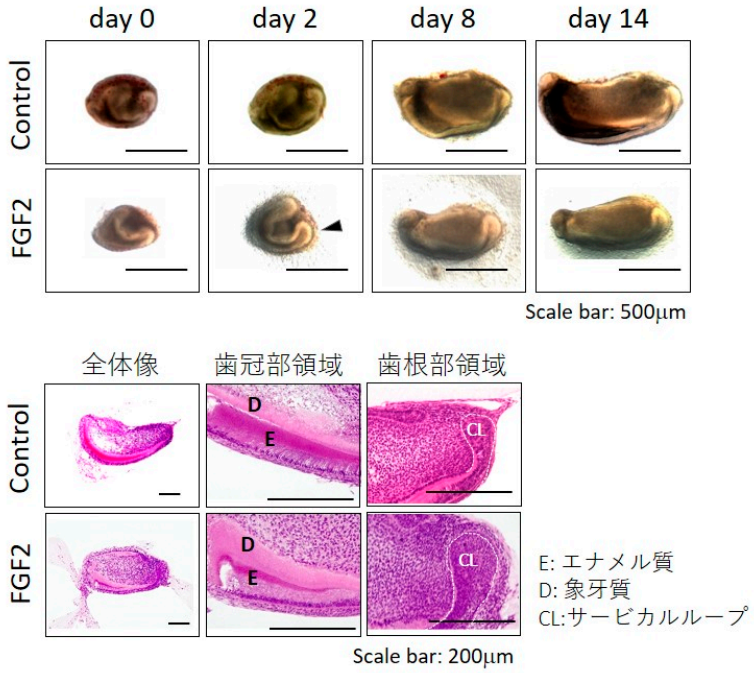
168　器官再生に向けた線維芽細胞増殖因子の機能理解と応用	大島　正充

【目的】ほぼ全ての器官は、胎児期の器官発生メカニズムによって誘導され、線維芽細胞増殖因子群（FGFs）などの遺伝子群による分子基盤が働いている。近年、機能不全に陥った器官を置換する器官再生医療が期待されているものの、再生器官は器官サイズや形態を十分に再現できていないことが課題とされてきた。本課題では、胚発生や器官発生において重要な役割を果たすFGF2が、歯胚発生に及ぼす影響を器官発生の観点から解析することにより、器官サイズ／形態形成の制御メカニズムの理解と応用を目的とした。

【方法】1. FGF2 による切歯歯胚発生への影響：C57BL/6J マウスから胎齢 14.5 日目の下顎切歯歯胚を摘出し、器官培養を行った。FGF2 添加群には Recombinant human FGF2、100 ng/mL を培地中に継続的に添加し、一方で Control 群には FGF2 非添加とし、切歯歯胚発生の観察と組織学的解析を行った。2. FGF2 濃度依存的な切歯歯胚の伸長抑制：培地中に 20 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL の rhFGF2 を継続的に添加し、8 日間の切歯歯胚の器官培養中の経時的な歯胚伸長率を算出した。3. FGF2 による歯胚発生関連遺伝子の発現変動：FGF2 非添加および添加（100 ng/mL）条件下における歯胚発生関連遺伝子の変動をリアルタイム PCR にて解析した。

【結果】1. FGF2 による切歯歯胚発生への影響：器官培養 14 日目には Control 群と比較して、FGF2 添加群の切歯歯胚の伸長が抑制され、エナメル質の減形成と象牙質形成の亢進、サービカルループ領域の肥大化が認められた。2. FGF2 濃度依存的な切歯歯胚の伸長抑制：高濃度の FGF2 添加群では、サービカルループ領域の肥大化が確認され、培養期間に伴って FGF2 濃度依存的に切歯歯胚の伸長が抑制された。3. FGF2 による歯胚発生関連遺伝子の発現変動：FGF2 添加群では、歯胚上皮における未分化マーカー遺伝子の発現上昇、および分化マーカー遺伝子の発現低下が認められた。一方、歯胚間葉においては未分化／分化マーカー遺伝子ともに発現上昇が認められた。

FGF2 による切歯歯胚発生への影響



168. 器官再生に向けた線維芽細胞増殖因子の機能理解と応用

大島　正充

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 顎機能咬合再建学分野

Key words：線維芽細胞増殖因子，器官発生，歯，器官再生医療

緒　言

ほぼ全ての器官は、胎児期の器官発生メカニズムによって誘導され、線維芽細胞増殖因子群（FGFs）などの遺伝子群による分子基盤が働いている。歯などの顎口腔器官においても、特徴的な分子による時空間的な制御を介して発生が進行し、多細胞動態の集積によって器官固有の三次元的形態が形成される［1］。歯胚発生を制御する分子基盤の解明を目的とする基礎研究も多く存在しており、数多くのシグナル分子による細胞増殖と遺伝子発現の連続的な制御によって進行するとされている［2］。その中でも、FGFs は胚発生や器官発生、細胞増殖・分化において重要な役割を果たしており、歯胚発生における FGFs 機能については、1. 歯胚上皮の FGF8 発現による間葉細胞の凝集、2. 歯胚上皮の FGF4 発現による咬頭形成、3. 歯胚間葉の FGF10 発現を介した歯胚上皮細胞の未分化性維持、4. FGF3 発現の濃度勾配による歯冠形態制御といった報告があるものの、生物学的機能の広汎性と多様性もあり、いまだ十分に明らかとされていない［3］。近年、機能不全に陥った器官を再生器官により置換する「器官再生医療」が期待されており、歯や毛髪、分泌腺から技術開発が進められている［4］。しかしながら、現在の再生歯や再生唾液腺では、生体が有する天然器官と比較して非常に小さく、器官機能を十分に代替できていないことが課題とされてきた。申請者らはこれまでに、歯胚発生に関わる遺伝子発現の網羅的な検証から、これまでに報告の少ない FGF2 が歯のサイズや形態形成に深く関与していることを新たに見出してきた。本課題では、FGF2 が歯胚発生に及ぼす影響を器官発生の観点から解析することにより、器官サイズ／形態形成の制御メカニズムの理解と応用を目的とした。

方法および結果

1.　FGF2 による切歯歯胚発生への影響

はじめに、FGF2 が歯胚発生に及ぼす影響を解析するために、C57BL/6J マウス（CLEA Inc.、Shizuoka、Japan）から胎齢 14.5 日目の下顎切歯歯胚を摘出し、通法に従い器官培養を行った［5］。器官培養にあたり、FGF2 添加群には Recombinant human FGF2、100 ng/mL（rhFGF2、R&D system Inc.）を培地中に継続的に添加し、一方で Control 群には FGF2 非添加とし、両群ともに 2 日ごとに培地交換を行った。器官培養 2 日目に FGF2 添加群では唇側サービカルループ領域の肥大化が確認され、器官培養 8 日目および 14 日目には Control 群と比較して、FGF2 添加群の切歯歯胚の伸長が抑制されていることが示された（図 1a）。次に、器官培養 14 日目における切歯歯胚の組織学的解析を行うために、通法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて評価した［5］。歯冠部領域においては、Control 群と比較して、FGF2 添加群の切歯歯胚ではエナメル質の減形成が認められるとともに、象牙質形成の亢進・肥厚化が認められた。さらに歯根部領域では、齧歯類における恒常的な切歯伸長に重要な役割を果たすサービカルループが、FGF2 添加群において肥大化していることが示された（図 1b）。

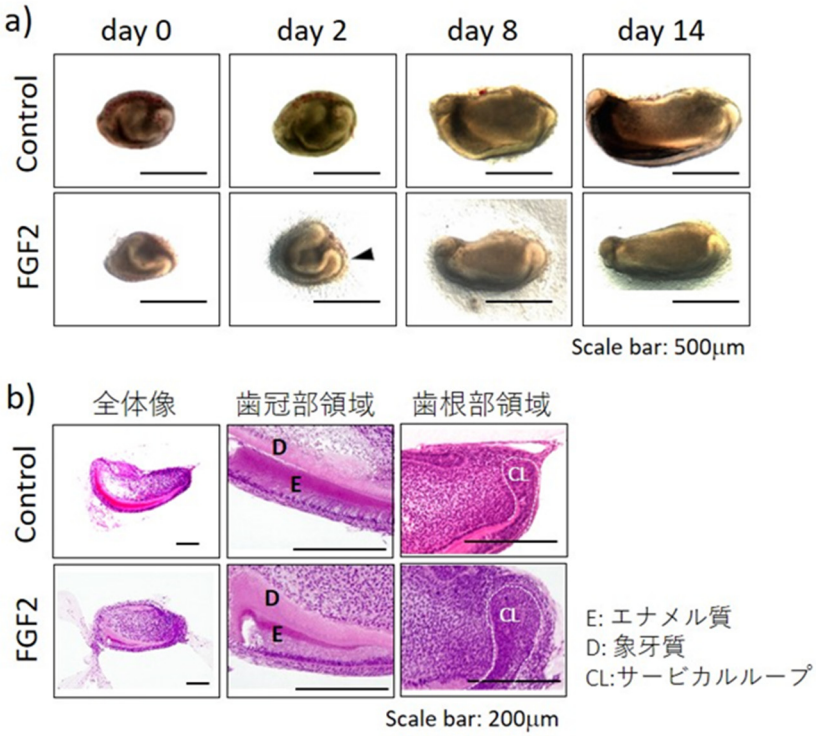


図 1. FGF2 による切歯歯胚発生への影響

a) FGF2 非添加および添加時におけるマウス切歯歯胚発生の経時的な器官培養像を示す。
矢頭：サービカルループの肥大化が確認される。（スケールバー：500μm）

b) FGF2 非添加および添加時におけるマウス切歯歯胚の器官培養 14 日目の HE 染色像を示す。
左列：歯胚全体像、中列：歯冠部領域の拡大像、右列：歯根部領域の拡大像。（スケールバー：200μm）

2. FGF2 濃度依存的な切歯歯胚の伸長抑制

FGF2 添加により切歯歯胚の伸長抑制が認められたことから、FGF2 濃度による効果を確認するために、培地中に 20 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL の rhFGF2 を継続的に添加し、8 日間の切歯歯胚の器官培養を行った。器官培養 2 日目には 100 ng/mL および 500 ng/mL の FGF2 添加群では、唇側ならびに舌側サービカルループ領域の肥大化が確認され、培養期間に伴って切歯歯胚の伸長が抑制されていることが示された（図 2a）。実際に、器官培養中における切歯歯胚の伸長率を培養開始時の切歯長さからそれぞれ算出したところ、Control 群（FGF2 非添加）では、培養 8 日目において約 3 倍の伸長率であった。一方で、培養 8 日目において、20 ng/mL および 100 ng/mL の FGF2 添加群では伸長率が約 2.35 倍、100 ng/mL の FGF2 添加群では伸長率が約 1.35 倍となっており、FGF2 濃度依存的な切歯歯胚の伸長抑制効果が示された（図 2b）。

3. FGF2 による歯胚発生関連遺伝子の発現変動

FGF2 添加による歯胚発生に及ぼす効果を詳細に解析するために、FGF2 非添加および添加（100 ng/mL）条件下における歯胚発生関連遺伝子の変動をリアルタイム PCR にて解析した。器官培養 8 日目において、歯胚上皮マーカー遺伝子である *Sonic hedgehog (Shh)*、*Notch1*、*Amelogenin*、*Ameloblastin* の発現を解析したところ、FGF2 添加群では Control 群と比較して、未分化マーカーである *Notch1* の発現が有意に上昇しており、その一方で分化マーカーである *Amelogenin* と *Ameloblastin* の発現が有意に低下していた（図 3a）。また、歯胚間葉マーカー遺伝子である *Msx1*、*FGF3*、*Dentin sialophosphoprotein (Dspp)*、*Runx2* の発現を解析したところ、FGF2 添加群では Control 群と比較して、未分化マーカーである *Msx1* と *FGF3* の発現が有意に上昇しており、加えて分化マーカーである *Dspp* および *Runx2* の発現においても有意に上昇していた（図 3b）。

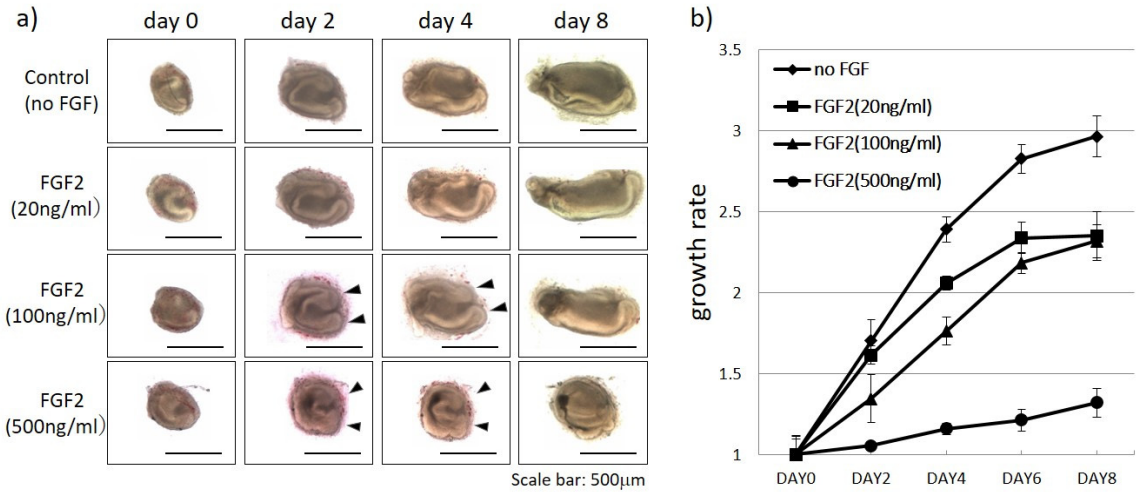


図 2. FGF2 濃度依存的な切歯歯胚の伸長抑制

a) FGF2 非添加および各濃度にて添加時におけるマウス切歯歯胚発生の経時的な器官培養像を示す。矢頭：サービカルループの肥大化が確認される。（スケールバー：500 μ m）

b) FGF2 非添加および各濃度にて添加時におけるマウス切歯歯胚の伸長率（growth rate）を示す。

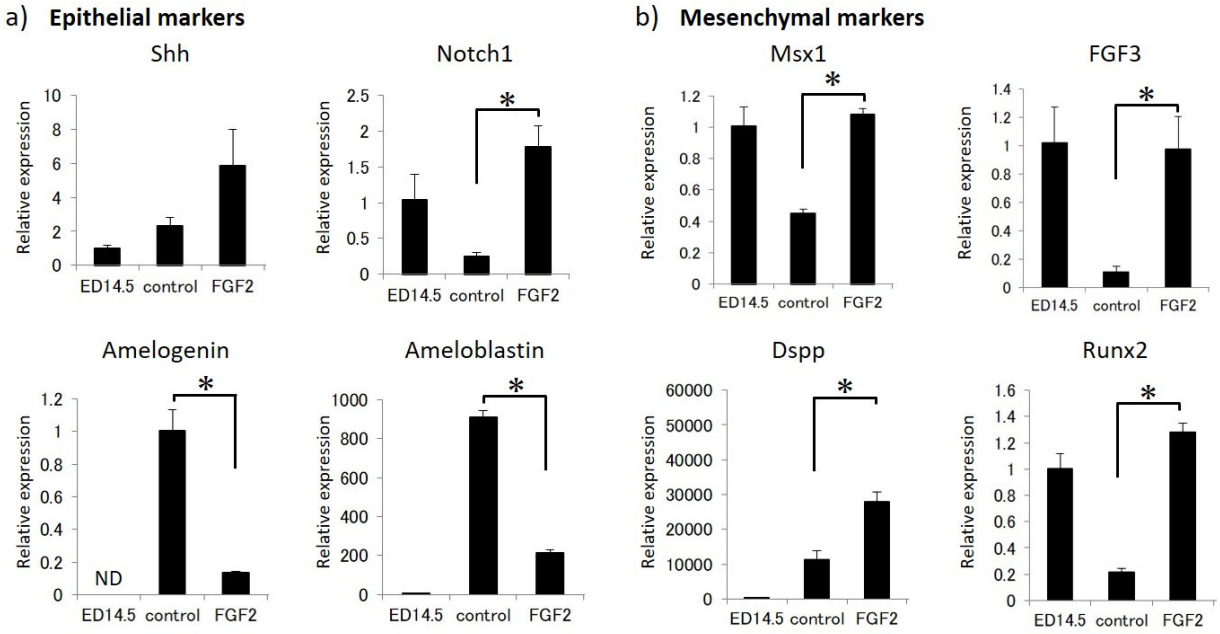


図 3. FGF2 による歯胚発生関連遺伝子の発現変動

a) FGF2非添加および添加時におけるマウス切歯歯胚の上皮系マーカー遺伝子の発現比較を示す。また参考値として、器官培養開始時の胎齢 14.5 日の切歯歯胚の発現量を ED14.5 として示す。unpaired t-test、$P<0.05$。

b) FGF2非添加および添加時におけるマウス切歯歯胚の間葉系マーカー遺伝子の発現比較を示す。また参考値として、器官培養開始時の胎齢 14.5 日の切歯歯胚の発現量を ED14.5 として示す。unpaired t-test、$P<0.05$。

考　察

本研究において、FGF2 添加により切歯歯胚の発生における伸長抑制とサービカルループ領域の肥大化が認められ、FGF2 濃度依存的に切歯伸長の抑制効果は高くなることが示された。また、組織学的解析ではエナメル質の減形成、および象牙質形成の亢進・肥厚化が認められており、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析では、FGF2 添加により歯胚発生に関連する遺伝子発現に特徴的な変化が認められた。歯胚上皮における未分化マーカーである *Shh* と *Notch1* の発現が上昇し、その一方で分化マーカーである *Amelogenin* と *Ameloblastin* の発現が有意に低下していたことから、歯胚上皮細胞では FGF2 により未分化性が維持されることにより切歯伸長が抑制され、恒常的な切歯伸長に重要な役割を果たすサービカルループ領域の肥大化を及ぼす可能性が示唆された。一方で、歯胚間葉における未分化マーカーである *Msx1* と *FGF3* の発現が有意に上昇し、分化マーカーである *Dspp* および *Runx2* の発現においても有意に上昇していた。このことから、FGF2 は歯胚発生における象牙質形成の亢進と肥厚化に影響していることが示唆された。しかしながら、歯胚発生は歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞の相互作用により進行し、上皮－間葉組織間で複雑な発現分子のやり取りがあることが知られている［2］。本研究はリコンビナント FGF2 の外的な添加による変化を解析しており、上皮－間葉相互作用に基づく器官発生現象に本質的な効果を及ぼしたかどうかは明らかにされていないため、さらなる検証が必要である。今後は、歯胚上皮・間葉組織に対する FGF2 遺伝子導入による解析や、FGF2 添加・導入による 3 次元的な細胞動態解析を行うことにより、器官サイズ／形態制御を可能とする技術開発を進めていく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学大学院医歯薬学研究部顎機能咬合再建学分野の松香芳三教授、ならびに宮城麻友助教である。また、本研究に助成をくださった上原記念生命科学財団に深く感謝する。

文　献

1) Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. Nat Rev Genet. 2004 Jul;5(7):499-508. PMID:15211352, DOI: 10.1038/nrg1380
2) Thesleff, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. J Cell Sci. 2003 May 1;116(Pt 9):1647-8. PMID: 12665545, DOI: 10.1242/jcs.00410
3) Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. Mech Dev. 2000 Mar 15;92(1):19-29. PMID: 10704885, DOI: 10.1016/s0925-4773(99)00322-6
4) Oshima M, Ogawa M, Tsuji T. Regeneration of complex oral organs using 3D cell organization technology. Curr Opin Cell Biol. 2017 Dec;49: 84-90. PMID: 29289879, DOI: 10.1016/j.ceb.2017.12.011
5) Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. Nat Methods. 2007 Mar;4(3):227-30. Epub 2007 Feb 18. PMID: 17322892, DOI: 10.1038/nmeth1012