

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17076

研究課題名(和文) 膜性骨化におけるIHHシグナルを介したCdc42の機能の解明

研究課題名(英文) The roles of Cdc42 in intramembranous ossification via regulation of Ihh signaling

研究代表者

相澤 怜 (Aizawa, Ryo)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：80710673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、頭蓋における間葉細胞特異的にCdc42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を用いて、膜性骨化におけるCdc42の役割について検討を行った。コンディショナルノックアウトマウスでは頭蓋骨形成不全が認められ、頭蓋骨の形成に関与するIhh、Bmp2、Bmp4の発現減少が認められた。さらに、Cdc42の機能が阻害された初代培養骨芽細胞において、骨芽細胞分化に関与するDlx5、Igf1の発現低下が認められ、IhhおよびBmpシグナルによって制御される頭蓋骨形成において、Cdc42が重要な役割を果た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

個体レベルにおけるCdc42と膜性骨化に着目した研究はこれまでほとんどなく、特に頭蓋骨の縫合部でのCdc42の役割は明らかでなかった。本研究結果から、膜性骨化により形成される頭蓋骨において、Cdc42が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、Cdc42に着目した効率的な生体材料の作製への応用や骨破壊を伴う疾患の予防および治療に有用な手法を見出せる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the role of Cdc42 in cranial bone development. Our results showed that loss of Cdc42 caused a defect of intramembranous ossification in cranial bone tissues which is related to decreased expressions of cranial suture morphogenesis genes, including Indian hedgehog (Ihh) and bone morphogenetic proteins (BMPs). Inhibition of Cdc42 decreased expressions of Dlx5 and Igf1, which are related to osteoblast differentiation, in primary cultured mouse osteoblasts. These findings demonstrate that Cdc42 plays a crucial role in cranial osteogenesis, and is controlled by Ihh- and BMP-mediated signaling during cranium development.

研究分野：歯周病学

キーワード：Cdc42 頭蓋骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Rho ファミリーGTP 結合タンパク質 (低分子量 G タンパク質) に属する Cdc42 は生体においてコピキタスに発現していると考えられている。Cdc42 はアクチン細胞骨格系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、細胞の様々な高次機能を制御していることが *in vitro* での研究から明らかになっている ()。しかし、これらの遺伝子を全身で欠損させたノックアウトマウスは胎生初期に死亡するため、個体レベルにおける機能については不明な点が多い。これまでの研究から、骨・軟骨の原基となる肢芽間葉細胞特異的に Cdc42 遺伝子を欠損させたマウス (Cdc42 コンディショナルノックアウトマウス; Cdc42^{fl/fl}; Prx1-Cre マウス) には頭蓋形成不全の表現型が認められ、Cdc42 は個体レベルにおいて、Indian Hedgehog (IHH) シグナルを介して骨・軟骨形成にも重要な役割を果たすことが示唆されている ()。

骨形成や骨創傷治癒の研究では、軟骨内骨化により形成される長管骨が用いられることが多い。しかし、歯槽骨を含む顔面頭蓋の骨格は膜性骨化により形成されることが知られている。そのため、膜性骨化により形成される骨の破壊を伴う疾患に対する研究では、長管骨を用いるだけでは不十分な可能性がある。頭蓋骨の形成には IHH、Bone Morphogenetic Protein (BMP) シグナルが関与することが報告されているが ()、膜性骨化における Cdc42 の機能については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Cdc42 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、個体レベルの膜性骨化における Cdc42 の役割の詳細を明らかにすることである。

3. 研究の方法

マウスの各発生段階に沿って、骨・軟骨組織を Alizarin red および Alcian blue で染色し、作製した頭蓋骨格標本の前頭骨、頭頂骨、後頭骨の面積を計測し、比較検討を行った。各骨の間に存在する前頭縫合、矢状縫合間の距離を計測し、比較検討を行った。また、頭蓋における細胞増殖、細胞死を PCNA の免疫組織学的染色、および TUNEL 染色により検討した。

頭蓋形成および骨形成に関する遺伝子群の発現様式を whole mount in situ hybridization 法、real-time PCR 法により検討した。

マウス頭蓋由来の骨芽細胞の培養系に Cdc42 の機能を阻害する Casin を添加し、マイクロアレイ解析により、細胞内シグナル伝達の変化に関して検討した。

4. 研究成果

Cdc42 コンディショナルノックアウトマウスの Cre 発現部位を確認し、同マウスの頭蓋において Cdc42 が欠損していることを確認した。

マウス骨格標本作製し、解析を行ったところ、Cdc42 コンディショナルノックアウトマウスにおける前頭縫合、および矢状縫合部の骨形成は野性型マウスと比較して有意に減少していたが、これらの頭蓋縫合部の細胞増殖および細胞死マーカーの発現に有意差は認められなかった (図 1)。このことから、Cdc42 コンディショナルノックアウトマウスに認められる頭蓋骨形成不全は、細胞増殖や細胞死の異常ではなく、Cdc42 の欠損により頭蓋の間葉細胞の骨形成能に異常が生じたことが原因であると考えられた。

そこで、Whole mount in situ hybridization 法、real-time PCR 法による解析を行ったところ、Cdc42 コンディショナルノックアウトマウスの頭蓋縫合部周辺において、頭蓋骨の形成に関与する *Ihh*、*Bmp2*、および *Bmp4* の発現低下が認められた (図 2)。このことから、Cdc42 が *Ihh* および *Bmp* シグナルを介して、頭蓋骨形成の機能を発揮する可能性が示唆された。

さらに、マウス頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞に Cdc42 の機能を阻害する Casin を作用させ、マイクロアレイ解析を行ったところ、Cdc42 の機能が阻害された初代培養骨芽細胞において、骨芽細胞分化に関与する distal-less homeobox 5 (*Dlx5*)、insulin-like growth factor 1 (*Igf1*)、骨芽細胞の分化マーカーである alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (*Alpl*)、骨のリモデリングに関与する matrix metalloproteinase 13 (*Mmp13*) の発現低下が認められた。その一方、抗酸化性タンパク質として知られている Metallothionein1, 2 (*Mt1, 2*)などは発現の上昇が認められた。このことから、Cdc42 は骨芽細胞の骨形成能を制御する可能性が示唆された。

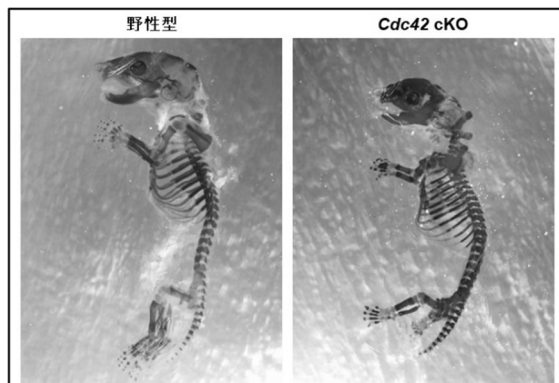


図1. Cdc42コンディショナルノックアウトマウス (Cdc42 cKO) は頭蓋骨形成不全を呈する

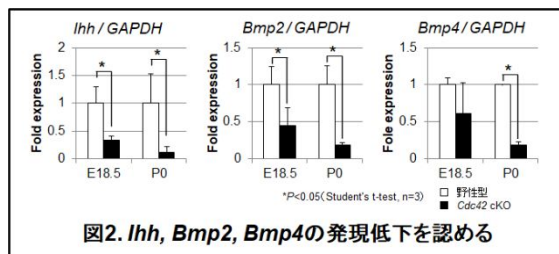


図2. *Ihh*, *Bmp2*, *Bmp4*の発現低下を認める

以上の結果から、Ihh および Bmp シグナルによって制御される頭蓋骨形成において、Cdc42 が間葉細胞の骨形成能に重要な役割を果たしていることが示唆された。

<引用文献>

Etienne-Manneville S and Hall A: Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420(6916): 629-635, 2002.

Aizawa R, Yamada A, Suzuki D, Imura T, Kassai H, Harada T, Tsukasaki M, Yamamoto G, Tachikawa T, Nakao K, Yamamoto M, Yamaguchi A, Aiba A, Kamijo R: Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development. *Mech Dev*. 129(1-4): 38-50, 2012.

Pan A, Chang L, Nguyen A, James AW: A review of hedgehog signaling in cranial bone development. *Front Physiol*. 4: 61, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Mayu, Tanaka Junichi, Aizawa Ryo, Yajima-Himuro Sara, Seki Tatsuaki, Tanaka Keisuke, Yamada Atsushi, Ogawa Miho, Kamiyo Ryutaro, Tsuji Takashi, Mishima Kenji, Yamamoto Matsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of junctional epithelial cell replacement by oral gingival epithelial cells over a life time and after gingivectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44065-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa Ryo, Yamada Atsushi, Seki Tatsuaki, Tanaka Junichi, Nagahama Ryo, Ikehata Mikiko, Kato Tadashi, Sakashita Akiko, Ogata Hiroaki, Chikazu Daichi, Maki Koutaro, Mishima Kenji, Yamamoto Matsuo, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 512
2. 論文標題 Cdc42 regulates cranial suture morphogenesis and ossification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 145 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中慧介, 相澤 怜, 田中準一, 澤田直子, 関 辰明, 田中麻友, 相内敏弘, 板部洋之, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 ハイドロキシアパタイト上での培養が不死化接合上皮細胞および口腔上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤麻友, 田中準一, 相澤 怜, 氷室沙羅, 関 辰明, 田中慧介, 山田 篤, 上條竜太郎, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 口腔歯肉上皮由来細胞による接合上皮細胞置換の可視化
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato M, Aizawa R, Tanaka J, Yajima-Himuro S, Seki T, Tanaka K, Mishima K, Yamamoto M
2. 発表標題 Replacement of junctional epithelium by oral epithelium
3. 学会等名 104th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology and the Japanese Academy of Clinical Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関 辰明, 相澤 怜, 田中準一, 氷室沙羅, 加藤麻友, 田中慧介, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 人工再構成歯胚技術を用いたマウス歯肉接合上皮細胞株の樹立
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤麻友, 相澤 怜, 関 辰明, 田中慧介, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 歯胚移植技術を用いたマウス歯肉接合上皮構成細胞の経時的変化の解明
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤麻友, 相澤 怜, 田中準一, 氷室沙羅, 関 辰明, 田中慧介, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 歯肉接合上皮構成細胞の経時的変化の解明
3. 学会等名 第347回昭和大学学士会例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学歯学部口腔生化学講座
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/index.html>
昭和大学歯学部歯周病学講座
<http://www10.showa-u.ac.jp/~perio/index.html>
昭和大学研究者情報・業績集
<https://researchers-achievements.showa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----