

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890194

研究課題名（和文） Akt-mTOR を介した骨格形成機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the bone formation mechanism through Akt-mTOR

研究代表者

六反田 賢 (ROKUTANDA SATOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60549608

研究成果の概要（和文）：

私はこれまで、骨格形成における軟骨細胞分化、増殖、基質産生、細胞成長（大きさ）に対するAktの機能を明らかにした。さらにその下流シグナル分子(mTOR、GSK3、FoxOs)の機能を解明し、mTORがAktの下流で一番主要な役割を担っていることを明らかにした。

今回の申請では、mTORの下流シグナルの骨格形成プロセス（分化、増殖、基質産生、細胞成長）における機能を明らかにする。具体的には、mTORの下流分子の機能を明らかにするとともに、Runx2の活性化を介した骨格形成プロセスの制御機構を解明を目指した。本研究は、これまでに確立した長管骨（大腿骨、頸骨）の器官培養と培養骨へのアデノウィルスを用いた遺伝子導入で、各分子の機能を組織レベルで明らかにする独創的な研究であり、骨格形成機構の解明に大きく貢献できると考えられた。

まず Runx2 に関連があると思われる分子の軟骨細胞における細胞増殖における機能について、胎生 15.5 日齢のマウス胎児より摘出した長管骨である大腿骨、頸骨を用いて対照群とラパマイシンを暴露した群で、器官培養を 48 時間、あるいは 96 時間行い、そのリン酸化型が低下しているか、ウエスタンブロッティング、また免疫染色で検討し、一方では有意な差を確認できた。

またその分子のリン酸化は、Runx2 の核移行を促進している可能性もあり、そこで、ある薬剤を胎生 15.5 日齢のマウス胎児から摘出した長管骨である大腿骨、頸骨に作用させ、器官培養を 48 時間行い、骨格標本においては有意な差を確認した。

また、それに関連し、wnt 経路に関連した Tcf7、Lef1 と Runx2 の相互作用について研究成

果を国際雑誌に発表した。

現在も継続し研究を行っている。

研究成果の概要（英文）：

I clarified a function of Akt for the bone formation until now. Akt regulates a large number of signal molecules in the down stream. I decided to perform function elucidation for the frame formation mechanism of those signal molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

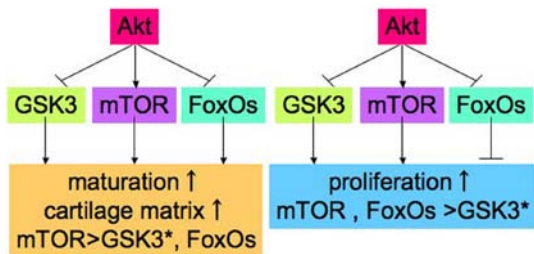
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：骨格形成機構、Akt-mTOR、Runx2、Stat1,3、S6K、4EBP1

1. 研究開始当初の背景

私はこれまで、骨格形成における軟骨細胞分化、増殖、基質産生、細胞成長（大きさ）に対するAktの機能を明らかにした。さらにその下流シグナル分子（mTOR、GSK3、FoxOs）の機能を解明し、mTORがAktの下流で一番重要な役割を担っていることを明らかにした。



今回の申請では、mTORの下流シグナルの骨格形成プロセス（分化、増殖、基質産生、細胞成長）における機能を明らかにする。具体的には、mTORの下流分子4EBP1とS6Kの機能を明らかにするとともに、Runx2の活性化を介した骨格形成プロセスの制御機構を解明する。本研究は、これまでに確立した長管骨（大腿骨、頸骨）の器官培養と培養骨へのアデノウ

イルスを用いた遺伝子導入で、各分子の機能を組織レベルで明らかにする独創的な研究であり、骨格形成機構の解明に大きく貢献できると考えられた。

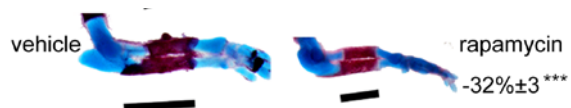
2. 研究の目的

mTORの下流シグナルの骨格形成プロセス（分化、増殖、基質産生、細胞成長）における機能を明らかにする。

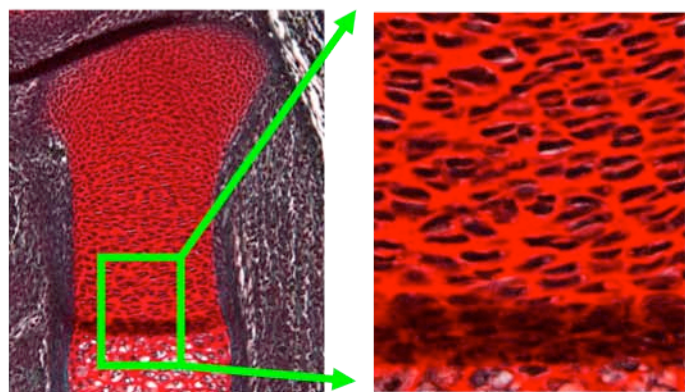
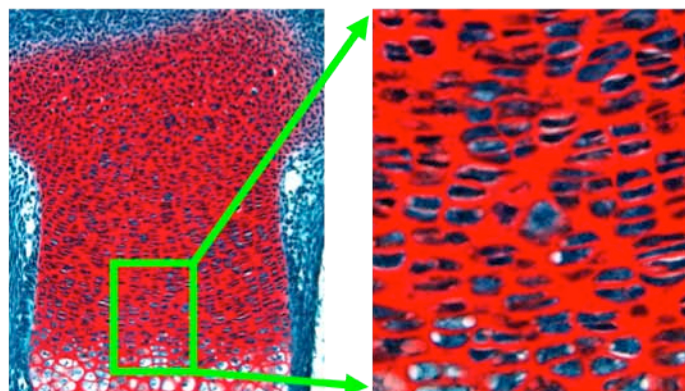
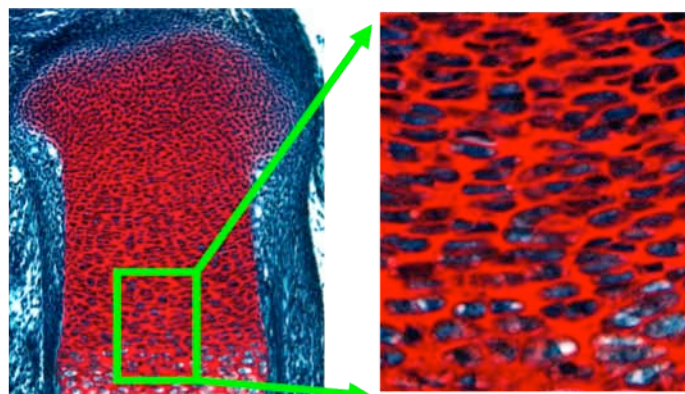
3. 研究の方法

目的分子の軟骨細胞における細胞増殖における機能について、胎生15.5日齢のマウス胎児より摘出した長管骨である大腿骨、脛骨を用いて対照群を薬剤やウイルスを暴露した群で、比較検討する。変化を認めた場合は

長管骨にそれらに作用する薬剤やウイルスを用いてその機能解析、また拮抗するであろう因子を用いてさらにその下流のシグナル分子を明らかとする。実験方法はウエスタンブロッティング、免疫染色、骨格標本、HE染色、サフラニンO染色、BrdU染色、リアルタイムPCR、In situ hybridization等で行う。



* 摘出したマウス胎児の上腕に薬剤を作用させた骨格標本。赤色に染まる骨の長さが減少しているのが分かる。

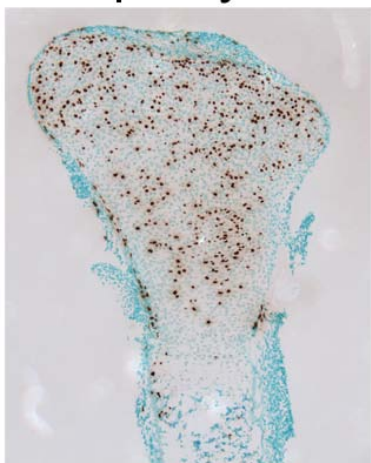


* ウイルスを作用させたことにより、赤色で示される基質産生に変化が認められたサフラニンO染色を行った切片。

Vehicle

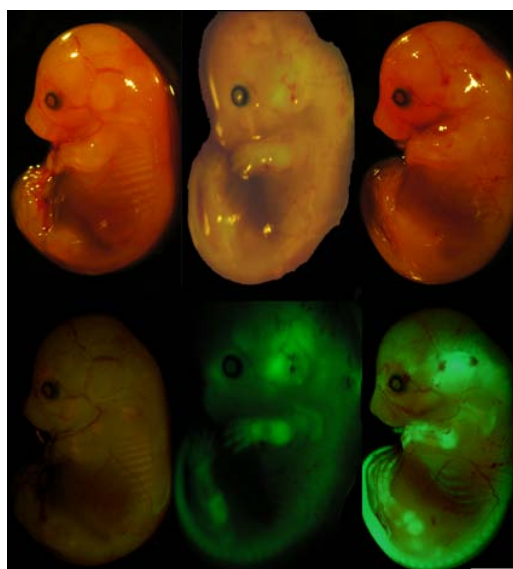


rapamycin



* 摘出したマウス胎児の脛骨に薬剤を作用させ細胞増殖を検討するため BrdU 染色を行ったもの。褐色の点に示される細胞増殖中の細胞数が変化しているのが分かる。

必要に応じ遺伝子導入のためのウイルス作製、トランスジェニックマウス作製、ノックアウトマウス作製を行う。



* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス胎児。EGFP を付与し遺伝子の導入を確認している。

4. 研究成果

現在まだ研究途中であるが、wnt 経路に関する論文を発表した。

Wnt 経路は早くからその存在が知られているが、未だその機能については未解明の部分が多く、しかしその機能は重要であると予想されていることから盛んに研究されている分野である。

今回は特に、骨格形成機構に非常に重要と予想された Tcf、Lef をコンストラクションし、インジェクションを行いトランスジェニックマウスを作製し解析を行った。

そのマウスをもとに in vivo、in vitro の実験を行い、骨格形成に必須とされる Runx2 との相互作用を明らかとし、その結果を国際雑誌に発表した。

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 2 件)

1. Shin-ichi Yamada, Souichi Yanamoto, Goro Kawasaki, Satoshi Rokutanda, Hisanobu Yonezawa Akiko Kawakita, Takayuki K Nemoto: Overexpression of CRK II increases migration and invasive potential in oral squamous cell carcinoma; Cancer Letters , 2011

2. Masaki Mikasa · Satoshi Rokutanda · Hisato Komori · Kosei Ito · Ying Sze Tsang · Yuki Date · Carolina A. Yoshida · Toshihisa Komori: Regulation of Tef7 by Runx2 in chondrocyte maturation and proliferation; Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2010

[学会発表] (計 件)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/handle/10069/24743>

6. 研究組織

(1)研究代表者

六反田 賢 (ROKUTANDA SATOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60549608

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：