

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：82729

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10805

研究課題名(和文) 頭蓋縫合早期癒合症の系統的遺伝子解析および骨分化のメカニズム解明

研究課題名(英文) Molecular genetic analysis of patients with craniosynostosis and the elucidation of mechanisms of osteoblast differentiation and bone formation

研究代表者

新保 裕子 (Shimbo, Hiroko)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・研究員

研究者番号：50724663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋縫合早期癒合症は、頭蓋骨や顔面骨の縫合が早期に閉鎖する疾患である。頭蓋縫合早期癒合症の原因としてFGFRの機能獲得型変異や転写因子TWIST1の機能喪失型変異が知られている。また、頭蓋縫合骨化遅延を呈する鎖骨頭蓋骨異形成症の原因となる転写因子RUNX2の過剰発現において、頭蓋縫合早期癒合症が報告されている。RUNX2やTWIST1は骨形成において、重要な役割を果たし、これらの発現の制御破綻が疾患の原因として考えられる。今回、RUNX2機能喪失型変異の歯髄細胞において、RUNX2の発現低下、TWIST1の発現上昇が認められ、骨疾患の研究ツールとして有用であることが示された。

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の原因として線維芽細胞増殖因子受容体FGFRの機能獲得型変異や転写因子TWIST1の機能喪失型変異が知られている。また、頭蓋縫合骨化遅延を呈する鎖骨頭蓋骨異形成症の原因となる転写因子RUNX2の過剰発現(重複)において、頭蓋縫合早期癒合症が報告されている。骨形成の各段階の成熟度を決めるTWIST1やRUNX2の発現制御の破綻が疾患に関係する。今回、RUNX2機能喪失型変異の歯髄細胞において、RUNX2の発現低下、TWIST1の発現上昇が認められ、骨疾患の研究ツールとして有用性が示された。先天性の骨系統疾患に限らず、骨代謝異常症の骨粗鬆症等の病態解明にも応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Craniosynostosis describes the premature fusion of the skull or facial bones.

Mutations of the gain-of-function in fibroblast growth factor receptor (FGFR) and the loss of function in transcription factor Twist Family bHLH Transcription Factor 1 (TWIST1) can cause some types of craniosynostosis. In the overexpression of transcription factor, Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) caused by Cleidocranial Dysplasia with delayed suture closure was reported in patients with craniosynostosis. RUNX2 and TWIST1 help regulate bone development, and disruption of these expressions may cause disease. We observed reduced RUNX2 and increased TWIST1 expression in the dental pulp cells of the RUNX2 loss-of-function mutation. This indicates its usefulness as a research tool for bone diseases.

研究分野：分子生物

キーワード：頭蓋縫合早期癒合症 鎖骨頭蓋骨異形成症 FGFR2 FGFR3 TWIST1 RUNX2 歯髄細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は 2009 年から頭蓋縫合早期癒合症にかかわる系統的検査を行い、Apert, Crouzon, Pfeiffer, Muenke, Saethre-Chotzen 症候群等の原因遺伝子の変異を見出している。近年次世代シーケンスの導入により、新規遺伝子も報告されているが¹、スプライシング異常解析や切断点同定解析等の課題が残されている。

(2) 頭蓋縫合早期癒合症の原因として線維芽細胞増殖因子受容体 FGFR の機能獲得型変異や転写因子 TWIST1 の機能喪失型変異が知られている²。

(3) 頭蓋縫合骨化遅延を呈する鎖骨頭蓋骨異形成症の原因となる転写因子 RUNX2 の過剰発現(重複)による頭蓋縫合早期癒合症が報告されている¹。

(4) 骨形成の各段階の成熟度を定める鍵となる転写因子の TWIST1 や RUNX2 を利用して³、頭蓋縫合早期癒合症および鎖骨頭蓋骨異形成症患者由来の間葉系細胞(歯髄細胞)の骨分化のメカニズムを探ることで、病態解明につなげる。

2. 研究の目的

(1) 頭蓋縫合早期癒合症の系統的遺伝子検索を行い、診断を確定し病態解明につなげる。
今までゲノムレベルの解析しか行ってこなかった Pfeiffer 症候群で見出された FGFR2 のスプライシングサイトにあるイントロンの変異に関しては、mRNA の解析を行い、転写産物の予測を行う。

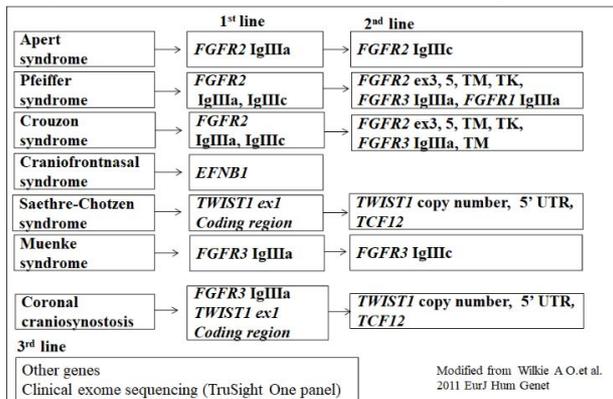
Saethre-Chotzen 症候群を含む 7p21 欠失症候群に関しては、症状の幅が広く、欠失領域を調べる必要がある。

(2) 骨系統疾患の歯髄細胞を用い、骨芽細胞および骨細胞分化の程度を評価する。

3. 研究の方法

(1) 図 1 に示すフローチャートに従い、系統的遺伝子検索を行う。

FGFR2 のスプライシングサイトのイントロンの変異によるスプライシングの影響については変異部及びその前後のエクソンをエクソントラップベクターに挿入した。野生型、変異型の一部の遺伝子が導入されたエクソントラップベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、mRNA を解析する。



Saethre-Chotzen 症候群を含む 7p21 欠失症において、原因遺伝子 TWIST1 だけでなく、隣接遺伝子のコピー数の定量法を確立する。

(2) 骨系統疾患由来の歯髄細胞を DMEM low glucose+10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1%Penicillin Streptomycin (PS)の条件で維持培養する。骨芽細胞および骨細胞への分化誘導には、基礎培地 DMEM low glucose + 10% FBS +1% PS に Ascorbic acid + -Glycerophosphate + Hydrocortisone (Takara,MK430) を加えた培地を用いる。

図 1. 頭蓋縫合早期癒合症の系統的遺伝子検索

4. 研究成果

(1) Pfeiffer 症候群で見出されたスプライシングサイトの変異 FGFR2 c.940 -2A>G についてエクソントラップベクター(図 2)を用いて解析した結果、Ig c のスキップが認められた(図 3)。

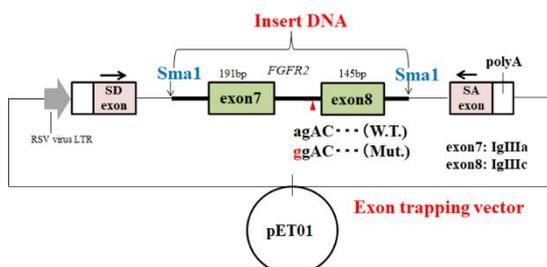


図 2. エクソントラップベクター構築

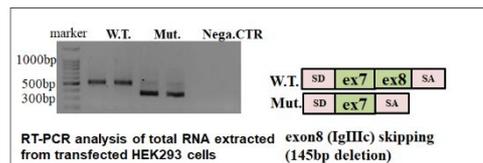


図 3. mRNA 転写産物の解析結果

Ig c: 145bp が欠損することにより、アミノ酸の読み枠がずれ、途中でストップコドンが入り、NMD(Nonsense-mediated mRNA decay)を受けることにより、mRNA が分解される機構が働くことも考えられる。しかし、本疾患において、FGFR2 は機能喪失型(タンパク質の量が半減で発症する)変異の報告はない。従って、新たな機能を獲得したタンパク質ができているのか等を含めて解析を検討する。

Saethre-Chotzen 症候群を疑う症例に関して図 4 に示すフローチャートに従い解析を進めた結果、サンガーシーケンスで塩基置換変異が認められない 3 症例中、2 症例について TWIST1 を含む隣接遺伝子の欠失、1 症例について TWIST1 遺伝子の重複が認められた。

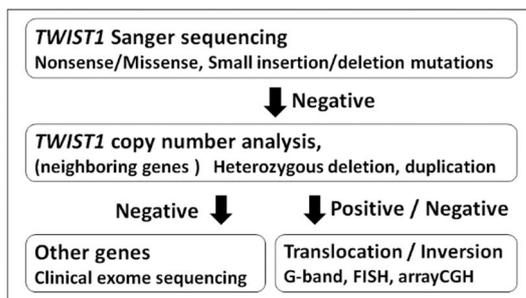


図 4. Saethre-Chotzen 症候群の遺伝子検索

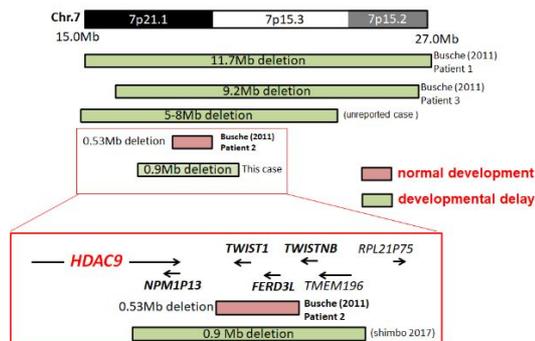


図 5. Saethre-Chotzen 症候群の欠失範囲と発達

Saethre-Chotzen 症候群は TWIST1 の遺伝子内の変異だけでなく、隣接遺伝子を含む欠失が知られており、症状は多彩である。今回解析した 0.9Mb の欠失症例と過去の症例とを比較したところ、TWIST1 に隣接する HDAC9 が発達に関与することが推察された (図 5)。

(2)

頭蓋縫合早期癒合症(FGFR2 ミスセンス変異:FGFR2 mut.)、鎖骨頭蓋骨異形成症 (RUNX2 ナンセンス変異:RUNX2 mut.)、コントロール (CTR)の歯髄細胞 (n=1)を用いて、骨芽細胞分化誘導を行い、分化マーカーのアルカリフォスファターゼ (ALP)、アリザリンレッド (Alz)の染色を行った。分化誘導10日目で CTR 細胞、FGFR2 mut.細胞では ALP 染色が認められたが、RUNX2 mut.細胞では ALP 染色が認められなかった。

Alz に関しては、CTR 細胞と FGFR2 mut.細胞について検討を行った。分化誘導 14 日目で Alz の染色は FGFR2 mut.細胞において僅かに濃く染まる傾向が見られた。

疾患モデル細胞について、転写因子 TWIST1, RUNX2 の発現を qPCR 法で評価したところ、RUNX2 mut.細胞は CTR 細胞と比べて、RUNX2 の発現低下、TWIST1 の発現量の増加が認められた。FGFR2 mut.細胞では、CTR 細胞と比べて RUNX2 と TWIST1 の発現量に差が見られなかった。最近 RUNX2 がグルコース輸送体 GLUT1 の発現を促進することが報告され、骨芽細胞は GLUT1 により取り込まれるグルコースに依存していることがわかってきた⁴。

RUNX2 mut.細胞における GLUT1 の発現を qPCR で調べたところ、顕著な発現低下が認められた。今回は検体数が少ないため、マイクロアレイ解析を行わなかったが、今後数を増やして検討する。

<引用文献>

1. Twigg & Wilkie. A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis. Am J Hum Genet (2015)
2. Kosty & Vogel. Insights into the development of molecular therapies for craniosynostosis. Kosty & Vogel. Neurosurg (2015)
3. Bialk P et al. A Twist Code Determines the Onset of Osteoblast Differentiation Dev. Cell. (2004)
4. Wei et al. Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation. Cell (2015)

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 Shimbo Hiroko, Yokoi Takayuki, Aida Noriko, Mizuno Seiji, Suzumura Hiroshi, Nagai Junichi, Ida Kazumi, Enomoto Yumi, Hatano Chihiro, Kurosawa Kenji	4. 巻 5
2. 論文標題 Haploinsufficiency of BCL11A associated with cerebellar abnormalities in 2p15p16.1 deletion syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 429 ~ 437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mgg3.289	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 -

1. 著者名 Hiroko Shimbo, Tatsuki Oyoshi, Kenji Kurosawa	4. 巻 58
2. 論文標題 Contiguous gene deletion neighboring TWIST1 identified in a patient with Saethre-Chotzen syndrome associated with neurodevelopmental delay: Possible contribution of HDAC9.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Congenit Anom (Kyoto)	6. 最初と最後の頁 33-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cga.12216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新保裕子
2. 発表標題 TWIST1遺伝子に異常が認められたSaethre-Chotzen症候群の10症例
3. 学会等名 第15回Craniosynostosis研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新保裕子
2. 発表標題 頭蓋縫合早期癒合症における系統的遺伝子検索
3. 学会等名 第14回Craniosynostosis研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新保裕子, 大吉達樹, 黒澤健司
2. 発表標題 Saethre-Chotzen 症候群を呈する 7p21.1 欠失症例
3. 学会等名 第58回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2016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	伊藤 進 (itoh susumu) (50254181)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部長 (82729)	
研究分担者	佐々木 康成 (sasaki yasunori) (70332848)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部長 (82729)	