

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792318

研究課題名(和文) 下顎頭軟骨の成長、機能維持における線維芽細胞増殖因子受容体の役割

研究課題名(英文) The role of the fibroblast growth factor receptor in the growth of the condylar cartilage and function maintenance

研究代表者

安田 忠司 (YASUDA, TADASHI)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：00410473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：FgfR3P244R変異体において、下顎頭の軟骨成長板の成長は不規則で、In situ hybridization法よりIhhの発現、chondroprogenitorsにおけるH4C、II、X型コラーゲンの発現は減少した。また骨梁構造の形成は抑制され、骨吸収活性の増加を認めた。FGF2/FGF9にて処理されたビーズを野生型下顎頭に移植したEdU細胞増殖活性の実験ではPtch1とPTHrPの発現が下顎頭軟骨表層とchondroprogenitor細胞層において減少した。FGFとIhhシグナリング間におけるバランスはTMJの成長のために重要な要因である。

研究成果の概要(英文)：Muenke syndrome is characterized by various craniofacial deformities and is caused by an autosomal dominant activating mutation in fibroblast growth factor receptor 3. Here we determined whether the mutation affects temporomandibular joint development and growth using mice carrying a corresponding mutation. In situ hybridization showed that Fgfr3 is normally expressed in condylar chondroprogenitors and maturing chondrocytes that expressed also the Indian hedgehog receptor and transcriptional target Patched 1. In Fgfr3 mutants, the condylar growth plates were disorganized and displayed reduced levels of Ihh expression, H4C-positive proliferating chondroprogenitors, and collagens type II- and type X-expressing chondrocytes. Our data indicate that the activating Fgfr3 mutation disturbs normal TMJ developmental processes likely by reducing hedgehog signaling and endochondral ossification.

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：Muenke症候群 線維芽細胞成長因子 顎関節 Indian hedgehog

### 1. 研究開始当初の背景

顎関節の形成を制御するメカニズムの解析は健全な顎関節の成り立ちを知る上で重要である。過去の報告より為されてきたがそのメカニズムの詳細は未だ不明である。これまで顎関節の成長発育、機能維持に関わる研究を続けこれまでに軟骨細胞特異的 *Ihh* ノックアウトマウスの下顎頭の形態変化を解剖組織学、組織形態計測学および骨・軟骨関連遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検索した。その結果、成長期マウスにおいてインディアンヘッジホッグ (*Ihh*) は前肥大軟骨細胞層 (*Ihh*-expressing chondrocytes) に認められ種々の細胞増殖に關与する PTHrP の発現が下顎頭軟骨表層部で検出されたが加齢に伴い *Ihh* と PTHrP の発現が減少し Histone H4C (細胞増殖マーカー) および Type collagen (幼若軟骨細胞マーカー) の発現も低下した。野生型にて *Ihh* は軟骨各層にシグナルを放出し、前軟骨細胞 (Chondroprecursors) で Sox9 (軟骨細胞分化誘導因子)、Runx2 (骨芽細胞分化誘導因子)、Osterix (骨形成転写因子) の発現を制御していた。このノックアウトマウスは *Ihh* シグナルがみられずこれら各細胞層で通常発現が確認されている Aggrecan, Coll1 も発現の減少があった。図 1 に *Ihh* が下顎頭軟骨各細胞層に影響する発現パターンを示す。(業績 3) また最近の応募者の研究はヘパラン硫酸 (HS) の硫酸基修飾酵素である Glucosaminyl *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase (NDST) の 1 つのアイソフォームである NDST1 遺伝子の胎児ノックアウトマウス下顎頭の形態変化を解剖組織学、組織形態計測学および骨・軟骨関連遺伝子発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検索した。このマウスは一部が胎齢 14.5 日 ~ 18.5 日で死亡し死因は頭蓋および眼の形成不全、呼吸不全、

肺拡張不全で大部分が出生直後に死亡することが報告されていたが顎関節の詳細な形成不全のメカニズムは解析はなされていなかった。μCT の解析より重度のノックアウトマウス表現型では頭蓋骨、下顎頭、下顎骨の形成はみられず、中等度のノックアウトマウス表現型では左側下顎頭の大きさは減少しているものの右側下顎頭は欠損していた。そして *in situ* ハイブリダイゼーション法の結果より下顎頭の growth plate は機能不全にあり表層 (Polymorphic layer) は厚くなっており骨化の亢進がみられた。*Ihh* のシグナル伝達は chondroprogenitor cell の増殖、Osterix と Col I の発現を制御していた。ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) が *Ihh* 情報伝達を抑制的に調整し、それによって軟骨膜/骨膜で fibro-polygonal zone と bone collar で *Ihh* 情報伝達を制限する。Ndst1 欠乏は内因性の HSPGs と結合する *Ihh* の減少により、*Ihh* 情報伝達を増大させた。この業績より HS の硫酸化に必要な Ndst1 が下顎および顎関節の成長のために重要で *Ihh* シグナルを制御していることを発見した。これまでの研究から顎関節の形成を制御するメカニズムの一端を解明した。

### 2. 研究の目的

変異型線維芽細胞増殖因子受容体型 (FGFR3) は骨の成長に抑制的に働くことが知られているが、下顎頭軟骨における研究は少なくそのメカニズムの詳細は不明である。そこで応募者は下顎頭軟骨の形成、成長、機能維持における FGFR3 の役割を検討することを目的とし、FGFR3 過剰発現するトランスジェニックマウスを用い解剖組織学、組織形態計測学および骨・軟骨関連遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析する。

### 3. 研究の方法

FGFR3 過剰発現するトランスジェニックマウスマウスを供与していただく計画である。そして顎関節、大腿骨のサンプルを採取 μCT より組織形態計測学的に解析し切片作成後 in situ hybridization 法を用い骨・軟骨関連遺伝子の発現パターンを解析する。また Gli1 LacZ マウス (HH レポーターマウス) 新生児から分離し下顎頭を器官培養する。すなわち bFGF 浸透ビーズを下顎頭軟骨に移植し BGJB 培地条件下で器官培養した時の細胞増殖、アポトーシスおよび骨・軟骨関連遺伝子の発現パターンを調べた。

#### 4. 研究成果

In situ hybridization 法の結果から野生型マウスの FgfR3 は chondroprogenitors と成熟した軟骨細胞で発現が認められ、また Indian hedgehog (Ihh) レセプターと転写目標 Patched 1 (Ptch1) も軟骨細胞で発現することを示した。FgfR3P244R 変異体において、下顎頭の軟骨成長板の成長は不規則で、In situ hybridization 法より Ihh の発現、chondroprogenitors における H4C、II、X 型コラーゲンの発現は減少した。また骨梁構造の形成は抑制され、骨吸収活性の増加を認めた。FGF2/FGF9 にて処理されたビーズを野生型下顎頭に移殖した EdU 細胞増殖活性の実験では Ptch1 と PTHrP の発現が下顎頭軟骨表層と chondroprogenitor 細胞層において減少した。TMJ の関節の関節窩の成長、発育の発育不全を認めた。FgfR3P244R は Ihh シグナリングと軟骨内骨化を制御に関与する。FGF と Ihh シグナリング間におけるバランスの維持は TMJ の成長のために重要な要因である。

#### 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)

Yasuda T, Nah HD, Laurita J, Kinumatsu T, Shibukawa Y, Shibutani T, Minugh-Purvis N, Pacifici M, Koyama E. Muenke syndrome mutation, FgfR3P<sup>244</sup>R, causes TMJ defects. J Dent Res. 2012 Jul;91(7):683-9.

[学会発表](計 1 件)

1. 渡邊昌弘、安部雅代、安田忠司、渋谷俊昭：歯根膜組織における組織幹細胞の局在：第 55 回春季歯周病学会学術大会、2012 年 5 月 18 日、北海道。
2. Watanabe M, Abe M, Yasuda T, Shibutani T: Localization of tissue stem cells in periodontal ligament tissue : AAP 98<sup>th</sup> Annual meeting:2012 年 9 月 29 日 Los Angeles
3. 安部雅代、渡邊昌弘、安田忠司、渋谷俊昭：インディアンヘッジホッグシグナル阻害による歯周組織への影響：第 56 回秋季歯周病学会学術大会、2012 年 9 月 22 日、東京。
4. Yasuda T, Watanabe M, Abe M, Shibutani T: Localization of tissue stem cells in periodontal ligament tissue : 10<sup>th</sup> Asian Pacific Society of Periodontology meeting, 2013 年 9 月 4 日、奈良。
5. 安部雅代、渡邊昌弘、安田忠司、渋谷俊昭：Cyclopamine による Ihh 阻害に対する歯周組織への影響：第 8 回日本歯周病学会中部地区大学日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会、2013 年 10 月 6 日、長野。
6. 渡邊昌弘、安部雅代、安田忠司、渋谷俊昭：EdU Labeling 法および免疫染色による組織幹細胞の局在：第 8 回日本歯周病学会中部地区大学日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会、2013 年 10 月 6 日、長野。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安田忠司 (YASUDA TADASHI)  
朝日大学・歯学部・口腔感染医療学講座歯  
周病学分野  
研究者番号：00410473

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：