

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592813

研究課題名(和文) 低分子量Gタンパク質Rac1およびCdc42の骨・軟骨形成における作用機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of Rac1 and Cdc42, Rho small GTPases, in bone and cartilage 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Rhoファミリータンパク質に属する低分子量Gタンパク質Rac1およびCdc42は細胞における様々な機能、例えば細胞骨格の制御や細胞増殖および細胞死に関して重要な役割を果たしていると考えられている。近年、Rac1およびCdc42を肢芽間葉系細胞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(Rac1<sup>fl/fl</sup>; Prx1-Cre; Rac1<sup>cKO</sup>およびCdc42<sup>fl/fl</sup>; Prx1-Cre; Cdc42<sup>cKO</sup>)を作製した所、顕著な合指症がともに認められた。本研究では、Rac1およびCdc42の骨軟骨形成の更なる機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Rac1 and Cdc42 are Rho small GTPases known to regulate multiple cellular functions, including cytoskeletal organization, proliferation, and apoptosis. Recently, their tissue-specific roles have been revealed, especially in mammalian limb development, using limb bud mesenchyme-specific inactivated Rac1 (Rac1<sup>fl/fl</sup>; Prx1-Cre; Rac1<sup>cKO</sup>) and Cdc42 (Cdc42<sup>fl/fl</sup>; Prx1-Cre; Cdc42<sup>cKO</sup>) conditional knockout mice. Both strains demonstrate striking syndactyly of the fore- and hindlimbs. That in Rac1<sup>cKO</sup> mice is caused by a failure of interdigital programmed cell death, while syndactyly in Cdc42<sup>cKO</sup> mice is caused by not only a failure of interdigital programmed cell death, but also fusion of metacarpals. Also, most of the Cdc42<sup>cKO</sup> neonates were viable at birth, though they appeared weaker and no milk was found in their stomachs, and died within a few days. In the present study, we analyzed mechanisms of Rac1 and Cdc42 functions in bone and cartilage formation.

研究分野：分子生物学

キーワード：コンディショナルノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

Rac1 および Cdc42 は Rho ファミリータンパク質に属する低分子量 G タンパク質で、細胞内情報伝達における分子スイッチとして働く。アクチン細胞骨格の再編成が関与する細胞機能、例えば、細胞の増殖、分化、細胞運動、細胞死、細胞極性など、それらの機能制御にとって非常に重要な役割を果たしている。

申請者は Rac1 および Cdc42 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 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 遺伝子および Cdc42 遺伝子に loxP 配列を組み込んだ flox マウス (Rac1 flox, Cdc42 flox) をそれぞれ交配させ、Cre 発現領域で Rac1 および Cdc42 を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 (Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre, Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre) を作製した。その結果、以下の表現型が得られた。

1. Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウス

Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスは四肢、胸骨、頭蓋骨に形成不全が認められ、離乳期までの生存率は野性型と比較し低かった。四肢は短く、成長板における増殖軟骨層柱状配列の乱れ、肥大軟骨層の肥厚が認められた。また、前・後肢の指間に癒合が認められた。

野性型マウスの肢芽指間域は、胎生 12 日から 14 日にアポトーシスが起り、その後分離する。Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウス肢芽指間域ではアポトーシスした細胞が減少しており、これが Rac1 コンディショナルノックアウトマウスの指間における癒合の原因であると考えられる。また、肢芽指間域のアポトーシスに関与する BMP ファミリータンパク質の遺伝子発現が野性型マウスと比較し、有意に減少していた。

2. Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウス

Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスは四肢、胸骨、頭蓋骨、口蓋に形成不全が認められ、生後間もなく死亡する。四肢は野性型マウスと比較し短く、成長板における増殖軟骨層の柱状配列の乱れ、肥大軟骨層の肥厚などが認められた。また、胸骨、頭蓋骨に癒合不全が認められた。Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスと同様に、肢芽指間域のアポトーシスした細胞が減少しており、その原因は肢芽指間域のプログラム細胞死に関与する BMP ファミリータンパク質の遺伝子発現が野性型マウスと比較し有意に減少していることが示唆された。

Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスは Rac1<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスと異なり、口蓋裂と指骨の石灰化不全が認められた。

以上の結果から、Rac1 と Cdc42 はともに、肢芽形成、体肢骨における軟骨内骨化、頭蓋骨形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、in vitroにおいて

機能が重複していると考えられてきた Rac1 と Cdc42 は、in vivo において指骨の形成や口蓋形成において異なる機能を有することが示唆された。

2. 研究の目的

Cdc42 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの表現型から認められた成長板軟骨分化・成熟の異常による四肢短縮の原因を他のコンディショナルノックアウトマウスを用い解明する。

3. 研究の方法

肢芽間葉系細胞特異的、軟骨細胞特異的、および神経堤細胞特異的に Cdc42 遺伝子を欠損させるために、Prx1 遺伝子プロモーター、2 型コラーゲン遺伝子プロモーター、および P0(myelin protein 0)プロモーター制御下で Cre を発現する Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウス、Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Col2-Cre マウス、および Cdc42<sup>fl/fl</sup>;P0-Cre マウスを用い、以下の研究を行った。

Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスおよび Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Col2-Cre マウスの体長および各長管骨の長さを骨格標本作製後、検討する。

Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスおよび Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Col2-Cre マウスの増殖層および肥大軟骨層の長さおよび存在する軟骨細胞数を検討する。

Cdc42<sup>fl/fl</sup>;P0-Cre マウスの骨格標本作製し、顎顔面形成への影響を検討する。

Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスの成長板における骨芽細胞数および破骨細胞数を検討する。

4. 研究成果

Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスおよび Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Col2-Cre マウスは骨格形成不全が認められ、生後間もなく死亡する。四肢は野性型マウスと比較し体長および長管骨が短く、成長板における増殖軟骨層の柱状配列の乱れ、肥大軟骨層の肥厚などが認められた。Cdc42<sup>fl/fl</sup>;Prx1-Cre マウスの成長板における骨芽細胞数および破骨細胞数はともに減少していた。また、Cdc42<sup>fl/fl</sup>;P0-Cre マウスの骨格標本解析より顎顔面の形成不全が認められた。

以上の結果より、Cdc42 は軟骨細胞の分化成熟および顎顔面形成にとって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 13 件)

1) Suzuki W, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Harada T, Nakayama M, Nagahama R, Maki K, Takeda S, Yamamoto M, Aiba A, Baba K, Kamijo R: Cdc42 is critical for cartilage development during endochondral ossification. *Endocrinol.* 156: 314-322, 2015

2) Maruyama N, Shibata Y, Wurihan, Swain MV, Kataoka Y, Takiguchi Y, Yamada A, Maki K, Miyazaki T: Starin-rate stiffening of cortical bone: observations and implications from nanoindentation experiments. *Nanoscale* 10 (3): 629-637, 2014

3) Akiyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, Tetsuo Suzawa T, Hoshino M, Imamura T, Akiyama C, Yasuhara R, Mishima K, Maruyama T, Kohda C, Tanaka K, Potempa J, Yasuda H, Baba K, Kamijo R: *Porphyromonas gingivalis*-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta but suppresses that by interleukin-17A. Importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain. *J. Biol. Chem.*, 289:15621-15630, 2014

4) Takahashi M, Suzawa T, Yamada A, Yamaguchi T, Mishima K, Osumi N, Maki K, Kamijo R: Identification of gene expression profile of neural crest-derived cells isolated from submandibular glands of adult mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 446:481-486, 2014

5) Yamada A, Aiba A, Kamijo R: Rho family small G proteins: lessons from tissue-specific gene knockout studies. *J Oral Biosci*, 56: 23-29, 2014

6) Shibata Y, Suzuki D, Wurihan, Yamada A, Maruyama N, Fujisawa N, Kamijo R, Miyazaki T: Lysyl oxidase like-2 reinforces unsatisfactory ossification induced by bone morphogenetic protein-2. *Nanomedicine*, 9 (7), 1036-1047, 2013

7) Aizawa R, Yamada A, Suzuki D, Tsukasaki M, Yamamoto M, Aiba A, Kamijo R: Cdc42 plays important roles in bone formation during limb development. *Jpn. J. Tissue Cult. Dent. Res.*, 22(2):35-41, 2013

8) Matsumoto T, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Tsukasaki M, Suzuki W, Nakayama M, Maki K, Yamamoto M, Baba K, Kamijo R: BMP-2 induced expression of Alx3 that is a positive regulator of osteoblast differentiation. *PLoS ONE* 5(6):e68774, 2013

9) Maruyama T, Miyamoto Y, Yamamoto G, Yamada A, Yoshimura K, Suzawa T, Takami M, Akiyama T, Hoshino M, Iwasa F, Ikumi N, Tachikawa T, Mishima K, Baba K, Kamijo R: Downregulation of carbonic anhydrase IX promotes *Col10a1* expression in chondrocytes. *PLoS ONE* 8:e56984, 2013

10) Shibuya I, Yoshimura K, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Suzuki D, Ikumi N, Hiura F, Anada T, Suzuki O, Kamijo R: Octacalcium phosphate suppresses chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Cell Tissue Res* 352 (2): 401-412, 2013

11) Suzuki D, Yamada A, Kamijo R: The essential roles of small GTPase Rac1 in limb development. *J. Oral. Biosci.*, 55, 116-121, 2013

12) Suzuki D, Yamada A, Aizawa R, Funato S, Matsumoto T, Suzuki W, Takami M, Miyamoto Y, Suzawa T, Yamamoto M, Baba K, Kamijo R: BMP2 differentially regulates expression of Gremlin1 and Gremlin 2, negative regulators of BMP function, during osteoblast differentiation. *Calcif Tissue Int*, 91:88-96, 2012

13) Tsukasaki M, Yamada A, Yoshimura K, Miyazono A, Yamamoto M, Takami M, Miyamoto Y, Kamijo R: Nephronectin expression is regulated by SMAD signaling in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425:390-392, 2012

〔学会発表〕(計 20 件)

1) 中山睦子, 山田篤, 鈴木大, 相澤怜, 鈴木航, 馬場一美, 山本松男, 上條竜太郎, 榎宏太郎 Cdc42は口蓋形成過程において必須の遺伝子である 第61回 昭和大学学士会総会プログラム・抄録集, P36, 2014 (第61回 昭和大学学士会総会, 東京, 2014年12月)

2) 中山睦子, 山田篤, 鈴木大, 榎宏太郎, 上條竜太郎 Cdc42は口蓋形成過程において必須

の遺伝子である。第51回口腔組織培養学会学術大会 プログラム・抄録集, p17, 2014 (第51回日本口腔組織培養学会学術大会、福岡、2014年11月)

3) 中山睦子, 山田篤, 佐藤友紀, 上條竜太郎, 榎宏太郎 Cdc42は口蓋形成過程において必須の遺伝子である。第73回日本矯正歯科学会大会・第5回日韓ジョイントミーティングプログラム・抄録集, p207, 2014 (第73回日本矯正歯科学会大会・第5回日韓ジョイントミーティング、千葉、2014年10月)

4) Wataru Suzuki, Atsushi Yamada, Ryo Aizawa, Dai Suzuki, Shu Takeda, Matsuo Yamamoto, Kazuyoshi Baba, Ryutaro Kamijo Cdc42 is essential for cartilage development during endochondral ossification. ANZBMS 24th Annual Scientific Meeting Handbook, p96, 2014 ANZBMS 24th Annual Scientific Meeting, Queenstown, New Zealand, September, 2014

5) 鈴木航, 山田篤, 相澤 怜, 鈴木大, 竹田秀, 山本松男, 馬場一美, 上條竜太郎 Cdc42は軟骨分化とそれに続く軟骨内骨化に必須である第32回日本骨代謝学会学術集会プログラム・抄録集, p258, 2014 (第32回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2014年7月)

6) 中山睦子, 山田篤, 佐藤友紀, 上條竜太郎, 榎宏太郎 Cdc42は口蓋形成において必須の遺伝子である 第38回日本口蓋裂学会学術集会プログラム・抄録集, p195, 2014 (第38回日本口蓋裂学会学術集会、北海道、2014年5月)

7) 山田篤: 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13回 松本ポーンフォーラム, 松本, 2014年5月9-10)

8) 鈴木航, 山田篤, 馬場一美, 上條竜太郎: 低分子量 G タンパク質 Cdc42 は軟骨分化とそれに引き続く軟骨内骨化に必須である。第68回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会プログラム, p212, 2014 (第68回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 東京, 2014年5月7-9日)

9) 山田篤: 骨・軟骨形成の必須因子: Rhoファミリー低分子量 G タンパク質 Rac1 および Cdc42 (第13回 東京骨関節フォーラム, 東京, 2013年7月)

10) 山田篤: マウスリバーシジェネティクスによる顎口腔発生制御機構の解明。日本口腔組織培養学会設立50周年記念学術大会・総会プログラム・抄録集, p.40, 2013 (第51回 日本口腔組織培養学会設立50周年記念学術大会・総会 東京, 2013年11月)

11) Nakayama M, Yamada A, Aizawa R, Isobe T, Suzuki D, Suzuki W, Sato Y, Aiba A, Baba K, Mishima K, Yamamoto M, Maki K, Kamijo R: Cdc42 is crucial for facial and palatal development. 2nd Meeting of the International Association for Dental Research-Asia Pacific Region PROGRAM BOOK, p21, 2013 (2nd Meeting of the International Association for Dental Research-Asia Pacific Region Bangkok, Thailand, August, 2013)

12) 鈴木航, 山田篤, 相澤 怜, 鈴木大, 中山睦子, 榎宏太郎, 山本松男, 馬場一美, 上條竜太郎: 低分子量 G タンパク質 Cdc42 は軟骨形成に必須の遺伝子である。J Oral Biosci, 2013(Suppl): 159, 2013 (第55回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013年9月)

13) 相澤 怜, 山田篤, 鈴木大, 飯村忠浩, 山本 剛, 山口朗, 山本松男, 上條竜太郎: 低分子量 G タンパク質 Cdc42 は四肢形成における軟骨分化と肢芽指間部の細胞死に必須である。第30回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集, p211, 2012 (第30回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012年7月)

14) 山田篤: 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54回歯科基礎医学会学術集会抄録集, p77 2012 (第54回歯科基礎医学会学術大会 サテライトシンポジウム6「マウスジェネティクスが解き明かす口腔顎顔面領域の発生・病態形成メカニズム」, 郡山, 2012年9月)

15) 相澤 怜, 山田篤, 鈴木大, 上條竜太郎: 低分子量 G タンパク質 Cdc42 は四肢形成における軟骨分化と肢芽指間部のアポトーシスを制御する。第49回日本口腔組織培養学会学術集会プログラム・抄録集: p21, 2012. (第49回日本口腔組織培養学会学術集会, 広島, 2012年11月)

16) 鈴木航, 山田篤, 相澤 怜, 鈴木大, 中山睦子, 榎宏太郎, 山本松男, 上條竜太郎, 馬場一美: Cdc42 の軟骨形成における機能解析。The Analysis of the functions of Cdc42 during cartilage development. Dent Med Res, 33:125, 2012. (第32回昭和歯学会例会, 東京, 2012年12月)

17) Suzuki W, Yamada A, Suzuki D, Aizawa R, Nakayama M, Maki K, Yamamoto M, Takeda S, Baba K, Kamijo R: Small GTPase Cdc42 is essential for cartilage development. 第60回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会プログラム; p65, 2012 (第60回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会, 新潟, 2012年12月)

18) Suzuki W, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Nakayama M, Takeda S, Aiba A, Maki K, Yamamoto M, Baba K, Kamijo R: Small GTPase Cdc42 is essential for cartilage development. 91<sup>st</sup> General Session & Exhibition of the IADR PROGRAM BOOK, p57, 164, 2013  
( 91<sup>st</sup> General Session & Exhibition of the IADR, Seattle, WA, USA, March, 2013)

19) 相澤怜, 山田篤, 鈴木大, 飯村忠浩, 山本剛, 美島健二, 山口朗, 山本松男, 上條竜太郎: 低分子量 G タンパク質 Cdc42 は四肢形成時の軟骨分化および肢芽指間部の細胞死を制御する 第 19 回 BMP 研究会抄録集 p15, 2012 (第 19 回 BMP 研究会, 東京, 2012 年 7 月)

20) 相澤怜, 山田篤, 鈴木大, 山本剛, 斉藤彰大, 榎本拓哉, 藤原亮一, 美島健二, 上條竜太郎, 山本松男: 骨・軟骨形成における低分子量 G タンパク質 Cdc42 の役割 . プログラム・抄録集: p72, 2013. (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 24 年度合同シンポジウム, 東京, 2013 年 3 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山田 篤 (YAMADA ATSUSHI)  
昭和大学歯学部・口腔生化学教室・講師  
研究者番号:50407558

### (2)研究分担者

上條 竜太郎 (KAMIJO RYUTARO)

昭和大学歯学部・口腔生化学教室・教授  
研究者番号:70233939

### (3)連携研究者

饗場 篤 (AIBA ATSU)  
東京大学大学院医学系研究科・附属疾患生命工学センター研究基盤部門・動物資源研究領域・教授  
研究者番号:20271116