

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792418

研究課題名（和文）頭蓋冠縫合部早期癒合症発症に関与する細胞群の同定とその分化制御に関する研究

研究課題名（英文）Identification of the cell group participating in the onset of craniosynostosis and study on the differentiation control

研究代表者

小林 起穂（KOBAYASHI YUKIHO）

東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンター・特任助教

研究者番号：20596233

研究成果の概要（和文）：

【目的】頭蓋顎顔面領域に形態異常を呈する先天性疾患には、矯正臨床と深く関わるものが多く、これまでに42疾患が歯科矯正治療に対する健康保険の適用となっている。中でも頭蓋冠縫合部早期癒合症は、胎生期に頭蓋冠縫合が癒合する先天性骨系統疾患であり、線維芽細胞増殖因子（FGF）/FGF受容体（FGFR）シグナル異常に起因するものが多く報告されている。アペール症候群（AS）は、頭蓋冠冠状縫合部の早期癒合と中顔面部の劣成長を伴う不正咬合、四肢の合指症を主徴とする疾患である。FGFR2におけるアミノ酸置換（S252WまたはP253R）が報告されており、FGF/FGFRシグナル異常に起因した機能獲得型変異が原因であるといわれているが、詳細な病態成立機序は不明である。当分野では可溶性FGFR2（sFGFR2）の骨芽細胞分化に対する抑制効果を報告してきた。本研究は、S252W変異を含むsFGFR2の精製タンパク質（sFGFR2Ap）が、頭蓋冠縫合部早期癒合症に及ぼす効果を検討することを目的とした。【試料および方法】COS-7細胞にsFGFR2Apを強制発現させ培養上清より精製を行った。担体として疎水化多糖ナノサイズゲル微粒子（ナノゲル）を用い、sFGFR2Apとの複合体を作製した。胎生15.5日齢ASモデルマウス（n=4）より頭蓋冠を摘出し、冠状縫合部の片側にはナノゲル（対照群）、反対側にはsFGFR2Ap-ナノゲル複合体（実験群）を適用し、4日間の組織培養後、HE染色法により縫合部の組織学的解析を行った。【結果および考察】冠状縫合部のHE染色組織像から、対照群では縫合部の癒合が観察され（n=4/4）、実験群では縫合部の開存が認められた（n=4/4）。【結論】精製sFGFR2Apの縫合部早期癒合に対する予防効果が示され、AS病態解明および新規治療法開発の一助となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Apert syndrome (AS), an autosomal dominant inherited disorder caused by missense mutation resulting from amino acid substitutions in the fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2, is characterized by the major clinical features of craniosynostosis, exophthalmus, midface deficiency, and symmetric syndactyly of the hands and feet. Ligand-dependent constitutive activation of FGFR2 has been reported to play a causative role in the pathogenesis of AS, however the precise mechanism remains to be elucidated. Surgical procedures are frequently required to treat the AS, the

development of non-invasive procedures for treating AS are keenly awaited. Objectives: To determine etiological mechanisms of craniosynostosis in AS, and verify the therapeutic effects of the purified soluble form of FGFR2^{S252W} (sFGFR2^{S252W}) complexed with polysaccharide nanogel *in vitro*. Methods: Recombinant sFGFR2^{S252W} was purified by affinity chromatography and was complexed with nanogel. Calvarial tissues were obtained from *Fgfr2^{+/S252W}* mice (AS mice) and wild-type mice (control mice), and were cultured for 4 days in the presence of either sFGFR2^{S252W}/nanogel complex or vehicle nanogel on either side of the coronal suture. MC3T3-E1 cells overexpressing FGFR2IIIc^{S252W} (MC3T3-E1-Ap) were established. The mRNA expression in MC3T3-E1 cells was analyzed by real-time PCR or semi-quantitative RT-PCR, and protein expression and phosphorylation were analyzed by Western blotting. Results: The coronal suture of the AS mice exhibited increased *Runx2* and *Osteopontin* mRNA expression, as well as accelerated phosphorylation of ERK and MEK, unlike that observed in the control mice. The ectopic expression of *Fgf10* and *Fgfr2IIIb*, which are probably indispensable for epidermal development, were observed in the coronal suture of the AS mice, whereas *Fgfr2IIIc* expression was detected in both the AS and the control mice. Administration of sFGFR2^{S252W} inhibited FGF2-stimulated proliferation; phosphorylation of ERK, p38, MEK, SAPK/JNK, and Akt; and the mineralization of MC3T3-E1-Ap *in vitro*. The sFGFR2^{S252W}/nanogel complex maintained the patency of the coronal sutures in the AS mice (n = 4/4); however, synostosis was observed to occur on the side where only nanogel was applied (n = 4/4) in the organ culture. Conclusion: The ectopic expression of *Fgf10* and *Fgfr2IIIb* probably induce the onset of craniosynostosis in AS, and an appropriate delivery of purified sFGFR2^{S252W} could be an effective method for treating AS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：craniosynostosis, Apert syndrome, osteoblast,

1. 研究開始当初の背景

頭蓋・顎顔面領域における骨縫合部は、骨格成長の場として大きな役割を果たす。頭蓋冠を構成する成熟骨組織の先端には osteogenic front と呼ばれる未分化間葉系骨芽細胞層が形成され、膜性骨化の最前線として重要な役割を担っている。Apert 症候群は、胎生期に冠状縫合部における早期の石灰化が生じ、頭蓋の変形や重篤な不正咬合を呈するが、研究者らは過去に骨芽細胞の異常分化

亢進が本疾患病態成立機序に関与する事を報告している。

2. 研究の目的

本研究は、Apert 症候群モデルマウス（以下 Ap マウスと表記する）頭蓋冠組織培養系にて縫合部におけるより詳細な病態成立機序の解明と RNA 干渉を利用した非侵襲的かつ疾患特異的な治療法確立への基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

COS-7 細胞に sFGFR2Ap を強制発現させ培養上清より精製を行った。担体として疎水化多糖ナノサイズゲル微粒子 (ナノゲル) を用い、sFGFR2Ap との複合体を作製した。胎生 15.5 日齢 AS モデルマウス (n=4) より頭蓋冠を摘出し、冠状縫合部の片側にはナノゲル (対照群)、反対側には sFGFR2Ap-ナノゲル複合体 (実験群) を適用し、4 日間の組織培養後、HE 染色法により縫合部の組織学的解析を行った。【結果および考察】冠状縫合部の HE 染色組織像から、対照群では縫合部の癒合が観察され (n=4/4)、実験群では縫合部の開存が認められた (n=4/4)。

4. 研究成果

冠状縫合部の HE 染色組織像から、対照群では縫合部の癒合が観察され (n=4/4)、実験群では縫合部の開存が認められた (n=4/4)。すなわち、精製 sFGFR2Ap の縫合部早期癒合に対する予防効果が示され、AS 病態解明および新規治療法開発の一助となる可能性が示唆された。

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 3 件)

旧姓 ; 谷本 (TANIMOTO)

(1) Suzuki H, Suda N, Shiga M, Kobayashi Y, Nakamura M, Iseki S, Moriyama K. Apert syndrome mutant FGFR2 and its soluble form reciprocally alter osteogenesis of primary calvarial osteoblasts. *J Cell Physiol.* 2012 ;227:3267-77. 査読有り

(2) Loss-of-Function of Gli3 in Mice Causes Abnormal Frontal Bone Morphology and Premature Synostosis of the

Interfrontal Suture. Veistinen L, Takatalo M, Tanimoto Y, Kesper DA, Vortkamp A, Rice DP. *Front Physiol.* 2012;3:121. 査読有り

(3) Prevention of premature fusion of calvarial suture in GLI-Kruppel family member 3 (Gli3)-deficient mice by removing one allele of Runt-related transcription factor 2 (Runx2). Tanimoto Y, Veistinen L, Alakurtti K, Takatalo M, Rice DP. *J Biol Chem.* 2012;287:21429-38. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

(1) Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K. Expression Pattern of Relaxin Receptors During Mouse Craniofacial Development. 90th General Session & Exhibition of the IADR, Foz do Iguacu, Brazil, June 20-23, 2012.

(2) Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K. The role of relaxin in proliferation and differentiation of osteoblasts. 91st The International Association for Dental Research. May 21, 2013

(3) Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K. マウス頭蓋顎顔面領域の発生過程におけるリラクシン受容体遺伝子発現様相の解析 Analysis of the expression pattern of Relaxin receptors during mouse craniofacial development. 第 71 回 日本矯正歯科学会大会 2012 年 9 月 27 日 盛岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 起穂 (KOBAYASHI YUKIHO)

東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンター・特任助教

研究者番号 : 20596233

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：