

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893243

研究課題名(和文)炎症性骨破壊におけるRhoファミリータンパク質の機能の解明

研究課題名(英文)The roles of Rho family GTPases in inflammatory bone destruction

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のさまざまな機能を制御するRhoファミリータンパク質の骨吸収における機能を解明することで、骨破壊を伴う疾患の予防もしくは治療に有用な手法を見出せる可能性がある。そこで、骨吸収を担う破骨細胞において、Rhoファミリータンパク質に属するRac1遺伝子とCdc42遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウスを用いて、個体レベルでの骨吸収におけるRhoファミリータンパク質の機能について検討を行った。

その結果、Rac1およびCdc42は個体レベルでの破骨細胞形成、すなわち骨吸収にとって重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We may find the technique that is useful in prevention or treatment of disease with bone destruction by investigating roles of Rho family GTPases in bone resorption. Therefore, we generated osteoclast-specific inactivated Rac1 and Cdc42 mice to investigate the physiological functions of Rac1 and Cdc42 in bone resorption.

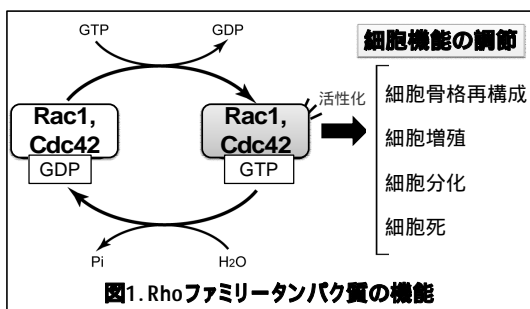
As a result, our findings suggest that Rac1 and Cdc42 play important roles for bone resorption caused by osteoclast formation in vivo.

研究分野：歯周病学

キーワード：遺伝子改変動物 炎症性骨破壊

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒などの多細胞生物のさまざまな生命現象は、基本的には細胞間と細胞内のシグナル伝達機構によって制御されている。細胞内シグナル伝達系における基本因子の一つである Rho ファミリー-GTP 結合タンパク質(低分子量 G タンパク質)はさまざまな生命現象に関与することが知られている。Rho ファミリータンパク質に属する Rac1 と Cdc42 は生体においてユビキタスに発現していると考えられており、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、細胞の様々な高次機能を制御している(図1)。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。



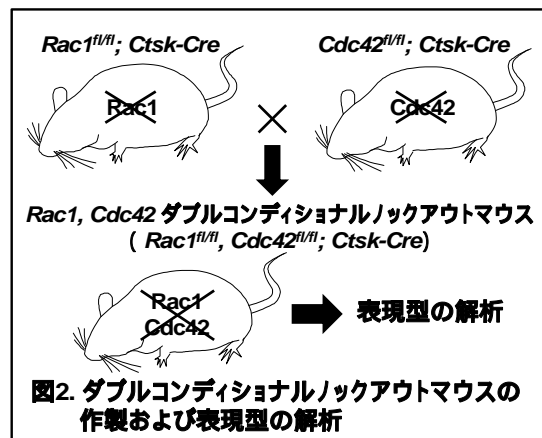
申請者らは、Rho ファミリータンパク質、特に Cdc42 が個体レベルでの骨・軟骨形成において、軟骨内骨化での正常な軟骨細胞の肥大化や軟骨基質の石灰化、肢芽形成期での軟骨細胞の凝集およびパターンニングに重要な役割を果たしていることを明らかにした。一方、骨吸収を担う破骨細胞においては、Cdc42 が破骨細胞の分化や機能の制御に関与しているとの報告があるものの、Rho ファミリータンパク質が個体レベルの骨吸収において果たしている機能は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、個体レベルの骨吸収における Rho ファミリータンパク質の役割の詳細を明らかにすることである。

3. 研究の方法

破骨細胞特異的に *Rac1* 遺伝子および *Cdc42* 遺伝子を欠損させるために、組換え酵素 Cre を破骨細胞に特異性の強いカテプシン K 遺伝子プロモーター制御下で発現させることのできるノックインマウスを用い、*Rac1* 遺伝子と *Cdc42* 遺伝子を破骨細胞特異的にダブルで欠損させたダブルコンディショナルノックアウトマウス (*Rac1<sup>fl/fl</sup>, Cdc42<sup>fl/fl</sup>; Ctsk-Cre*) を作製した。作製したダブルコンディショナルノックアウトマウスを用い、以下の研究を行った(図2)。

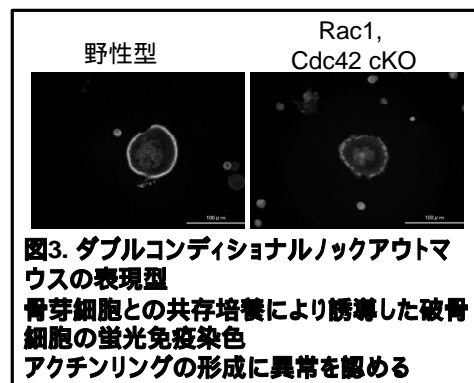


大腿骨における骨形態計測(骨量、骨面、破骨細胞数、骨梁数、骨形成速度などのパラメータ)を行った。

組織切片を作製し、破骨細胞の分化・成熟を破骨細胞マーカーである TRAP 活性染色により検討した。

4. 研究成果

ダブルコンディショナルノックアウトマウスは野性型マウスと比較して、体長および長管骨の長さが短縮しており、脾臓の肥大化が認められた。また、ダブルコンディショナルノックアウトマウス由来の骨髄細胞の破骨細胞形成能は低下しており、破骨細胞のアクチンリングの形成不全および TRAP 活性の減少が認められた(図3)。



以上の結果より、*Rac1* および *Cdc42* は個体レベルでの破骨細胞形成にとって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 3 件)

Suzuki W, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Harada T, Nakayama M, Nagahama R, Maki K, Takeda S, Yamamoto M, Aiba A, Baba K, Kamijo R:  
Cdc42 is critical for cartilage

development during endochondral ossification.  
Endocrinology. 156(1): 314-322, 2015.  
(査読有)

Aizawa R, Yamada A, Suzuki D, Tsukasaki M, Yamamoto M, Aiba A, Kamijo R:  
Cdc42 plays important roles in bone formation during limb development.  
Jpn. J. Tissue Cult. Dent. Res., 22(2): 35-41, 2013. (査読有)

Matsumoto T, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Tsukasaki M, Suzuki W, Nakayama M, Maki K, Yamamoto M, Baba K, Kamijo R:  
BMP-2 induced expression of Alx3 that is a positive regulator of osteoblast differentiation.  
PLoS ONE 8(6): e68774, 2013. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

中山睦子, 山田 篤, 鈴木 大, 相澤 怜, 鈴木 航, 馬場一美, 山本松男, 上條竜太郎, 榎宏太郎:  
Cdc42 は口蓋形成過程において必須の遺伝子である。  
第 61 回昭和大学学士会総会 プログラム・抄録集: p. 36, 2014  
(第 61 回昭和大学学士会総会, 2014 年 12 月 6 日, 東京)

Suzuki W, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Takeda S, Yamamoto M, Baba K, Kamijo R:  
Cdc42 is essential for cartilage development during endochondral ossification.  
ANZBMS 24th Annual Scientific Meeting Handbook: p96, 2014  
(ANZBMS 24th Annual Scientific Meeting, September 9, 2014, Queenstown, New Zealand)

鈴木 航, 山田 篤, 相澤 怜, 鈴木 大, 竹田 秀, 山本松男, 馬場一美, 上條竜太郎:  
Cdc42 は軟骨形成とそれに続く軟骨内骨化に必須である。  
第 32 回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集: p. 258, 2014  
(第 32 回日本骨代謝学会学術集会 2014 年 7 月 24 日, 大阪)

鈴木 航, 山田 篤, 相澤 怜, 鈴木 大, 中山睦子, 榎宏太郎, 山本松男, 上條竜太郎, 馬場一美:  
Cdc42 は軟骨形成とそれに続く軟骨内骨

化に必須である。  
プログラム・抄録集: p.19, 2013  
(昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成 25 年度シンポジウム, 2014 年 3 月 8 日, 東京)

鈴木 航, 山田 篤, 相澤 怜, 鈴木 大, 中山睦子, 山本松男, 榎宏太郎, 馬場一美, 上條竜太郎:  
Cdc42 は軟骨形成に必須の遺伝子である。  
J Oral Biosci, 55, suppl.: p. 159, 2013  
(第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013 年 9 月 21 日, 岡山)

Nakayama M, Yamada A, Aizawa R, Isobe T, Suzuki D, Suzuki W, Sato Y, Aiba A, Baba K, Mishima K, Yamamoto M, Maki K, Kamijo R:  
Cdc42 is crucial for facial and palatal development.  
2nd Meeting of the International Association for Dental Research-Asia Pacific Region PROGRAM BOOK, p21, 2013  
(2nd Meeting of the International Association for Dental Research-Asia Pacific Region. August 21, 2013, Bangkok, Thailand)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 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 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

相澤 怜 ( AIZAWA, Ryo )

昭和大学・歯学部歯周病学講座・助教

研究者番号：80710673

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：