

## 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 24 年 4 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890180

研究課題名（和文）骨・軟骨形成における低分子量 G タンパク質 Rac1 の機能解析

研究課題名（英文）Functions of Rac1 during bone and cartilage formation

研究代表者

鈴木 大 (DAI SUZUKI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00585797

研究成果の概要（和文）：Rho ファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質、Rac1 を組織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、野性型マウスと比較し、四肢の短縮、頭蓋骨の癒合不全が認められた。四肢の短縮の原因は軟骨内骨化の不全によるもの、頭蓋骨の癒合不全は早期の石灰化が原因である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Rac1, a member of the Rho subfamily of small GTPases, is known to be a regulator of multiple cellular functions, including cytoskeletal organization, cell migration, proliferation, and apoptosis. To investigate the physiological function of Rac1 during bone and cartilage formation, we generated tissue-specific inactivated Rac1 (*Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre*) mice. Rac1 conditional knockout mice demonstrated short limbs and incomplete fusions of the cranium. Our results infer that short limb was caused by abnormal endochondral ossification and incomplete fusion of the cranium was due to enhanced mineralization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23 年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：遺伝子、発生・分化、細胞・組織、骨・軟骨

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 低分子量 G タンパク質、Rac1 について

Rac は Rho ファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質で、細胞外の種々の刺激により GTP 結合型に変異し、活性化される。活性化した Rac はアクチン細胞骨格系の制御を介した細胞運動を通して個体発生、発

癌、神経細胞のネットワークなど、生体の様々な高次機能を制御していることが知られている。哺乳類において Rac は 3 つのアイソフォームが存在し、Rac1 はユビキタスに発現しているのに対し、Rac2、Rac3 はそれぞれ造血細胞および神経細胞で発現している。*Rac1* 遺伝子を全身で欠損させたマウスは胎生初期、原始線条体形成不全により

胎生 9.5 日から 10.5 日目以降生存しない (Sugihara K. *et al.* *Oncogene* 17, 3427-3433 (1998))。

## (2)骨・軟骨細胞における Rac1 の作用

*in vitro*において、Rac1 は p38 MAP Kinase を介し、軟骨細胞分化・増殖および細胞死において重要な役割を果たしている (Wang G. *et al.* *J. Bone Miner. Res* 20, 1022-1031 (2005))。また、*in vivo*において、軟骨細胞特異的に *Rac1* 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスでは軟骨細胞形成不全により骨格の変性が起こり、矮小発育症、脊柱後湾症の表現型が認められる (Wang G. *et al.* *Dev. Biol.* 20, 1022-1031 (2007))。

## 2. 研究の目的

申請者は *Rac1* の四肢形成における機能を検討するために、主に肢芽間葉系細胞で発現している *Prx1* 遺伝子のエンハンサー制御下で *Cre* 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (*Prx1-Cre Tg*) と、*Rac1* 遺伝子エクソン 1 の上流および下流域に loxP 配列を組み込んだマウス (*Rac1 flox*) を交配させたコンディショナルノックアウトマウス (*Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre*) を作成した結果、以下の表現型が得られた。

## 3. 研究の方法

### (1) *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスの四肢・骨格形成における表現型解析

① *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは合指症を呈するため、その解析を行う。指間分離期である胎生 13、14 日の肢芽の切片を作製し TUNEL 染色を行い、指間域におけるアポトーシスを確認する。また、四肢形成のパターニングに関与する遺伝子群 (*BMP*、*FGF*、*Hox* 遺伝子) の発現様式を胎生 11、12、13 日において whole mount *in situ* hybridization 法を用い検討する。

② *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスについて、四肢以外の表現型が認められるか、骨格標本作製し検討する。骨・軟骨組織を Alizarin red および Alcian blue で染色する。

### (2) *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスの骨・軟骨形成における表現型解析

*Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは四肢の長管骨が野生型マウスと比較し、短いことが確認されたため、骨・軟骨形成における機能解析を行う。胎生期より順次、骨格標本作製し、経時的な骨・軟骨組織の染色状態を実体顕微鏡を用いて観察する。また同時に四肢長管骨の切片を作製し、静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層、骨化領域の組織的変化の部位および時期を特定する。軟骨細胞層の増殖およびアポトーシスを BrdU 染色、TUNEL 染色を用いて確認する。骨芽細胞および軟骨細胞層のマーカー遺伝子群 (*Col*、*Ihh*、*Mmp*、*Runx2*、*Vegfa* 遺伝子) の発現様式を *in situ* hybridization または免疫染色法を用い検討する。

## 4. 研究成果

### (1) *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは四肢・骨格形成が異常である。

① *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは上肢、下肢ともに野生型マウスと比較し、短く、指間の癒合を呈している。

② *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスの肢芽指間域でアポトーシスが認められなかった。

③ 肢芽指間域のアポトーシスに関与する *Bmp2* および *Bmp7* の発現が *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスでは野生型マウスと比較し、有意に減少していた。

④ *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは頭蓋骨、胸骨の癒合不全が認められた。

⑤ *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは頭蓋骨の早期石灰化が認められた。

### (2) *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは骨・軟骨形成が異常である。

① *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは長管骨における軟骨内骨化の遅延が認められた。

② 一次骨化中心形成後の *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスの成長板で肥大軟骨細胞層の肥厚が認められた。

③ *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは肥大軟骨細胞層の早期アポトーシスが認められた。

④ *Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre* マウスは肥大軟骨細胞層における *Vegfa*、*Mmp13* の発現低下が認められた。

以上の結果から、*Rac1* は四肢・骨格形成および骨・軟骨形成に重要な役割を果たしてい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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Suzuki D (3 番目/14 人): Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development. *Mech. Dev.*, in press. (査読: 有)
- 2) Suzuki D (4 番目/9 人): Antioxidant and osteogenic properties of anodically oxidized titanium. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical*, in press. (査読: 有)
- 3) Suzuki D (3 番目/9 人): Antimicrobial and osteogenic properties of a hydrophilic-modified nanoscale hydroxyapatite coating on titanium. *Nanomedicine*, 8: 374-382, 2012. (査読: 有)
- 4) Suzuki D (3 番目/12 人): Expression of POEM, a positive regulator of osteoblast differentiation, is suppressed by TNF- $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 766-770, 2011. (査読: 有)
- 5) Suzuki D (2 番目/9 人): The characteristics of in vitro biological activity of titanium surfaces anodically oxidized in chloride solutions. *Biomaterials*, 31: 8546-8555, 2010. (査読: 有)

[学会発表] (計 22 件)

- 1) 柴田 陽, 鈴木 大, 上條竜太郎, 宮崎 隆:  
陽極酸化チタン表面石灰化組織のナノバイオメカニクス.  
昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 23 年度合同シンポジウム  
2012 年 3 月 17 日, 東京
- 2) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 相澤 怜, 鈴木 航, 塚崎 雅之, 山本松男, 馬場一美, 上條竜太郎:  
BMP 活性制御因子 Alx3 の骨芽細胞分化制御機構の解明.  
昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 23 年度合同シンポジウム

2012 年 3 月 17 日, 東京

- 3) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 上條竜太郎, 馬場一美:

転写因子 Alx3 は BMP シグナルを増強し、骨芽細胞分化を促進させる。

第 4 回口腔先端応用医科学研究会 (Academy of Advanced Applied Science in Oral Medicine (AAASOM)) 学術会議

2012 年 1 月 21-22 日, 東京

- 4) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 馬場一美, 上條竜太郎:

Alx3 は BMP-2 による骨芽細胞分化を制御する。

第 48 回日本口腔組織培養学会学術大会

2011 年 11 月 19 日, 東京

- 5) 相澤 怜, 山田 篤, 鈴木 大, 塚崎 雅之, 山本 剛, 飯村 忠浩, 山口 朗, 山本松男, 上條 竜太郎:

Cdc42 は四肢形成における軟骨形成と肢芽指間域のアポトーシスを制御する。

第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2011 年 9 月 30 日, 10 月 1-2 日, 岐阜

- 6) 塚崎雅之, 山田 篤, 高見正道, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 吉村健太郎, 山本松男, 上條竜太郎:

TNF- $\alpha$  は POEM の発現を抑制し、骨芽細胞分化を制御する。

第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2011 年 9 月 30 日, 10 月 1-2 日, 岐阜

- 7) Ryo Aizawa, Atsushi Yamada, Dai Suzuki, Hidetoshi Kassai, Takeshi Harada, Masayuki Tsukasaki, Gou Yamamoto, Tadahiro Iimura, Akira Yamaguchi, Kazuki Nakao, Matsuo Yamamoto, Atsu Aiba, Ryutarō Kami jo:

Essential role of Cdc42 in chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development.

The 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research  
September 16-20, 2011, San Diego, California, USA

- 8) Rika Yasuhara, Motomi Enomoto-Iwamoto, Dai Suzuki, Atsushi Yamada, Atsu Aiba, Shu Takeda, Ryutarō Kami jo:

The cross talks between Wnt/ $\beta$ -catenin and Rac1 signaling in regulation of maintenance and function of superficial cell layer in articular cartilage.

IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) Annual Scientific Meeting with the Japanese Society for Bone and Mineral Society (JSBMR) (IOF-ANZBMR)

September 4-8, 2011, Gold Coast, Australia

9) 塚崎雅之, 山田 篤, 高見正道, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 吉村健太郎, 山本松男, 上條竜太郎:

TNF- $\alpha$  は骨芽細胞において POEM の発現を抑制し、骨芽細胞分化を制御する。

第 29 回 日本骨代謝学会学術集会

2011 年 7 月 28-30 日, 大阪

10) 安原理佳, 鈴木 大, 山田 篤, 竹田秀, 上條竜太郎:

関節表層細胞の維持と機能調節における Wnt/ $\beta$ -catenin と Rac1 シグナルのクロストーク。

第 29 回 日本骨代謝学会学術集会

2011 年 7 月 28-30 日, 大阪

11) 相澤 怜, 山田 篤, 鈴木 大, 塚崎 雅之, 山本 剛, 立川 哲彦, 上條 竜太郎, 山本 松男:

Cdc42 は四肢形成において軟骨形成と指間部アポトーシスに必須である。

第 31 回昭和歯学会総会

2011 年 7 月 2 日, 東京

12) 塚崎雅之, 山田 篤, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 宮本洋一, 須澤徹夫, 高見正道, 山本松男, 上條竜太郎:

TNF- $\alpha$  は細胞接着分子 POEM の発現を抑制し、骨芽細胞分化を制御している。

第 31 回昭和歯学会総会

2011 年 7 月 2 日, 東京

13) 柴田 陽, 鈴木 大, 片岡 有, 宮崎 隆:

陽極酸化処理チタンの抗菌効果と骨形成能。

昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 22 年度合同シンポジウム

2011 年 3 月 26 日, 東京

14) 山田 篤, 塚崎雅之, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 山本松男, 上條竜太郎:

BMP 活性制御因子の探索とその機能解析。

昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 22 年度合同シンポジウム

2011 年 3 月 26 日, 東京

15) Suzuki D, Yamada A, Kamijo R:

Essential role of Rac1 during limb and skeletal development.

89<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the International Associate for Dental Research (IADR)

March 16-19, 2011, San Diego, California, USA

16) Tanaka R, Shibata Y, Suzuki D, Manabe A, Hisamitsu H, Miyazaki T:

Antimicrobial Activity and Osteoblastic Responses to Anodically Oxidized Titanium Surfaces.

89<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the International Associate for Dental Research (IADR)

March 16-19, 2011, San Diego, California, USA

17) Tsukasaki M, Yamada A, Miyazono A, Suzuki D, Yoshimura K, Aizawa R, Miyamoto Y, Takami M, Suzawa T, Morimura N, Aruga J, Yamamoto M, Kamijo R:

TNF- $\alpha$  Suppresses POEM Expression in Osteoblasts.

89<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the International Associate for Dental Research (IADR)

March 16-19, 2011, San Diego, California, USA

18) Matsumoto T, Yamada A, Suzuki D, Takami M, Suzawa T, Miyamoto Y, Baba K, Kamijo R:

Alx3, a Paired-type Homeodomain Containing Transcription Factor, Regulates Osteoblast Differentiation Induced by BMP-2.

The 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research

October 15-19, 2010, Toronto, Canada

19) 鈴木 大, 山田 篤, 安原理佳, 立川哲彦, 中村雅典, 上條竜太郎:

低分子量 G タンパク質 Rac1 は四肢骨格形成に必須である。

第 52 回歯科基礎医学会学術大会

2010 年 9 月 20-22 日, 東京

20) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 馬場一美, 上條竜太郎:

ホメオボックス遺伝子  $Alx3$  は BMP-2 による骨芽細胞分化を制御する.

第 26 回日本骨代謝学会学術集会

2010 年 7 月 21-23 日, 東京

21) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 上條竜太郎, 馬場一美:

ホメオボックス遺伝子  $Alx3$  は BMP-2 による骨芽細胞分化を制御する.

第 30 回昭和歯学会総会

2010 年 7 月 3 日, 東京

22) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 馬場一美, 上條竜太郎:

$Alx3$  による骨芽細胞分化制御機構の解明.

第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会

2010 年 6 月 25-26 日, 北九州

## 6. 研究組織

研究代表者

鈴木 大 (SUZUKI DAI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号: 00585797

研究協力者

上條 竜太郎 (KAMIJO RYUTARO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号: 70233939

山田 篤 (YAMADA ATSUSHI)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号: 50407558