

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09512

研究課題名（和文）硬組織形成におけるRhoファミリータンパク質の細胞内外シグナル伝達制御機構の解明

研究課題名（英文）Functions of Rho family proteins on hard tissue formation

研究代表者

山田 篤 (Yamada, Atsushi)

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：低分子量Rhoファミリー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える分子スイッチとしての役割を果たしている。細胞に関しては、主にアクチン細胞骨格の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の硬組織細胞における機能を、各種阻害剤および活性化剤を用い、Rac1およびCdc42遺伝子の機能に関する研究を行うことを目的とした

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タンパク質は生体内で様々な機能を有することが細胞レベルおよび生体レベルで知られている。そのため、Rhoファミリー低分子量Gタンパク質中でもRac1およびCdc42の硬組織細胞における機能に関する研究は本研究分野で非常に社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The low molecular weight Rho family G proteins Rac1 and Cdc42 serve as molecular switches that transmit various extracellular information into the cell. Regarding cells, it is known that various biological activities, such as cell proliferation, differentiation, and cell death, are regulated mainly through the regulation of actin cytoskeleton. The purpose of this study was to study the functions of Rac1 and Cdc42 genes in hard tissue cells using various inhibitors and activators.

研究分野：骨代謝

キーワード：signal transduction

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タンパク質は、GTP結合型の活性型とGDP結合型の不活性型をもち、細胞外からの刺激を細胞内に伝える分子スイッチとしての役割を持つ(Yamada A, J Oral Biosci, 56, 23-29, 2014)。現在、およそ20種類ほど同定されており、中でもRac1とCdc42はRhoAとともに生体内でユビキタスに存在するため、これまで、様々な組織由来の培養細胞でその機能が研究されてきた(Burridge K, Cell, 116, 167-179, 2004)。その結果、アクチン細胞骨格が関与する細胞の増殖・分化・細胞死、細胞運動や細胞極性など細胞の機能にとって非常に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた(Hall A, Science, 279, 509-514, 1998)。生体におけるRac1とCdc42の機能を知るために、全身で欠損させたノックアウトマウスを作製したところ、ともに胎生初期、着床前後で致死となった(Sugihara K, Oncogene, 17, 3427-3433, 1998、Chen F, Curr Biol, 10, 758-765, 2000)。そこで、組織および時期特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製が必要となった。

Rhoファミリー低分子量Gタンパク質は、GTP結合型の活性型とGDP結合型の不活性型をもち、細胞外からの刺激を細胞内に伝える分子スイッチとしての役割を持つ(Yamada A, J Oral Biosci, 56, 23-29, 2014)。現在、およそ20種類ほど同定されており、中でもRac1とCdc42はRhoAとともに生体内でユビキタスに存在するため、これまで、様々な組織由来の培養細胞でその機能が研究されてきた(Burridge K, Cell, 116, 167-179, 2004)。その結果、アクチン細胞骨格が関与する細胞の増殖・分化・細胞死、細胞運動や細胞極性など細胞の機能にとって非常に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた(Hall A, Science, 279, 509-514, 1998)。生体におけるRac1とCdc42の機能を知るために、全身で欠損させたノックアウトマウスを作製したところ、ともに胎生初期、着床前後で致死となった(Sugihara K, Oncogene, 17, 3427-3433, 1998、Chen F, Curr Biol, 10, 758-765, 2000)。そこで、組織および時期特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製が必要となった。

硬組織形成時のRac1とCdc42の機能を検討するために、以下のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。

四肢骨軟骨組織でRac1、Cdc42を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス

1. *Rac1^{fl/fl};Col2-Cre* マウス

四肢の短縮と低体長・低体重が認められた。Frank Beier博士のグループも同じマウスを用いた研究結果を発表している(Woods G, Dev Biol, 306, 612-623, 2007)。

2. *Cdc42^{fl/fl};Col2-Cre* マウス

生後まもなく致死となる。四肢の短縮と低体長が認められた。大腿骨成長板に異常が認められ、成長板軟骨細胞の形態異常ならびに軟骨細胞分化マーカーの発現が低下していた。また、申請者は生後、軟骨組織でCdc42を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス(*Cdc42^{fl/fl};Col2-CreER* マウス)も作製した。

3. *Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウス

四肢の短縮と低体長が認められた。合指が認められその原因は胎生期、肢芽指間細胞のアポトーシス不全が原因と考えられた。

4. *Cdc42^{fl/fl};Prx1-Cre* マウス

生後まもなく致死となる。上記3. *Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスでは認められなかった口蓋裂を呈する。*Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスと同様に、四肢形成不全と合指が認められた。認められた表現型は、*Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスよりも強く現れた。指骨の形成不全および指骨間の癒合が認められ、この表現型は*Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスでは認められなかった。

5. *Cdc42^{fl/fl};P0-Cre* マウス

頭蓋顎顔面組織を構成する細胞の多くが神経堤を由来とする細胞であると考えられている(Chai Y, Dev Dyn, 235, 23537-2375, 2006)。生後まもなく致死となる。口蓋裂を呈し、哺乳ができない。顎顔面の骨軟骨形成に異常が認められた。*Rac1^{fl/fl};P0-Cre* マウスには口蓋裂の表現型は認められなかった(未発表データ)。

上記、ノックアウトマウスの表現型から、Rac1とCdc42は四肢骨軟骨組織および頭蓋顎顔面組織の形成に非常に重要であることが示唆された。しかし、認められた表現型の詳細なエビデンスの究明は未だ行なわれておらず、また、細胞内外のシグナル伝達など、分子レベルでのメカニズム解明も行われていない。例えば、これまで様々な組織細胞におけるRac1とCdc42のアクチン細胞骨格が関与する細胞内シグナル伝達に関して、Wave, PI3K, PakおよびN-Waspといった分子を介し、ラメリポディアおよびフィロポディア形成を制御していることが示唆されてきたが(Bishop AL, Biochem J, 348, 241-255, 2000)、硬組織におけるRac1とCdc42の細胞内シグナル伝達に関する詳細は不明である。Rac1およびCdc42がどのような細胞内シグナル伝達で硬組織形成過程を制御しているのか?との問いを提起した。

2. 研究の目的

Rac1およびCdc42の硬組織細胞における機能を、各種阻害剤および活性化剤を用い、Rac1およびCdc42遺伝子の機能に関する研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

骨芽細胞における機能を検討する目的で、in vitro (マウス由来頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞) でRac1とCdc42の機能を阻害する阻害剤、NSC23766およびCasinをそれぞれ作用させた際の細胞内における遺伝子発現変化の網羅的解析をマイクロアレイ解析により行った。また、軟骨細胞株ATDC5細胞にRac1およびCdc42の両方のsiRNAを処理したサンプル (Rac1 Cdc42 si) および無処理のサンプル (Control1) における遺伝子発現様式に関し、NGS(次世代シーケンス)解析による網羅的解析を行った。

4. 研究の成果

骨芽細胞における機能を検討する目的で、in vitro (マウス由来頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞) でRac1とCdc42の機能を阻害する阻害剤、NSC23766およびCasinをそれぞれ作用させた際の細胞内における遺伝子発現変化の網羅的解析をマイクロアレイ解析により行った。その結果、hyaluronan synthaseファミリーの1つHyaluronan synthase 2 (Has2)、Transforming growth factor beta superfamilyに属し頭蓋骨形成に重要な役割を果たしていると考えられているGrowth differentiation factor 10 (Gdf10)、インスリン様増殖因子結合タンパク質ファミリーの1つ、Insulin-like Growth factor binding protein 5(Igfbp5)などの遺伝子発現が強力に抑制されることが示唆された。

また、軟骨細胞株ATDC5細胞にRac1およびCdc42の両方のsiRNAを処理したサンプル (Rac1 Cdc42 si) および無処理のサンプル (Control1) における遺伝子発現様式に関し、NGS(次世代シーケンス)解析による網羅的解析を行った。その結果Control1に比べRac1 Cdc42 siで発現が上昇した遺伝子は29個、発現が低下した遺伝子は3個であった。Controlに比べRac1 Cdc42 siで発現が上昇した遺伝子としてはDecorin、Asporin、Osteomodulinなどがあり、発現の低下した遺伝子にはHistone H2Atype1Cがあった。また、本年度は骨芽細胞にRho Rac Cdc42シグナルを活性化させる活性化剤を作用させたサンプル (RhoRac Cdc42 activator) および無処理のサンプル (Control2) における遺伝子発現様式に関しても、cDNAマイクロアレイ法により網羅的解析を行った。その結果desmin、keratin7、netrin4などの遺伝子に発現の上昇が認められ、calponin1、pleiotrophinなどの遺伝子に発現の低下が認められた。軟骨特異的にRac1とCdc42を欠損させたダブルノックアウトマウスの研究で骨軟骨に様々な表現型が認められたが、阻害および活性化でも様々な遺伝子の発現に変化が認められたことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takimoto R, Suzawa T, Yamada A, Sasa K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasama Y, Tanaka M, Kinoshita M, Ikezaki K, Ichikawa M, Yamamoto M, Shiota T, Kamijo R	4. 巻 162(3)
2. 論文標題 Zoledronate promotes inflammatory cytokine expression in human CD14-positive monocytes among peripheral mononuclear cells in presence of T cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 306-313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imm.13283.	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 Kato T, Mizobuchi M, Sasa K, Yamada A, Ogata H, Honda H, Sakashita A, Kamijo R	4. 巻 532(1)
2. 論文標題 Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Uremic Rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.096.	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 Izumida E, Suzawa T, Miyamoto Y, Yamada A, Otsu M, Saito T, Yamaguchi T, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Yoshimura K, Sasa K, Takimoto R, Uyama R, Shiota T, Maki K, Kamijo R	4. 巻 99(4)
2. 論文標題 Functional analysis of PTH1R variants found in primary failure of eruption.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Dent. Res.	6. 最初と最後の頁 429-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520901731.	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 Matsumoto A, Takami M, Urano E, Nakamachi T, Yoshimura K, Yamada A, Suzawa T, Miyamoto Y, Baba K, Kamijo R	4. 巻 62
2. 論文標題 Lipopolysaccharide (LPS) inhibits ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2 and TGF-beta1 through IL-1beta production.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Bioscience	6. 最初と最後の頁 44-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.01.004.	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 Kato M, Tanaka J, Aizawa R, Yajima-Himuro S, Seki T, Tanaka K, Yamada A, Ogawa M, Kamijo R, Tsuji T, Mishima K, Yamamoto M	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of junctional epithelial cell replacement by oral gingival epithelial cells over a life time and after gingivectomy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44065-x.	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 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, Kamijo R	4. 巻 512
2. 論文標題 Cdc42 regulates cranial suture morphogenesis and ossification.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 145-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.106.	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 Manome Y, Suzuki D, Nishida R, Yamada A, Miyamoto Y, Funatsu T, Kamijo R	4. 巻 16
2. 論文標題 Immunotherapy for malignant tumors with focus on toll-like receptors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Sci Int	6. 最初と最後の頁 3-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1011	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 吉田優子、山田篤、吉村健太郎、上條竜太郎、飯島毅彦	4. 巻 28
2. 論文標題 血管形成におけるCdc42の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本口腔組織培養学会	6. 最初と最後の頁 1-9
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 Kato T, Yamada A, Sasa K, Yoshimura K, Morimura N, Ogata H, Sakashita A, Kamijo R	4. 巻 104(2)
2. 論文標題 Nephronectin expression is inhibited by inorganic phosphate in osteoblasts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Calcif. Tissue Int.	6. 最初と最後の頁 201-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-018-0484-3	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 該当する

1. 著者名 Sasa K, Yoshimura K, Yamada A, Suzuki D, Miyamoto Y, Imai H, Nagayama K, Maki K, Yamamoto M, Kamijo R	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Monocarboxylate transporter-1 promotes osteoblast differentiation via suppression of p53, a negative regulator of osteoblast differentiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 10579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28605-5	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 該当する

1. 著者名 Ikehata M, Yamada A, Fujita K, Yoshida Y, Kato T, Sakashita A, Ogata H, Iijima T, Kuroda M, Chikazu D, Kamijo R	4. 巻 500
2. 論文標題 Cooperation of Rho family proteins Rac1 and Cdc42 in cartilage development and calcified tissue formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 525-529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.032	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 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 木下三博、山田篤、上條竜太郎
2. 発表標題 骨芽細胞においてPMAはNephronectinの発現をPKC および を介し抑制する.
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田梨恵, 鈴木 大, 笹 清人, 山田 篤, 田中準一, 三島健二, 飯島毅彦, 上條竜太郎
2. 発表標題 抗MHC抗体投与後の肺水腫における血管内皮グリコカリックスの分解.
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧本玲子, 田中元博, 山田 篤, 宮本洋一, 笹 清人, 須澤徹夫, 吉村健太郎, 高見正道, 代田達夫, 上條竜太郎
2. 発表標題 ゾレドロン酸による末梢血単球の破骨細胞分化抑制.
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田優子, 山田篤, 鈴木航, 上條竜太郎, 飯島毅彦
2. 発表標題 Rhoファミリー低分子量Gタンパク質Cdc42の血管形成および骨形成に対する機能解析.
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧本玲子, 笹 清人, 山田 篤, 宮本洋一, 吉村健太郎, 代田達夫, 上條竜太郎
2. 発表標題 ゾレドロン酸による末梢血単球の破骨細胞分化抑制.
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oshio A, Miyamoto Y, Sasa K, Yamada A, Yoshimura K, Kamiyo R
2. 発表標題 Gelated ozone suppresses osteoclast differentiation and periodontal bone loss.
3. 学会等名 第67回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村健太郎、宮本洋一、笹清人、山田篤、坂井信裕、高見正道、上條竜太郎
2. 発表標題 歯周病性骨破壊に対するオゾンジェルの効
3. 学会等名 第2回 オゾン医療・審美学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧本 玲子、宮本 洋一、山田 篤、須澤 徹夫、笹 清人、上條 竜太郎、代田 達夫
2. 発表標題 ビスホスホネートのヒト末梢血単核細胞に対する作用の解析
3. 学会等名 第65回昭和大学学士会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下三博、山田 篤、上條竜太郎
2. 発表標題 PMA 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
3. 学会等名 第56回 日本口腔組織培養学会学術大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田優子、山田篤、上條竜太郎
2. 発表標題 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。
3. 学会等名 第55回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池畑美紀子、山田篤、吉田優子、加藤憲、近津大地、上條竜太郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田優子、山田篤、池畑美紀子、加藤憲、上條竜太郎
2. 発表標題 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。
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤憲、山田篤、吉田優子、池畑美紀子、緒方浩顕、上條竜太郎
2. 発表標題 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。
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学歯学部 口腔生化学講座
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------