

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592050
 研究課題名（和文）Sez12ノックアウトマウスで認められた顎形態異常の分子機序に関する研究
 研究課題名（英文）Molecular analysis of cranio-facial abnormalities found in the Sez12 knockout mice
 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

研究成果の概要（和文）：ホモ型 Sez12 ノックアウトマウス（Sez12-KO マウス）で認められる顔貌異常などの骨格系表現型について検討するため、内在性 Sez12 プロモーターで制御されたノックイン GFP の発現分布を指標にして顔貌異常と Sez12 発現分布との関連性を解析した。ノックイン GFP 発現は、マウス発生段階では神経堤・第一鰓弓・頭部間葉組織などの頭部神経冠遊走領域に、また生後では長骨の軟骨内骨化過程で最も強い GFP シグナルを認めた。Sez12-KO マウス由来の胎仔線維芽細胞に Sez12 を過剰発現させると、低血清培地で生存率が高く維持されていた。以上のことから、Sez12 は軟骨内骨化過程の軟骨細胞に発現し、細胞の維持・生存に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the relationship between the phenotype shown in the homozygous Sez12 knockout mice (Sez12-KO mice) and distribution of the knockin eGFP expression. We demonstrate that the Sez12 plays an important role in skeletal growth, such as cranial neural crest development during embryogenesis and endochondral ossification after birth. Furthermore, the Sez12 upregulation affected cell survival under a condition such as serum depletion. These findings suggest that the Sez12 is responsible for cell differentiation and maintenance of the differentiating cells, which cause skeletal abnormalities in mice including craniofacial malformation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：22q11.2 欠失症候群、ノックアウトマウス、Sez12 遺伝子、顎形態形成

1. 研究開始当初の背景

22q11.2 欠失症候群は、Velo-cardio-facial 症候群（軟口蓋心臓顔貌症候群）/DiGeorge 症候群）とも呼ばれるヒト第 22 番染色体長腕 11.2 領域のゲノム微細欠失を伴う多発先天形態異常症候群である。新生児の約 4000 人に 1 人の割合で発症し、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。病因は鰓弓の発生異常であるが、根本的にはヘテロ型 q11.2 微細欠失であり、コードされている遺伝子群（現状 27 遺伝子）が病因候補遺伝子として考えられている。現時点で鰓弓形成で活性をもつ転写因子をコードする *TBX1* が最も有望な遺伝子である。*Tbx1* ノックアウトマウス（*Tbx1*-KO マウス）は、第 2-3 鰓弓の形成不全を示し、本疾患の主徴である心血管の障害を起こした（Lindsay, E. A. et al, Nature 401, 379-383, 1999）。しかしヘテロ型 *Tbx1*-KO マウスの表現型はヒト症状よりも軽度であり、また顎顔面形態の根本である神経冠細胞には *Tbx1* は発現していない。従って、*TBX1* だけでなく 22q11.2 欠失領域内の複数の遺伝子が本疾患発症に関わっている可能性が示唆されている。

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）。*DGCR2* は、細胞外に C 型レクチンドメインをもつ膜タンパク質をコードし、相手細胞の糖鎖情報を介して細胞接着や情報シグナルの細胞内伝達が予想される。既に *Sez12* 遺伝子破壊とともに *Sez12* プロモーターで緑色蛍光タンパク質（GFP）

を発現するノックアウトマウス（KO マウス）を作製した。

2. 研究の目的

既に *Sez12* 遺伝子破壊とともに *Sez12* プロモーターで緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するノックアウトマウス（KO マウス）を作製した。ノックインした GFP を検討したところ、*Sez12* が遊走する頭部神経冠細胞で発現し、正常に遊走する神経冠細胞の分布が認められた。特に第 1 鰓弓に豊富に存在していた。また *Sez12*-KO マウスは上顎骨（特に切歯骨）形態異常と鼻中隔の湾曲が認められた。そこで本研究計画では、新規 C 型レクチンをもつ膜タンパク質 *Sez12* がいかなるシグナル経路に活性をもち、どのような機能分子を制御して顎形態形成に関わっているのかを解明する。

3. 研究の方法

3.1. 骨格系表現型解析

離乳時から野生型および *Sez12*-KO マウスの尾長を経時的に計測し、骨格異常の判定とする。細部の骨格系表現型解析は、12 週齢の野生型および *Sez12*-KO マウスの CT 画像を 3 次元的に再構築して検討した。顎形態の比較検討には、以下の Web に参照されている採寸方法を用いた（http://craniofacial.jax.org/new_standard_protocols.html）。

3.2. ノックイン GFP 発現分布解析

Sez12-KO マウス胎仔および骨格標本の GFP 分布解析にはレーザー実体顕微鏡（SZX7; Olympus）を用いて検討した。また組織化学的 GFP 解析では、タングステ

ンミクロトームナイフ (Leica Microsystems) にて長骨関節部の凍結切片を作製し、抗 GFP 抗体 (Abcom) を用いて GFP を同定した。

3.3. マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) の調製および遺伝子導入

通法に従い胎生 12.5 日目のマウス胎仔より線維芽細胞を調製し (Hogan, B. et al. Manipulating the mouse embryo, CSHL press)、構成的な過剰発現を引き起こす CAG プロモーターの下流に *Sez12* cDNA を挿入したミニジーンを作製して *Sez12*-KO MEF に導入して *Sez12* 機能について検討した。

4. 研究成果

既に作製された *Sez12* KO マウスでは、その骨格系表現型として上顎低形成に起因した顔貌異常が認められ (図 1)、これにより鼻中隔の著しい湾曲が認められた (図 2)。

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

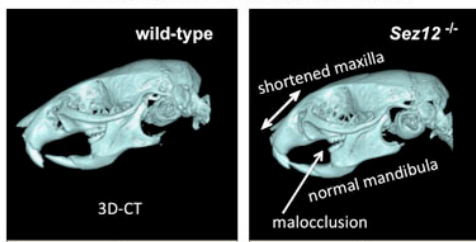
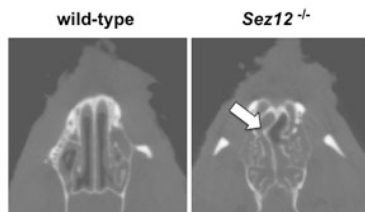


図 2
Sez12ノックアウトマウスで認められた鼻中隔湾曲症



鼻中隔の湾曲(矢印)は、上顎骨の形成不全に加え、分化していない軟骨細胞の正常な発育により引き起こされたと考えられる

これら骨格異常として認められた表現型と

Sez12 発現分布との関連性を検討するため、内在性 *Sez12* プロモーターで制御されたノックイン GFP の発現分布について組織化学的解析を行なった。ノックイン GFP 発現は、マウス発生段階では神経堤・第一鰓弓・頭部間葉組織などの頭部神経冠遊走領域に発現し (図 3)、また生後においては長骨の軟骨内骨化過程で最も強い GFP シグナルを認めた (図 4)。

図 3

ノックインGFP局在は頭部神経冠遊走経路、特に神経堤・顔面部・第一鰓弓に一致する

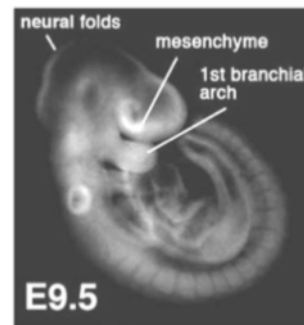
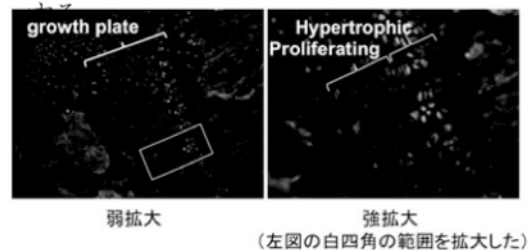
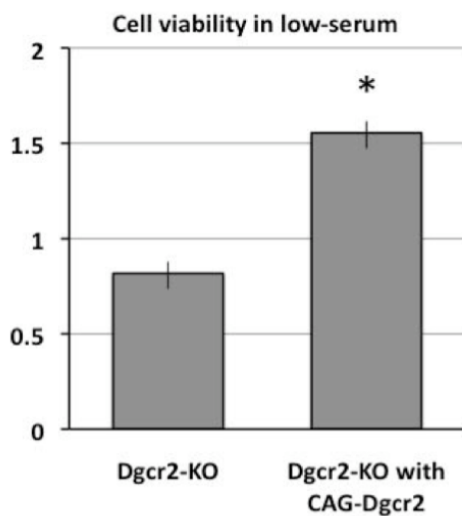


図 4 *Sez12*は軟骨内骨化領域に発現



Sez12 は、軟骨内骨化過程の軟骨細胞で発現を増強させ、正常な骨格形成に何らかの役割を果たしていることが伺える。*Sez12*-KO マウス由来の胎仔線維芽細胞に *Sez12* を過剰発現させると、低血清培地で生存率が高く維持されていた (図 5)。

図5 低血清培地での細胞生存



培養開始の細胞数を1として、3日間低血清で培養したときの細胞生存の割合を示した。

以上のことから、Sez12 遺伝子機能は骨格形成の軟骨分化、さらに分化する細胞の維持・増殖などに重要な役割を果たすことが示唆された。

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 16 件)

- ① Selective overexpression of Comt in prefrontal cortex rescues schizophrenia-like phenotypes in a mouse model of 22q11 deletion syndrome、Kajiwara, K. (他 7 名、5 番目)、Transl Psychiatry 2、査読有、e146 (2012)
- ② 22q11.2 欠失症候群で欠失するヒト DGCR2 遺伝子マウスホモログSez12 の軟骨分化への影響、梶原景正、J Oral Biosci、査読有、Suppl、96 (2012)
- ③ シックハウス症候群スクリーニングを視野に入れたマウス・ラット眼球運動研究の応用、木村穰(他 5 名、5 番目)、臨床環境医学 21、査読有り 1 (2012)
- ④ Fluorescent transgenic mice suitable

for multi-color aggregation chimera studies、Kimura M. (他 6 名、4 番目)、Cell Tissue Res、査読有、Aug 7. (2012)

- ⑤ In vivo gene transfer in mouse preimplantation embryos after intraoviductal injection of plasmid DNA and subsequent in vivo electroporation. Masahiro Sato, Eri Akasaka, Issei Saitoh, Masato Ohtsuka and Satoshi Watanabe、Systems Biol. in Reprod. Med.、査読有、Early Online: 1–10 (2012)
- ⑥ Caffeine abolishes the ultraviolet-induced REV3 translesion replication pathway in mouse cells、Kajiwara, K. (他 3 名、3 番目) Int. J. Mol Sci. 12、査読有り、8513-8529 (2011)
- ⑦ Pain Assessment for Designing a Painless Microneedle、Kajiwara, K. (他 2 名、2 番目) CyberTherapy & Rehabilitation 2、査読有り、38-39 (2011)
- ⑧ ヒトDGCR2 遺伝子ホモログ欠失マウスで認められた顎顔面形態異常の解析、梶原景正、J Oral Biosci 53、査読有り、Supplement p.132 (2011)
- ⑨ Craniofacial analysis of mice deficient in Sez12, the murine homolog of the DGCR2 gene on chromosome 22q11.2、Kajiwara, K. (他 2 名、1 番目) J. Physiol. Sci. 61、査読有り、Supplment, S230 (2011)
- ⑩ Production Technique and Design for Painless Injection Needle、Kimura, M.、Kajiwara, K. (他 2 名、4 番目) International Conference on Micro-Manufacturing、ICOMM 2011、査

- 読有り、p.469-473 (2011)
- ⑪ IkBL, a novel member of the nuclear IkB family, inhibits inflammatory cytokine expression, Kimura M.(他 6 名、6 番目) FEBS Lett 585 (22) 査読有り 3577-3581 (2011)
- ⑫ Kimura M.(他 7 名、6 番目) Enforced expression of the transcription factor HOXD3 under the control of the Wnt1 regulatory element modulates cell adhesion properties in the developing mouse neural tube. J Anat. 219 (5)、査読有り、589-600 (2011)
- ⑬ Improvement of a phiC31 integrase-based gene delivery system that confers high and continuous transgene expression. Satoshi Watanabe, (他 4 名、1 番目) New Biotechnology 28(4) 査読有り 312-319 (2011)
- ⑭ A novel glycosylation signal regulates transforming growth factor β receptors as evidenced by endo- β -galactosidase C expression in rodent cells, Satoshi Watanabe, (他 5 名、1 番目) Glycobiology 21(4) 査読有り 482-492 (2011)
- ⑮ Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression, Kimura M. (他 11 名、11 番目) Nucleic Acids Res. 38 (22) 査読あり: e198. (2010)
- ⑯ Mapping of susceptibility locus for endometriosis within the HLA region using microsatellite markers in Japanese women, Kimura M. (他 9 名、10 番目) Tissue Antigens. 75 (1)、査読有り、65-67.(2010)
- [学会発表] (計 11 件)
- ① 梶原景正、安田佳代、田中政之、林秀樹、木村穰、石井直明、新井信：線虫を用いたダイオウ薬効に関わるヒト分子メカニズムの網羅的解析、第29回和漢医薬学会学術大会、2012年9月、東京
- ② 梶原景正: 22q11.2欠失症候群で欠失するヒトDGCR2遺伝子マウスホモログSez12の軟骨分化への影響、第54回歯科基礎医学会学術大会、2012年9月、福島
- ③ K.Kajiwara, S. Mugikura, S. Watanabe, M.Kimura : Sez12, the Murine Homolog of DGCR2 Gene Laid within the Microdeletion of 22q11.2 Deletion Syndrome, Functions in the Endochondral Ossification, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月、福岡
- ④ S. Mugikura, S. Watanabe, K.Kajiwara, M.Kimura : The Sez12, Coding the C-type Lectin-like Domain-containing Membrane Protein, Plays a Regulatory Role in T Cell Growth, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月、福岡
- ⑤ Yusri Mohd、槌谷和義、梶原景正、木村穰: 穿刺時間に対する唾液中 α アミラーゼ量変動、精密工学会大会学術講演会、2012年9月、福岡
- ⑥ モハマド・ユスリ、梶原景正、木村穰 : サブスタンスPによる注射針穿刺時の痛みの客観的評価手法の確立、精密工

学会大会学術講演会、2012年3月、東京

- ⑦ 梶原景正、麥倉信一郎、木村穰：顎顔面領域の形態形成に関わるDgcr2ホモログSez12とTbx1との比較解析、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月、神奈川
- ⑧ 麥倉信一郎、千葉朋希、渡部聡、梶原景正、木村穰：Sez12遺伝子欠失マウスの免疫系細胞における細胞増殖能の検討、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月、神奈川
- ⑨ 梶原景正：ヒトDGCR2遺伝子ホモログ欠失マウスで認められた顎顔面形態異常の解析、第53回歯科基礎医学会学術大会、2011年9月、岐阜
- ⑩ 梶原景正、麥倉信一郎、木村穰：Targeted disruption of the mouse homolog of the DGCR2 gene, Sez12, causes a nasal septum abnormality and some dental problems in mice、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月、兵庫
- ⑪ 麥倉信一郎、梶原景正、木村穰：DGCR2遺伝子のマウスホモログSez12遺伝子ノックアウトマウスの胸腺細胞分化の解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月、兵庫

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：穿刺針、微量体液採取用治具および微量薬液投与用治具

発明者：榎谷和義、木村穰、梶原景正、坂元公則

権利者：高電工業株式会社、学校法人東海大学

種類：特許

番号：特願 2012-106453

出願年月日：2012年5月8日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<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

〔2011～2012年度〕

渡部 聡 (WATANABE SATOSHI)

独立行政法人農業生物資源研究所・

ゲノム研究センター・家畜ゲノム・

主任研究員

研究者番号：80391572