

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20968

研究課題名(和文)顎下腺に着目したApert症候群モデルマウスの病態解析

研究課題名(英文)Pathological analysis of Apert syndrome mice model in submandibular gland

研究代表者

森田 淳平(Morita, Jumpei)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50737046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Apert症候群は頭蓋冠早期癒合症を主症状とし、線維芽細胞増殖因子2型受容体(FGFR2)の機能亢進が原因とされている。Apert症候群患者で唾液量が増大している所見が臨床経験から示唆されるが臨床的及び基礎的報告はない。今回、Apert症候群モデルマウスを用いて、唾液腺におけるApert症候群の病態解析を行った。

Apマウスで顎下腺の実質占有率が大きく、小葉の数は少なく、総面積は大きかった。このことから、Apマウスの顎下腺ではFGFR2の機能亢進により、分枝形態形成が亢進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Apert syndrome is characterized by craniosynostosis and severe bony syndactyly of the hands and feet. The cause of Apert syndrome is a single nucleotide substitution mutation (S252W or P253R) in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2). Clinical experience suggests increased production of saliva by Apert syndrome patients, but this has not been formally investigated. Using Apert syndrome mice model, we investigated the role of FGFR2 in SMGs and analyzed the SMG pathology of Apert syndrome.

In Ap mice, the number of lobules was small and the average area of lobules and the parenchyma occupancy rate were large compared with controls. Ap mice showed morphological changes in the SMGs, which are likely to be caused by gain-of-function of FGFR2, suggesting the possibility that epithelial cell proliferation is enhanced.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Apert症候群 唾液腺

1. 研究開始当初の背景

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)依存的機能亢進型変異(S252W または P253R)を原因とし、頭蓋骨縫合部早期癒合症、手足の合指症を主症状とする先天性疾患である。Apert 症候群患者の口腔領域においては、中顔面部の劣成長に起因した重度の反対咬合、開咬を呈し、顎矯正手術を併用した外科的矯正治療が適応となり、多くの症例で、極めて治療が困難となる。

FGFR2 には、選択的スプライシングによる FGFR2IIIb と FGFR2IIIc の 2 つのアイソフォームが存在し、FGFR2IIIb は上皮系細胞に発現して FGF7、10 に高い親和性を示すのに対し、FGFR2IIIc は間葉系細胞に発現して FGF2、3、6、8、9 に高い親和性を示す。そして、Apert 型変異をもつ FGFR2 は FGF リガンドに対する結合特異性の喪失および結合親和性の亢進が生じていると報告されている。

近年、*Fgfr2^{S252W}* または *Fgfr2^{P253R}* の変異をもつ遺伝子組換えマウスが作出された。これらのマウスは冠状縫合部の早期癒合、中顔面部の劣成長などの特徴をもち、Apert 症候群患者と類似した表現型を呈することから、Apert 症候群の発症メカニズムの解明や、新規治療法の開発研究に有用な疾患モデルマウスと考えられている。申請者は、細胞内領域を欠失し、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}) の Apert 症候群モデルマウス (Ap マウス) に対する影響を検索してきたが、その際、間葉系細胞由来組織である前頭縫合部において、縫合の開大、異所性骨形成、周囲軟骨肥厚といった新たな Apert 症候群様表現型を発見した (Morita et al. Dev Dyn. 2014)。また、神経堤細胞または中胚葉由来細胞に特異的に *Fgfr2^{S252W}* を発現させたマウスを作出し比較した実験から、冠状縫合の早期癒合には中胚葉由来細胞における FGF シグナルの亢進が必要十分であるとの報告もある (G Holmes et al. Dev Biol. 2012)。このように Apert 症候群における骨形成異常、軟骨形成異常といった主に間葉系細胞が関与する表現型についての報告が散見される。

一方、Apert 症候群患者では、唾液量が増加しているという所見が本研究代表者の臨床経験から得られ、歯科矯正治療を困難にする一因となっていると考えられる。現に、組織培養系における FGF7、10 およびリコンビナント FGFR2IIIb 投与実験などから顎下腺の分枝形態形成に FGFR2IIIb を介した FGF シグナルが関与していることが明らかになっている (Zachary et al. Development. 2005, Yamamoto et al. J Biol Chem. 2008)。しかし、Apert 症候群の顎下腺における表現型およびその発症メカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究はまだ解明されていない Apert 型変異 S252W による顎下腺における表現型および発症メカニズムを、Apert 症候群モデルマウスを用いて検索し、**Apert 症候群患者における病態解明の発展および顎下腺発生における上皮間葉相互作用の解明**を目的とした基礎的研究を行う。特に Apert 症候群モデルマウスにおける顎下腺の形態的变化を組織学的評価により調べることとした。

3. 研究の方法

ACTB-Cre^{+/+} マウスと *Fgfr2^{+/Neo-S252W}* マウスを交配して得られた *Fgfr2^{+/S252W}* マウス (Ap マウス) を使用した。また、同腹仔の *ACTB-Cre^{+/+}* マウスを対照群とした。生後 1 日齢において顎下腺と舌下腺 (SGs) を採取し、パラフィン包埋の後、組織切片を作製し、HE 染色を行い、光学顕微鏡下に観察した (図 1)。また、光学顕微鏡で観察された画像をデジタルデータ化し、画像解析ソフト (ImageJ) を用いて以下の解析を行った。

(1) 顎下腺の実質と間葉の識別

画像データのカラーモデルを 8bit グレースケールに変換した。その後、輝度 180 を閾値として 2 値画像を作成し (図 2)、黒色の領域を顎下腺の実質、白色の領域を間葉と識別した。

(2) 顎下腺の単位面積あたりの実質が占める割合 (実質占有率) の算出

ROI (Region of Interest) として 200 μm 四方の正方形を顎下腺内にランダムに 10 箇所設定し (図 3)、ROI 内の実質が占める面積を計測し、実質占有率を算出した。

(3) 小葉の数・面積の計測

ROI として顎下腺の概形を図 4 に示すようにマニュアルで設定し、粒子解析を行った (図 5)。実質のうち、810 μm^2 以上の広さのものを小葉と判別し、数、総面積、平均面積を計測した。

顎下腺の実質占有率、小葉の数、総面積、平均面積について Ap マウス群と対照群を比較した。統計学的解析は Mann-Whitney U test を用い、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

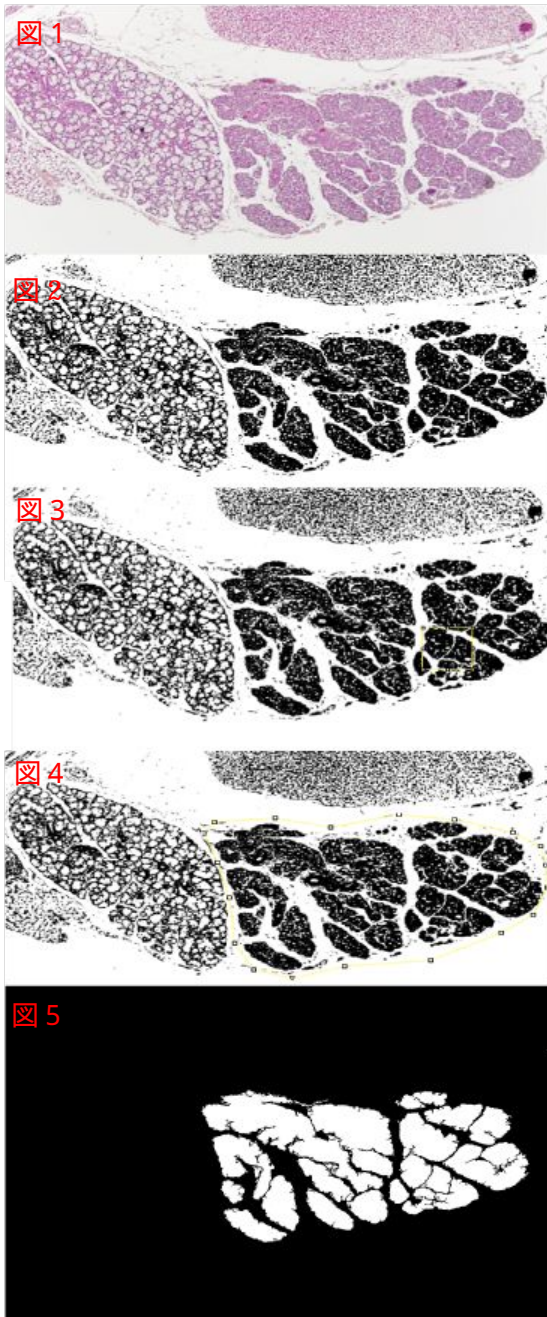
(1) 顎下腺の組織学的所見

図 6 に顎下腺を HE 染色した画像を示す。Ap マウスでは、小葉間の間葉の幅 (⇔) が狭く、実質占有率が大きい傾向を認めた。

(2) 顎下腺の画像解析

グラフに実質占有率、小葉の数、総面積、平均面積の計測結果を示す。Ap マウスでは顎下腺の実質占有率が有意に大きかった。さらに小葉の数は有意に少なく、平均面積は有意に大きかった。小葉の総面積には有意差を認めなかった。

本研究では、Ap マウスの顎下腺において実質が過形成となることが明らかとなった。これは、Jaskoll らの *Fgfr2b^{+/-}* マウスの顎下腺



において実質が低形成となるという報告と整合性のある結果だった。

また、Ap マウスにおいて FGFR2 の機能亢進による FGF シグナルの亢進により、分枝形態形成が促進し、上皮細胞の増殖が亢進している可能性が示唆された。

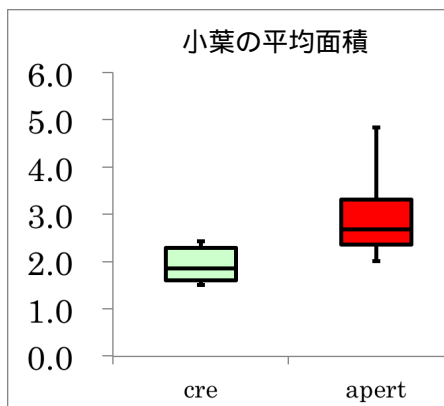
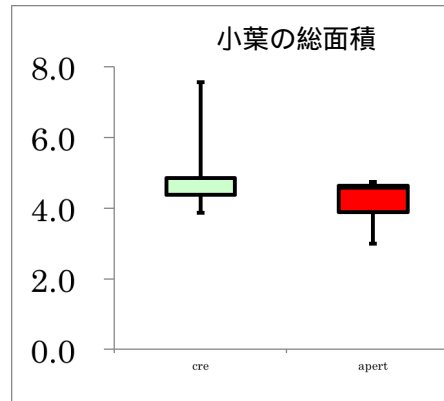
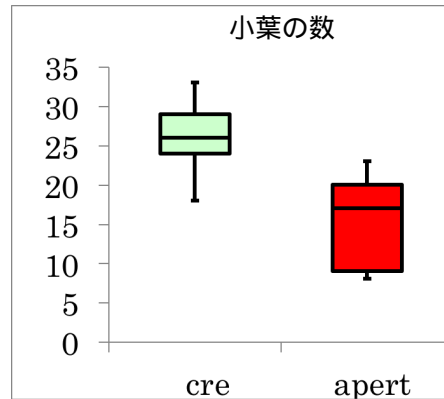
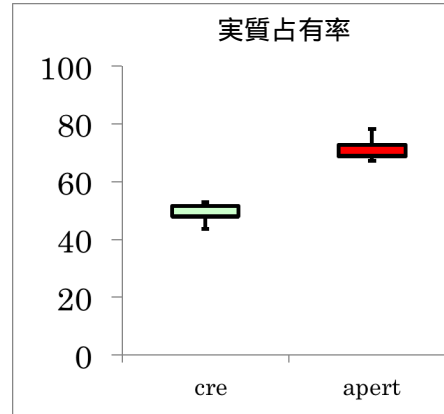
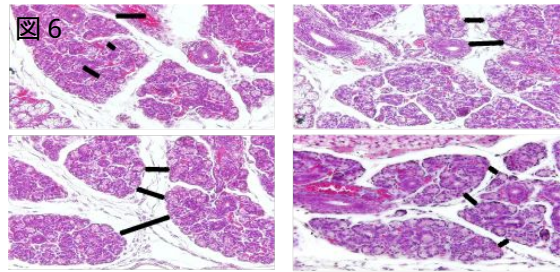
5. 主な発表論文等

(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4件)

・本邦における外科的矯正治療症例の統計的検討. 川元龍夫、森田淳平、一田利道、福留由貴、池田恵理奈、瀧口玲子、郡司掛香織、黒石加代子. 九州歯科学会誌. 69(4):87-93, 2015.

・A preliminary investigation of the effect of relaxin on bone remodelling in suture



expansion. Duarte C., Kobayashi Y., Morita J., Kawamoto T., Moriyama K., Eur J Orthod. [Epub ahead of print] 2016.

・外科的矯正治療後の長期安定性を求めて。川元龍夫、森田淳平，東京矯歯科学会雑誌，26:30-37，2016。

・上顎骨に対する顎変形症治療の術後安定性について。黒石加代子、郡司掛香織、瀧口玲子、一田利道、森田淳平、上田雅恵、富永和宏、川元龍夫，九州歯科学会雑誌，70(2):39-48，2016。

〔学会発表〕(計4件)

・Characteristic Orofacial Phenotypes in a Patient Diagnosed with Orofaciodigital Syndrome1. Morita J., Tsuji M., Uezono M., Moriyama K., The 8th International Orthodontic Congress (於：London 2015年9月27-30日)

・九州歯科大学顎口腔機能矯正学分野における10年間の外科的矯正治療に関する検討。森田淳平、池田恵理奈、福留由貴、鶴島弘喜、土生学、吉岡泉、富永和宏、川元龍夫 第26回日本顎変形症学会総会・学術大会(於：学術総合センター(一橋講堂) 東京都 2016年6月24-25日)

・九州歯科大学附属病院矯正歯科外来における永久歯先天性欠如に関する検討 森田淳平、渡邊司、郡司掛香織、黒石加代子、川元龍夫 第75回日本矯正歯科学会大会(於：アスティとくしま、徳島県 2016年11月7-10日)

・顎下腺におけるApert症候群モデルマウスの病態解析 山地晃二郎、森田淳平、郡司掛香織、志賀百年、川元龍夫 第12回九州矯正歯科学会大会(於：New Wel City、宮崎県 2017年3月18-19日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田淳平 (MORITA Jumpei)

九州歯科大学・歯学部・歯学科・顎口腔機能矯正学分野・助教

研究者番号：50737046

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

山地 晃二郎 (YAMAJI Kojiro)