

—原著—

FGFR2 シグナリング活性化が胎仔頭蓋底の軟骨分化におよぼす影響と
分子機構の検討

関 雪 絵, 永 田 昌 毅, 小 玉 直 樹, 高 木 律 男

Molecular mechanisms of abnormal chondrocyte differentiation in the fetal cranial
base caused by the effect of activated FGFR2 signaling

Yukie Seki, Masaki Nagata, Naoki Kodama and Ritsuo Takagi

新潟大学 医歯学系 顎顔面口腔外科学分野 (主任: 高木律男教授)

Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Health Science,
Course for Oral Life Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

平成 18 年 4 月 21 日 受付 6 月 7 日 受理

Key words : fibroblast growth factor receptor type 2 (FGFR2) , Apert syndrome, 頭蓋底, 軟骨分化, 軟骨縫合

Abstract : Apert syndrome exhibits the specific clinical features including abnormal premature fusion of calvarial sutures and syndactyly, which are known to be caused by miss sense mutations of Ser252Trp or Pro253Arg on *Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)* gene responsible for abnormal activation of the tyrosin kinase and osteoblast differentiation. On the other hand, premature bony fusion of cranial base synchondroses are another major skeletal abnormalities, however the mutant FGFR2 signaling in the cranial cartilage is still remain to be elucidated. Purpose of this study is to clarify molecular mechanism of the craniofacial endochondral growth affected by abnormal FGFR2 signaling.

Transgenic mice bearing the Apert type mutant *Fgfr2* gene (*Fgfr2III^{C^{P253R}}*) driven by promoter/enhancer of *Col2a1* gene were used to analyze the effect of cartilage specific expression. Elevated expression level of *Runx2/Cbfa1*, *Indian hedgehog (Ihh)* and *Matrix metalloproteinase 13 (Mmp-13)* suggested accelerated chondrocytes differentiation with the exogenous *Fgfr2 III^{C^{P253R}}* gene expression in cranial base cartilage. Taken together with histological findings showing reduced size of cranial base cartilage and accelerated bone formations, activated FGFR2 signaling negatively regulate the growth of cranial base through modulating the endochondral growth process.

抄録 : Apert 症候群は頭蓋冠縫合早期異常癒合や合指症など特徴的な病態を呈し, *Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)* 遺伝子のセリン 252 トリプトファンあるいはプロリン 253 アルギニンなどのレセプター活性化型ミスセンスが頭蓋冠縫合部の骨芽細胞の分化を亢進することが原因とされている。一方で Apert 症候群において軟骨縫合の早期異常閉鎖がもう一つの主要な骨格異常であるにも関わらず, 軟骨内における変異型 FGFR 2 シグナリングの役割は定義されていない。この研究では, FGFR2 の活性化が頭蓋顔面の軟骨性成長におよぼす影響について分子機構の一端を解明することを目的とした。

実験動物には Apert 症候群型変異 *Fgfr2* 遺伝子 (*Fgfr2III^{C^{P253R}}*) を 2 型コラゲンのプロモーターによって軟骨組織特異的に発現するトランスジェニックマウス (Tg マウス) を用いた。変異 *Fgfr2III^{C^{P253R}}* 遺伝子導入に伴い *Runx2/Cbfa1*, *Indian hedgehog (Ihh)*, *Matrix metalloproteinase 13 (Mmp-13)* 遺伝子の検出レベル上昇が軟骨組織に観察され, FGFR2 シグナリング活性化が軟骨分化に変化をもたらしたことが示唆された。組織所見における頭蓋底軟骨縫合の縮小と骨化亢進を考え合わせると, FGFR2 シグナリングが軟骨性成長の抑制を通じて頭蓋底の成長を抑制的に調節すると考えられた。総じて, FGFR2 シグナリングは骨芽細胞系と軟骨細胞系の細胞分化に対する統合的な調節作用を通じて頭蓋顔面の形態形成と発育に重要な役割を果たすことが示唆された。

緒 言

近年, FGFR2 遺伝子上のエクソン 7, 8, 9 に生じた変異が頭蓋顔面や四肢の形態異常を伴うさまざまな症候群の原因であることが明らかになった¹⁻⁵⁾。そのひとつである Apert 症候群は胎生期から出世後の成長過程に存在する頭蓋縫合および軟骨縫合の早期癒合症, 尖頭症, 上顎と頭蓋底前方部の劣成長, 浅い眼窩による眼球突出, 合指症, 四肢関節異常, 頸椎癒合など骨格系の異常による特徴的な病態を呈する。Apert 症候群の原因となる遺伝子異常としてセリン 252 トリプトファン (S252W) とプロリン 253 アルギニン (P253R) 変異が主なものとしてあげられ⁶⁾, これらの遺伝子変異により引き起こされる FGFR2 レセプターの機能異常が高親和性ライガンドである FGF 分子との親和性あるいは特異性に変化を引き起こすことが報告されている^{7, 8)}。胎生期の形態形成から出世後の成長過程にあるさまざまな組織・器官において, 特徴的な発現パターンを有する FGF ファミリーライガンド群との機能的相互関係に破綻をきたした結果引き起こされる異時的あるいは異所的な FGFR2 チロシンキナーゼ異常活性化が四肢や骨格を構成するさまざまな細胞群の増殖, 分化に影響を及ぼすことが病因として示唆されている⁹⁻¹¹⁾。しかしながら, その複雑な症状を引き起こす分子メカニズムの具体的な理解はいまだ十分とは言えない。

FGFR2 変異により引き起こされるすべての症候群の間に共通することは, FGFR2 レセプターのチロシンキナーゼの異常機能亢進に起因することである。これまで FGFR2 機能亢進が骨芽細胞系の分化を促進することにより頭蓋を構成する冠状縫合の異常早期癒合が引き起こされた結果, 頭蓋顔面の形態異常につながるという病態形成のメカニズムが一般に支持されている。しかしその一方で, Apert 症候群患者の頭蓋底軟骨縫合の早期癒合, 頭蓋底の前後的な発育抑制が重要な要因であることが臨床的に提示されている¹²⁾。この考えと一致して, 最近のマウス *Fgfr2* 遺伝子の gene targeting 実験の結果からは頭蓋冠縫合における骨芽細胞の骨形成亢進と共に, 軟骨細胞の増殖, 分化, その後の軟骨内骨化に伴う発育異常も今後検討を要する分野であると考えられている¹³⁻¹⁵⁾。

私たちはこれまでに Apert 症候群型変異 *Fgfr2IIIc^{P253R}* を軟骨細胞に特異的に発現する Tg マウスを作成し, 軟骨組織に生ずる変化を観察してきた。これまでの観察の結果, 軟骨組織特異的な *Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現は頭蓋底の前後発育の抑制を引き起こし, しかもその変化がヒト Apert 症候群患者に見られるのと同様に頭蓋底軟骨縫合の早期異常骨癒合を伴うことが観察された。これらのトランスジェニックマウス胎仔における頭蓋底の形態的特

徴は軟骨内化骨過程の亢進を示唆するものであったことから, 私たちは「FGFR2 レセプター活性化が軟骨内化骨過程において促進的作用を有する」と仮説した。本研究では組織学的形態観察と酵素組織化学的染色による軟骨組織分化過程の観察を行うとともに, 形態的には捉え難い軟骨細胞の分化過程の機能的変化を, レーザーマイクロダイセクション (Laser microdissection: LMD) と定量的リアルタイム RT-PCR (qRT-PCR) の併用による軟骨分化マーカーの発現定量によって検出することを試みた。その結果では形態学的には頭蓋底の軟骨縫合を構成する軟骨細胞の減少と骨化開始の促進所見, 遺伝子発現定量では頭蓋底軟骨における *Fgfr2IIIc^{P253R}* の発現が軟骨細胞の肥大化, 骨化に関わるいくつかの分子の遺伝子発現亢進が明らかになった。本研究ではヒトの疾患あるいは正常発生・発育において FGFR2 が骨芽細胞系だけでなく軟骨細胞系の分化調節を介して形態形成を統合的に制御する役割について考察した。

材料と方法

1. 実験動物

トランスジェニックマウス: 実験動物として Apert 症候群型変異 *Fgfr2* 遺伝子 (*Fgfr2IIIc^{P253R}*) 導入 Tg マウスを用いた。このマウスは National Institutes of Health, National Institutes of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases より分与された。2 型コラーゲンのプロモーター/エンハンサーによって全身の軟骨特異的に *Fgfr2IIIc^{P253R}* を発現し, 前頭部の突出, 上顎の劣成長, 口蓋裂など頭蓋顔面に特徴的な形態異常を生ずる (図 1)。

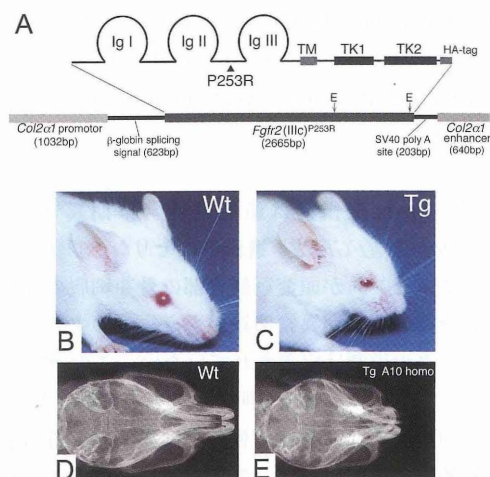


図 1

導入 *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子とトランスジェニックマウスの頭蓋顔面変形。A: 導入遺伝子の構造を示す。BとC: 頭蓋顔面の所見では額部から頭頂の突出と短い上顎の形態が明らかである。DとE: 頭蓋の軟エックス線写真所見では著しい上顎と頬骨の前後短縮, 頭蓋底軟骨縫合の消失, 脳頭蓋の変形が目立つ。

Tg マウスの雌雄を 20:00 から翌朝 8:00 まで交配し陰栓を確認した日の 0:00 を 0 日とし、胎齢 15 日 (E15) および 16 日 (E16) 胎仔頭部をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4) 浸漬下で形態を観察した。頭部は下顎を除去後、口蓋裂の有無を確認した。口蓋裂を有する個体は後述の genotyping によって、導入遺伝子陽性の確認を行い、これらの頭部を Tg マウスとして観察に用いた。また、口蓋裂の無い個体については genotyping で導入遺伝子陰性のものを野生型 (Wt) として実験に用いた。なお、本研究における動物実験は「新潟大学動物実験指針および新潟大学動物実験規則」に基づいて行われた。

Genotyping: E15 または E16 の胎仔尾約 2 mm を切断し、組織溶解液 (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA, 0.1% SDS) に液量の 1/100 量の Proteinase K (MERCCK Co., Darmstadt, Germany) を加えた組織溶解液にて 55°C で攪拌しながら 12 時間組織を溶解させた後、通法に従いフェノール、クロロホルム処理、エタノール沈殿で DNA を抽出した。続いて 1 サンプルにつき、10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP mix, 1unit の AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) に検体の genomic DNA と導入遺伝子検出用プライマーを加え、全量 25 μ l とし、95°C - 9 分に続き、94°C - 1 分、60°C - 1 分、72°C - 1 分を 30 サイクル後に 72°C - 10 分行って反応を終了した (GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems))。PCR 産物を 1% アガロースゲルにて電気泳動し、導入 *Fgfr2IIIc*^{P253R} 遺伝子の増幅産物を検出により遺伝型を決定した。導入遺伝子の特異的に検出する変異 *Fgfr2IIIc*^{P253R} のプライマーを以下に示す。Forward, 5' -CCACATTCAAGCAGTTGGTCG- 3'; backward, 5' -GATATCCGGTACGTCATATGG- 3'。

2. 組織学的観察

パラフィン包埋標本: E15 と E16 の Wt または Tg マウスの頭部を、それぞれ 4% パラホルムアルデヒドにて 4°C 下で 12 時間浸漬固定した。E16 の標本に対しては、10% EDTA (pH7.4) にて 4°C 下で 24 時間浸漬し、硬組織の脱灰を行った。続いて、通法によるパラフィン包埋を行い、5 μ m 切片を作製、ヘマトキシリンエオジン (H-E) 染色を施した。

ポリアクリルアミドゲル包埋凍結標本: E15 の Wt または Tg マウス胎仔を 4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、下顎を除去した頭部を剖出し、4°C 下で 2 時間浸漬固定したのち、標本を 5%, 10%, 15%, 20% スクロースに順次置換した。次にアクリルアミドモノ

マー溶液に 12 時間浸漬した (アクリルアミド, 和光)。アクリルアミドモノマー溶液の組成は、20% スクロース, 5% アクリルアミド, 0.5% N', N' -メチレンビスアクリルアミド, 0.087% N, N', N' -テトラメチルジアミン, 0.05M トリス塩酸生理食塩水 (pH8.0) 溶液とした。次に、標本を浸漬したアクリルアミドモノマー溶液にペルオキシ二硫酸アンモニウムを 0.033% 添加することで重合させた。全ての操作は 4°C 下で行った。重合開始から 12 時間後、標本周囲のポリアクリルアミドゲルを取り除き、通法に従い OCT コンパウンド (Tissue-Tek, SAKURA, 東京) にて凍結包埋を行った。その後、クリオスタット (MICROM HM505N, ミクロトーム社, Germany) で 5 μ m 凍結切片を作製し、H-E 染色およびアルカリホスファターゼ (ALP) 酵素組織化学染色を施し、光学顕微鏡観察を用いて頭蓋底の軟骨と骨化の過程を観察した。ALP 酵素組織化学染色では 0.1% ファストレッド TR 塩 (SIGMA F8764), 0.02% ナフトール AS-MX リン酸 (SIGMA N4875), 0.1M トリス塩酸 (pH8.5) 溶液を発色に用い、Methyl green で対比染色した。

3. 胎仔頭蓋底軟骨の遺伝子発現定量解析

レーザーマイクロダイセクション (LMD): E15 の Wt または Tg マウスの無固定頭部を OCT コンパウンドに包埋した。7 μ m で凍結切片を作製、フオイル付きスライドガラス (90FOIL-SL25, 松浪硝子工業, 大阪) に貼付した。これらの切片は HistoGene™ LCM Frozen Section Staining Kit (ARCTURUS, Mountain View, CA) で染色後、Leica AS Laser Microdissection System (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) により、頭蓋底軟骨を形態学的所見に基づき、静止層、肥大化層の各分化段階の軟骨細胞を選択的に採取した。これらから PicoPure™ RNA Isolation Kit (ARCTURUS) で total RNA を抽出し、得られた RNA の品質を Agilent 2100 Bioanalyzer (RNA 6000 Pico LabChip kit; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) にて検定した。RNA 量は分光光度計 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) にて測定し定量した。

リアルタイム PCR による遺伝子発現解析: 得られた 300ng の total RNA より逆転写酵素 (SuperScript III, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA を合成した。cDNA 600ng を鋳型とし、Wt, Tg それぞれの静止軟骨細胞、肥大化軟骨細胞について、1 サンプルにつき TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems N4304437), TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems), DNase RNase free H₂O を加え全量 25 μ l とし、real time

PCR (Smart Cycler[®], Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) を用いて軟骨細胞の分化に関連する遺伝子群の相対的定量検出を行った。PCR 反応は ABI 社標準プロトコル (95℃, 600 秒, 95℃ /15 秒, 60℃ /60 秒 × 45 サイクル) で行った。PCR 反応およびリアルタイムモニタリングは, TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems) によって以下のプライマー/プローブを用いて行った。 *Fgfr2* (Mm00438941m1); *Ihh* (Mm00439613m1); *Mmp-13* (Mm00439491m1); *Runx2/Cbfa1* (Mm00501578m1); *Col2a1* (Mm00491889m1), *Alp* (Mm00475831m1)。

各プローブについてあらかじめ, 正常マウス新生仔四肢の軟骨から抽出した total RNA より合成した cDNA を鋳型として 5 段階 (1:10:100:1000:10000) の希釈系列を作成し, 各濃度のサンプルについてリアルタイム PCR を行い, 増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数 (threshold cycle; Ct 値) を横軸に, 初発の cDNA 希釈倍率を縦軸にプロットし, 検量線を作成した。LMD より得た未知濃度のサンプルについても同じ条件下で反応を行い, Ct 値を求め, この値と検量線からサンプル中の目的の cDNA 量を希釈倍率として算出し, 比較した。1 遺伝子につき 3 回ずつ反応を行い, その平均値と標準偏差を求めた。

また, 導入遺伝子 *Fgfr2IIIc^{P253R}* の発現の特異的検出は TaKaRa Ex Taq[™] R-PCR Version 2.1 (TaKaRa, Siga, Japan) と 5'-CCACATTC AAGCAGTTGGTCG-3' 5'-GATATCCGGTACGTCATATGG-3' プライマーによって 95℃ -60 秒, 95℃ -5 秒, 68℃ -20 秒 × 45 サイクル行い, SYBR[®] Green I (TaKaRa) でモニターした。

結 果

1. 頭蓋底の組織所見

胎齢 16 日胎仔頭部の横断切片において Tg マウスでは蝶形骨体部の骨化領域の前後径に縮小が認められた (図 2 A, B)。それとともに Tg マウスの蝶形-後頭軟骨縫合 (S-O 軟骨縫合) には中央付近で静止軟骨層の消失を伴う前後幅の縮小が確認された。この部位では S-O 軟骨縫合の厚みも減少し肥大化から骨化の前線が軟骨縫合中央線に沿って進入する所見があった。これは周産期に観察される S-O 軟骨縫合の早期異常癒合に進展すると考えられた。そのほか, 図では示されていないが, 本来繊維性組織が介在する耳胞 (Otic vesicle) と S-O 軟骨縫合組織の間に軟骨性の異常癒合が観察された。これは軟骨周囲の軟骨膜の軟骨細胞への分化傾向にも促進傾向が存在することを示唆しており, 同様に将来この部位の早期異常骨癒合につながる事が予想された。Tg マウスの S-O 軟骨縫合における静止軟骨細胞の縮小

以外に増殖軟骨細胞層, 前肥大化軟骨細胞層と肥大化軟骨細胞層に喪失や顕著な配列の乱れは認められなかった。しかし, それぞれの軟骨細胞層の配列を詳細に比較すると, Tg マウスにおいては増殖軟骨細胞層領域の軽度拡大, 前肥大化軟骨細胞の減少, 個々の肥大化軟骨細胞の大きさの拡大とコラム配列の乱れが観察された (図 2 C, D)。

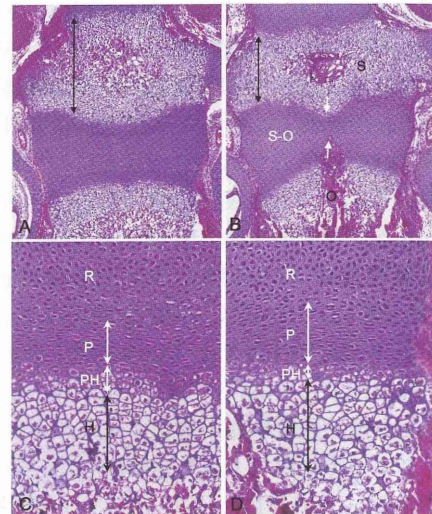


図 2. 胎齢 16 日頭蓋底の横断切片所見

A, C:野生型マウス (Wt), B, D:トランスジェニックマウス (Tg)。Tg マウスでは蝶形骨体部 (S) の骨化中心と周囲の肥大化軟骨細胞の前後径が Wt に比べて短い (黒両頭矢印)。Tg マウスの蝶形-後頭軟骨縫合 (S-O) 中央線付近においては静止軟骨細胞層が消失し蝶形骨体部 (S) と後頭骨体部 (O) から, それぞれ肥大化軟骨細胞と bone collar に相当する骨質の侵入 (双白矢印) が見られる。

C および D: A および B の拡大像を示す。Tg マウスでは増殖軟骨細胞層 (P) の範囲の拡大と前肥大化軟骨細胞層 (PH) の圧縮が観察された。Wt マウスの肥大化軟骨細胞層 (H) は比較的規則的で column 形成が見られるのに対し, Tg マウスでは軟骨細胞を入れる軟骨小腔の形と配列が不ぞろいで, かつ一般に肥大化傾向が強かった。R, 静止軟骨細胞層には明らかな形態の変化はなかった。

一方, それより 1 日早い胎齢 15 日の蝶形骨頭蓋底部と後頭骨部頭蓋底部の骨化開始領域では, 広範囲で軟骨細胞肥大化とその周囲に bone collar の形成が開始される。この時点で頭蓋底の前後径には Wt と Tg の間で後で見られるような明瞭な差は認められなかった (図 3 A, B)。しかし, Tg マウスの頭蓋底組織は全般に上下的な厚みが少なく, 下垂体との相対的位置において蝶形骨部骨化開始部位の後方位, 後頭骨 bone collar 骨化開始部位の前方位 (図 3 C, D) が特徴として観察された。これらの所見は Tg マウスの胎仔頭蓋底を構成する要素の矮小化が軟骨頭蓋の骨化開始以後に加速的に進行する事を示唆している。軟骨周囲に沿って起こる骨芽細胞分化の開始は Wt と Tg で同じく増殖軟骨細胞層表面にエオジン好染性細胞の集積として観察され (図 3 C, D), こ

れらにアルカリフォスファターゼ (ALP) 酵素活性が確認された (図 4 A, B)。しかし、後頭骨領域の bone collar 形成は Tg マウスにおいて進行しており (図 3 B, D)、骨化にいたる軟骨最終分化から骨芽細胞の分化過程は導入 *Fgfr2IIIc*^{P253R} 発現により加速されることを示していた。このように *Fgfr2IIIc*^{P253R} の発現がない骨芽細胞にみられる分化促進は軟骨細胞に引き起こされた分化亢進に伴った二次的なものであると考えられた。

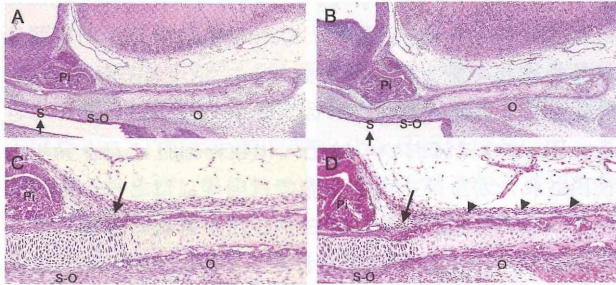


図 3. 胎齢 15 日 Wt マウス胎仔 (A および C), Tg マウス胎仔 (B および D) の頭蓋底矢状断切片。

C および D にそれぞれ A および B の後頭骨前部 (O) の拡大像を示す。全般に Tg マウスの頭蓋底骨格は Wt のそれに比べて厚みが少ない。Tg マウスの蝶形-後頭軟骨縫合 (S-O) は増殖軟骨細胞層においてややくびれ、その表面よりエオジン好性の骨芽細胞の増生が認められた (D, 黒矢印)。Tg マウス胎仔後頭骨 (O) 領域では肥大化軟骨細胞の外表面に Wt マウスに比べて進行した骨基質形成と血管の侵入からなる bone collar 形成が確認できる (D, 黒矢頭)。Pi: 下垂体, S: 蝶形骨領域。

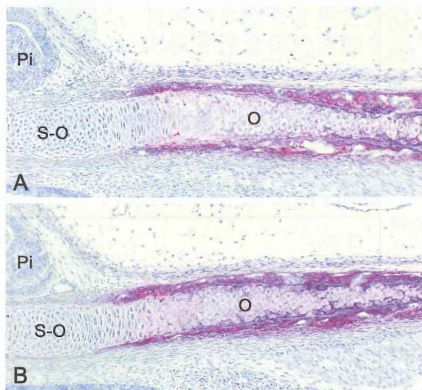


図 4. 胎齢 15 日頭蓋底矢状断切片のアルカリフォスファターゼ (ALP) 酵素組織染色。

下垂体 (Pi) との相対的位置関係において Tg マウス (B) における ALP 活性陽性細胞の出現は前位にあるが、ALP 陽性細胞群の出現とその下にある軟骨細胞の分化段階の位置関係は Wt マウスと Tg マウス間に明確な違いは見出せなかった。Pi: 下垂体, S-O: 蝶形-後頭軟骨縫合, O: 後頭骨領域。

2. レーザーマイクロダイセクション (LMD)

胎仔の頭蓋底軟骨は静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層、肥大化軟骨細胞層の境界が出生後の軟骨に比べて不明瞭である (図 5 A, B)。特に増殖軟骨細胞層は正確な境界の設定は難しい場合があった。そこで LMD による選択

的切出しは識別が容易な静止軟骨細胞層と肥大化軟骨細胞層で行った (図 5 C, D)。LMD の形態学的判断基準として、密に配列した領域を静止軟骨細胞層、トルイジンブルー染色で異染性を示す肥大した細胞領域を肥大化軟骨細胞層として採取した。低品質の RNA の使用を避けるため二つの軟骨分化層から抽出した total RNA はキャピラリー電気泳動を用いて質的な検定を行った。抽出した total RNA はいずれの場合も 28S-ribosomal RNA のピークに軽度低下を生じたが、28S と 18S の明瞭な 2 つのピークが確認できる total RNA を用いた (図 5 E)。

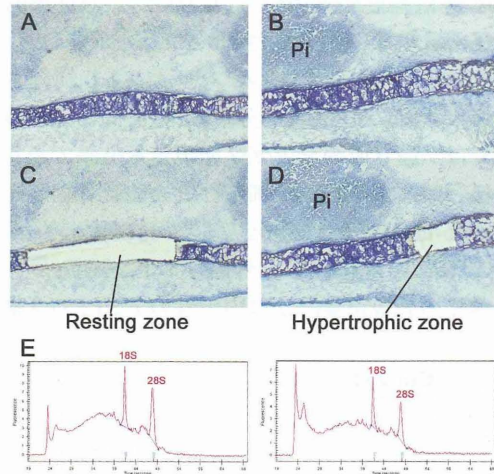


図 5. レーザーマイクロダイセクション (LMD) による軟骨細胞切り出しの所見を示す。

A と C: 静止軟骨細胞の LMD 所見, B と D: 肥大化軟骨細胞の LMD 時所見。

E: それぞれ静止軟骨細胞, 肥大化軟骨細胞から抽出した total RNA のキャピラリー電気泳動所見。18S, 28S はそれぞれ 18S および 28S-ribosomal RNA のピークを示している。

3. 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) による遺伝子発現解析

採取された細胞集団の均一性と得られた cDNA の品質を確認するために、type2 collagen (*Col2a1*) の遺伝子発現を定量した。軟骨器質を構成する *Col2a1* は、形態的に静止軟骨細胞として LMD された細胞群に発現しており、一方で肥大化軟骨細胞として LMD された細胞群においてはわずかな発現が検出されるのみだった (図 6 A)。逆に *Alp* 遺伝子の発現は肥大化軟骨細胞層で認められ、静止軟骨細胞においては軽微な発現が検出されたのみだった (図 7 D)。これらの遺伝子は Wt と Tg マウスにおいて発現のレベルは同等のレベルであった。マーカー遺伝子の明確な発現の分離は形態学的所見に基づく軟骨細胞分化層の LMD が的確に行われたことを分子マーカーレベルで示唆した。

マウス胎仔骨格における内因性 *Fgfr2* 遺伝子発現は従来の In situ hybridization による観察で、軟骨膜から比較的未分化な軟骨細胞、強い発現は骨芽細胞において検

出される。本研究では導入遺伝子の発現様相を正確に把握し、実験結果の意義を正確に解釈するため、内因性と導入 *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子をあわせた *Fgfr2* 遺伝子全転写物の検出、加えて導入 *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子のみの特異的検出を qRT-PCR で行った。Wt マウスの内因性 *Fgfr2* 遺伝子発現は静止軟骨細胞層、肥大化軟骨細胞層の両方で、それぞれおよそ 2 : 1 の比で検出された (図 6 B)。同様に Tg マウスにおいては静止軟骨細胞層、肥大化軟骨細胞層のいずれにおいても Wt の約 3 倍量の *Fgfr2* 遺伝子発現が検出された。これは内因性 *Fgfr2* 遺伝子発現に比べて 2 倍程度の外因性 *Fgfr2IIIc^{P253R}* の付加的発現が遺伝子導入によりもたらされたことを示唆している。*Col2a1* プロモーター/エンハンサーにより制御された外因性導入 *Fgfr2IIIc^{P253R}* 転写産物を特異的に定量検出した結果では、図 6 B の全 *Fgfr2* 発現定量結果で予想されたことに一致し、静止軟骨細胞と肥大化軟骨細胞においておよそ 2 : 1 の割合で *Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現検出された (図 6 C)。これらの解析から、外因性の *Fgfr2IIIc^{P253R}* の軟骨組織内での発現が量的には内因性の *Fgfr2* の 2 倍程度

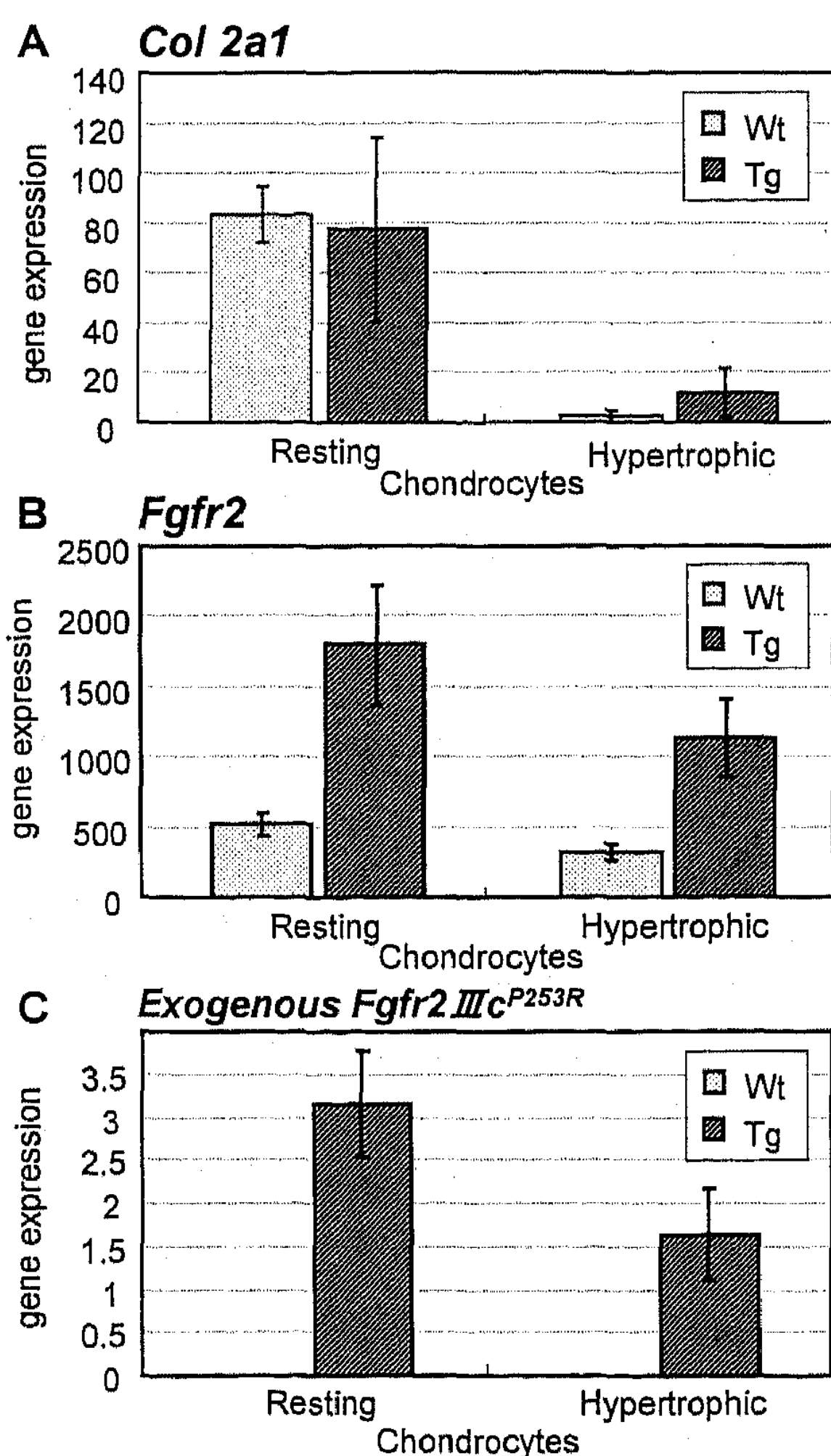


図 6. LMD/qRT-PCR 遺伝子発現定量結果。

A : *Col2a1*, B : 内因性および外因性の *Fgfr2* 両者の総体としての発現レベルを表す。静止および肥大化軟骨細胞の両方で Tg マウスが Wt の約 3 倍の発現レベルを示した。C : 導入 *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子発現を特異的に検出するプライマーで導入遺伝子発現のみを選択的に定量検出した。したがって Wt マウスでは検出されない。導入 *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子の静止および肥大化軟骨細胞間の発現比率は C に示された Wt における内因性 *Fgfr2* のそれに類似していた。エラーバー : 1SD。

あり、軟骨組織内での発現パターンも内因性のそれに近似していることが示された。

Runx2/Cbfa1 遺伝子発現は Wt マウスの頭蓋底では主に肥大化軟骨細胞に検出され、静止軟骨細胞においては低いレベルで発現が検出された。外因性的変異 *Fgfr2IIIc^{P253R}* の付加的な発現を伴う Tg マウス頭蓋底において、静止軟骨細胞と肥大化軟骨細胞の両者に *Runx2/Cbfa1* 遺伝子発現の検出レベルに増加傾向が認められた (図 7 A)。

Indian hedgehog (Ihh) は軟骨細胞の分化後期に関与し軟骨細胞の肥大化前期に限局して発現することから、分化過程での肥大化のマーカーとして用いることができる。Wt マウスにおいては肥大化軟骨細胞に *Ihh* 発現が検出されたが、静止軟骨細胞では発現はほとんど検出されなかった。Tg マウスにおける *Ihh* 発現には明らかな検出レベルの上昇が認められた。Tg マウスの肥大化軟

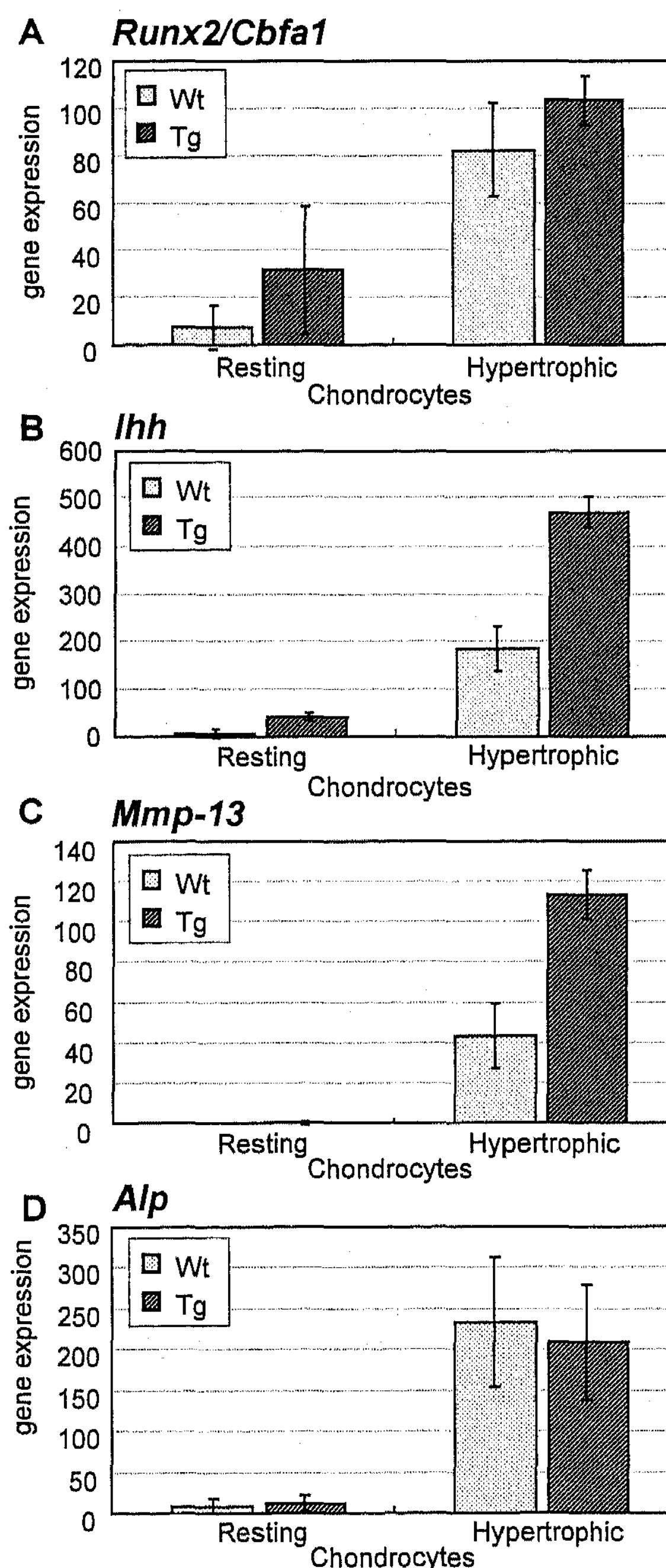


図 7. LMD/qRT-PCR 遺伝子発現定量結果。

A : *Cbfa1/Runx2*, B : *Ihh*, C : *Mmp-13*, D : *Alp*. いずれも肥大化軟骨細胞層において主な検出が認められ、*Alp* を除き Tg マウスの頭蓋底軟骨でより強い発現が認められた。エラーバーは 1SD を示す。

骨細胞層では Wt に対し約 2.5 倍の検出量を示し、静止軟骨細胞でも低レベルであるが *Ihh* の上昇が検出された (図 7B)。

Matrix metalloproteinase 13 (Mmp-13) は軟骨内化骨の過程において軟骨基質分解に関与し、軟骨の肥大化から骨化に向かう軟骨細胞の分子マーカーとして捉えることができる。*Mmp-13* は肥大化層に局限した発現を示し、Tg マウス肥大化軟骨細胞において明瞭な検出レベル上昇が認められた (図 7C)。

アルカリフォスファターゼ (*Alp*) は骨芽細胞のマーカーとして用いられるが、骨化に先立つ肥大化軟骨細胞においても酵素活性が認められる。*Alp* 遺伝子発現解析では、Wt と Tg マウスの肥大化軟骨細胞において発現が検出されたが、外因性の *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子発現に伴う発現傾向の変化は認められなかった (図 7D)。

考 察

この研究で、私たちは FGFR2 シグナリングが胎仔頭蓋底の軟骨細胞の分化と骨形成に与える影響について形態学的観察と共にマーカー遺伝子の発現レベル解析を行った。変異 *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子導入による軟骨細胞内の FGFR2 シグナリング活性化は *Runx2/Cbfa1* の転写量に促進的に作用した。それに伴い、*Runx2/Cbfa1* 発現レベルにより発現に変動を生ずることが知られている *Ihh*¹⁶⁾ と *Mmp-13*¹⁷⁾ 遺伝子に明確な発現上昇が確認された。軟骨量の減少と内軟骨性骨化の加速を示した組織学的所見とともに考えると、FGFR2 シグナリングが軟骨性成長の抑制と内軟骨性骨化の亢進を通じて、内軟骨性の骨格形成に依存する頭蓋底の成長に抑制的な調節作用を有することが示唆された (図 8)。

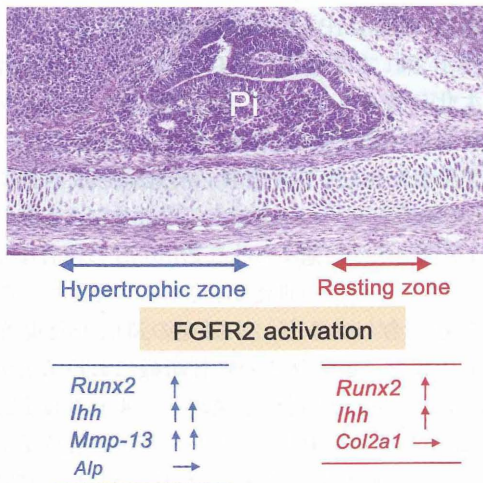


図 8. FGFR2 シグナリング活性化がもたらす遺伝子発現の変化

組織学的所見は *Fgfr2 III c^{P253R}* 発現に伴う内軟骨性化骨過程の促進傾向を示唆している：組織学的観察では胎齢 16 日胎仔頭蓋の蝶形骨体部および後頭骨の骨化開始領域が Tg マウスでは明らかに小さく、この時点で頭蓋底の骨格構成要素に矮小傾向がすでに存在することが示された。さらに骨化の進行と並行して進む頭蓋底の内軟骨性成長の源である蝶形骨間、蝶形-後頭骨間などの軟骨縫合において静止軟骨細胞層の縮小とともに内軟骨性骨化の亢進所見が観察された。これら一連の軟骨の発生および成長の変化は軟骨細胞自体の増殖活性の低下、あるいは軟骨分化の加速による軟骨成長領域の縮小に起因することが考えられる。S-O 縫合正中領域にみられる静止軟骨細胞の退縮がいずれに起因しているかを確定することは難しいが、同腹の Wt に比べて Tg マウス胎仔の S-O 縫合の静止軟骨細胞層が矢状断切片像ですでに上下的に薄い事実は軟骨細胞の増殖活性自体の低下を支持する所見である。実際に、*Fgfr2IIIc* の gain-of-function mutation (C342Y) を用いた gene targeting の結果では、胎齢 14.5 日の胎仔 S-O 軟骨縫合において軟骨細胞の BrdU 標識数の顕著な減少が示されている¹⁴⁾。Tg マウス胎仔において観察された増殖軟骨細胞層の拡大傾向は静止軟骨細胞層からの分化勾配の急化が静止軟骨細胞減少の一因である可能性を示している。隣接する前肥大化軟骨細胞層は Wt マウスにおいては 2 から 3 細胞層であるのに対し Tg マウスでは 1 から 2 細胞層へ圧縮傾向がみとめられた。それに続く肥大化軟骨細胞層の幅自体に明確な違いを指摘できなが、Tg マウスの肥大化軟骨細胞層の単位面積あたりの細胞数は Wt マウス胎仔にくらべて平均 26% の減少が見られた。これらの組織像所見に加えて、内軟骨性化骨の開始以降に頭蓋底の矮小化が顕著化する事実は軟骨細胞肥大化と骨化の過程にも変異 *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子発現が促進的な調節作用を及ぼす可能性を示している。

骨化開始時の蝶形骨領域の縮小について、その他に考えられる原因として FGFR2 シグナリングによる軟骨細胞の細胞死の増加による細胞数の減少があげられる。しかし私たちが行った TUNEL 標識では胎齢 15 日胎仔の頭蓋底軟骨細胞のアポトーシスは Wt, Tg マウスともにほとんど検出されなかった (データ非表示)。これらを勘案すると、組織学的所見から *Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現による FGFR2 シグナリング活性化は頭蓋底軟骨細胞の増殖と分化の両面において、それぞれ抑制的と促進的な作用を有することが考えられる。

遺伝子発現解析は *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子発現による軟骨細胞分化促進を示唆した：FGFR2 の S252W あるいは P253R 変異はレセプター分子のライガンドに対する親和性と特異性に变化をもたらす^{8, 18)}。発生や成長過程にお

いては精緻に制御された FGF 分子とそのレセプター分子の組織内発現パターンが重要な調節的役割を果たすと考えられている。それらの発現パターンや親和性の変化によって引き起こされるライガンド-受容体間の相互関係の乱れは、発生および成長過程における FGFR2 シグナリングの活性化に強度的、時間的あるいは位置的異常をもたらす、これが Apert 症候群などの患者に見られる骨格その他の複雑な異常を生ずると考えられる¹¹⁾。これまでおもに骨芽細胞系における FGFR2 シグナリングの作用が着目され研究がなされてきた。しかし、FGFR2 遺伝子変異に起因する早期頭蓋縫合癒合症候群においては臨床的に無視できない主に頭蓋の内軟骨性発生と成長の異常が存在している^{12, 19)}。近年の *Fgfr2* 遺伝子 gene targeting による分子機能解析においては FGFR2 シグナリングが骨芽細胞の増殖と分化に促進的に作用することが示されている。同時にこれらの研究において、頭蓋底軟骨縫合の早期癒合を含む軟骨組織の異常についても指摘がなされた¹³⁻¹⁵⁾。従来の In situ hybridization (ISH) による検出において骨格系では骨芽細胞と未分化な軟骨系細胞に *Fgfr2* の発現が主に認められ、分化した軟骨細胞では微少な発現のみが提示されている。しかし、私たちの LMD/qRT-PCR 解析では内因性 *Fgfr2* 発現が軟骨内で安定して検出されたことに加えて、いくつかの *Fgfr2* gene targeting 実験において示された軟骨組織の異常と考え合わせると、軟骨性の発生と発育に依存する頭蓋底において FGFR2 シグナリング異常活性化が Apert 症候群の病態形成に重要な役割を有する可能性を想起できるであろう。

本研究では骨、軟骨系細胞で機能するいくつかの遺伝子発現の変動の局面から導入した *Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現による FGFR2 シグナリング活性化が頭蓋底軟骨に及ぼす影響を検討した。*Runx2/Cbfa1* は未分化な骨芽細胞および軟骨細胞の分化に対して促進的作用を有し、骨格の形成において基本的な転写因子である。その軟骨細胞における機能は軟骨細胞の肥大化から軟骨内化骨に及ぶプロセスに関与しているとされる²⁰⁻²²⁾。骨芽細胞に比べ軟骨細胞では発現が微弱であるが、LMD/qRT-PCR 解析によると静止軟骨細胞、肥大化軟骨細胞の両方で *Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現に伴う *Runx2/Cbfa1* 発現の変化を明確に検出することができた。*Runx2/Cbfa1* は軟骨組織内では肥大化軟骨細胞での発現が主であるが、FGFR2 シグナリングの活性化に伴い静止軟骨細胞層においても発現の増加が誘発された。Wt および Tg マウスの頭蓋底の軟骨と内軟骨性骨化の変化および遺伝子発現レベルの推移から、Tg マウスの頭蓋底軟骨細胞は肥大化に向かう分化勾配の急化を内包することが予想される。組織学的所見で示された Tg マウスにおける静止軟骨細胞層の退縮と骨化の亢進所見がこれを反映するといえるであろう。過

去の gene targeting による *Fgfr2IIIc* の loss-of-function あるいは gain-of-function mutation によって、骨芽細胞を含む骨組織の *Runx2/Cbfa1* 発現がそれぞれ減少と増加を結果することが確認されている^{13, 14)}。これらの結果と一致して、私たちのデータは FGFR2 シグナリング活性化が軟骨細胞においても *Runx2/Cbfa1* 発現亢進に作用することを示すものである。

Ihh は主に前肥大化層において発現し、PTHrP を介して軟骨細胞の肥大化を抑制する。この *Ihh* による分化制御は増殖能を有する肥大化前の分化段階にある細胞の維持と供給にかかわると考えられている^{23, 24)}。*Ihh* 遺伝子上の制御領域には複数の *Runx* 結合部位が予測され、in vitro 系のプロモーター解析によっても *Runx2/Cbfa1* 発現による顕著な *Ihh* 発現の亢進が確認されている。同様に Gene targeting 実験においても *Runx* ファミリー遺伝子発現による *Ihh* 発現の誘導が示されており、軟骨細胞の増殖と成熟におけるこれらの分子間の機能による制御が予想されている¹⁶⁾。本研究において *Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現に伴い Tg マウス頭蓋底軟骨に検出された *Runx2/Cbfa1* 発現の亢進と *Ihh* 遺伝子発現量の増加が同一の相互作用に起因する可能性がある。Tg マウスにおいて観察された頭蓋底軟骨の組織像所見と共に考え合わせると、*Ihh* 遺伝子発現の検出量増加は *Runx2/Cbfa1* 機能亢進によって肥大化へ向かう軟骨細胞の分化勾配の急化に伴う *Ihh* 発現細胞数の割合の増加によるもの、あるいは *Runx2/Cbfa1* による *Ihh* 遺伝子に対する直接的な転写誘導作用を反映しているものとも考えられる。

軟骨発生過程において *Mmp-13* は軟骨細胞肥大化に伴い発現が観察される。*MMP-13* は軟骨細胞肥大化に際して MMP-2 による活性化を経ることによって軟骨基質の分解とそれに続く骨化過程において役割を有すると考えられている²⁵⁾。*Mmp-13* プロモーター上の *Cbfa1* 結合モチーフへの *Cbfa1* の直接的作用が骨芽細胞と軟骨細胞において MMP-13 の誘導に関わることが in vitro 解析系で示されている。さらに *Cbfa1*^{-/-} マウス胎仔の軟骨肥大化に伴う *Mmp-13* 発現の消失と共に、成熟した骨芽細胞の分化が阻害される事実は *Runx2/Cbfa1* が *Mmp-13* 発現を介して内軟骨性の骨組織形成過程に影響することの証である¹⁷⁾。一方で FGF2 添加による軟骨系あるいは骨芽細胞系の細胞における *Mmp-13* の顕著な発現誘導についてもいくつかの研究で示されている^{26, 27)}。これらのことを考え合わせると、本研究の遺伝子発現解析の結果で示された Tg マウスの軟骨組織における *Runx2/Cbfa1* および *Mmp-13* 遺伝子発現レベル亢進は *Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現による FGFR2 シグナリング活性化が *Runx2/Cbfa1* を介して軟骨最終分化の過程における MMP-13 の機能に促進的な変化をもたらしたことを示していると考えられる。

結語

導入 *Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現によりもたらされる胎仔頭蓋軟骨内における FGFR2 シグナリングの活性化は軟骨細胞の分化秩序を破壊させるまでにいたらなかったが、その過程を修飾することによって頭蓋顔面の発育に比較的顕著な形態異常をもたらした。これらの所見は軟骨細胞における FGFR2 シグナリング活性化が軟骨細胞の分化過程に決定的な影響を及ぼすものでなく、軟骨分化過程への比較的穏やかな修飾を通じて骨組織形成、特に頭蓋の形態形成と発育に症状としては顕著な影響を及ぼすことを示している。今回、*Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現により検出された分子機能の変化のなかでもっとも上流に位置するものと考えられる *Runx2/Cbfa1* の発現レベル変動は静止軟骨細胞層と肥大化軟骨細胞層の両方で観察され、FGFR2 シグナリングが軟骨細胞の広い分化段階で *Runx2/Cbfa1* の機能を介して影響を及ぼす可能性が提示された。結論として、従来の研究で示されてきた骨芽細胞に対する作用と共に考えあわせると、FGFR2 シグナリングが骨芽細胞系と軟骨細胞系の分化を統合的に調節することによって、骨格形成、なかでも頭蓋顔面の形態形成と発育において重要な役割を担っていることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に当たりご指導をいただいた新潟大学医歯学系顎顔面口腔外科学分野ならびに口腔解剖学分野の皆様にご心から深謝申し上げます。

本研究の一部は平成 14-15 年日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究 C，課題番号 14571883）によって行われた。またこの論文の内容の一部は第 45 回日本歯科基礎医学会（2003 年 9 月，盛岡市），第 46 回歯科基礎医学会学術大会 若手サテライトシンポジウム（2004 年 9 月，広島市），平成 16 年度新潟歯学会第 2 回例会（2004 年 11 月，新潟市）において発表した。

文 献

- 1) Reardon W., Winter R. M. et al: Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet*, 8: 98-103, 1994.
- 2) Wilkie A. O. M., Slaney S. F. et al: Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet*, 9: 165-172, 1995.
- 3) Rutland P., Pulleyn L. J. et al: Identical mutations in the FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. *Nat Genet*, 9: 173-176, 1995.
- 4) Schell U., Hehr A. et al: Mutations in FGFR 1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. *Hum Mol Genet*, 4: 323-328, 1995.
- 5) Nuckolls G. H., Shum L. et al: Progress toward understanding craniofacial malformations. *Cleft Palate Craniofac J*, 36: 12-26, 1999.
- 6) Slaney S. F., Oldridge M. et al: Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. *Am J Hum Genet*, 58: 923-932, 1996.
- 7) Anderson J., Burns H. D. et al: Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Human Mol Genet*, 7: 1475-1483, 1998.
- 8) Yu K., Herr A. B. et al: Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 14536-14541, 2000.
- 9) Oldridge M., Zackai E. H. et al: De Novo Alu-Element Insertions in FGFR2 Identify a Distinct Pathological Basis for Apert Syndrome. *Am J Hum Genet*, 64: 446-461, 1999.
- 10) Hajihosseini M. K., Wilson S. et al: A splicing switch and gain-of-function mutation in *Fgfr2-IIIc* hemizygotes causes Apert/Pfeiffer-syndrome-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3855-3860, 2001.
- 11) Yu K., Ornitz D. M.: Uncoupling fibroblast growth factor receptor 2 ligand binding specificity leads to Apert syndrome-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3641-3643, 2001.
- 12) Kreiborg S., Pryds U. et al: Clinical conference I. Calvarium and cranial base in Apert's syndrome: an autopsy report. *Cleft Palate J*, 13: 296-303, 1976.
- 13) Eswarakumar V. P., Monsonego-Ornan E. et al: The IIIc alternative of *Fgfr2* is a positive regulator of bone formation. *Development*, 129: 3783-3793, 2002.
- 14) Eswarakumar V. P., Horowitz M. C. et al: A gain-of-function mutation of *Fgfr2c* demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 12555-12560, 2004.
- 15) Yu K., Xu J. et al: Conditional inactivation of

- FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development*, 130: 3063-3074, 2003.
- 16) Yoshida C.A., Yamamoto H., et al: Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*, 18(8): 952-63, 2004.
 - 17) Jimenez M. J., Balbin M. et al: Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol*, 19: 4431-42, 1999.
 - 18) Anderson J., Burns H.D., et al: Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Human Mol Genet*, 7: 1475-1483, 1998.
 - 19) Park S., Takushima A.: Median cleft of the lower lip, mandible and manubrium. A case report. *J Craniomaxillofac Surg*, 21: 189-91, 1993.
 - 20) Ueta C., Iwamoto M. et al: Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol*, 153: 87-100, 2001.
 - 21) Takeda S., Bonnamy J. P. et al: Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev*, 15: 467-481, 2001.
 - 22) Enomoto H., Enomoto-Iwamoto M. et al: Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem*, 275: 8695-8702, 2000.
 - 23) St-Jacques B., Hammerschmidt M. et al: Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*, 13: 2072-2086, 1999.
 - 24) Karp S. J., Schipani E. et al: Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development*, 127: 543-548, 2000.
 - 25) D'Angelo M., Yan Z. et al: MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy. *J Cell Biochem*, 77: 678-93, 2000.
 - 26) Uria J. A., Balbin M. et al: Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol*, 153: 91-101, 1998.
 - 27) Varghese S., Rydziel S. et al: Basic fibroblast growth factor stimulates collagenase-3 promoter activity in osteoblasts through an activator protein-1-binding site. *Endocrinology*, 141: 2185-91, 2000.