

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 1 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20426

研究課題名(和文)低分子量Gタンパク質Rac1による軟骨形成の時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of spatio-temporal controlling mechanism in cartilage development by small G protein Rac1

研究代表者

鈴木 大 (Suzuki, Dai)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：00585797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Rac1はRhoファミリーに属する低分子量Gタンパク質の一つで、細胞の様々な機能を制御している。軟骨形成におけるRac1の機能解析を目的とし軟骨細胞または肢芽未分化間葉系細胞特異的にRac1遺伝子を欠損させたマウスを作成した結果、Rac1は生体内における軟骨形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなったが、それぞれのRac1遺伝子欠損マウスの軟骨形態異常は大きく異なるものであった。本研究によって、組織特異的遺伝子欠損のための組換え酵素Creの発現パターンおよび細胞内シグナル伝達のわずかな差異が軟骨形態異常の違いを引き起こした可能性を示唆するデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：Rac1, a member of the small Rho GTPase family, has multiple cellular roles, while studies that used mice conditionally lacking Rac1 in cartilage or limb mesenchyme have revealed its essential involvement in cartilage development. However, cartilage- and limb mesenchyme-specific Rac1 conditional knockout mice show different types of abnormal cartilage formation. The novel results of the present study suggest that the expression patterns of Cre recombinases, tissue-specific target gene knockout, and slight differences in intracellular signaling may cause differences in cartilage morphological abnormalities.

研究分野：生化学

キーワード：Rac1 軟骨細胞 未分化間葉系細胞 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

(1)低分子量 G タンパク質 Rac1

Rac1 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 GDP 結合型から GTP 結合型に変異し、活性化される。活性化した Rac1 はアクチン細胞骨格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。

(2) Rac1 コンディショナルノックアウトマウスと軟骨形成

申請者は生体内の軟骨形成における Rac1 の機能を検討するために、主に軟骨細胞または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};Col2-Cre* および *Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre*)を作成した。その結果、Rac1 は生体内においても軟骨形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。しかし、興味深いことに *Rac1^{fl/fl};Col2-Cre* マウスは増殖軟骨細胞層の肥厚が、*Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスは肥大軟骨細胞層の肥厚が観察された。つまり、それぞれのコンディショナルノックアウトマウスの軟骨形態異常は大きく異なるものであった。

2. 研究の目的

Rac1^{fl/fl};Col2-Cre マウスと *Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスで異なる軟骨形態異常を示す原因は、軟骨形成過程における Col2-Cre と Prx1-Cre の発現時期とパターンの違いによる可能性が考えられる。つまりそれぞれの Rac1 コンディショナルノックアウトマウスで、軟骨とその周囲組織において Rac1 欠損の時期とパターンのわずかな違いがこの軟骨形態異常の違いを生み出していると推察される。本研究はこの点について詳細な解析を行うことで、Rac1 による軟骨形成の時空間的制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

レポーターマウスを用いて軟骨とその周囲組織における *Col2-Cre* と *Prx1-Cre* の発現の時期とパターンの違いを明確にする。続いて、*Rac1^{fl/fl};Col2-Cre* および *Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスから軟骨細胞を採取し、細胞内シグナル伝達の違いについて検討する。最後に、それぞれの Rac1 コンディショナルノックアウトマウスに常活性型 Rac1 過剰発現マウスを交配させ、その形態および機能解析を行う。

4. 研究成果

平成 28 年度

Col2-Cre マウスおよび Prx1-Cre マウスとレポーターマウスを交配させることにより、Col2-Cre と Prx1-Cre の発現パターンを可視

化して比較を行った。その結果、成長板の静止軟骨細胞層において Prx1-Cre は Col2-Cre と比べ発現が弱い可能性が示された。続いて、細胞内シグナル伝達系に着目し、胎生期の *Rac1^{fl/fl};Col2-Cre* マウスから採取した長管骨の軟骨細胞において、過去の報告通り p38 MAP Kinase がコントロールと比較して低下している結果が得られた。しかし、*Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスにおいては p38 MAP Kinase の低下している可能性が低いデータとなった。

以上の結果は、Col2-Cre と Prx1-Cre の発現パターンおよび *Rac1^{fl/fl};Col2-Cre* マウスと *Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスの細胞内シグナル伝達の変化のわずかな差異が軟骨形態異常の違いを引き起こした可能性を示唆する。

平成 29 年度

Rac1 コンディショナルノックアウトマウスの軟骨形態異常を回復できるか検討するために、それぞれのコンディショナルノックアウトマウスに恒常活性型 Rac1 が過剰発現するマウスを交配させ、その解析を行った。その結果、恒常活性型 Rac1 過剰発現マウスを交配させたマウスは *Rac1^{fl/fl};Col2-Cre* マウスと *Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスと比較し、それぞれの軟骨形態異常を有意に回復することが明らかとなった。また、それに伴って長管骨の短縮および体重の低下も回復されることがわかった。しかし、コントロールマウス (*Rac1^{fl/fl}*) と比較すると、成長板軟骨細胞の柱状配列の乱れや体重の低下などは残り、Rac1 コンディショナルノックアウトマウスで見られた異常が完全に回復されることがなかった。

異常が完全に回復されなかった原因に関しては、Rac1 の発現量に起因するものなのか、不活性型の Rac1 も軟骨形成に対して重要な機能を有しているのかなど、いくつか推察されるが、その詳細は今後の検討課題である。

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9件)

原著論文

Rodriguez R, Yoshimura K, Shibata Y, Miyamoto Y, Tanaka R, Uyama R, Sasa K, Suzuki D, Miyazaki T, Kamiyo R. Nanoindentation time-dependent deformation/recovery suggestive of methylglyoxal induced glycation in calcified nodules. *Nanomedicine*, 13(8): 2545-2553, 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.nano.2017.07.003.

Suzuki D, Bush J, Bryce DM, Kamiyo R, Beier F. Rac1 dosage is crucial for normal endochondral bone growth.

Endocrinology, 158(10): 3386-3398, 2017
DOI: 10.1210/en.2016-1691.

Hoshino M, Kaneko K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Suzuki D, Akaike T, Sawa T, Ida T, Fujii S, Ihara H, Tanaka J, Tsukuura R, Chikazu D, Mishima K, Baba K, Kamiyo R. 8-Nitro-cGMP promotes bone growth through expansion of growth plate cartilage. *Free Rad Biol Med* 110: 63-71, 2017
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.022.

Saito E, Suzuki D, Kurotaki D, Mochizuki A, Manome Y, Suzawa T, Toyoshima Y, Ichikawa T, Funatsu T, Inoue T, Takami M, Tamura T, Inagaki K, Kamiyo R. Down-regulation of *Irf8* by *Lyz2-cre/loxP* accelerates osteoclast differentiation in vitro. *Cytotechnology*, 69(3): 443-450, 2017
DOI: 10.1007/s10616-016-0013-z.

Hiranuma K, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Nagahama R, Ikehata M, Tsukasaki M, Morimura N, Chikazu D, Maki K, Shiota T, Takami M, Yamamoto M, Iijima T, Kamiyo R. Expression of nephronectin is enhanced by $\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *FEBS Open Bio.*, 6: 914-918, 2016
DOI: 10.1002/2211-5463.12085.

Kurosawa T, Yamada A, Suzuki D, Morimura N, Sasagane Y, Itabe H, Kamiyo R. Nephronectin expression is up-regulated by BMP-2. *Biol. Pharm. Bull.*, 39: 1211-1215, 2016
DOI: 10.1248/bpb.b15-00941.

Oshima-Nakayama M, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Kassai H, Sato Y, Yamamoto M, Shiota T, Aiba A, Maki K, Kamiyo R. *Cdc42* is crucial for facial and palatal formation during craniofacial development. *Bone Reports*, 5:1-6, 2016
DOI: 10.1016/j.bonr.2016.01.001.

総説

鈴木大、上條竜太郎、宮本洋一。「細菌性プロテアーゼと歯周病性骨破壊 (Bacterial proteases and periodontal bone loss)」月刊「細胞」49(11): 33-36, 2017

鈴木大、馬目瑤子、齋藤愛美、上條竜太郎。口腔におけるカルシウム制御とアンチエイジング (Importance of Calcium Metabolism for Oral Health and Anti-Aging Strategies) 日本抗加齢医学会雑誌 (Antiaging Medicine) Vol.12(2),41-46, 2016

〔学会発表〕(計6件)

馬目瑤子、鈴木大、望月文子、齋藤愛美、笹清人、吉村健太郎、井上富雄、稲垣克記、高見正道、上條竜太郎、船津敬弘
TLR7 リガンドの R848 は悪性黒色腫の骨浸潤を抑制する (第 64 回昭和大学学術大会、東京、2017 年 11 月 25 日)

Yoko Manome, Dai Suzuki, Ayako Mochizuki, Emi Saito, Kiyohito Sasa, Kentaro Yoshimura, Tomio Inoue, Katsunori Inagaki, Masamichi Takami, Takahiro Funatsu, Ryutaro Kamiyo. R848, a TKR7 ligand, inhibits invasions of B16F10 malignant melanoma in bone. (第65回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会、東京、2017年11月18日-19日)

鈴木大、山田篤、笹清人、上條竜太郎
低分子量 G タンパク質 Rac1 は骨芽細胞分化の負の制御因子である (第 59 回歯科基礎医学学会学術大会、長野、2017 年 9 月 16 日-18 日)

齋藤愛美、鈴木大、黒滝大翼、望月文子、須澤徹夫、高見正道、井上富雄、田村智彦、上條竜太郎、稲垣克記
*Lyz2-Cre/loxP*を用いた *Irf8*遺伝子欠損は細胞培養系でのみ破骨細胞分化を促進する (第31回 日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016年10月13日)

齋藤愛美、鈴木大、黒滝大翼、望月文子、須澤徹夫、高見正道、田村智彦、稲垣克記、上條竜太郎
*LysM-Cre/loxP*による *Irf8*欠損は細胞培養系でのみ破骨細胞分化を促進する (第34回日本骨代謝学会学術集、大阪、2016年7月23日)

齋藤愛美、鈴木大、黒滝大翼、望月文子、須澤徹夫、高見正道、井上富雄、Keiko Ozato、田村智彦、上條竜太郎、稲垣克記
*Lyz2-Cre/loxP*による *Irf8*遺伝子欠損は細胞培養系でのみ破骨細胞分化を促進する (第32回昭和大学学術大会、東京、2016年5月21日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 大 (SUZUKI, Dai)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号: 00585797

(2)研究協力者

須澤 徹夫 (SUZAWA, Tetsuo)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号: 60271285

宇山 理紗 (UYAMA, Risa)

昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：40307054

齋藤愛美 (SAITO, Emi)
昭和大学・医学部・大学院生

馬目瑶子 (MANOME, Yoko)
昭和大学・歯学部・大学院生