

機関番号：35413

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790171

研究課題名 (和文) 軟骨および骨形成における低分子量 G タンパク質、Rho ファミリーの役割

研究課題名 (英文) The functional involvement of Rho family on bone formation.

研究代表者

福山 亮 (FUKUYAMA RYO)

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号：20389117

研究成果の概要 (和文): 低分子量 G タンパク質の一つ Rac の constitutively active 体 (L61Rac) を遺伝子導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、Rac の活性化が骨代謝環境に与える影響について検討した。その結果、L61Rac Tg マウスでは幼若化した骨芽細胞の増加と類骨に異常が認められ、骨量が減少していた。よって、Rac の活性化は骨芽細胞の成熟を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文): In this study, to examine the physiological role of Rac on bone formation, we generated transgenic (Tg) mice that overexpressed L61Rac, a constitutively active form of Rac, in osteoblast using pro- $\alpha 1(I)$ collagen promoter and examined the characteristic of Tg mice. Tg mice showed osteopenia due to inhibition of osteoblast maturation.

交付決定額

(金額単位: 円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：発生学・形態形成学

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨形成に必須の転写因子 Runx2 の発見以降、本転写因子と相互作用する因子が次々と明らかとなっている。申請者もこれまでに in vivo 条件下、Cbfb (Core binding factor β) が Runx2 の DNA 結合に必須であること (Yoshida C et al. Nature Genet 32: 633-638, 2002)、Runx2 が骨芽細胞の骨細胞への分化を抑制することを明らかとしている

(Kanatani N et al. Dev Biol 296: 48-61, 2006)。

(2) さらに申請者は骨代謝分野において、ほとんど議論されてこなかった細胞の方向性や生存・増殖に関与する Akt が Runx2 と互いに協調し、骨芽・軟骨細胞の分化と運動性に重要な役割を示すこと (Fujita T et al. J Cell Biol 166: 85-95, 2002)、細胞の運動

性および細胞の骨格を制御している Rho ファミリーの機能を阻害することで、細胞の運動性が抑制される一方で、細胞の分化・骨形成能を亢進することを報告している (Fukuyama R et al. Biochem Biophys Res Commun 315:636-642, 2004)。

(3) (1)、(2) から、Rho ファミリーの機能阻害による骨形成への関与の一環として執り行った骨芽細胞内の Rac の生体内での解析では、2.3kb I 型コラーゲンプロモーターを用いた骨芽細胞特異的 dominant negative 型-Rac トランスジェニック (dn-Rac Tg) マウスを作製し、骨芽細胞内の Rac の役割を検討した。結果として野生型マウス (wt) に対し、dn-Rac Tg マウスは骨形態計測および骨形成マーカーの解析で骨形成促進を示唆するデータが得られた。これにも関わらず、顕著な骨量の減少が認められ、表現型では *in vitro* と *in vivo* で矛盾した結果を得た。この原因の一つとして、dn-Rac Tg マウスでは骨吸収マーカーの尿中デオキシピリジノリンと破骨細胞分化促進因子 RANKL が上昇する結果を得たことから、破骨細胞の骨吸収亢進と細胞分化の亢進が考えられた。

以上のように、骨芽細胞内での Rho ファミリーの機能は非常に重要な役割を担うこと、骨芽細胞の機能異常が破骨細胞分化・機能にも影響を及ぼすことを明示してきた。

2. 研究の目的

これまでに、骨芽細胞内の Rho ファミリー分子 (Rac, Cdc42, RhoA) 機能を抑制することにより、細胞分化・骨形成機能に多大な影響を及ぼすことを明らかにしてきた。本研究において、Rho ファミリーの骨形成関連細胞群 (軟骨細胞・骨芽細胞) の機能への関与について、

(1) 骨芽細胞内の Rho ファミリー機能亢進による細胞分化・骨形成機能への影響

(2) 骨芽細胞による破骨細胞分化制御への影響

(3) 軟骨細胞内の Rho ファミリー機能抑制・亢進が軟骨形成に与える影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウスの作製

骨芽細胞特異的に発現を誘導する 1 型コラ

ーゲン (coll1a1) プロモーターと L61Rac を pNASSβ ベクターに組み換え、coll1a1 promoter-L61Rac/pNASSβ を作成した。受精卵へのマイクロインジェクションには、coll1a1 の 5' を KpnI で、polyA+配列の 3' を HindIII で消化して得られる 3.5 kb の断片を用いた。誕生したマウスの尾からゲノム DNA を抽出し、BamHI 消化後 L61Rac cDNA 0.7 kb の断片をプローブとしてサザンブロッティング法によりスクリーニングを行い、導入遺伝子の発現を認めたマウスについて、ノザンブロッティング法により導入遺伝子由来の mRNA 発現を調べた。その結果、2 匹に強い発現を認め、これらをそれぞれ独立してライン化した。以下の解析は、最も強い mRNA 発現を認めた 1 ラインで行った。

骨塩量・骨密度の測定

pQCT 骨密度測定装置、XCT Research SA (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany) を用いてボクセルサイズ 0.08 × 0.08 × 0.46 mm で測定した。海綿骨領域の計測には、大腿骨遠位端成長板軟骨から 0.2 mm 間隔で 15 スライス計測し、骨幹部の計測は大腿骨の中央部を 1 スライス計測した。全骨の外形は、pQCT software algorithm で自動計測を行った。

組織学的解析

骨形態計測には 10 週齢の雄性マウスを用いた。大腿骨を 70% ethanol で固定し、2-propanol で脱水後、水溶性メタクリル酸メチル (GMA) で重合・包埋した。これを長軸方向に 3 μm で薄切後、toluidine blue 染色を施した後封入し、半自動骨形態計測システム (システムサプライ社) で計測を行った。骨形態計測値は American Society of Bone Mineral Research が推奨する定義・指標を基に計測・算出した。組織学的解析には骨を脱灰後、パラフィンで包埋、薄切し、hematoxylin・eosin (HE) 染色を施した。

骨芽細胞分化マーカーの解析

骨芽細胞の分化および分化状態を調べるため、セバゾール RNA (ナカライテスク) を用いて、脛骨、大腿骨の mRNA を抽出し、ノザンプロット法で測定した。

骨芽細胞による破骨細胞分化制御への影響の解析

生体内における骨芽細胞と破骨細胞の細胞間相互作用による破骨細胞制御の解明として、RANKL と OPG の mRNA 発現量を RT-PCR 法で測定した。

骨折試験

麻酔下マウスの下腿前面に 1.5 cm の皮膚

縦切開を行い、静脈を傷つけないように下腿を露出した。下腿中央で脛骨の外側から筋と骨の間を骨に沿って曲がりピンセットを用いて注意深く剥離し、内側に至った。小型電動ノコギリで垂直に脛骨骨幹部を切断し、生理食塩水で洗浄し、骨折部から骨頭部に向けて23G スパイナル針の内ピンを挿入し、膝蓋腱付着部から一度外に貫通させた。骨折を整復し、側部側の脛骨に慎重に挿入し、抵抗があるところで止め、余分な内ピンを切断した。患部を生理食塩水で洗浄し、皮膚を縫合した。コントロールとして、反対側の脛骨は骨折せずに脛骨近位端側から内ピンのみを刺入した。

(2) Rho ファミリー分子 (Rac, Cdc42, RhoA) 安定発現細胞株の樹立

Rho ファミリー分子 (Rac, Cdc42, RhoA) 機能の軟骨細胞機能への影響を検討するため、各 Rho ファミリー分子の ca および dn 体をトランスフェクション試薬 (TransFectin, Bio-Rad 社) を用いて、軟骨細胞株 ATDC5 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入には、目的遺伝子と共に neomycin 耐性遺伝子を含む pEGFP-N1 を共導入した。導入後、低密度になるように細胞を再播種し、3 週間、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 を含む 5% FBS/D-MEM で薬剤耐性クローンを選別した。各細胞クローンは、クローニングリングを用いてピックアップし、導入遺伝子の発現はウエスタンブロッティング法を用いて選別し、導入遺伝子の発現量の高いクローンを実験に用いた。それぞれの細胞について mRNA を抽出し、ノザンブロッティング法により、軟骨細胞分化マーカーの II 型、X 型コラーゲンの発現を測定した。

4. 研究成果

(1) ca-Rac Tg マウスの解析

表現系解析

ca-Rac Tg マウスは出生時、骨格に異常は認められず、体成長も野生型 (wt) マウスと ca-Rac Tg マウスと差はなかった。また、dn-Rac Tg マウスで認められた歯芽破折は生じなかった。軟 X 線像による骨塩量の解析では、4 週齢までは wt マウスと ca-Rac Tg マウス間に骨塩量に顕著な変化を認めないが、8 週齢では wt マウスに比べ ca-Rac Tg マウスで骨の軟 X 線透過度が上昇し、15 週齢ではその差がより大きく認められた。この傾向は 10 週齢 ca-Rac Tg マウスの pQCT 解析でも認められた。海綿骨が多く存在する大腿骨遠位端部の計測では、ca-Rac Tg マウスの海綿骨の骨塩量 (Total BMC)・骨密度 (Total BMD) が wt

マウスに比べ、有意に減少していた。皮質骨が多くを占める大腿骨骨幹部の計測でも、骨密度 (Total BMD) が wt マウスに比べ、有意に減少していた。また、骨内膜周囲長 (Endo-C) に差が認められず、骨外膜周囲長 (Peri-C) が wt マウスに比べ、有意に減少していたことから、ca-Rac Tg マウスの皮質骨厚が低下していることがわかった。

骨形態計測法による海綿骨の骨代謝解析

10 週齢の ca-Rac Tg マウスの大腿骨遠位端部の海綿骨骨量 (BV/TV) は、wt マウスに比べ有意な減少を認めた。一方、ca-Rac Tg マウスの単位面積あたりの骨芽細胞数 (N. Ob/B. Pm)、骨芽細胞面 (Ob. S/BS) は wt マウスに比べ、有意に増加したものの、幼若な骨芽細胞が多数存在し、類骨産生がうまくできていない様子が観察された。従って、ca-Rac Tg マウスは wt マウスに比べ、骨形成が正常に行われず、劇的な骨量減少を導いたと考えられた。

骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現

骨芽細胞の分布および分化状態を調べるために、colla1、osteopontin、osteocalcin の各 mRNA 発現量を検討した。4 週齢のマウスの後肢より抽出した total RNA でノザンブロットを行った。その結果、wt マウスと比較して ca-Rac Tg マウスでは colla1 および osteopontin の発現量が上昇していた。osteocalcin については、同等であった。この結果は、ca-Rac Tg マウスの形態学的解析での幼若な骨芽細胞が多いことにより、骨形成に障害があることを裏付ける結果となった。

破骨細胞分化に対する影響

骨芽細胞内の Rac の強制発現による発細胞分化への影響を検討するため、ca-Rac Tg マウスから抽出した RNA を用いて、RANKL と OPG の mRNA 発現量を RT-PCR 法にて測定した。その結果、野生型マウスに比べ、RANKL の上昇と OPG の低下傾向が認められた。しかしながら、本研究期間中の解析においては、個体間のばらつきが大きく有意差を認めなかった。

骨芽細胞の走化性機能が骨代謝に与える影響の解析

骨芽細胞での Rac 機能亢進による走化性機能の影響を検討するため、細胞の集積と走化性が必要とされる条件として、ca-Rac Tg マウスに骨折術を施し、骨折治癒能への影響を検討した。その結果、wt マウスに比べ、ca-Rac Tg マウスでは、明らかに骨の融合が遅延しており、Rac 機能の亢進が細胞走化性と骨形成の低下を導くことが示唆された。

(2) 軟骨細胞内の Rho ファミリー機能抑制・亢進が軟骨形成に与える影響

細胞分化能

軟骨分化能に対する Rho ファミリーの役割を検討するため、軟骨分化マーカーとして知られている Type II コラーゲン、Type X コラーゲンの発現について、各遺伝子導入細胞を経日的にサンプリングし、ノザンプロット法を用いて検討した。その結果、mock 体に比べ、全ての dn 体では両コラーゲンの発現が亢進していた。その中で特に dn-Rac1 で強い発現が認められた。一方で ca 体では変化は認められなかった。

軟骨形成に与える影響

各安定発現細胞のプロテオグリカン生成量について測定を行った。その結果、mock 体に比べ、全ての dn 体で有意にプロテオグリカン量の上昇が認められた。特に dn-Rac1 が最も上昇を示した。また、ca 体では有意な差は認められなかった。

研究代表者は本研究において、骨芽細胞の Rho ファミリー、特に Rac1 の機能亢進による生体での骨代謝に対する影響を検討した。その結果、以前検討した dn-Rac Tg マウスと同様に骨量減少が誘導された。しかしながら、ca-Rac Tg では明らかに幼若な骨芽細胞が多く認められ、類骨形成がうまく行われていないなど dn-Rac Tg マウスとは骨代謝に対する影響が異なることが示された。さらに、in vitro 条件下、Rho ファミリーの活性・不活性化により骨形成に対し影響を与えることを示してきた。本研究により、軟骨細胞においても in vitro 条件下では同様の結果が得られることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 1 件)

福山 亮、Benzo [b] furan 誘導体 MU314 の骨吸収抑制作用発現機構に関する検討、第 118 回日本薬理学会近畿部会、2011 年 11 月 19 日、大阪

[その他]

ホームページ等

<http://web.me.com/ph.hirokoku.u.ac.jp/Lab/Phar.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山 亮 (FUKUYAMA RYO)

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号：20389117