

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09626

研究課題名(和文)Crouzon症候群におけるゲノム編集を用いた遺伝子変異修復と新規治療薬剤選出

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms associated with pathogeny of Crouzon syndrome and drug discovery

研究代表者

鳥居 大祐 (TORII, Daisuke)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：10548259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では頭蓋縫合早期癒合症候群の1つであるCrouzon症候群(CS)の発症機序につながる分子機構解明と新規治療薬剤選出を目指し研究を行った。

CS由来歯髄幹細胞について遺伝子発現およびmitogen-activated protein kinase (MAPK)の解析を行った。CSの原因となるfibroblast growth factor receptor 2の変異についてゲノム編集を行うためスライシングバリアント解析を行った。

CS由来歯髄幹細胞は健常者由来歯髄幹細胞に比較し、硬組織形成関連遺伝子の高発現と、プロテインキナーゼC刺激時におけるMAPKの低リン酸化率が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋縫合早期癒合症候群の疾患モデルにおけるこれまでの研究では遺伝子変異箇所の修復が困難であったのに対し、ゲノム編集と部位特異的組換えとの併用によって、原因となる変異箇所を修復し正常な細胞機能の回復を図ることが、本研究課題の学術的意義であると考えられる。

また、得られた細胞試料における分子動態を、クラウド型ナレッジベースへアップロードすることで、Crouzon症候群における症状の発症抑制にはたらく新規治療薬剤選出につながることで、本研究課題の社会的意義であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Crouzon syndrome (CS) is an inherited craniosynostosis that presents with cranial deformity, hypoplastic maxilla and exophthalmos associated with fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2 mutation. In this study, we aimed to solve the molecular mechanisms associated with pathogeny of CS, and to search a new drug.

We evaluated multipotency of CS patient-derived dental pulp stem cells (CS-DPSCs). CS-DPSCs showed multipotency equivalent to healthy donor DPSCs. We investigated the levels of mRNA expression related to mineralization and the phosphorylation rate of mitogen-activated protein kinases (MAPK). High expression of mineralization-related genes were detected in CS-DPSCs compared with in healthy donor DPSCs. Activation of protein kinase C induced a lower phosphorylation rate of MAPK in CS-DPSCs than healthy donor DPSCs.

We performed splice variant analysis toward the RNA-guided genome editing of FGFR2 in DPSCs due to analyze the molecular mechanisms compared with unedited DPSCs.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：Crouzon症候群 頭蓋縫合早期癒合症候群 FGFR2 MAPキナーゼ ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Crouzon 症候群は、中顔面低形成や眼球の突出等を主徴とする遺伝性の頭蓋縫合早期癒合症候群の1つで、FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) の変異が原因であることが知られている (Galvin BD, *et al.*, 1996)。その発症機序については不明な点が多く、治療は出生以降、複数回の手術を要し、患者や家族の負担は大きい。また、子宮体癌の FGFR2 変異との関連性も指摘されており (Pollock PM, *et al.*, 2007) 発症に関連する分子機構を解明し患者にとって負担の少ない新規治療用薬剤の開発につながる新たな知見を得ることは重要である。

近年、遺伝性疾患への医用工学的アプローチにおいては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来の細胞について、欠損しているエクソンをゲノム編集技術でノックインしたタンパク質合成を回復させるという手法が報告されている (Li HL, *et al.*, 2015)。本研究課題においても、ジーンターゲティングによって変異箇所を修復した細胞を用いることで、FGFR2 変異と Crouzon 症候群の発症機序に関連する分子機構について同一患者由来の分子動態を比較解析することが可能となり、さらに、解析結果をクラウド型ナレッジベース上へ反映することで新規治療用薬剤を選出できると考え、研究を遂行した。

2. 研究の目的

本研究課題では、Crouzon 症候群における FGFR2 の変異情報に基づき、患者由来の細胞においてゲノム上の変異箇所を修復し、変異修復前後の細胞と健常者由来の細胞との比較からその発症機序の分子機構解明と治療用薬剤選出を行うことを目的として、研究を遂行した。

3. 研究の方法

Crouzon 症候群患者と健常者の歯科治療に際して得られた抜去歯に由来する歯髄幹細胞をそれぞれ培養し、幹細胞マーカー遺伝子の *OCT3/4*、*NANOG*、*CD146* の発現を RT-PCR で確認した。多分化能については石灰化能と脂肪分化能をそれぞれ Alizarin Red S と Oil Red O 染色にて解析した。

FGFR2 の配列に関しては、エクソン 5 からエクソン 19 について cDNA を作製後、シーケンス解析を行い、さらに、*FGFR2* の遺伝子発現を定量 RT-PCR で解析した。また、ゲノム編集に用いるガイド RNA の設計のために *FGFR2* のスプライシングバリエーション解析を行った。

硬組織形成関連遺伝子の発現に関しては、*bone gamma-carboxyglutamate protein (BGLAP)*、*specificity protein 7 (Sp7)*、*Distal-Less Homeobox 3 (DLX3)* の遺伝子発現を定量 RT-PCR で解析した。

タンパク質の解析に関しては、FGFR2 の下流経路の伝達分子であるプロテインキナーゼ α (PKC) の刺激剤として 2.5 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加後、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) と p42/44 MAPK のリン酸化タンパク質について Immunoblot を行った。

本研究は、日本歯科大学の倫理審査委員会の承認を得て行われた。

4. 研究成果

Crouzon 症候群患者由来歯髄幹細胞および健常者由来歯髄幹細胞ともに、幹細胞マーカーの *OCT3/4*、*NANOG*、*CD146* の発現が確認された (図 1. 鳥居 他, 2019)。多分化能についても、石灰化誘導と脂肪分化誘導でそれぞれ Alizarin Red S 陽性、Oil Red O 陽性を示した。

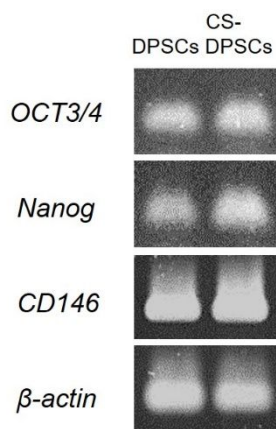
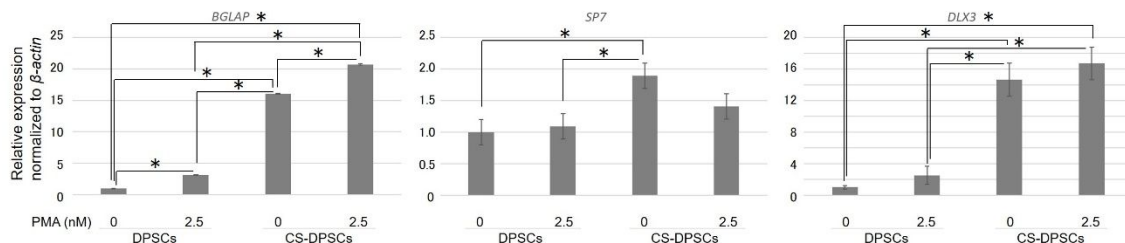


図1. 幹細胞マーカーの発現

FGFR2 のシーケンス解析の結果、Crouzon 症候群患者由来歯髄幹細胞で Gly338Arg (Gorry MC, *et al.*, 1995) の変異が認められ、FGFR2 の発現については通常培地での培養下で健常者由来歯髄幹細胞と比較して細胞外および細胞内領域とも約 0.1 倍であった (Torii D, *et al.*, 2021)。

健常者由来歯髄幹細胞における FGFR2 スプライシングバリエントは NM_000141.5 であった。

硬組織形成関連遺伝子に関しては、健常者由来歯髄幹細胞と比較して Crouzon 症候群患者由来歯髄幹細胞では BGLAP、SP7、DLX3 とともに高発現が解析され、PMA 添加で健常者由来歯髄幹細胞においては 8 時間後に BGLAP の発現が 3.2 倍に上昇したが、Crouzon 症候群患者由来歯髄幹細胞では PMA 添加による BGLAP 発現上昇は 1.29 倍であった (図 2. 鳥居 他, 2019)。



Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA with Tukey's post-test. The data are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$

図2. 硬組織形成関連遺伝子の発現

また、MAPK についても、Crouzon 症候群患者由来歯髄幹細胞では健常者由来歯髄幹細胞と比較して PMA 添加後に低リン酸化率が解析され (Torii D, *et al.*, 2021) 本研究で用いた Crouzon 症候群患者由来歯髄幹細胞の硬組織形成において、PKC を介する FGF シグナル伝達系に異常のあることが示唆された。

今後、細胞の不死化を行い、スプライシングバリエントの情報に基づき設計したガイド RNA を用いてゲノム編集を行う予定である。

< 引用文献 >

Constitutive Receptor Activation by Crouzon Syndrome Mutations in Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) 2 and FGFR2/Neu Chimeras. Galvin BD, Hart KC, Meyer AN, Webster MK, Donoghue DJ. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996; 93(15): 7894-7899.

Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H, Mohammadi M, Futreal PA, Stratton MR, Trent JM, Goodfellow PJ. Oncogene, 2007; 26(50): 7158-7162.

Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watanabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S, Hotta A. Stem Cell Reports, 2015; 4(1): 143-154.

Crouzon syndrome: mutations in two spliceforms of FGFR2 and a common point mutation shared with Jackson-Weiss syndrome. Gorry MC, Preston RA, White GJ, Zhang Y, Singhal VK, Losken HW, Parker MG, Nwokoro NA, Post JC, Ehrlich GD. Hum Mol Genet, 1995; 4(8): 1387-1390.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Torii D, Kobayashi T, Horie T, Tsutsui TW.	4. 巻 236
2. 論文標題 Characterization of dental pulp stem cells isolated from a patient diagnosed with Crouzon syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 5317-5324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥居大祐, 小林朋子, 堀江哲郎, 筒井健夫
2. 発表標題 Crouzon 症候群患者由来の歯髄幹細胞における遺伝子発現とタンパク質発現の解析
3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥居大祐, 小林朋子, 堀江哲郎, 筒井健夫
2. 発表標題 Scleraxisノックアウトヒト歯根膜由来不死化細胞におけるTenomodulin遺伝子発現解析
3. 学会等名 第60回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	筒井 健夫 (TSUTSUI Takeo) (70366764)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小林 朋子 (KOBAYASHI Tomoko) (10548283)	日本歯科大学・生命歯学部・講師 (32667)	
研究 分 担 者	堀江 哲郎 (HORIE Tetsuro) (10508675)	日本歯科大学・生命歯学部・講師 (32667)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関