

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：11301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22659363
 研究課題名（和文）FGFR2 関連頭蓋骨縫合早期癒合症の疾患モデルの開発と内科的治療に向けての検討
 研究課題名（英文）Development of study model and medical treatment procedure for the FGFR2-related craniosynostosis syndromes
 研究代表者
 森 士朗（MORI SHIRO）
 東北大学・病院・講師
 研究者番号：80230069

研究成果の概要（和文）：FGFR2 関連頭蓋骨縫合早期癒合症の疾患モデルを樹立し、FGFR2 を標的とした治療実験を行い、本疾患の内科的治療に向けて検討を行うことを目的とする。本研究において、FGFR2 の遺伝子座に骨・軟骨形成異常の疾患感受性遺伝子を有するマウスを見出し、近交系として系統樹立した。また、この疾患モデルマウスとナノバブルと超音波を用いた分子導入法を用いることにより、FGFR2 の Ig-Fc 融合タンパクの投与による治療実験を行うことが可能となった。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study is to develop a study model and medical treatment procedure for the FGFR2-related craniosynostosis syndromes. In the present study, a new recombinant congenic strain of mice, which is a model for the dysplasia of bone and cartilage, was successfully established, and the onset of the disease in the mice was significantly associated with the genetic locus of FGFR2. By using the animal model and gene delivery system to the tissue around bone using nanobubbles and ultrasound, it became to be possible to perform an experimental molecular therapy using the Ig-Fc fusion protein of FGFR2 against the study model for the FGFR-related dysplasia of bone and cartilage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：FGFR2、疾患モデル、関節強直症、ナノバブル、超音波、分子導入

1. 研究開始当初の背景

本研究は以下の学術的背景に基づいて企画された。

(1) FGFR2 関連の頭蓋骨縫合早期癒合症として、Crouzon 症候群、Jackson-Weiss 症候群、Apert 症候群等が知られており、冠状

縫合癒合、特徴的な顔貌、骨性合指症、足根骨の異常等の症状を呈する。口腔外科領域においては、顎変形症や咬合異常のため外科的矯正の対象疾患となっているが、これらの病変の発症メカニズムが解明されていないことから、有効な内科的治療法は確立しておら

ず、患者の成長過程において、頻回の大掛かりな外科的治療を要し、患者本人はもとより、患者家族にも筆舌に尽くし難い多大な負担を強い難治性先天性疾患である。

(2) これまで我々は、骨付着部靭帯に骨・軟骨の異常増殖を伴った関節強直症を発症する遺伝子組み換えマウスを作出し、骨・軟骨形成異常の疾患感受性遺伝子について遺伝子解析を行ったところ、疾患感受性遺伝子座は、第7染色体上のD7Mit68(60cM)の遠位に同定された(Mori S, et al. *Ann Rheum Dis* 65: 1273-1278, 2006)。この遺伝子座はヒトの第10染色体上のFGFR2遺伝子座に対応し、この遺伝子座に異常を認める疾患として、FGFR2関連頭蓋骨縫合早期癒合症が知られている。

(3) 超音波と微小気泡を使った分子導入法は、気泡が超音波照射により破壊される時に生じる衝撃圧を利用して、非侵襲的に標的組織に遺伝子等を導入することが可能であるが、我々は直径200nm以下のキャビテーション気泡の衝撃圧の制御で分子導入効率の改善が図られることを確認し、高効率型超音波分子導入装置を開発した。

(4) これまで我々は、ナノバブルと超音波を用いた非侵襲性の遺伝子導入技術を確立した。

(5) 我々は、レンチウイルスベクター作製用プラスミドDNAを開発し、マウス骨格筋に本分子導入法で1回導入するだけで、遺伝子発現を100日間以上にわたり持続させることに成功した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FGFR2関連頭蓋骨縫合早期癒合症の疾患モデルを樹立し、病変発症の機序を解明するとともに、新規生物製剤(fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2のIg-Fc融合タンパク)(FGFR2-Fc)発現遺伝子をナノバブルと超音波による分子導入システムを用いて、病変組織に導入し、治療実験を行うことである。

3. 研究の方法

(1) FGFR2関連頭蓋骨縫合早期癒合症の疾患モデルを樹立と病因解析

我々が見出したFGFR2の遺伝子座に骨・軟骨形成異常の疾患感受性遺伝子を有するマウスは、MRL/lprマウスのX染色体上のSAP遺伝子に突然変異を起こしたMRL/rpl系マウスとC3H/lpr系マウスを始祖とするが、このマウスのY染色体はC3H/lpr系マウスに由来している。このマウスにおいては、雄において高頻度に骨・軟骨形成異常を発症するという特徴がある。そこで、このマウスの系統樹立にあたっては、Y染色体の病変発症への

関与を調べるため、始祖の系統であるC3H/lpr系マウス由来のY染色体を有する骨・軟骨形成異常の疾患モデルマウスを樹立するとともに、このマウスの雌とMRL/rpl系マウスの雄を交配させ作出したF1マウスを骨・軟骨形成異常を発症するマウスに戻し交配することにより作出した、MRL/rpl系マウス由来のY染色体を有するマウスの系統樹立も行った。

一方、我々が見出したFGFR2の遺伝子座に骨・軟骨形成異常の疾患感受性遺伝子を有する遺伝子組み換えマウスの頭蓋顎顔面の大きさや形状を規定する遺伝子座を、この遺伝子組み換えマウスの始祖の系統であるMRL/rpl系マウスとC3H/lpr系マウスのF2世代(MCF2)のマウスとマイクロサテライトマーカーを用いて解析した。すなわち、上記MCF2マウス246匹について96種類のマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイドスクリーンを行い、頭蓋顎顔面の大きさや形状を規定する遺伝子座を同定するためのリンケージ解析を行った。

(2) 本研究のためのナノバブルと超音波を用いた遺伝子導入法の検討

病変組織に注入したナノバブルの時間応答性をみるために、直径が異なる二つの脂質ナノバブルを作成する。各組成と平均直径はDistearoyl-Phosphocholine(DSPC)+Distearoyl Phosphoethanolamine (DSPE)-PEG-OMe (平均直径150nm) および Distearoyl phosphatidylcholine(PC)-PEG (平均直径400nm) である。

遺伝子導入効率を評価するため、ナノバブル超音波分子導入システムで、レポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)導入用プラスミドDNAと同時に注入したナノバブルを標的組織近傍を想定した骨組織近傍で破壊、遺伝子導入後、生体発光イメージングシステムでルシフェラーゼ発現活性を測定する。ルシフェラーゼの発現率は、標的組織を取り出して免疫組織学的に評価する。

4. 研究成果

本研究により、FGFR2の遺伝子座に骨・軟骨形成異常の疾患感受性遺伝子を有し、このマウスの始祖の系統であるC3H/lpr系マウスとMRL/rpl系マウスのそれぞれに由来するY染色体を有する近交系マウスの系統樹立に成功した。その結果、このマウスの骨・軟骨形成異常に、Y染色体の系統の由来は関与しないことが明らかとなった。また、この疾患モデルマウスにおいては、ある種のFGFR2関連頭蓋骨縫合早期癒合症にみられる足根骨の癒合が、雄においては80%以上において認

められた。

さらに、上記 MCF2 マウスにおけるマイクロサテライトマーカーを用いた頭蓋顎顔面の大きさや形状を規定する遺伝子座を同定するためのリンケージ解析の結果、これらのマウスの頭蓋顎顔面の大きさや形状を規定する遺伝子座として第 1 染色体と第 10 染色体に存在する遺伝子座が浮上してきた。以上の結果より、我々が見出した足関節に骨軟骨の形成異常を示すマウスの骨軟骨の形成異常には、FGFR2 に相当する遺伝子座が関与しているが、頭蓋顎顔面の大きさや形状には、第 1 染色体と第 10 染色体に存在する遺伝子座が関与している可能性が示唆された。

一方、これまでのナノバブルと超音波を用いた分子導入法の検討により、骨組織近傍の組織にも、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の導入と遺伝子発現が可能であることが明らかとなった。

以上の研究結果により、我々が樹立した FGSR2 の遺伝子座に骨・軟骨形成異常の疾患感受性遺伝子を有するマウスとナノバブルと超音波を用いた分子導入法を用いることにより、この骨・軟骨形成異常の疾患モデルマウスの治療において有効と考えられる FGFR2 の Ig-Fc 融合タンパクの投与による治療実験を行うことが可能となった。

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Horie S, Watanabe Y, Ono M, Mori S, Kodama T. Evaluation of anti-tumor effects following tumor necrosis factor- α gene delivery using nanobubbles and ultrasound. *Cancer Sci* 102: 2082-2089, 2011. 査読有
2. Kodama T, Tomita N, Yagishita Y, Horie S, Funamoto K, Hayase T, Sakamoto M, Mori S. Volumetric and angiogenic evaluation of antitumor effects with acoustic liposome and high-frequency ultrasound. *Cancer Res* 71: 6957-6964, 2011. 査読有
3. Y Kuwahara, T Oikawa, Y Ochiai, M H Roudkenar, M Fukumoto, T Shimura, Y Ohtake, Y Ohkubo, S Mori, Y Uchiyama, M Fukumoto: Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. *Cell Death Dis* (2011) 2, e177; doi: 10.1038/cddis.2011.56. Published online 30 June 2011. 査読有
4. Yoshikazu KUWAHARA, Miyuki MORI, Toshiyuki OIKAWA, Tsutomu SHIMURA, Yosuke OHTAKE, Shiro MORI, Yasuhiro

OHKUBO, Manabu Fukumoto: The Modified High-Density Survival Assay is the Useful Tool to Predict the Effectiveness of Fractioned Radiation Exposure. *J Radiat Res* 51: 297-302, 2010. 査読有

5. Sachiko Horie, Yukiko Watabnabe, Rui Chen, Shiro Mori, Yasuhiro Matsumura, Tetsuya Kodama: Development of localized gene delivery using a dual-intensity ultrasound system in the bladder. *Ultrasound Med Biol* 2010;36(11):1867-1875. 査読有
6. Tetsuya Kodama, Atsuko Aoi, Yukiko Watabnabe, Sachiko Horie, Mizuho Kodama, Li Li, Rui Chen, Noriyoshi Teramoto, Hidehiro Morikawa, Shiro Mori, Manabu Fukumoto: Evaluation of transfection efficiency in skeletal muscle using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 36(7): 1196-1205, 2010. 査読有
7. Watanabe Y, Sachiko Horie, Funaki Y, Kikuchi Y, Yamazaki H, Ishii K, Mori S, Vassaux G, Kodama T: Delivery of Na/I symporter gene into skeletal muscle by using nanobubbles and ultrasound: Visualization of gene expression by positron emission tomography. *J Nucl Med* 51(6):951-8, 2010. 査読有
8. Yuki Tanaka, Hiroaki Komori, Shiro Mori, Yoshiko Soga, Takahito Tsubaki, Miho Terada, Tatsuhiro Miyazaki, Takahiro Fujino, Satoshi Nakamura, Hiroyuki Kanno, Tatsuya Sawasaki, Yaeta Endo, Masato Nose: Evaluating the Role of Rheumatoid Factors for the Development of Rheumatoid Arthritis in a Mouse Model with a Newly Established ELISA System. *Tohoku J Exp Med*. 220 (3): 199-206, 2010. 査読有
9. Tetsuya Kodama, Noriko Tomita, Sachiko Horie, Nicolas Sax, Hiroko Iwasaki, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Shiro Mori, Manabu Fukumoto: Morphological study on Acoustic liposome using transmission electron microscopy. *J Electron Microscop* 59(3):187-196, 2010. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1. 畠山友梨子, 李麗, サックスニコラ, 阪本真弥, 森 士朗, 小玉 哲也: 鼠径リンパ節内の圧力上昇にともなう輸出リンパ管への流出特性. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011 年 10 月 3 日-5 日 名古屋.
2. 李麗, 森 士朗, 柳下陽子, サックスニ

- コラ, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 高地崇, 李深偉, 宮下仁, 森川秀広, 阪本真弥, 小玉哲也: 頭頸部癌所属リンパ節転移の診断・治療に向けたリンパ節腫大マウスを用いたリンパ節転移モデルの開発. 第35回日本頭頸部癌学会. 2011年6月9日-10日 名古屋.
3. 渡邊夕紀子, 森 士朗, 堀江佐知子, サックスニコラ, 李麗, 李深偉, 柳下陽子, 高地崇, 船木善仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井慶造, 阪本真弥, 宮下仁, 小玉哲也: 頭頸部癌遺伝子治療に向けたナノバブルと超音波による NIS 遺伝子導入と¹²⁴I-PET イメージング. 第35回日本頭頸部癌学会. 2011年6月9日-10日 名古屋.
 4. 渡邊 夕紀子, 堀江佐知子, 船木善仁, 菊池洋平, 山崎浩道, 石井慶造, 森 士朗, 小玉哲也: 超音波とナノバブルを使用した遺伝子導入法および PET を使用した遺伝子発現の可視化法の開発. 第49回日本生体医工学会大会. 2011年04月29日 東京.
 5. 高田陽子, 森 士朗, 柳下陽子, 稲原英恵, 川村 仁, 丹田奈緒子: 膠原病疾患モデルマウス McH-*Ipr/Ipr*-RA1 における唾液腺炎に関する免疫病理学的解析. 第55回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2010年10月16-18日, 千葉.
 6. 稲原英恵, 森 士朗, 柳下陽子, 高田陽子, 川村 仁, 丹田奈緒子: 関節強直を早期に発症するリコンビナントコンジュニックマウスの免疫病理学的解析. 第55回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2010年10月16-18日, 千葉.
 7. 大木宏介, 森 士朗, 宮下仁, 川村仁, 小玉哲也: ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた口腔癌の遺伝子治療法を想定した分子導入法の検討. 第55回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2010年10月16-18日, 千葉.
 8. 柳下陽子, 森 士朗, 高田陽子, 大木宏介, 宮下仁, 森川秀広, 川村仁, 小玉哲也: 口腔癌早期診断のためのナノバブルと高周波超音波による腫瘍血管構築画像の病理学的評価, 第55回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2010年10月16-18日, 千葉.
 9. 宮下仁, 森 士朗, 柳下陽子, 高田陽子, 大木宏介, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也: ナノバブルと高周波超音波による腫瘍血管構築と VEGF の発現に関する分子学的検討. 第55回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2010年10月16-17日, 千葉.
 10. 佐藤祥太, 李 麗, 柳下陽子, 阪本真弥, 高橋昭喜, 森 士朗, 小玉哲也: マイクロバブルと高周波超音波を用いた三次元イメージング法による転移リンパ節の血管密度の評価, 日本超音波医学会東北地方会第40回学術集会, 2010年9月26日(日), 仙台.
 11. 渡邊夕紀子, 児玉栄一, 堀江佐知子, 高地 崇, Sax Nicolas, 柳下陽子, 陳 銳, 李 麗, 服部俊夫, 森 士朗, 小玉哲也: がん遺伝子治療に向けた新しい PET レポーター/治療遺伝子の開発 (0-418), 第69回日本癌学会学術総会予稿集 366頁, 2010年9月22日-24日, 大阪.
 12. 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 小島貴則, 陳銳, 李麗, 柳下陽子, Sax Nicolas, 阪本真弥, 森 士朗, 小玉哲也: ナノバブルと超音波を用いた TNF-alpha 遺伝子導入による抗腫瘍効果の評価, 第69回日本癌学会学術総会予稿集 322頁, 2010年9月22日(水)-24日(金), 大阪.
 13. 小島貴則, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳銳, 李麗, 阪本真弥, 森 士朗, 小玉哲也: 膀胱がん治療に向けた二重超音波照射法の数値的至適化, 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月22日-24日, 大阪.
 14. 陳銳, 李麗, 渡邊夕紀子, Sax Nicolas, 堀江佐知子, 柳下陽子, 森 士朗, 福本学, 小玉哲也: 三次元高周波超音波およびナノバブルを用いた肝転移の非侵襲的観察, 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月22日-24日, 大阪.
 15. 陳銳, 千葉美麗, 森 士朗: In vivo detection of cancer metastases at an early stage by vessel density with ultrasound and nano/microbubbles. 第52回歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会 2010. 2010年9月20-22日, 東京.
 16. Sachiko Horie, Yukiko Watanabe, Yoko Yagishita, Nicolas Sax, Rui Chen, Li Li, Takanori Kojima, Hidehiro Morikawa, Maya Sakamoto, Masao Ono, Shiro Mori, Tetsuya Kodama: Longitudinal three-dimensional noninvasive imaging analysis and quantification of anti-tumor effects of TNF-alpha gene for small tumor. 2010 World Molecular Imaging Congress. (Oral Presentation: 0717A) September 8-11, 2010, Kyoto, Japan.
 17. Yukiko Watanabe, Sachiko Horie, Yoshihito Funaki, Youhei Kikuchi, Hiromichi Yamazaki, Keizo Ishii, Shiro Mori, Georges Vassaux, Tetsuya Kodama: PET Visualization of Na/I Symporter Gene Expression after Delivery by Nanobubbles and Ultrasound. 2010 World Molecular Imaging Congress. (Oral Presentation: 0191) September 8-11, 2010, Kyoto, Japan.

18. 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳銳, Nicolas Sax, 李麗, 小野栄夫, 森 士朗, 小玉哲也: ナノバブルと超音波を用いた TNF- α 遺伝子導入による抗腫瘍効果の評価. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会. 2010 年 6 月 17 日-18 日, 大阪.
19. 柳下陽子, 森 士朗, 李麗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 陳銳, 高田陽子, 川村仁, 森川秀広, 小玉哲也: ナノバブルと高周波超音波を用いた腫瘍血管構築法の開発. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会. 2010 年 6 月 17 日-18 日, 大阪.
20. Sax N, Horie S, Li L, Chen R, Watanabe Y, Mori S, Sakamoto M, Kodama T. : Developement and characterization of echogenic poylated liposomes. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会. 2010 年 6 月 17 日-18 日, 大阪.
21. 柳下陽子, 森 士朗, 李麗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 陳 銳, 高田陽子, 大木宏介, 宮下 仁, 小玉瑞穂, 川村 仁, 森川秀広, 小玉哲也: 口腔癌早期診断のためのナノバブルと高周波超音波を用いた画像診断法に関する組織学的検討. 第 34 回日本頭頸部癌学会. 2010 年 6 月 10-11 日 東京.
22. 宮下 仁, 森 士朗: 口腔癌早期診断におけるナノバブルと超音波を用いた腫瘍血管画像構築と VEGF の発現に関する分子病理学的検討. 第 34 回日本頭頸部癌学会. 2010 年 6 月 10-11 日 東京.
23. 陳 銳, 森 士朗, 千葉 美麗, 福本 学, 小玉哲也: 歯肉癌の遺伝子治療のためのナノ・マイクロバブルと超音波を用いた分子導入法の検討. 第 34 回日本頭頸部癌学会. 2010 年 6 月 10-11 日 東京.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 士朗 (MORI SHIRO)
東北大学・病院・講師
研究者番号: 80230069

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)
東北大学・医工学研究科・教授
研究者番号: 40271986

小野 栄夫 (ONO MASAO)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 20302218