

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10392

研究課題名(和文) Apert症候群疾患遺伝子を応用した顎下腺の上皮間葉相互作用及び機能的影響の解明

研究課題名(英文) Epithelial-mesenchymal interactions and functional consequences in the submandibular gland with application of the Apert syndrome disease gene.

研究代表者

川元 龍夫 (Kawamoto, Tatsuo)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50323704

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)：本研究は、Apert症候群モデルマウス(Apマウス)を用いて顎下腺の発生における上皮間葉相互作用のメカニズムやFGFR2のシグナル亢進が顎下腺に及ぼす影響を検索することを目的とした。顎下腺上皮の分枝が開始される胎齢13.5日(E13.5)と顎下腺導管内の内腔が形成される胎齢15.5日(E15.5)に着目して顎下腺の形態解析を行った。E13.5とE15.5のApマウスは対照群と比較してFGFR2シグナルの亢進によって顎下腺上皮の過形成が生じていることが明らかとなった。今後はApマウスを用いてFGFR2シグナル亢進による唾液腺の機能的影響を解明する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Apert症候群モデルマウス(Apマウス)はApert症候群患者と同様の表現型が認められることから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である。臨床経験よりApert症候群患者では唾液分泌量が増加しているという所見が得られており、本研究のApマウスで認めた顎下腺上皮の過形成が関係している可能性が高いと考えられる。またFGFシグナルと顎下腺発生に関する新たな知見を提供し、口腔乾燥症治療の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to search for mechanisms of epithelial-mesenchymal interactions in the development of the submandibular gland and the effects of increased FGFR2 signaling on the gland using Apert syndrome model mice (Ap mice). We analyzed the morphology of the submandibular gland focusing on the 13.5 days of fetal age (E13.5), when the branching of the submandibular gland epithelium begins, and the 15.5 days of fetal age (E15.5), when the lumen in the submandibular gland conduit forms. Hyperplasia was found to occur. In the future, we plan to use Ap mice to elucidate the functional effects of increased FGFR2 signaling on the salivary glands.

研究分野：成長および発育系歯学関連

キーワード：Apert症候群 分枝形態形成 上皮間葉相互作用 FGFR2 顎下腺

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、FGFR2IIIc は間葉系細胞に発現することで種々の組織で上皮間葉相互作用に関与している。そして、Apert 型変異をもつ FGFR2 は FGF リガンドに対する結合親和性の亢進が生じていると報告されている(文献 1)。

近年、Fgfr2S252W または Fgfr2P253R 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 Apert 症候群患者と類似した表現型を呈し、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(文献 2,3)。Apert 症候群モデルマウス(Ap マウス)では、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、周囲軟骨肥厚等の Apert 症候群様表現型が発見された(文献 4)。

また、神経堤細胞または中胚葉由来細胞に特異的に Fgfr2S252W 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 シグナルの亢進が強く関連しているとの報告もある(文献 5)。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申請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。現に、組織培養系における FGF7、10 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(文献 6,7)。

従来より研究代表者らは顎下腺に着目し Ap マウスの病態解析を行ってきた。Ap マウス顎下腺の組織学的解析を行ったところ、生後 1 日において顎下腺の腺房数の増加を確認した。そこでこの形態的影響の原因を検索するため Real-time PCR や免疫染色を用いた顎下腺の解析を行った。その結果 Ap マウスの顎下腺の上皮細胞において FGF3、BMP4 が有意に多く発現していることを解明した。BMP4 の発現の亢進よりも FGF シグナル活性の亢進が優位であり分枝形態形成の亢進が示唆された。このように Ap マウスの顎下腺の形態的影響に関して徐々に明らかになりつつある。しかし形態的影響の解析は不十分であるためさらなる研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究は 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、Ap 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及び機能的影響の解明を目的とする。

3. 研究の方法

FGFR2^{+/Neo-S252W} マウスと ACTB-Cre^{+/+} マウスを交配し、胎齢 13.5 日(E13.5)と胎齢 15.5 日(E15.5)に胎子を摘出した。得られた Ap マウスを実験群 ACTB-Cre マウスを対照群とした。頭部を採取し、パラフィン薄切切片を作成し各種染色を行った。

(1) 顎下腺の組織学的解析

Ap マウスの顎下腺の組織学的評価のためにパラフィン薄切切片を用いて HE 染色を行った。HE 染色で観察した画像を顕微鏡用デジタルカメラ(DP74; OLYMPUS, Tokyo, Japan)、顕微鏡用イメージングソフトウェア(cellSens Standard; OLYMPUS)を使用し画像解像度 72ppi、24 ビット RGB カラーモデルの JPEG 形式としてデジタルデータ化した。得られた画像を ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.) を使用して顎下腺総面積に対する上皮占有率を算出した。

(2) FGF シグナル関連タンパク質の局在部位の評価

顎下腺発生に関与する FGF シグナル関連のタンパク質の局在部位を評価するために免疫組織化学染色を行った。

(3) 顎下腺におけるアポトーシスの評価

顎下腺発生とアポトーシスの関連性について調べるために TUNEL 染色を行ってアポトーシスの検出を行った。

4. 研究成果

(1) 顎下腺の組織学的解析

E13.5 と E15.5 の Ap マウスにおいて、顎下腺総面積に対する上皮占有率は対照群と比較して有意に大きく上皮の過形成が示唆された(図 1、図 2)。

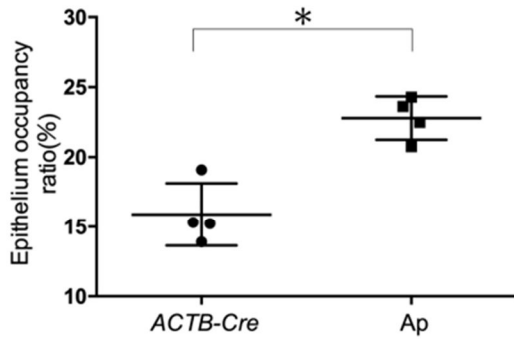


図1. E13.5 顎下腺の上皮占有率
* $P < 0.05$

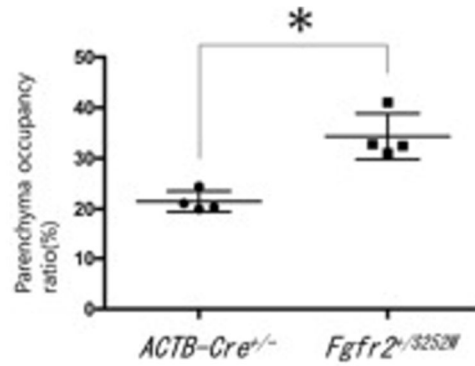


図2. E15.5 顎下腺の上皮占有率
* $P < 0.05$

(2) FGF シグナル関連タンパク質の局在部位の評価

E13.5 時点における評価では Ap マウスの顎下腺において FGF7 と BMP4 が対照群と異なる局在を認めた(図 3)。E15.5 時点における評価では Ap マウスの顎下腺において BMP4 が対照群と異なる局在を認めた(図 4)。また FGFR1 が局在部位に差異は認めなかったが、対照群と比較して高発現していた(図 4)。これらのことより顎下腺発生初期より Ap マウスの顎下腺において FGF シグナル亢進が生じていることが示唆された。また FGF シグナル亢進による上皮の過形成に対するネガティブフィードバック機構として BMP4 が関与している可能性が考えられる。

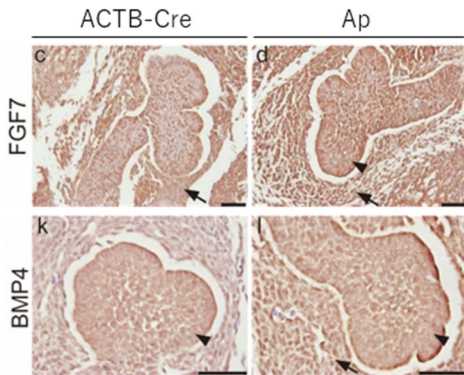


図3. E13.5 顎下腺の免疫染色
矢頭は上皮、矢印は間葉を示す。
スケール 20 μm

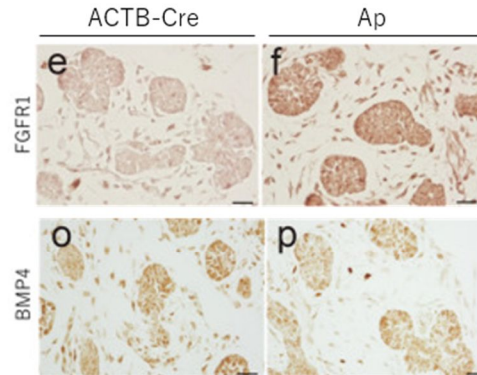


図4. E15.5 顎下腺の免疫染色
スケール 20 μm

(3) 顎下腺におけるアポトーシスの評価

E13.5 の Ap マウスの顎下腺においてはアポトーシスを認めなかった(図 5)。E15.5 の Ap マウスの顎下腺では対照群と比較して腺房周囲の間葉でアポトーシスを多く認めた(図 6k)。アポトーシスの増加が顎下腺上皮の腺房形成に関与している可能性が示唆された。

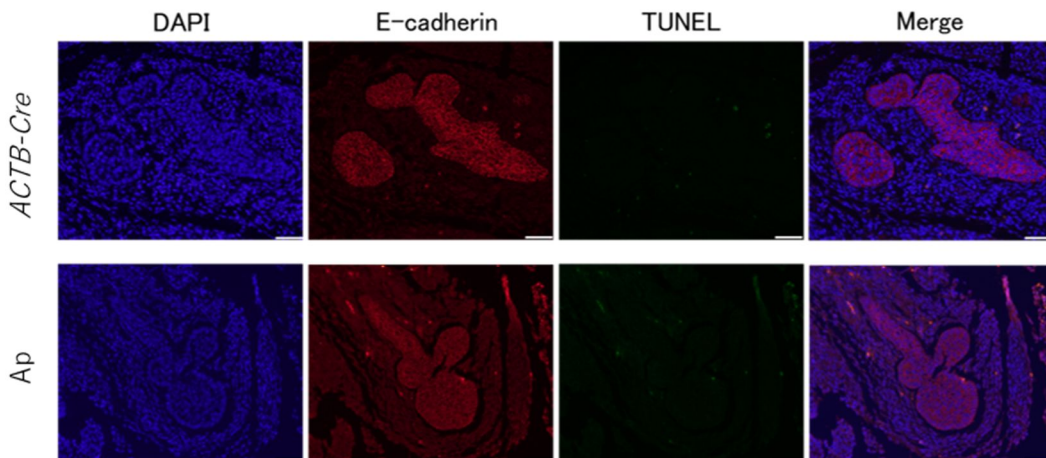


図5 E13.5 顎下腺のTUNEL染色 (スケール 50 μm)

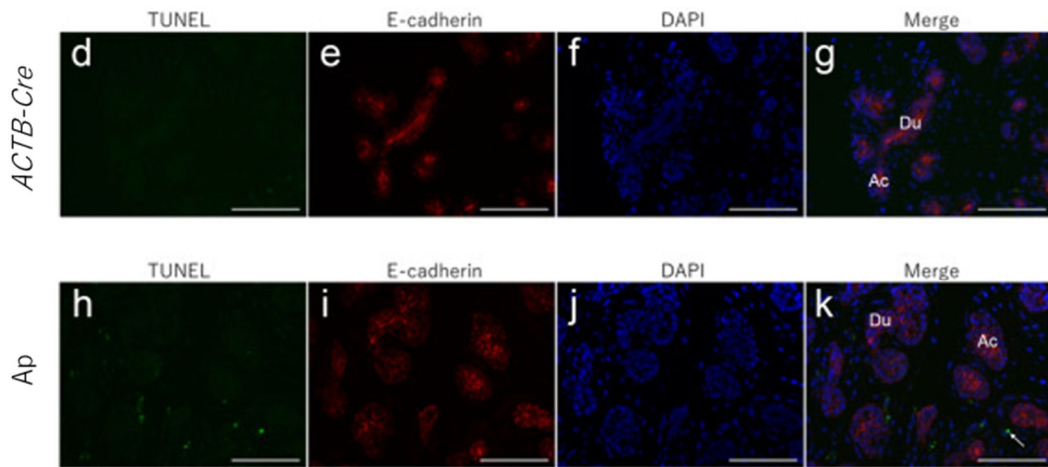


図6 E15.5 顎下腺のTUNEL染色 (スケール 50 μ m)

【引用文献】

- 1) Yu K, et al. Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 97(26):14536–41, 2000.
- 2) LinChen, et al. A Ser250Trp substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis. *Bone* 33(2):169–78, 2003.
- 3) Yin L, et al. A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *Bone* 42(4):631–43, 2008.
- 4) Morita J, et al. Soluble form of FGFR2 with S252W partially prevents craniosynostosis of the apert mouse model. *Dev Dyn*. 243(4): 560-7, 2014.
- 5) Holmes G, et al. Mesodermal expression of Fgfr2S252W is necessary and sufficient to induce craniosynostosis in a mouse model os Apert syndrome. *Dev Biol*. 368(2): 283-93, 2012.
- 6) Yamamoto S, et al. Platelet-derived growth factor receptor regulates salivary gland morphogenesis via fibroblast growth factor expression. *J Biol Chem*. 283(34):23139-49, 2008.
- 7) Steinberg Z, et al. FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development*. 132(6):1223-34, 2005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Watanabe Tsukasa, Kometani-Gunjigake Kaori, Nakao-Kuroishi Kayoko, Ito-Sago Misa, Mizuhara Masahiro, Iwata Daiki, Moriyama Keiji, Ono Kentaro, Kawamoto Tatsuo	4. 巻 63
2. 論文標題 A Ser252Trp substitution in mouse FGFR2 results in hyperplasia of embryonic salivary gland parenchyma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 184 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2021.02.008	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊 司、山地 晃二郎、郡司掛 香織、黒石 加代子、志賀 百年、川元 龍夫
2. 発表標題 Apert症候群モデルマウスの胎生期における顎下腺の形態解析
3. 学会等名 第79回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 渡邊 司、山地 晃二郎、郡司掛 香織、黒石 加代子、左合 美紗、志賀 百年、川元 龍夫
2. 発表標題 胎生期におけるApert症候群モデルマウスの顎下腺の形態解析
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 岩田大季、渡邊司、郡司掛香織、黒石加代子、水原正博、中富満城、小野堅太郎、川元龍夫
2. 発表標題 Apert症候群モデルマウスにおける顎下腺発生初期の形態解析
3. 学会等名 第80回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 岩田大季、渡邊司、郡司掛香織、黒石加代子、水原正博、中富満城、 小野堅太郎、川元龍夫
2. 発表標題 Apert症候群モデルマウスにおける胎生期顎下腺の形態解析
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 岩田大季、渡邊司、郡司掛香織、黒石加代子、水原正博、中富満城、 小野堅太郎、川元龍夫
2. 発表標題 Apert症候群モデルマウスを用いた胎生期顎下腺の形態解析
3. 学会等名 第17回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 岩田大季、郡司掛香織、黒石加代子、水原正博、中富満城、 小野堅太郎、川元龍夫
2. 発表標題 Apert症候群モデルマウスを用いた顎下腺の形態解析
3. 学会等名 第81回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年～2023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
研究 分担者	志賀 百年 (Shiga Momotoshi) (20596134)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (27102)	削除：2019年8月23日

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	郡司掛 香織 (Gunjigake Kaori) (90448811)	九州歯科大学・歯学部・助教 (27102)	
研究 分 担 者	黒石 加代子（中尾加代子） (Kuroishi Kayoko) (60468303)	九州歯科大学・歯学部・助教 (27102)	
研究 分 担 者	左合 美紗 (Sago Misa) (40815825)	九州歯科大学・歯学部・特別研究員 (27102)	

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