

顎顔面形態形成に関わる FGF-8の解析

山本 康弘

線維芽細胞増殖因子 (FGF) の一つである FGF-8は後脳や四肢の発生過程において重要な役割を演じている。本研究では、発生時の顎顔面の形態形成過程で発現している分泌性タンパク質 FGF-8に注目し、その発現パターンと機能をニワトリ胚で調べた。正常胚において FGF-8は鼻窩辺縁と上顎隆起の下顎隆起側縁に発現していた。また、胚発生の途中の段階で、レトロウイルスベクターを介して FGF-8を片側上顎隆起に過剰持続発現させた。その結果、これらの個体には FGF-8の過剰発現した側へ上顎が湾曲する表現型が生じた。これらの個体では骨組織、特に palatine bone, maxillary bone, jugal の欠損または低形成をきたしていたが、軟骨には欠損や低形成は起こらず、逆に眼窩下方上顎部で異所性の軟骨組織が形成されていた。これらの硬組織の変化に対し、二次口蓋の裂幅は変わらず、FGF-8は軟部組織の形成には影響していなかった。これらの結果から、FGF-8は顎顔面形態形成で重要な機能を持っており、過剰な FGF-8は発生過程の骨形成に対しては抑制的に、軟骨形成に対しては促進的に働くことが判明した。(平成17年10月7日受理)

Role of FGF-8 in Bone Formation During Orofacial Development of the Chicken Embryo

Yasuhiro YAMAMOTO

FGF-8, a member of the fibroblast growth factor (FGF) family, plays a key role in development of the hindbrain and limbs, and is also expressed in the developing face. The expression pattern of FGF-8 and its function were examined in the chick embryo. FGF-8 is expressed in epithelial cells of the nasal fossa, and of the side edges of the lower and upper jaws in normal embryos. When FGF-8 was misexpressed with the retrovirus vector at stage 20 in the maxillary prominence, the upper jaw curved to the side of misexpression without change in facial width. Loss or hypoplasia of palatine bone, maxillary bone, and jugal was frequently observed. Loss or hypoplasia of cartilage elements was not observed, but ectopic cartilage did form in the upper jaw. FGF-8 has no effect on soft tissue organization. These results suggest that FGF-8 plays a key role in craniofacial morphogenesis, and that excessive FGF-8 expression promotes cartilage differentiation, which in turn, results in suppression of bone formation during orofacial development. (Accepted on October 7, 2005) *Kawasaki Igakkaishi* 31(3):151-159, 2005

Key Words ① FGF-8 ② Orofacial development
③ Misexpression ④ Bone formation

はじめに

胚発生における顎顔面の形態形成は口窩の側縁周囲の上顎隆起、下縁の下顎隆起、および上縁の前頭鼻隆起から始まり、顎顔面を構成する骨格は顔面隆起内を満たす神経堤細胞に由来する間充織が分化して、膜性骨化により形成される¹⁾。前頭鼻隆起の両側には鼻板とよばれる体表外胚葉の局所的肥厚があり、発生が進むと鼻板は陥入して卵円形の鼻窩となる。この際に鼻窩の周囲に馬蹄形の隆起が生じ、この内側部が内側鼻隆起、外側部が外側鼻隆起である。発生が進むとともに、上顎隆起は外側鼻隆起と癒合し頬と上顎骨を形成し、一方上顎隆起は前方に増大し内側鼻隆起とも癒合し、顎前骨を形成する。最終的に一對の下顎隆起は正中線上で癒合して下顎を形成する^{2),3)}。これら顔面隆起の形成や増殖の異常などにより、頭蓋顎顔面先天性形態異常が生ずると考えられている^{4),5)}。

一方、胚における形態形成の過程にはラクシャリーな多種類の分子が一過性に発現し、それらの相互作用が器官形成には重要である。特に、細胞間の相互作用で情報の伝搬を担う TGF- β 、SHH、BMP、FGF などの分泌性タンパク質は、細胞増殖、細胞分化、そして器官形成に至るまでのさまざまな胚発生の段階で部位および時間的に特異的な発現パターンを示し、形態形成の数多くの局面で重要な機能を持っていることが知られている^{6)~9)}。中でも多様な役割が知られている分泌性タンパク質の FGF ファミリーは単に細胞の増殖因子としての機能以外に、器官形成においても重要な役割を演じており、その1つである FGF-8 については、初期胚の軸性決定、胚葉分化、後脳の形成、神経管や体節の分化、四肢や腎臓の形成などにおける組織の構築や器官形成の過程で繰り返し発現し、誘導や形態形成において重要な機能を持っていることが知られている。顎顔面形態形成における FGF-8 の役割については、顔面の限定された部位で発現し^{10)~14)}、顔面形成の初期に

は SHH と共同して顔面隆起の伸長を制御すること^{11),15)}、また外胚葉での FGF-8 の発現を抑制すると、第一鰓弓に由来する骨格の大部分が欠損すること¹⁶⁾などから、顎顔面形成過程において重要な機能を果たすと考えられている。

そこで著者は、顔面隆起を構成する間充織細胞が骨や軟骨に分化する過程、また個々の骨格原基の形態形成時において、FGF-8 が果たす役割を解明することをめざした。そこで顎顔面の形態形成過程にあるニワトリ胚を用い、FGF-8 を過剰に、かつ局所的に持続発現させることで、顎の形態形成に対する影響を調べた。

実験材料と方法

1. 組換え retrovirus の作製

ニワトリ線維芽細胞由来の細胞株 DF-1 は 5% ウシ胎児血清 (FBS: Irvine Scientific) を含む Dulbecco 改変最少培地 (D-MEM) で継代培養した。ニワトリ胚の cDNA ライブラリーからクローニングした全コーディング域を含む FGF-8a cDNA を RCAS vector に linker を介してサブクローニングし、RCAS-FGF-8 を構築した。

ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) を 1.0×10^6 cells/well で直径 90 mm のシャーレに播き (培地は 2% FBS と 1% ニワトリ血清 (CS) を含む D-MEM 10 ml)、CO₂ 孵卵器中で 37°C、12~24 時間培養する。約 70% confluent になっているのを確認し、シャーレ当たり 3.0 μ g の RCAS-FGF-8 DNA と 15.0 μ l の Lipofectin を用いて GIBCO-BRL 社のマニュアル記載の手順に従って transfection を行った。培地を血清なしの D-MEM に変えて引き続き 24 時間培養し、培地を 2% FBS 1% CS D-MEM 10 ml に換える。その後、24~48 時間毎に培地を交換し、培養上清にウイルス粒子を回収する。

回収した培地を遠心チューブ中に合わせ、BECKMANN SW-27 ロータで 20,000 rpm、10 分間、4°C で遠心し、細胞残渣を除去したのち、上清を別の遠心チューブに移し、同様に 120 分

間遠心してウイルス粒子を沈殿させる。上清を除去後、少量の培地に懸濁し、濃縮ウイルス液を得る。濃縮したウイルスは -80°C で保存する。

2. ウイルス力価の検定

DF-1細胞を12穴プレートに 1.0×10^5 cells/wellで播き込む(培地は2% FBS, 1% CS D-MEM)。保存ウイルスを $1.0 \mu\text{l}$, $2.0 \mu\text{l}$ を加え、 37°C で培養する。48時間後に培地を捨て、phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、4% paraformaldehyde (PFA) / PBS 溶液で20分間固定する。再度 PBS で洗浄し、0.3% 過酸化水素/methanol 溶液を5分間浸透させることで内在性 peroxidase を不活化する。PBS で洗浄後、VECTASTAIN® Elite® ABC KIT を用いて免疫染色する。発色液(組成: 0.05% diaminobenzidine, 0.02% 過酸化水素水, 0.1 M Tris-HCl)で20分間発色させる。

3. ニワトリ胚顎部への遺伝子導入

ニワトリ胚の発生 stage は Hamburger and Hamilton (1951) に従った¹⁷⁾。レトロウイルス未感染のニワトリ受精卵 (line M) は日生研株より購入し、 38°C の孵卵器 (SANYO MIR-153) で stage 20 まで孵卵する。Stage 20 のニワトリ胚の漿膜・羊膜を取り除き、片側上顎隆起に上記の濃縮した RCAS-FGF-8 ウイルスをマイクロインジェクター (NARISHIGE IM-300) で微量注入 (約 10 nl を数回) する。その後、卵開口部を透明粘着テープでシールし、孵卵を継続する。

なお、対照実験としては上記手順と同様に濃縮したアルカリホスファターゼ発現ウイルス (RCAS-BPAP) を同部位に微量注入する。

4. Whole-mount *in situ* hybridization

胚を卵から採りだし、PBS を満たしたシャーレの上で羊膜を剥ぎ、胸腹部臓器を除去した後、4% PFA/PBS 溶液に置換し 4°C で一晩固定した。その後の whole-mount *in situ* hybridization は山本ら¹⁸⁾の手法に準じて行った。

5. 骨・軟骨二重染色

Stage 37 のニワトリ胚を PBS 中に採りだし、 4°C で約 1 時間脱血した後 100% ethanol で固

定する。20% 酢酸-ethanol に室温で 4 時間置換浸透した後、0.01% Alcian green-20% 酢酸-ethanol 溶液で 20 時間軟骨を染色する。100% ethanol で 2 時間洗浄を 2 回、計 4 時間した後、0.01% Alizarin red-1% KOH 溶液で 5 時間骨を染色する。24 時間蒸留水で置換し 20% glycerol-1% KOH に 12 時間、50% glycerol-1% KOH に 12 時間、50% glycerol-蒸留水に順次置換し、透明化する (Fig. 1A, B)。

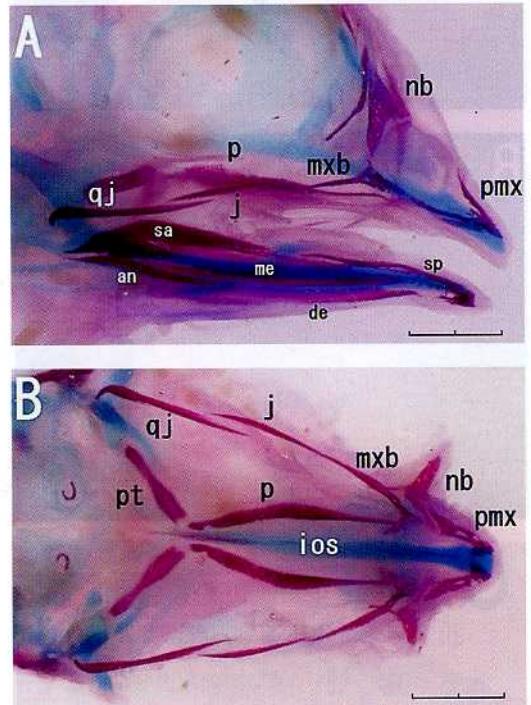


Fig. 1. Skeletal derivatives in the orofacial region of the chick embryo.

(A, B) Skulls stained with Alcian green (cartilage) and Alizarin red (bone). Lateral view (A) and palatal view with lower beak removed (B) of stage 37 embryo. Abbreviations: an, angular bone; de, dentary; ios, interorbital septum; j, jugal; mc, Meckel's cartilage; mxb, maxillary bone; nb, nasal bone; p, palatine bone; pmx, premaxilla; pt, pterygoid; qj, quadratojugal; sa, superangular; sp, splenary. Bars = 2 mm

結 果

1. 正常胚顎顔面における FGF-8 の発現

ニワトリ胚 stage 26 における FGF-8 の mRNA 発

現領域を, whole-mount *in situ* hybridization により調べた. FGF-8は鼻窩辺縁および上顎隆起

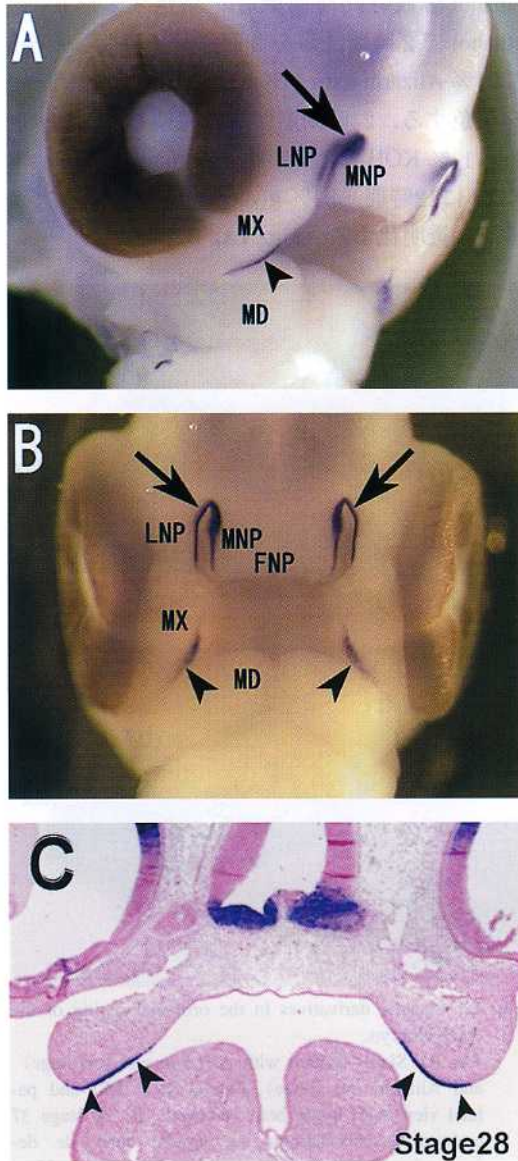


Fig. 2. Expression of the FGF-8 in the facial prominence of the chick embryo.

(A, B) Three quarters view (A) and frontal view (B) of stage 26 embryo. (C) Frontal section of stage 28 embryo showing FGF-8 expression (blue) after counter staining with Nuclear fast red ($\times 20$). FGF-8 is expressed in the medial nasal prominence, lateral nasal prominence (arrows) and the maxillary prominence (arrowheads). Abbreviations: FNP, frontonasal prominence; LNP, lateral nasal prominence; MNP, medial nasal prominence; MX, maxillary prominence; MD, mandibular prominence.

の下顎隆起側縁での発現を認めた (Fig. 2A, B). 切片での *in situ* hybridization では上記領域の上皮のみに発現が観察された (Fig. 2C).

2. FGF-8の過剰発現による外表の異常

RCAS-FGF-8をニワトリ胚 stage 20の右側上顎隆起に微量注入した. 48時間発生させた後に固定し, whole-mount *in situ* hybridization を行い FGF-8の発現を調べた. その結果, 上顎隆起全体にウイルスが感染し, FGF-8 mRNA が異所的に間充織まで拡大していることが分かった. しかし, この時点で上顎隆起の形態に変化はなかった (Fig. 3A, B). 上記操作を加えた胚を stage 37まで発生を進めた結果, 上顎が右側へ湾曲する表現型が多数83.3% (20/24) 見られた. 下顎の形態異常は見られなかった (Fig. 4A,B). また, 対照実験では表現型の発現率は

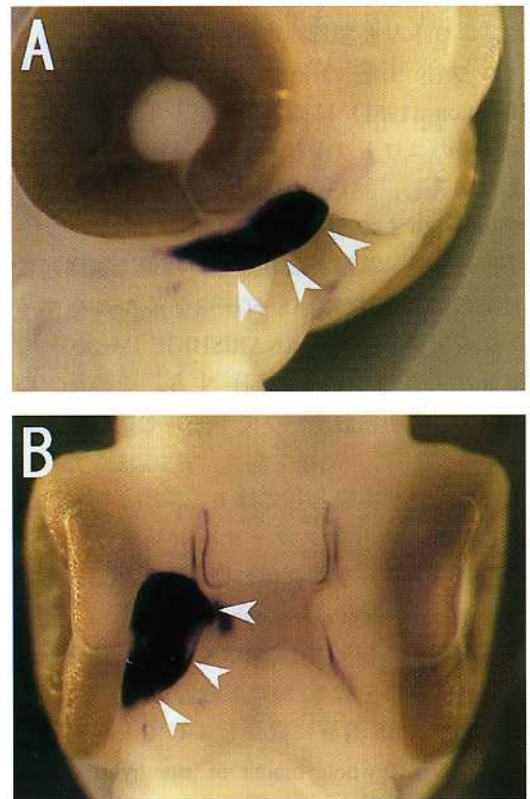


Fig. 3. Misexpression of FGF-8 at 48-hr post-injection of RCAS-FGF-8 virus to the right maxillary prominence of stage 20 embryo, indicating ectopic FGF-8 expression (white arrowheads). (A) Right oblique view. (B) frontal view.

0% (5/5) であった (Fig. 4D, E).

したがって, stage 37における上顎の右方向への湾曲は右上顎隆起全体で異所的に拡大発現させた FGF-8によりもたらされたものと考えられる.

また, 生じた表現型の下顎を切除し二次口蓋

を観察した. 裂幅は対象 (Fig. 4F) と変わらず, 口蓋突起は形成されている (Fig. 4C).

3. FGF-8の過剰発現による骨および軟骨形態の変化

FGF-8を上顎隆起に過剰発現させた胚で stage 37における顎顔面を構成する骨格の形態

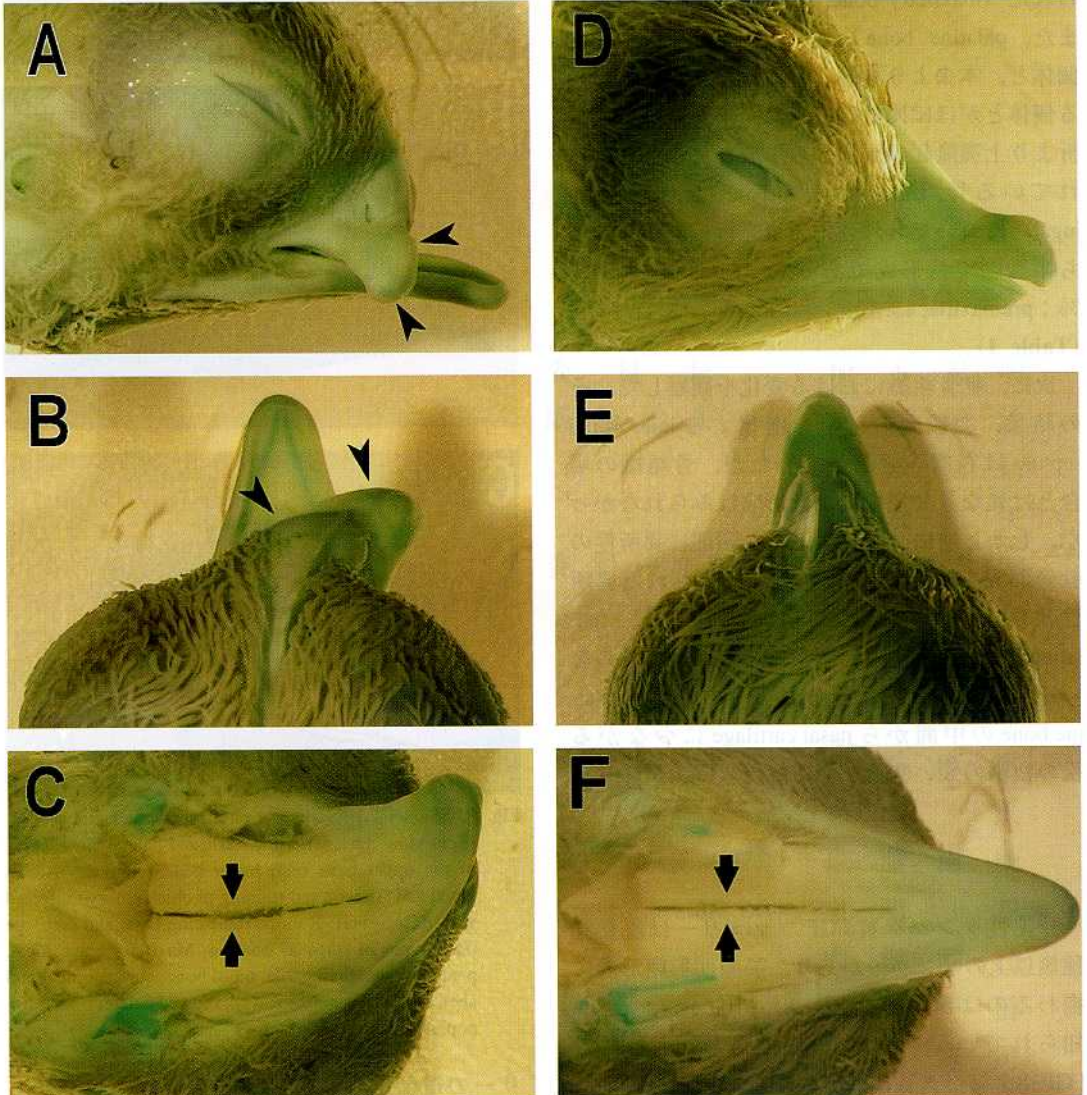


Fig. 4. The morphological effects of FGF-8 misexpression during chick orofacial development.

(A, B, C) FGF-8-misexpressed embryos fixed at stage 37. Maxilla (upper beak) turned to the right where RCAS-FGF-8 was infected (arrowheads). Lateral palatine process is formed normally (arrows). (A) External view. (B) Superior view. (C) Palatal view of the upper beak with lower beak removal.

(D, E, F) Control embryos fixed at stage 37 after misexpression of RCAS-BPAP instead of RCAS-FGF-8. Embryos showed normal symmetric phenotype without any change in external facial structure. (D) External view. (E) Superior view. (F) Palatal view of the upper beak with lower beak removal.

を調べた (Fig. 5A, B). すでに系譜解析の結果から, 上顎隆起からは maxillary bone や palatine bone, jugal が形成されることが報告されている^{19), 20)}. FGF-8の過剰発現により, これらの上顎隆起に由来する骨組織の低形成が高頻度で観察された. 特に maxillary bone や jugal では骨そのものが欠損した個体が多くみられた (maxillary bone, 70.8%; jugal, 54.2%). また, palatine bone については全てを欠損した個体と, 本来よりも短い骨が近位に留まっている個体とがほぼ同数観察された. 一方, 系譜解析より上顎隆起の周辺から形成されると考えられている骨 (nasal bone, premaxilla, quadratojugal) についても, 過剰発現を行った個体のうち半数弱で低形成であった (nasal bone, 37.5%; premaxilla, 45.8%; quadratojugal, 41.7%) (Table 1).

次に, 軟骨組織における変化を観察した. その結果, 顎顔面の正中を構築する interorbital septum は右側へ湾曲していたが, 骨組織の場合とは異なり欠損を含む低形成はみられなかった. しかし逆に, 右眼窩下方上顎部に異所性の軟骨形成を認めた (66.7%). 形成された異所性軟骨は大きさや形態には均一性がなく, palatine bone の中間に周囲軟骨組織と連絡性のない小豆様の軟骨が認められるものから, palatine bone の中間から nasal cartilage につながる松の枝様の太い軟骨まであった (Fig. 5C).

考 察

分泌性タンパク質 FGF ファミリーは現在20種類以上のメンバーがあり, 顎顔面形態形成に携わるのは FGF-2, -3, -8, -10, -17, -18 が知られている^{6), 13)}. 上皮性細胞で分泌されて FGF-8 タンパク質は間充織細胞で発現している数種の受容体 FGFR と結合し, MAP kinase 経路などで細胞増殖および分化, 遊走に関与し, 形態形成や器官形成に重要な役割を演じている. 上顎隆起基部において, 上皮組織で発現した FGF-8 は入れ子状の発現をする DLX ファミ

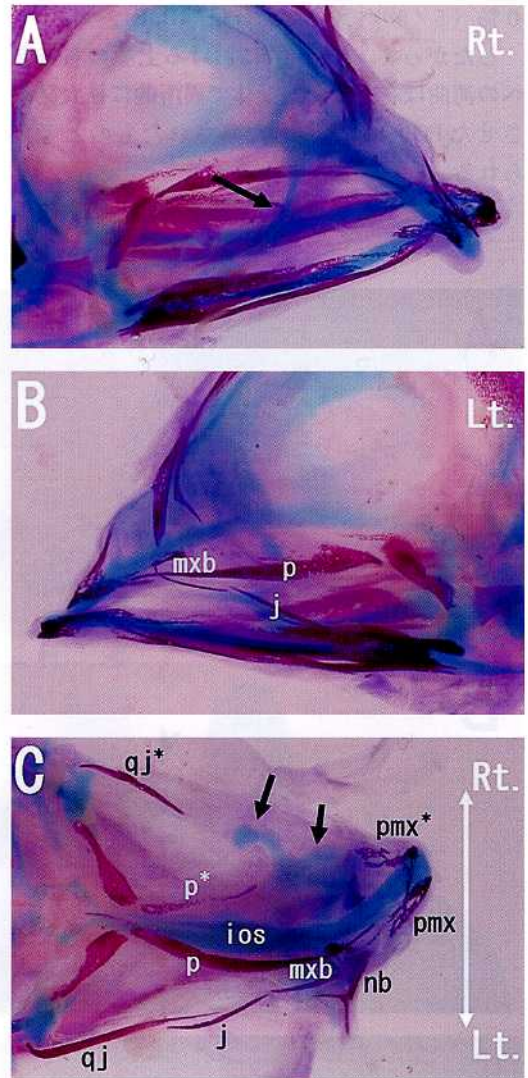


Fig. 5. Skeletal derivatives of malformed chick embryo. Right view (A), left view (B), and palatal view (C) of the upper beak with lower beak removal. Alcian green and Alizarin red staining of chick embryo infected with RCAS-FGF-8 virus, indicating bone and cartilage phenotypes of stage 37 embryo. Maxillary bone, jugal, palatine bone, premaxilla, nasal bone, quadratojugal and aberrant cartilage (arrows) showed defect or hypoplasia after RCAS-FGF-8.

リーの遺伝子のうち DLX-1 の発現を誘導することにより最終的な顎の構造を決定していると考えられている^{21), 22)}.

著者は FGF-8 の発現の顎顔面形態形成の顎の構造決定における機能的役割を明らかにするため, RCAS-FGF-8 ウイルスを局所的に感染さ

Table 1. Summary of the abnormal orofacial bones in the upper beak formed after FGF-8 misexpression in the right maxillary prominence

骨形態	palatine bone	nasal bone	premaxilla	maxillary bone	jugal	quadratojugal
欠損	37.5% (9/24)	4.2% (1/24)	20.8% (5/24)	70.8% (17/24)	54.2% (13/24)	0% (0/24)
低形成	45.8% (11/24)	33.3% (8/24)	25.0% (6/24)	12.5% (3/24)	20.8% (5/24)	41.7% (10/24)
正常	16.7% (4/24)	62.5% (15/24)	54.2% (13/24)	16.7% (4/24)	25.0% (6/24)	58.3% (14/24)

せる方法により、FGF-8を持続的に過剰発現させその発現パターンを可視化した。この方法で、上顎隆起上皮における特異的発現領域を間充織にまで拡大させることが可能であった。微量注入法は上皮組織における発現に留まらず、正常では発現していない間充織領域にも過剰に発現するので、その遺伝子発現の影響を明らかにするうえで極めて有用であった。

今回の実験結果から、RCAS-FGF-8を上顎隆起に感染させて48時間後では上顎隆起の形態には変化がなく、さらに口蓋突起の形態も正常であった。一方発生が進んだときの上顎隆起に由来する maxillary bone や jugal, palatine bone に不完全な欠損を含む骨の低形成をきたすことが明らかになった。これらの結果は、間充織での FGF-8の過剰発現は上顎隆起の形態には変化をもたらさないが、上顎隆起の細胞分化、主に骨形成に影響し、FGF-8は顎顔面の骨形成において抑制的に働くことを示唆している。

一方、軟骨組織の interorbital septum の基本形態においては特別な変化は認められず、膜性骨の欠損を含む低形成に基づく支持組織欠如の結果、二次的に湾曲したものと考えられる。しかし FGF-8過剰発現側で低形成をきたした palatine bone の中間から nasal cartilage につながる部位で明らかな軟骨組織の形成が認められた。発生学的に形成された軟骨は顎顔面の骨組織は膜性骨化であることから、骨の軟骨化ではなく異所性であるものと考えられる。異所性の軟骨発生母地に関しては stage 20の上顎隆起間充織に拡大発現した FGF-8により形成されたことから、同部位の未分化な間充織細胞に由来するものと考えられる。以上のことから、FGF-8

は胚発生過程では軟骨組織の形成、軟骨分化に対して促進的に働くものと考えられる。

現在までの遺伝的疾患の解析から FGFR の機能変異により骨格系の異常が起こることが報告されている^{1),23)}。このうち、FGFR-1もしくは FGFR-2の活性型変異はいくつかの頭蓋縫合早期癒合症の原因となる²³⁾。Apert 症候群のモデル動物として作製された FGFR 2の変異マウス (FGFR^{+S252W}) では、骨組織の低形成や発育遅滞が観察される一方で、頭部での異所性軟骨の形成が報告されている²⁴⁾。この遺伝子改変マウスは FGFR 2の活性型変異であり、間充織細胞に過剰な FGF シグナルが入った結果、骨や軟骨分化に異常が生じたと考えられている。今回の実験結果は、過剰な FGF-8により骨形成が抑制され、一方で軟骨形成が促進されており、この遺伝子改変マウスの結果とよく一致するといえる。

おわりに

本研究では、発生時の顎顔面形態形成における FGF-8の役割を解明するために、ニワトリ胚の発生の途中の段階で、FGF-8を上顎隆起で局所的に過剰持続発現させ次の結果を得た。

1. 片側上顎隆起への FGF-8の過剰持続発現は骨組織には欠損または低形成を誘導し同側への上顎湾曲が認められる表現型を生じた。
2. 軟骨分化に対しては片側上顎隆起への FGF-8の過剰持続発現は間充織中に軟骨組織の異所的な発生を誘導した。
3. 軟骨組織に対しては FGF-8の影響を認められなかった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、始終にわたり御指導を賜りました森口隆彦教授、濃野勉助教授、本間隆義助教授、実験手技について直接ご指導を頂きました和田直之博

士、および実験を援助していただきました寺田久美子さん、内田恵美さん、組織電子顕微鏡センターの磯田恵子さんに深謝いたします。また、本研究の一部はプロジェクト研究費(14-101, 14-206, 15-103A, 15-216 B, 16-209T)によって行われた。

参 考 文 献

- 1) Ornitz DM, Marie PJ : FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Gene Dev* 16 : 1446-1465, 2002
- 2) 森口隆彦, 中川皓文, 森寿子 : 口唇裂口蓋裂の総合治療-成長に応じた諸問題の解決-. 東京, 克誠堂出版, 1995 : 18-27
- 3) Larsen WJ : ラーセン最新人体発生学. 第2版. 相川英三, 山下和雄, 三木明德, 大谷浩訳. 新潟, 西村書店, 1999 : 315-338
- 4) Sadler TW : ラングマン人体発生学. 第8版. 安田峯生, 野沢十蔵訳. 東京, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2001 : 319-353
- 5) Stanier P, Moore GE : Genetics of cleft lip and palate : syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic cleft. *Hum Mol Genet* 13 : R73-R81, 2004
- 6) Francis-West P, Ladher R, Barlow A, et al. : Signalling interactions during facial development. *Mech Dev* 75 : 3-28, 1998
- 7) 野地澄晴, 上野直人 : 新 形作りの分子メカニズム. 東京, 羊土社, 1999
- 8) Helms JA, Cordero D, Tapadia MD : New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* 132 : 851-861, 2004
- 9) Murray JC, Schutte BC : Cleft palate : players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest* 113 : 1676-1678, 2004
- 10) Ohuchi H, Yoshioka H, Tanaka A, et al. : Involvement of androgen-induced growth factor (FGF-8) gene in mouse embryogenesis and morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 204 : 882-888, 1994
- 11) Crossley PH, Martin GR : The mouse FGF8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121 : 438-451, 1995
- 12) Mahmood R, Bresnick J, Hornbruch A, et al. : A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Curr Biol* 5 : 797-806, 1995
- 13) Bachler M, Neubuser A : Expression of members of the FGF family and their receptors during midfacial development. *Mech Dev* 100 : 313-316, 2001
- 14) Hu D, Marcucio RS, Helms JA : A zone of frontonasal ectoderm regulates patterning and growth in the face. *Development* 130 : 1749-1758, 2003
- 15) Abzhanov A, Tabin JC : Shh and FGF8 act synergistically to drive cartilage outgrowth during cranial development. *Dev Biol* 73 : 134-148, 2004
- 16) Trumpp A, Depew M, Rubenstein JLR, et al. : Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Gene Dev* 13 : 3136-3148, 1999
- 17) Hamburger V, Hamilton H : A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88 : 49-92, 1951
- 18) 山本康弘, 高田温行, 森口隆彦, 他 : 顎顔面形態形成に関与する Wnt ファミリーの発現パターン. 川崎医学会誌, 印刷中, 2005
- 19) McGonnell IM, Clarke JD, Tickle C : Fate map of the chick face : analysis of expansion of facial primordia and es-

- establishment of the primary palate. *Dev Dyn* 212 : 102 – 118, 1998
- 20) Lee SH, Bedard O, Buchtova M, et al. : A new origin for the maxillary jaw. *Dev Biol* 276 : 207 – 222, 2004
 - 21) Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL : Specification of jaw subdivisions by Dlx genes. *Science* 298 : 381 – 385, 2002
 - 22) Park BK, Sperber SM, Choudhury A, et al. : Intergenic enhancers with distinct activities regulate Dlx gene expression in the mesenchyme of the branchial arches. *Dev Biol* 268 : 532 – 545, 2004
 - 23) Wilkie AOM, Oldridge M, Tang Z, et al. : Craniosynostosis and related limb anomalies. In *The Molecular Basis of Skeletogenesis*. New York, Wiley & Sons Inc. 2001, pp 122 – 143
 - 24) Wang Y, Xiao R, Yang F, et al. : Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome $FGFR^+/S252W$ mouse. *Development* 132 : 3537 – 3548, 2005