

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890063

研究課題名(和文) FGFシグナル制御によるApert症候群頭蓋冠縫合部早期癒合の治療法開発

研究課題名(英文) Development of therapy for craniosynostosis in Apert syndrome by FGF signal control

研究代表者

鈴木 尋之 (Suzuki, Hiroyuki)

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：70634492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：Apert症候群は、線維芽細胞増殖因子2型受容体(FGFR2)のリガンド(FGF)依存的機能亢進型の点変異(S252W)を原因とし、頭蓋冠縫合部早期癒合症や合指症を示す。本研究の目的は、Apert症候群モデルマウスを用いてApert症候群の病態発症メカニズムを解明するとともに、可溶性FGFR2やヘパラン硫酸分解酵素によるFGFシグナル抑制が頭蓋冠縫合部早期癒合に対して与える効果を明らかにし、非侵襲的な新規治療法開発への糸口を見つけることである。本研究では、ナノゲルを担体とすることで、ヘパラン硫酸分解酵素を胎児期マウス頭蓋冠縫合部に局所作用させる実験系を計画し、施行した。

研究成果の概要(英文)：Apert syndrome is characterized by craniosynostosis and syndactyly, and is predominantly caused by point mutation of either S252W or P253R in the fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2 gene. These mutation cause activation of FGFR2 depending on ligand binding. Recently, an Apert syndrome mouse model (FGFR2 knock-in mouse model) showed phenotypes similar to those of Apert syndrome patients. In this study, we plan to investigate the phenotypes of Apert syndrome mouse model to clarify the pathogenic mechanism of Apert syndrome. Moreover, we analyze the effects of FGF signal control by soluble FGFR2 protein or heparin sulfate-degrading enzyme on craniosynostosis to improve new noninvasive therapeutic approach. We planned and tested the experiment that we operated heparin sulfate-degrading enzyme on coronal suture of mouse at a fetal age by nanogel as a carrier material locally.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：歯科 先天異常疾患

1. 研究開始当初の背景

Apert 症候群に代表される頭蓋冠縫合部早期癒合症は、多くが中顔面の劣成長に起因した著しい不正咬合を有するため、歯科にも深く関与する。現状では、これらの疾患の形態と機能の改善には、侵襲の大きな外科的アプローチの併用が必須となり、Apert 患者では頭蓋変形および脳圧亢進防止のため、頭蓋冠拡張の外科手術を出生後縫合閉鎖再発の度に受けなければならない。

Apert 症候群は頭蓋冠縫合部早期癒合に加えて、合指症を主徴とする常染色体優性遺伝疾患であり、原因として FGFR2 の 2 種類の変異 (S252W、P253R) が同定されている。FGFR2 には間葉系組織に主に発現する FGFR2IIIc と上皮系組織に主に発現する FGFR2IIIb の 2 つの isoform があり、変異は受容体に対するリガンドの結合能の亢進と結合特異性の喪失を惹起し、これら受容体のリガンド依存的な機能亢進を誘導する。

近年、S252W と P253R に関してノックインマウスも作出され、Apert 症候群の病態に関して多くの知見が得られつつある。しかしながら、これらノックインマウスを用いた病態メカニズムの解明はいまだ完全ではない。また、治療法の開発という視点にたった研究はほとんど行われていないのが現状である。

申請者は Apert 症候群における冠縫合部早期癒合症に対し、非侵襲的で安全な新規治療法を分子生物学的に開発することを目指し研究を行ってきた。S252W 変異を付与した FGFR2IIIc-S252W と、細胞内ドメインを欠落し FGF と結合してもシグナルを伝達しない可溶性変異体 soluble FGFR2IIIc-S252W (sFGFR2IIIc-S252W) を開発し、その分子薬理的機能を検討してきた。

申請者は、FGFR2IIIc-S252W を導入したトランスジェニックマウス (S252W-Tg) および sFGFR2IIIc-S252W を導入したトランスジェニックマウス (sS252W-Tg)、さらに両者の交配により得た双方の遺伝子を持つマウス (S252W/sS252W-Tg) を作出し、頭蓋冠由来骨芽細胞の表現型の解析を行なった。

分化能に関して、S252W-Tg 由来骨芽細胞は分化が亢進するのに対し、sS252W-Tg 由来骨芽細胞ではほとんど認められなかった。S252W/sS252W-Tg 由来骨芽細胞は野生型 (WT) 由来骨芽細胞と同程度となった。また、分子シグナル解析の結果から、S252W-Tg 骨芽細胞では MEK、ERK、p38 を介する FGF シグナル経路が活性化し、*in vitro* での増殖・分化ならびに *in vivo* での骨形成が促進するのに対し、sS252W-Tg 骨芽細胞ではこれらの現象は抑制することが分かった。FGFR2IIIc-S252W と sFGFR2IIIc-S252W の共発現する S252W/sS252W-Tg 骨芽細胞においては、S252W 変異による FGF シグナル経路は抑制され、増殖・分化能は WT 骨芽細胞と同程度となった。

これらの結果から、sFGFR2IIIc-S252W を用いた FGF シグナルの抑制は Apert 症候群の新規治療法の開発に有用と考えられた。

一方、FGF と FGFR の結合にはグリコサミノグリカンの介在が必要であり、グリコサミノグリカンが生合成されない場合 FGF シグナルは欠失する。グリコサミノグリカンの主成分であるヘパラン硫酸 (HS) は細胞膜および細胞外基質 (ECM) に普遍的に存在し、FGF や PDGF 等、様々な成長因子の働きを調節している。HS は FGF・FGFR の結合と、細胞内のチロシンキナーゼの活性化とリン酸化に必須である。

グリコサミノグリカンの主成分である HS はコアプロテインと 1 つ以上の負電位のヘパラン硫酸鎖 (HS 鎖) によって構成されている。HS 鎖は FGF と高い親和性を示し、その伸長はグリコシルトランスフェラーゼである extosin により起こり、リガンド刺激により伸長が促進される。HS 鎖の非存在下では FGF は FGFR と結合せず、FGF シグナルは活性化しないことが分かっている。また、ヘパラン硫酸 (HS) が S252W 変異による FGF シグナル亢進にも必須であるといえる。さらに、Apert 症候群の主要な表現型の発症部位である骨・軟骨は、ECM が豊富であり、ECM 成分の異常な変化も報告されている。この点からも、ECM の主成分であるヘパラン硫酸の制御は、骨・軟骨の成長コントロールに有効であると考えられる。以上のことから、FGF シグナルの抑制方法として、ヘパラン硫酸を分解する酵素の使用も考えられた。

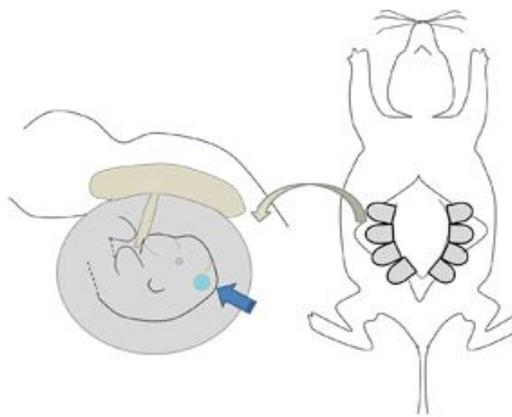
2. 研究の目的

In vivo でのデータ集積に際し、より典型的な表現型を示す Apert 症候群型モデルである FGFR2-S252W knock-in マウスを用いて、Apert 症候群の詳細な病態解明を行なうとともに、頭蓋冠縫合部早期癒合に対する FGF シグナル抑制の薬理効果を検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

Apert 症候群マウスモデルとして、Deng CX が作出した FGFR2-S252W knock-in マウス (2003 年論文発表) を供与してもらい、実験に使用することとした。

FGFR2-S252W knock-in マウスの胎生期 (E15.0) を対象に、頭蓋冠縫合部および周辺組織の切片作製し、免疫組織学的染色・*in situ* hybridization 法によりシグナル解析を行なう。その際、頭蓋冠器官培養系や *ex utero* 実験系 (図 1) を用い、ピース等を担体として、縫合部に FGF や Bmp を過剰作用させた場合の反応を評価する。



- ・妊娠中の雌マウスの胎児を実験に使用
- ・青矢印は担体の縫合部への投与を示す

図 1. Ex utero 実験を用いた縫合部局所的 FGF シグナル抑制の実験模式図

さらに、FGF シグナル抑制に効果があると考えられる可溶性 FGFR2 (sFGFR2IIIc-S252W) (図 2) やヘパラン硫酸分解酵素をビーズにて縫合部に局所作用させ、早期癒合症に対する薬理効果を検討していく。

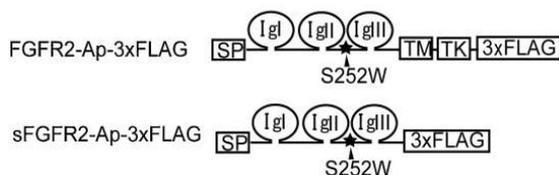


図 2. S252W 変異をもつ FGFR2 とその可溶性 soluble form

ヘパラン硫酸 (HS) は FGF・HS・FGFR の細胞表面での ternary complex の形成 (図 3) が、細胞内のチロシンキナーゼの活性化とリン酸化を引き起こす。

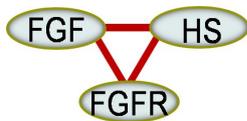


図 3. Ternary complex の概念図

ヘパラン硫酸分解酵素は、FGF と高い親和性を持つ、ヘパラン硫酸の構成成分のヘパラン硫酸鎖に対して、その伸長を妨げ、断片化させることが可能である。その結果、FGF シグナルを抑制することが予想された。

FGFR2-S252W knock-in マウスの対照群として、WT マウスを用いる。FGF シグナル抑制物質の対照群として、PBS や FGF2 を作用させる。

準備として、FGF シグナル抑制に効果があると考えられるタンパクの精製と効果的な濃度、担体の材質等の検索を行なう。

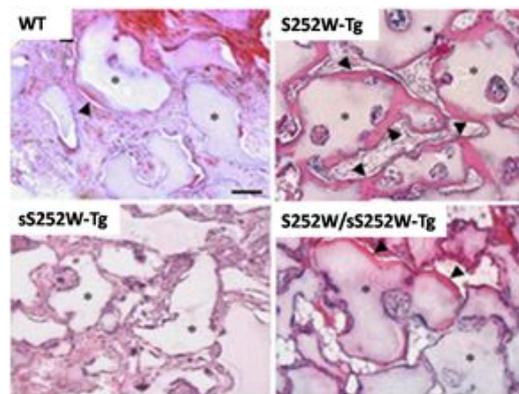
さらに、*in vitro* での実験系において FGFR2-S252W 変異による細胞形質の異常な変化や、それに対する FGF シグナル抑制の効果の詳細に検討する。これらの研究により Apert 症候群の病態解明と新規治療法開発のためのデータを集積する。

4. 研究成果

FGFR2IIIc-S252W と、その細胞外ドメインのみ (可溶性) の sFGFR2IIIc-S252W を発現するトランスジェニックマウスの頭蓋冠由来骨芽細胞の解析により、可溶性を用いた FGF シグナルの抑制が、S252W 変異による増殖・分化能の異常な亢進を抑制することを以前に示した。この結果に関する研究論文が海外誌にて発刊となった。

図 4 は、研究論文における結果の 1 つである。トランスジェニックマウスの頭蓋冠骨芽細胞を β -TCP と免疫不全マウス背側皮下へ移植し、8 週後の移植片中の骨様組織を HE 染色により観察したものである。

S252W-Tg 由来骨芽細胞では WT 由来骨芽細胞に比較し、骨様組織形成の促進が観察されたのに対して、sS252W-Tg 由来骨芽細胞では骨様組織形成は認められなかった。S252W/sS252W-Tg 由来骨芽細胞は WT 由来骨芽細胞と同程度の骨様組織形成となった。



β -TCP (*), 骨様組織 ()

図 4. 頭蓋骨由来骨芽細胞の移植実験における骨様組織形成

本研究における FGFR2-S252W knock-in マウスを用いた実験では、最初に、生後 2 日目の FGFR2-S252W knock-in マウスおよび WT マウス (対照群) の頭蓋冠からコラゲナーゼ酵素処理により、骨芽細胞を単離、培養し、増殖能および分化能の解析を行った。

FGFR2-S252W knock-in マウス由来骨芽細胞および WT マウス由来骨芽細胞を一定数播種し、3 日ごとに細胞数計測を行ったところ、FGFR2-S252W knock-in マウス由来骨芽細胞は WT マウス由来骨芽細胞に比較し、高い増殖能を示した (図 5)。

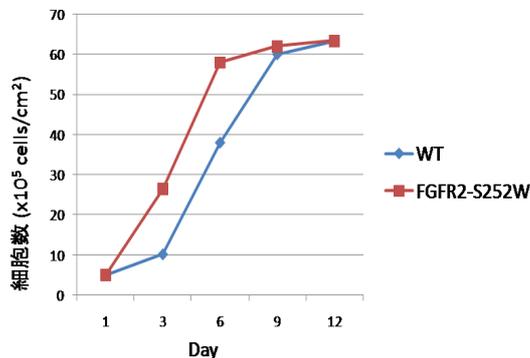


図 5. 骨芽細胞の細胞数計測の結果

次に、FGFR2-S252W knock-in マウス由来骨芽細胞および WT マウス由来骨芽細胞を 3 週間の分化誘導後、アリザリン染色を行ったところ、FGFR2-S252W knock-in マウス由来骨芽細胞において、WT マウス由来の骨芽細胞と比較して濃染し、分化能が亢進していることが確認された (図 6)。

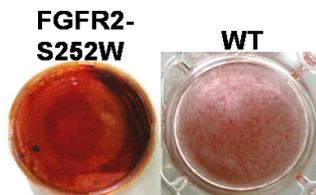


図 6. 頭蓋冠由来骨芽細胞の分化能

さらに、培養頭蓋冠骨芽細胞から抽出したタンパクを用いて、代表的な FGFR2 シグナルタンパクである ERK のリン酸化についてウェスタンブロット法により評価したところ、FGFR2-S252W knock-in マウス由来骨芽細胞は WT マウス由来骨芽細胞と比較して、リン酸化が亢進していることを確認した (図 7)。

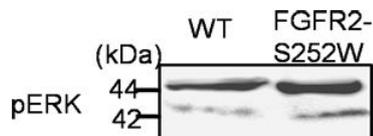


図 7. 頭蓋冠由来骨芽細胞の ERK のリン酸化

これらの *in vitro* での実験結果は、FGFR2-S252W knock-in マウスに関する過去の報告と一致した。

本研究では、FGF シグナル抑制が与える、胎児マウス頭蓋冠縫合部での影響を観察する *in vivo* での実験を主体に考えていた。FGFR2 機能低下状態を作り出し、縫合部早期癒合に対する阻害効果を得る物質として、安定した物質であるヘパラン硫酸分解酵素を用いることとした。ヘパラン硫酸特異的分解

酵素として細菌由来酵素で市販されている heparitinase がある。その他には、Sulf-1, Sulf-2 と呼ばれる細胞外ヘパラン硫酸鎖の 6 位の硫酸を特異的に脱硫酸する酵素(ヘパラン硫酸鎖自体は分解されないが FGF2 の結合性は低下する)や、heparanase とよばれるヘパラン硫酸分解酵素があるが、いずれも精製された酵素としては市販されておらず、トランスフェクションの実験が必要となる。本実験では、同一条件で実験可能な heparitinase を使用する薬剤と選定した。さらに、FGF シグナル低下に効果的な濃度、作用範囲、作用時間などの詳細な探索を行なう必要がある。FGFR2-S252W knock-in マウスの縫合部へ局所的に作用させるために、担体として用いる物質(ヘパリンビーズ、アガロースゲル、ナノゲル等)の選定が必要であった。本研究では、生体親和性があり徐放性のあるナノゲルを用いることとし、実際に WT マウス胎児頭蓋冠縫合部に作用可能であるかに関して、質的・量的な検討を行った。その結果、一定のサイズ以下であれば使用可能であると判断した。

今後さらに、ヘパラン硫酸分解酵素を含有させたナノゲルによる、胎児マウス頭蓋冠縫合部でのシグナル反応性を評価する必要性がある。マウス胎児頭蓋冠縫合部へのナノゲルの投与実験は、顕微鏡下での手術が必要である。手技的な熟練に努め、実験結果の人為的誤差を減らし精度を向上させるために試験を行ってきた。現時点では、Apert 症候群マウスモデルとして、FGFR2-S252W knock-in マウスを用いた実験を行う段階ではなく、その前段階として WT マウスを用いた基礎データの収集を先行すべきであると考えられる。WT マウスを用いた実験結果から蓄積されたデータに基づいて、FGFR2-S252W knock-in マウスを用いて実験を行うことで、FGF シグナル抑制による頭蓋冠縫合部早期癒合の治療効果に関して、解明がより円滑に推進すると思われる。さらに、FGF シグナル抑制による頭蓋冠縫合部早期癒合の治療と、それに伴い明らかにされるであろう頭蓋縫合部(頭蓋骨および硬膜、骨膜など周囲組織を含めた複合体)の組織間の相互作用を含めたシグナル解析に関しては、今後の課題である。

申請者は頭蓋冠縫合部にも異常をきたす先天異常疾患である、鎖骨頭蓋異形成症に関しても臨床的データを解析し、その結果に関して、学会にて発表を行った。

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 1 件)

鈴木 尋之、須田 直人、志賀 百年、小林 起穂、中村 正孝、井関 祥子、森山 啓司、Apert syndrome mutant FGFR2 and its soluble

form reciprocally alter osteogenesis of primary calvarial osteoblasts、Journal of Cellular Physiology、査読有、227 巻、2012、3267-3277
DOI: 10.1002/jcp.24021

〔学会発表〕(計 2 件)

鈴木 尋之、辻 美千子、森田 淳平、丸岡 亮、鈴木 聖一、森山 啓司、鎖骨頭蓋異形成症 16 例における歯数および萌出の異常に関する検討、第 54 回日本先天異常学会学術集会、2014 年(7 月 26 日発表予定)、神奈川県(日本)

鈴木 尋之、辻 美千子、志賀 百年、岡村 絵里花、鈴木 聖一、森山 啓司、Supernumerary Teeth and Their Eruption State in Three Siblings with Cleidocranial Dysplasia、The 45th Annual Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists、2012 年 11 月 1 日、ソウル(大韓民国)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
無

6. 研究組織

研究代表者

鈴木 尋之 (SUZUKI, Hiroyuki)

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：70634492