

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18431

研究課題名(和文) 頭蓋縫合早期癒合症の病態における骨芽細胞の分化とその役割

研究課題名(英文) Differentiation of the osteoblast and its role in the pathogenesis of the craniosynostosis

研究代表者

吉岡 史隆 (Yoshioka, Fumitaka)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：30620249

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)：研究期間全体を通して、症候群性頭蓋縫合早期癒合症4例、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症3例の骨標本を採取することができた。新型コロナウイルス感染拡大の影響もあり、採取できた骨標本は少数に限られたが、間葉系幹細胞のマーカーを用いた免疫染色を行い、免疫組織学的に間葉系幹細胞の存在を同定しようと試みた。しかしながら培養細胞の免疫染色に難渋し、培養細胞内に間葉系幹細胞が含まれるのかを確認することができなかった。そのため、その後の間葉系幹細胞の単離・培養やRunx2、Actin2の遺伝子異常および発現解析には至らず、学会や論文の発表には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究期間全体を通して、症候群性頭蓋縫合早期癒合症4例、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症3例の骨標本を採取することができた。この標本を用いて、現在も研究を継続中である。研究機関内には成果を上げることはできなかったが、得られた標本および培養細胞から、頭蓋縫合早期癒合症の病態解明に寄与する結果を導くべく、今後も研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：We were able to obtain bone specimens from four cases of syndromic craniosynostosis and three cases of nonsyndromic craniosynostosis throughout the study period. Although only a small number of bone specimens could be collected due to the spread of the infection of COVID-19, we attempted to identify the presence of mesenchymal stem cells immunohistochemically by immunostaining with a marker for mesenchymal stem cells. However, we had difficulty in immunostaining cultured cells and could not confirm whether the cultured cells contained mesenchymal stem cells. Therefore, we were not able to isolate and culture mesenchymal stem cells or analyze the genetic abnormalities and expression of Runx2 and Actin2, which we had planned to do afterwards, and we were not able to present our findings at a conference or in a scientific paper.

研究分野：小児脳神経外科学

キーワード：頭蓋縫合早期癒合症 骨芽細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

頭蓋縫合早期癒合症は約 2500 出生に 1 人の発生率の稀な先天性疾患であり、本来開存しているべき頭蓋縫合が早期に癒合することで、頭蓋変形に伴う醜状を生じるのみならず、頭蓋内圧亢進により脳の発達(言語獲得能力や学習能力)への影響が報告されている。外貌の異常のみでも児の心理的な影響は無視できず、社会生活への適応に大きな障がいとなっている。

それにも関わらず、頭蓋縫合早期癒合症の病態は未だ解明されていない。膜性骨化という骨化形態を示す頭蓋骨では骨芽細胞の分化・成熟がその発症に関与している可能性があるものの、骨芽細胞の分化に関わる細胞内シグナル伝達経路については、まだ不明な点も多い。

近年の遺伝子研究の進歩により *MSX2*、*TWIST1/2*、*EGFR1/2/3*、*EFNB2* の変異が様々な頭蓋縫合早期癒合症の発症とリンクしていることが示された。しかし、これらの遺伝子変異はクルーズン病やアペール症候群に代表される家族性の症候群性頭蓋縫合早期癒合症に関与する一方、疾患の約 85% と大多数を占める非症候群性頭蓋縫合早期癒合症の病態は未だ解明されていない。頭蓋骨が四肢骨と異なり、間葉系幹細胞から骨芽細胞へ分化する膜性骨化という骨化形態を示すことや前頭骨は神経堤細胞由来、頭頂骨や後頭骨は中胚葉由来とその組織由来も異なることも病態解明をより複雑にしていると考えられる。

非症候群性頭蓋縫合早期癒合症では、症候群性頭蓋縫合早期癒合症で明らかとなった遺伝子変異よりさらに下流に位置する骨芽細胞の分化に関わるシグナル調節因子が、早期癒合の原因となっている可能性がある。ただし、これまでの研究は主にマウスにおける研究であり、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症のヒトにおける詳細な探索は行われていない。

本研究においては、症候群性および非症候群性頭蓋縫合早期癒合症のヒト臨床摘出標本における頭蓋骨縫合部の骨芽細胞の分化を、*Runx2*、*Axin2* という骨芽細胞分化シグナル調節因子という側面から明らかにしたい。特に症候群性頭蓋縫合早期癒合症の臨床摘出標本に加え、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症においては罹患縫合と正常縫合という同一個体内での差異にも注目し、比較検討を行うことで、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症の病態に迫りたいという背景があった。

また、現在の医学においては頭蓋縫合早期癒合症に対する治療は外科治療が唯一の方法であり、患児の早期癒合した縫合部位や頭蓋形状、年齢などを勘案しつつ、全頭蓋形成術や前頭眼窩前進術といった一期的な頭蓋形成術や骨延長器を用いた頭蓋形成手術、罹患縫合切除およびヘルメット療法などが行われている。複数回の外科治療を要する患児も多く、早期癒合した縫合を切除しても急速な骨形成のため、再手術を要することも経験される。本研究により本疾患の病態に迫ることは、将来的には手術以外の治療法の開発や手術中に再骨化の予防に用いる材料の開発にもつながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*Runx2*、*Axin2* という間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化するにあたり、重要な働きを担うシグナリング調節因子の非症候群性頭蓋縫合早期癒合症のヒトにおける働きを解明し、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症の病態に迫ることにある。

具体的には、早期癒合した縫合部と正常縫合では骨芽細胞の分化に同一個体内においても差異があり、それは *Runx2* と *Axin2* の発現に差異があることに由来するという 2 段階の仮説を明

らかにすることを目的としている。

遺伝子異常が明らかとなってきた症候群性頭蓋縫合早期癒合症と異なり、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症においては、遺伝的傾向もなく、その原因は未だ明らかではない。したがって、患者ならびにその家族の不安は非常に大きく、原因や病態を解明することはリスクを抱える家系へ適切なアドバイスを行うことにもつながる。

3. 研究の方法

1) 臨床摘出標本の採取

本疾患の手術に際し、患者・家族の同意が得られた症例において、早期癒合した縫合部と正常縫合部を採取する。頭蓋縫合早期癒合症の手術は早期癒合した骨を切除することが目的であり、通常の手術においても切除、破棄するものを臨床摘出標本として利用する。一部は免疫組織学的解析のため、EDTA 脱灰し、パラフィン包埋し、一部は細胞培養のため、凍結保存する。

2) 免疫組織学的検討

症候群性頭蓋縫合早期癒合症における頭蓋縫合、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症における罹患縫合、正常縫合の3つの頭蓋縫合部において、間葉系幹細胞、骨前駆細胞、前骨芽細胞、骨芽細胞と順に分化する細胞の分布を CD73、CD90、CD11b、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (OCN)、オステオポンチン (OPN)、オステオプロゲステリン (OPG) による免疫組織学的に解析する。このことにより、本研究の1つめの仮説である早期癒合した縫合部や正常縫合部では、それぞれの細胞の分布が異なるという仮説を検討する。

3) 頭蓋縫合部の骨髓検体からの間葉系幹細胞の単離、培養

臨床摘出標本の骨髓から CD73 を標的としてセルソーターで間葉系幹細胞を単離する。間葉系幹細胞は単離した後も元々の由来組織へと分化傾向を有することが知られており、特に骨髓由来の間葉系幹細胞は増殖能が高いことも知られている。そのため、骨髓由来の間葉系幹細胞は研究利用が進んでいる。

石灰化誘導培地にカルシウム親和性蛍光色素を添加して培養することにより、最終的に成熟した骨細胞へと分化させることで細胞外マトリックスの石灰化を蛍光顕微鏡や共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて測定した蛍光強度の差から評価し、それぞれの臨床摘出標本の石灰化傾向を定量的に比較、検討する。

4) 症候群性および非症候群性の罹患縫合と正常縫合由来の細胞での Runx2、Axin2 遺伝子異常解析

単離・培養した症候群性頭蓋縫合早期癒合症の癒合部由来細胞、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症の癒合部由来細胞、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症の正常縫合由来細胞より、DNA を抽出し、シーケンサーにて遺伝子異常の有無を検討する。

5) 症候群性および非症候群性の罹患縫合と正常縫合由来の細胞での Runx2、Axin2 の発現解析

単離・培養した症候群性頭蓋縫合早期癒合症の癒合部由来細胞、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症の癒合部由来細胞、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症の正常縫合由来細胞を確保し、mRNA を抽出して、real time-PCR によって発現を定量化する。また蛋白を抽出し、Western blotting を行い、蛋白発現を評価する。

4. 研究成果

1) 臨床摘出標本の採取

研究機関を通して、症候群性頭蓋縫合早期癒合症 4 例、非症候群性頭蓋縫合早期癒合症 3 例から骨標本を採取することができた。しかしながら、COVID-19 感染拡大の影響からか、症例の集積

は十分とは言えない症例数に留まった。

2) 免疫組織学的検討

少数の症例から得られた標本を用いて、CD73、CD44やCD106等の間葉系幹細胞のマーカを用いた免疫染色を行い、免疫組織学的に間葉系幹細胞の存在を同定しようと試みたが、培養細胞の免疫染色がなかなかうまくいかず、得られている培養細胞内に間葉系幹細胞が含まれるのかを確認することにも難渋し、研究期間内には成功させることができなかった。継代を重ねることでの細胞へのダメージも考慮し、現在は適切な培養環境や染色条件の検討を行っているところである。

3) ~ 5)

その後計画していた間葉系幹細胞の単離・培養や Runx2、Actin2 の遺伝子異常および発現解析に研究期間中に到達することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------