

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17128

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）Functional research of small G protein during bone and cartilage formation.

研究代表者

鈴木 航（Suzuki, Wataru）

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：10736680

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）：Rhoファミリー低分子量Gタンパク質Cdc42は細胞外からのシグナルを細胞内に変換する分子スイッチとして生体内で重要な役割を果たしている。これまで、in vitroにおいては、細胞骨格の制御、細胞の増殖・細胞死の制御、細胞の分化制御に重要な機能を有することが示唆されており、また、in vivo、特に硬組織においては、コンディショナルノックアウトマウスの研究から四肢軟骨形成などにおいて必須の因子であることが示唆されてきた。本研究課題では、Cdc42の軟骨細胞に詳細な機能解析を検討するためにCdc42の阻害剤、siRNA並びにRhoファミリータンパク質活性化剤を用いた遺伝子発現様式の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、軟骨形成におけるCdc42の機能を検討するために、Cdc42コンディショナルノックアウトマウスを用いた研究を行ってきた。本研究では、軟骨細胞において、Cdc42の機能を低下させた際に、軟骨細胞内での遺伝子発現様式にどのような変化が起こるか、詳細な解析を行った。その結果、多くの遺伝子に発現の変化が認められた。本研究課題で得られた、遺伝子発現の網羅的解析結果は、今後の軟骨細胞機能の研究に意義ある結果を提示できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The Rho family small G protein Cdc42 plays an important role in the body as a molecular switch that converts extracellular signals into cells. So far, it has been suggested that it has important functions in controlling cell skeleton, cell proliferation / death, and cell differentiation in vitro, and in vivo, especially in hard tissues. Studies of conditional knockout mice have suggested that it is an essential factor in cartilage formation. In this research project, the gene expression profilings using Cdc42 inhibitors, siRNAs, and Rho family protein activators have performed in order to investigate detailed functional analysis of Cdc42 chondrocytes.

研究分野：骨代謝

キーワード：シグナル伝達

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、研究者個人に帰属します。

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 タンパク質には Rac1, Cdc42, RhoA などがある。低分子量 G タンパク質は、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。低分子量 G タンパク質の中でも、Cdc42 は、アクチン細胞骨格系の制御を介した細胞の増殖、分化、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ことが知られている。

頭蓋骨の一部と鎖骨を除くほとんどの骨は、軟骨内骨化によって形成されており、軟骨代謝は骨格形成において非常に重要であると考えられる。そこで、Cdc42 の生体における軟骨形成に関する研究を行うために、Cdc42 ノックアウトマウスを用いた研究を行なった。ところが、全身で Cdc42 を欠損させたマウス (コンベンショナル Cdc42 ノックアウトマウス) は胎生致死 (胎生初期で致死となる) であることから、生体内における詳細な機能解析を行うことは困難となった。そこで、軟骨形成における Cdc42 の機能を解析するために、Cre-loxP システムを用いて、軟骨細胞で 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、2 つの loxP 配列に挟まれた Cdc42 遺伝子を持つ flox マウス (*Cdc42 flox*) とを交配させ、軟骨細胞特異的に 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^{f/f}; Col2-Cre*) を作成した。その結果、*Cdc42^{f/f}; Col2-Cre* マウス (Cdc42 cKO) は四肢の短縮と低身長を呈し、生後間もなく死亡した。大腿骨成長板の軟骨細胞において、増殖軟骨層の短縮と柱状配列の消失、肥大軟骨層の肥厚が認められた。

以上の結果から、Cdc42 は軟骨形成にとって重要な遺伝子であることが示唆された。

2. 研究の目的

Cdc42 の軟骨細胞における詳細な機能解析を行うために、in vitro において Cdc42 の各種阻害剤および活性化剤を用い、Cdc42 の軟骨細胞における機能に関する研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

軟骨細胞としてマウス肋軟骨由来初代培養軟骨細胞および ATDC5 細胞を用いることとした。また、Cdc42 の機能を阻害する阻害剤として Casin および Cdc42 siRNA を、また、Rho ファミリータンパク質活性化剤を用いた。Cdc42 の機能を阻害する阻害剤および Rho ファミリータンパク質活性化剤を作用させた際の細胞内における遺伝子発現変化の網羅的解析をマイクロアレイ解析および NGS (次世代シーケンシング) 解析による網羅的解析を行った。

4. 研究の成果

(1) Cdc42 の機能を阻害する阻害剤 (Casin) を作用させた際の軟骨細胞内で変化する遺伝子の発現様式

肋軟骨から採取した初代軟骨培養細胞に Cdc42 の機能を阻害する阻害剤 (Casin) を作用させた際の軟骨細胞内で変化する遺伝子の発現解析をマイクロアレイ (Clariom S; Affymetrix 社) を用い解析を行った。その結果、酸化還元酵素シトクロム P450 (Cytochrome P450) family4 に属する Cyp4a12a および b、アクチン細胞骨格に関与し細胞の形態に重要な役割を果たしていると考えられている transgelin (Tagln)、代謝関連遺伝子群のマスター制御因子と考えられている Kruppel-like factor 14 (Klf14)、繊維化に関与し、軟骨内骨化をはじめ骨芽細胞や破骨細胞の分化増殖に重要な役割を果たしていると考えられている Connective tissue growth factor (Ctgf, Ccn2 とも知られている) などの遺伝子の発現が顕著に低下していた。

(2) Cdc42 遺伝子の siRNA を処理による軟骨細胞株 ATDC5 細胞における遺伝子発現様式

軟骨細胞株ATDC5細胞を用い、Cdc42遺伝子のsiRNAを処理した細胞(Cdc42 si)と処理していない細胞(Control)における遺伝子発現様式の変化をNGS(Next Generation Sequence)解析により行った。その結果、Controlと比較しCdc42 siでは有為な発現上昇が認められた遺伝子は50個、有為な発現低下が認められた遺伝子は44個であった。発現が上昇した遺伝子にはannexin A3、syndecan2、fibulin 5、keratin 15などの細胞骨格、細胞外マトリックスタンパク質などが認められ、actin related protein2/3、col2a1などの発現低下が認められた。Cdc42を軟骨で欠損させたコンディショナルノックアウトマウスでは軟骨の形成不全、大腿骨成長板における柱状配列の欠損が認められ、様々な遺伝子が関与していると考えられてきた。今回の発現様式解析より、in vitroにおいてもin vivo同様に様々な遺伝子発現の変化により軟骨細胞の形質に影響を与えることが示唆された。

(3) Rhoファミリータンパク質を活性化による軟骨細胞株ATDC5細胞における遺伝子発現様式
軟骨細胞株ATDC5細胞にRhoファミリータンパク質を活性化させた際の遺伝子の変動をcDNAマイクロアレイ解析により行った。その結果、Ctgf、Angiogeninなどの遺伝子の発現が上昇し、Igtbp3,5およびApelinなどの遺伝子発現の減少が認められた。本結果より、これまでのCdc42の阻害剤やsiRNAでの遺伝子ノックダウンによる実験とは逆にRhoファミリーを活性化させた際の軟骨細胞内における遺伝子発現様式を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田優子, 山田篤, 鈴木航, 上條竜太郎, 飯島毅彦
2. 発表標題 Rhoファミリー低分子量Gタンパク質Cdc42の血管形成および骨形成に対する機能解析.
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------