

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月21日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791648

研究課題名（和文） 軟骨無形成症における小胞体ストレスの関与の解明

研究課題名（英文） The analysis of the involvement of ER stress in FGFR3-related chondrodysplasias

研究代表者

佐藤 亮祐 (SATO RYOSUKE)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：30581152

研究成果の概要（和文）：四肢短縮型低身長をきたす最も頻度の高い骨系統疾患である軟骨無形成症は Fibroblast growth factor receptor(FGFR)3 の変異によるシグナル過剰が原因であると考えられているが、いまだ不明な点が多く、別の病態の存在が考えられる。本研究において、一部の変異型では小胞体に蓄積し、小胞体ストレスによる細胞死が誘導されていることが明らかになった。本疾患における病態の解明は新たな治療方法の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：Various point mutations of the Fibroblast Growth Factor Receptor(FGFR)3 Gene are known to cause short limb dwarfism. It is generally accepted that constitutive activation of the FGFR3 signaling is the main mechanism, but the severity of phenotype is not completely associated with the activation of FGFR3 signaling, suggesting the existence of the other mechanism. We showed the new mechanism that the accumulation of mutant FGFR3 in endoplasmic reticulum(ER) induced apoptosis of chondrocyte through ER stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：軟骨無形成症、FGFR3、小胞体ストレス、細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1)軟骨無形成症は四肢短縮型低身長をきたす骨系統疾患の中で最も頻度が高く、知能は正常で生命予後は良好であるが、社会生活や医療・福祉・教育の面で様々なハンディを背負っている。本疾患は Fibroblast Growth Factor Receptor(FGFR)3 遺伝子の点変異によることがわかっており、変異の部位の違いにより、軽症型である軟骨低形成症(hypochondroplasia: HCH)や重症型である致タナトフォリック軟骨異形成症(thanatophoric dysplasia: TD I, TD II)、発達遅延と黒色表皮種を合併する型(Severe

Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans: SADDAN)とさまざまな症状を呈する。現在、軟骨無形成症の治療は対症療法が主であり、低身長に対しては仮骨延長術が主流であるが、本質的な治療とは言い難く病因メカニズムに基づく新たな治療法の開発が望まれる。

(2)FGFR3 は細胞膜に発現する 1 回膜貫通型の受容体であり、リガンドである FGF を介して二量体形成することにより、シグナルを下流に伝える。成長軟骨細胞において FGFR3 シグナルは MAPK 経路と JAK/STAT1 経路を介して細胞の増殖と分化

を抑制することがわかっており、軟骨無形成症では **FGFR3** の変異によりシグナルが恒常的に活性されることにより発症すると考えられている。しかし変異型 **FGFR3** によるシグナル活性の程度と重症度が相関しない例もあり、別の病因メカニズムの存在が考えられる。

(3)タンパク質合成の工場である小胞体は低酸素や低栄養などの外的要因、変異などによるタンパク質の高次構造の変化などの内的要因により折りたたみが障害される。これを小胞体ストレスという。全ての細胞は小胞体ストレスに対して小胞体ストレス応答と呼ばれる適応機構を持ち、生体機能に重要な働きをしている。過度の小胞体ストレスにより適応機能の破綻をきたすと細胞死が誘導される。近年、炎症性疾患、虚血性疾患、動脈硬化、癌や神経変性疾患など様々な疾患でこの適応機構の破綻が病態形成に関与することが示唆されている。また骨系統疾患においても骨形成不全症や **MCDS** などで小胞体ストレスが病態形成に関与することが報告されている。

2. 研究の目的

(1)現在、**FGFR3** の異常による軟骨異形成症に対しては対症療法が主であり、病態に即した治療法の開発が望まれている。**FGFR3** のシグナル経路の制御による治療法の開発が進み、動物実験では一定の効果をあげているが、正確な病態の解明が治療法の選択に重要であり、小胞体ストレスの関与が明らかになれば、変異型 **FGFR3** のタイプに応じて小胞体ストレスを緩和する薬剤を選択したり組み合わせることにより、さらなる治療効果が得られると考えられる。

(2)細胞外基質を盛んに産生する成長軟骨細胞は発達した小胞体を持つことから、小胞体ストレス応答が成長軟骨細胞の機能発現に重要な働きをしていることが予想される。**FGFR3** の変異により高次構造の変化が起こり、ミスフォールドした変異型 **FGFR3** が小胞体に蓄積することにより小胞体ストレスを起し細胞死が誘導されているのではないかと、そして細胞死が本疾患の病態形成に影響を与えているのではないかと仮説を立て検証した。

3. 研究の方法

(1)**FGFR3** のさまざまな部位の変異により軟骨異形成症が引き起こされることが明らか

になっている。現在報告されている軟骨異形成症の原因となる変異 **FGFR3** 発現プラスミドを構築した(図1)。

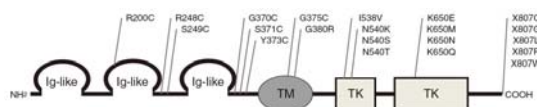


図1. **FGFR3** 遺伝子変異部位

(2)293T 細胞および cos-7 細胞に変異型 **FGFR3** を発現させて、その細胞内の局在をウェスタンブロットおよび免疫染色で解析した。

(3) 小胞体ストレスに対する応答経路には **PERK** 経路、**IRE1** 経路、**ATF6** 経路の3つがある。変異型 **FGFR3** の発現によりこれらの経路が活性化されるかを解析するために、293T 細胞に変異型 **FGFR3** を発現させてルシフェラーゼアッセイでスクリーニングを行った。

(4) スクリーニングで小胞体ストレスを起こすことが疑われる変異型 **FGFR3** を前軟骨細胞培養株 **ATDC5** に発現させて、小胞体ストレスマーカーである **BiP** と小胞体ストレスによる細胞死のマーカーである **CHOP** の発現が上昇するか否か、また小胞体ストレス検知器である **IRE1** の活性により生じる **XBP1** のスプライシングに関して **RT-PCR** 法を用いて検討した。

(5)小胞体ストレスを引き起こす変異型 **FGFR3** を前軟骨細胞培養株 **ATDC5** に発現させることによって、細胞死が誘導されるかどうかを **Annexin V assay** および **Hoechst 33258 dye** を用いた核染色法で解析した。

(6)マウス初代培養軟骨細胞に小胞体ストレスを起こす変異型 **FGFR3** を発現させ、小胞体ストレスを軽減させる化学シャペロンの処理により、細胞死から回復できるかを **colony formation assay** で検討した。

研究成果

(1)変異型 **FGFR3** のなかには軟骨無形成症の原因であり **FGFR3** シグナルの過剰を起こすことが報告されている **G380R** 変異型のような細胞膜に局在する変異型がある一方で変異型 **FGFR3** が細胞膜まで輸送されずに小胞体に蓄積している変異型があることが明らかになった(図2)。

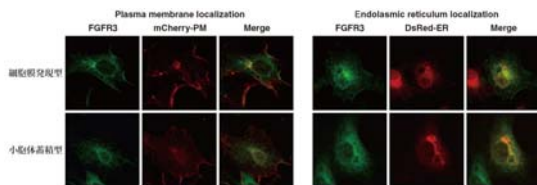


図2. 変異型 FGFR3 の細胞内局在

(2) ルシフェラーゼアッセイの結果から、小胞体に蓄積するタイプの変異型 FGFR3 を発現した細胞では PERK 経路、IRE1 経路、ATF6 経路のいずれも誘導がかかっており、小胞体ストレスが起こっていることが明らかになった。

(3) 小胞体ストレスに対して細胞は小胞体ストレス応答により適応しようとする。十分に適応できた場合では細胞は生存するが、適応できない場合は生体内のホメオスタシスを保つために細胞死が誘導される。前軟骨細胞培養株 ATDC5 に小胞体ストレスを起こす変異型 FGFR3 を発現させたところ、生存細胞数の減少および細胞死の増加を認めた。Hoechst33258dye を用いて核染色を行い、核の形態を観察すると変異型 FGFR3 を発現した細胞では核の凝集を認め細胞死が引き起こされていることが明らかになった(図3)。また変異型 FGFR3 発現細胞では小胞体ストレスによる細胞死マーカーである CHOP の発現上昇を認め、変異型 FGFR3 の発現により小胞体ストレスが起こり、細胞死が誘導されることを見出した。

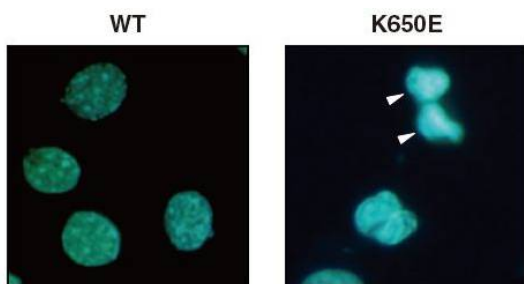


図3. 変異型 FGFR3 の発現による細胞死

(4) FGFR3 は長管骨において成長軟骨板の増殖軟骨細胞に発現し骨の成長を制御している。そのため、マウス初代培養軟骨細胞を用いて実際の軟骨細胞における変異型 FGFR3 の影響を調べた。軟骨細胞に小胞体ストレスを起こす変異型 FGFR3 を発現させると野生型 FGFR3 を発現させた場合と比べて生存細胞数の減少及び細胞死の増加を認めた。そして小胞体ストレスを軽減させる化学シャペロンなどの薬剤を投与することにより細胞死か

ら回復することを見出した。

(5) 以上の結果から、軟骨異形成症の原因として従来から考えられている FGFR3 のシグナル過剰説に対して、変異部位の違いによっては小胞体ストレスを介した細胞死が病態に関与することが強く示唆された(図4)。現在、FGFR3 のシグナル経路に関して解明が進み、G380R 変異型マウスを用いた動物実験レベルでは FGFR3 のシグナル経路を制御する CNP や Snail-1 を制御したり、FGFR3 のシグナルを抑制する薬剤を投与することにより長管骨の成長障害が緩和されることがわかってきている。しかし変異型の違いにより病態が異なることが本研究で明らかになったため、変異型のタイプによってはシグナルの制御のみでは効果が弱いもしくは効果がない例が出てくることが想像される。そのような例では小胞体ストレスを軽減させる化学シャペロンなどの薬剤が効果を得られると考えられ。現在、骨系統疾患は遺伝子異常により分類されているが、今後は病態に沿った新しい分類を作成することが治療法の選択のうえでも重要になってくると考えられる。

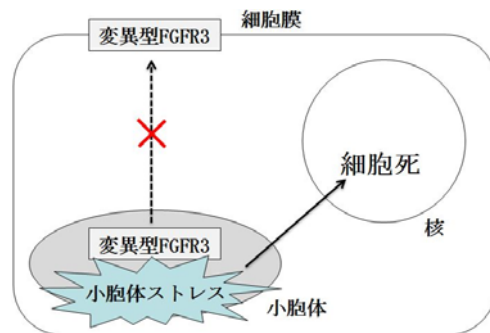


図4. 小胞体ストレスによる細胞死説

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4件)

(1) Sato, R., Takahashi, M. Miyake, M. Tsugawa, K. Oyadomari, S. Yasui, N. The Involvement of endoplasmic reticulum stress in FGFR3-related chondrodysplasias. Orthopaedic Research Society 2013年1月26日サンアントニオ(USA) Henry B. Gonzalez Convention Center

(2) 佐藤亮祐, 三宅雅人、倉橋清衛、高原一菜、野村明利、津川和江、小倉淳、井上寛、安井夏生、親泊政一
FGFR3 遺伝子異常による軟骨異形成症における小胞体ストレスの関与

第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14 日
(福岡県)福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)

(3) **Sato, R.** Goda, Y. Oyadomari. S. Yasui, N.

The Involvement of endoplasmic reticulum stress in FGFR3-related chondrodysplasias. European Orthopaedic Research Society 2012 年 9 月 27 日 アムステルダム (オランダ王国) The ACTA Building

(4) **Sato, R.** Takahashi, M. Miyake, M. Ito, T. Oyadomari, S. Yasui, N.

The Involvement of endoplasmic reticulum stress in FGFR3-related chondrodysplasias. Orthopaedic Research Society 2012 年 2 月 4 日 サンフランシスコ (USA) Moscone West Convention Center

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dmb/DMB/homu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 亮祐 (SATO RYOSUKE)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：30581152

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：