

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18K09808
研究課題名(和文) 骨系統疾患に起因する顎変形症への新規治療法の開発(疾患特異的iPSを用いた検討)

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for jaw deformity caused by skeletal dysplasia

研究代表者
中尾 一祐(nakao, kazumasa)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40599932
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨無形成症(Ach)モデルマウスの顎顔面形態を解析したところ、ヒトと同様に中顔面の矢状方向の劣成長や大後頭孔の狭窄を認めた。Achマウスの頭蓋底の軟骨結合部の肥大軟骨細胞層・増殖細胞層はともに狭小化しており、さらに中心部に血管新生やアポトーシスを伴った早期骨化を認めた。Achマウスで認められていた中顔面の劣成長や大後頭孔の狭窄は、CNPの血中濃度上昇により、有意に改善することが出来た。一方、軟骨無形成症患者から樹立したiPS細胞の軟骨分化実験では、継代数や株ごとに軟骨分化成功率にばらつきを認めた。そのため人に対するCNPの有効性の判定に使用することは困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎変形症は顎骨の大きさ、形態が著しく異常な状態であるものの総称である。顎変形症は遺伝要因や環境要因が強く関わり発症する多因子疾患と考えられているがその発症メカニズムについては十分には明らかとなっていない。

また、顎変形症に対する治療は主に外科的手術による上下顎の移動による治療を行っているのが現状であり、投薬などのより低侵襲な治療法の開発が必要である。強力な内軟骨性骨化促進因子であるC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の血中濃度上昇が、上顎骨の矢状方向への成長を促進することが明らかとなり、さらに軟骨無形成症モデルマウスにおいて生じていた顎変形症をCNPの血中濃度上昇により改善することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the craniofacial morphology of achondroplasia (Ach) model mouse showed midface hypoplasia and foramen magnum stenosis, as in humans. In the synchondrosis of the skull base of Ach mice, both hypertrophic cell layers and proliferative cell layers were narrowed. The midfacial hypoplasia and foramen magnum stenosis observed in Ach mice could be significantly rescued by elevated blood levels of CNP. On the other hand, in experiments of chondrogenic differentiation of iPS cells established from patients with chondrodysplasia, the success rate of chondrogenic differentiation varied among different passages and strains. Therefore, it was difficult to determine the efficacy of CNPs in humans.

研究分野：口腔外科学

キーワード：CNP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎変形症は顎骨の大きさ、形態が著しく異常な状態であるものの総称である。顎変形症に対する治療は主に外科的手術による上下顎の移動による治療を行っているのが現状であり、投薬などのより低侵襲な治療法の開発が必要である。これまで我々は、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の血中濃度上昇が、上顎骨の矢状方向への成長を促進することを、遺伝子改変マウスを用い、明らかにしてきた。そこで、CNPを用いた新規顎変形症治療の確立を目的とし、本申請においては、特に軟骨無形成症を含めた先天性の骨系統疾患に生じる顎変形症に対し、疾患モデルマウスを用いたCNP投与条件と顎骨形態矯正効果、ヒト骨系統疾患特異的iPS細胞の樹立、野生型iPSとの分化機能の差異確認、CNPおよび内軟骨性骨化促進因子による機能レスキュー効果、の2点につき検討する。これらの検討を通じて、外科的手術に頼らない投薬による新規治療法の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、軟骨無形成症モデルマウスおよび軟骨無形成症患者から樹立した疾患特異的iPS細胞を使用し、軟骨無形成症を含めた先天性の骨系統疾患に生じる顎変形症の発症メカニズムの解析および新たな治療法を開発することを目的とする。

これまで我々は、強力な内軟骨性骨化促進因子であるC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)に着目し、新たな顎変形症治療への新規治療薬としての可能性を検討してきた。CNP遺伝子欠損マウスでは、上下顎の矢状方向への劣成長を呈し、反対に軟骨におけるCNPの過剰発現させたトランスジェニックマウスでは上顎の過成長を呈することを示し、CNPおよび内軟骨性骨化の顎顔面形態への重要性を明らかとしてきた(Nakao.et.al, J Dent Res. 2013)。さらにSAPプロモーターを用いた血中濃度上昇型のCNPトランスジェニックマウスにおいても、上顎の矢状方向への成長が促進されることを明らかとしてきた。そこで我々は内軟骨性骨化促進因子であるCNPに注目し、新たな治療法の確立を目指している。

特に軟骨無形成症を含めた先天性の骨系統疾患に生じる顎変形症に対し、CNP投与が新たな顎変形症治療となる可能性を考えており、CNPを用いた新たなアプローチでの治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 軟骨形成不全モデルマウスの顎顔面形態の解析

生後3ヶ月目の軟骨形成不全モデルマウスの頭蓋骨の μ CT撮影を行い(島津社製 inspeXio SMX-90CT) 上顎27ヶ所、下顎21ヶ所の計測点を μ CT上でとり、それぞれの直線距離を計測し比較を行う1)(EDMA法)。顎変形症の原因を明らかとするために、顔面を構成する軟骨組織、つまり軟骨内骨化により成長する部位である蝶後頭軟骨結合部、鼻中隔軟骨、下顎頭軟骨等の組織学的解析を行う。

(2) 軟骨形成不全症モデルマウスへのCNP-Tgマウスとの交配およびCNP投与による顔面形態のレスキュー実験

軟骨形成不全モデルマウスにおいて認められた顎変形症(上下顎の劣成長)を血中濃度上昇型CNP-Tgマウスと交配させることにより、顎変形症を改善しうるか検討する。顎顔面形態の評価は、頭蓋骨を μ CT撮影を行いEDMA法により解析する。またCNPの皮下投与を行うことにより、顎顔面形態を改善することができるかどうかについても検討を行う。さらに、生後1日目の軟骨形成不全モデルマウスより下顎骨、頭蓋底を採取し、器官培養を施行し、レスキューのメカニズムについての解析を行う。また、内軟骨骨化に重要な、蝶後頭軟骨係合部(SOS)、下顎頭軟骨(MCC)、鼻中隔軟骨(NSC)から軟骨細胞を採取し、3次元培養(Micromass culture)を施行し、軟骨無形成症の軟骨の性状およびCNP添加によりそれがどのように変化するか解析する。

(3) 軟骨形成不全症患者のiPS細胞を用いた軟骨分化誘導実験

維持培養された軟骨形成不全症患者のiPS細胞を我々が開発した4段階から成る培養法により、iPS細胞から軟骨細胞を誘導する。分化系の関連遺伝子、タンパク質の定量・定性、組織学的検討を、real time RT-PCR法で分化に関連した発現遺伝子、各種Kitを使用しタンパク量を解析する。また、アルシアンブルー染色、免疫組織化学染色を行い、各分化誘導系における組織学的検討も併せて行う。

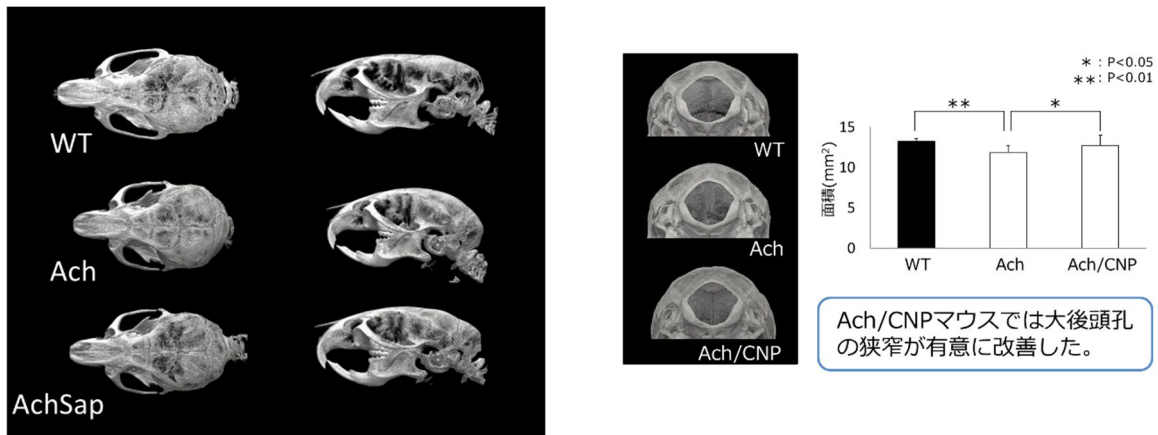
4. 研究成果

(1) 軟骨無形成症(Ach)モデルマウスの μ CT画像を解析したところ、ヒトと同様に中顔面の矢状方向の劣成長や大後頭孔の狭窄を認めた。

中顔面の成長には、頭蓋底における成長中心である蝶脛骨間軟骨結合部(ISS)と蝶後頭軟骨結合部(SOS)における内軟骨性骨化による成長が重要であるとされている。組織学的解析におい

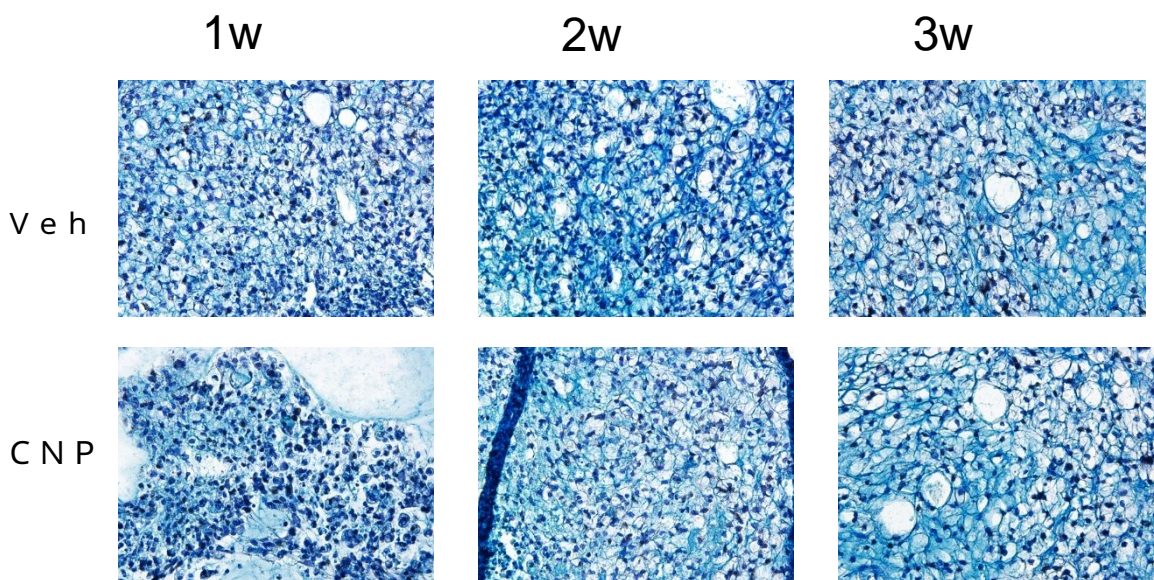
て、Ach マウスの ISS と SOS の肥大軟骨細胞層・増殖細胞層はともに狭小化しており、さらに SOS 中心部に血管新生やアポトーシスを伴った早期骨化を認めた。

(2)Ach マウスで認められていた顎顔面形態異常に対し、CNP の血中濃度上昇により改善できるかどうか検討するために、Ach マウスと血中濃度上昇型 CNP トランスジェニックマウスとの交配実験を行った。CNP の血中濃度上昇により、Ach マウスで認められていた中顔面の劣成長や大後頭孔の狭窄は有意に改善することが出来た。組織学的解析の結果、SOS で生じていた早期骨化については CNP の影響は認めなかったものの ISS、SOS の内軟骨性骨化の促進により、軟骨細胞の肥大化や基質産生の増大を認めていた。以上のことより、CNP の投与は軟骨結合部の内軟骨性骨化を促進させることにより、軟骨無形成症で認められる顎顔面形態異常を改善しうる可能性が示唆された。



(3) iPS 細胞を用いて in vitro における骨・軟骨細胞への分化誘導系について検討を行ってきており、(1)未分化 iPS 細胞からの胚様体 (EB) 形成、(2)培養皿上に接着させた EB からの細胞増殖、(3)単一細胞に解離させ残存 EB を除去後の単層培養、(4)3次元のペレット培養の4段階から成る培養法により、iPS 細胞から軟骨細胞を誘導した。この培養法を用い、軟骨無形成症疾患特異的 iPS 細胞の軟骨分化能の解析および CNP や内軟骨性骨化促進因子の感受性試験などの検討を行った。

今回の検討では軟骨無形成症疾患特異的 iPS 細胞における CNP の有効性については確認は困難であった。原因としてはヒト iPS 細胞はクローン間だけでなく継代間でも分化能に差が大きく、結果の差が CNP により生じたのかどうかの判断が困難であった。



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 Yotsumoto T., Morozumi N., Furuya M., Fujii T., Hirota K., Ueda Y., Nakao K., Yamanaka S., Yoshikiyo K., Yoshida S., Nishimura T., Abe Y., Jindo T., Ogasawara H., Yasoda A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Foramen magnum stenosis and midface hypoplasia in C-type natriuretic peptidedeficient rats and restoration by the administration of human C-type natriuretic peptide with 53 amino acids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Isobe, Y., Takahashi, K., Kiso, H., Nakao, K., Ikeno, M., Koyama, N., Sugai, M., Shimizu, A., Haga, H., Bessho, K.	4. 巻 93
2. 論文標題 Direct evidence for the age-dependent demise of GNAS-mutated cells in oral fibrous dysplasia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 133-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柏木まりな 中尾一祐 山中茂樹 別所和久
2. 発表標題 ムコ多糖症モデルマウスを用いた顎顔面形態異常のメカニズムについての検討
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中茂樹、中尾一祐、小山典昭、柏木まりな、別所和久
2. 発表標題 軟骨無形成症の顎顔面形態異常に対する新規治療法の検討 第二報
3. 学会等名 第64回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中茂樹、中尾一祐、小山典昭、柏木まりな、別所和久
2. 発表標題 ニコチンが内軟骨性骨化に与える影響
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中茂樹、中尾一祐、柏木まりな、小山典昭、別所和久
2. 発表標題 内軟骨性骨化の顎変形症に対する影響について
3. 学会等名 第29回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中尾一祐 山中茂樹 八十田明宏 中尾一和 別所和久	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 9
3. 書名 内軟骨性骨化におけるCNP/GC-B系の生理的意義	

〔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	小山 典昭 (KOYAMA NORIAKI) (30599931)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	八十田 明宏 (YASODA AKIHIRO) (50378642)	独立行政法人国立病院機構（京都医療センター臨床研究センター）・その他部局等・臨床研究センター長 (84305)	
研究分担者	山中 茂樹 (YAMANAKA SHIGEKI) (80637596)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	別所 和久 (BESSHO KAZUHISA) (90229138)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関