

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791983

研究課題名(和文) 関節表層細胞における Rac-1 による Wnt シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) The study of the signaling cross talks between Wnt/beta-catenin and Rac1 signaling in Regulation of Maintenance and Function of Superficial Cell Layer in Articular Cartilage

研究代表者

安原 理佳 (Yasuhara, Rika)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20453649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)：顎関節や四肢、指趾の関節を構成する関節軟骨(硝子軟骨)の損傷は痛みと運動障害を招き QOL を著しく低下させる。申請者はこれまでに関節軟骨の表層を覆う「表層細胞」が、隣り合う軟骨細胞とは異なる形質を示し関節の機能発現に必須である一方、環境に応じ関節軟骨に分化し得る細胞である事、表層細胞の機能維持に Wnt/ β -catenin シグナルが関与する事を見出した。本研究では、細胞形態、機能制御において多面的な作用を保持する Rac-1 が、表層細胞の機能制御において Wnt シグナルの活性化を調節するのか、また、どのように機序であるのかについて解析をすすめた。本研究は関節軟骨の維持機構の 1 つの機序を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Articular cartilage has poor ability to regenerate and repair, and thereby proceed toward osteoarthritis. The superficial layer (SFL) in articular cartilage has received much attention as an initial site of cartilage degeneration, however, the exact regulation of SFL function remain largely unclear. We have found that Wnt/ β -catenin signaling is critical for maintenance of SFL in articular cartilage using the loss- and gain-of-function approaches of β -catenin. Rac-1, one of the small GTPase has been shown to regulate β -catenin signaling pathway. In this study, we tested whether β -catenin and Rac-1 signaling pathways have a crosstalk in regulation of SFL function in articular cartilage. The results from this study suggest that Rac-1 and Wnt/ β -catenin signaling could cooperatively regulate SFL proliferation and function.

研究分野：細胞分子機能病理学

キーワード：関節軟骨 再生医学 細胞・組織 遺伝子 軟骨 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨の再生・修復能は低く、加齢や損傷による関節軟骨の機能不全が QOL の低下をきたす。本研究は関節表層細胞を焦点におき、関節疾患の予防、修復再生への応用を目指した。これまでの知見を以下に示す。

(1) 関節軟骨の構造や組成は関節の可動性および衝撃耐性の維持に不可欠である。関節軟骨の表層を覆う「表層細胞」の欠如や軟骨特異性基質の欠損マウスでは変形性関節症を誘発する。

(2) 申請者らは、関節表層細胞の単離、培養法の確立を行い、表層細胞が、関節軟骨特異的な基質の産生を担うこと、環境に応じ関節軟骨細胞に分化し得る細胞であること、遺伝子組み換え動物を用いて、機能発現には Wnt/ β -catenin シグナルが重要な因子であることを明らかにした。

(3) Wnt/ β -catenin シグナルは生命体の発生や維持に必須な因子であり、他のシグナル伝達経路との相互作用により制御される。近年、その1つに細胞骨格の制御、細胞周期、細胞分化の調節に関与する低分子量 G 蛋白質 Rac-1 が β -catenin を活性化することが報告された。

2. 研究の目的

本研究では、関節軟骨細胞の機能維持における Wnt/ β -catenin と Rac-1 のシグナル相互作用の解析を目的とした。

(1) 関節軟骨の組織構築および機能調節における Rac-1 の要求性、および、関節表層細胞の増殖、分化、 β -catenin の活性化に対する Rac-1 の役割について解析する。

(2) Rac-1 の活性化が Wnt/ β -catenin シグナルや Wnt の下流で機能するインテグリン、 Ca^{2+} 応答性シグナル分子とどのように相互作用するのかについて解析する。

3. 研究の方法

(1) 軟骨特異的 Rac1 欠損マウス (Col2Cre-Rac1^{flox/flox}) を作成し、骨格形態の変化や関節表層の形態学的変化とタンパク質の発現を免疫組織化学的手法により解析した。

(2) マウス関節表層細胞のうちフィブロネクチンと選択的に接着する細胞を採取し、 β -catenin および Rac1 シグナルによる細胞増殖および分化に対する影響を解析した。

4. 研究成果

(1) Cre-loxP システムを用いた Type II Collagen 特異的な Rac-1 欠損マウス (Col2Cre-Rac-1^{fl/fl}) を作出し、骨格の成長障害が生じる事を見出した (図 1A)。組織学的な解析から 3 週齢の骨端軟骨の軟骨内骨化の遅延を認めた (図 1B)。3 ヶ月および 6 ヶ月齢の Rac1

欠損マウス関節軟骨は平坦な形態を示し、関節軟骨の非薄化と表層細胞数が減少した (図 2)。これらの特徴は軟骨特異的な β -catenin 欠損マウスと類似していた。

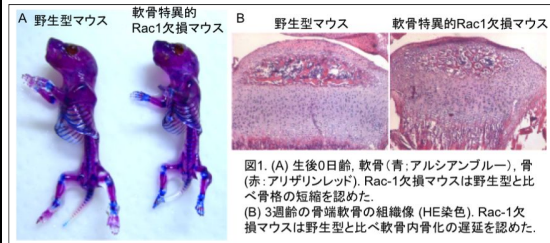


図1. (A) 生後0日齢、軟骨(青:アルシアンブルー)、骨(赤:アリザリンレッド)。Rac-1欠損マウスは野生型と比べ骨格の短縮を認めた。(B) 3週齢の骨端軟骨の組織像 (HE染色)。Rac-1欠損マウスは野生型と比べ軟骨内骨化の遅延を認めた。

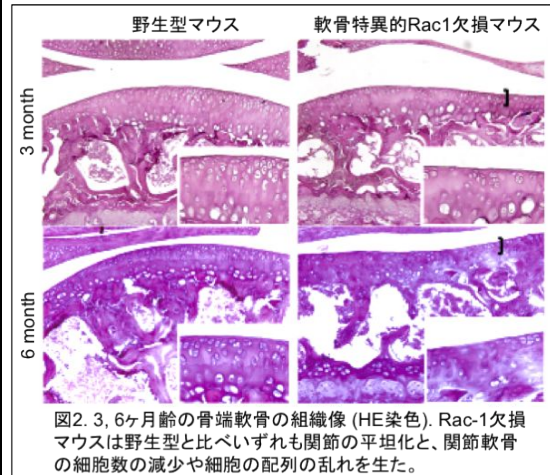


図2. 3, 6ヶ月齢の骨端軟骨の組織像 (HE染色)。Rac-1欠損マウスは野生型と比べいずれも関節の平坦化と、関節軟骨の細胞数の減少や細胞の配列の乱れを生た。

(2) Rac1 欠損マウスから採取した関節表層細胞は、野生型に比べ関節表層細胞に特異的に発現する Lubricin や Asporin 遺伝子の発現が低く、Wnt に対する応答性が低下した。Rac-1 阻害剤を用いた解析においても同様の結果を得た。

(3) DNA マイクロアレイによる解析から、関節軟骨から単離培養した関節表層細胞と軟骨細胞における遺伝子発現を比較すると、表層細胞で 2 倍以上高く発現した遺伝子が 105 遺伝子、発現が低かったものが 65 遺伝子みられ、このうち、インテグリン $\beta 1$ が 8.8 倍表層細胞で高く発現した。インテグリン $\beta 1$ は $\alpha 5$ とヘテロダイマーを形成し機能する。インテグリン $\alpha 5$ と $\beta 1$ の発現は Wnt3A により正に制御され、 β -catenin の欠損マウスでは関節表層の $\alpha 5$ の発現が消失した。

(4) Wnt シグナルの非古典経路の1つでもある Ca^{2+} (カルシウム) シグナルを担うカルモジュリン酵素 (CaMK) を阻害すると、Wnt による Lubricin の発現が亢進した。一方で、高 Ca 培地で培養した表層細胞は表層マーカー遺伝子の発現は低下し、ER stress の亢進を認めた。

(1) ~ (4) の結果は、Rac-1 やインテグリン、 Ca^{2+} シグナルが β -catenin 古典経路と同時に表層細胞の機能発現を制御する重要なシグナル伝達経路であることを示唆する。 Ca^{2+} やインテグリンの下流で Rac-1 が活性化する知

見と合わせ、他のシグナル伝達経路との相互作用を理解することで Wnt/ β -catenin シグナルの制御が可能であることが示唆された。本研究は関節軟骨の維持機構の1つの機序を示すものである。

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10件)

Yasuhara R, Irie T, Shiozawa E, Yamochi T, Tanaka J, Kohno Y, Fujikura M, Kimura Y, Hanazawa T, Seki K, Sano T, Shiota T, Kushima M, Takimoto M, Mishima K. Plasmablastic lymphoma of the maxillary sinus with intraoral manifestation caused by direct alveolar bone infiltration in an HIV-negative patient. *Pathol Int.* 2014;64:588-90. doi: 10.1111/pin.12212.

Candela ME, Yasuhara R, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Resident mesenchymal progenitors of articular cartilage. *Matrix Biol.* 2014;39:44-9. doi: 10.1016/j.matbio.2014.08.015.

Candela ME, Cantley L, Yasuhara R, Iwamoto M, Pacifici M and Enomoto-Iwamoto M. Distribution of slow-cycling cells in epiphyseal cartilage and requirement of β -catenin signaling for their maintenance in growth plate. *J Orthop Res.* 2014 May;32(5):661-8. DOI: 10.1002/jor.22583

Tanaka J, Irie T, Yamamoto G, Yasuhara R, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K. ANGPTL4 regulates the metastatic potential of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(2):126-33. doi: 10.1111/jop.12212.

Okada S, Irie T, Tanaka J, Yasuhara R, Yamamoto G, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K. Potential role of hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(2):115-25. doi: 10.1111/jop.12210.

Akiyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, 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* 2014;289:15621-15630. doi: 10.1074/jbc.M113.520510.

Hayashi S, Tanaka J, Okada S, Isobe T, Yamamoto G, Yasuhara R, Irie T, Akiyama C, Kohno Y, Tachikawa T, Mishima K.: Lin28a is a putative factor in regulating cancer stem cell-like properties in side population cells of oral squamous cell carcinoma. *Experimental Cell Research* 2013;1;319(8):1220-8. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.03.004.

Cantley L, Saunders C, Guttenberg M, Ohta Y, Yasuhara R, Kondo N, Tung W, Candela E. M, Sgariglia F, Asai S, Zhang X, Qin L, Hecht T. J, Chen D, Toyosawa S, Dormans P. J, Iwamoto M, Pacifici M and Enomoto-Iwamoto M.: Loss of β -Catenin Induces Multifocal Ectopic Chondroma-like Masses in Adult Mice. *Am J Pathol.* 2013;182(3):917-27. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.11.012.

Wang X, Suzawa T, Miyauchi T, Zhao B, Yasuhara R, Anada T, Nakamura M, Suzuki O, Kamijo R.: Synthetic Octacalcium Phosphate Enhanced Reparative Dentin Formation via Induction of Odontoblast Differentiation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013 Jan 28. doi: 10.1002/term.1669.

Mishima K, Inoue H, Nishiyama T, Mabuchi Y, Amano Y, Ide F, Matsui M, Yamada H, Yamamoto G, Tanaka J, Yasuhara R, Sakurai T, Lee M, Chiba K, Sumimoto H, Kawakami Y, Matsuzaki Y, Tsubota K, Saito I.: Transplantation of side population cells restores the function of damaged exocrine glands through clusterin. *Stem Cells.* 2012;30(9):1925-37. doi: 10.1002/stem.1173.

[学会発表](計15件)

安原理佳、田中準一、入江太郎、岩本資己、美島健二. 慢性炎症性刺激に対する関節軟骨表層細胞の機能変化第35回日本炎症・再生医学会 / 第1回日本骨免疫会議, 沖縄, 2014年7月1-5日

Rika Yasuhara, Junichi Tanaka, Tarou Irie, Yoko Kohno, Kenji Mishima. The role of adipose-derived stem cells in salivary gland regeneration. 第62回 JADR 学術大会, 2014年12月4-5日

安原理佳、田中準一、入江太郎、深田俊幸、福島美和子、河野葉子、美島健二. 脂肪幹細胞を活用した唾液腺再生メカニズムの解析. 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, 2015年3月28日

安原理佳、入江太郎、塩沢英輔、矢持淑子、田中準一、河野葉子、九島巳樹、瀧本雅文、美島健二：上顎臼歯部に生じた形質芽細胞性リンパ腫(Plasmablastic lymphoma)の一例。第103回日本病理学会，広島，2014年4月24-27

安原理佳、入江太郎、外園知恵、磯辺友秀、河野葉子、美島健二：上顎に発生し眼窩底に及んだkeratoameloblastomaの一例(第102回日本病理学会総会，北海道，2013年6月4-6日)

外園知恵、入江太郎、森 泰昌、大西忠博、安原理佳、磯邊友秀、田中準一、山本 剛、美島健二：核内長鎖 non-coding RNA(MALAT-1)は唾液腺腫瘍に発現し予後に影響する(第67回日本口腔科学会学術集会，2-F-14，宇都宮，2013年5月)

Rika Yasuhara, Gou Yamamoto, Taro Irie, Kenji Mishima: Cohort study and functional analysis of the bone metastatic factors (2013年国際骨代謝学会・日本骨代謝学会 第2回合同国際会議 (IBMS-JSBMR2013)，神戸，2013年5月28日-6月1日)

安原理佳、岩本資己、美島健二：関節軟骨維持における表層細胞の機能解析：Wnt/ β -catenin シグナルと $\alpha 5$ integrin との相互作用 (第30回日本骨代謝学会、東京、2012年7月)

安原理佳、沢田晃暢、鈴木研也、中村清吾、山本 剛、入江太郎、美島健二：乳癌骨転移誘導因子の検索とその機能解析(第101回日本病理学会，東京，2012年4月)

外園知恵、入江太郎、岡田誠二、磯邊友秀、安原理佳、山本 剛、朽名智彦、近藤誠二、新谷 悟、栃木直文、藤岡保範、鈴木良夫、美島健二：上顎骨内原発の solitary fibrous tumor の一例(第101回日本病理学会，P1-PM-27，東京，2012年4月)

林茂雄、田中準一、岡田誠二、磯辺友秀、山本 剛、安原理佳、入江太郎、秋山知恵、河野葉子、立川哲彦、美島健二：Lin 28 は口腔扁平上皮癌における癌幹細胞性の制御に関与している(文部科学省私立大学戦力的研究基盤形成支援事業平成24年度シンポジウム、東京、2013年3月23日)

外園知恵、入江太郎、秋光信佳、大西忠博、安原理佳、磯辺友秀、林茂雄、田中準一、山本 剛、美島健二：長鎖 noncoding RNA (MALAT-1)は唾液腺腫瘍に発現する(文部科学省私立大学戦力的研究基盤形成支援事業平成24年度シンポジウム、東京、2013年3月23日)

安原理佳、大岩亜希子、山本剛、田中準一、磯辺友秀、秋山知恵、入江太郎、河野葉子、美島健二：唾液腺再生を目指した脂肪幹細胞の応用(文部科学省私立大学戦力的研究基盤形成支援事業平成24年度シンポジウム、東京、2013年3月23日)

Yasuhara R, Enomoto-Iwamoto M, and Mishima K. :The crosstalks between wnt/ β -catenin and $\alpha 5$ integrin signalings in the articular superficial cell functions.:(1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting -22nd ANZMB, Perth, Austraria, September 2012)

安原理佳、入江太郎、山本 剛、美島健二：口蓋腫瘍。(第23回日本臨床口腔病理学会，東京，2012年8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：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralpath/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安原理佳 (Rika Yasuhara)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20453649

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：