

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20557

研究課題名(和文) 低分子量Gタンパク質Rac1の新規四肢形成制御機構及び制御因子の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of small G protein Rac1 during limb development.

研究代表者

斉藤 芳郎 (Saito, Yoshiro)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70611581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量Gタンパク質Rac1は細胞の増殖、分化、細胞死などに重要な役割がなされていることが知られている。本研究ではRac1を肢芽未分化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の肢芽細胞を用いたマイクロマスカルチャー培養を用いることで四肢の軟骨形成に重要な役割があることが示唆された。Rac1ノックアウトマウスを用いた肢芽細胞はコントロールマウスの肢芽細胞と比較して増殖能の低下が認められた。これよりRac1は四肢の軟骨細胞における増殖能に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rac1 which is a member of the Rho small GTPases are known to be a regulator of multiple cellular functions, including cytoskeletal organization, proliferation, and apoptosis. Recently, its tissue-specific roles, especially in mammalian limb development, have been revealed using limb bud mesenchyme-specific inactivated Rac1 conditional knockout (Rac1 cKO) mice. In the present study, we employed in vitro micromass culture assays to define the underlying chondrogenic defect in Rac1 cKO mice. Micromass cultures derived from Rac1 cKO mice limbs lacked proliferation of chondrocytes compared to those from control mice limbs. These results suggested that Rac1 is required for proliferation of chondrocytes during limb development.

研究分野：骨代謝

キーワード：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

Rho ファミリータンパク質 (Rho, Rac, Cdc42 など) に属する低分子量 G タンパク質、Rac1 は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ことが示唆されてきた。

2. 研究の目的

肢芽未分化間葉系細胞で特異的に Rac1 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスの肢芽を用い、in vitro 系で Rac1 の軟骨分化および石灰化の機能に対する解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

肢芽未分化間葉系細胞で特異的に Rac1 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (*Rac1^{fl/fl}; Prx1-Cre*; Rac1 cKO) を作成し未分化間葉系細胞の段階 (胎生 12 日齢) で四肢の採取を行い細胞レベルでの検討を行った。採取した四肢細胞を用いて高密度培養を行い、培養 0 日、3 日、5 日で細胞の分化・増殖の検討を行った。その結果コントロール群 (Rac1 をノックアウトしていない細胞) に対し Rac1 をノックアウトした細胞では優位な細胞増殖の低下を認めた。また、軟骨形成を Alcian blue 染色を用いて確認したところコントロール群と Rac1 をノックアウトした細胞ともに軟骨の形成を認めた。軟骨分化に対し定量的 PCR 法を用いて軟骨細胞特異的な遺伝子 (Aggrecan, Col12, Col10, SOX9) の発現量を検討した結果、分化に違いは認めなかった。

細胞培養を 5 日行った後、グリセロリン酸を添加した石灰化培地に変更し培養を行った。その結果コントロール群に対し、ノックアウトした細胞の石灰化が促進されたことを Von Kossa 染色にて確認した。また、定量的 PCR 法を用いて骨芽細胞特異的な遺伝子 (ALP, RUNX2, OSX) の発現量を検討した結果、Rac1 をノックアウトした細胞で有為に発現量が増加した。

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 (*Rac1^{fl/fl}; Prx1-Cre*; Rac1 cKO) の四肢長管骨 (生後 1 日齢) の成長板における軟骨細胞の増殖に対し検討した。組織切片を凍結切片で作成し、EdU により細胞の増殖を検討した。その結果、EdU 陽性細胞は増殖軟骨細胞においてコンディショナルノックアウトマウスで減少している傾向が認められた。

4. 研究成果

、より肢芽未分化間葉系細胞で 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 (*Rac1^{fl/fl}; Prx1-Cre*; Rac1 cKO) の肢芽細胞を用いた培養系では、Rac1 は細胞の増殖能を抑制する因子であることが分かった。また、軟骨細胞の石灰化の段階においては石灰化を促進させることが分かった。

より in vivo の研究においても Rac1 は軟骨細胞の増殖に重要な機能を有す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 17 件)

1. 齊藤芳郎, 藤居直和, 池田賢一郎, 榎橋幸民, 江川峻哉, 鴨志田慎之助, 北嶋達也, 倉澤侑也, 勝田 秀行, 嶋根俊和. 舌癌 Stage1・II 症例の臨床的検討. 昭和学士会雑誌 77: 546-550, 2017. 査読有り
2. Saito Y, Kondo S, Kamatani T, Nagasaki M, Itose M, Miyazaki H, Watanabe H, Shiota T. Maxillary osteoblastoma in a woman: Report of a rare case and review of the literature. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology 29: 49-52, 2017. 査読有り
3. 栗原祐史, 勝田秀行, 山口徹太郎, 安田有沙, 塩竈素直, 佐藤 仁, 齊藤芳郎, 鴨志田慎之助, 鎌 谷宇明, 代田達夫. ナビゲーションシステムを用いてオトガイ形成術を施行した 2 例. 日本顎変形症学会雑誌 27: 17-23, 2017. 査読有り
4. 勝田秀行, 倉澤侑也, 齊藤芳郎, 北嶋達也, 江川峻哉, 榎橋幸民, 池田賢一郎, 宮崎裕明, 佐藤 仁

- 代田達夫,嶋根俊和.頬粘膜乳頭状扁平上皮癌の1例.昭和学士会雑誌 77: 349-353, 2017. 査読有り
5. 勝田秀行,倉澤侑也,齊藤芳郎,江川峻哉,櫛橋幸民,池田賢一郎,宮崎裕明,佐藤 仁,代田 達夫,嶋根俊和.下顎リンパ節に転移を認めた下顎・肉癌の1例.昭和学士会雑誌 77: 220-225, 2017. 査読有り
 6. 池田賢一郎,嶋根俊和,田中道子,倉澤侑也,齊藤芳郎,勝田秀行,江川峻哉,櫛橋幸民,小林一女.セツキシマブ併用放射線療法後に全身気腫をきたした1例.頭頸部癌 43: 393-396, 2017. 査読有り
 7. 櫛橋幸民,勝田秀行,池田賢一郎,江川峻哉,池谷洋一,齊藤芳郎,倉澤侑也,木村百合香,小林一女,嶋根俊和.頸部結核性肉芽腫の1例.昭和学士会雑誌 77: 442-447. 2017. 査読有り
 8. 櫛橋幸民,勝田秀行,池田賢一郎,江川峻哉,池谷洋一,齊藤芳郎,鴨志田慎之助,北嶋達也,小林一女,嶋根俊和.当センターにおける縦隔内甲状腺腫の手術適応についての検討.昭和学士会雑誌 77: 570-577. 2017. 査読有り
 9. 江川峻哉,北嶋達也,倉澤侑也,齊藤芳郎,鴨志田慎之助,中村泰介,櫛橋幸民,池田賢一郎,勝田秀行,小林一女,嶋根俊和.喉頭に発生した腺扁平上皮癌の1例.昭和学士会雑誌 77: 559-564, 2017. 査読有り
 1. Suzuki M, Kamatani T, Akizuki A, Yasuda A, Sato H, Saito Y, Ogura H, Shirota T. Peri-Implant Bone Loss Evaluation around Dental Implants Placed into Alveolar Cleft Sites. Dentistry 6: 398, 2016. 査読有り
 10. Hiranuma K, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Nagahama R, Ikehata M, Tsukasaki M, Morimura N, Chikazu D, Maki K, Shirota T, Takami M, Yamamoto M, Iijima T, Kamijo R. Expression of nephronectin is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D3. FEBS Open Bio 6:914-918, 2016. 査読有り
 11. Oshima-Nakyama M, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Kassai H, Sato Y, Yamamoto M, Shirota T, Aiba A, Maki K, Kamijyo R. Cdc42 is crucial for facial palatal formation during craniofacial development. Bone Reports 5:1-6, 2016. 査読有り
 12. Akizuki A, Kamatani T, Kondo S, Miyazaki H, Saito Y, Shirota T. A case of two-jaw surgery under high-dose gamma-globulin therapy for a patient with ITP. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology 28: 555-558, 2016. 査読有り

13. Saito Y, Yamada A, Suzuki D, Tanaka J, Nagahama R, Kurosawa T, Maki K, Mishima K, Shiota T, Kamijo R. Association of aging with gene expression profiling in mouse submandibular glands. Genomics Data 5: 115-119, 2015. 査読有り
14. Kurosawa T, Yamada A, Takami M, Suzuki D, Saito Y, Hiranuma K, Enomoto T, Morimura N, Yamamoto M, Iijima T, Shiota T, Itabe H, Kamijo R. Expression of nephronectin is inhibited by oncostatin M via both JAK/STAT and MAPK pathways. FEBS Open Bio 5: 303-7, 2015. 査読有り
15. Kondo S, Katsuta H, Saito Y, Yoshihama Y, Shiota T, Shintani S. True lateral dermoid cyst of the submandibular region. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology 27: 74-77, 2015. 査読有り
16. 齊藤芳郎, 下平 修, 栗原祐史, 秋月文子, 近藤誠二, 武井良子, 高橋浩二, 代田達夫. 頬骨インプラントを用いて咬合再建を行った両側口唇口蓋裂の 1 例. 日本口蓋裂学会雑誌 40: 54-60, 2015. 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 第 62 回日本口腔外科学会総会
2017.10.20-22 京都
上顎・口蓋腫瘍術後に生じた聴覚障

害についての臨床的検討

齊藤芳郎 倉澤侑也 勝田秀行
鴨志田慎之助 榑橋幸民 池田賢
一郎 江川峻哉 嶋根俊和

2. 第 338 回昭和大学学士会例会
2017.6.24 目黒区

上顎および口蓋腫瘍切除後における聴覚障害についての臨床的検討

齊藤芳郎 勝田秀行 鴨志田慎之助
榑橋幸民 池田賢一郎 江川峻哉
北嶋達也 代田達夫 嶋根俊和

3. 第 203 回日本口腔外科学会関東支部
学術集会 2017. 5.27 千代田区
悪性腫瘍との鑑別に苦慮した梅毒
の 1 例

齊藤芳郎 榑橋幸民 勝田秀行
倉澤侑也 池田賢一郎 江川峻哉
代田達夫 嶋根俊和

4. 第 61 回日本口腔外科学会総会
2016.11.25-27 幕張

Rho ファミリー低分子量 G タンパク
質 Rac1 の軟骨形成における機能解
析 齊藤芳郎 鎌谷宇明 近藤誠二
嶋根俊和 上條竜太郎 代田達夫

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

齊藤 芳郎 (Saito, Yoshiro)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：70611581

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()