

学位研究紹介

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

Molecular mechanisms of abnormal chondrocyte differentiation in the fetal cranial base by aberrant activation of the FGFR2 signaling

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
口腔健康科学講座 顎顔面口腔外科学分野
関 雪絵
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
Yukie Seki

【目 的】

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¹⁻⁵⁾。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、またプロリン 253 アルギニンの活性型ミスセンスが知られている⁶⁻⁸⁾。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解明が十分ではない。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。

【材料と方法】

実験動物として、National Institutes of Health, National Institutes of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases より分与を受けた Apert 症候群型変異 Fgfr2 遺伝子 (Fgfr2 c-P253R) 導入トランスジェ

ニックマウスを用いた。

形態学的には、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ォスファターゼ染色を行った。分子生物学的には、Wt, Tg の胎齢 15 日胎仔の頭部を無固定凍結包埋したのち、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、real time PCR 法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。

【結 果】

胎齢 16 日頭蓋底横断面切片では、Tg の蝶形 - 後頭軟骨縫合 (S-O) 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 (図 1)。

胎齢 15 日頭蓋底中央付近の矢状断切片では、Tg において全般に厚みが減少し、前後的にも短小化が見られた。特に増殖軟骨細胞層の厚みが減少し、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 (図 2)。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 real time PCR 法による遺伝子発現解析の結果は、type 2 collagen は静止層に、一方 type 1 collagen は肥大化層に発現が確認された。

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 Fgfr 2 IIIc^{P253R} 遺伝子を選択的に検出した結果、Wt では発現が全く認められず、Tg で内因性の Fgfr2 に類似した発現パターンが確認された (図 3)。

Runx2 は骨細胞の分化と機能を制御すると同時に、軟骨細胞の分化にも重要な役割を果たす。Wt では肥大化層で発現しているが、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、その増殖や分化に重要であるとともに軟骨細胞肥大化のマーカーとしても有用である。Tg の肥大化層に著明な発現上昇が認められることから、

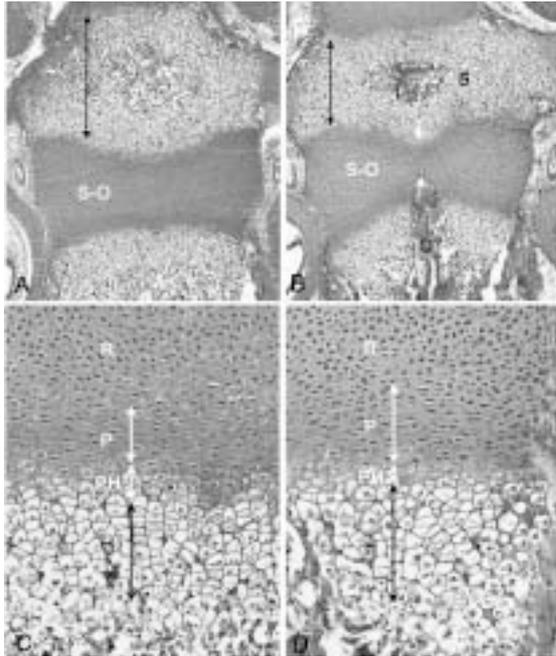


図1 胎齢16日頭蓋底の横断切片所見。
 A, C:野生型マウス (Wt), B, D:トランスジェニックマウス (Tg)
 Tg マウスでは蝶形骨体部 (S) の骨化中心と周囲の肥大化軟骨細胞の前後径が Wt に比べて短い (黒両頭矢印)。Tg マウスの蝶形 - 後頭軟骨縫合 (S-O) 中央線付近においては静止軟骨細胞層が消失し蝶形骨体部 (S) と後頭骨体部 (O) から、それぞれ肥大化軟骨細胞と骨膜の侵入 (双白矢印) が見られる。
 C および D : A および B の拡大像。Tg マウスでは増殖軟骨細胞層 (P) の範囲の拡大と前肥大化軟骨細胞層 (PH) の圧縮が観察された。Wt 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。

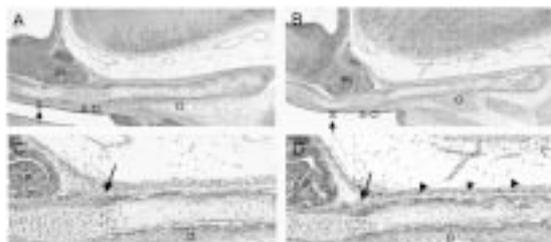


図2 胎齢15日 Wt マウス胎仔 (A および C), Tg マウス胎仔 (B および D) の頭蓋底矢状断切片。
 C および D にそれぞれ A および B の後頭骨前部 (O) の拡大像を示す。全般に Tg マウスの頭蓋底骨格は Wt のそれに比べて厚みが少ない。Tg マウスの蝶形 - 後頭軟骨縫合 (S-O) は増殖軟骨細胞層においてややくびれ、その表面よりエオジン好性の骨芽細胞の増生が認められた (図2D, 黒矢印)。Tg マウス胎仔後頭骨 (O) 領域では肥大化軟骨細胞の外表面に Wt マウスに比べて進行した骨基質形成と血管の侵入からなる bone collar の形成が確認できる (図2D, 黒矢頭)。Pi, 下垂体; S, 蝶形骨領域。

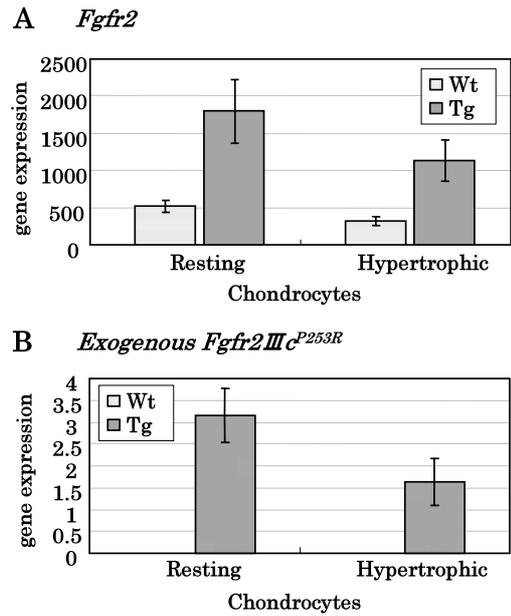


図3 遺伝子発現定量結果。
 A, 内因性および導入遺伝子に由来する Fgfr2 遺伝子発現の総体を定量検出した。B, 導入 Fgfr2IIIcP253R 遺伝子発現を特異的プライマーによって選択的に定量検出した。エラーバーは 1SD を示す。

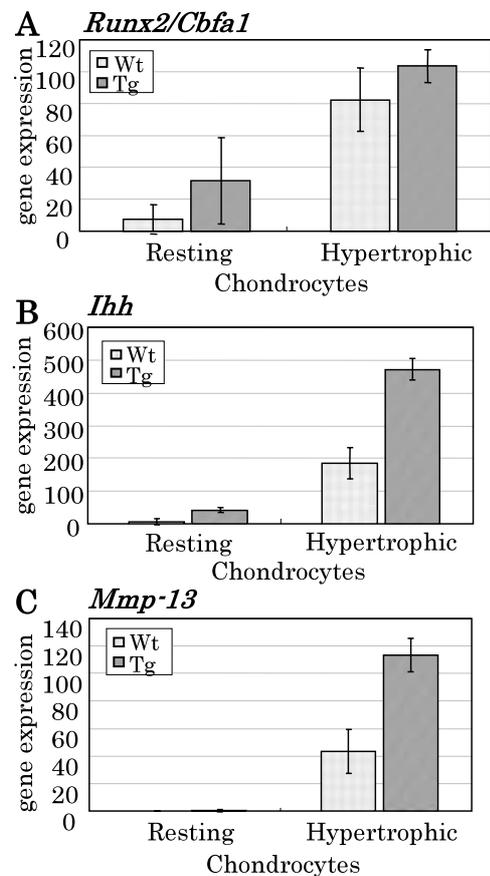


図4 遺伝子発現定量結果。A, Cbfa1; B, Ihh; C, Mmp-13。エラーバーは 1SD を示す。

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、Fgfr 2 IIIc^{P253R} 発現にともない、同様に肥大化層での活性化が示された (図 4)。

Alp については、Wt と Tg に明らかな差異は認められなかった。

【考 察】

これまでの結果から、軟骨内の FGFR2 シグナリング活性化は Runx2 発現上昇を介して、そのターゲットである Ihh, Mmp-13 の上昇に反映される軟骨分化を促進するメカニズムの存在が示唆された。この作用は、Ihh 発現を抑制するとされる FGFR3 シグナリングと正反対に、軟骨内仮骨への分化を加速する役割が考えられた。また、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。

さらに、この FGFR2 活性化の軟骨における作用は骨芽細胞系分化促進作用と協調して Apert 症候群の複雑な病態を形成すると考えられ、FGFR2 活性は頭蓋顔面の発育を修飾し、今後組織再生や診断において重要な因子であると考えられた。

【参 考 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 FGFR1 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.

1) Reardon W., Winter R. M. et al: Mutations in the