

令和元年5月22日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11051

研究課題名(和文) Rhoファミリータンパク質の骨軟骨形成における機能重複に関する研究

研究課題名(英文) Mechanisms of Rho family proteins during cartilage and bone formation

研究代表者

山田 篤 (Atsushi, Yamada)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：50407558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞特異的にRac1およびCdc42遺伝子をダブルで欠損させたマウスの作製およびその解析を行った。Rac1およびCdc42遺伝子をダブルで欠損させたマウスはCdc42遺伝子をシングルで欠損させた場合と同様に、生後間もなく致死となった。長管骨は、Rac1およびCdc42遺伝子をシングルで欠損したときと比較しより短くなっていた。また、骨格標本作製の結果、Rac1およびCdc42遺伝子をダブルで欠損させたマウスは形成に異常が認められた。成長板における細胞の組成および柱状配列形成においてシングルノックアウトよりも強い異常が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rhoファミリー低分子量Gタンパク質Rac1およびCdc42は細胞外からの様々な情報を細胞内に伝達する細胞内シグナル伝達因子である。主にアクチン細胞骨格制御を介した様々な生物活性、例えば細胞の増殖、分化、細胞死等を制御していることが知られている。Rac1およびCdc42の硬組織形成における機能を、組織および時期特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製したところ、それぞれ共通した表現型と異なる表現型を呈した。Rac1およびCdc42をダブル欠損させたマウスを作製し、シングル欠損させたマウスと表現型を比較することによりRac1およびCdc42遺伝子の機能重複性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We created mice with double deletion of Rac1 and Cdc42. We aimed to study the functional duplication of Rac1 and Cdc42 genes by comparing their phenotypes with those of mice. In order to specifically delete the Rac1 and Cdc42 genes in cartilage tissue, Rac1 flox mice Cdc42 flox mice and Col2 Cre transgenic mice were mated. The mice in which the Rac1 and Cdc42 genes were double deleted became lethal soon after birth, as in the case where the Cdc42 gene was single deleted. The long bones were shorter compared to the single deletion of the Rac1 and Cdc42 genes. In addition, the mice in which the Rac1 and Cdc42 genes were double deleted were found to have abnormal formation in skeletal organs. Stronger abnormalities were observed in cell composition and columnar formation in the growth plate than those of Rac1 and Cdc42 single knockout mice.

研究分野：骨代謝

キーワード：細胞内シグナル伝達

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

1. 研究開始当初の背景

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 Rac1 および Cdc42 は細胞外からの様々な情報を細胞内に伝達する細胞内シグナル伝達因子である。主にアクチン細胞骨格制御を介した様々な生物活性、例えば細胞の増殖、分化、細胞死等を制御していることが知られている。

2. 研究の目的

Rac1 および Cdc42 の硬組織形成における機能を、組織および時期特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製したところ、それぞれ共通した表現型と異なる表現型を呈した。そこで、Rac1 および Cdc42 をダブル欠損させたマウスを作製し、シングル欠損させたマウスと表現型を比較することにより、Rac1 および Cdc42 遺伝子の機能重複に関する研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

軟骨組織特異的に Rac1 および Cdc42 遺伝子を欠損させるために、Rac1 flox マウス Cdc42 flox マウスおよび Col2Cre トランスジェニックマウスを交配し、作製した。

4. 研究成果

軟骨細胞特異的に Rac1 および Cdc42 遺伝子をダブルで欠損させたマウスの作製およびその解析を行った。Rac1 および Cdc42 遺伝子をダブルで欠損させたマウスは Cdc42 遺伝子をシングルで欠損させた場合と同様に、生後間もなく致死となった。長管骨は、Rac1 および Cdc42 遺伝子をシングルで欠損したときと比較し、より短くなっていた。また、骨格標本作製の結果、Rac1 および Cdc42 遺伝子をダブルで欠損させたマウスは形成に異常が認められた。成長板における細胞の組成および柱状配列形成においてはシングルノックアウトよりもより強い異常が認められた。増殖軟骨細胞マーカー遺伝子および肥大軟骨細胞マーカー遺伝子の発現様式を検討したところ、明らかに Rac1 および Cdc42 遺伝子をダブルで欠損させたマウスの成長板では発現様式に異常が認められた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1) Aizawa R, Yamada A, Seki T, Tanaka J, Nagahama R, Ikehata M, Kato T, Sakashita A, Ogata H, Chikazu D, Maki K, Mishima K, Yamamoto M, Kamiyo R. Cdc42 regulates cranial suture morphogenesis and ossification. *Biochem Biophys Res Commun*. 512(2) 145-149, 2019.

2) Kato T, Yamada A, Sasa K, Yoshimura K, Morimura N, Ogata H, Sakashita A, Kamiyo R. Nephronectin expression is inhibited by inorganic phosphate in osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 104(2) 201-206, 2019.

3) Sasa K, Yoshimura K, Yamada A, Suzuki D, Miyamoto Y, Imai H, Nagayama K, Maki K, Yamamoto M, Kamiyo R. Monocarboxylate transporter-1 promotes osteoblast differentiation via suppression of p53, a negative regulator of osteoblast differentiation *Sci. Rep*. 8,10579,2018

4) Ikehata M, Yamada A, Fujita K, Yoshida Y, Kato T, Sakashita A, Ogata H, Iijima T, Kuroda M, Chikazu D, Kamiyo R. Cooperation of Rho family proteins Rac1 and Cdc42 in cartilage development and calcified tissue formation *Biochem Biophys Res Commun*,500,525-529,2018

5) Kato T, Yamada A, Ikehata M, Yoshida Y, Sasa K, Morimura N, Sakashita A, Iijima T, Chikazu D, Ogata H, Kamiyo R. FGF-2 suppresses expression of nephronectin via JNK and PI3K pathways. *FEBS Open Bio*, 8(5),836-84,2018

6) Iezumi Y, Yamada A, Minami E, Ikehata M, Yoshida Y, Kato T, Morimura N, Ogata H, Sakashita A, Iijima T, Chikazu D, Kamiyo R. IL-1beta suppresses nephronectin expression in osteoblasts via ERK1/2 and JNK. *Biochem Biophys Res Commun*, 493,773-775,2017

7) Ikehata M, Yamada A, Morimura N, Itose M, Suzawa T, Shiota T, Chikazu D, Kamiyo R. Wnt/ β -catenin signaling activates nephronectin expression in osteoblasts.

- 8) Yamaguchi T, Hosomichi K, Yano K, Kim YI, Nakaoka H, Kimura R, Otsuka H, Nonaka N, Haga S, Takahashi M, Shiota T, Kikkawa Y, Yamada A, Kamijo R, Park SB, Nakamura M, Maki K, Inoue I, Comprehensive genetic exploration of selective tooth agenesis of mandibular incisors by exome sequencing. *Human Genome Variation*, 4: 17005, 2017
- 9) Konno A, Nishimura A, Nakayama S, Mochizuki A, Yamada A, Kamijo R, Inoue T, Iijima T. Continuous monitoring of caspase-3 activation induced by propofol in developing mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 51: 42-49, 2016
- 10) Hiranuma K, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Nagahama R, Ikehata M, Tsukasaki M, Morimura N, Chikazu D, Maki K, Shiota T, Takami M, Yamamoto M, Iijima T, Kamijo R. Expression of nephronectin is enhanced by VD₃. *FEBS Open Bio.*, 6: 914-918, 2016
- 11) Kurosawa T, Yamada A, Suzuki D, Morimura N, Sasagane Y, Itabe H, Kamijo R. Nephronectin expression is up-regulated by BMP-2. *Biol. Pharm. Bull.*, 39: 1211-1215, 2016
- 12) Nagahama R, Yamada A, Tanaka J, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Yamamoto M, Mishima K, Aiba A, Maki K, Kamijo R. Rho GTPase protein Cdc42 is critical for postnatal cartilage development. *Biochem Biophys Res Commun*, 470: 813-817, 2016
- 13) Oshima-Nakayama M, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Kassai H, Sato Y, Yamamoto M, Shiota T, Aiba A, Maki K, Kamijo R. Cdc42 is crucial for facial and palatal formation during craniofacial development. *Bone Reports*, 5: 1-6, 2016
- 14) Ono, M, Suzawa, T, Takami, M, Yamamoto, G, Hosono, T, Yamada, A, Suzuki, D, Yoshimura, K, Watahiki, J, Hayashi, R, Arata, S, Mishima, K, Nishida K, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Localization and osteoblastic differentiation potential of neural crest-derived cells in oral tissues of adult mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 464: 1209-1214, 2015
- 15) Saito Y, Yamada A, Suzuki D, Tanaka J, Nagahama R, Kurosawa T, Maki K, Mishima K, Shiota T, Kamijo R. Association of aging with gene expression profiling in mouse submandibular glands. *Genomics Data*, 5: 115-119, 2015
- 16) Wurihan, Yamada A, Suzuki D, Shibata Y, Kamijo R, Miyazaki T. Enhanced in vitro biological activity generated by surface characteristics of anodically oxidized titanium the contribution of the oxidation effect. *European Cells & Materials*, 29: 290-302, 2015
- 17) Kurosawa T, Yamada A, Takami M, Suzuki D, Saito Y, Hiranuma K, Enomoto T, Morimura N, Yamamoto M, Iijima T, Shiota T, Itabe H, Kamijo R. Expression of Nephronectin is inhibited by Oncostatin M via both JAK/STAT and MAPK pathways. *FEBS Open Bio*, 5: 303-307, 2015
- 18) Maruyama N, Shibata Y, Mochizuki A, Yamada A, Maki K, Inoue T, Kamijo R, Miyazaki T. Bone micro-fragility caused by the mimetic aging processes in *a-Klotho* deficient mice: *in situ* nanoindentation assessment of dilatational bands. *Biomaterials*, 47:62-71, 2015

〔学会発表〕(計 29 件)

- 1) 吉田優子、山田篤、上條竜太郎
Cdc42 は出生後の血管形成および血管を介した骨形成に重要な役割を果たしている
(第 55 回日本口腔組織培養学会学術大会、兵庫、2018/11/10)
- 2) 吉田優子、山田篤、飯島毅彦、上條竜太郎
Cdc42 plays pivotal roles in postnatal angiogenesis and bone formation

(第15回 Bone Biology Forum、幕張、2018/8/17)

- 3) 池畑美紀子、山田篤、吉田優子、加藤憲、近津大地、上條竜太郎
骨軟骨形成におけるRhoファミリー低分子量Gタンパク質Rac1とCdc42の機能解析
第36回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集, p155, 2018/7/27
(第36回日本骨代謝学会学術集会、長崎、2018年7月)
- 4) 吉田優子、山田篤、池畑美紀子、加藤憲、上條竜太郎
Cdc42は出生後の血管形成および血管を介した骨形成に重要な役割を果たしている
第36回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集, p144, 2018/7/26
(第36回日本骨代謝学会学術集会、長崎、2018年7月)
- 5) 加藤憲、山田篤、吉田優子、池畑美紀子、緒方浩顕、上條竜太郎
細胞外リン濃度の上昇はFGFシグナルを介し、細胞外マトリックスタンパク質
Nephronectinの発現を抑制する
第36回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集, p170, 2018
(第36回日本骨代謝学会学術集会、長崎 2018年7月)
- 6) 加藤憲、山田篤、吉田優子、笹清人、伊藤英利、上條竜太郎、緒方浩顕、坂下暁子
FGF-2による細胞外マトリックスタンパク質Nephronectinの発現制御機構の解明
第344回昭和大学学士会例会プログラム、p2、2018
(第344回昭和大学学士会例会、東京、2018年2月10日)
- 7) Erika Minami, Atsushi Yamada, Ryutaro Kamijo
Molecular mechanisms of palatal development controlled by Cdc42.
The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR 2017)
Annual Scientific Meeting, Tokyo, Japan, November 18-19, 2017
- 8) 加藤憲、山田篤、上條竜太郎
FGF-2による細胞外マトリックスタンパク質 Nephronectin の発現制御機構の解明
第54回日本口腔組織培養学会学術大会 プログラム集, p19, 2017
(第54回日本口腔組織培養学会学術大会、岩手、2017年11月4日)
- 9) 池畑美紀子、山田篤、上條竜太郎、近津大地
細胞外マトリックスタンパク質Nephronectinの発現制御機構の解明
第18回運動器科学研究会プログラム, p12, 2017
(第18回運動器科学研究会、広島県呉市大和ミュージアム、2017年9月1-2日)
- 10) Erika Minami, Atsushi Yamada
Molecular mechanisms controlled by Cdc42 during palatal development
APDSA Annual congress Hong Kong 2017, August 1-5, 2017
- 11) Yuka Iezumi, Atsushi Yamada
IL-1beta Suppresses Nephronectin Expression via JNK pathway in Osteoblasts.
APDSA Annual congress Hong Kong 2017, August 1-5, 2017
- 12) 長濱諒、山田篤、上條竜太郎、榎宏太郎
Cdc42はPTHシグナルを介し骨軟骨形成を制御している
Cdc42 is critical for bone and cartilage development through PTH-mediated
signaling.
第75回日本矯正歯科学会大会 プログラム集, p206, 2016
(第75回日本矯正歯科学会大会、徳島、2016年11月8日)
- 13) 長濱諒、山田篤、榎宏太郎、上條竜太郎
低分子量Gタンパク質Cdc42はPTHシグナルを介し胎生期および生後成長期の軟骨形成を
制御している
Cdc42 is critical for cartilage development through PTH-mediated signaling.
第58回歯科基礎医学会学術集会 プログラム集, p55, 2016
(第58回歯科基礎医学会学術集会、札幌、2016年8月25日)
- 14) 長濱諒、山田篤、鈴木大、榎宏太郎、上條竜太郎
低分子量Gタンパク質Cdc42は生後成長期の軟骨形成において重要である
Rho GTPase protein Cdc42 is critical for postnatal cartilage development

第34回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集, p223, 2016
(第34回日本骨代謝学会学術集、大阪、2016年7月23日)

15) 平沼克洋、山田篤、鈴木大、長濱諒、高見正道、上條竜太郎
Nephronectin は活性型ビタミンD₃により発現が誘導される
第34回日本骨代謝学会学術集会 第3回アジア太平洋骨代謝学会議プログラム・抄録集,
p84, 2016
(第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪 2016年7月)

16) 鈴木大、宮本洋一、山田篤、須澤徹夫、吉村健太郎、宇山理紗、山本松男、上條
竜太郎
microRNAによる骨軟骨形成に関する遺伝子発現制御の解析
プログラム・抄録集: p31, 2016
(昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成27年度シン
ポジウム, 東京, 2016年3月)

17) R. Nagahama, A. Yamada, D. Suzuki, K. Maki, R. Kamijo
Cdc42 is critical for cartilage development during endochondral ossification at
postnatal stage
2015 cell biology ascb annual meeting poster guide p35 2015
(2015 cell biology ascb annual meeting, san diego, December 12-16)

18) Hiranuma Katsuhiko, Yamada Atsushi, Suzuki Dai, Iijima Takehiko, Kamijo Ryutarō
Regulation of nephronectin gene expression by 1, 25-Dyhydroxyvitamin D₃
2015 Cell biology ascb annual meeting • Poster Guide, p110, 2015
(2015 Cell biology ascb annual meeting, Sandiego California United States America
December 2015)

19) 平沼克洋、山田篤、上條竜太郎、飯島毅彦
活性型ビタミンD₃による細胞外マトリックスタンパク質Nephronectinの発現制御機構
の解明
第62回昭和大学学士会総会プログラム・抄録集, p19, 2015
(第62回昭和大学学士会総会、東京 2015年11月)

20) 長濱諒、山田篤、上條竜太郎、榎宏太郎
Cdc42遺伝子の生後成長期の軟骨形成における機能解析
第62回昭和大学学士会総会 プログラム・抄録集, p19, 2015
(第62回昭和大学学士会総会、東京都昭和大学、2015年11月)

21) 平沼克洋、山田篤、鈴木大、飯島毅彦、上條竜太郎
Nephronectinに対する活性型ビタミンD₃の発現制御機構の解析
第52回日本口腔組織培養学会学術大会プログラム・抄録集, p17, 2015
(第52回日本口腔組織培養学会学術大会、徳島 2015年11月)

22) 長濱諒、山田篤、鈴木大、上條竜太郎、榎宏太郎
Cdc42は生後成長期の軟骨形成に重要である
第52回日本口腔組織培養学会学術大会 プログラム・抄録集, p16, 2015
(第52回日本口腔組織培養学会学術大会、徳島、2015年11月)
ベストプレゼンテーション賞 受賞

23) Mutsuko Oshima, Atsushi Yamada, Dai Suzuki, Koutaro Maki, Ryutarō Kamijo
Cdc42 in neural crest derived cells is essential for palatal development.
ANZBMS 25th Annual Scientific Meeting Handbook, p43, 2015
ANZBMS 25th Annual Scientific Meeting, Tasmania, Australia, November, 2015

24) 長濱諒、山田篤、榎宏太郎、上條竜太郎 “Cdc42 is critical for postnatal
cartilage development.” 第63回国際歯科研究学会 日本部会総会・学術大会 抄録集,
p95 (第63回国際歯科研究学会、福岡、2015年10/30.31)

25) 平沼克洋、山田篤、飯島毅彦、上條竜太郎
“Expression of nephronectin is regulated by 1, 25-Dyhydroxyvitamin D₃.”
第63回国際歯科研究学会 日本部会総会・学術大会 抄録集, p95

(第63回国際歯科研究学会、福岡、2015年10/30.31)

26) 大島睦子、山田篤、鈴木大、槇宏太郎、上條竜太郎
神経堤由来細胞に発現するRhoファミリー低分子量Gタンパク質Cdc42は口蓋形成に必須である第57回歯科基礎医学会学術大会・総会プログラム・抄録集, p263, 2015 (第57回歯科基礎医学会学術大会・総会、新潟、2015年9月)

27) 大島睦子、山田篤、鈴木大、槇宏太郎、上條竜太郎
低分子量Gタンパク質Cdc42は口蓋形成において重要な遺伝子である第33回日本骨代謝学会学術集会プログラム・抄録集, p185, 2015 (第33回日本骨代謝学会学術集会、東京、2015年7月)

28) 山田篤、鈴木大、上條竜太郎
Rhoファミリー低分子量Gタンパク質Rac1およびCdc42の骨・軟骨形成における機能解析第1回日本骨免疫学会プログラム・抄録集, p107, 2015 (第1回日本骨免疫学会、沖縄 宮古島、2015年6-7月)

29) 大島睦子、山田篤、槇宏太郎、上條竜太郎
Cdc42遺伝子の口蓋形成過程における機能解析第69回日本口腔科学会学術集会プログラム・抄録集, p223, 2015 (第69回日本口腔科学会学術集会、大阪、2015年5月)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。