

Title	Inhibition of Rac1 promotes BMP-2-induced osteoblastic differentiation
Author(s)	大西, 恵
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34217
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	大西 恵
論文題名 Title	Inhibition of Rac1 promotes BMP-2-induced osteoblastic differentiation (Rac1はBMP-2誘導性骨芽細胞分化を抑制する)
論文内容の要旨	
<p>〔目的 (Purpose)〕</p> <p>RhoやRac、Cdc42に代表されるRhoファミリータンパク質は低分子Gタンパク質のひとつで、細胞の形態制御や遊走など様々な生体反応を調節することが知られている。Bone morphogenetic protein (BMP) は、分化、成長、細胞死に関与する様々なプロセスを制御する多機能性サイトカインである。特に生体内で異所性骨化を誘導する物質として知られ、骨分化や骨再生に重要な因子であると考えられている。先の研究で我々は、RhoエフェクターであるROCKの働きを阻害することによりBMP-2誘導性骨芽細胞分化が促進することを報告した。さらに、BMP新規受容体Neogeninを介したシグナルが、BMPの古典的な経路であるSmad経路を抑制し、骨芽細胞分化を抑制することが報告されている。先行研究からRhoが骨芽細胞分化抑制的に働くことが明らかだが、RacやCdc42といった他のRhoファミリータンパク質が骨芽細胞分化へ及ぼす影響は明らかにされていない。Rhoファミリータンパク質は、ファミリー間のクロストークにより、細胞の分化や遊走性を制御することから、RacやCdc42の作用を解明することがBMPによる骨形成メカニズムの全貌を明らかにする上で重要であると考えられる。そこで本研究では、骨芽細胞分化におけるRacの役割の解明を試みた。</p> <p>〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕</p> <p>BMP-2誘導性骨芽細胞分化におけるRac1及びCdc42の影響を明らかにするために、BMP-2刺激により骨芽細胞に分化することが知られているC2C12細胞にRac1ドミナントネガティブタイプ変異体 (Rac1N17) および Rac1活性型変異体 (Rac1L61) をそれぞれ遺伝子導入した。BMP-2刺激条件下において、Rac1N17導入細胞のAlkaline phosphatase (ALP) の有意な活性化と、骨分化マーカー遺伝子Runx2およびOsteocalcinの発現増加が確認された。</p> <p>Rac1阻害剤であるNSC23766で処理したC2C12細胞においても、BMP-2誘導性骨芽細胞分化が促進された。一方で、マウス前骨芽細胞株であるMC3T3-E1細胞やラット骨髄間葉系細胞において、NSC23766は有意な骨芽細胞分化促進作用を示さなかった。また、Cdc42 siRNAを導入したC2C12細胞において、BMP2誘導性骨芽細胞分化を検討したところ、Cdc42 siRNA導入群ではControl siRNA導入群と比べてBMP-2誘導性ALP活性が上昇する傾向がみられた。これらの結果から、C2C12細胞においてRac1、Cdc42共にBMP-2誘導性骨芽細胞分化を抑制する作用を持つことが示された。</p> <p>NSC23766はRac1とグアニチンヌクレオチド交換因子であるTrio、Tiam1の結合を阻害することによりRac1阻害剤として働く。そこで、Trio、Tiam1それぞれのsiRNAを用いて発現抑制したところ、Tiam1発現抑制下でBMP-2誘導性ALP活性が有意に上昇していた。一方、Trio siRNA導入細胞においては、Control siRNA導入細胞に比べてBMP-2誘導性ALP活性に有意な差は認められなかった。これらの結果から、Tiam1を介したRac1の活性化がBMP-2誘導性骨芽細胞分化を抑制することが示された。</p> <p>さらにC2C12細胞において、RacエフェクターであるPAKを用いたPull down assayを行い、Racの活性化を検証した。その結果、BMP-2刺激によりRac1が活性化されることが示された。BMP-2誘導性骨芽細胞分化の代表的な経路であるSmad1/5/8経路について、BMP-2刺激によるSmad1/5/8のリン酸化をWestern-blotting法で確認し、Smad1の核移行を免疫染色で確認した。NSC23766存在下で、BMP-2刺激によるSmad1/5/8リン酸化とSmad1の核移行共に変化は見られなかった。以上の結果から、BMP-2はRacの活性化を介して骨芽細胞分化を抑制することが示唆された。また、この作用はSmad経路の抑制による作用ではないことが推察された。</p> <p>〔総括 (Conclusion)〕</p> <p>C2C12細胞においてBMP-2は、従来より報告されていた骨芽細胞分化促進作用のみならず、Tiam1を介したRac1の活性化により、骨芽細胞分化抑制作用も有することを明らかにした。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		大西 恵	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	山下 俊英
	副 査	大阪大学教授	大園 恵一
	副 査	大阪大学教授	石井 優
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>Bone morphogenetic protein (BMP) は骨分化や骨再生に重要な因子であり、Smad経路を介した骨芽細胞分化促進メカニズムが知られている。しかしながら、BMPの効果は種によって異なり、臨床応用の障壁となっている。これまで、Rho-ROCKを介したシグナル伝達がSmad経路の抑制を介して骨芽細胞分化を抑制すると報告されているが、Rho-ROCKと相反する機能を持つRacの影響は明らかにされていない。</p> <p>BMPによる骨形成メカニズムの全貌解明を目指して申請者は、骨芽細胞分化におけるRacの影響の解明を試みた。本研究のRac活性阻害実験により、RacがBMP誘導性骨芽細胞分化抑制的に働くことが示された。さらにそのメカニズムはRho-ROCKによる骨芽細胞分化抑制とは異なり、Smad経路の抑制には関与しないことが明らかとなった。</p> <p>BMPがSmad経路を介した骨芽細胞分化促進と、Rho-ROCKやRacを介した骨芽細胞分化抑制の二つの作用を持つという見解は、BMPの骨再生効果が種によって異なることを説明する上で非常に重要な研究であるとの評価を受けた。よって、学位申請者の研究は学位の授与に値すると考えられる。</p>			