

平成 28 年 6 月 14 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：2014～2015

課題番号：26893271

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Cdc42の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of the role of small G protein Cdc42 during bone and cartilage development.

研究代表者

鈴木 航（Suzuki, Wataru）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10736680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、骨・軟骨形成における低分子量Gタンパク質Cdc42の機能を明らかにすることで、骨軟骨形成不全などの先天性疾患の原因解明とその予防・治療方法の可能性を探ることである。我々は、軟骨特異的Cdc42遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを用い、大腿骨成長板においてCdc42が軟骨細胞の増殖、分化の制御に重要な役割を担っていることを明らかにした。また、Cdc42の欠損が軟骨形成遺伝子の発現を抑制し、結果として軟骨内骨化に影響を及ぼし、海綿骨の形成不全を引き起こすことを明らかにした。

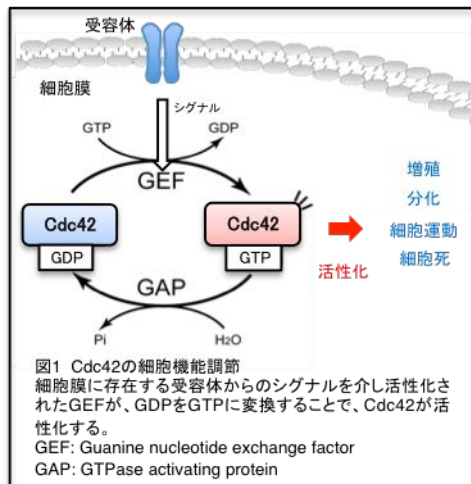
研究成果の概要（英文）：The aim of this study, by clarify the function of small G protein Cdc42 in bone and cartilage formation, to explore the possibility of probable cause and its prevention and treatment method of congenital diseases, such as bone cartilage hypoplasia. We revealed that Cdc42 regulate proliferation and development of chondrocyte in growth plate of femur using by Cdc42 conditional knock out mice. Furthermore, lack of Cdc42 in cartilage caused low bone mineralization in trabecular bone.

研究分野：骨・軟骨形成

キーワード：Cdc42 軟骨形成

1. 研究開始当初の背景

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、通常、細胞内で GDP と結合した不活性型を示すが、Guanine nucleotide Exchange factor (GEF) の作用によって GTP と結合すると活性型として働くことが知られている。活性化した Cdc42 は、アクチン細胞骨格系の制御を介した細胞の増殖、文化、細胞運動、細胞死など、細胞機能にとって重要な分子スイッチとしての役割を果たしている (図 1)。



2. 研究の目的

本研究の目的は、骨・軟骨形成における低分子量 G タンパク質 Cdc42 の機能を明らかにすることで、骨軟骨形成不全などの先天性疾患の原因解明とその予防・治療方法の可能性を探ることにある。Cdc42 の全身性の欠損は胎生致死 (胎生 7.5 日) であるため、申請者は、Cre-loxP システムを用いて、軟骨特異的に 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 cKO) を作製したところ、低身長と四肢の低下、成長板軟骨の成熟異常が認められた。このことから、Cdc42 が軟骨形成、ひいては軟骨内骨化による骨形成にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。本研究では、Cdc42 の骨・軟骨形成における詳細な機能解析を遂行し、その作用メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Cdc42 遺伝子の生体内における軟骨形成への作用機序を解明するために、(1) ～ (4) の項目を 2 カ年間に渡り解析する。

平成 26 年度

(1) Cdc42 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの低身長や四肢の短縮、また大腿骨成長板において増殖軟骨層が短縮、肥厚していた原因について解明する。

(2) Cdc42 が軟骨形成、ひいては軟骨内骨化に及ぼす影響を解明する。

平成 27 年度

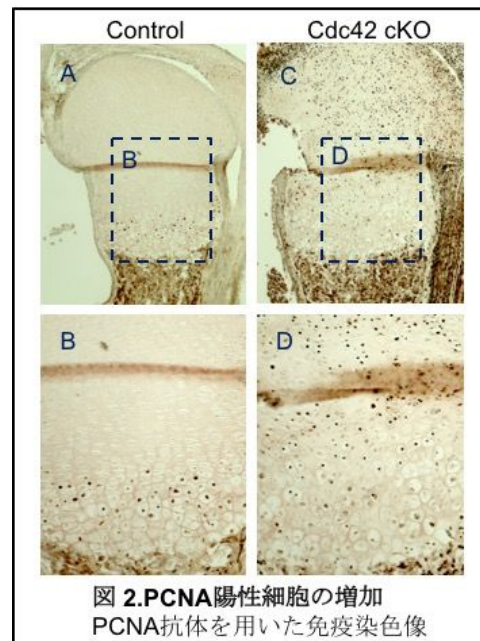
(3) in vitro での再現性を得るために、軟骨細胞を GFP 標識した新たなコンディショナ

ルノックアウトマウスを作製する。

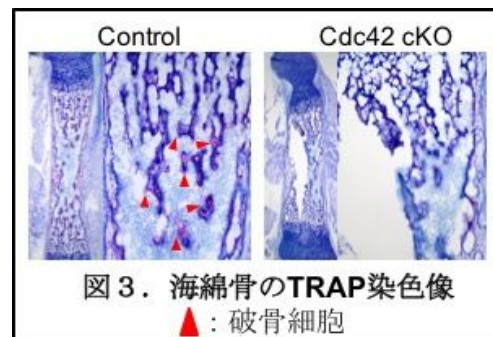
(4) Cdc42 を介する軟骨細胞分化制御シグナルの解明

4. 研究成果

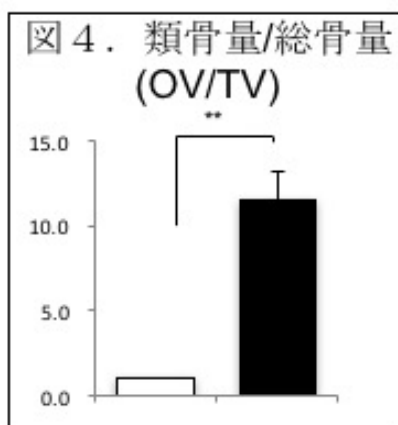
(1) Cdc42 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスがコントロールマウスと比較して低身長で四肢が短縮していたこと、また、大腿骨成長板において増殖軟骨層が短縮、肥大軟骨層が肥厚していた原因について解明するために、生後 1 日齢 Cdc42^{fl/fl}; Col2-Cre マウスの大腿骨成長板における表現型の組織学解析を行った。具体的には、組織切片作製後、PCNA や pH3 などの細胞増殖マーカーの抗体を用いた免疫染色や、BrdU の取り込みにより、増殖軟骨層における細胞増殖について検討を行った。PCNA による免疫染色の結果、Cdc42 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスではコントロールマウスと比較して、増殖軟骨細胞の増加が認められた (図 2) が、pH3 の免疫染色では変化が認められなかった。



(2) Cdc42 が軟骨形成、ひいては軟骨内骨化に及ぼす影響を解明するために、TRAP 染色を行い、破骨細胞の局在を確認したところ、Cdc42 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスでは破骨細胞数の低下が認められた (図 3)。



また、海綿骨の石灰化を検討したところ、低石灰化の骨（類骨）の増加が認められた（図4）



（3）これまで得られた結果について、in vitro での再現性を得るために、軟骨で Cre 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス（*Col2-Cre Tg*）と、mT/mG 二重蛍光 Cre レポーターマウスとを交配し、*Cdc42^{fl/fl}* ; *Col2-Cre* ; *mTmG* マウスを作製した。大腿骨成長板から軟骨細胞を採取し培養を行ったところ、GFP 陽性の軟骨細胞を確認できた。この結果をもとに、*Cdc42*、 α 1(I)型コラーゲン、 α 2(I)型コラーゲン、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）13 などの遺伝子発現解析を定量的 PCR 法によって解析を行ったところ、コントロールマウスと比較して *Cdc42^{fl/fl}* ; *Col2-Cre* ; *mTmG* マウスでは、各遺伝子の発現が低下していることが明らかになった（図5）

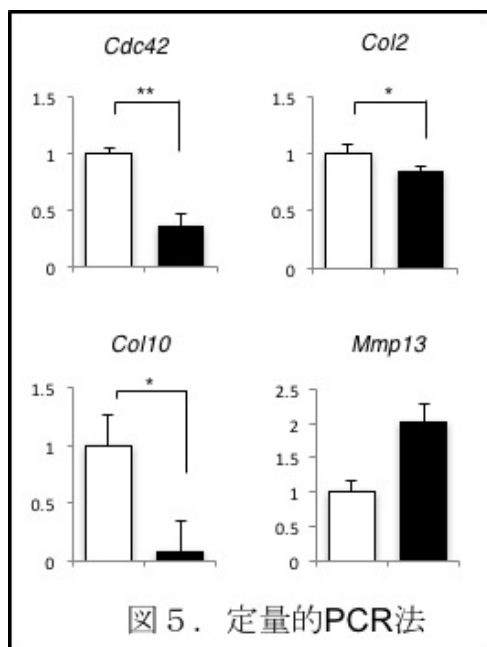


図5. 定量的PCR法

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 1 件）

Suzuki W, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Harada T, Nakayam M, Nagahama R, Maki K, Takeda S, Yamamoto M, Aiba A, Baba K, Kamijo R. Cdc42 is critical for cartilage development during endochondral ossification. *Endocrinology*, 156(1):314-322, 2015 査読有 http://press.endocrine.org/doi/10.1210/en.2014-1032?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed

〔学会発表〕（計 3 件）

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）
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）
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回日本口腔科学会学術集会プログラム・抄録集, p212, 2014（第68回口腔科学会学術集会、東京、2014年5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：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 航 (SUZUKI, Wataru)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10736680

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：