

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10400

研究課題名(和文) エキソソームデリバリー-siRNAを用いた頭蓋骨縫合癒合症の治療法開発基盤構築

研究課題名(英文) Development of a therapeutic platform for the treatment of craniosynostosis using exosome-delivered siRNA.

研究代表者

小林 起穂 (KOBAYASHI, YUKIHO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20596233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Ex-siRNAFgfr2S252Wの構築はエキソソーム単離キットを用いてマウス血清からエキソソームを単離精製し、マウスFgfr2点変異特異的siRNAをsRNA-into-Exome kitを用いてエキソソーム内に導入した。胎生期野生型マウスおよびcraniosynostosisを発症するApert症候群モデルマウス頭蓋冠縫合部を発生段階毎に摘出し、組織より骨芽細胞を分離培養した。Ex-siRNAFgfr2S252Wの投与を行い、Apert疾患モデルマウス頭蓋冠縫合部にて発生時期特異的に有為な発現上昇および低下を示すmRNAおよびMAPK経路因子リン酸化について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られる結果は、広く先天性疾患を対象としたsiRNA創薬の発展へと波及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To construct Ex-siRNAFgfr2S252W, exosomes were isolated and purified from mouse serum using an exosome isolation kit, and siRNA specific for the mouse Fgfr2 point mutation was introduced into the exosomes using the sRNA-into-Exome kit. The craniofacial sutures of embryonic wild-type mice and Apert syndrome model mice developing craniosynostosis were harvested at each developmental stage, and osteoblasts were isolated from the tissues and cultured. The mRNA and MAPK pathway factor phosphorylation that were specifically up-regulated and down-regulated in the cranial coronal sutures of Apert disease model mice were analyzed.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：頭蓋縫合部早期癒合症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内のあらゆる細胞が分泌し血中を循環するナノ分泌顆粒をエクソソームと呼ぶ。癌をはじめとする様々な疾患のバイオマーカーとして注目を集める一方、生体に備わった分子輸送機構であり、新規ドラッグデリバリーシステム (DDS) の候補とされている。様々な核酸医薬のなかでも、低分子干渉 RNA (siRNA) は標的配列に高い特異性を示すが、生体内での安定性が低く創薬研究が進まなかったが、2018年に世界初の PEG リポソーム輸送型 siRNA 医薬品が米国 FDA で承認された。一方、頭蓋骨縫合癒合症を主徴とするアペール症候群は、FGFR2 の機能獲得型点突然変異によるアミノ酸置換により発症する。本研究は、アペール症候群モデルマウス点変異特異的 siRNA をエクソソームにより輸送し、マウス頭蓋顎顔面縫合発生に対する影響を *in vitro* および *in vivo* にて解析することを目的とした。得られる結果は、広く先天性疾患を対象とした siRNA 創薬の発展へと波及することが期待される。

2. 研究の目的

研究期間内の目標を以下の4項目とした。

siRNAのエクソソームへの内包 (Ex-siRNA^{Fgfr2S252W})

*In vitro*細胞培養系におけるEx-siRNA^{Fgfr2S252W}の機能解析

*In vitro*マウス頭蓋骨器官培養系におけるEx-siRNA^{Fgfr2S252W}の機能解析

*In vivo*マウス胎児発生におけるEx-siRNA^{Fgfr2S252W}の応用展開

3. 研究の方法

Ex-siRNA^{Fgfr2S252W} の構築は、まず PureExo エクソソーム単離キットを用いてマウス血清からエクソソームを単離精製し、マウス Fgfr2 エクソン7 に存在する点変異特異的 siRNA を ExoFect in siRNA-into-Exome kit (Electro)を用いてエクソソーム内に導入する。胎生期 (E15.5 ~ E18.5) 野生型マウスおよび当分野で飼育中の craniosynostosis を発症する Apert 症候群モデルマウス頭蓋冠縫合部を発生段階毎に摘出し、組織より骨芽細胞を分離培養する。Ex-siRNA^{Fgfr2S252W} の投与を行い、Apert 疾患モデルマウス頭蓋冠縫合部にて発生時期特異的に有為な発現上昇および低下を示す mRNA および MAPK 経路因子リン酸化について解析する。また、冠状縫合の器官培養系に Ex-siRNA^{Fgfr2S252W} を添加、whole mount *in situ* hybridization および IHC にて解析する。また、細胞増殖、分化、細胞死の観点から解析を行う。最終的には妊娠アペールマウスに Ex-siRNA^{Fgfr2S252W} を尾静脈投与し、胎児への移行の確認後、胎児頭蓋骨発生、形態形成の解析を行う。

4. 研究成果

現在までに、野生型マウス siRNA のエクソソームの単離を行い、単離効率の最適化を行った。また、エクソソーム単離の確認のため、エクソソーム特異的バイオマーカーの発現をウェスタンブロット法にて確認した。また、蛍光色素で標識した siRNA^{Fgfr2S252W} をエクソソームに内包させ、培養細胞に作用させると、細胞質内に取り込まれることを蛍光顕微鏡にて確認できた。In vitro 細胞培養系における Ex-siRNA^{Fgfr2S252W} の機能解析を目的として、培養細胞に導入したところ、骨芽細胞分化マーカーである *Runx2* mRNA の発現低下と Erk1/2 のリン酸化の低下をそれぞれ RT-qPCR 法、Western blot 法にて確認した。

1. Ogura K, Kobayashi Y, Hikita R, Tsuji M, Moriyama K. Three-dimensional analysis of the palatal morphology in growing patients with Apert syndrome and Crouzon syndrome. *Congenit Anom* (Kyoto). 2022.
2. Niki Y, Kobayashi Y, Moriyama K. Expression pattern of transcriptional enhanced associate domain family member 1 (Tea1) in developing mouse molar tooth. *Gene Expr Patterns*. 2021;40:119182.

3. Miyazaki T, Kurimoto R, Chiba T, Matsushima T, Nakamichi R, Tsutsumi H, et al. Mxk regulates the orthodontic tooth movement via osteoclast induction. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(5):780-6.
4. Min Swe NM, Kobayashi Y, Kamimoto H, Moriyama K. Aberrantly activated Wnt/ -catenin pathway co-receptors LRP5 and LRP6 regulate osteoblast differentiation in the developing coronal sutures of an Apert syndrome (Fgfr2(S252W) (/+)) mouse model. *Dev Dyn.* 2021;250(3):465-76.
5. Kobayashi Y, Ogura K, Hikita R, Tsuji M, Moriyama K. Craniofacial, oral, and cervical morphological characteristics in Japanese patients with Apert syndrome or Crouzon syndrome. *Eur J Orthod.* 2021;43(1):36-44.
6. Kamimoto H, Kobayashi Y, Moriyama K. Relaxin 2 carried by magnetically directed liposomes accelerates rat midpalatal suture expansion and subsequent new bone formation. *Bone Rep.* 2019;10:100202.

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 0件）

1. 著者名 Nay Myo Min Swe, Yukiho Kobayashi, Hiroyuki Kamimoto, Keiji Moriyama.	4. 巻 250
2. 論文標題 Aberrantly activated Wnt/ -catenin pathway co-receptors LRP5 and LRP6 regulate osteoblast differentiation in the developing coronal sutures of an Apert syndrome (Fgfr2 S252W /+) mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dev Dyn .	6. 最初と最後の頁 pub 2020 Sep 9.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.239.	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 -

1. 著者名 Kobayashi Y, Ogura K, Hikita R, Tsuji M, Moriyama K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Craniofacial, oral, and cervical morphological characteristics in Japanese patients with Apert syndrome or Crouzon syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Orthod.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ejo/cjaa015.	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kobayashi Y, Min Swe Nay Myo, Kamimoto H, Moriyama K
2. 発表標題 Apert症候群モデルマウスの頭蓋縫合早期癒合症におけるWnt/ -cateninシグナル伝達機構の解析
3. 学会等名 第60回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kobayashi Y, Min Swe Nay Myo, Kamimoto H, Moriyama K
2. 発表標題 Aberrant Wnt/ -catenin Signaling in Coronal Sutures of Apert Mouse Model
3. 学会等名 "The 9th Internarional Orthodontic Congress The 12th Asian Pacific Orthodontic Conference The 79th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society" (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Min Swe Nay Myo, Kobayashi Yukiho, Kamimoto Hiroyuki, Moriyama Keiji
2. 発表標題 Aberrant Wnt/ -catenin Signaling in Coronal Sutures of Apert Mouse Model
3. 学会等名 2020 IADR/AADR/CADR General Session (Washington, D.C., USA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 紙本裕幸、小林起穂、森山啓司
2. 発表標題 磁性制御型リボソームにより標的指向化されたリラキシンはラット正中蓋縫合拡大と骨形成を促進する
3. 学会等名 第84回口腔病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minswe NM, Kobayashi Y, Kamimoto H, Moriyama K
2. 発表標題 "Aberrant activation of Wnt/ -catenin signaling in the coronal sutures of an Apert syndrome mouse model"
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

1. 発表者名 "トリーチャー・コリンズ症候群患者の下顎骨における antegonial notchの形態に関する検討 "
2. 発表標題 井上貴裕、庄司あゆみ、小倉健司、狩野桜子、佐川夕季、小林起穂、辻美千子、松本力、森山啓司
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

1. 発表者名 仁木佑紀、小林起穂、森山啓司
2. 発表標題 "Hippo-Yap/Tazシグナル関連転写因子TEA domain family member 1 (Tead1)のマウス歯胚発生における発現解析"
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

1. 発表者名 Tsuji M, Shoji A, Hirabayashi K, Kobayashi Y, Moriyama K
2. 発表標題 Analysis of dentocraniofacial morphology in patients with achondroplasia
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会・The 13th World Congress of International Cleft Lip and Palate oundation CLEFT 2019 ICPF合同学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2019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

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