

研究者：窪田えりか（所属：東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 医歯学系
専攻 博士課程 小児歯科学分野）

研究題目：塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF2）の頭蓋冠骨形成における作用機序の解明

目的：

骨形成は口蓋裂や頭蓋冠早期癒合症といった先天性疾患において治療に深く関わる問題であり、骨芽細胞分化の分子メカニズムの解明は疾患の機序の解明にとどまらず治療への貢献も期待できる。しかし、骨形成には多様なシグナル伝達回路が関与しており、未だ不明な部分も多い。FGF2が骨形成へ影響を与えることはよく知られており、特に歯科領域においては骨形成因子2（BMP2）とともに骨形成誘導の臨床応用を目指した研究が精力的に行われているタンパク質である。本研究の目的は膜性骨化によって発生するマウス頭蓋冠にFGF2を作用させた際の線維芽細胞増殖因子受容体（Fgfr）及び骨形成関連遺伝子の発現を解析し、頭蓋顎顔面骨の発生における線維芽細胞増殖因子と受容体の発現の関係を明らかにすることにより、頭蓋顎顔面骨形成に異常をきたす疾患の原因を理解することである。

対象および方法：

1. マウスを用いた胎児子宮体外手術法

C57BL/6J 野生型マウス胎齢15.5日胚の冠状縫合部に子宮体外胎児手術法にてFGF2（Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA）に浸漬したヘパリンコートアクリルビーズ（diameter 250-300 μ m, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を埋入し、48時間経過後にサンプリングを行った。頭部を凍結包埋し（OCTコンパウンド、サクラファインテックジャパン）、クライオスタットにより冠状断にて凍結組織切片を作成した。

2. 細胞培養

KUSA-O細胞（骨芽細胞前駆細胞系統株）を用いたin vitro実験を行った。10% FBS添加 α -MEM培地にてコンフルエントまで培養したのち、石灰化誘導培地（10% FBS, 10mM β グリセロリン酸, 0.28mM アスコルビン酸 2-リン酸含有 α -MEM培地）にて2週間培養した。

3. マウス切片に対する in situ hybridization 法

線維芽細胞増殖因子受容体〔Fgfr1, Fgfr2, Fgfr3 (IIIc splice variant whole cDNA)〕、マウス骨基質蛋白（Bsp）のセンス鎖・アンチセンス鎖RNAプローブをRNAポリメラーゼ（Roche Diagnostics GmbH, Germany）を用いて、ジゴキシゲニン（DIG）ラベル法にて作成した。ハイブリダイゼーション後にニトロブルーテトラゾリウム（NBT）/ 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 p-トルイジン塩（BCIP）（Roche Diagnostics GmbH, Germany）法にて免疫組織学的にDIGを検出し、発色を観察した。

4. リアルタイム PCR 法

KUSA-O 培養細胞からセバゾール RNA I (nacalai tesque, Japan) を用いてプロトコールに則って RNA を抽出し、逆転写酵素 (ReverTra Ace qPCR RT Master Mix) を用いて相補的 DNA (cDNA) を合成した。SYBR Green I 検出系を用いて cDNA に対し 3 ステップサイクルにてリアルタイム PCR を行った (KOD SYBR qPCR Mix, TOYOBO CO., JAPAN / LC96 Roche)。PCR に使用したプライマー配列は以下の表に示した。

genename	primer	
	Forward	Reverse
gapdh	GAACGGATTTGGCCGTATTG	AATGAAGGGGTCGTTGATGG
Colla1	GGCCAAGAAGACATCCCTGA	AAGCATACCTCGGGTTTCCA
Fgfr1	CTCTGGGGTTCTCCTGGTTC	GCCAAGTGGTTTGCCTAAGA
Fgfr2	TTCCCCAGAGATAAGCTGACG	GCCTCCTTGGGTTTGTCTTT
Fgfr3	TGCTTTGGACAGGTGGTCAT	TCAGTCGCATCATCTTTCAGC

結果および考察：

1. マウス 15.5 日胚の頭蓋冠冠状縫合部に 300ng/ul の FGF2 を浸漬したヘパリンアクリルビーズを埋入し、48 時間後の BSP 及び Fgfr1-3 の発現部位を in situ hybridization 法にて観察した結果、骨基質蛋白のマーカー分子である BSP はビーズ直下 (頭蓋冠冠状縫合部) において発現が著明に低下し、骨芽細胞分化が阻害されたことが示唆された。受容体である Fgfr1 はビーズ周囲の間葉細胞において発現の亢進を強く認め、ビーズ直下においてその発現レベルはやや低下し、局在が不明瞭になった。Fgfr2、Fgfr3 はビーズ直下において、ほぼその発現が認められなくなった。これらのことより、FGF2 が冠状縫合部に生体の通常時よりも多量に存在すると、同部位の骨芽細胞分化のバランスは分化抑制に働くことが示唆された。
2. 培養細胞を用いた実験においては、リアルタイム PCR 法により、石灰化誘導開始後 2 週間において骨芽細胞分化マーカーである Colla1 の発現レベルが上昇し、アリザリンレッド染色とその定量解析により、石灰化が開始していることを確認した。この際、Fgfr1-3 すべての遺伝子発現レベルが増加し、特に Fgfr3 発現レベルの変化は約 80 倍の増加を認めた。これらの結果より、骨芽細胞が分化する際、石灰化に伴って Fgfr1-3 の発現レベルが上昇することが明らかとなった。

培養細胞を用いた骨芽細胞の分化過程において Fgfr1-3 遺伝子の発現レベルが上昇したことから、FGF2 の生体における作用の結果については、骨芽細胞において FGF2 の強いシグナルが存在するとフィードバック調節によって受容体遺伝子の発現抑制が起きたと推察された。また、軟骨細胞のマーカー分子として使用される Fgfr3 が骨芽細胞分化における石灰化段階に重要な役割を果たしていることが示唆されたため、今後 Fgfr3 のノックアウトマウスを用いて子宮体外手術法により野生型マウスで行ったものと同様の実験を行うとともに、頭蓋冠縫合部の間葉系幹細胞のマーカーである Gli1 発現細胞の局在やその存在などを観察し、FGF シグナルの骨芽細胞分化への関与について検討を継続する予定である。

成果発表：

第 59 回日本先天異常学会 ポスター発表（予定）

学会発表を通じてより考察を深めたうえで論文発表を行う予定である。本研究は頭蓋顎顔面骨の発生における分子生物学的なメカニズムの解明をすることで、先天性頭蓋冠早期癒合症など頭蓋冠骨形成に異常をきたす疾患では直接的に議論の一助となることが見込まれる。