

氏名 せき ゆきえ 関 雪絵
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 12 号
学位授与の日付 平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 3 条第 3 項該当
博士論文名

FGFR2 シグナリング活性化が胎仔頭蓋の軟骨分化に及ぼす影響と分子機構の検討

論文審査委員 主査 教授 高木 律男
副査 教授 前田 健康
教授 齋藤 力

博士論文の要旨

線維芽細胞増殖因子受容体 2 型 (FGFR2) の一定部位に起こる突然変異が頭蓋縫合早期癒合症を引き起こすことが報告されている。そのひとつである Apert 症候群は頭蓋縫合の早期癒合、尖頭症、上顎と頭蓋底前方部の劣成長など頭蓋顔面の骨形成異常に起因する特徴的な病態を呈する。この疾患の原因遺伝子として、主にセリン 252 トリプトファン、あるいはプロリン 253 アルギニンの活性型ミスセンスが知られている。FGFR2 変異の結果、骨細胞の分化亢進が示されているが、その下流の機構については十分に解明されていない。また、FGFR2 の骨・軟骨での広範な発現にもかかわらず、頭蓋の形成・発育に果たす役割は定義されていない。この研究では、胎仔軟骨頭蓋内における FGFR2 の活性化が頭蓋顔面の発育におよぼす影響と分子機構の一端について示すことを目的とした。

実験動物として Apert 症候群型変異 Fgfr2 遺伝子 (Fgfr2^{IIIc-P253R}) を Col2a1 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を用いた。野生型 (Wt) とトランスジェニックマウス (Tg) について胎齢 15、16 日胎仔頭部を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋または 5% アクリルアミド樹脂包埋したのち、ヘマトキシリン-エオジンまたはアルカリフオスファターゼ染色した。また、Wt、Tg の胎齢 15 日胎仔頭部を無固定凍結包埋し、Laser Microdissection 法 (LMD) で、頭蓋底部の軟骨細胞を静止層、肥大化層の分化段階に分けて採取し、定量的リアルタイム PCR 法 (qRT-PCR) 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。

胎齢 16 日頭蓋底横断切片では、Tg の蝶形-後頭軟骨縫合における静止軟骨細胞の明らかな退縮に対して、増殖、前肥大化、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、Tg の各軟骨細胞層の配列には若干の乱れが確認された。

胎齢 15 日頭蓋底矢状断切片では、Tg において頭蓋底軟骨全般の厚みが減少し、前後的にも短小化が見られた。特に増殖軟骨細胞層が減少し、その表面に骨芽細胞の分化が拡大していた。後頭骨部では bone collar の形成と血管の侵入がすすみ、骨化過程の早期化が示唆された。同様の切片のアルカリフオスファターゼ活性は Wt と Tg で明らかな差異はなかった。

LMD と qRT-PCR による遺伝子発現解析の結果は、type2 collagen は静止層に、一方 type1 collagen は肥大化層に発現が確認され、LMD の確からしさを示唆していた。続いて、Fgfr2 遺伝子は静止層、肥大化層両方に発現が認められた。Tg での発現上昇は導入した *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子の付加によると考えられた。さらに導入した *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子を選択的に検出した結果、Tg で内因性の *Fgfr2* に類似した発現パターンが確認された。

Runx2/Cbfa1 は骨細胞分化の機能を制御と同時に、軟骨細胞の分化にも重要である。Wt に比し、Tg では静止層と肥大化層において発現の亢進が認められた。*Ihh* は軟骨細胞の分化後期に関与し、Tg の肥大化層に著明な発現上昇が認められることから、*Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現が主に肥大化軟骨細胞で *Ihh* 発現の亢進を引き起こすことが示された。一方、軟骨の最終分化段階の骨化過程に重要な *Mmp-13* は、*Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現にともない、*Ihh* 同様に肥大化層での活性化が示された。

Alp については、Wt と Tg に明らかな差異は認められず、この結果と形態学的所見から、軟骨細胞内での *Fgfr2* シグナリング活性化は骨細胞系そのものの分化には影響を与えていないことが示唆された。

この研究結果において、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* の転写量を促進し、さらに *Ihh* と *Mmp-13* 遺伝子に明確な発現上昇が確認された。軟骨量の減少を示す組織学的所見と合わせると、FGFR2 シグナリングが軟骨細胞の増殖抑制と分化亢進を通じて、内軟骨性の骨格形成に依存する頭蓋底の成長に対し抑制的な調節作用を有することを示唆している。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関わることを示している。従来 *Fgfr2IIIc* gene targeting における *Runx2/Cbfa1* を介した骨形成への促進的作用と合わせると、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制御し、骨格形成、特に頭蓋顔面の形態形成と発育に関与する機構の存在が示唆された。

審査結果の要旨

線維芽細胞増殖因子受容体 2 型 (FGFR2) の一定部位に起こる突然変異が頭蓋縫合早期癒合症を引き起こすことが報告されている。そのひとつである Apert 症候群は頭蓋縫合の早期癒合、尖頭症、上顎と頭蓋底前方部の劣成長など頭蓋顔面の骨形成異常に起因する特徴的な病態を呈する。この疾患の原因遺伝子として、主にセリン 252 トリプトファン、あるいはプロリン 253 アルギニンの活性型ミスセンスが知られている。FGFR2 変異の結果、骨細胞の分化亢進が示されているが、その過程にみられる下流の機構については十分に解明されていない。また、FGFR2 の骨・軟骨での広範な発現にもかかわらず、頭蓋の形成・発育に果たす役割は定義されていない。

この研究では、胎仔軟骨頭蓋内における FGFR2 の活性化が頭蓋顔面の発育におよぼす影響と分子機構の一端について示すことを目的とした。

実験動物として Apert 症候群型変異 *Fgfr2* 遺伝子 (*Fgfr2IIIc-P253R*) を *Col2a1* 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を用いた。

野生型 (Wt) とトランスジェニックマウス (Tg) について胎齢 15、16 日胎仔頭部を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋または 5% アクリルアミド樹脂包埋したのち、ヘマトキシリンエオジンまたはアルカリフオスファターゼ染色した。また、Wt、Tg の胎齢 15 日胎仔頭部を無固定凍結包埋し、Laser Microdissection 法 (LMD) で、頭蓋底部の軟骨細胞を静止層、肥大

化層の分化段階に分けて採取し、定量的リアルタイム PCR 法 (qRT-PCR) 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。

胎齢 16 日頭蓋底横断切片では、Tg の蝶形-後頭軟骨縫合における静止軟骨細胞の明らかな退縮に対して、増殖、前肥大化、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、Tg の各軟骨細胞層の配列には若干の乱れが確認された。

胎齢 15 日頭蓋底矢状断切片では、Tg において頭蓋底軟骨全般の厚みが減少し、前後的にも短小化が見られた。特に増殖軟骨細胞層が減少し、その表面に骨芽細胞の分化が拡大していた。後頭骨部では bone collar の形成と血管の侵入がすすみ、骨化過程の早期化が示唆された。同様の切片のアルカリフォスファターゼ活性は Wt と Tg で明らかな差異はなかった。LMD と qRT-PCR による遺伝子発現解析の結果は、type2 collagen は静止層に、一方 type1 collagen は肥大化層に発現が確認され、LMD の確からしさを示唆していた。続いて、Fgfr2 遺伝子は静止層、肥大化層両方に発現が認められた。Tg での発現上昇は導入した *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子の付加によると考えられた。さらに導入した *Fgfr2IIIc^{P253R}* 遺伝子を選択的に検出した結果、Tg で内因性の *Fgfr2* に類似した発現パターンが確認された。

Runx2/Cbfa1 は骨細胞分化の機能を制御と同時に、軟骨細胞の分化にも重要である。Wt に比し、Tg では静止層と肥大化層において発現の亢進が認められた。*Ihh* は軟骨細胞の分化後期に関与し、Tg の肥大化層に著明な発現上昇が認められることから、*Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現が主に肥大化軟骨細胞で *Ihh* 発現の亢進を引き起こすことが示された。一方、軟骨の最終分化段階の骨化過程に重要な *Mmp-13* は、*Fgfr2IIIc^{P253R}* 発現にともない、*Ihh* 同様に肥大化層での活性化が示された。

Alp については、Wt と Tg に明らかな差異は認められず、この結果と形態学的所見から、軟骨細胞内での *Fgfr2* シグナリング活性化は骨細胞系そのものの分化には影響を与えていないことが示唆された。

この研究結果において、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* の転写量を促進し、さらに *Ihh* と *Mmp-13* 遺伝子に明確な発現上昇が確認された。軟骨量の減少を示す組織学的所見と合わせると、FGFR2 シグナリングが軟骨細胞の増殖抑制と分化亢進を通じて、内軟骨性の骨格形成に依存する頭蓋底の成長に対し抑制的な調節作用を有することを示唆している。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関わることを示している。従来の *Fgfr2IIIc* gene targeting における *Runx2/Cbfa1* を介した骨形成への促進的作用と合わせると、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制御し、骨格形成、特に頭蓋顔面の形態形成と発育に関与する機構の存在を示唆するもので、学位論文としての価値を認める。