

平成23年5月17日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790730

研究課題名 (和文)

変異FGFR3と頭蓋形成異常の分子病態の解明：副甲状腺ホルモンの作用を中心として

研究課題名 (英文) Molecular mechanism of genetic mutation of fibroblast growth factor receptor type 3 (FGFR3) gene in abnormalities of cranial formation: Relation to the action of Parathyroid hormone

研究代表者

長谷川 高誠 (HASEGAWA KOUSEI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90467738

研究成果の概要 (和文)：

FGFR3 関連疾患の頭蓋骨早期癒合症の臨床像を得る目的で日本国内の FGFR3 関連疾患疑いの遺伝子診断を 42 検体行い、FGFR3 遺伝子変異を 21 例に認めた。軟骨無形成症 (G380R 12 例)、軟骨低形成症 (N540K 4 例、S84L1 例)、致死性骨異形成症 I 型 (R248C 1 例、Y373C 2 例)、致死性骨異形成症 II 型 (K650E 1 例)。これらにつき、頭蓋骨の早期癒合症の有無について検討したところ、調査時はいずれの症例も頭蓋骨早期癒合症は認めなかった。

研究成果の概要 (英文)：

To obtain the clinical information of abnormalities of cranial formation like craniosynostosis in FGFR3 related disorders, we conducted the genetic analysis of 42 patients who suspected of FGFR3 related disorders and we found genetic mutation in FGFR3 gene in 21 patients; achondroplasia (G380R:12), Hypochondroplasia (N540K:4, S84L:1), Thanatophoric dysplasia type I (R248C:1, Y373C:2), Thanatophoric dysplasia type II (K650E). In these 21 patients, craniosynostosis was not observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：線維芽細胞増殖因子受容体 3 型、軟骨異栄養症、副甲状腺ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨無形成症は繊維芽細胞増殖因子受容体3型 (FGFR3) の変異によって起こる、近位部優位な四肢短縮型低身長をきたす代表的な骨系統疾患である。現在、軟骨無形成症の著明な低身長に対する治療には成長ホルモンの投与が行なわれているが、その効果は日常生活を支障なく送ることができるほどにまで患児の低身長を改善させる物ではなく、決して効果として満足できる物ではない。そのため我々は新規の治療法を模索する中で副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) が軟骨無形成症では減少しており、軟骨無形成症を発症する変異 (G380R) FGFR3 を導入することで増加した軟骨細胞様細胞 ATDC5 のアポトーシスを PTHrP の投与により抑制したこと (Yamanaka et. al. J Bone Miner Res 18 (2003) :1395-403)、PTHrP と副甲状腺ホルモン (PTH) が同じ受容体を共有することに着目し、PTH の軟骨無形成症の治療薬としての可能性を検討してきた。その結果、*in vitro* の実験系 (Ueda et. al. Bone 41 (2007) 13-18) および、予備実験として行った *in vivo* での軟骨無形成症モデルマウスへの PTH の皮下投与実験で PTH は軟骨無形成症モデルマウスの四肢短縮を改善させる可能性があるという結果を得た。しかし小児においては PTH の外的投与は腫瘍原性の問題から禁忌とされており、我々はこの問題を回避するために内因性の PTH を増加させる目的でカルシウム感知受容体アンタゴニスト (CaSRAN) 投与による治療や PTH-Fc 融合蛋白で PTH の血中半減期を長くすること (Kostenuik et. al J Bone Miner Res 22 2007; 1534-47)

によって頻回の注射を回避することを今後の治療展開に考えているが、血中の PTH 濃度を上昇させることによる治療には様々な問題が残されている。その一つとしてあげられるのは、軟骨無形成症は頭蓋底の低形成を合併し、しばしば大後頭孔の狭窄が認められ神経症状へと結びつくことである。血中 PTH 濃度の上昇により頭蓋底の低形成に起因する大後頭孔狭窄が改善するか、悪化するかについては依然不明である。

また、軟骨形成症の原因遺伝子である FGFR3 の変異により Tanatophoric dysplasia type II、Craniosynostosis Muenke type、Craniosynostosis (Crouzon-like) with acantosis nigricans など頭蓋骨の早期癒合癒合を来す疾患が生じる一方で軟骨無形成症や軟骨低形成症、Tanatophoric dysplasia type I では頭蓋骨の早期癒合をきたさないように FGFR3 変異で起きる疾患全てにおいて頭蓋骨早期癒合を生じるわけではない。

現在の所、顔面形成、頭蓋骨癒合においては FGFR1、FGFR2 の役割が重要であると考えられており、シグナル経路が明確にされつつあるが、FGFR3 の膜性骨化、頭蓋骨癒合への影響やそのシグナリング経路、および特定の FGFR3 変異のみ頭蓋骨早期癒合をきたす機序については不明な点が多く、血中 PTH 濃度の上昇で未知のシグナル経路の活性化から頭蓋骨の癒合の早期癒合などが起きる危険性なども危惧される。

## 2. 研究の目的

今後、我々が軟骨無形成症患児の低身長治療への臨床応用を目指している CaSRAN 投

与やPTH-Fc融合蛋白で血中PTH濃度を上昇させることによる軟骨無形成症児の低身長治療における問題の1つとなると考えられる、PTHの頭蓋底の低形成(大後頭孔の狭窄)への影響、頭蓋骨の骨縫合への影響といった軟骨無形成症の頭蓋骨形成に対する影響について軟骨無形成症モデルマウスを用いて本研究で明確にする。

さらに現段階では明らかになっていない頭蓋骨縫合におけるFGFR3シグナリング経路や頭蓋骨縫合におけるFGFR1,2シグナリングとのオーバーラップ、またFGFR3の限られた変異にのみ頭蓋骨早期癒合が起きる機序を細胞実験にて明確にする。

### 3. 研究の方法

in vivoでの軟骨無形成症モデルマウスに対するPTH投与による頭蓋骨の縫合への影響を確認するためにex vivoのゲルベッドを使った3次元器官培養系(図3:Gong et. al Cell 2001 Nov 107(16), 513-523)にて野生型及び、軟骨無形成症モデルマウスの新生仔頭蓋冠の培養をPTHの存在、非存在下の培養液中で非存在下にて行い、縫合の形成について $\mu$ CTによる解析、組織学的な検討、遺伝子発現についての検討を行い、20年度の研究成果との比較検討を行いPTHの頭蓋骨縫合への影響の有無を確認する。

野生型及び頭蓋骨早期癒合をきたす変異型FGFR3、軟骨無形成症をはじめ頭蓋骨早期癒合をきたさない変異型FGFRそれぞれの発言ベクターをリポフェクションにより遺伝子導入したマウス間葉系細胞株C3H10T1/2のFGFR3シグナリングについて検討を行い、頭蓋骨早期癒合をきたす場合ときたさない場合のシグナリングの違いについて、頭蓋骨の縫合に関与

の深いと考えられているFGFR1,2の下流に存在するMAPK系やPKC系などの解析をH20年、21年度の遺伝子、蛋白発現の結果をふまえて行う予定である。

H20年度及びH21年度にてPTHの投与が頭蓋骨の縫合に対して早期癒合などの影響をあたえることが観察された場合は、軟骨無形成症をきたす変異型FGFR3(G380R)を同様に導入し、PTHの投与の有無および濃度の変化による下流シグナリングの変化について検討し、PTHのFGFR3シグナリングへの影響について検討を加える

H20年度及びH21年度にてPTH投与の縫合及び頭蓋骨の形成に対する影響が認められなかった場合は実際にCaSRANの軟骨無形成症モデルマウスへの投与を行う予定である。

その方法として短期投与での血中PTH濃度を始め血中、尿中カルシウム、リン濃度や尿中cAMP濃度のモニタリングや臨床症状の観察を行い、至適投与法、投与量及び投与回数検討、長期投与による四肢短縮の改善効果や頭尾長の変化、神経症状の有無の観察、経時的な血中、尿中カルシウム濃度、血中PTH濃度、cAMP濃度、骨代謝マーカーの変動、レントゲンによる骨腫瘍の発生の有無の観察、骨密度の検討を行う。

### 4. 研究成果

in vitroでのPTHの四肢の伸長効果を確認する目的で、生後1週から3週まで2日に1回2週間の0.1および1 $\mu$ g/KgのPTHもしくは生理食塩水を野生型マウスおよびAchTgへの投与を行い、0.1 $\mu$ g/KgのPTHの投与において有意にAchTgの大腿骨の伸長効果を認めた。

このことから次に長期的な投与として PTH の  $0.1 \mu\text{g}/\text{Kg}$  で 4 週間の投与を行い、この実験においても PTH を投与した AchTg の大腿骨において有意な伸長効果を得ることができた。

この段階で PTH 投与群での頭蓋骨の明らかな早期癒合は確認できなかった。しかしながら 4 週間という短期間での投与であり、さらに長期の投与が必要であると考えられる。

人間における FGFR3 遺伝子異常の表現型である軟骨異栄養症において診断時における頭蓋骨早期癒合の有無を調査する意味合いで、FGFR3 遺伝子異常を認めた 21 名(軟骨無形成症(G380R 12 例)、軟骨低形成症(N540K 4 例、S84L1 例)、致死性骨異形成症 I 型(R248C 1 例、Y373C 2 例)、致死性骨異形成症 II 型(K650E 1 例))につき臨床上昇を収集したが、診断時には明らかな頭蓋骨早期癒合症は認めなかった。

今後は 4 週以上の長期投与時においてマウスの頭蓋骨早期癒合を含めた、頭蓋骨の形成異常が認められるか、また頭蓋骨の形成異常が認められた場合には実験計画において記載した実験を行っていきたい。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 高誠 (HASEGAWA KOUSEI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90467738