

令和元年5月22日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17289

研究課題名(和文)低分子量Gタンパク質Rac1の四肢形成制御機構の研究

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(Yoshiro, Saito)

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)：Rac1遺伝子を四肢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大腿骨成長板における組織学的解析を行った結果、コントロールマウスと比較して、骨の成長が遅延していることが示唆された。また、Rac1阻害剤を用い、遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、N-Myc downregulated gene ファミリーに属するNdrgr1、タイトジャンクションタンパク質Claudin1、細胞外マトリックスタンパク質Periostinなどに発現の低下が認められた。以上の結果からRac1は細胞内で様々な遺伝子発現を調節することにより、骨軟骨形成を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子量Gタンパク質Rac1は、細胞内外のシグナル伝達において、細胞外からのシグナルを細胞内のシグナルに変換する際の分子スイッチとして働いており、細胞の様々な機能にとって非常に重要な遺伝子であることが知られている。本研究は遺伝子改変マウスおよびマイクロアレイ解析を行うことにより、Rac1の骨代謝における新たな機能を見出した点で学術的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Histological analysis of the femoral growth plate of conditional knockout mice in which Rac1 gene is specifically deleted in undifferentiated mesenchymal cells of limbs showed that bone growth is delayed compared to control mice. In addition, as a result of comprehensive analysis of gene expression using a Rac1 inhibitor, a decrease in expression was observed in Ndrgr1 belonging to the N-Myc downregulated gene family, the tight junction protein Claudin1 and the extracellular matrix protein Periostin. These results suggest that Rac1 regulates osteochondral formation by regulating the expression of various genes in cells.

研究分野：骨軟骨形成

キーワード：低分子量Gタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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は、細胞内外のシグナル伝達において、細胞外からのシグナル(ファーストメッセンジャー)を細胞内のシグナル(セカンドメッセンジャー)に変換する際の分子スイッチとして働いていることが知られている。Rac1と四肢形成に関して、Rac1が軟骨細胞の増殖および分化に重要であることをFrank Beier博士らのグループにより報告された[Wang G. J. Bone Miner. Res. 20, 1022-31(2005)]。その後、同じグループからRac1を軟骨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^{fl/fl}; Col2-Cre)が作製され、Rac1を欠損した成長板では増殖軟骨細胞の細胞死の亢進が認められた[Wang G. Dev. Biol. 306, 612-23(2007)]。申請者らはRac1を主に肢芽未分化間葉系細胞(四肢の原基である肢芽における軟骨細胞の起源と考えられている細胞)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^{fl/fl}; Prx1-Cre)を作製し、Frank Beier博士らのグループと同様、Rac1が四肢骨格形成にとって重要な役割を果たしていることを示唆した[Suzuki D. Dev Biol. 335, 396-406(2009)]

2. 研究の目的

申請者は、四肢形成における細胞骨格制御、中でもアクチン細胞骨格制御の重要性に着目し、細胞内でアクチン細胞骨格制御を一手に担っているRhoファミリー低分子量Gタンパク質、中でもRac1の四肢形成における作用機序の解析を中心に解析を行うこととした。

3. 研究の方法

Rac1を全身で欠損させたコンベンショナルノックアウトマウスは胎生早期に発生が止まるため[Sugihara K. Oncogene 17, 3427-3433(1998)]、Rac1を主に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(Rac1^{fl/fl}; Prx1-Cre)を作製した[Suzuki D. Dev Biol. 335, 396-406(2009)]。その結果、コンディショナルノックアウトマウスの四肢は野性型と比較して短縮していた。また、成長板軟骨細胞の柱状配列の乱れおよび肥大軟骨層が肥厚が認められた。本研究では成長板における組織学的解析を検討した。また、Rac1が石灰化機序にどのような役割を果たしているか検討するために、Rac1の機能を阻害する低分子化合物(NSC23766)を作用させ、マイクロアレイ解析(Affymetrix)を行い、遺伝子発現の網羅的解析を行った。

4. 研究成果

Rac1遺伝子を四肢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大腿骨成長板における組織学的解析を行った。コントロールマウスの一次髄腔は石灰化前線から一次髄腔に向けて、縦方向に骨梁を形成していくが、コンディショナルノックアウトマウスでは、遅延しており、縦の分化形態にはまだ到達していなかった。また、一次髄腔において類骨の増加が見られ、皮質骨では石灰化骨の割合が非常に少なかった。これより石灰化の障害があると考えられた。以上の結果から、コンディショナルノックアウトマウスは、コントロールマウスと比較して、骨の成長が遅延していることが示唆された。また、*in vitro*の系で、骨芽細胞においてRac1が細胞内でどのような機能を有するか遺伝子発現の網羅的解析を行い検討した。マウス頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞にRac1の機能を阻害する低分子化合物(NSC23766)を作用させ、マイクロアレイ解析(Affymetrix)を行った。その結果、発現に2倍以上差のある遺伝子が1104遺伝子抽出された。中でも、N-Myc downregulated geneファミリーに属する遺伝子Ndrp1、タイトジャンクションに存在するタンパク質でRunx3によって発現が制御されていることが知られているClaudin1、細胞外マトリックスタンパク質で骨や歯の形成に重要であると考えられているPeriostin(Postn)、RTL3遺伝子ファミリーに属する転写調節因子Zochc5に発現の低下が認められた。一方、抗酸化性タンパク質として知られている

Metallothionein1,2 (Mt1, 2)、インテグリンファミリー Integrin alpha 3 (Itga3)、ERMファミリーに属する細胞の接着に関与すると言われているEzrinなどは発現の上昇が認められた。以上の結果から、Rac1は細胞内で様々な遺伝子発現を調節することにより、骨軟骨形成を制御していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) 櫛橋幸民、倉澤侑也、内山美緒、野田秀行、池田賢一郎、江川峻哉、斎藤芳郎、鴨志田慎之助、北島達也、小林一女、嶋根俊和
顎洞に発生した顎骨破壊を伴う血管内乳頭状内皮過形成症の1例
昭和学士会誌、78巻、526-530、2018年(査読有)

2) 斎藤芳郎、藤居直和、池田賢一郎、櫛橋幸民、江川峻哉、鴨志田慎之助、北島達也、倉澤侑也、勝田秀行、嶋根俊和
舌癌 Stage II 症例の臨床的検討
昭和学士会誌、77巻、546-550、2017年(査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 斎藤芳郎、倉澤侑也、勝田秀行、鴨志田慎之助、櫛橋幸民、池田賢一郎、江川峻哉、嶋根俊和
舌癌肺転移により両側肺気胸を発症した1例
第63回日本口腔外科学会総会学術大会、2018年

2) 斎藤芳郎、倉澤侑也、鴨志田慎之助、池田賢一郎、櫛橋幸民、江川峻哉、勝田秀行、嶋根俊和
上顎癌術後における聴覚障害の臨床的検討
第62回日本口腔外科学会総会学術大会、2017年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。