

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20368

研究課題名(和文) 頭蓋縫合閉鎖に関わるメカノバイオロジーの解明

研究課題名(英文) Mechanobiology involved in cranial suture closure

研究代表者

坂本 好昭 (SAKAMOTO, Yoshiaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：10464835

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)：頭蓋縫合が開存している部分、ならびに早期癒合している部分とを比較する方法として、ヒトのmetopic suture(前頭縫合)にあたるposterofrontal suture(PF)に着目して研究を行った。その結果、癒合傾向にある縫合において癒合するまでエストロゲンレセプター(ER)の強発現が続く一方で、ERは癒合が始まるとともに発現が減少するという知見を得た。以上のことから、ERは破骨細胞の活性に関与、そしてERは骨芽細胞の活性化を抑制することで、縫合の開存と癒合を調整していることが示唆された。

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は先天的に頭蓋縫合が癒合しており、癒合する縫合により特徴的な異常頭蓋形態を示す疾患である。本疾患の原因遺伝子がいくつか報告されているが、なぜ早期に癒合が生じるのかということに関しては未だわかっていない。申請者は通常、縫合はいかに癒合せずに開存しているのかということに着目した。その結果、驚くべきことに、通常は骨吸収を促進させる破骨細胞が、開存部分より癒合部分で多く発現していることを見出した。また臨床経験から縫合に外力を加えると癒合が促進されるという知見を得た。以上のことから、頭蓋内圧と頭蓋縫合癒合には圧センサー的なメカノバイオロジーが関与していると考え、その病態を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：In mice, the posterofrontal suture (this was fused p19) and metopic suture (this was patent) was compared.

As results, it was found that the strong expression of estrogen receptor (ER) continues until the suture was fused, while the expression of ER decreases as the fusion starts. These results suggest that ER was involved in osteoclast activity and ER regulates osteoblast activation.

研究分野：形成外科

キーワード：頭蓋縫合早期癒合症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭蓋縫合早期癒合症は先天的に頭蓋縫合が癒合しており、癒合する縫合により特徴的な異常頭蓋形態を示す疾患である(図1)。

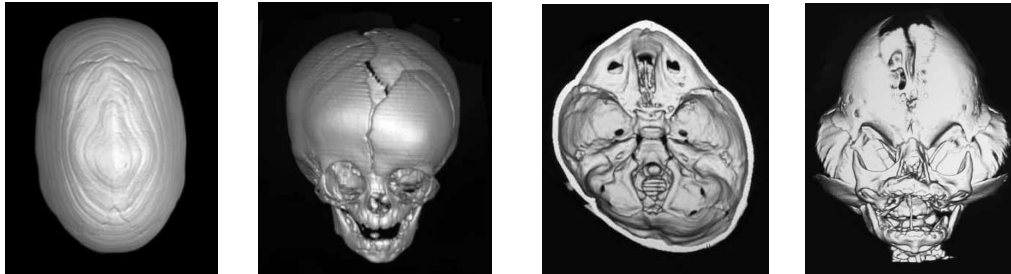


図1. 頭蓋縫合早期癒合症で認められる異常頭蓋形態
左から舟状頭、斜頭、三角頭、短頭、クローバー様頭蓋。
放置すると見た目の問題だけでなく、脳の発育障害が生じる

頭蓋縫合早期癒合症における頭蓋形態発生のメカニズムに関しては、1851年にVirchowによる「早期癒合が生じるとその癒合と垂直方向に代償性の拡大が生じる」とする説が出されて以降150年以上にも渡り全く議論がなされていない。また本疾患の一部の原因遺伝子の同定とそのノックアウトマウスは存在するものの、そのマウスの頭蓋での発現タンパクや細胞への研究は十分なされているとは言い難い。

その原因の一つは癒合した縫合を観察してもそれは周囲と同じ骨となってしまうためである。そのため、癒合段階にある縫合での検討が必要である。

2. 研究の目的

頭蓋縫合早期癒合症の原因遺伝子がいくつか報告されているが、なぜ早期に癒合が生じるのかということに関しては未だわかっていない。申請者は通常、縫合はいかに癒合せずに開存しているのかということに着目した。生理学的に見るとヒトの前頭縫合は通常1歳前後までは開存しており、その後生理的に自然癒合する縫合である。また臨床的には持続的な圧が頭蓋骨に関わると、二次性の頭蓋縫合早期癒合症が生じることが知られている。胎児期には母胎内での頭蓋外からの圧が加わり、そして生後は脳の成長による頭蓋内からの圧が加わることになる。以上のことから、圧と頭蓋縫合癒合には圧センサー的なメカノバイオロジーが関与していると考え、その病態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

頭蓋縫合が開存している部分、ならびに早期癒合している部分とを比較する方法として、ヒトのmetopic suture(前頭縫合)にあたるposterofrontal suture(PF)に着目した。同縫合はマウス出生後約19日目に生理的に癒合する唯一の縫合である(図2)。一方、そのPFと連続するsagittal suture(SAG)は癒合することはない。同部において骨芽細胞、破骨細胞の活性化と、その活性にかかわる因子としてRANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)の発現を検討する。またそれ以外の発現を検討し、これらの関係性を総合的に検討する。原因となる候補のノックアウトマウスを作成し、そのマウスにおいて癒合が起きうるかを検討した。

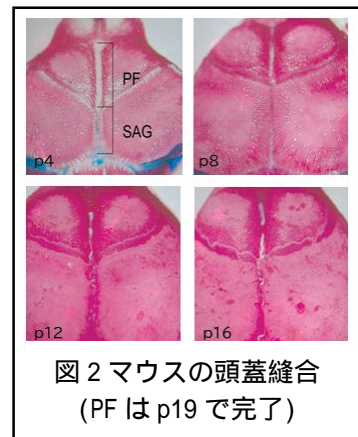


図2 マウスの頭蓋縫合
(PFはp19で完了)

4. 研究成果

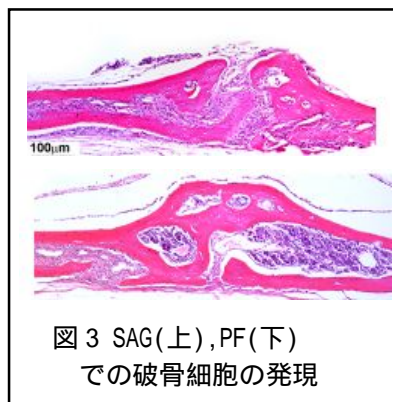


図3 SAG(上),PF(下)
での破骨細胞の発現

骨が癒合ということは同部において骨新生が進んでいる。すなわち骨芽細胞が活性化していると考えられる。そこでマウスのposterofrontal suture,ならびにその縫合と連続するsagittal sutureでの骨芽細胞、ならびに破骨細胞の発現を検討した。

癒合部分では骨新生を促す骨芽細胞の発現が確認される。開存部分であれば、骨吸収に関する破骨細胞が発現していることは容易に理解可能であるが、癒合段階にあるposterofrontal sutureにおいて、破骨細胞が開存部よりも強発現するという結果を見出した(図3)。

また同様にRANKLの発現も認めることができた。

そこで破骨細胞の発現、RANKLと関連する因子を検討する

こととした。ここで着目したのが、骨粗鬆症である。加齢に伴いエストロゲンが減少すると骨端線が閉鎖していることが知られていた。そのことから母胎でのエストロゲン、あるいはその応答が減少することで早期に頭蓋縫合が癒合するのではと考えた。

そこでエストロゲンレセプター(ER)の発現を免疫染色により確認したところ(図4)、PFで多く発現していることが判明した。ERにはこの二つのサブセットが存在する。そこでこれらの発現量を RT-PCT を用いて定量化した。その結果(図5)、p4-19においてはERはPFの方が優位に多く発現していた。一方ERに関してはp4-10はPFのほうが優位に発現していたが、P13-19ではSAGと有意な差をみとめなかった。

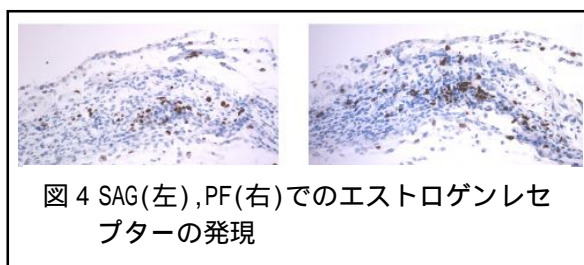


図4 SAG(左),PF(右)でのエストロゲンレセプターの発現

以上の検討から、免疫染色で増加していた者はERであることが示唆された。しかしここで着目すべきなのは微量であるERの変化と考えた。すなわち開存から癒合に至る過程において、ERの発現量が低下することで癒合にいたるのではないかと考えた。

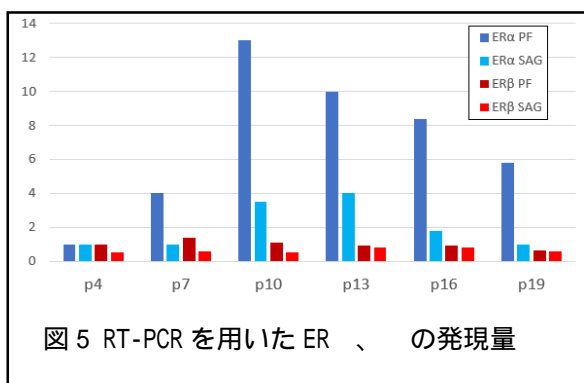


図5 RT-PCRを用いたERの発現量

そこでER、ならびにERノックアウトマウスを用いて、posterofrontal sutureの自然癒合の過程を検討した。その結果ERKOでは正常よりもその癒合が遅延することが判明した。しかしここでの問題点はERKOでは、骨ミネラルの減少や骨密度増加を示し、また全体に体も小さく長管骨が短縮する傾向があった。これはヒトの頭蓋縫合早期癒合症では認められない症状である。一方のERKOはその体形含めて正常と考えられた。本マウスではPFの癒合が通常よりも早期に認められた。

以上のことから仮説として考えられることは、ERは破骨細胞の活性に関与、そしてERは骨芽細胞の活性化を抑制していると考えられる。PFではERが高発現している。その場合、破骨細胞が活性化され、RANK-RANKLの刺激により骨芽細胞を通常であれば活性化する。しかしここにERが発現しているとその活性が抑えられ、骨新生は進まない。しかしERの高発現が続く中、ERの発現が少なくなると、骨新生が進み癒合が生じる。一方SAGのようにERが高発現していない場合には通常のリモデリングが行われるのみにとどまる。

このようにERとERの発現量の違いが閉鎖に関与していることが示唆された。

しかし本研究においてはER、ERの発現機構を解明するまでは至らなかった。

本研究の限界としては今回はあくまで生理的に自然癒合する縫合を研究対象として使用しており、それが本来病的に癒合しているものと同様の反応とは断定しえない。しかしながら生理的癒合に関しても十分な検討がこれまでなされていなかったことから、本研究で得た知見は今後の病態解明の一助になると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yoshiaki Sakamoto
2. 発表標題 To distract or not to distract for frontoorbital advancement in craniosynostosis
3. 学会等名 Plastic Surgery The Meeting in 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Sakamoto
2. 発表標題 Influence of cranial pressure in Mouse Posterofrontal Cranial Suture Fusion
3. 学会等名 Asian Pacific Craniofacial Association (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yoshiaki Sakamoto
2. 発表標題 Influence of cranial pressure in Mouse Posterofrontal Cranial Suture Fusion
3. 学会等名 American Society of Plastic Surgeon (国際学会)
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