

令和元年9月3日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11786

研究課題名(和文) Rab14とCCN2による小胞輸送がマトリクス形成に及ぼす役割

研究課題名(英文) Roles of CCN2 and Rab14 in the formation of extracellular matrix

研究代表者

星島 光博 (Hoshijima, Mitsuhiro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30736567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨分化促進因子CCN2と細胞内輸送制御因子Rab14は、骨、軟骨および肺組織で極めて高いレベルで発現している。両者の分子間相互作用が、これらの組織で果たす役割を解明することを目的とし、骨細胞の分化や基質産生に及ぼす影響について検証した。その結果、骨細胞の成熟に伴ってRab14とCCN2の発現が亢進し、Ⅰ型コラーゲンやオステオカルシンの発現が有意上昇していた。それに伴い細胞内カルシウム応答に關与するc-Fos、コネキシン43およびパネキシン3の発現が著しく増加した。また成熟骨細胞で、機械的刺激に対する細胞内カルシウムイオンの上昇率が有意に上昇した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨細胞の成熟過程においてCCN2とRab14の発現が上昇し、基質産生に關与する因子の発現を亢進するとともに、細胞内カルシウム応答にも影響を及ぼす可能性が示唆された。また、CCN2とRab14は細胞内で相互作用し、小胞輸送に關与していることが、これまで研究で示されている。本研究から得られた知見を基に、CCN2とRab14の分子間相互作用を阻害あるいは促進することが可能となれば、骨細胞の分化や基質産生を制御し、骨形成不全や過形成等を症状とする疾病の原因究明や治療にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：CCN2 and Rab14 strongly expressed in bone, cartilage and lung. To elucidate the roles of CCN2 and Rab14 in osteocyte maturation, we investigated the different expression of osteocyte-related genes between young osteocytes and developmentally mature osteocytes using 3D-cultured MLO-Y4 cells. As the results, in the mature MLO-Y4 cells, rab14, ccn2, col1a1, CCN, c-Fos, Cx43 and Panx3 mRNA expression were significantly increased in comparison with young cells. Furthermore, in the present study, we showed for the first time that intracellular Ca²⁺ levels were significantly increased in developmentally mature osteocytes in comparison with young osteocytes by flow-induced mechanical stress.

These findings show that the CCN2 and Rab14 plays an important role in the formation of extracellular matrix, and the intracellular Ca²⁺ responses in a 3D cellular network in osteocyte.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：CCN2 Rab14 骨組織 骨細胞 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

身体を構成している骨の多くは、一旦軟骨を経てから骨に置換される内軟骨性骨化により形成される。これにより骨格の成長が起こるが、成熟した骨組織においても、骨芽細胞、骨細胞および破骨細胞によるリモデリングが絶え間なく繰り返されており、骨組織の恒常性が維持されている。分泌タンパク質である CCN ファミリータンパク質 2/結合組織成長因子 (CCN2/CTGF)は、内軟骨性骨化で重要な役割を演ずる軟骨細胞、骨形成を行う骨芽細胞の増殖・分化を共に促進する。また、CCN2 は特徴的な 4 つのドメイン構造を有し、様々な因子と相互作用することで、多様な情報伝達系を介して細胞の機能を制御している¹⁾。

これまでに申請者らは、様々な CCN2 と結合する因子を解析し^{2), 3)}、その 1 つが Rab ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rab GTPase) に属する Rab14 であることを明らかにしてきた。

Rab14 は細胞質内に存在し、小胞膜上に会合することで、分泌タンパク質のゴルジ体から分泌小胞への輸送に関与していることが知られている⁴⁾。また、Rab14 の両者は軟骨組織のみならず、骨や肺組織においても高いレベルで CCN2 と共に発現していることが明らかとなった (図 1)。これらの所見は、CCN2 と Rab14 が細胞内で相互作用し、分泌タンパク質あるいは膜タンパク質の輸送に関与することで、幅広い組織において、その形成に深く関与している可能性を示している。

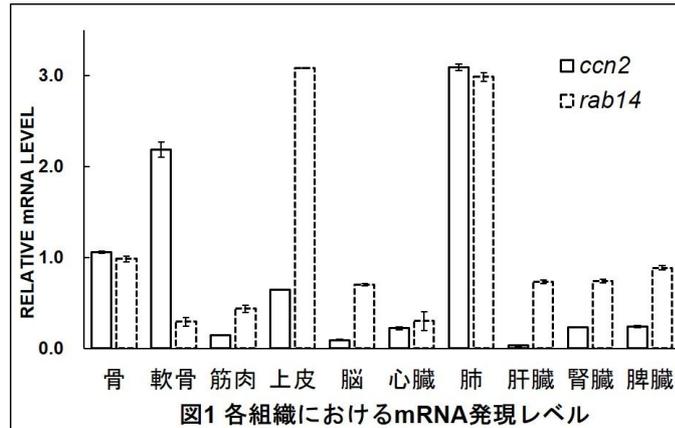


図1 各組織におけるmRNA発現レベル

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、軟骨細胞用細胞株 HCS-2/8 から作製した cDNA ライブラリーを基に、CCN2 の結合因子として Rab14 を同定し、その結合様式や軟骨細胞におけるこれらの分子の役割を解明してきた。また、一方で生後 4 日のマウスの組織を用いた実験において、CCN2 と Rab14 が軟骨細胞だけでなく、骨および肺などの組織でも極めて高い発現を示すことが分かった (図 1)。そこで、Rab14 と CCN2 の相互作用が骨化のメカニズムでどのような役割を担っているかを解明するとともに、骨や肺などの組織において細胞外基質産生にどのような関与を示すのかを検証する。これらの研究成果は、骨形成不全や肺線維症等の細胞外基質産生に起因した疾病の原因や、特異的な治療法の解明にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

- (1) Rab14 と CCN2 が骨細胞の成熟過程や基質産生に与える影響を調べるために、細胞様細胞株である MLO-Y4 細胞のコラーゲンゲルを用いた 3 次元 (3D) 培養系を確立した。3D 培養で誘導された幼若骨細胞と成熟骨細胞を用いて、*rab14* および *ccn2* mRNA 発現レベルを、定量 real time PCR 法 (qRT-PCR) により解析した。
- (2) 骨細胞の成熟過程における Rab14 と CCN2 の発現上昇に伴い、どのような因子が変動し、細胞の生理作用に影響を及ぼすかを qRT-PCR により調べた。
- (3) 類骨中の幼若骨細胞と石灰化骨に囲まれている成熟骨細胞の機械的刺激に対する違いを調べるために、ニワトリ胚頭蓋冠の骨細胞に流体剪断応力を負荷し、細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 応答の 3 次元タイムラプスイメージングを行った。

4. 研究成果

- (1) MLO-Y4 細胞をコラーゲンゲル中で 3D 培養し、突起の長さを測定した。経時的に突起の長さは増加し、幼若骨細胞から成熟骨細胞様の形態へと変化した。さらに、コラーゲンゲル内で 3D 培養した MLO-Y4 細胞から、培養開始 7 日目と 15 日目に RNA を回収し、骨細胞関連遺伝子の発現変化を qRT-PCR により評価した。15 日間培養した群では、幼若骨細胞で高発現する *Dentin matrix protein 1 (Dmp1)* の mRNA 発現量が 7 日間培養した群に比ベ有意に減少し、一方で成熟骨細胞に高発現する *Sclerostin (Sost)* の mRNA 発現量が有意に上昇した。これにより、MLO-Y4 細胞は長期培養することで、幼若骨細胞の特徴を備えた細胞から成熟骨細胞の特徴を備えた細胞に分化していくことが確認された (図 2)。また、*rab14* および *ccn2* mRNA の発現レベルを qRT-PCR により解析したところ、15 日間培養した群で両者とも有意に上昇していた (図 3)。

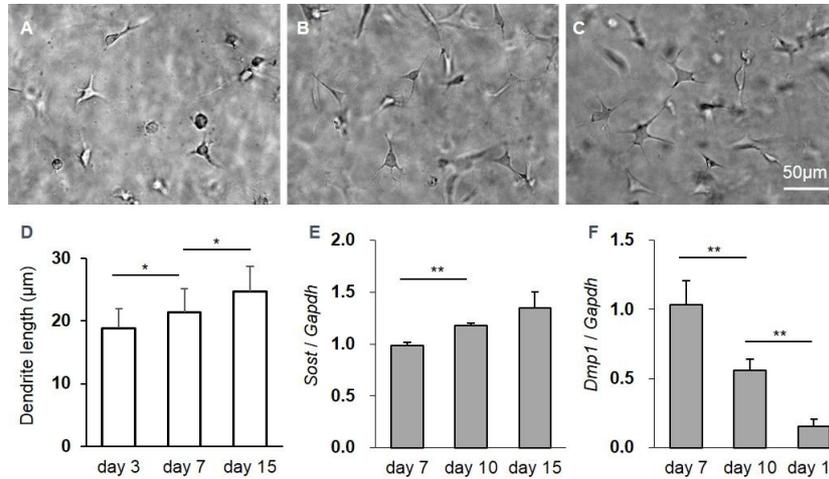


図2 3D培養におけるMLO-Y4細胞の成熟

MLO-Y4細胞をtype I collagen gel中で、(A) 3日間、(B) 7日間および(C) 15日間、3D培養した。それぞれの培養期間で細胞の樹状突起の平均長を測定した(D)。Sost (E) と Dmp1 (F)の発現レベルを、7日から15日間培養した群でqRT-PCRにより比較した(*t*-test **P* < 0.05, ***P* < 0.01)。

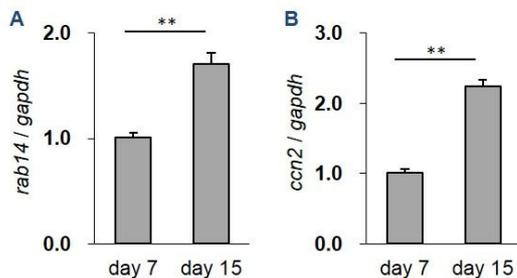


図3 MLO-Y4細胞の成熟過程におけるRab14とCCN2の発現
qRT-PCRによりrab14 (A) とccn2 (B)の発現レベルを、7日間と15日間培養した群で比較した(*t*-test ***P* < 0.01)。

- (2) 骨細胞の成熟過程におけるRab14とCCN2の発現上昇に伴い、どのような因子が変動し、細胞の生理作用に影響を及ぼすかを調べた。骨組織中の類骨骨細胞と類似した形態的特徴を持つ3D培養開始3-7日目のMLO-Y4細胞と比較し、成熟骨細胞様の長い突起を持つ15日間長期培養した細胞では、型コラーゲン(Coll1a1)やオステオカルシン(OCN)の発現が有意上昇していた。さらに、細胞内カルシウム応答に関与するc-Fos、コネキシン43(Cx43)およびパネキシン3(Panx3)が、長期間3D培養したMLO-Y4細胞で著しく上昇していることを明らかにした(図4)。

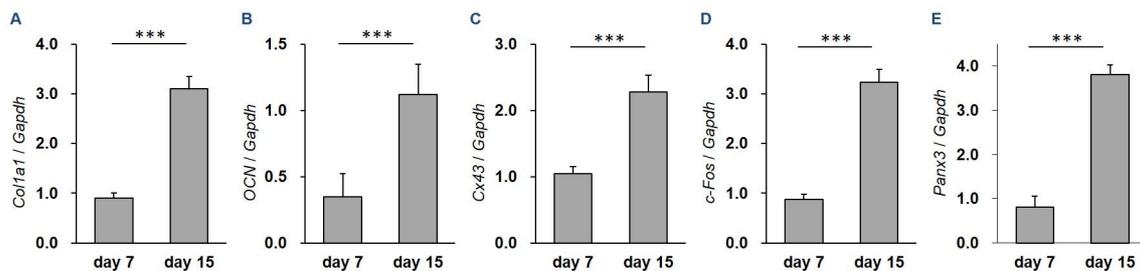


図4 MLO-Y4細胞の成熟過程における遺伝子発現の変化

MLO-Y4細胞を7日間と15日間3D培養した群で、Coll1a1 (A)、OCN (B)、Cx43 (C)、c-Fos (D)およびPanx3 (E)のmRNA発現レベルを比較した(*t*-test ****P* < 0.001)。

- (3) 骨細胞の成熟とRab14、CCN2の発現上昇に伴い、細胞の生理作用にどのような影響が現れるかを組織レベルで検討した。ニフトリ胚頭蓋冠の骨細胞に流体剪断応力を負荷したところ、類骨中の幼弱骨細胞と比較して、石灰化骨に囲まれている成熟骨細胞では、細胞内Ca²⁺の上昇率が有意に高い値を示すことが明らかとなった(図5)。

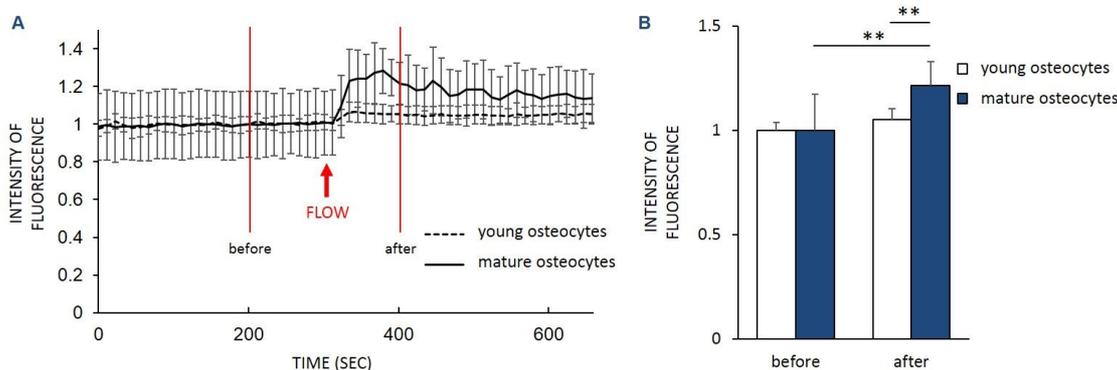


図5 機械的刺激に対する幼若骨細胞と成熟骨細胞の Ca^{2+} 応答
ニワトリ胚頭蓋冠を用いて細胞内 Ca^{2+} 応答の 3D タイムラプスイメージングを行い、幼若骨細胞と成熟骨細胞の流体剪断応力に対する違いを比較した(A, B) (t -test $**P < 0.01$)。

(4) まとめ

これらの結果から、骨細胞の成熟に伴って Rab14 と CCN2 の発現が亢進し、基質産生を活性化することが示された。また、細胞内 Ca^{2+} 応答にも影響を及ぼす可能性が示唆された。骨細胞の成熟に伴って Cx43 や Panx3 といった因子の発現が上昇し、 Ca^{2+} 応答が亢進されることで、機械的刺激に対する反応が増強することが明らかとなった(図 6)。これらのことは、骨化の進行した深部骨組織において、骨代謝能が高められている可能性を示唆している。

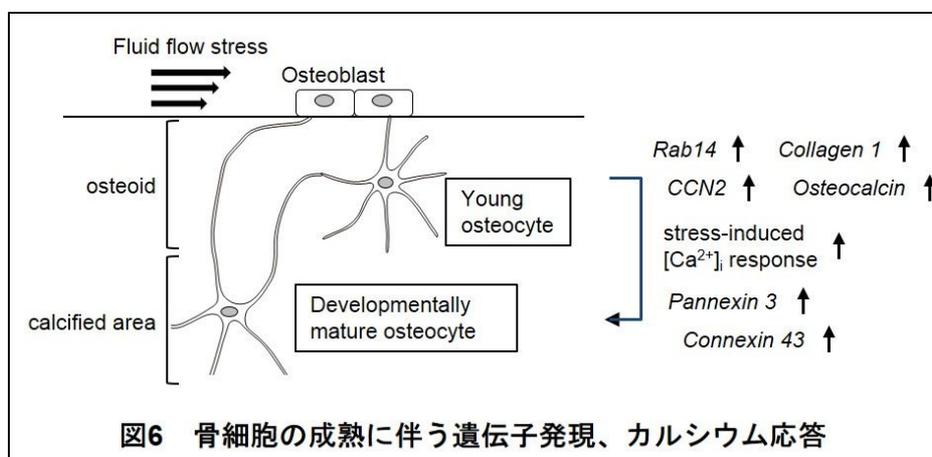


図6 骨細胞の成熟に伴う遺伝子発現、カルシウム応答

< 引用文献 >

- 1) Perbal B & Takigawa M *Imperial College Press*, London. 2005.
- 2) Aoyama E et al. *Biochem. J.* 420, 413-420, 2009.
- 3) Hoshijima M et al. *FEBS J.* 279, 3584-3597, 2012.
- 4) Jagath R et al. *Molecular Biology of the Cell* 15, 2218-2229, 2004.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Tanaka T, Hoshijima M, Sunaga J, Nishida T, Hashimoto M, Odagaki N, Osumi R, Aadachi T, Kamioka H. Analysis of Ca^{2+} response of osteocyte network by three-dimensional time-lapse imaging in living bone. *J Bone Miner Metab.* 2017, 36: 519-528. (査読あり) DOI: 10.1007/s00774-017-0868-x

[学会発表](計 4 件)

星島光博, 服部高子, 青山絵理子, 西田崇, 久保田聡, 上岡寛, 滝川正春: CCN2 と Rab14 の相互作用が骨・軟骨細胞の小胞輸送に及ぼす役割 ~軟骨分化促進因子 CCN2 の新たな細胞内機能~, 第 60 回歯科基礎医学会, 福岡, 2018.9.5-7 (ポスター発表)
星島光博, 服部高子, 青山絵理子, 西田崇, 田中智代, 久保田聡, 上岡寛, 滝川正春: CCN2 と Rab14 の相互作用が骨・軟骨細胞の小胞輸送に及ぼす役割, 第 40 回 日本分子生物学会年会(ConBio2017), 神戸, 2017.12.6-9 (ポスター発表)

Mitsuhiro Hoshijima, Takako Hattori, Eriko Aoyama, Takashi Nishida, Satoshi Kubota, Hiroshi Kamioka, Masaharu Takigawa, Novel intracellular function of CCN2 -Role of interaction between CCN2 and Rab14 in vesicle trafficking in chondrocytes-, The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2016 Annual Meeting Sep. 16-19, 2016, Atlanta, Georgia, USA
Tomoyo Tanaka, Mitsuhiro Hoshijima, Junko Sunaga, Takashi Nishida, Taiji Adachi, Hiroshi Kamioka, Analysis of Intracellular Ca²⁺ Mobilization by 3D Time-lapse Imaging in Bone, The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2016 Annual Meeting Sep. 16-19, 2016, Atlanta, Georgia, USA

〔図書〕(計 1件)

Hoshijima M, Hattori T, Takigawa M. Protocols for Screening for Binding Partners of CCN Proteins: Yeast Two-Hybrid System. *Methods Mol Biol.* 2017;1489: 145-154. DOI: 10.1007/978-1-4939-6430-7_15

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/kyousei/classroom/event.html>

<http://www.dent.okayama-u.ac.jp/arcocs/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：服部 高子

ローマ字氏名：(Hattori, takako)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：00228488

研究分担者氏名：青山 絵理子

ローマ字氏名：(Aoyama, eriko)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：10432650

研究分担者氏名：滝川 正春

ローマ字氏名：(Takigawa, masaharu)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：20112063

研究分担者氏名：西田 崇

ローマ字氏名：(Nishida, takashi)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30322233

研究分担者氏名：上岡 寛

ローマ字氏名：(Kamioka, hiroshi)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：80253219

研究分担者氏名：久保田 聡

ローマ字氏名：(Kubota, satoshi)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：90221936

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。