

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11460

研究課題名(和文) 22q11.2欠失症候群原因遺伝子による頭蓋底軟骨結合の成長維持メカニズムの解析

研究課題名(英文) The Sez12, mouse homolog of DGCR2 gene encoding within 22q11.2, contributes to enchondral ossification in skull base

研究代表者

梶原 景正 (KAJIWARA, Kagemasa)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00204397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト22q11.2内のDGCR2遺伝子のホモログSez12が顎顔面形態に重要な頭蓋底軟骨結合の成長に役割を果たすことを検討した。Sez12欠失マウス(Sez12-KO)と、Sez12近傍の遺伝子群を欠失させたDf1マウスを交配させ、ヘテロ型Sez12-Df1変異マウス(ダブルヘテロ)を作製して、頭蓋底の発育成長を検討した。ホモ型Sez12-KOは、軟骨細胞の肥大軟骨への分化異常による頭蓋底軟骨結合の早期消失が認められた。一方、ダブルヘテロマウスでも同様な頭蓋底発育異常が認められた。従って、Sez12遺伝子は近傍の他の遺伝子と協調して顔面領域の骨格形成に役割を果たしている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

22q11.2欠失症候群の診断では顔貌異常が重要な所見となり、その分子メカニズムを解明することは学術的意義がある。また通常は悪性腫瘍細胞でのみ発現するといわれたTGF-betaシグナル阻害機能が、軟骨細胞分化過程でSez12遺伝子機能として発現し、軟骨内骨化に重要な役割を果たしていることも学術的意義がある。Sez12遺伝子機能で発揮される頭蓋底軟骨の軟骨内骨化への影響が生後個体でのみ認められることは、生後の患者を対象とした顎顔面領域への臨床的応用に期待がかかり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We examined whether the DGCR2, human homolog of Sez12, plays a candidate for pathological severity of 22q11.2 deletion syndrome. We generated Sez12 knockout/EGFP-knockin (Sez12-KO) mice. After weaning, half of Sez12-KO mice showed mild skeletal abnormalities with flat face. Skeletal analyses revealed maxillofacial dysplasia caused by earlier defect of synchondrial joint in Sez12-KO mice. The skull base showed abnormalities in enchondral ossification, especially in hypertrophic chondrocytes. The knock-in EGFP was expressed in the decreased hypertrophic chondrocytes in Sez12-KO mice. However, heterozygous Sez12-KO mice showed no phenotype. We generated a heterozygous mutant for both Sez12 and Tbx1 (double hetero mice). As well as the Sez12-KO, the double hetero mice showed maxillofacial abnormalities caused by defects in enchondral ossification, suggesting Sez12 together with Tbx1 and molecule(s) expressed within 22q11.2 play an important role in maxillofacial development.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：DGCR2 22q11.2欠失症候群 頭蓋底軟骨結合 肥大軟骨細胞 ノックアウトマウス Sez12 Tbx1 Df1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 22q11.2 欠失症候群は、ヒト染色体 22q11.2 のヘテロ型欠失を伴う Velo-cardio-facial 症候群 (軟口蓋心臓顔貌症候群) / DiGeorge 症候群と定義される。先天性心血管異常、頭部顎顔面領域の奇形、胸腺低形成・低カルシウム血症、発達精神遅滞などが特徴的な症状である。病因は、ヘテロ型 22q11.2 ゲノム欠失による遺伝子喪失 (現状 50 遺伝子程度がコード) であるが、特に鰓弓形成に関わる転写因子をコードする *TBX1* 遺伝子が最も有望で、*Tbx1* ノックアウトマウス (*Tbx1*-KO マウス) は、ヘテロ型で心血管異常を起こした (Lindsay, E. A. et al, Nature 401, 379-383, 1999)。しかしヘテロ型 *Tbx1*-KO マウスの症状はあまりに軽度で、顔面奇形など認められず、他の遺伝子機能の欠失が病状形成に必須である可能性が考えられている。
- (2) 我々がけいれん関連遺伝子として単離した *Sez12* 遺伝子は、22q11.2 欠失症候群の欠失領域に存在するヒト *DGCR2* 遺伝子の相同遺伝子であった (Kajiwara, K. et al. BBRC 222, 144-148, 1996)。既に *Sez12* 遺伝子破壊とともに *Sez12* プロモーターで GFP を発現するノックアウトマウス (*Sez12*-KO マウス) を作製し、以下の知見を得ている (Kimoto S, Kajiwara K et al. 2012 ; Mugikura S, Kajiwara K et al. 2015)。

*Sez12*-KO マウスは全身骨格に形成不全がみられ、特徴的な顔貌所見は上顎骨形態異常が原因であった。

ノックイン GFP が頭蓋軟骨結合や長骨成長板の静止および肥大軟骨細胞に認められた。

2. 研究の目的

- (1) ヒト染色体 22q11.2 のヘテロ型欠失により発症する 22q11.2 欠失症候群は、先天性心血管異常、頭部顎顔面領域の奇形、胸腺低形成・低カルシウム血症、発達精神遅滞などが特徴的な症状である。病因は、22q11.2 ゲノム欠失領域にコードされる遺伝子機能の喪失 (現状 50 遺伝子程度がコード) であるが、特に鰓弓形成に関わる転写因子をコードする *TBX1* 遺伝子が現状最も有望である。しかしヘテロ型 *Tbx1*-KO マウスではほとんど症状が認められず、他の遺伝子をも踏まえた複合的な遺伝子機能消失が発症に必須であると考えられる。
- (2) 我々がけいれん関連遺伝子として単離した *Sez12* 遺伝子は、22q11.2 欠失領域に存在するヒト *DGCR2* 遺伝子のマウス相同遺伝子であった。既に *Sez12* 遺伝子破壊とともに内在性 *Sez12* プロモーターで GFP を発現するノックアウトマウス (*Sez12*-KO マウス) を作製し、以下の知見を得た。
- ホモ型 *Sez12*-KO マウスは上顎骨形態異常が認められた。
- ノックイン GFP が頭蓋軟骨結合の軟骨細胞に認められ、さらにそこでは軟骨細胞の絶対数の減少が認められ、軟骨結合は早期に骨化していた。
- 初代 *Sez12*-KO 線維芽細胞を用いた Luc レポーター解析により、*Sez12* が欠失すると TGF-beta シグナルの亢進が認められた。
- 初代 *Sez12*-KO 軟骨細胞は、TGF- $\beta$  シグナルにより容易に形態変化を起こして線維芽細胞様となった。
- (3) 以上の知見から、頭蓋底軟骨組織での *Sez12* による TGF- $\beta$  シグナル制御が顎顔面形態形成に重要な役割を果たし、*Sez12* ヘテロ欠失が顎顔面形態の障害を発生させることが伺える。そこで *DGCR2* (*Sez12* 遺伝子のヒトホモログ) とヒト顎顔面形態異常の関連性について解明することを研究目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨格解析

Sez12-K0 マウスと、Sez12 遺伝子より下流のゲノムに存在する 12 個の遺伝子を一挙に欠失させた Df1 変異マウスを用いた。これら Sez12-K0 マウス・Df1 変異マウスの交配により、Sez12・Df1 のダブルヘテロ型変異マウスを作製し、それぞれ系統の頭蓋底の発育成長を検討した。骨格解析のため、変異マウスの透明骨格標本をアルシアンブルー8GX とアリザリンレッド S を用いて作製した。標本は、頭蓋冠と脳組織を除去し、頭蓋底を明示させ、頭蓋底骨格の成長や頭蓋底軟骨組織の状態を検討した。

#### (2) 初代軟骨細胞の調整と免疫染色

マウス新生仔の胸骨を摘出し、眼科バサミで細断し、3 mg/ml コラゲナーゼ D にて処理した。処理後の細断胸骨をピペティングし、さらに 0.5 mg/ml コラゲナーゼ D にてインキュベートした。細胞を PBS 洗浄後、10%ウシ胎仔血清を含む DMEM にて軟骨細胞を維持した。細胞増殖を確認し、通常のトリプシン処理にて適当数の軟骨細胞をチャンバースライドに培養し、25 ng/ml TGF-beta を含む 0.5%ウシ胎仔血清を含む培養液で細胞を維持した。細胞は PBS 洗浄後、4%PFA にて固定し、通常の抗体染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 頭蓋底の骨格形成における Sez12 遺伝子機能の解析

ホモ型 *Sez12*-K0 マウスは顔面および頭蓋領域に骨格異常が認められ、軟骨の早期消失が原因と思われる頭蓋底の形成不全が認められた (Fig. 1)。しかしヘテロ型 *Sez12*-K0 やヘテロ型 Df1 変異マウスでは骨格異常は確認できず、*Sez12* 遺伝子単独では 22q11.2 欠失症候群の顔面異常の原因として十分ではなかった (Fig. 2)。一方、ヘテロ型 *Sez12*-K0, Df1 変異をもつダブルノックアウトマウスでは、ホモ型 *Sez12*-K0 マウスと同様な顔面骨格系の異常が認められ、頭蓋底の形態的異常が引き起こされていた (Fig. 2)。以上のことから、ヒト 22q11.2 欠失症候群の原因遺伝子として *Sez12* は必要であるが十分ではなく、*Sez12* 遺伝子近傍の他の遺伝子と協調して顔面領域の骨格形成に役割を果たしている可能性が考えられた。

Figure 1 Abnormalities of the base of skull synchondrosis in the Dgcr2-KO mice

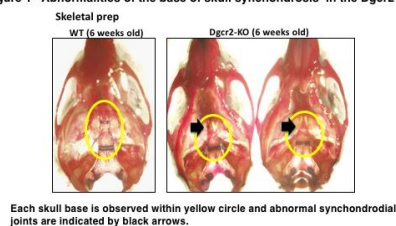
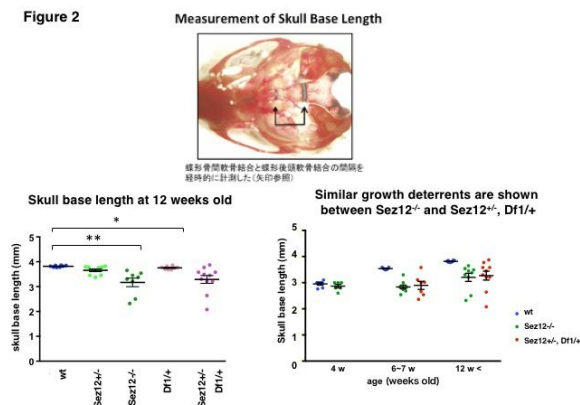


Figure 2

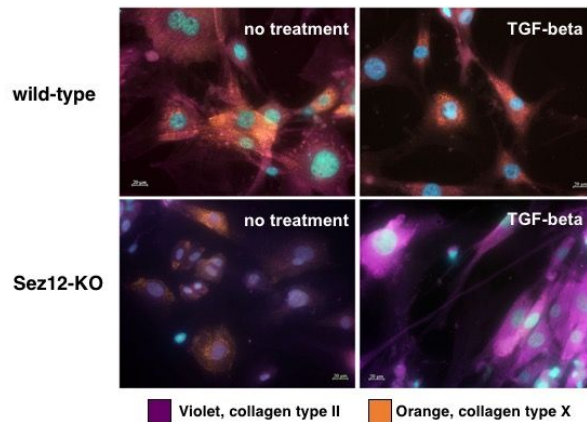


#### (2) 初代軟骨細胞を用いた Sez12 遺伝子機能の解析 (Fig. 3)

我々は、初代軟骨細胞を用いて TGF-beta シグナルに影響を与える Sez12 の細胞内機能を検討した。野生型軟骨細胞は、II 型コラーゲンを産生する増殖軟骨から X 型コラーゲンを産生する肥大軟骨細胞に成長分化する (wild-type, no treatment)。この細胞に TGF- を投与すると、肥大軟骨細胞の分化を抑制し、X 型コラーゲンと II 型コラーゲンが共存する細胞のみが観察される (wild-type, TGF-beta)。一方、Sez12-K0 軟骨細胞は、TGF- 投与により II 型コラーゲンのみを強く発現する線維芽細胞様の形態に変化し、通常認められる X 型コラーゲン産生細胞は

認められなくなった (Sez12-KO, TGF-beta)。以上の知見から Sez12 遺伝子機能は過剰な TGF-beta シグナルを制御する役割を果たしていることが認められた。

Figure 3 The morphology and characterization in Dgcr2-KO chondrocytes were changed after TGF-β administration.



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Kajiwara K, Arai M, Nakada Y, Kinoue T. Administration of Astragalus Membranaceus prevented kidney dysfunction in mice and in patients with chronic kidney disease. Nephrology Dialysis Transplantation. 2018;33(suppl 1):i426-i427. 査読あり

Kajiwara K, Aoyama K, Uchibori M, Ota Y, Kimura M, Tanigaki K, Illingworth E. The mouse homolog of DGCR2 gene encoding within 22q11.2 contributes to enchondral ossification in skull base and its defect causes the severity in 22q11.2 deletion syndrome. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2018;76(10):e72-e73. 査読あり

Kajiwara K. The Dgcr2 shows inducible expression and regulates TGF-beta signal activities during hypertrophy of chondrocytes in mouse cranial base synchondrosis. Journal of Oral Biosciences. 2018;supplement:212. 査読あり

Uchibori M, Aoyama KI, Ota Y, Kajiwara K, Tanaka M, Kimura M. A mutation in NOTCH1 ligand binding region detected in patients with oral squamous cell carcinoma reduces NOTCH1 oncogenic effect. Oncology reports. 2017;38(4):2237-2242. 査読あり

Mani GK, Miyakoda K, Saito A, Yasoda Y, Kajiwara K, Kimura M, Tsuchiya K. Microneedle pH Sensor: Direct, Label-Free, Real-Time Detection of Cerebrospinal Fluid and Bladder pH. ACS applied materials & interfaces. 2017;9(26):21651-21659. 査読あり

Mugikura S-i, Katoh A, Watanabe S, Kimura M, Kajiwara K. Abnormal gait, reduced locomotor activity and impaired motor coordination in Dgcr2-deficient mice. Biochemistry and Biophysics Reports. 2016;5:120-126. 査読あり

Arai M, Nakada Y, Kajiwara K, Kimura M, Ishii N. Preparation of Clinically Useful Sennoside-reduced Rhubarb. The Tokai journal of experimental and clinical medicine. 2016;41(1):24-29. Epub 2016/04/07. PubMed PMID: 27050892. 査読あり

〔学会発表〕(計 8件)

梶原 景正, 渡部 聡, 青山 謙一, 内堀 雅博, 大澤 侑子, 太田 嘉英, 木村 穰. Dgcr2は軟骨内骨化過程における肥大軟骨細胞への分化過程でTGF-betaシグナルを抑制的に制御する. 第41回 日本分子生物学会年会. 2018年11月. 査読あり

Kagemasa Kajiwara, Kenichi Aoyama, Masahiro Uchibori, Yoshihide Ota, Minoru Kimura, Kenji Tanigaki, Elisabeth Anne Illingworth. The Mouse Homolog of DGCR2 Gene Encoding within 22q11.2 Contributes to Enchondral Ossification in Skull Base and Its Defect Causes the Severity in 22q11.2 Deletion Syndrome. 100th AAOMS Annual Meeting. Scientific Sessions and Exhibition. 2018年10月. 査読あり

梶原 景正. Dgcr2は頭蓋底軟骨結合における肥大軟骨細胞への分化過程でTGF-betaシグナルを抑制的に制御する. 第60回 歯科基礎医学会学術大会. 2018年9月. 査読あり

梶原 景正. Reilly現象が起因となる分子病態メカニズムとその展開. 第6回 日本病巣疾患研究会総会・学術集会. 2018年8月. 査読あり

梶原 景正, 青山 謙一, 内堀 雅博, 太田 嘉英, 木村 穰. 22q11.2欠失症候群の骨格異常に関するDGCR2のTGF-betaシグナル制御メカニズム. ConBio2017. 2017年12月. 査読あり

梶原 景正. 22q11.2欠失症候群モデルを用いたDgcr2遺伝子による頭蓋底軟骨の制御メカニズムの解析. 第59回歯科基礎医学会学術大会. 2017年9月. 査読あり

梶原 景正, 青山 謙一, 内堀 雅博, 渡部 聡, 金澤 花帆, 太田 嘉英, 木村 穰. 22q11.2欠失症候群の骨格異常に関するDGCR2遺伝子のノックアウトマウスを用いた病因解析. 第39回 日本分子生物学会年会. 2016年11月. 査読あり

梶原 景正. マウス頭蓋底軟骨結合で発現するDgcr2遺伝子は肥大軟骨細胞のTGF-シグナルを制御する. 第58回 歯科基礎医学会学術大会. 2016年08月. 査読あり

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

Kajiwara K. Research Unit (<http://kage.med.u-tokai.ac.jp>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：青山 謙一

ローマ字氏名：AOYAMA, Ken-ichi

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 10647530

研究分担者氏名：内堀 雅博

ローマ字氏名：UCHIBORI, Masahiro

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：臨床助手

研究者番号(8桁): 50749273

研究分担者氏名：太田 嘉英

ローマ字氏名：Ota, Yoshihide

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60233152

研究分担者氏名：木村 穰

ローマ字氏名：KIMURA, Minoru

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10146706

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：ILLINGWORTH, Elizabeth

ローマ字氏名：ILLINGWORTH, Elizabeth

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。