

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462876

研究課題名(和文)顎形態形成におけるSez12とTbx1によるBMPシグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Sez12 gene contributes to the chondrocytes differentiation by modulating TGF-β signaling during postnatal maxillofacial development.

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Sez12-KOマウスは顎顔面骨格異常がみられ、このときノックインGFPは頭蓋底軟骨結合、特に肥大軟骨細胞で顕著に発現し、肥大軟骨細胞数の低下がみられた。そこでSez12-KO初代軟骨細胞を調製し、TGF-betaを投与すると、形態変化とともに細胞増殖が亢進した。このときII型コラーゲンを発現するSez12-KO初代軟骨細胞は減少し、I型コラーゲンを発現する線維芽細胞様形態を示す細胞が増加した。この変化はTGF-betaシグナル阻害剤により解消した。以上の結果から、Sez12遺伝子産物は、TGF-beta受容体と相互作用により分化過程にある軟骨細胞の維持・生存に役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that the DGCR2 gene plays a role in the pathogenesis of 22q11.2 deletion syndrome. To analyze its function, we used our Sez12-knock-out/EGFP-knock-in mice (Sez12-KO mice). At weaning, approximately 50% of Sez12-KO mice showed mild skeletal abnormalities. Skeletal analyses revealed maxillofacial malformation in Sez12-KO mice around 6-week-old. In histology, the knock-in EGFP was expressed significantly in cartilage tissues and especially in hypertrophic chondrocytes, whose sparseness was observed in cranial base of Sez12-KO mice. Here we examined the Sez12 gene function with the primary cultured chondrocytes from Sez12-KO mice. When TGF-beta was applied, the Sez12-KO chondrocytes changed to fibroblast-like cell shape with expression of type I collagen. Our results suggest that Sez12 plays a role for maintenance and/or survival of hypertrophic chondrocytes by regulating TGF-beta signaling.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：22q11.2欠失症候群 DGCR2 Sez12 ノックアウトマウス 頭蓋底軟骨結合 TGF-beta 顎顔面骨格形成

1. 研究開始当初の背景

22q11.2 欠失症候群は、ヒト染色体 22q11.2 ゲノム領域の微細欠失を伴う 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、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。病因は鰓弓を含めた発生異常とされているが、根本的には 22q11.2 領域にコードされている遺伝子群 (現状 50 遺伝子程度) のヘテロ型欠失である。これら遺伝子群の中で、現時点で鰓弓形成に関わる転写因子をコードする *TBX1* が最も有望な病因遺伝子である。*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 マウスの病状はあまりに軽度で、顔面奇形など他の症状も認められないため、*TBX1* 以外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。一方、我々が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)。*DGCR2* は、細胞外に糖鎖親和性のある C 型レクチンドメインをもつ膜タンパク質をコードし、糖鎖情報を細胞内に伝達する機能が予想される。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) を作製したところ、*Sez12*-KO マウスに顎顔面骨格に特徴的な形成不全が認められた。

2. 研究の目的

我々の *Sez12* ノックアウトマウスの解析から、*Sez12* ヒトホモログ *DGCR2* が TGF-beta/BMP シグナルを制御して顎顔面形態形成に関わっている知見を得た。また近年、転写因子 *TBX1* が BMP シグナルを制御する知見も報告された。22q11.2 ゲノム領域にコードされ、22q11.2 を欠失する 22q11.2 欠失症候群の原因遺伝子とされる *DGCR2*・*TBX1* が、複合して BMP シグナルを制御し、頭蓋底軟骨結合の内軟骨性骨化を通じて顎顔面領域の形態形成に重要な役割を果たす可能性を考え、マウスホモログ *Sez12*・*Tbx1* が TGF-beta/BMP シグナル制御するメカニズムをマウス個体で検討する。最終的に 22q11.2 欠失症候群の顎顔面骨格異常の成因・病態と BMP シグナルとの関連性について解明を目指し、*TBX1* のみならずヒト *DGCR2* 遺伝子の疾患感受性について明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 肥大軟骨細胞に局在する *Sez12* が TGF-beta/BMP シグナルを制御することを解明し、*Sez12* が関わる TGF-beta/BMP シ

グナル制御が肥大軟骨細胞にどのような影響を与えるのかを、新生仔マウス胸骨由来の初代培養軟骨細胞または軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いて細胞レベルで解明する。

- (2) BMP-Smad1 シグナルを制御することが注目されている *Tbx1* の内軟骨性骨化過程での発現分布を胎仔または新生仔、一部生体マウス組織を用いて同定する。さらに BMP-Smad1 シグナルと *Sez12* との関連性について細胞レベルで検討する。
- (3) *Sez12* / BMP シグナルに活性をもつシグナル分子を *Sez12*, *Tbx1* ダブルノックアウト軟骨細胞を用いてパスウェイ解析により同定する。
- (4) *Tbx1* と *Sez12* が欠失するヘテロ型ノックアウトマウスの顎顔面成長状態を形態学的に解析し、22q11.2 欠失症候群の顎顔面形態モデルとしての有用性を 3次元 CT 解析・骨格標本などを用いて検討する。

4. 研究成果

初年度は、GFP 遺伝子ノックイン *Sez12* 遺伝子ノックアウトマウス (*Sez12*-KO マウス) の解析から、*Sez12*-KO マウスに軽度な骨格異常、特に顎顔面領域の形態異常が認められた (図 1)。内在性 *Sez12* プロモーターから発現する GFP 発現は、頭蓋底軟骨結合を含む全身の軟骨組織に強いシグナルを認めた。さらに *Sez12*-KO マウスの頭蓋底軟骨結合は 4 週齢以降から早期に消失していた (図 2)。従って、*Sez12* 遺伝子は軟骨細胞に重要な役割を果たすことが予想された。

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

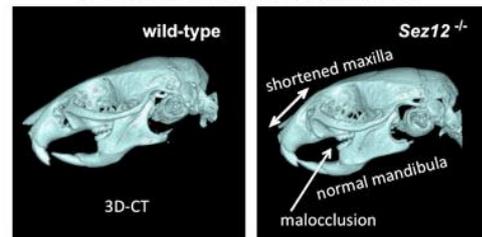
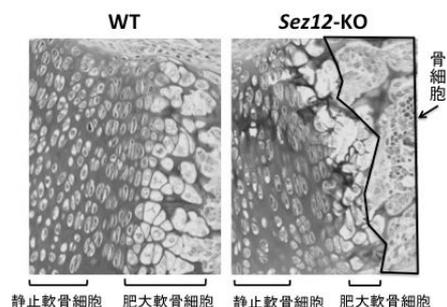


図 2. *Sez12*-KO マウス頭蓋底の軟骨軟骨細胞は増殖分化異常であった

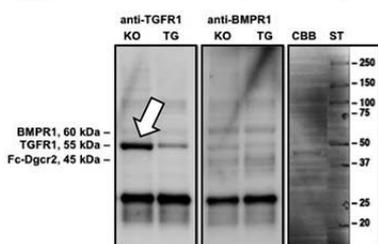


次年度以降の組織化学的検討で、ノックイン GFP は頭蓋底軟骨結合の静止および肥大軟骨細胞で発現し、*Sez12* が軟骨細胞の分化過

程に機能する可能性を考えた。そこで *Sez12*-KO マウス胎仔線維芽細胞 (*Sez12*-KO MEF) を調製し、野生型 MEF を対照として、様々なシグナル伝達経路を検討したところ、*Sez12* が BMP・TGF- $\beta$  シグナルを制御していた。*Sez12* が細胞膜に局在することから、BMP または TGF- $\beta$  受容体との相互作用を予想した。また *Sez12*-KO MEF にタグ付き *Sez12* を発現させ、プルダウンアッセイから *Sez12* と TGF- $\beta$  受容体と相互作用が認められた。

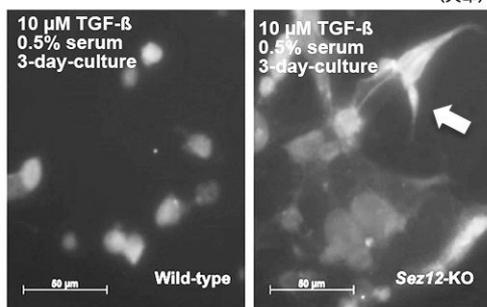
最終年度では、*Sez12*-KO 初代軟骨細胞を用いて TGF- $\beta$  シグナルを制御する *Sez12* 遺伝子機能について検討した。TGF- $\beta$  投与により、*Sez12*-KO 初代軟骨細胞の型コラーゲン発現は減少し、容易に線維芽細胞様に脱分化した。(図 4) この変化は TGF- $\beta$  受容体阻害剤により解消した。従って *Dgcr2* 遺伝子産物は、TGF- $\beta$  受容体と相互作用することで、TGF- $\beta$  シグナルを制御して軟骨細胞の分化維持に役割を果たすことが示唆された。現在、*Tbx1* と *Sez12* が欠失するヘテロ型ノックアウトマウスを作製し、22q11.2 欠失症候群の顎顔面形態モデルとして表現型を検討している。

図3 TGF $\beta$ 1 was detected as a Dgcr2-associated protein



ビーズに結合した *Sez12* タンパク質と細胞ライゼートとを相互作用させた結果、*Sez12* タンパク質と親和性をもつ TGF 受容体 R1 とが、抗 TGF 受容体 R1 抗体で同定された(矢印)。

図 4. *Sez12*-KO 初代軟骨細胞は TGF- $\beta$  により容易に脱分化をおこす (矢印)



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Shin-ichiro Mugikura, Akira Katoh, Satoshi Watanabe, Minoru Kimura, Kagemasa Kajiwara, Abnormal gait, reduced locomotor activity and impaired motor

coordination in *Dgcr2*-deficient mice, *Biochemistry and Biophysics Reports* 5, 120-126, 2016 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.015>

2. Ken-ichi Aoyama, Yoshihide Ota, Kagemasa Kajiwara, Noriaki Hirayama, Minoru Kimura, Frequent mutations in NOTCH1 ligand-binding regions in Japanese oral squamous cell carcinoma, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452, 980-985, 2014 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.021>

3. 槌谷 和義, 梶原 景正, 木村 穰, 痛みの定量化に基づく新規低侵襲針の開発, *臨床麻酔* Vol. 38, 1139-1146, 2014 査読有

4. 梶原 景正, 22q11.2 欠失症候群の頭蓋底軟骨分化に関わる *Dgcr2* 遺伝子機能の解析, *J Oral Biosci Suppl*, 25, 2014 査読有

5. Selection of the Best Shape for A Micro Painless Needle, Hideaki Kimoto, Takehiko Inoue, Kazuyoshi Tsuchiya, Kagemasa Kajiwara, Minoru Kimura, International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 40-43, 2014 査読有

6. Kazuyoshi Tsuchiya, Sachiko Imori, Kagemasa Kajiwara, Minoru Kimura, Interaction between carbon nanotubes and human cell, *Precision Engineering* 38, 116-120, 2014 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.precisioneng.2013.08.002>

7. Kazuyoshi Tsuchiya, Mohd Yusri Bin Saidin, Takehiko Inoue, Kagemasa Kajiwara, Minoru Kimura, Qualitative measurement of pain by analysing the salivary alpha amylase. *Precision Engineering* 38, 257-260, 2014 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.precisioneng.2013.09.006>

[学会発表](計 10 件)

1. 梶原 景正, 青山 謙一, 内堀 雅博, 清陸王, 渡部 聡, 木村 穰. マウス *Dgcr2* 遺伝子は TGF- $\beta$  シグナルを介して分化軟骨細胞の増殖を制御する. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

2. 内堀 雅博, 太田 嘉英, 青山 謙一, 梶原 景正, 木村 穰. 日本人口腔字扁平上皮癌に見いだされた変異型 NOTCH1 分子の発現解析. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

3. 内堀 雅博, 青山 謙一, 太田 嘉英, 金子 明寛, 梶原 景正, 木村 穰. NOTCH1 遺伝子変異による口腔扁平上皮癌

の予後の検討. 日本口腔腫瘍学会, 2015年1月29日, 奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

4. 青山 謙一, 太田 嘉英, 内堀 雅博, 金子 明寛, 梶原 景正, 木村 穰. 口腔扁平上皮癌にみられた変異型 NOTCH1 の性質は、機能変化を生じている可能性がある. 日本口腔腫瘍学会, 2015年1月29日, 奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

5. 梶原 景正, 22q11.2欠失症候群の頭蓋底軟骨分化に関わるDgcr2遺伝子機能の解析, 第56回歯科基礎医学会学術大会, 2014年9月27日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

6. 梶原 景正, 渡部 聡, 木村 穰. マウスDgcr 2 遺伝子は軟骨細胞の増殖分化制御により骨格形成に影響を与える. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月26日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

7. 渡部 聡, 梶原 景正, 木村 穰. EndoGalCとtargeted toxin法の組み合わせを用いたCRISPR系でノックアウトされた遺伝子改変細胞濃縮法の開発. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月26日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

8. 梶原 景正, 麥倉 真一郎, 渡部 聡, 木村 穰, 22q11.2欠失症候群で欠失するヒトDGCR2遺伝子のTGF- $\beta$ /BMPシグナルとの相互作用, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月4日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

9. 渡部 聡, 梶原 景正, 麥倉 信一郎, 桜井 敬之, 中村 伸吾, 木村 穰, 佐藤 正宏, 膜結合型C-typeレクチンであるDgcr2タンパクはI型BMP受容体と結合しシグナル伝達制御に関与する, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月4日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

10. 梶原 景正, 麥倉 信一郎, 渡部 聡, 木村 穰. 22q11.2 欠失症候群で欠失するヒト DGCR2 遺伝子のマウスホモログ Dgcr2 の TGF- $\beta$  シグナルへの影響. 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 13 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔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)研究代表者

梶原 景正(KAJIWARA, Kagemasa)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 00204397

(2)研究分担者

木村 穰(KIMURA, Minoru)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 10146706