

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791798

研究課題名（和文） 骨・軟骨形成における Cdc42 の機能解析

研究課題名（英文） Functions of Cdc42 during skeletal development

研究代表者

山田 篤（YAMADA ATSUSHI）

昭和大学・歯学部・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、Cdc42 を主に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、野性型マウスと比較し、四肢の短縮、胸骨・頭蓋骨の形成不全、口蓋裂、および指間の癒合などの表現型が認められた。指間の癒合の原因は中指骨の癒合および肢芽指間領域におけるプログラム細胞死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）：Cdc42, a member of the Rho subfamily of small GTPases, is known to be a regulator of multiple cellular functions, including cytoskeletal organization, cell migration, proliferation, and apoptosis. To investigate the physiological function of Cdc42 during limb development, we generated limb bud mesenchyme-specific inactivated Cdc42 (*Cdc42^{fl/fl}; Prx1-Cre*) mice. *Cdc42^{fl/fl}; Prx1-Cre* mice demonstrated short limbs and body, abnormal calcification of the cranium, cleft palate, disruption of the xiphoid process, and syndactyly. Syndactyly in *Cdc42^{fl/fl}; Prx1-Cre* mice was caused by fusion of metacarpals and a failure of interdigital programmed cell death (ID-PCD). These results demonstrate that Cdc42 is essential for chondrogenesis and ID-PCD during limb development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
23 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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) 低分子量 G タンパク質 Cdc42 について

Cdc42 は Rho ファミリータンパク質に属する低分子量 G タンパク質で、アクチン細胞骨格の再編成が関与する細胞機能の制御、例えば、細胞の形態や極性、細胞接着、細胞運動、細胞質分裂、平滑筋の収縮、神経軸索の伸展などにおける分子スイッチとして働いている。Cdc42 を過剰発現させるとフィロポディアと呼ばれる特異的なアクチン構造が形成される。

(2) 骨・軟骨細胞における Cdc42 の作用

*in vitro*において Cdc42 遺伝子を強制発現させた軟骨細胞株 ATDC5 細胞は、アポトーシスの誘導および軟骨分化の促進が起こることが知られている (Wang G. *et al. J. Bone Miner. Res.* 20, 1022-31(2005))。

(3) 本研究課題に至った背景

申請者は Cdc42 と同じ Rho ファミリーに属する低分子量 G タンパク質、Rac1 の四肢形成における機能を検討するために、主に肢芽間葉系細胞で発現している Prx1 遺伝子のエンハンサー制御下で Cre 遺伝子を発現す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 の上流および下流域に loxP 配列を組み込んだマウス (Rac1 flox) を交配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) を作成した結果、以下の表現型が得られた。

1. Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre マウスは骨格形成が異常である。

- ① 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^{fl/fl};Prx1-Cre マウスは野性型マウスと比較し、有意に体重の減少が認められた。
- ③ Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre 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、また、胸骨、頭蓋骨では癒合不全が認められた。
- ④ Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre 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^{fl/fl};Prx1-Cre 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^{fl/fl};Prx1-Cre 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与する Bmp2 および Bmp7 の発現が Rac1^{fl/fl};Prx1-Cre 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。

2. 研究の目的

申請者は同じ Rho ファミリーに属する低分子量 G タンパク質 Cdc42 の骨・軟骨形成における作用を検討するために、Cdc42 遺伝子欠損マウスの解析が必要となった。しかし、Cdc42 遺伝子を全身で欠損させたマウスは Rac1 遺伝子欠損マウスと同様に胎生初期で死に至る。そこで、Cdc42 遺伝子エクソン 1 の上流および下流域に loxP 配列を組み込んだマウス (Cdc42 flox) を Prx1-Cre Tg と交配させたコンディショナルノックアウトマウス (Cdc42^{fl/fl};Prx1-Cre) を作成し、その表現型表現型の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) Cdc42 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 (胎生期および生後 1 日齢)。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ンに関与する遺伝子 (Bmp、Fgf、Hox、Sox、Shh 遺伝子など) の発現様式を Whole mount *in situ* hybridization 法を用い検討する。
- ③生後 1 日齢の大腿骨および脛骨の石灰化度をソフト X 線およびマイクロ CT を用い解析する。さらに、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 (Collagen、Ihh 遺伝子など) 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。

(2) Cdc42 遺伝子の口蓋形成における機能解析

Cdc42^{fl/fl};Prx1-Cre マウスの口蓋の異常（口蓋裂）に関して以下の実験を遂行する。

①口蓋形成が始まる胎生 12 日齢以降の組織標本を経時的に作製する。

4. 研究成果

1. 四肢形成が異常である。

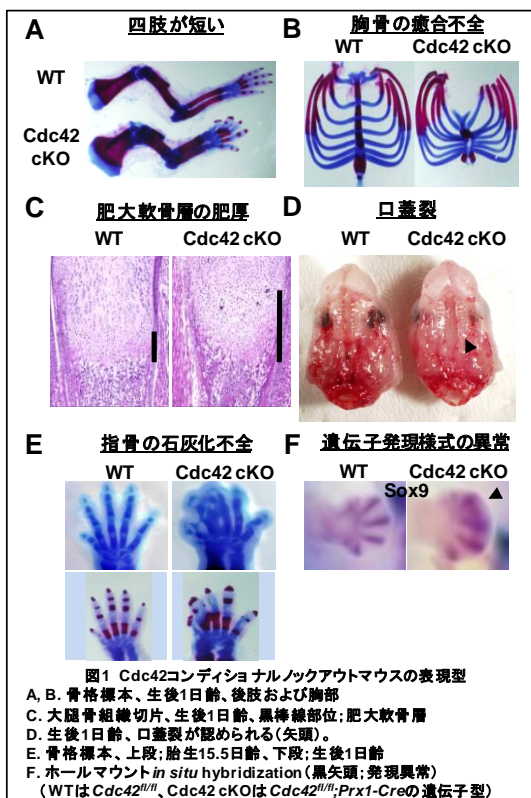
Cdc42^{fl/fl};Prx1-Cre マウスは出生後、1～2 日目で死亡した。*Cdc42^{fl/fl};Prx1-Cre* マウスの四肢は野性型マウスと比較し、上肢、下肢ともに短く、指の形成が不全であった（図 1A, C, E）。

2. 胸骨形成が異常である。

Cdc42^{fl/fl};Prx1-Cre マウスの胸骨（胸骨柄および胸骨片）は野性型マウスと比較し短く、また、剣状突起が無いもの、もしくは真ん中で破裂しているなど形成不全が認められた（図 1B）。

3. 口蓋形成が異常である。

Cdc42^{fl/fl};Prx1-Cre マウスの口蓋における破裂（口蓋裂）が認められた（図 1D）。



以上の結果から、*Cdc42* は *Rac1* と同様に四肢・骨格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 7 件）

1) Yamada A (2 番目/14 人、**Corresponding author**) : *Cdc42* is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development. *Mech. Dev.*, in press. (査読：有)

2) Yamada A (4 番目/11 人) : Expression of MAL in oral carcinogenesis. *Medical Molecular Morphology*, in press. (査読：有)

3) Yamada A (6 番目/14 人) : Identification and isolation of neural crest derived cells in nasal concha. *Jpn J Tissue Cult Dent Res*, in press. (査読：有)

4) Yamada A (2 番目/12 人、**Corresponding author**) : Expression of POEM, a positive regulator of osteoblast differentiation, is suppressed by TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 766-770, 2011. (査読：有)

5) Yamada A (5 番目/8 人) : Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron*, 70(5): 908-923, 2011. (査読：有)

6) Yamada A (6 番目/12 人) : Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β via late phase activation of nuclear factor κ B and expression of phagocyte-type NADPH oxidase. *J Biol Chem* 286(17):14744-14752, 2011. (査読：有)

7) Yamada A (5 番目/9 人) : Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts. *Cell Tissue Res*, 342:213-220, 2010. (査読：有)

〔学会発表〕（計 2 1 件）

1) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 相澤 怜, 鈴木 航, 塚崎 雅之, 山本松男, 馬場一美, 上條竜太郎 :

BMP 活性制御因子 Alx3 の骨芽細胞分化制御機構の解明.

昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 23 年度合同シンポジウム

昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 22 年度合同シンポジウム

2) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 上條竜太郎, 馬場一美 :

転写因子 Alx3 は BMP シグナルを増強し、骨芽細胞分化を促進させる。

第 4 回口腔先端応用医科学研究会 (Academy of Advanced Applied Science in Oral Medicine (AAASOM)) 学術会議

3) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 馬場一美, 上條竜太郎 :

Alx3 は BMP-2 による骨芽細胞分化を制御する。

第 48 回日本口腔組織培養学会学術大会

4) 相澤 怜, 山田 篤, 鈴木 大, 塚崎 雅之, 山本 剛, 飯村 忠浩, 山口 朗, 山本 松男, 上條 竜太郎 :

Cdc42 は四肢形成における軟骨形成と肢芽指間域のアポトーシスを制御する。

第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2011 年 9 月 30 日, 10 月 1-2 日, 岐阜

5) 塚崎雅之, 山田 篤, 高見正道, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 吉村健太郎, 山本松男, 上條竜太郎 :

TNF- α は POEM の発現を抑制し、骨芽細胞分化を制御する。

第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2011 年 9 月 30 日, 10 月 1-2 日, 岐阜

6) Ryo Aizawa, Atsushi Yamada, Dai Suzuki, Hidetoshi Kassai, Takeshi Harada, Masayuki Tsukasaki, Gou Yamamoto, Tadahiro Iimura, Akira Yamaguchi, Kazuki Nakao, Matsuo Yamamoto, Atsu Aiba, Ryutaro Kamiyo :

Essential role of Cdc42 in chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development.

The 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research

September 16 - 20, 2011, San Diego, California, USA

7) 松本貴志, 山田 篤, 上條竜太郎, 馬場一美 :
ホメオボックス Alx3 は BMP-2 による骨芽細胞分化を制御する。

第 41 回日本口腔インプラント学会・学術大会

2011 年 9 月 16-18 日, 愛知

8) Rika Yasuhara, Motomi Enomoto-Iwamoto, Dai Suzuki, Atsushi Yamada, Atsu Aiba, Shu Takeda, Ryutaro Kamiyo :

The cross talks between Wnt/bcatenin and Rac1 signaling in regulation of maintenance and function of superficial cell layer in articular cartilage.

IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) Annual Scientific Meeting with the Japanese Society for Bone and Mineral Society (JSBMR) (IOF-ANZBMR)

September 4 - 8, 2011, Gold Coast, Australia

9) 塚崎雅之, 山田 篤, 高見正道, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 吉村健太郎, 山本松男, 上條竜太郎 :

TNF- α は骨芽細胞において POEM の発現を抑制し、骨芽細胞分化を制御する。

第 29 回 日本骨代謝学会学術集会

2011 年 7 月 28-30 日, 大阪

10) 安原理佳, 鈴木 大, 山田 篤, 竹田 秀, 上條竜太郎 :

関節表層細胞の維持と機能調節における

Wnt/ β -catenin と Rac1 シグナルのクロストーク。

第 29 回 日本骨代謝学会学術集会

2011 年 7 月 28-30 日, 大阪

11) 相澤 怜, 山田 篤, 鈴木 大, 塚崎 雅之, 山本 剛, 立川 哲彦, 上條 竜太郎, 山本 松男 :

Cdc42 は四肢形成において軟骨形成と指間部アポトーシスに必須である。

第 31 回昭和歯学会総会

2011 年 7 月 2 日, 東京

12) 塚崎雅之, 山田 篤, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 宮本洋一, 須澤徹夫, 高見正道, 山本松男, 上條竜太郎 :

TNF- α は細胞接着分子 POEM の発現を抑制し、骨芽細胞分化を制御している。

第 31 回昭和歯学会総会, 2011 年 7 月 2 日, 東京

13) 山田 篤, 塚崎雅之, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 山本松男, 上條竜太郎 :

BMP 活性制御因子の探索とその機能解析。

昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 22 年度合同シンポジウム

プログラム抄録集, p. 25, 2011

昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 22 年度合同シンポジウム

2011 年 3 月 26 日, 東京

14) Suzuki D, Yamada A, Kamiyo R :

Essential role of Rac1 during limb and skeletal development.

89th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR)

March 16-19, 2011, San Diego, California,

USA

15) Tsukasaki M, Yamada A, Miyazono A, Suzuki D, Yoshimura K, Aizawa R, Miyamoto Y, Takami M, Suzawa T, Morimura N, Aruga J, Yamamoto M, Kamijo R :

TNF- α Suppresses POEM Expression in Osteoblasts.

89th General Session & Exhibition of the International Associate for Dental Research (IADR)

March 16-19, 2011, San Diego, California, USA

16) Matsumoto T, Yamada A, Suzuki D, Takami M, Suzawa T, Miyamoto Y, Baba K, Kamijo R : Alx3, a Paired-type Homeodomain Containing Transcription Factor, Regulates Osteoblast Differentiation Induced by BMP-2.

J Bone Miner Res, **25**: p.S276, 2010

The 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research

October 15-19, 2010, Toronto, Canada

17) 鈴木 大, 山田 篤, 安原理佳, 立川哲彦, 中村雅典, 上條竜太郎 :

低分子量 G タンパク質 Rac1 は四肢骨格形成に必須である。

第 52 回歯科基礎医学会学術大会

2010 年 9 月 20-22 日, 東京

18) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 馬場一美, 上條竜太郎 :

ホメオボックス遺伝子 Alx3 は BMP-2 による骨芽細胞分化を制御する。

第 28 回日本骨代謝学会プログラム抄録集, p. 228, 2010

第 26 回日本骨代謝学会学術集会

2010 年 7 月 21-23 日, 東京

19) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 上條竜太郎, 馬場一美 :

ホメオボックス遺伝子 Alx3 は BMP-2 による骨芽細胞分化を制御する。

Dental Medicine Research, 30(3), p273-274, 2010.

第 30 回昭和歯学会総会, No. 5, 2010 年 7 月 3 日, 東京

20) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 馬場一美, 上條竜太郎 :

Alx3 による骨芽細胞分化制御機構の解明。

第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会抄録集, p. 108, 2010

第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会

2010 年 6 月 25-26 日, 北九州

21) 山田 篤 :

遺伝子改変動物を用いた生体機能の解明。

平成 22 年度 上條奨学賞-研究業績-

第 31 回昭和歯学会総会, 2011 年 7 月 2 日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 篤 (YAMADA ATSUSHI)

昭和大学・歯学部・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・教授

研究者番号:70233939

鈴木 大 (SUZUKI DAI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号:00585797

相澤 怜 (RYO AIZAWA)

昭和大学・歯学部・大学院生

研究者番号:なし