

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K10062

研究課題名（和文）22q11.2欠失症候群の顎顔面異常に関わる頭蓋底軟骨の分化制御メカニズムの解析

研究課題名（英文）Expression characteristics of Sez12 gene, the murine homolog of DGCR2, in chondrocytes from 22q11.2 deletion syndrome model with knocked-in GFP

研究代表者

梶原 景正 (KAJIWARA, Kagemasa)

東海大学・医学部・客員講師

研究者番号：00204397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト22q11.2ゲノム領域にコードされるDGCR2の遺伝子機能と22q11.2欠失症候群との関連性を検討するため、マウスホモログSez12遺伝子ノックアウト/GFP遺伝子ノックインマウスを作成し、ヒト22q11.2のマウス相同領域がヘテロ型に欠失するDf1変異マウス（ただしSez12は欠失していない）と交配させ、ダブルヘテロ変異マウスを作成した。この変異マウスは頭蓋底の骨格低成長による顎顔面異常を示し、ダブルヘテロマウス由来の初代軟骨細胞は、TGF-betaによる肥大軟骨細胞への分化抑制が顕著であった。以上の結果から、DGCR2遺伝子が関与する本疾患発症メカニズムが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒト染色体22番長腕11.2領域の欠失により引き起こされる顔貌異常の発症メカニズム解明のため、欠失ゲノム領域の遺伝子機能を検討し、22q11.2欠失症候群の顔貌骨格異常の根本的治療の基盤となった。本研究で解析されたDGCR2遺伝子は、22q11.2欠失領域のいくつかの遺伝子と協調して頭蓋底の軟骨内骨化に寄与している。特記すべきことは、DGCR2欠失マウスが生後若齢で顔貌異常を認めることである。つまり、本疾患のみならず、他の原因による顔面骨格異常であっても、DGCR2を標的とした出生後の活性調節治療で症状が改善できる可能性が示唆され、外科治療に依存しない出生後治療に期待がもてる。

研究成果の概要（英文）：To explore the DGCR2 gene function, we generated Sez12 (the mouse homolog of DGCR2) -knockout/GFP-knocked-in mice, which showed maxillofacial hypoplasia caused by early malformations of basilar cartilage and differentiation defects of pre-hypertrophic chondrocytes. In the homozygous Sez12-KO chondrocytes treated with TGF-beta, we found significant activation of TGF-beta signaling and decrease of chondrocytes with expression of type X collagen, compared to wild-type ones showing expression of both type II and type X collagen. Furthermore, the primary chondrocytes with heterozygous mutants from both Sez12-KO and Df1 region which is heterozygously deleted a large portion of mouse genome corresponding to human 22q11.2 showed similar maxillofacial phenotypes and knocked-in GFP expression. These results suggest that DGCR2 together with other gene(s) in 22q11.2 could regulate the TGF-beta signaling activity for differentiation from replicative chondrocytes to hypertrophic ones after birth.

研究分野：口腔解剖学・口腔発生学

キーワード：22q11.2欠失症候群 DGCR2 Sez12 Df1 GFPノックイン 肥大軟骨細胞 頭蓋底軟骨結合 TGF-betaシグナル

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

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、頭部顎顔面領域の形態異常、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機能（現状 50 以上の遺伝子がコードされている）の喪失であるが、特に鰓弓形成に関わる転写因子をコードする *TBX1* 遺伝子の機能消失が最も有望な発症原因である。*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、顔面奇形など全く認められない。ヒトとマウスの動物種の違いが原因との考えもあるが、マウスをヒトモデル動物と考える基盤にたてば、ゲノム欠失領域内の他の遺伝子も踏まえた複合的遺伝子機能異常が病状形成に必須であると考えられ、ヒト *TBX1* と共に発症に関わる遺伝子がゲノム欠失領域に存在するのではないかと予想した。

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* 遺伝子のマウス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を作製している (Kimoto, S., Kajiwara, K., Illingworth, E., Tanigaki, K. et al., Transl Psychiatry 2, e146-, 2012)。これまでの研究成果としては、(1) *Sez12*-KO マウスは上顎骨形態異常が認められ、(2) 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、(3) *Sez12*-KO 軟骨初代細胞は、TGF- $\beta$  を投与しても軟骨細胞分化が進まず、増殖軟骨細胞が維持されていた。

以上の知見から、*Tbx1* の機能として既知の BMP シグナル制御に加え、我々が解明した *Sez12* による TGF- $\beta$  シグナル制御との複合的な BMP / TGF- $\beta$  病態シグナルの発生が、顎顔面形態形成異常を含めた本疾患の原因ではないかという可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

我々は、ヒト 22q11.2 ゲノム領域にコードされる *DGCR2* の遺伝子機能と疾患との関連性を明らかにすることを研究目的として、既に作成しているヒト *DGCR2* のマウスホモログである *Sez12* 遺伝子のノックアウト/GFP 遺伝子ノックインマウス (*Sez12*-KO) において、*Sez12* 欠失による顎顔面骨格形成に重要な頭蓋底軟骨結合の軟骨内骨化の異常、特に肥大軟骨細胞への分化異常を、ノックアウトマウスより調製した初代軟骨細胞を用いて検討した。しかしながら、22q11.2 欠失症候群のゲノム欠失はヘテロ型である。ホモ型 *Sez12*-KO マウスで認められた頭蓋底軟骨結合での軟骨分化異常は、ヘテロ型 *Sez12*-KO マウスでは認められなかった。そこで我々は、ヒト 22q11.2 の *TBX1* 遺伝子を含めたマウス相同領域がヘテロ型に欠失する変異マウス (Df1 マウス: ただし *Sez12* は欠失してない) と *Sez12*-KO との交配マウス (ダブルヘテロマウス) を作成し、マウス個体および初代軟骨細胞の分化過程での組織化学的解析を行い、本疾患ゲノム欠失領域内での *DGCR2* を含めた複合的遺伝子機能異常による発症メカニズムを想定し、研究を展開した。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨格解析

*Sez12*-KO 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*-KO マウスと Df1 変異マウスの交配を行い、ダブルヘテロマウスを作成し、野生型・*Sez12*-KO・Df1 およびダブルヘテロマウスの各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、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 で固定し、Alexa Fluor 594、647 が標識された 2 次抗体を用いて抗体染色を行い、ノックイン GFP や DAPI と共に蛍光画像の多重染色にて初代軟骨細胞を解析した。

## 4. 研究成果

(1) *Sez12* 遺伝子産物による TGF-beta シグナル制御

これまで *Sez12* 発現と一致するノックイン GFP 発現が全身の軟骨組織で顕著に認められ、*Sez12*-KO マウス離乳後から軽度の骨格発育不良、特に頭蓋底軟骨結合の形成不全による顔面骨格異常が発症した (図 1、図 2)。今回、軟骨細胞の分化成長に関わる TGF-beta シグナルに注目して軟骨細胞での *Sez12* 遺伝子機能を検討した。まず前段階として *Sez12*-KO 胎仔線維芽細胞で Luc-reporter assay を行ったが、*Sez12*-KO 細胞で TGF-beta シグナルが亢進したが、*Sez12* を一過性に過剰発現させると TGF-beta シグナル亢進は低下した。以上のことから、*Sez12* は TGF-beta シグナル活性化に際し、それらシグナルを抑制的に制御することが考えられた。この *Sez12* 遺伝子産物による TGF-beta シグナル抑制効果は、軟骨細胞のような TGF-beta シグナルが複雑にクロストークする頭蓋底軟骨結合の軟骨内骨化において重要な役割を果たすことが考えられる。

図 1

*Sez12* ノックアウトマウスは上顎骨 (切歯骨) の形態異常を示す  
さらに頭蓋骨全体的にも形態異常がみられる

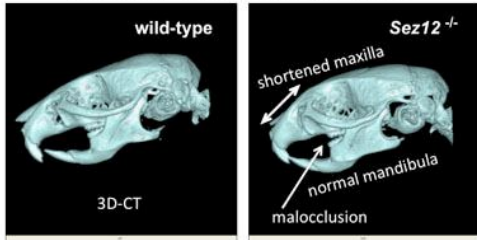
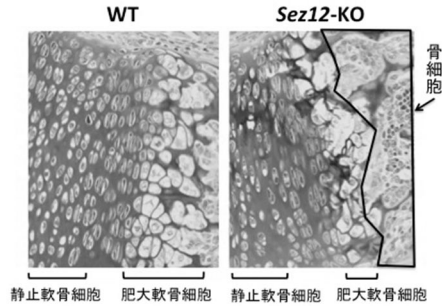


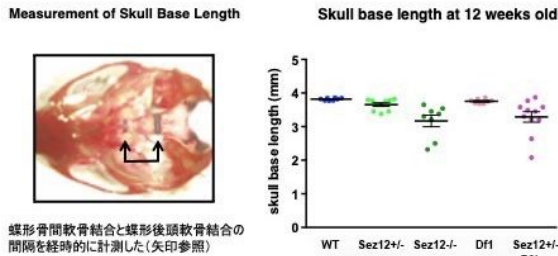
図 2. *Sez12*-KO マウス頭蓋底の軟骨軟骨細胞は増殖分化異常であった



(2) ダブルヘテロマウスの骨格解析

ヘテロ型 *Sez12*, *Tbx1* ダブルノックアウトマウス (ダブルヘテロマウス) の骨格異常や顔貌異常を検討したところ、ダブルヘテロマウスではホモ型 *Sez12*-KO マウスと同等な骨格異常が存在し、尾骨の軟骨内骨化が連なった尾や軟骨結合が存在する頭蓋底で、顕著な発育不良が認められた (図 3)。

図 3

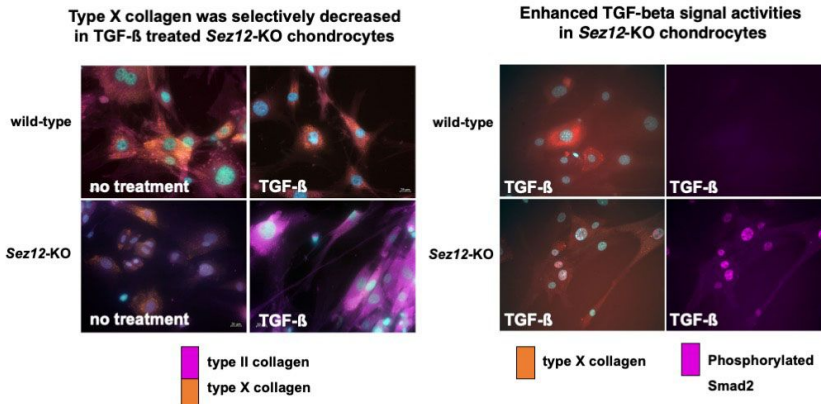


(3) ダブルヘテロマウス由来の初代軟骨細胞の分化異常

新生仔胸骨由来の初代培養軟骨細胞を使用して以後の解析を行った。*Sez12*-KO 軟骨

細胞に 25 ng/ml TGF-beta を投与すると、投与前は 型および X 型コラーゲン発現する *Dgcr2*-KO 軟骨細胞が混在していたが、TGF-beta 投与後は 型コラーゲンのみを発現する軟骨細胞がほとんどとなった (図 4)。さらにしかし野生型を含め、ヘテロ型 *Sez12*-KO および *Df1* マウスではこのような異常は全く認められず、TGF-beta 投与でも肥大軟骨細胞に特有な X 型コラーゲン発現が認められる細胞は、投与前と同様に混在していた。以上の結果から *Sez12* 遺伝子は、軟骨内骨化の多様な細胞分化過程で TGF-beta シグナルを抑制的に制御する役割が予想され、この *Sez12* 遺伝子機能の消失が 22q11.2 欠失症候群の発症に必要な可能性が考えられた。

図 4

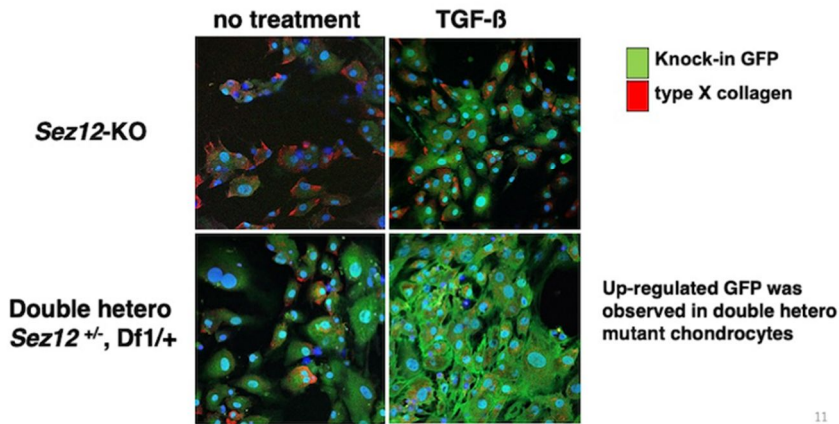


(4) ダブルヘテロ初代軟骨細胞における肥大化抑制

*Sez12*-KO と *Df1* との交配で得られたダブルヘテロマウス由来の初代軟骨細胞を用い、軟骨細胞

肥大化の解析を行った。ダブルヘテロ軟骨細胞に TGF-beta を投与すると、48 時間以内に X 型コラーゲン陽性細胞の減少とともに、ホモ型 *Sez12* 欠失細胞でみられたノックイン GFP 発現上昇、TGF-beta シグナル亢進がダブルヘテロ初代軟骨細胞でも認められた (図 5)。しかし、ヘテロ型 *Sez12* マウスや Df1 マウスではこのような細胞内変化は認められなかった。以上の結果から *Sez12* 遺伝子は、22q11.2 領域内のいくつかの遺伝子と協調して頭蓋底軟骨結合の形態形成を制御すると考えられる。そしてこれら協調した遺伝子機能のヘテロ型欠失が 22q11.2 欠失症候群の発症を引き起こすことが示唆された。

図 5 Double hetero chondrocytes show the up-regulated knock-in GFP and the down-regulated differentiation marker, type X collagen, as shown in *Sez12*-KO chondrocytes



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Jun Takezawa, Anna Shimazaki, Hidemi Takimoto, Kagemasa Kajiwara, and Kouichi Yamada	4. 巻 98
2. 論文標題 A large intermediate domain of vertebrate REV3 protein is dispensable for ultraviolet-induced translesion replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA repair	6. 最初と最後の頁 103031-103039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2020.103031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kagemasa Kajiwara, Makoto Arai, Yoshinobu Nakada, Go Nagashima, and Takaaki Kinoue	4. 巻 35
2. 論文標題 Expression of CNDP1 protein is regulated by age-dependent and AKI-related Astragalus membranaceous effects in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 iii872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ndt/gfaa142.P0552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kagemasa Kajiwara, Arai Makoto, Nakada Yoshinobu, Takaaki Kinoue	4. 巻 34
2. 論文標題 Administration of Astragalus Membranaceus prevented kidney dysfunction in cisplatin-AKI model mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 i144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ndt/gfz106.FP292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kagemasa Kajiwara, Makoto Arai, Tatsuya Nogami, Yoshinobu Nakada, Go Nagashima, Kyoka Tashiro, Takaaki Kinoue	4. 巻 36
2. 論文標題 Administration of astragalus membranaceous prevented cisplatin-induced AKI, especially in old mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 i241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ndt/gfab084.0015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kagemasa Kajiwara	4. 巻 Suppl
2. 論文標題 Expression characteristics of heterozygous Dgcr2 gene in murine chondrocytes from 22q11.2 deletion syndrome model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kagemasa Kajiwara	4. 巻 Suppl
2. 論文標題 Inducible expression of the Dgcr2 by TGF-beta signaling normalizes chondrocyte differentiation in cranial base during maxillofacial development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 梶原 景正, 長島豪, 田代 杏夏, 内堀 雅博, 太田 嘉英
2. 発表標題 22q11.2欠失症候群の顎顔面症状におけるヘテロDGCR2遺伝子欠失の役割
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kagemasa Kajiwara, Makoto Arai, Yoshinobu Nakada, Go Nagashima, Takaaki Kinoue
2. 発表標題 Expression of CNDP1 protein is regulated by age-dependent and AKI-related Astragalus membranaceous effects in mice
3. 学会等名 the 57th ERA-EDTA Virtual Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶原 景正
2. 発表標題 Dgcr2ノックアウトマウスを用いた22q11.2欠失症候群の顎顔面症状と頭蓋底成長との関連性の解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原 景正, 長島 豪
2. 発表標題 22q11.2欠失症候群で欠失する DGCR2遺伝子は軟骨細胞分化過程でTGF-betaシグナルを抑制的に制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 晃一, 竹澤 純, 嶋崎 杏奈, 梶原 景正
2. 発表標題 動物細胞DNAポリメラーゼ (REV3) の長大な中間領域は損傷乗り越え複製 (TLS) に必須ではない?
3. 学会等名 第25回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原 景正
2. 発表標題 22q11.2欠失症候群モデルの初代軟骨細胞におけるヘテロ型DGCR2遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Kajiwara, K. Research Unit  
http://kage.med.u-tokai.ac.jp/  
http://kage.med.u-tokai.ac.jp/  
Kajiwara, K. Research Unit

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木村 穰  (KIMURA Minoru)  (10146706)	東海大学・総合医学研究所・特任教授   (32644)	
研究分担者	内堀 雅博  (UCHIBORI Masahiro)  (50749273)	東海大学・医学部・助教   (32644)	
研究分担者	太田 嘉英  (Ota Yoshihide)  (60233152)	東海大学・医学部・教授   (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------