

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18209060

研究課題名（和文） 頭蓋顎顔面骨格先天異常に対する新規治療法開発と実用化への基礎的研究

研究課題名（英文） Basic study for developing new therapies and its practical use for craniofacial anomalies

研究代表者

森山 啓司（MORIYAMA KEIJI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20262206

研究成果の概要：

頭蓋冠縫合部早期癒合症を主症状の1つとする Apert 症候群の原因として、FGFR2 の細胞外領域における 2 種類の変異（S252W、P253R）が報告されている。我々は、S252W 型変異が骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討することを目的として、S252W 型変異体（FGFR2 IIIc-S252W）と、その細胞外領域のみを含む可溶性変異体（soluble FGFR2 IIIc-S252W）を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作出した。マウスの頭蓋冠由来の骨芽細胞を単離し、種々の解析を加えた結果、FGFR2 IIIc-S252W は骨芽細胞分化を亢進するのに対し、soluble FGFR2 IIIc-S252W はこのプロセスを抑制した。可溶性変異体による分化制御が、頭蓋冠縫合部早期癒合症に対する新規治療法に発展する可能性が期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
2007年度	15,700,000	4,710,000	20,410,000
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
総計	37,700,000	11,310,000	49,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：FGFR2、Apert 症候群、頭蓋冠早期癒合症、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正学分野では、頭蓋、顎顔面、口腔の成長発育コントロールを行うことで、顎口腔系の形態、機能の改善を図ってきた。しかし、頭蓋冠縫合部早期癒合症を主症状とする先天性疾患である Apert 症候群、Crouzon 症候群は中顔面の劣成長を伴い、著しい反対咬合や開咬等の不正咬合を呈することから侵襲の大きな外科的療法に頼る部分が多いのが現状である。これら症候群の発症の原因は線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR2）の

細胞外ドメインである IgII と IgIII の結合領域における S252W および P253R の変異であるとされているが、この疾患の発症の分子細胞メカニズムには不明な点が多く残されている。

近年、骨・軟骨系先天性疾患に関与する遺伝子が次々に明らかにされ、遺伝子の異常と疾患の関連についての理解が深まりつつある一方で、骨格形成制御機構の複雑性、多様性が明白となっている。このような骨系統先天性疾患の病因を探る研究は世界中で盛ん

に研究されている一方、治療法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。

2. 研究の目的

頭蓋冠縫合部早期癒合症を主症状とする先天性疾患である Apert 症候群、Crouzon 症候群などの骨系統疾患の病態成立機序を詳細に解明することで、新しくかつ安全で非侵襲的な治療法を開発することを目的とした。具体的には、頭蓋冠縫合部早期癒合症モデルマウスを作製し、その骨形成様相について組織・分子レベルで詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

①頭蓋冠縫合部早期癒合症モデルマウスの作製

S252W 型変異が骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討することを目的として、S252W 型変異体 (FGFR2 IIIc-S252W) と、その細胞外領域のみを含む可溶性変異体 (soluble FGFR2 IIIc-S252W) を CMV プロモーターにより過剰発現させたトランスジェニックマウス (各々 S252W-Tg、SOL-Tg とする) を作出した。

②これらのマウスの頭蓋冠由来の骨芽細胞の単離、種々の解析

S252W-Tg、SOL-Tg、両者の交配により得られた S252W×SOL-Tg、野生型 (WT) の 4 種のマウス (生後 2 日目) より、通法に従って頭蓋冠を酵素処理し、骨芽細胞を得た。単離した細胞を分化誘導培地中で培養した。培養 3 週間後、ALP 活性、alizarin red 染色、骨関連の遺伝子発現を解析した。また、免疫不全マウスの背側皮下に単離骨芽細胞を β -TCP 顆粒と共に移植し、8 週間後切片を作成し、組織学的に観察した。

4. 研究成果

①WT 由来と比較して、S252W-Tg 由来の骨芽細胞は、ALP 活性が有意に高く、alizarin red 染色に濃染し、osteocalcin と Runx2 の発現量が高かった。一方、SOL-Tg 由来の骨芽細胞ではこれらは低値を示し、S252W×SOL-Tg 由来の細胞は WT 由来のものと同差がなかった。

②移植細胞による異所性の骨様組織形成は、WT や S252W×SOL-Tg 由来の骨芽細胞と比べ、S252W 由来の細胞で高頻度に観察された。一方、SOL-Tg 由来の細胞では、骨様組織は全く観察されなかった。

以上より、FGFR2 IIIc-S252W は骨芽細胞分化を亢進するのに対し、soluble FGFR2

IIIc-S252W はこのプロセスを抑制することが明らかにされた。この可溶性変異体による分化制御が、頭蓋冠縫合部早期癒合症に対する新規治療法に発展する可能性が期待される。今後、*in vivo* での検討を進めていく予定である。

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 32 件)

1. Miraoui H, Oudina K, Petite H, Tanimoto Y, Moriyama K, Marie PJ. Fibroblast growth factor receptor2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via extracellular-related kinase and protein kinase c signalling. J Biol Chem, 284(8)4897-904, 2009.
2. Suda N, Shiga M, Ganburged G, Moriyama K. Marfan syndrome and its disorder in periodontal tissues. J. Exp. Zool 2009 (in press).
3. Yagi Y, Suda N, Yamakoshi Y, Baba O, Moriyama K. In vivo application of amelogenin suppresses root resorption. J Dent Res, 2009 (in press).
4. Inoue MS, Ono T, Honda E, Kurabayashi T, Moriyama K. Motor coordination of articulators depends on the place of articulation. Behav Brain Res. 2009(in press).
5. Gereltzul E, Baba Y, Suda N, Shiga M, Inoue M, Tsuji M, Shin I, Hirata Y, Ohyama K, Moriyama K. Case Report of de novo Dup(18p)/Del(18q) and R(18) Mosaicism. Journal of Human Genetics 53(10):941-6, 2008
6. Putranoto P, Oba Y, Kaneko K, Shioyasono A, Moriyama K. Effects of bisphosphonates on roots resorption and cytokine expression during experimental tooth movements in rats. Orthod Waves 67(4) 141-149, 2008
7. Okudaira M, Kawamoto T, Ono T, Moriyama K. Soft-tissue changes in association with anterior maxillary osteotomy: a pilot study. Oral Maxillofac Surg. 12(3):131-8, 2008
8. Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, Noji S.

- Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther.* 15(15):1126-30, 2008
9. Sato-Wakabayashi M, Inoue-Arai MS, Ono T, Honda E, Kurabayashi T, Moriyama K. Combined fMRI and MRI movie in the evaluation of articulation in subjects with and without cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 45(3):309-14, 2008
 10. Nishi M, Yasue A, Kinouchi N, Noji S, Moriyama K. The increases in the skeletal muscle mass of the transgenic mice expressing the mutated myostatin affected craniofacial morphology. *Orthod Waves.* 66(3): 73-78, 2007.
 11. Izawa T, Ishimaru N, Moriyama K, Kohashi M, Arakaki R, Hayashi Y. Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance. *Blood.* 110(1):242-50, 2007.
 12. Araujo RM, Oba Y, Moriyama K. Role of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in periodontal ligament cells under mechanical stress. *Cell Biochem Funct.* 25(6): 753-8, 2007.
 13. Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Nakano A, Takeuchi K, Kitazoe K, Kido S, Inoue D, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S, Matsumoto T. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin. *Clin Cancer Res.* 13(3):816-23, 2007.
 14. Osaka N, Takahashi T, Murakami S, Matsuzawa A, Noguchi T, Fujiwara T, Aburatani H, Moriyama K, Takeda K, Ichijo H. ASK1-dependent recruitment and activation of macrophages induce hair growth in skin wounds. *J Cell Biol.* 176(7): 903-9, 2007.
 15. Suda N, Hamada T, Hattori M, Torii C, Kosaki K, Moriyama K. Diversity of supernumerary tooth formation in siblings with cleidocranial dysplasia having identical mutation in RUNX2 -Possible involvement of non-genetic or epigenetic regulation. *Orthod Craniofac Res.* 10:222-225, 2007.
 16. Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, Yasue A, Moriyama K, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y. Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition *J Clin Invest.* ;116(11):2924-34. 2006
 17. Fujihara S, Yokozeki M, Oba Y, Higashibata Y, Nomura S, Moriyama K. Function and regulation of osteopontin in response to mechanical stress. *J Bone Miner Res.* 21(6):956-64. 2006
 18. 篠原亨太郎, 馬場祥行, 横関雅彦, 森山啓司. RED システムにより Le Fort I 型骨延長術を行い反対咬合および上顎側方偏位を改善した Crouzon 症候群の 1 例. *日顎変形誌* 18 (1) : 39-48, 2008
 19. 森山啓司. 頭蓋縫合早期癒合症に関する歯科矯正学的一考察. *口腔病学会雑誌*, 74(3):176-182, 2007.
 20. 松本和也, 中西秀樹, 高瀬真記, 古泉佳男, 谷本起穂, 森山啓司. 【頭蓋顔面骨延長の中期成績】 トリーチャーコリンズ症候群に対する下顎骨延長の中期成績. *形成外科* 49(3) 311-317, 2006.
- [学会発表] (計 94 件)
1. Ono T, Inoue-Arai MS, Sato-Wakabayashi M, Miyamoto JJ, Honda E, Hashimoto K, Kurabayashi T, Moriyama K. Mapping of brain activation in covert/overt articulation in subjects with/without CLP using fMRI. 2nd Joint Meeting of the Korean Association of Orthodontists and the Japanese Orthodontic Society, Seoul, December 6-8, 2008.
 2. Baba Y, Kataoka K, Kawafuji A, Honda A, Ishizaki T, Suzuki S, Moriyama K. Measurement of traction force using micro tension gauge in maxillary distraction osteogenesis. 2nd Joint Meeting of the Korean Association of Orthodontists and the Japanese Orthodontic Society, Seoul, December 6-8, 2008.
 3. Tsuji M, Baba Y, Yagishita K, Yamami N, Mano Y, Suzuki S, Moriyama K.

- Clinical application of hyperbaric oxygen therapy for cleft patients treated by distraction osteogenesis. 2nd Joint Meeting of the Korean Association of Orthodontists and the Japanese Orthodontic Society, Seoul, December 6-8, 2008.
4. Kawafuji A, Suda N, Ichikawa N, Kakara S, Suzuki T, Ogawa T, Tsuji M, Moriyama K. Systemic and maxillofacial characteristics of Beckwith-Wiedemann syndrome patients without having glossectomy. 2nd Joint Meeting of the Korean Association of Orthodontists and the Japanese Orthodontic Society, Seoul, December 6-8, 2008.
 5. Kataoka K, Baba Y, Honda A, Ishizaki T, Tetsumura A, Ohbayashi N, Kurabayashi T, Suzuki S, Moriyama K. Ultrasonographic observation of bone formation after maxillary distraction osteogenesis. 2nd Joint Meeting of the Korean Association of Orthodontists and the Japanese Orthodontic Society, Seoul, December 6-8, 2008.
 6. Yagi Y, Suda N, Yamakoshi Y, Baba O, Moriyama K. Amelogenin is a potent inhibitor of odontoclastic root resorption. 56th Japanese Association for Dental Research, Nagoya, November 29-30, 2008.
 7. Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Moriyama K, Noji S. Atelocollagen-mediated Applications of Myostatin-targeting siRNA Increase Skeletal Muscle Mass. 86th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Toronto, Canada, July 2-5, 2008.
 8. Inoue MS, Sato-Wakabayashi M, Ono T, Honda E, Moriyama K. Evaluation of articulation in subjects with and without CLP using functional MRI and MRI movie. 84th Congress of the European Orthodontic Society, Lisbon, June 10-14, 2008.
 9. Baba Y, Honda A, Ishizaki T, Suzuki S, Moriyama K. Follow-up study after maxillary distraction in growing children with cleft lip/palate. 6th Asian Pacific Orthodontic Conference. Bangkok, Thailand, March, 27-30, 2008.
 10. Kataoka K, Baba Y, Ishizaki Y, Suzuki S, Moriyama K. Distraction osteogenesis of dentoalveolar segment for reconstruction of Cleft Lip/Palate. 6th Asian Pacific Orthodontic Conference. Bangkok, Thailand, March, 27-30, 2008.
 11. 小川卓也, 森山啓司. PAX9 の変異を有する先天性多数歯欠損家系における MSX1 の多型解析. 第 26 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2008 年 10 月 29-31 日.
 12. 小川卓也, シンタ ウィラハディ クスマ, 森山啓司. 矯正治療後に長期観察を行った先天性ミオパチー患者の顎態変化. 第 67 回日本矯正歯科学会大会、千葉、2008 年 9 月 16-18 日.
 13. Ganburged Ganjargal, 須田直人, 森山啓司. Maran 症候群にみられる重篤な歯周疾患の動物モデルの作製. 第 67 回日本矯正歯科学会大会、千葉、2008 年 9 月 16-18 日.
 14. 山田大輔、鎌田秀樹、大隈瑞恵、辻美千子、須田直人、森山啓司. 当分野を受診した hemifacial microsomia 患者の臨床症状に関する検討. 第 67 回日本矯正歯科学会大会、千葉、2008 年 9 月 16-18 日.
 15. 横田俊明、下川仁彌太、馬場祥行、小野卓史、鈴木聖一、森山啓司. I 型インスリン様増殖因子(IGF-I)は下顎頭軟骨のアポトーシスを制御する. 第 21 回日本顎関節学会学術大会、2008 年 7 月 26-27 日、大阪.
 16. 馬場祥行、須田直人、志賀百年、辻美千子、ゲレルトゥズル エンクトゥフシン、平田 結喜緒、大山 紀美栄、森山啓司. A case report of de novo rod/ring chromosome 18 mosaicism. 第 48 回日本先天異常学会学術集会、東京、2008 年 6 月 28-30 日.
 17. 青木朝里、川元龍夫、井口隆人、工藤淳夫、長濱浩平、馬場祥行、鈴木聖一、森山啓司. ビーグル犬歯槽骨延長モデルにおける組織修復様相の観察—延長量が歯髓血流回復および骨新生に及ぼす影響— 第 32 回日本口蓋裂学会総会、広島、2008 年 5 月 28-29 日.
 18. 若林みちる、井上マリステラ小百合、宮

- 本順、橋本幸治、倉林亨、小野卓史、森山啓司。機能的磁気共鳴画像法を用いた口唇口蓋裂患者における外言語・内言語生成時の脳賦活領域のマッピング。第 32 回日本口蓋裂学会総会，広島，2008 年 5 月 28-29 日。
19. 辻美千子，森山啓司。口腔内の異常に気付いて矯正歯科を受診した鎖骨頭蓋異形成症 2 例について。第 32 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会，仙台，2008 年 5 月 23-25 日。
 20. Ohkuma M, Murakami M, Moriyama K, Nakamura M. SP-mediated regulation of TWIST1 expression in mesenchymal cells. 4th International Symposium on Basic Helix-Loop-Helix Genes. Kyoto, Japan, May 17-18, 2007.
 21. Jinno K, Takahashi T, Tsuchida K, Moriyama K. Acceleration of palatal wound healing in Smad-3-deficient mice. 85th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, New Orleans, USA, March 21- 24, 2007.
 22. 福岡裕樹，辻美千子，佐野路奈，須田直人，森山啓司。Kabuki syndrome7 症例における顎顔面領域の特徴について。第 66 回日本矯正歯科学会学術大会，大阪，2007 年 9 月 19-21 日。
 23. 服部架，須田直人，小崎健次郎，谷本啓二，森山啓司。鎖骨頭蓋異形成症における過剰歯と RUNX2 遺伝子変異の相関。第 66 回日本矯正歯科学会学術大会，大阪，2007 年 9 月 19-21 日。
 24. 日浅正博，安倍正博，橋本年弘，木戸慎介，竹内恭子，北添健一，浅野仁，尾崎修治，森山啓司，松本俊夫。TNF α converting enzyme (TACE)による破骨細胞・骨髄系樹状細胞分化の制御。第 25 回日本骨代謝学会学術集会，大阪，2007 年 7 月 19-21 日。
 25. 志賀百年，馬場祥行，辻美千子，須田直人，鈴木聖二，森山啓司。Treacher Collins 症候群及び craniosynostosis を認めた 1 家系。第 47 回日本先天異常学会学術集会，名古屋，2007 年 7 月 7-9 日。
 26. 辻美千子，小川卓也，半田幸子，森山啓司。Kallmann 症候群を伴う一矯正患者の問題について。第 31 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会，東京，2007 年 5 月 25-27 日。
 27. Oba Y，Santos De Araujo RM, Moriyama K. RhoE regulates actin cytoskeleton organization in human periodontal ligament cells. 84th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Brisbane, Australia, June 28- July 1, 2006.
 28. 森山啓司。口腔顎面領域に異常を生じる遺伝性疾患とその治療。第 18 回遺伝医学セミナーカリキュラム、大阪、2008 年 9 月 5-7 日。
 29. 森山啓司。Fibroblast growth factor receptor (FGFR) の変異と頭蓋縫合早期癒合症。第 17 回大学院医歯学総合研究科大学院セミナー、ポストゲノム時代の発生生物学展望。東京医科歯科大学、2008 年 6 月 23 日。
 30. Keiji Moriyama. Orthodontist as a member of the team for cleft lip and/or palate patients care. 6th Asian Pacific Orthodontic Conference. Bangkok, Thailand, March, 27-30, 2008
 31. 森山啓司。顎変形症の診断と治療計画。日本頭蓋顎顔面外科学会 第 3 回学術講習会，東京，2007 年 11 月 10 日。
 32. 森山啓司。メカニカルストレス応答性遺伝子オステオポンチンの歯周組織における発現と機能。第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会，札幌，2007 年 8 月 30-31 日。
 33. 森山啓司。口唇口蓋裂患者の咬合再建（矯正の立場から）。第 31 回日本口蓋裂学会総会・学術集会，草津，2007 年 5 月 24-25 日。
- 〔図書〕（計 1 件）
- ① 大山紀美栄、辻美千子、森山啓司。【外表奇形の診断と治療】顎顔面の奇形 小児科 49(1):17-25, 2008.
- 〔産業財産権〕
- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）
- 〔その他〕
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
森山 啓司 (MORIYAMA KEIJI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：20262206
 - (2) 研究分担者

平成 18 年度

大庭 康雄 (OBA YASUO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号：40294706
高橋 巧 (TAKAHASHI TAKUMI)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：30363154
北瀬 由紀子 (KITASE YUKIKO)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70363166
谷本 起穂 (TANIMOTO YUKIHO)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：20380032
井澤 俊 (IZAWA TAKASHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：30380017
藤原 慎視 (FUJIHARA SHINJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：70403706

平成 19 年度

鈴木 聖一 (SUZUKI SHOICHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：90187732
小野 卓史 (ONO TAKASHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：30221857
須田 直人 (SUDA NAOTO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：90302885
馬場 祥行 (BABA YOSHIYUKI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：70251535
川元 龍夫 (KAWAMOTO TATSUO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：50323704
辻 美千子 (TSUJI MICHIKO)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：90345281
浜田 俊 (HAMADA TAKASHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：00376766
大庭 康雄 (OBA YASUO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号：40294706
高橋 巧 (TAKAHASHI TAKUMI)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：30363154
北瀬 由紀子 (KITASE YUKIKO)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70363166
谷本 起穂 (TANIMOTO YUKIHO)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：20380032
井澤 俊 (IZAWA TAKASHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：30380017
藤原 慎視 (FUJIHARA SHINJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：70403706

平成 20 年度

須田 直人 (SUDA NAOTO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：90302885
小川 卓也 (OGAWA TAKUYA)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：504013460

(3) 連携研究者

平成 20 年度
鈴木 聖一 (SUZUKI SHOICHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：90187732
小野 卓史 (ONO TAKASHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：30221857
馬場 祥行 (BABA YOSHIYUKI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：70251535
川元 龍夫 (KAWAMOTO TATSUO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：50323704
辻 美千子 (TSUJI MICHIKO)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：90345281