

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月15日現在

機関番号： 82626
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2009～2012
 課題番号： 21590088
 研究課題名（和文） FGF受容体の変異による骨・軟骨形成不全疾患発症メカニズムの分子レベルでの解析
 研究課題名（英文） Analysis of Molecular Mechanisms of Apert Syndrome

研究代表者

浅田 真弘 (MASAHIRO ASADA)
 独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
 研究者番号：30344120

研究成果の概要（和文）：

野生型 FGFR2 はヘパリン存在下でのみ FGF1 と結合するのに対し、Apert 症候群の原因変異を導入した FGFR2 はヘパリン非存在下でも FGF1 と結合した。また、野生型 FGFR2c を導入した細胞の増殖には FGF と HP の両者が必要であったが、Apert 症候群の原因変異をもつ FGFR2 導入細胞は、FGF1 のみで細胞増殖が惹起された。この現象は、細胞内でのシグナル伝達の活性化によっても、検証された。

研究成果の概要（英文）：

FGF1 binds to wild-type FGFR2 in the presence of heparin, however it binds to mutant FGFR2 having Apert syndrome either in the presence or absence of heparin. In the same way, BaF3 cells introduced with wild-type FGFR2c required both FGF1 and heparin for cell growth, but that with Apert mutated FGFR2c could grow only in the presence of FGF1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成22年度	800,000	240,000	1,040,000
平成23年度	800,000	240,000	1,040,000
平成24年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：繊維芽細胞増殖因子・Apert 症候群・先天性奇形・グリコサミノグリカン

1. 研究開始当初の背景

Apert 症候群などの頭蓋縫合早期癒合症や軟骨形成不全症は繊維芽細胞増殖因子 (FGF) の受容体 (FGFR) の突然変異によって生じることが知られている。しかし、Apert、Crouzon、Jackson-Weiss、Pfeiffer 等の様々な臨床症状を呈したり、軟骨低形成から致死性骨異形成まで重篤度に違いが生じるにもかかわらず、遺伝子上での突然変異部位との相関が明

らかにされておらず、FGFR の変異がもたらす疾患発症メカニズムが分子レベルで解明されたとは言い難い。FGF は 22 種類のリガンドと主として 7 種類の受容体の組合せにより様々な生理機能が発揮される。受容体は標的細胞の膜表面において、リガンド及びヘパリン硫酸との結合によって活性化し、二量体化が生じ、細胞内のチロシンキナーゼ活性を通して核にまでシグナルが伝わると考えられている。しかし、上記の疾患はいずれもが

FGFR の機能獲得型 (gain-of-function) 変異であることから、点突然変異がどのように受容体活性の亢進をもたらすのか、そして、いかなるメカニズムで骨形成不全が発症するのかについてはわかっていない。

本研究課題代表者らはこれまで、生理的条件下における各種 FGF リガンドと各種 FGF 受容体との結合を各種 GAG が共存する条件下で網羅的に解析してきた。その結果、ある種のリガンドと受容体の結合特異性 (選択性) やその結果発揮される FGF の生理活性は、共存する GAG の構造に依存することを明らかにした (Asada M. *et al.*, *Biochim Biophys Acta*. (2008))。一方、2006 年、McDowell らは Apert 症候群に見られる点突然変異を導入した FGFR がヘパラン硫酸非依存的にリガンドと結合し、細胞増殖因子としての活性を発揮することを報告した (McDowell LM. *et al.*, *J Biol Chem*. (2006))。この報告をもとに、申請者らは、FGFR の点突然変異による受容体活性の亢進をヘパラン硫酸への依存性の消失で説明できる可能性を想起するに至った。しかし、McDowell らの報告は、Apert 症候群に見られる FGFR2 の点突然変異 S252W についてのみのものであるが、Apert 症候群に限ってもこれ以外に数種の点突然変異が報告されており、Crouzon、Jackson-Weiss、Pfeiffer の各症候群においても、複数の FGFR で多くの変異が知られている。そこで本研究においては、上記の仮説が広く一般化できることを実証するため、その他の変異、あるいは他の症候群における FGF 受容体 (FGFR1、FGFR2、FGFR3) の変異が「リガンド-受容体-GAG」の結合やその後の細胞内でのシグナル伝達に及ぼす影響を網羅的に解析することを目標とする。

2. 研究の目的

本研究課題代表者らは、平成 16 年度～平成 17 年度・科学研究費補助金・基盤研究 (C) における「グリコサミノグリカンの構造多様性に基づく細胞増殖因子の活性制御機構の解明」で、各種 FGF 及び各種 FGFR を可溶性組換え体として調製し、各種 GAG 存在下におけるリガンド-受容体の結合特異性と GAG 依存性を網羅的に解析した。そこで、これまでに報告されている複数の変異や他の症候群における FGF 受容体 (FGFR1、FGFR2、FGFR3) の変異を導入した FGFR を可溶性組換え体として調製し、この *in vitro* の結合試験に供してその反応性を検証する。これにより、上述の McDowell らの報告が一般化できるものか否かを検証する。また、これらの変異受容体を発現する培養細胞 (マウス pro B 由来 Ba/F3 細胞) を構築し、リガンドによって惹起される細胞内シグナルを評価する。ここでは、リ

ガンド特異性 (選択性)、GAG 依存性もあわせて詳細に解析する。これらを通して、病態との関連、特に発症のメカニズムを分子レベルで明らかにすることができると考えている。さらに、これらの疾患への対処を意識して、ドミナントネガティブ型可溶性受容体を用いた受容体機能の抑制を図る実験系を構築し、遺伝性疾患の治療法開発への足がかりを築く。

3. 研究の方法

本研究課題代表者らはこれまでに、23 種の FGF リガンドと、7 種類の FGF 受容体を組換え体として調製し、「リガンド-受容体-グリコサミノグリカン (GAG)」の結合を *in vitro* で評価する系を構築した。また、内在的な FGF 受容体を発現していないため、導入した特定の受容体のみを発現する Ba/F3 細胞を作成することで、受容体特異的な反応 (増殖、分化、DNA 合成) を *in vivo* で評価する系も構築した。本研究では、これまでに調製・準備した FGF リガンドや可溶性 FGF 受容体、Ba/F3 細胞などを最大限に利用する。一方、Apert 症候群等の骨・軟骨形成不全症における原因突然変異は十数種類以上あり、いずれもが機能獲得型 (gain-of-function) の変異で、受容体の機能亢進をもたらしている。申請者らは「FGF 受容体の点突然変異による受容体活性の亢進はヘパラン硫酸への依存性が消失するためである。」との仮説を提案しており、これを検証するため、各種の疾患で見られる様々な点突然変異型の FGF 受容体を、これまでと同様に可溶性蛋白質として調製し、*in vitro* における結合試験を網羅的に実施する。これにより、「リガンド-受容体-GAG」の三者複合体形成のレベルでの突然変異の影響を検証する。さらに、点突然変異が GAG 依存性を消失させるメカニズムを構造生物学的に解析することも視野に入れる。

一方、*in vivo* での機能を解析するため、正常あるいは各種の点突然変異型 FGF 受容体を発現するベクターを構築し、これを Ba/F3 細胞に導入することで、変異型受容体に特異的に反応する細胞を樹立する。これを標的細胞として、FGF リガンド及び共存する GAG 依存的な細胞増殖活性あるいは DNA 合成促進活性を評価する。また、細胞増殖あるいは DNA 合成に至るまでの細胞内でのシグナル伝達の過程を、MAP キナーゼ等、シグナル伝達の下流にある分子の活性化 (リン酸化等) で評価する。これにより、受容体の突然変異に伴う機能亢進あるいは恒常的活性化が、リガンドの結合段階で規定されるのか、その後の細胞内シグナル伝達によって規定されるのか判断される。

FGF 受容体 (FGFR1、FGFR2、FGFR3) は、オ

ルタネイティブスプライシングにより、主に上皮組織に発現される IIIb 型と間充織に発現される IIIc 型とがある。exon a は b 型、c 型に共通に利用されるが、exon b、exon c はそれぞれ IIIb 型、IIIc 型にのみ利用される。Apert, Pfeiffer, Crouzon, Muenke, Jackson-Weiss 等の症候群で見られる FGF 受容体の変異は主として、細胞外領域の第 3 Ig ループを構成する exon a 及び exon c に認められ、一部は細胞内領域のチロシンキナーゼ領域に存在する。各症候群は臨床症状を基準に判定されるため、変異が存在する受容体の型や変異アミノ酸は様々である。骨形成の過程では、間充織に発現される FGF7 や FGF10 などが、上皮系細胞に発現される b 型受容体に、一方上皮系細胞に発現される FGF2, 4, 6, 8, 9, 18 などが、間充織に発現される c 型受容体に作用し、その結果、間充織細胞が骨芽細胞に分化すると考えられている。これらの組織の間ではグリコサミノグリカンを含む数多くの細胞外マトリックスが存在し、複数の FGF リガンド、FGF 受容体の相互作用を制御しているものと考えられる。骨分化の過程はこのように複雑で多くの分子が関わっている。本研究で利用する *in vitro* 結合試験や *in vivo* 機能試験は、特定のリガンド、特定の受容体、特定の GAG の間での結合や反応を評価するため、複雑な骨分化の過程を単純化して解析することが可能である。このため、受容体の点突然変異の影響を鋭敏に捉えることができると考えている。これらを通して、先天性奇形疾患の発症メカニズムの解明に寄与することを目標とする。

さらに、長期的には、治療法の開発に向けた研究を試行する。微小環境に共存する GAG の構造を改変することで GAG を利用するシグナル伝達を修飾したり、ドミナントネガティブ型の受容体を導入することで異常に亢進した FGF 機能を抑制できる可能性を検討し、先天性奇形疾患の治療法の開発に結びつける。

4. 研究成果

繊維芽細胞増殖因子 (FGF) は受容体 (FGFR) と結合することで様々な生理活性を発揮する。この際、ヘパラン硫酸をはじめとするグリコサミノグリカン (GAG) の共存が必須であると考えられている。近年、先天性奇形である Apert 症候群に見られる FGFR2 の点突然変異によって、FGFR がヘパラン硫酸非依存的にリガンドと結合する例が報告され、FGFR の突然変異による受容体活性の亢進をヘパラン硫酸への依存性の消失で説明できる可能性が考えられた。本研究では、他の類似の疾患における FGFR の変異が三者 (リガンド、受容体、GAG) 複合体の形成や細胞内でのシグ

ナル伝達に及ぼす影響を解析し、FGFR の変異がもたらす疾患の発症メカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。

まず、複数の変異型の受容体遺伝子を構築し、これらを組換え体可溶性蛋白質として調製した。これらを用いて、*in vitro* のリガンド結合試験を行った結果、野生型 FGFR2 はヘパリン存在下でのみ FGF1 と結合するのに対し、Apert 症候群の原因変異を導入した FGFR2 はヘパリン非存在下でも FGF1 と結合した。

また、Apert 症候群の原因変異を導入した FGFR2 を発現する細胞株を構築し、その細胞増殖に与える FGF と HP の効果を検証した。その結果、野生型 FGFR2c 導入細胞の増殖には FGF と HP の両者が必要であったが、変異型 FGFR2c (S252W、P253R) 導入細胞は、FGF1 のみで細胞増殖が惹起されることを観察した。

さらにこの現象を検証する目的で、細胞内でのシグナル伝達を解析した。その結果、変異型 FGFR2c (S252W、P253R) 導入細胞は、FGF1 のみで FGFR 下流のシグナルが活性化していることが判明した。

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)

[学会発表] (計 7 件)

① 浅田 眞弘、中村 悠、本田 絵美、隠岐潤子、鈴木 理、今村 亨、「点突然変異 FGF 受容体の複合体形成とシグナル伝達異常の解析」、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場 (福岡県)

② 浅田 眞弘、中村 悠、本田 絵美、隠岐潤子、鈴木 理、今村 亨、「ヘパリン依存性のシグナル伝達に変化を及ぼす Apert 変異型 FGF 受容体の解析」、第 31 回日本糖質学会大会、2012 年 9 月 20 日、鹿児島市民文化ホール (鹿児島県)

③ 中村 悠、浅田 眞弘、本田 絵美、隠岐潤子、今村 亨、鈴木 理、「先天性疾患に存在する点突然変異 FGF 受容体の複合体形成とシグナル伝達異常の解析」、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 31 日、北海道大学 (北海道)

④ 中村 悠、浅田 眞弘、本田 絵美、隠岐潤子、今村 亨、鈴木 理、「Apert 症候群の病態発症メカニズムの解析」、第 11 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2012 年 1 月 31 日、産総研つくば中央共用講堂 (茨城県)

⑤中村 悠、浅田 眞弘、本田 絵美、隠岐潤子、今村 亨、鈴木 理、「FGF受容体の点突然変異によるリガンド結合能とシグナル伝達の変化」、第55回日本薬学会関東支部大会、2011年10月8日、東邦大学船橋キャンパス（千葉県）

⑥中村 悠、浅田 眞弘、本田 絵美、隠岐潤子、今村 亨、鈴木 理、「点突然変異を持つFGF受容体の複合体形成とシグナル伝達異常の解析」、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都国際会議場（京都府）

⑦中村 悠、浅田 眞弘、本田 絵美、隠岐潤子、今村 亨、鈴木 理、「変異型FGF受容体の複合体形成とシグナル伝達異常の解析」、日本薬学会第131年会、2011年3月31日、グランシップ（静岡県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 眞弘 (Masahiro ASADA)
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門・主任研究員
研究者番号： 30344120

(2) 研究分担者

今村 亨 (Toru IMAMURA)
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門・研究グループ長
研究者番号： 80356518

鈴木 理 (Masashi SUZUKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門・主任研究員
研究者番号： 70192622

(3) 研究協力者

中村 悠 (Yu NAKAMURA)
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門

本田 絵美 (Emi HONDA)
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門

隠岐 潤子 (Junko OKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門