

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間： 2008～2009
課題番号：20791361
研究課題名 (和文) 低分子量 G タンパク質 Rac1 の四肢・骨格形成における機能解析
研究課題名 (英文) Roles of Rac1 during limb development
研究代表者
山田 篤 (YAMADA ATSUSHI)
昭和大学・歯学部・口腔生化学教室・講師
研究者番号：50407558

研究成果の概要 (和文) : Rho ファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質、Rac1 を肢芽間充織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を作製したところ、野生型マウスと比較し、体重の減少、四肢の短縮、胸骨・頭蓋骨の形成不全、および指間の癒合が認められた。その原因は肢芽指間領域における BMP-2 および BMP-7 の発現低下に伴うプログラム細胞死 (アポトーシス) の不全によるものであることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : To investigate the physiological functions of Rac1, a member of the small Rho GTPase family, we generated Rac1 conditional knockout mice (Rac1 cKO mice) which are characterized by limb bud mesenchyme-specific inactivation of Rac1. Rac1 cKO mice had shorter body length and lower body weight as compared with control mice. Rac1 cKO mice also showed incomplete fusion of the sternum and cranium. The most striking feature of the Rac1 cKO mice fore- and hindlimbs was profound soft tissue syndactyly because of a complete absence of interdigital programmed cell death. Furthermore, the lack of interdigital programmed cell death and associated syndactyly was related to down-regulated gene expression of BMP-2 and BMP-7, which are known to promote apoptosis in the interdigital mesenchyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計			

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：遺伝子、細胞・組織、発生・分化、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎生期における四肢形成について

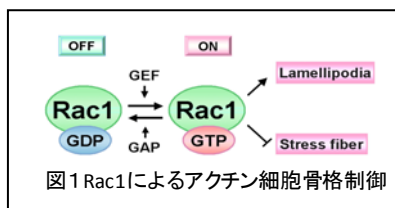
四肢は骨・筋肉・血管・皮膚など、多彩な細胞および組織によって構成される脊椎動物に固有の器官である。マウス胎児期における四肢形成は側板中胚葉由来の肢芽間充織細胞が基部から先端部方向へ伸長することからはじまり、①パターン形成期：肢芽間充織細胞が集合して位置に固有のパターンで前軟骨凝集塊を形成する、②軟骨細胞の増殖・分化期：前軟骨凝集塊が位置特異的に増殖・分化をおこない骨組織の予定領域を占める、の2つの過程を経てその後、血管侵入とともに軟骨内に侵入した骨芽細胞が分化し、骨形成が進行する(Kaufman M.H. *et al. The Anatomical Basis of Mouse Development* 93-108)。

(2) 肢芽のプログラム細胞死について

鳥類、哺乳類の多くの種では、肢芽間充織細胞が決まったタイミングで選択的に死滅することにより、水掻き部分が消失し、指が分離する。マウスにおける前肢、後肢はともに胎生 12 日から 13 日目、Sub. Apical Ectodermal Ridge Marginal Zone (SAMZ) 領域でプログラム細胞死が起こりはじめ、胎生 15 日目までに指間は完全に分離する。指間のプログラム細胞死を制御する因子として BMP(Bone Morphogenetic Protein) および FGF(Fibroblast Growth Factor) ファミリータンパク質が知られているが、その詳細については不明な点が多い (Pajni-Underwood S. *et al. Development* 134, 2359-2368 (2007))。

(3) 低分子量 G タンパク質 Rac について

Rac は低分子量 GTP 結合タンパク質で Rho ファミリータンパク質に属しており、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、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。哺乳類において、Rac は3つのアイソフ



ォーム (Rac1, 2, 3) から構成されており、その発現様式として、Rac1 はユビキタスに発現しているのに対し、Rac2、Rac3 はそれぞれ造血細胞および神経細胞で発現している。Rac1 遺伝子を全身で欠損させたマウスは胎生初期、原始線条体形成不全により胎生 9.5 日から 10.5 日目以降生存しない (Sugihara K. *et al. Oncogene* 17, 3427-3433 (1998))。

(4) 骨・軟骨における Rac1 の機能

in vitro において、Rac1 遺伝子を強制発現させた、軟骨細胞株 ATDC5 は軟骨分化が亢進する (Wang G. *et al. J. Bone Miner. Res* 20, 1022-1031 (2005))。また、*in vivo* において、軟骨細胞特異的に 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では軟骨細胞形成不全により骨格の変性が起こり、矮小発育症、脊柱後湾症の表現型が認められる (Wang G. *et al. Dev. Biol.* 20, 1022-1031 (2007))。

(5) 本研究課題に至った背景

申請者はバクテリオファージ P1 由来の組み換え酵素 Cre を *Prx1* 遺伝子エンハンサーの制御下で発現させることのできるトランスジェニックマウス (*Prx1-Cre*Tg) と、Rac1 遺伝子エクソン 1 の両側に loxP 配列を挟んだマウス (*Rac1 flox*) を交配させ、主に胎生期の四肢で *rac1* 遺伝子が欠損したコンディショナルノックアウトマウス (*Rac1 ckO:Rac1 conditional knockout mice*) を作成した。その結果、四肢形成において以下の表現型を得た。

①四肢形成が異常である。

軟骨細胞特異的に 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と同様に、四肢の長さが短く (Wang G. *et al. Dev. Biol.* 20, 1022-1031 (2007))、また、四肢の石灰化に異常が認められる場合が多い。

②指間の癒合が生じる。

前肢および後肢の指間に癒合が生じる。ただし、X線解析の結果から指骨間に癒合は認められなかった。

2. 研究の目的

(1) Rac1 の四肢形成における機能の解明

①胎生期 *Rac1* cKO マウス四肢の組織学的解析を発生段階に沿って詳細に検討する。その際、四肢形成のパターニングに関与する遺伝子群および軟骨細胞の分化・増殖に関与する遺伝子群の発現様式も同時に検討する。

②*Rac1* cKO マウス由来、胎生 12.5 日の肢芽から培養した初代培養肢芽間充織細胞を用い、*Rac1* 遺伝子の肢芽における細胞内シグナル伝達機構について検討する。

(2) *Rac1* の指間におけるプログラム細胞死制御機能の解明

①胎生 12 日から 13 日目における、*Rac1* cKO マウス肢芽のプログラム細胞死を検討する。

②*Rac1* cKO マウス由来、胎生 12.5 日から 14.5 日における、肢芽のプログラム細胞死に関する遺伝子の発現様式を検討する。

3. 研究の方法

(1) *Rac1* cKO マウスの表現型解析

Rac1 cKO マウスについて、四肢以外にも表現型が認められるか検討する。

①胎生期および出生後においてメンデルの法則に従う遺伝子型となっているか検討する。

②出生後からの体重を経時的に測定する。

③胎生期および出生後の *Rac1* 遺伝子が欠損した組織を、サザンブロッティング法もしくは PCR 法により *Rac1* 遺伝子の欠損を、ノーザンブロッティング法、定量的 RT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法により *Rac1* 遺伝子の mRNA およびタンパク質の発現量を、それぞれ検討する。また、組織によって Cre の発現する細胞がモザイクになっている可能性があるため、免疫染色法もしくは *in situ* hybridization 法 (whole mount *in situ* hybridization 法) により *Rac1* 遺伝子の発現を検討する。必要であれば ROSA26R マウスを用い、*Prx1-Cre* Tg マウスにおける Cre タンパク質の発現様式を検討する (Soriano P. *et al. Nat. Genet.* 21, 70-71 (1999))。

(2) *Rac1* 遺伝子の四肢形成における機能解析

①四肢骨格標本作製する (胎生期、生後 1 日齢、生後 3 週齢)。骨・軟骨組織を Alizarin red および Alcian blue で染色する。

②胎生初期における四肢形成のパターニングに関与する遺伝子 (BMP、FGF、Hox 遺伝子) の発現様式を Whole mount *in situ* hybridization 法を用い、検討する。

③離乳後の大腿骨および脛骨の石灰化度をマイクロ CT、ソフト X 線、および pQCT を用い、解析する。さらに胎生期、生後 1 日齢、生後 3 週齢および離乳後の四肢組織の包埋切片を作製し、骨芽細胞および軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現様式を免疫染色法もしくは *in situ* hybridization 法を用い、検討する。

④胎生 12.5 日の肢芽から培養した初代培養肢芽間充織細胞を用い、様々な増殖因子・分化誘導因子で刺激した際の細胞増殖に対する影響、および分化誘導に対する影響を検討する。

4. 研究成果

(1) *Rac1* cKO マウスは骨格形成が異常である。

①*Rac1* cKO (*Rac1^{fl/fl}; Prx1-Cre*) マウスは出生後、早期に死亡し、離乳時までの生存率は約 20%であった。

②*Rac1* cKO マウスは野性型 (*Rac1^{fl/fl}*) マウスと比較し、有意に体重の減少が認められた。

③*Rac1* cKO マウスは四肢、胸骨、頭蓋骨に異常が認められ、四肢に関しては上肢、下肢ともに野性型マウスと比較し、短く、指間の癒合を呈しており (図 2)、また、胸骨、頭蓋骨では癒合不全が認められた。

④*Rac1* cKO マウスは指骨における軟骨内骨化

の遅延が認められた。

(2) *Rac1* cKO マウスの肢芽指間域では BMP の発現低下

によりプログラム細胞死が起きないことから指間の癒合を呈した。

①野性型マウスの前肢および後肢の肢芽指間域は、胎生 12 日から 14 日の間でプログラム細胞死が起こり、胎生 15 日までに分離する。*Rac1* cKO マウスの肢芽指間域でプログラム細胞死が認められなかった。

②肢芽指間域のプログラム細胞死に関する



図2 四肢形成が異常である。
(3週齢、後肢)

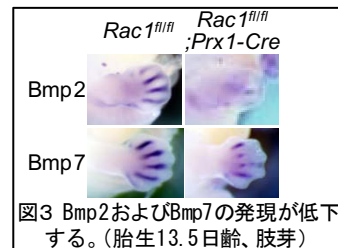


図3 Bmp2およびBmp7の発現が低下する。(胎生13.5日齢、肢芽)

る *Bmp2* および *Bmp7* の発現が *Rac1* cKO マウスでは野性型マウスと比較し、有意に減少していた (図 3)。

以上の結果から、*Rac1* は四肢形成に重要な役割を果たしてい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 8 件)

(1) Suzuki D, Yamada A, Amano T, Yasuhara R, Kimura A, Sakahara M, Tsumaki N, Takeda S, Tamura M, Nakamura M, Wada N, Nohno T, Shiroishi T, Aiba A, Kamijo R. Essential mesenchymal role of small GTPase Rac1 in interdigital programmed cell death during limb development. *Dev. Biol.* 335, 396-406 (2009) (査読：有)

(2) Takami M, Mochizuki A, Yamada A, Tachi K, Zhao B, Miyamoto Y, Anada T, Honda Y, Inoue T, Nakamura M, Suzuki O, Kamijo R. Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through RANKL expression in osteoblasts. *Tissue Eng.* 15, 3991-4000 (2009) (査読：有)

(3) Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, Tamura T, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv LB, Takayanagi H, Kamijo R. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat. Med.* 15, 1066-71 (2009) (査読：有)

(4) Yamada A, Suzuki D, Miyazono A, Oshima K, Kamiya A, Zhao B, Takami M, Donnelly RP, Itabe H, Yamamoto M, Kimura S, Kamijo R. IFN- γ down-regulates Secretoglobin 3A1 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 964-968 (2009) (査読：有)

(5) Tomita T, Yamada A, Miyakoshi M, Kido T, Sheikh F, Srisodsai A, Miyajima A, Donnelly RP, Kimura S. Oncostatin M regulates Secretoglobin 3A1 and 3A2 expression in a bidirectional manner. *Am. J.*

Respir. Cell Mol. Biol. 40, 620-630 (2009) (査読：有)

(6) Suzuki D, Yamada A, Amano T, Kimura A, Yasuhara R, Sakahara M, Tamura M, Tsumaki N, Takeda S, Nakamura M, Shiroishi T, Aiba A, Kamijo R. Generation of Rac1 conditional mutant mice by Cre/loxP system. *New Frontiers in Neuroscience* 175-178 (2009) (査読：無)

(7) 鈴木大、安原理佳、山田篤 四肢・骨格形成における低分子量Gタンパク質Rac1 の役割
口腔組織培養学会誌 18 巻 21-27(2009)
(査読：無)

(8) Zhao B, Takami M, Miyamoto Y, Suzawa T, Yamada A, Mochizuki A, Yasuhara R, Wang X, Inoue T, Namiki O, Sakamoto K, Kamijo R. Characterization of synovial cell clones isolated from rheumatoid arthritis patients: possible involvement of TNF- α in reduction of osteoprotegerin in synovium. *Cytokine* 41, 61-70 (2008) (査読：有)

[学会発表] (計 12 件)

(1) 山田 篤, 鈴木 大, 松本貴志, 影山晴秋, 今井 元, 荒田 悟, 馬場一美, 塩田清二, 饗場 篤, 上條竜太郎: 低分子量Gタンパク質Rac1 による中枢性骨代謝制御機構の解析. 昭和大学共同研究 平成 21 年度研究成果抄録集-中間報告-, p9, 2010 (昭和大学共同研究平成 21 年度研究成果発表会, 東京, 2010 年 3 月)

(2) Suzuki D, Yamada A, Amano T, Yasuhara R, Kimura A, Sakahara M, Tsumaki N, Takeda S, Tamura M, Nakamura M, Shiroishi T, Aiba A, Kamijo R: Essential role of Rac1 during limb development. American Society for Bone & Mineral Research (ASBMR) 31st Annual Meeting Onsite Program p291, 1152, 2009 (American Society for Bone & Mineral Research (ASBMR) 31st Annual Meeting. Denver Colorado, USA, September 2009)

(3) 鈴木大, 山田篤, 高見正道, 須澤徹夫,

宮本洋一, 上條竜太郎: GremlinはBMP-2による骨芽細胞分化を制御する. 第27回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集, p252, 2009 (第27回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2009年7月)

(4) 山田 篤, 鈴木 大, 松本貴志, 影山晴秋, 今井 元, 荒田 悟, 馬場一美, 塩田清二, 饗場 篤, 上條竜太郎: 低分子量Gタンパク質Rac1による中枢性骨代謝制御機構の解析. 昭和大学共同研究 平成20年度研究成果抄録集-中間報告-, p9, 2009 (昭和大学共同研究平成20年度研究成果発表会, 東京, 2009年3月)

(5) 鈴木 大, 山田 篤, 松本貴志, 趙宝紅, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 馬場一美, 上條竜太郎: BMP活性制御物質の探索とその機能解析. 昭和大学歯学部口腔癌包括的研究センター平成20年度公開シンポジウム プログラム・抄録集, p16, 2009 (昭和大学歯学部口腔癌包括的研究センター平成20年度公開シンポジウム, 東京,) 2009年3月)

(6) Suzuki D, Yamada A, Amano T, Yasuhara R, Kimura A, Sakahara M, Tsumaki N, Takeda S, Tamura M, Nakamura M, Shiroishi T, Aiba A, Kamiyo R: Essential role of small GTPase Rac1 during limb development. 2nd Joint Meeting of the International Bone & Mineral Society and the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society Delegate Program Book, p26, 2009 (2nd Joint Meeting of the International Bone & Mineral Society and the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society (IBMS-ANZBMS). Sydney, Australia, March 2009)

(7) 鈴木 大, 山田 篤, 天野孝紀, 木村文子, 安原理佳, 妻木範行, 竹田 秀, 田村勝, 中村雅典, 城石俊彦, 饗場 篤, 上條竜太郎: Rac1は四肢形成に必須である. 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会 講演要旨集, p454, 2008 (第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008年12月)

(8) 鈴木 大, 山田 篤, 天野孝紀, 木村文

子, 安原理佳, 妻木範行, 竹田 秀, 田村勝, 中村雅典, 城石俊彦, 饗場 篤, 上條竜太郎: Rac1は四肢形成に必須である. 口腔組織培養学会誌 **18**: 5-6, 2009 (第45回日本口腔組織培養学会, 塩尻, 2008年11月)

(9) 鈴木 大, 山田 篤, 木村文子, 安原理佳, 妻木範行, 竹田 秀, 松本貴志, 馬場一美, 中村雅典, 饗場 篤, 上條竜太郎: 低分子量Gタンパク質Rac1は四肢形成に必須である. 第26回日本骨代謝学会プログラム抄録集, p138, 2008 (第26回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2008年10月)

(10) Suzuki D, Yamada A, Yasuhara R, Tsumaki N, Nakamura M, Kamiyo R: Rac1 controls interdigital programmed cell death in limb buds. Abstracts, p33-34, 2008 (The 1st Showa International Symposium for Life Science 5th Annual Meeting, Tokyo, Japan, September 2008)

(11) 鈴木 大, 山田 篤, 安原理佳, 木村文子, 妻木範行, 竹田 秀, 中村雅典, 饗場篤, 上條竜太郎: 低分子量Gタンパク質Rac1は四肢形成に必須である. 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会抄録集, p181, 2008 (第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 札幌, 2008年7月)

(12) Suzuki D, Yamada A, Yasuhara R, Nakamura M, Kamiyo R: Essential role of small GTPase Rac1 in limb development. Dent Med Res, **28**: 203-204, 2008 (第28回昭和歯学会総会, 東京, 2008年6月)

6. 研究組織

研究代表者

山田 篤 (YAMADA ATSUSHI)

昭和大学歯学部・口腔生化学教室・講師
研究者番号: 50407558

研究協力者

上條 竜太郎 (KAMIJO RYUTARO)

昭和大学歯学部・口腔生化学教室・教授
研究者番号: 70233939

鈴木 大 (SUZUKI DAI)

昭和大学歯学部・口腔生化学教室・大学院生