

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861787

研究課題名(和文) FGF18による歯髄・骨芽細胞分化誘導メカニズムの解明とその臨床化

研究課題名(英文) Induction of odonto-/osteoblastic differentiation by FGF18 and its clinical application

研究代表者

大井 智恵 (Ohi, Chie)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30431935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：Fibroblast growth factors (FGF)18は、骨・軟骨組織の発生・分化に関与する成長因子として有名であるが、FGF18の歯髄細胞および骨芽細胞分化について検討した。FGF18はヒト歯髄幹細胞およびマウス頭蓋骨由来第2培養細胞、株化骨芽細胞様細胞MC3T3-E1の増殖を促進した。また、FGF18はヒト歯髄幹細胞アルカリフォスファターゼおよびDSPP mRNA発現の亢進を誘導した。以上の結果より、FGF18は硬組織分化を正の方向に制御する機能を有し、臨床において象牙芽細胞あるいは骨芽細胞の分化および石灰化を効率的に誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast growth factors (FGF)18 is a famous growth factor involved in development/differentiation of bone/cartilage tissues. This project focused on the effects of FGF18 on pulpal and osteoblastic differentiation. FGF18 promoted the cell growth of human dental pulp stem cells, mouse calvaria-derived osteoblasts, and mouse osteoblast-like cells: MC3T3-E1. It also enhanced alkaline phosphatase and DSPP mRNA expression. These results indicate that FGF18 possesses an ability to induce differentiation/maturation of hard-tissue forming cells. Clinical application of FGF18 may effectively induce differentiation/mineralization of odontoblasts and osteoblasts.

研究分野：歯内療法学

キーワード：FGF18 FGFシグナル 硬組織分化 歯髄幹細胞 骨芽細胞 分化誘導 Akt

1. 研究開始当初の背景

歯を口腔内で長く機能させるためには健全な状態の歯髄を保存することが重要である。しかし臨床においては、う蝕や破折等の理由でやむを得ず抜髄に至る例が少なくない。その原因として歯髄の炎症のコントロールが不可能であること、象牙質の誘導が困難であることがあげられる。

歯髄は本来さまざまな外来侵襲に対して修復象牙質を形成する機能を有しているが、歯髄組織に含まれると考えられている前駆細胞から象牙芽細胞への分化、そして石灰化組織形成に至る機序は明らかにされていない。発生過程においての象牙芽細胞の分化では上皮間葉相互作用が重要な働きを担っているが、歯髄細胞は単独であっても象牙芽細胞へ分化する能力を有している。したがって、歯髄細胞のプロパティを解明することは、象牙芽細胞への分化の機序の解明に寄与できるものと期待される。

申請者らは、Fibroblast growth factor (FGF) 18 が歯髄組織において特に強く発現していることを初めて認めた¹。さらに、歯髄細胞系の細胞である MDPC-23 に対し、FGF18 が増殖促進といった生理学的活性を有することも確認している。FGF18 は FGF8 ファミリーに属する成長因子であるが、FGF8 は歯の発生の初期に発現し、歯胚の発生に必須の因子である²。また、FGF18 遺伝子をノックアウトしたマウスは骨および軟骨分化に異常をきたすと報告されており³、FGF18 は硬組織形成において重要な役割をはたしていると推察される。すなわち、FGF18 が歯の発

生、そして歯髄における象牙芽細胞の分化あるいは硬組織形成に關与している可能性は高い。さらに近年、毛根における FGF18 発現が報告されている⁴が、毛根組織は歯胚と同様その発生に上皮間葉相互作用が必須の組織であり、毛根における FGF18 の発現が確認されたことは、歯の発生における FGF18 の関与を強く示唆していると言える。

2. 研究の目的

Fibroblast Growth Factors (FGFs) は代表的な成長因子であり、特に FGF2 は細胞増殖にかかわっている。申請者は FGFs のメンバーの一つである FGF18 に着目し、FGF18 が歯髄組織および歯髄細胞に高い発現が認められることを明らかにした。また FGF18 欠損は骨に異常および歯の発育不全が認められる。このことから、FGF18 は歯髄細胞および骨芽細胞において細胞の硬組織形成細胞への分化を誘導していると推察される FGF18 による歯髄細胞および骨芽細胞分化のメカニズムの一端を解明するとともに、臨床における FGF18 を用いた歯髄組織あるいは骨組織における硬組織誘導の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞および骨芽細胞への FGF18

タンパク添加による分化誘導

歯髄細胞としてヒト歯髄幹細胞（東京医科歯科大学倫理審査番号 #948）を用いる。FGF2 および FGF18 を添加し、細胞増殖について検討するとともに、象牙芽細胞特異的マーカー発現について検討する。骨芽細胞とし

て、マウス頭蓋骨由来初代培養細胞あるいは株化骨芽細胞用細胞 MC3T3E1 を用いる。細胞増殖は CCK8 を用い、象牙芽細胞特異的マーカー発現は RT-rPCR にて検討する。

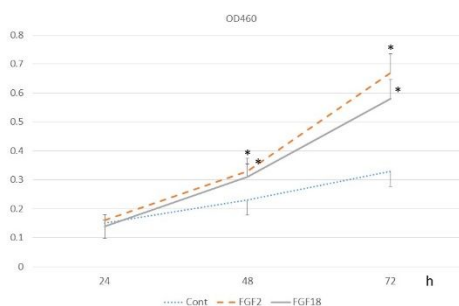
(2) FGF18 下流のシグナルの探求

代表的なシグナルカスケードである、MAPK、PI3K のリン酸化について、Western Blotting により検討する。また、それぞれのシグナルのインヒビターを使用し、分化誘導がどのように修飾されたのかについて検討する。

4. 研究成果

(1) 歯髄細胞および骨芽細胞への FGF18

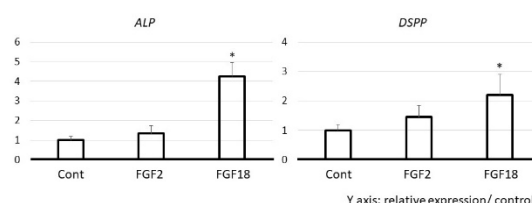
タンパク添加による分化誘導
ヒト歯髄幹細胞に FGF18 および代表的な FGF である FGF2 を添加し、細胞増殖を検討した。FGF18 を 100ng/ml で添加した歯髄幹細胞は非添加群と比較して有意に細胞増殖が促進された。FGF18 の細胞増殖促進効果は FGF2 とほぼ同等であった。



初代培養骨芽細胞および MC3T3E1 においても同様の結果が得られた。

次に象牙芽・骨芽細胞マーカー発現について検討を行った。その結果、FGF2 にはほとんど分化誘導能を認めないが、FGF18 には歯髄幹細胞において ALP および DSPP mRNA 発現を促進する作用があることが明らかになった。初代培養骨芽細胞および MC3T3E1 においても同様の結果が得られた

以上の結果は、FGF18 には硬組織形



成細胞の増殖を促進するのみならず、分化を正の方向に分化誘導する働きがあることが明らかになった。なお、FGF18 のターゲットである FGFR は 1-3 までは発現していることを RT-PCR にて確認している。

(2) FGF18 下流のシグナルの探求

FGF18 添加した後に、Western Blotting にてシグナルカスケードを検討したところ、PI3K 下流の Akt のリン酸化が亢進していた。Akt のリン酸化は骨芽細胞の成熟と関連すると報告されており、FGF18 は Akt を介して歯髄幹細胞分化を誘導したと推察される。なお、MAPK p38 のリン酸化も亢進していたが、これは細胞増殖活性と関連あるものと推察される。Akt リン酸化を誘導するメカニズムについては本研究から

は十分に解析できなかった。また、FGF18 を用いた in vivo の解析についても、解析が不十分である。FGF18 を臨床に応用し、硬組織形成を誘導するシステムについて今後さらに研究を進めていきたい。

<引用文献>

1. 大井 智恵, 歯 髄 に お け る Fibroblast growth factor 18 発現, 日本歯科保存学雑誌 50(1): 68 -74 2007.
2. Thesleff I., Developmental biology and building a tooth. Quintessence Int. 2003 Sep; 34(8): 613-20
3. Ohbayashi N., Shibayama M., Kurotaki Y. et. al., FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. Genes and Development 16; 870-879, 2002.
4. Kawano M.et. al., Comprehensive analysis of FGF and FGFR expression in skin: FGF18 is highly expressed in hair follicles and capable of inducing anagen from telogen stage hair follicles, J Invest Dermatol 124(5): 877-85, 2005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

川島伸之、山本弥生子、橋本健太郎、Alumddin Bakhit、小泉悠、大井智恵、鈴木規元、三次元培養による歯髄・歯肉幹細胞の生物学的特性、第14回 日本再生医療学会総会、2015年3月19-21日、パ

シフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

川島伸之、山本弥生子、橋本健太郎、Alumddin Bakhit、小泉悠、辺見浩一、大井智恵、鈴木規元、興地隆史、歯髄組織および歯肉組織より得られた間葉系幹細胞の硬組織形成細胞への分化能の比較、第142回日本歯科保存学会春季大会、2015年6月25日、26日、西日本総合展示場・北九州国際会議場(小倉、北九州市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大井 智恵 (OHI Chie)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号: 30431935