



Title	低分子量GタンパクRap1の骨代謝における役割に関する研究
Author(s)	上田, 晃己
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45564">https://hdl.handle.net/11094/45564</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	上田 晃己
博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)
学位記番号	第 19401 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	低分子量 G タンパク Rap 1 の骨代謝における役割に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 米田 俊之 (副査) 教授 由良 義明    講師 川井 直彦    講師 豊澤 悟

### 論文内容の要旨

#### 〈目的〉

低分子量 G タンパクは、癌遺伝子産物の一つである Ras をはじめ 100 種類以上が存在し、多様な細胞機能の調節に関与していることが知られている。骨代謝においても、低分子量 G タンパクの様々な役割が明らかにされている。例えば Ras の活性化は、骨芽細胞の分化抑制や破骨細胞の寿命延長を引き起こすことが示されている。一方、Ras の阻害因子として発見され、Ras と最も相同性が高い低分子量 G タンパクである Rap1 の骨代謝における役割は未だ不明である。本研究では、Rap1 の骨代謝における役割を明らかにするために、Rap1 を特異的に不活化する分子である SPA-1 の遺伝子欠損マウス (SPA-1<sup>-/-</sup> マウス) を用いて、骨に見られる表現型を検索するとともに、Rap1 の骨芽細胞および破骨細胞の分化に対する影響について *in vitro* での検討を加えた。

#### 〈実験方法〉

##### 1. SPA-1 遺伝子欠損マウスの検討

野生型マウス (WT マウス、C57BL/6) における Rap1 および SPA-1 の臓器別発現をウェスタンブロッティング法にて確認した。骨の組織学的検討は、16 週齢マウスの脛骨パラフィン包埋薄切片を用い、H-E 染色および酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色 (TRAP 染色) を施し行った。

##### 2. Rap1 の骨形成に対する作用

未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 に、Rap1 活性化分子である Epac、不活化分子である SPA-1 をレトロウイルスシステムを用い過剰発現させ、BMP2 存在下で 7 日間培養の後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を指標に評価した。石灰化に対する作用は、3~4 日齢の SPA-1<sup>-/-</sup> マウス頭蓋骨由来初代骨芽細胞を BMP2 存在下で 2 週間培養の後、アリザリンレッド染色およびフォンコッサ染色により評価した。Rap1 の活性化は、活性化型 Rap1 に対する融合タンパクである RalGDS-RBD を用いたプルダウンアッセイ法にて検討した。石灰化速度および骨形成率の測定にはカルセイン二重標識法を用いて検討した。

##### 3. Rap1 の骨吸収に対する作用

SPA-1<sup>-/-</sup> マウス脾細胞を M-CSF、RANKL 存在下にて 6 日間培養後、TRAP 陽性多核破骨細胞様細胞数を測定した。アクチンリングの形成は、コラーゲンコート処理したカバーガラス上にて同様に破骨細胞形成を誘導し、

ローダミン標識ファロイジンにて染色後、蛍光顕微鏡にて観察した。

破骨細胞分化調節因子の発現は、SPA-1<sup>-/-</sup> マウス初代培養骨芽細胞に PTH-rP を添加し、RANKL、OPG の mRNA 発現を RT-PCR 法により評価した。

〈結果〉

#### 1. SPA-1 遺伝子欠損マウスの検討

SPA-1<sup>-/-</sup> マウスは WT マウスと比較して体重、体毛、生殖能力に差を認めなかった。SPA-1 は WT マウスの肺、脾臓、骨髄、骨芽細胞、卵巣において強い発現が認められた。また、SPA-1<sup>-/-</sup> マウスの脾細胞と骨髄細胞では WT マウスと比較して Rap1 の強い活性化が認められた。

骨の組織学的検討では、SPA-1<sup>-/-</sup> マウスでは WT マウスと比較して有意な海綿骨量の増加と単位骨長当たりの破骨細胞数の減少を認めた。

#### 2. Rap1 の骨形成に対する作用

C3H10T1/2 において BMP2 刺激により Rap1 が活性化されることが示された。また、BMP2 により誘導される C3H10T1/2 の骨芽細胞分化は、SPA-1 過剰発現により抑制され、Epac 過剰発現により促進された。Epac 過剰発現細胞では BMP2 非存在下でも骨芽細胞分化が認められた。SPA-1<sup>-/-</sup> マウス由来初代骨芽細胞は WT マウスと同程度の石灰化を示した。

#### 3. Rap1 の骨吸収に対する作用

SPA-1<sup>-/-</sup> マウス由来脾細胞から誘導された TRAP 陽性破骨細胞様細胞数は、WT マウスと比較して有意な減少が認められた。形成された破骨細胞様細胞の形態、アクチンリングの形成に関しては差を認めなかった。

SPA-1<sup>-/-</sup> マウス由来初代培養骨芽細胞では、PTH-rP 刺激による OPG mRNA 発現の減少が抑制されていた。

〈結論・考察〉

骨芽細胞において Rap1 が BMP2 により活性化されることが、Rap1 の活性が ALP 活性を指標とした骨芽細胞分化と相関すること、さらには SPA-1<sup>-/-</sup> マウスにおいて海綿骨量の増加が認められることなどの所見から、Rap1 の活性化が骨形成を正に制御することが示唆された。一方、破骨細胞においては Rap1 の活性化が *in vitro* において破骨細胞分化を抑制すること、また、SPA-1<sup>-/-</sup> マウスにおいて破骨細胞数の減少が認められることなどの所見から、Rap1 の活性化は骨吸収に対しては負に作用することが示唆された。そのメカニズムの一つとして、破骨細胞分化誘導刺激による骨髄間葉系細胞における OPG 発現低下が Rap1 活性化により抑制されることが関与している可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、低分子 G タンパク Rap1 の骨における役割を検討する目的で、Rap1 活性が高まっている遺伝子改変マウス (SPA-1 欠損マウス) の骨形成および骨吸収について解析を行ったものである。

SPA-1 欠損マウスにおいては、骨量および骨形成が増加しており、一方骨吸収は破骨細胞数の減少により低下していた。また培養前駆骨芽細胞においても Rap1 活性の増加は骨芽細胞分化を促進し、活性の抑制は骨芽細胞分化を阻害した。さらに SPA-1 欠損マウス由来の脾細胞は破骨細胞形成能が低下していた。

以上の結果は低分子 G タンパク Rap1 の活性化が骨リモデリングの調節において重要な役割を演じていることを明らかにしたものであり、博士 (歯学) を授与するに値すると認める。