

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861777

研究課題名(和文) Apert症候群頭蓋冠縫合部早期癒合症に対するヘパラン硫酸鎖制御による治療法開発

研究課題名(英文) The control of FGFR signal by heparan sulfate chain degrading enzyme results in altered closure of cranial suture in Apert mouse model

研究代表者

鈴木 尋之 (SUZUKI, HIROYUKI)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：70634492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Apert症候群は、線維芽細胞増殖因子2型受容体(FGFR2)のリガンド(FGF)依存的機能亢進型の点変異(S252W)を原因とし、頭蓋冠縫合部早期癒合症や合指症を示す。本研究の目的は、Apert症候群モデルマウスを用いた病態発症メカニズムの解明と、ヘパラン硫酸分解酵素によるFGFシグナル抑制が頭蓋冠縫合部早期癒合に対して与える効果を明らかにし、非侵襲的な新規治療法開発への糸口を見つけることである。ヘパラン硫酸分解酵素を、ビーズを担体とし、胎児期マウス頭蓋冠縫合部に局所作用させる実験系を施行した。その結果、ヘパラン硫酸分解酵素の早期癒合症に対する治療効果の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Apert syndrome is characterized by craniosynostosis and syndactyly, and is predominantly caused by point mutation of either S252W or P253R in the fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2 gene. These mutation cause activation of FGFR2 depending on ligand binding. Recently, an Apert syndrome mouse model (FGFR2 knock-in mouse model) showed phenotypes similar to those of Apert syndrome patients.

In this study, we plan to investigate the phenotypes of Apert syndrome mouse model to clarify the pathogenic mechanism of Apert syndrome. Moreover, we analyze the effects of FGF signal control by heparan sulfate (HS) chains degrading enzyme craniosynostosis to improve new noninvasive therapeutic approach. We planned and performed the experiment that we operated HS chain degrading enzyme on coronal suture of mouse at a fetal age by gel beads as a carrier material locally. Our results suggest that HS chain degrading enzyme could be a useful tool for treating craniosynostosis in Apert syndrome.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Apert症候群

1. 研究開始当初の背景

Apert 症候群に代表される頭蓋冠縫合部早期癒合症は、多くが中顔面の劣成長に起因した著しい不正咬合を有するため、歯科にも深く関与する。現状では、これらの疾患の形態と機能の改善には、侵襲の大きな外科的アプローチの併用が必須となり、Apert 患者では頭蓋変形および脳圧亢進防止のため、頭蓋冠拡張の外科手術を出生後縫合閉鎖再発の度に受けなければならない。

Apert 症候群は頭蓋冠縫合部早期癒合に加えて、合指症を主徴とする常染色体優性遺伝疾患であり、原因として FGFR2 の 2 種類の変異 (S252W、P253R) が同定されている。FGFR2 には間葉系組織に主に発現する FGFR2IIIc と上皮系組織に主に発現する FGFR2IIIb の 2 つの isoform があり、変異は受容体に対するリガンドの結合能の亢進と結合特異性の喪失を惹起し、これら受容体のリガンド依存的な機能亢進を誘導する。

近年、S252W と P253R に関してノックインマウスも作出され、Apert 症候群の病態に関して多くの知見が得られつつある。しかしながら、これらノックインマウスを用いた病態メカニズムの解明はいまだ完全ではない。また、治療法の開発という視点にたった研究はほとんど行われていないのが現状である。

申請者は Apert 症候群における冠状縫合部早期癒合症に対し、非侵襲的で安全な新規治療法を分子生物学的に開発することを目指し研究を行ってきた。S252W 変異を付与した FGFR2IIIc-S252W と、細胞内ドメインを欠落し FGF と結合してもシグナルを伝達しない可溶性変異体 soluble FGFR2IIIc-S252W (sFGFR2IIIc-S252W) を開発し、その分子薬理学的機能を検討してきた。

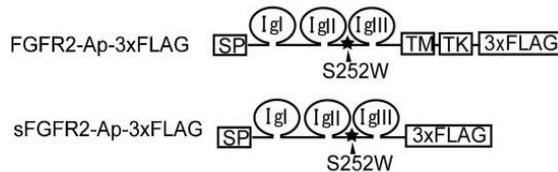
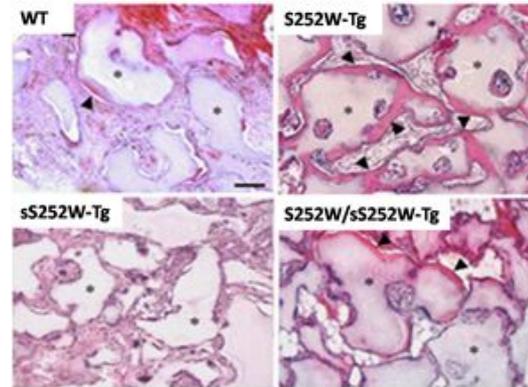


図 1. S252W 変異をもつ FGFR2 とその可溶性 soluble form

申請者は、FGFR2IIIc-S252W を導入したトランスジェニックマウス (S252W-Tg) および sFGFR2IIIc-S252W を導入したトランスジェニックマウス (sS252W-Tg)、さらに両者の交配により得た双方の遺伝子を持つマウス (S252W/sS252W-Tg) を作出し、頭蓋冠由来骨芽細胞の表現型の解析を行なった。分化能に関して、S252W-Tg 由来骨芽細胞は分化が亢進するのに対し、sS252W-Tg 由来骨芽細胞ではほとんど認められなかった。S252W/sS252W-Tg 由来骨芽細胞は野生型 (WT) 由来骨芽細胞と同程度となった。また、分子シグナル解析の結果から、S252W-Tg 骨芽細胞では MEK、ERK、p38 を介する FGF

シグナル経路が活性化し、*in vitro* での増殖・分化ならびに *in vivo* での骨形成が促進するのに対し、sS252W-Tg 骨芽細胞ではこれらの現象は抑制することが分かった。FGFR2IIIc-S252W と sFGFR2IIIc-S252W の共発現する S252W/sS252W-Tg 骨芽細胞においては、S252W 変異による FGF シグナル経路は抑制され、増殖・分化能は WT 骨芽細胞と同程度となった。図 2 は、トランスジェニックマウスの頭蓋冠骨芽細胞を β -TCP と免疫不全マウス背側皮下へ移植し、8 週後の移植片中の骨様組織を HE 染色により観察したものである。S252W-Tg 由来骨芽細胞では WT



β -TCP (*), 骨様組織 ()

図 2. 頭蓋冠由来骨芽細胞の移植実験における骨様組織形成

由来骨芽細胞に比較し、骨様組織形成の促進が観察されたのに対して、sS252W-Tg 由来骨芽細胞では骨様組織形成は認められなかった。S252W/sS252W-Tg 由来骨芽細胞は WT 由来骨芽細胞と同程度の骨様組織形成となった。これらの結果から、sFGFR2IIIc-S252W を用いた FGF シグナルの抑制は Apert 症候群の新規治療法の開発に有用と考えられた(2012 年論文発表)¹⁾。

一方、FGF と FGFR の結合にはグリコサミノグリカンの介在が必要であり、グリコサミノグリカンが生合成されない場合 FGF シグナルは欠失する。グリコサミノグリカンの主成分であるヘパラン硫酸 (HS) は細胞膜および細胞外基質 (ECM) に普遍的に存在し、FGF や PDGF 等、様々な成長因子の働きを調節する。細胞表面において FGF・HS・FGFR の ternary complex が形成 (図 3) され、HS は FGF・FGFR の結合と、細胞内のチロシナーゼの活性化とリン酸化に必須である。

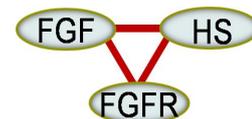


図 3. Ternary complex の概念図

グリコサミノグリカンの主成分である HS はコアプロテインと 1 つ以上の負電位のヘパラン硫酸鎖 (HS 鎖) によって構成されている。

HS 鎖は FGF と高い親和性を示し、その伸長はグリコシルトランスフェラーゼである extosin により起こり、リガンド刺激により伸長が促進される。HS 鎖の非存在下では FGF は FGFR と結合せず、FGF シグナルは活性化しないことが分かっている。また、ヘパラン硫酸 (HS) が S252W 変異による FGF シグナル亢進にも必須であるといえる。さらに、Apert 症候群の主要な表現型の発症部位である骨・軟骨は、ECM が豊富であり、ECM 成分の異常な変化も報告されている。この点からも、ECM の主成分であるヘパラン硫酸の制御は、骨・軟骨の成長コントロールに有効であると考えられる。以上のことから、FGF シグナルの抑制方法として、ヘパラン硫酸を分解する酵素の使用が考えられた。

2. 研究の目的

In vivo でのデータ集積に際し、より典型的な表現型を示す Apert 症候群型モデルである FGFR2-S252W knock-in マウスを用いて、Apert 症候群の詳細な病態解明を行なうとともに、ヘパラン硫酸分解酵素を用いた FGF シグナル抑制の頭蓋冠縫合部早期癒合症に対する薬理効果を検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) Apert 症候群マウスモデル

Apert 症候群マウスモデルとして、Deng CXらが作出した FGFR2-S252W knock-in マウス(2003年論文発表)²⁾ を供与してもらい、実験に使用することとした。胎齢 18.5 日で冠状縫合癒合を示す。

(2) ヘパラン硫酸分解酵素

ヘパラン硫酸分解酵素は、FGF と高い親和性を持つ、ヘパラン硫酸の構成成分のヘパラン硫酸鎖に対して、その伸長を妨げ、断片化させることが可能である。その結果、FGF シグナルを抑制することが予想された。ヘパラン硫酸特異的分解酵素として細菌由来酵素で市販されている heparinase (sigma 社) がある。その他には、Sulf-1, Sulf-2 と呼ばれる細胞外ヘパラン硫酸鎖の 6 位の硫酸を特異的に脱硫酸する酵素 (ヘパラン硫酸鎖自体は分解されないが FGF2 の結合性は低下する) や、heparanase とよばれるヘパラン硫酸分解酵素があるが、いずれも精製された酵素としては市販されておらず、トランスフェクションの実験が必要となる。本実験では、同一条件で実験可能であり、ヘパラン硫酸鎖を分解する heparinase III (sigma 社) を使用する薬剤と選定した。FGFR2-S252W knock-in マウスの縫合部へ局所的に作用させるために、担体として用いる物質 (ヘパリンビーズ、アガロースゲル、ナノゲル等) の選定が必要であった。今

回、酵素含有性、一定時間の徐放性、生体親和性および操作性を考え、直径 150–300 μm のゲルビーズ (Affi-Gel Blue Gel beads、Bio-Rad Laboratories 社製) を使用した。

(3) 頭蓋冠由来骨芽細胞の解析

FGFR2-S252W 変異を持つ骨芽細胞の形質と、ヘパラン硫酸分解酵素添加の影響を検討するため、FGFR2-S252W knock-in マウスの頭蓋冠由来骨芽細胞を用いた *in vitro* での実験を行った。

生後 2 日目の FGFR2-S252W knock-in マウスおよび WT マウス (対照群) 頭蓋冠より、コラゲナーゼ酵素処理により骨芽細胞を単離、培養した。

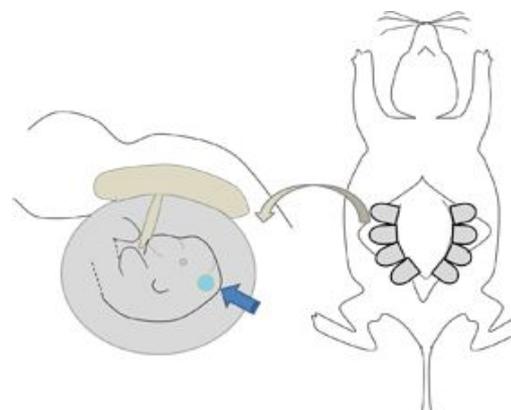
それらの培養細胞を用いて、分化能の評価を行うため、分化誘導培地 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン、10 nM デキサメタゾン、10 mM β -グリセロフェオスフェートを添加した 10%FBS 含有 α -MEM) にて 3 週間培養した後、アリザリンレッド染色を行った。また、FGFR2 シグナル経路 (raf-Map-kinase や ras-PI3K-Akt) に関与するタンパクのリン酸化に関して、コンフルエント時の培養細胞より抽出した 20 μg タンパク質を用いて Western blot 法にて評価を行った。ヘパラン硫酸分解酵素の効果を検討するため、ヘパリナーゼ (30 mU/mL) を培地に含有させ培養を行った。

(4) 頭蓋冠縫合閉鎖に対するヘパラン硫酸分解酵素の影響

Apert 症候群マウスモデルにおける冠状縫合早期癒合に対するヘパラン硫酸分解酵素の影響を調べるため、ビーズを担体として頭蓋冠縫合部に局所作用させた場合に惹起される変化の観察を行った。

FGFR2-S252W knock-in マウスの病的な頭蓋冠縫合癒合は胎齢 18.5 日より開始するため、胎生期のマウスを重点の対象とした。

Ex utero (子宮外胎児手術法、胎仔を取り出し処置後胎内に戻す) 実験系 (図 4) にお



- ・妊娠中の雌マウスの胎児を実験に使用
- ・青矢印は担体の縫合部への投与を示す

図 4. Ex utero 実験を用いた縫合部局所的 FGF シグナル抑制の実験模式図

いてヘパリナーゼ (300 mU/mL)および対照群として PBS を担体のビーズに含有させ、胎齢 16 日の FGFR2-S252W knock-in マウスの冠状縫合上に埋入し、72 時間後に凍結組織切片 (胎齢 19 日相当) を作成した。

FGFR2-S252W knock-in マウスの胎生期の頭蓋冠縫合部および周辺組織の切片を用いて、HE 染色による組織学的な検討の他、*in situ* hybridization 法によりシグナル解析を行なった。

4. 研究成果

(1) *In vitro* の解析

FGFR2-S252W knock-in マウス由来骨芽細胞および WT マウス由来骨芽細胞を 3 週間の分化誘導後、アリザリン染色を行ったところ、FGFR2-S252W knock-in マウス由来骨芽細胞において、WT マウス由来の骨芽細胞に比較して濃染し、分化能が亢進していることが確認された (図 5)。ヘパリン硫酸分解酵素であるヘパリナーゼの添加により、FGFR2-S252W knock-in マウスおよび WT マウスの両方の骨芽細胞分化を抑制した。

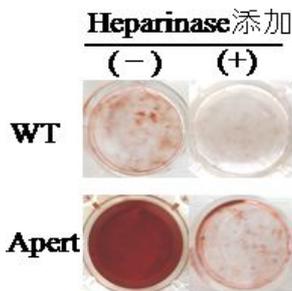


図 5. 頭蓋冠由来骨芽細胞の分化能

さらに、培養頭蓋冠骨芽細胞から抽出したタンパクを用いて、代表的な FGFR2 シグナルタンパクである ERK のリン酸化についてウェスタンブロット法により評価したところ、FGFR2-S252W knock-in マウス由来骨芽細胞は WT マウス由来骨芽細胞に比較して、リン酸化が亢進していることを確認した (図 6)。

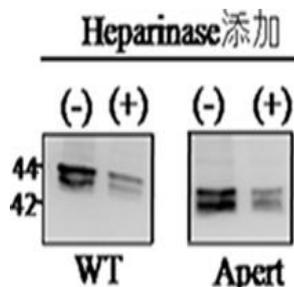


図 6. 頭蓋冠由来骨芽細胞の ERK のリン酸化

ヘパリナーゼの添加により、FGFR2-S252W knock-in マウスおよび WT マウスの骨芽細胞

ERK のリン酸化の抑制を認めた。

(2) *In vivo* の解析

FGF シグナル抑制に効果があると考えられるヘパリン硫酸分解酵素を、ビーズを担体として縫合部に局所作用させ、早期癒合症に対する薬理効果を検討した。Ex utero 実験系において、胎齢 16 日でビーズ埋入後、72 時間の胎齢 19 日相当のマウス頭部 (図 7) の組織切片を作成し、冠状縫合部の観察を行った。図 7 に示すように、FGFR2-S252W knock-in マウスではドーム状の頭蓋の形態を認めた。

ビーズ埋入実験の結果、FGFR2-S252W knock-in マウスの冠状縫合部に、PBS 含有ビーズを埋入した対照群では、早期癒合および骨マーカー遺伝子の 1 つである Bone sialoprotein (Bsp) の発現亢進が認められたが、ヘパリナーゼ含有ビーズはそれらを抑制した (図 8)。

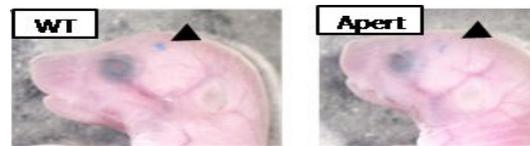


図 7. ビーズ埋入後、72 時間 (胎齢 19 日相当) のマウス頭部

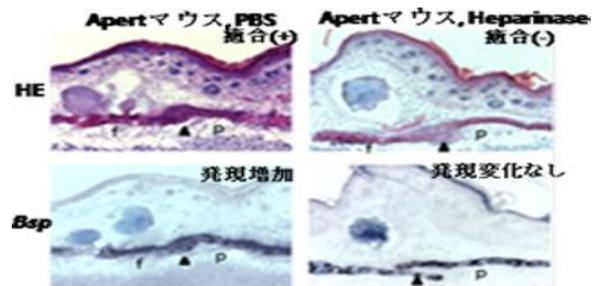


図 8. ビーズ実験結果

(3) 考察

培養頭蓋冠由来骨芽細胞の実験より、FGFR2-S252W knock-in マウス由来骨芽細胞では、ERK のリン酸化およびアリザリンレッド染色の濃染が認められた。これらの *in vitro* での実験結果は、FGFR2-S252W knock-in マウスに関する過去の報告と一致した。ヘパリン硫酸分解酵素は、FGF と高い親和性を持つ、ヘパリン硫酸の構成成分のヘパリン硫酸鎖に対して、その伸長を妨げ、断片化させることが可能である。その結果、FGF シグナルを抑制することが予想された。培養細胞を用いた実験で、ヘパリン硫酸分解酵素の添加が、ERK のリン酸化を低下させ、分化の亢進を抑制することが認められ、仮説と一致した。

さらに、*in vitro* での実験系において

FGFR2-S252W 変異による細胞形質の異常な変化や、それに対する FGF シグナル抑制の効果の詳細に検討する必要がある。これらの研究により Apert 症候群の病態解明と新規治療法開発のためのデータの集積が可能となると考えられる。

本研究では、FGF シグナル抑制が与える、胎児マウス頭蓋冠縫合部での影響を観察する *in vivo* での実験を計画・施行した。

マウス胎児頭蓋冠縫合部へのビーズの投与実験は、顕微鏡下での手術が必要である。手技的な熟練に努め、実験結果の人為的誤差を減らし精度を向上させるために試験を行ってきた。

FGF シグナル抑制物質であるヘパラン硫酸分解酵素および、対照群として PBS を FGFR2-S252W knock-in マウス冠状縫合部に作用させた結果、ヘパラン硫酸分解酵素の骨マーカー遺伝子発現の抑制と、冠状縫合早期癒合への治療効果が示唆された。

今後さらに、ヘパラン硫酸分解酵素を含有させたビーズによる、胎児マウス頭蓋冠縫合部でのシグナル反応性を評価する必要性がある。併せて、Apert 症候群マウスモデルとして、FGFR2-S252W knock-in マウスを用いた実験の準備として WT マウスを対照群として用いた基礎データの収集が必要であると考えられる。WT マウスを用いた実験結果から蓄積されたデータに基づいて、FGFR2-S252W knock-in マウスを用いて実験を行うことで、FGF シグナル抑制による頭蓋冠縫合部早期癒合の治療効果に関して、解明がより円滑に推進すると思われる。さらに、FGF シグナル抑制による頭蓋冠縫合部早期癒合の治療と、それに伴い明らかにされるであろう頭蓋縫合部（頭蓋骨および硬膜、骨膜など周囲組織を含めた複合体）の組織間の相互作用を含めたシグナル解析に関しては、今後の課題である。

申請者は頭蓋冠縫合部にも異常をきたす先天異常疾患である、鎖骨頭蓋異形成症に関しても臨床的データを解析し、その結果に関して、学会にて発表を行った。

<引用文献>

1) Suzuki H, Suda N, Shiga M, Kobayashi Y, Nakamura M, Iseki S, Moriyama K (2012) Apert syndrome mutant FGFR2 and its soluble form reciprocally alter osteogenesis of primary calvarial osteoblasts. *J Cell Physiol* 227; 3267–3277.

2) Chen L, Li D, Li C, Engel A, Deng CX (2003) A Ser250Trp substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis. *Bone* 33; 169–178.

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

鈴木 尋之、辻 美千子、鈴木 聖一、森山 啓司、鎖骨頭蓋異形成症患者における埋伏歯の形態および位置の三次元的評価、第74回日本矯正歯科学会大会、2015年11月19日、福岡県、福岡マリンメッセ(日本)

鈴木 尋之、辻 美千子、森山 啓司、Examination about the abnormality of the number and the eruption of the teeth in 16 cases of cleidocranial dysplasia、The 9th Asian Pacific Orthodontic Congress & 20th Malaysian Association of Orthodontists International Scientific Conference and Trade Exhibition、2014年10月18日、クチン、ボルネオコンベンションセンター(マレーシア)

鈴木 尋之、辻 美千子、鈴木 聖一、森山 啓司、鎖骨頭蓋異形成症 16例における歯数および萌出の異常に関する検討、第54回日本先天異常学会学術集会、2014年7月26日、神奈川県、麻布大学(日本)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
無

6. 研究組織

研究代表者

鈴木 尋之 (SUZUKI, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：70634492