全ての間葉細胞は頭部神経堤由来細胞であることを示している。マウス顎下腺では PDGF-A は主に上皮に発現し、PDGF-B は間葉に発現する。PDGF の受容体である PDGF  $\alpha$  受容体と PDGF  $\beta$  受容体は、ともに間葉に発現し PDGF の結合によりそのシグナルを細胞内に伝達する。マウス顎下腺の器官培養において、PDGF-AA あるいは PDGF-BB を添加すると、その受容体は間葉に存在しているのにも関わらず、唾液腺組織

の上皮細胞増殖が亢進し、分岐形態形成が促進された。対照的に、PDGF-A 及び B siRNA を用いて PDGF mRNA 発現の抑制を行なった場合、上皮組織での細胞増殖が抑えられ分岐形態形成が減少した。また抗 PDGF-AB 及び BB 抗体を用いて PDGF 機能の抑制を行なった場合も同様の結果が得られた。この結果から、間葉における PDGF シグナル伝達によって何らかの分子が誘導され、この分子が上皮組織に作用しているのではないかと仮説を立てた。現在までで、間葉組織に発現する増殖因子で、上皮組織の増殖を促進する因子としては繊維芽細胞増殖因子 (FGF) が報告されている。そこで PDGF シグナルと FGF 発現の関係について解析を行った。マウス顎下腺の器官培養において、PDGF-AA は FGF3 と FGF7 の発現を誘導し、PDGF-BB は FGF1、FGF3、FGF7 及び FGF10 の発現を誘導した。その一方で PDGF-A 及び B siRNA は FGF3、FGF7、FGF10 の発現を抑制した。この結果は、PDGF が顎下腺間葉における FGF の発現を制御していることを示唆している。

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 山本晋也, 武田康男: 先天異常児の親の再度の妊娠に関する問題 臨床経験とアンケート調査からの考察. 第 48 回小児歯科学会. 2010 年 5 月 19-20 日. 名古屋市.

2. 落合聡, 山田千晶, 森下格, 雑賀厚臣, 長谷川大子, 山本晋也, 齊藤一誠, 早崎治明, 山崎要一: 口蓋床を用いた口唇顎口蓋裂児の早期治療 作業模型の製作方法の違いによる上顎形態に及ぼす治療効果. 第 34 回日本口蓋裂学会. 2010 年 5 月 27-28 日. (東京都北区)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Pedo/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 晋也 (YAMAMOTO SHINYA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90514729