

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03894

研究課題名(和文) FGF23産生機序とリン代謝異常を基軸とする顎骨線維性骨異形成症の包括的病態理解

研究課題名(英文) Comprehensive understanding of fibrous dysplasia of the jaw based on the mechanism of FGF23 production and abnormal phosphorus metabolism.

研究代表者

山口 朗 (Yamaguchi, Akira)

東京歯科大学・歯学部・客員教授

研究者番号：00142430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では線維性異形成症(FD)におけるFGF23産生へのNotchシグナルの関与を明らかにすることを目的として研究を推進し、以下の結果を得た。1)FD症例でNotch1, Hey1, FGF23の発現が免疫組織学的に確認できた、2)FD症例でGNAS遺伝子変異が確認できた、3)FD患者の血清FGF23は増加していた、3)UMR106細胞、IDG-SW3骨細胞用細胞株でNotchシグナルはFGF23産生を促進し、その過程でHif2が重要な役割を担っていることが示唆された。これらの結果より、FDにおけるFGF23産生にNotchシグナルが関与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

申請者は骨芽細胞で特異的にNotch核内分子を過剰発現するトランスジェニックマウスの骨細胞、骨芽細胞はFGF23を過剰産生し、骨軟化症を惹起することを世界で初めて報告した(BBRC 518:233-238,2019)。線維性骨異形成症(FD)ではFGF23が過剰産生するが、そのメカニズムは明らかにされていなかったが、本研究ではFDにおけるFGF23産生にNotchシグナルが関与していることを示し、この結果はFDの病態解明に貢献する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the involvement of Notch signaling in FGF23 production in fibrodysplasia (FD) and obtained the following results: 1) Notch1, Hey1, and FGF23 expression was immunohistochemically confirmed in FD cases, 2) GNAS gene mutation was confirmed in FD cases, 3) serum FGF23 was increased in FD patients, and 3) Notch signaling promoted FGF23 production in UMR106 cells and IDG-SW3 osteocytic cell line. 3) Serum FGF23 was increased in FD patients, and 3) Notch signaling promotes FGF23 production in UMR106 cells and IDG-SW3 cell line for bone cells, suggesting that Hif2 plays an important role in this process. These results suggested that Notch signaling is involved in FGF23 production in FD.

研究分野：口腔病理学

キーワード：線維性骨異形成症 FGF23 Notch

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

線維性骨異形成症(FD)は FGF23 作用過剰疾患の一つで、低リン血症、骨軟化症を惹起するため、FD における FGF23 の動態が注目されている。頭蓋顎顔面骨は大腿骨と並ぶ FD の好発部位であるが、顎骨 FD での FGF23 産生に関する解析は極めて少ない。そのため、研究代表者は顎骨に発症する FD の病態を包括的に理解するには、FGF23 産生と血清リン値の相関を詳細に解析する必要性を痛感していた。

研究代表者は、長年、骨代謝及び口腔癌の骨破壊における Notch シグナルの役割を解析してきた。Notch は膜貫通型の受容体で、組織形成や細胞の分化決定などで重要な役割を担っている。Notch シグナルは Notch リガンド (Jagged, Delta など) が隣接細胞の細胞膜に存在する Notch に結合することにより伝達される。その後、-secretase により Notch の細胞内ドメイン (Notch intracellular domain: NICD) が切り離されて、細胞質から核内へと移動し、転写因子である RBPJ- などと複合体を形成して *Hes1*, *Hey1* などの標的遺伝子の発現を調節する。

研究代表者らは骨形成における Notch の役割を解析するために骨芽細胞で NICD を過剰発現する *NICD* transgenic mice (Col1 *NICD* Tg mice) を作出し、その表現型を解析する過程で、このマウスの骨細胞は FGF23 を過剰発現し、骨軟化症を呈していることを発見した (BBRC 518:233-238, 2019)。我々はこの論文で世界に先駆けて Notch シグナルが骨細胞の FGF23 発現を制御することを報告し、未だ十分に解明されていない FGF23 の制御機構の理解に一石を投じるものとして注目されている。

2. 研究の目的

我々が発見した Notch シグナルによる骨細胞/骨芽細胞の FGF23 発現制御機構のメカニズム解析をさらに推進し、顎骨 FD における Notch シグナルによる FGF23 産生とリン代謝の関連を明らかにして、顎骨 FD の病態を包括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた Notch シグナルによる FGF23 の発現制御機構の解析

UMR106 細胞 (骨芽細胞様細胞) IDG-SW3 細胞 (骨細胞様細胞株) を用いて、Notch リガンドである Jag1 をコートした培養ディッシュ上で両細胞を培養し、Notch シグナルの活性化と FGF23 発現の関連を解析した。

レトロウイルスベクターを用いて UMR106 細胞に NICD, Notch extracellular domain (NECD), dominant negative RBPJ- (dnRBPJ-), RBPJVP16 (R218H 変異を組み込んだ RBPJ-) を導入し、FGF23、Notch 関連分子の発現を解析した。

頭蓋冠または長管骨から純化骨細胞培養系を分離し、Notch シグナルによる FGF23 の制御機構を解析した。

鉄欠乏状態は GSI 発現を上昇させ、hypoxia-inducible factor (Hif) を介して FGF23 発現を上昇させることが報告されている。そのため、主に UMR106 細胞を用いて、鉄キレート剤 (DFO) 添加による FGF23 発現の上昇を確認し、その過程における Hif1 と Hif2 の各 shRNA を用いて FGF23 発現に及ぼす影響を解析して Hif1 と Hif2 の役割を解析した。

FD 型 *GNAS1* 変異遺伝子 (R201H 及び R201C) cDNA を未分化間葉系細胞である C3H10T1/2 細胞、骨髄間質細胞由来である ST2 細胞、骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞にレンチウイルスベクターを用いて導入し、細胞株の樹立を試みた。

(2) In vivo 実験

既に作出した Col1 *NICD* Tg mice マウスの骨密度、血清 FGF23 値、リン値を測定する。

GNAS 変異遺伝子 (R201H) を導入した Flox マウスと *Dmp1-cre* マウスを交配し、骨細胞/骨芽細胞に変異 *GNAS* 遺伝子を発現するモデルマウスの作出と解析。

(3) ヒト顎骨 FD 症例の解析

検体の病理組織学的解析。

病理検体の免疫組織学的解析 (FGF23, Notch, Hey1 など)。

FD 患者より血清サンプルを採取し、これらの血清を用いて FGF23 とリンを測定する。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた Notch シグナルによる FGF23 の発現制御機構の解析結果

UMR-106 細胞及び IDG-SW3 細胞を Notch リガンドである Jag1 をコートした培養ディッシュで培養すると FGF23 の発現が上昇した。

NICD を UMR-106 細胞で過剰発現する *Hey1*, *Hes1* 及び *FGF23* の発現が上昇した。また、同細胞に NECD を導入すると Jag1 が誘導した FGF23 発現は抑制された。さらに、タモキシフェン誘導型 CreER システムで NICD を過剰発現することにより、UMR-106 細胞及び IDG-SW3 細胞で FGF23 の発現が上昇した。

UMR-106 細胞に dnRBPJ- を導入すると、*Hes1* 及び *FGF23* の発現が減少した。また、RBPJVP16 を導入すると *Hes1*, *Hey1* 及び *FGF23* の発現が上昇した。

頭蓋冠及び長管骨から採取した純化骨細胞培養系では、Jag1 コートディッシュで培養しても *FGF23* の発現上昇は確認できなかった。これは、採取した培養細胞の骨細胞系細胞が少なかったことに起因すると考えられた。

UMR-106 細胞を DF0 で処理すると *FGF23* 発現が上昇した。DF0 処理で UMR-106 細胞の Hif1 と Hif2 タンパク質の発現上昇が確認できたので、同細胞に shHif1 または shHif2 を導入すると shHif2 は DF0 または Jag1 で誘導された *FGF23* 発現を抑制したが、shHif1 では抑制作用が確認できなかった。そのため、Notch シグナルが誘導する *FGF23* の発現上昇では、Hif2 が重要な役割を担っていることが示唆された。

3H10T1/2 細胞、ST2 細胞及び MC3T3-E1 細胞から FD 型 *GNAS1* 変異遺伝子 (R201H 及び R201C) を過剰発現する細胞株の樹立に成功した。現在、これらの細胞の性状を解析中。

(2) In vivo 実験

Col1 *NICD* Tg mice ではコントロールマウスに比べて骨幹部、骨端部で骨密度が減少し、骨軟化症の病態になっていることを確認した。また、同マウスでは血清 *FGF23* が増加し、リン値の低下が確認できた。

研究分担者の豊澤らが作出した骨細胞 / 骨芽細胞に変異 *GNAS* 遺伝子が発現するマウスでは骨幹端部に異常に骨量が増加していることが確認できた。また、これらの骨異常部では *FGF23*, Notch, *Hey1* が発現している細胞が確認できたが、同一細胞で共発現しているか現在解析中。

(3) ヒト顎骨 FD 症例の解析

5症例のFDで血清*FGF23*値が上昇していることを確認できたが、全ての症例で血清リン値は正常値範囲であった。これは、大腿骨などのFDに比べて、顎骨のFDは病変が小さくて*FGF23*産生量は少ないために、低リン血症が確認できなかったと考察している。

3症例で*GNAS*遺伝子のミスセンス変異 (R201CまたはR201H) を確認した。

FD症の脱灰パラフィン切片で、*FGF23*, Notch1, *Hes1*, *Hey1*の免疫染色を酵素抗体法で行った。その結果、FDの多くの細胞でこれらの抗体に陽性の細胞が確認できた。現在、蛍光抗体法でさらに詳細な解析を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ito Shinichirou, Kasahara Norio, Kitamura Kei, Matsunaga Satoru, Mizoguchi Toshihide, Htun Myo Win, Shibata Yasuaki, Abe Shinichi, Takano Masayuki, Yamaguchi Akira	4. 巻 16
2. 論文標題 Pathological differences in the bone healing processes between tooth extraction socket and femoral fracture	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Reports	6. 最初と最後の頁 101522 ~ 101522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2022.101522	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 Mitomo Keisuke, Yamaguchi Akira, Muramatsu Takashi	4. 巻 135
2. 論文標題 Hypoplasia of medial pterygoid process in sphenoid bone relates to decreased mesenchymal cell proliferation in the Runx2-haploinsufficient cleidocranial dysplasia mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105358 ~ 105358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2022.105358	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 Aoki Kazumitsu, Matsunaga Satoru, Ito Shinichirou, Shibahara Takahiko, Nomura Takeshi, Matsuzaki Hideo, Abe Shinichi, Yamaguchi Akira	4. 巻 39
2. 論文標題 Persistent bone resorption lacunae on necrotic bone distinguish bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw from denosumab-related osteonecrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 737 ~ 747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01223-4	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 Sato M, Aoki H, Nakamura T, Onodera S, Yamaguchi A, Saito A, Azuma T	4. 巻 55
2. 論文標題 The effects of parathyroid hormone on osteoblastic differentiation of mouse induced pluripotent stem cells in a 3-D culture model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Period Res	6. 最初と最後の頁 734-743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12762.	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 202. Nakamura T, Nakamura-Takahashi A, Kasahark M, Komori T, Yamaguchi A, Azuma T	4. 巻 524
2. 論文標題 Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 702-709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.136.	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 Nakamura-Takahashi A, Tanase T, Matsunaga S, Shintani S, Abe S, Watanabe A, Hirai Y, Okada T, Yamaguchi A, Kasahara M	4. 巻 106
2. 論文標題 High-level expression of alkaline phosphatase by adeno-associated virus vector ameliorates pathological bone structure in a hypophosphatasia model mouse.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Calif Tissue Int	6. 最初と最後の頁 665-677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-020-00676-5.	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 Onodera S, Saito A, Hojo H, Nakamura T, Zujur D, Watanabe K, Morita N, Hasegawa D, Masaki H, Nakauchi H, Nomura T, Shibahara T, Yamaguchi A, Chung U, Azuma T, Ohba S	4. 巻 15
2. 論文標題 Hedgehog activation governs osteoblast mineralization.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Rep	6. 最初と最後の頁 129-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.05.008.	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 Sato M, Aoki H, Nakamura T, Onodera S, Yamaguchi A, Saito A, Azuma T	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) on osteoblastic differentiation and mineralization of mouse induced pluripotent stem cells in a 3D culture model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Periodontal Res	6. 最初と最後の頁 734-743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12762. Epub 2020 Jun 25.	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 Aoki K, Matsunaga S, Ito S, Shibahara T, Nomura T, Matsuzaki H, Abe S, Yamaguchi A	4. 巻 39
2. 論文標題 Persistent bone resorption lacunae on necrotic bone distinguish bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw from denosumab-related osteonecrosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab	6. 最初と最後の頁 737-747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01223-4.	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 Mitomo K, Yamaguchi A, Muramatsu T	4. 巻 135
2. 論文標題 Hypoplasia of medial pterygoid process in sphenoid bone relates to decreased mesenchymal cell proliferation in the Runx2-haploinsufficient cleidocranial dysplasia mouse model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol	6. 最初と最後の頁 105358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2022.105358.	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 Ito S, Kasahara N, Kitamura K, Matsunaga S, Mizoguchi T, Htun MW, Shibata Y, Abe S, Takano M, Yamaguchi A	4. 巻 16
2. 論文標題 Pathological differences in the bone healing processes between tooth extraction socket and femoral fracture.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Rep.	6. 最初と最後の頁 101522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2022.101522.	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0件

〔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	東 俊文 (Azuma Toshifumi) (00222612)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	

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	片倉 朗 (Katakura Akira) (10233743)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	
研究分担者	森田 圭一 (Morita Keiichi) (10396971)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	
研究分担者	豊澤 悟 (Toyosawa Satoru) (30243249)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	鶴澤 成一 (Uzawa Narikazu) (30345285)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	小高 研人 (Odaka Kento) (30801469)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	
研究分担者	高野 正行 (Takano Masayuki) (50197117)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	
研究分担者	玉村 禎宏 (Tamamura Yoshihiro) (70431963)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教 (16101)	
研究分担者	明石 良彦 (Akashi Yoshihiko) (70875690)	東京歯科大学・歯学部・助教 (32650)	

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	中村 貴 (Nakamura Takashi) (80431948)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	
研究分担者	坂本 啓 (Sakamoto Kei) (00302886)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	

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