

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390471

研究課題名(和文)ゲノム・ナノサイエンスを応用した顎顔面先天異常に対する分子標的治療開発の基盤創成

研究課題名(英文)Development of new therapeutic strategy for the craniosynostosis patients

研究代表者

森山 啓司(Moriyama, Keiji)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20262206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はApert型変異(S252W)を伴う可溶性FGFR2(sFGFR2111cS252W)の縫合部早期癒合に対する効果を検証することを目的とした。Apert症候群モデルマウス冠状縫合部では、Fgf10およびEsrp1、Fgfr2111b、Runx2、Osteopontinの高発現を認め、精製sFGFR2111cS252W-ナノゲル複合体はASマウス冠状縫合癒合を阻害したことより、精製sFGFR2S252Wの縫合部早期癒合に対する予防効果が示され、Apert症候群の病態解明および新規治療法開発の一助となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Here we aimed to clarify the etiological mechanisms of craniosynostosis in mouse models of Apert syndrome and verify the effects of purified soluble FGFR2 harboring the S252W mutation (sFGFR2111cS252W) on calvarial sutures in Apert syndrome mice in vitro. We observed increased expression of Fgf10, Esrp1, and Fgfr2111b, which are indispensable for epidermal development, in coronal sutures in Apert syndrome mice. Purified sFGFR2111cS252W exhibited binding affinity for Fgf2 but also formed heterodimers with FGFR2111c, FGFR2111cS252W, and FGFR2111bS252W. sFGFR2111cS252W complexed with nanogels maintained the patency of coronal sutures, whereas synostosis was observed where the nanogel without sFGFR2S252W was applied. Thus, based on our current data, we suggest that increased Fgf10 and Fgfr2111b expression may induce the onset of craniosynostosis in patients with Apert syndrome and that the appropriate delivery of purified sFGFR2111cS252W could be effective for treating this disorder.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯学 頭蓋冠縫合部早期癒合症 ナノサイエンス

## 1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面奇形は、先天異常患者の約7割に随伴して生じると言われている。現在、我が国においては、先天性疾患に起因した咬合異常に対する歯科矯正の保険診療の適応が拡大し、矯正歯科を受診する患者は増加傾向にある。したがって個々の疾患に応じた臨床的諸問題の克服が歯学において解決すべき重要な課題となっている。

ゲノム科学の目覚ましい進歩に伴い、頭蓋縫合早期癒合症を主症状とする先天性疾患の原因として、FGFR1、FGFR2、FGFR3、MSX2、TWIST1 などの変異が遺伝子レベルで報告されてきた。そのなかの一疾患である Apert 症候群は、FGFR2 の細胞外領域の点変異 (S252W または P253R) によって結合するリガンドの特異性低下と結合能亢進が誘導され、機能獲得 (gain-of-function) の状態に陥ることが主な原因と考えられている。また臨床所見としては、頭蓋変形、眼球突出、両眼隔離、中顔面の劣成長、左右対称性に生じる四肢の合指症を特徴とし、頭蓋内圧亢進に伴って種々の神経症状が生じることから頭蓋冠形成術の適応となる。さらに合指症に対する形成手術を始めとして、著しい反対咬合や開咬といった骨格性不正咬合に対する外科的矯正治療など、さまざまな外科的治療法が適応されることになる。したがって、本疾患の病態発症のメカニズムに立脚した非侵襲的かつ根本的な分子標的治療の基盤が創成されれば、患者の QOL が格段に向上していくものと期待される。

一方、近年、再生医療やテーラーメイド医療の進展において、高機能性バイオマテリアルの開発がなされてきている。特にナノサイエンスにおけるドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術は、従来法では到達することが困難であった組織や細胞に、高効率に新規核酸医薬や低分子化合物をデリバリーできる方法として注目されている。研究分担者である京都大学工学研究科高分子化学専攻生体機能高分子分野秋吉一成教授のもとで開発された、ナノサイズのゲル微粒子 (ナノゲル) とリン酸カルシウムを複合化させた新しい有機-無機ハイブリッドナノ粒子を用いることで、ナノゲル内の物質の放出制御によるドラッグデリバリーや骨欠損部位の修復など、幅広い臨床応用も可能になるものと期待される。

## 2. 研究の目的

口腔顎顔面領域に種々の形態異常を伴う先天異常は歯科領域における難治性疾患として位置づけられ、その克服は現代歯学における最重要課題の一つとなっている。本研究は、ゲノム科学と、ナノサイエンス科学との知識を統合して新たな先端研究領域を開拓し、顎顔面先天異常の治療基盤を推進する研究を

提案するものである。即ち、本研究においては、顎顔面先天異常の分子病理基盤ならびに特異な形質に至る分子機構の探索、ナノサイエンスにおけるドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術を応用した顎顔面領域の組織・細胞に対する分子標的治療の開発、を目的とする。これにより、顎顔面先天異常に対するゲノム・ナノサイエンスを応用した革新的かつ非侵襲的な治療法開発のための基盤創成を目指す。

## 3. 研究の方法

頭蓋縫合早期癒合症を主症状とする先天異常の中で、Apert 症候群は、先述の通り FGFR2 遺伝子の点変異による 2 種類のアミノ酸置換 (S252W、P253R) による機能獲得型突然変異が原因で発症することが知られている。研究代表者らは、病態成立機序の一端を明らかにするため、変異可溶型受容体 (sFGFR2IIIcS252W) を作製し、その生物活性を細胞レベルで検証する研究に取り組んできた。その結果、変異可溶型受容体による細胞内シグナルの制御が、頭蓋冠早期癒合症の非侵襲的な治療法開発の端緒となる可能性が明らかとなってきた。また今回、海外研究協力者である National Institutes of Health (NIH) の Chu-Xia Deng 博士から、変異受容体 (FGFR2IIIcS252W) を過剰発現し頭蓋縫合部早期癒合症を発症する Apert 症候群疾患モデルマウスを供与された。さらにナノゲルを独自に開発した秋吉一成教授と共同研究を行うことで、以下の研究計画を提案することが可能となった。

1) 変異可溶型受容体が Apert 症候群疾患モデルマウスに及ぼす影響の検索：レスキューマウスの作製

Apert 症候群疾患モデルマウスと、研究代表者らが作出した変異可溶型受容体を全身性に過剰発現するトランスジェニックマウスを交配させ、組織学的手法ならびに分子生物学的手法により、Apert 症候群疾患モデルマウスの表現型に対する変異可溶型受容体の効果の検証を行う。

2) ナノゲルによる DDS 技術を応用した変異可溶型受容体の作用条件の最適化：Apert 症候群疾患モデルマウス由来骨芽細胞様細胞を用いた *in vitro* 解析

ナノサイズのゲル微粒子 (ナノゲル) を用いた DDS 技術を応用して、Apert 症候群疾患モデルマウス由来の骨芽細胞様細胞へ変異可溶型受容体を作用させ、細胞レベルでの有効性を検索すると同時に、その至適条件について検討を行う。

3) 非侵襲的な分子標的治療の基盤構築：ナノゲルの頭蓋冠縫合部への *in vivo* での導入  
ナノサイズのゲル微粒子 (ナノゲル) とリン酸カルシウムを複合化させた新しい有機-無機ハイブリッドナノ粒子を用いることで、疾患部位の縫合組織をターゲットとして変異

可溶性受容体を選択的に導入できるシステムによる分子標的治療の基盤構築を目指す。

#### 4. 研究成果

雄性 sFGFR2111cS252W E11a-Cre と雌性 Fgfr2+/Neo-S252W を交配して得られたマウス (n = 242) の遺伝子型を PCR にて解析した結果、Fgfr2+/Neo-S252W、E11a-Cre sFGFR2111cS252W、Ap/Sol マウスの出生率は低く、E11a-Cre、sFGFR2111cS252W マウスの出生率は高かった。また、血清中の sFGFR2111cS252W の発現を Western blot 法で確認したところ、sFGFR2111cS252W マウスの血清中に約 60 kDa と 35 kDa の FLAG 標識タンパク質を検出した。既知の FGFR2 の遺伝子配列から推定される sFGFR2111cS252W の分子量から、60 kDa のバンドは sFGFR2111cS252W を示すと考えられた。一方、35 kDa のバンドは、sFGFR2111cS252W の分解産物と推測された。

肉眼的所見として、P1 の Ap マウスの体長は小さい傾向を示したが、Ap/Sol マウスの体長は Ap マウスよりわずかに大きかった。体重計測の結果、Ap マウスは野生型マウスに比べ有意に低く、Ap/Sol マウスでは、野生型、または、Ap マウスと比べ有意差を認めなかった。

定量的 $\square$ CT データから、P1 において、Ap マウスでは冠状縫合の連続性と前頭縫合の開大を認めた。P8 において、野生型マウスでは前頭縫合が癒合していたが、Ap マウスでは開存していた。一方、Ap/Sol マウスでは、P1 において、冠状縫合の連続性は認めず、前頭縫合の開大は Ap マウスと比較して、小さかった。P8 において、Ap/Sol マウスの前頭縫合形態は野生型マウスに類似していた。一方、P1 において頭頂骨の骨密度を計測したところ、野生型、Ap、Ap/Sol マウス間に有意差は認めなかった。Ap マウスの前頭縫合部幅径は、野生型、Ap/Sol マウスに比べて有意に大きく、野生型と Ap/Sol マウス間に有意差は認めなかった。

P1 における頭蓋冠縫合部の組織像において、HE 染色にて Ap マウスでは冠状縫合の早期癒合と前頭縫合の開大および異所性の骨様構造の形成を認めた。この骨様構造はアリザリンレッドに濃染することから、石灰化した骨組織であると考えられた。また、アルシアンブルー染色にて、前頭縫合周囲の軟骨の肥厚を認めた。一方、Ap/Sol マウスでは冠状縫合は野生型マウスの冠状縫合と類似しており、前頭縫合の開大は Ap マウスと比較して小さく、異所性の骨様構造の形成や軟骨の肥厚は認めなかった。Apert 症候群様表現型の発症率を野生型、Ap、Ap/Sol マウスで比較した結果、冠状縫合の早期癒合、前頭縫合の異所性骨形成について、Ap マウスと比較して Ap/Sol マウスでは有意に症状の改善を認めた。

胎生 15.5 日齢 AS マウス頭蓋冠縫合部

における *Runx2* および *Osteopontin* の高発現が認められた。ERK1/2 や MEK、SAPK/JNK の細胞内シグナル伝達分子のリン酸化および Bax の発現が AS マウスにおいて亢進していた。さらに *Fgfr2111b* mRNA および Epithelial splicing regulatory protein 1 (*Edrp1*) 発現、Fgf10 タンパク質の発現が AS マウスにおいて異所性に認められた。

野生型可溶性 FGFR2 (sFGFR2111c) および sFGFR2111cS252W を精製した結果、それぞれ約 50 kDa と同定された。精製 sFGFR2111c および精製 sFGFR2111cS252W は Fgf2 と結合することが確認された。さらに sFGFR2111cS252W は FGFR2111c および FGFR2111bS252W とヘテロダイマーを形成することが示された。

FGF2 添加により MC3T3-E1 細胞は有意に増殖したが、MC3T3-Ap 細胞の増殖は促進しなかった。sFGFR2111cS252W 添加により有意に細胞増殖が減少した。MC3T3-E1 細胞において FGF2 添加により Erk1/2 および MEK、SAPK/JNK、p38、Akt のリン酸化亢進が認められた。一方、MC3T3-Ap 細胞では、これら分子のリン酸化は FGF2 非添加でも亢進されており、FGF2 添加によっても変化しなかった。sFGFR2111c または sFGFR2111cS252W 添加により、これら分子のリン酸化亢進は抑制された。とくに Erk1/2、SAPK/JNK、p38 において sFGFR2111cS252W の方が sFGFR2111c よりも強い抑制作用を認めた。MC3T3-E1 細胞は分化誘導培地にて 3 週間後に石灰化が認められたが、MC3T3-Ap 細胞では 1 週間後に石灰化が認められ、sFGFR2111cS252W 添加により、U0126 (ERK 阻害剤) および SB203580 (p38 阻害剤) 添加と同程度まで石灰化の抑制が認められた。

頭蓋冠組織培養の結果より、AS マウス冠状縫合部においてナノゲル単体添加群では縫合部の癒合が全例で認められた。一方、ナノゲル-sFGFR2111cS252W 添加群では縫合部の開存が全例 (n = 4) で認められた。

#### 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)

[雑誌論文](計 18 件)すべて査読あり

Morita J, Nakamura M, Kobayashi Y, Deng CX, Funato N, Moriyama K. Soluble form of FGFR2 with S252W partially prevents craniosynostosis of the apert mouse model. Dev Dyn.243(4):560-567, 2014.

DOI:10.1002/dvdy.24099

Watanabe C, Morita M, Hayata T, Nakamoto T, Kikuguchi C, Li X, Kobayashi Y, Takahashi N, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Ezura Y, Noda M. The stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via Cnot3. Proc Natl Acad Sci USA.

111(7):2692-2697, 2014.  
DOI: 10.1073/pnas.1316932111  
Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K. Relaxin receptors 1 and 2 and nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) mRNAs are expressed in oral components of developing mice. Arch Oral Biol. 59(2):111-118, 2014.  
DOI:10.1016/j.archoralbio.2013.10.010  
Uezono M, Takakuda K, Kikuchi M, Suzuki S, Moriyama K. Hydroxyapatite/collagen nanocomposite-coated titanium rod for achieving rapid osseointegration onto bone surface. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 101:1031-1038, 2013.  
DOI: 10.1002/jbm.b.32913  
Aukkarasongsup P, Haruyama N, Matumoto T, Shiga M, Moriyama K. Periostin inhibits hypoxia-induced apoptosis in human periodontal ligament cells via TGF- $\beta$  signaling. Biochem Biophys Res Commun. 441:126-32, 2013.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.027  
Suzuki H, Suda N, Shiga M, Kobayashi Y, Nakamura M, Iseki S, Moriyama K. Apert syndrome mutant FGFR2 and its soluble form reciprocally alter osteogenesis of primary calvarial osteoblasts. Journal of Cellular Physiology. 227(9): 3267-77, 2012.  
DOI: 10.1002/jcp.24021  
Tsuji-Takechi K, Negishi-Koga T, Sumiya E, Kukita A, Kato S, Maeda T, Pandolfi PP, Moriyama K, Takayanagi H. Stage-specific functions of leukemia/lymphoma-related factor (LRF) in the transcriptional control of osteoclast development. Proc Natl Acad Sci USA. 109:2561-6, 2012.  
DOI: 10.1073/pnas.1116042109  
Kawafuji A, Suda N, Ichikawa N, Kakara S, Suzuki T, Baba Y, Ogawa T, Tsuji M, Moriyama K. Systemic and maxillofacial characteristics of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome not treated with glossectomy. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 139(4):517-25, 2011.  
DOI:10.1016/j.ajodo.2009.07.021  
Suda N, Ogawa T, Kojima T, Saito C, Moriyama K. Non-syndromic oligodontia with a novel mutation of PAX9. J Dent Res. 90(3):382-6, 2011.  
DOI: 10.1177/0022034510390042

[学会発表](計 35 件)

森田淳平、船戸紀子、小林起穂、中村正孝、森山啓司. アペール型変異(S252W)を伴う可溶型 FGFR2 はアペール症候群モデルマウスの頭蓋冠早期癒合症の発症を抑制する. 第 72 回日本矯正歯科学会大会、松本、平成 25 年 10 月 7-9 日.  
吉崎正子、小林起穂、佐々木善浩、秋吉一成、森山啓司. 頭蓋冠縫合部早期癒合症に対する FGF/FGFR シグナルを標的とした新規治療法開発への試み. 第 72 回日本矯正歯科学会大会、松本、平成 25 年 10 月 7-9 日.

Yoshizaki M, Kobayashi Y, Moriyama K. Soluble fibroblast growth factor receptor 2 with Apert mutation inhibits differentiation and mineralization of osteoblast. 2nd Joint Meeting of the International Bone Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, May 28 -June 1, 2013.

Yoshizaki M, Kobayashi Y, Moriyama K. Soluble FGFR2 with Apert mutation inhibits osteoblastic proliferation and differentiation. The 91st General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Seattle, March 20-23, 2013.  
Moriyama K. Outcome and stability of surgical treatment for mandibular prognathism with long face. 8th Asian Pacific Orthodontic Conference, New Delhi, December 1, 2012.

Moriyama K. Osteocyte is a key modulator for orthodontic tooth movement induced by mechanical stress. 112th American Association of Orthodontists, Hawaii, May 7, 2012.  
Tsuji K, Koga T, Moriyama K, Takayanagi H. The Transcriptional Repressor LRF Regulates Osteoclastogenesis. The 59th Japanese Association for Dental Research, Hiroshima, October 8-9, 2011.

Watanabe C, Morita M, Ezura T, Nakamoto T, Hayata T, Hemmi H, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Noda M. Cnot3, a crucial factor of mRNA stability, controls osteoblastic differentiation. The American Society for Bone and Mineral Research 2011 Annual Meeting, San Diego, September 16-20, 2011.

Ogawa T, Ohya A, Sato M, Baba Y, Moriyama K. Clinical surveys on associated anomalies in cases with isolated cleft palate. The 9th European Craniofacial Congress,

Salzburg, September 14-17, 2011.  
松本力、森山啓司、山口朗. 矯正学的歯の移動における骨細胞の役割. 第70回日本矯正歯科学会 & 第4回国際会議、名古屋、平成23年10月17-20日.

〔図書〕(計 3件)

森山啓司、上園将慶、鈴木聖一、高久田和夫、菊地正紀、NTS INC、アンチエイジングシリーズ3. 骨研究最前線、2013、p145-155

Kuroda T, Ohyama K, Motohashi N, Moriyama K. Atlas of orthodontic treatment for patients with birth defect. Needham Press, 2012. 207

Takeda S, Haga N, Moriyama K. Clinical correlate: cleidocranial dysplasia. Mineralized tissues in oral and craniofacial science.

WILEY-BLACKWELL, 2012. p59-63

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: HAp/CoI 複合体によって被覆された生体材料

発明者: 菊池正紀, 高久田和夫, 森山啓司, 鈴木聖一, 上園将慶

権利者: 東京医科歯科大学、物質・材料研究機構

種類: 発明

番号: PTC/JP2013/061666

出願年月日: 2013年4月19日

国内外の別: 国外

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〕

日本経済新聞 2013年4月9日付掲載.

日刊工業新聞 2013年4月9日付掲載.

科学新聞 2013年5月3日付掲載.

マイナビニュース掲載  
(<http://news.mynavi.jp/news/2013/04/09/061/>)

東京医科歯科大学ホームページ掲載  
(<http://www.tmd.ac.jp/press-release/index.html>)

NIMS ホームページ掲載  
(<http://www.nims.go.jp/news/press/2013/04/p201304080.html>)

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・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号: 20262206

(2)研究分担者

小川 卓也 (OGAWA Takuya)

東京医科歯科大学・大学院・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号: 50401360

東堀 紀尚 (HIGASHIHORI Norihisa)

東京医科歯科大学・大学院・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号: 50585221

小林 起穂 (KOBAYASHI Yukiho)

東京医科歯科大学・大学院・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号: 20596233

秋吉 一成 (AKIYOSHI Kazunari)

京都大学・工学部・教授

研究者番号: 90201285