

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06885

研究課題名（和文）CCN2とVASH1による新たな内軟骨性骨化調節メカニズムの解明

研究課題名（英文）Novel regulatory mechanism of endochondral ossification via CCN2-VASH1 axis

研究代表者

村瀬 友里香（MURASE, Yurika）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：70803708

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）：本研究では、CCN2とVASH1による新たな内軟骨性骨化調節メカニズムを解明することを目的とした。興味深いことに、VASH1はCCN2と同様に肥大軟骨細胞層に局在し、また、軟骨細胞においてCCN2の発現を抑制すると、VASH1の発現が低下し、アポトーシスが誘導された。そして、その誘導されたアポトーシスはROS阻害剤であるN-acetyl-L-cysteineにより抑制された。これらの成果から、軟骨細胞の肥大化期には、CCN2-VASH1の発現が亢進し、ROSレベルの制御を介して肥大軟骨細胞の細胞死・アポトーシスを分化終末期まで防いでいる可能性が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：本研究により、未だにほとんど解明されていない「内軟骨性骨化の最終段階 軟骨から骨への転化段階」の調節メカニズムの一端を解明する成果が生み出された。

社会的意義：本研究により、骨・軟骨形成に異常をきたす疾病の原因・病態究明、治療法開発につながる成果が生み出された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to investigate a novel regulatory mechanism of endochondral ossification by CCN2 and VASH1. We found that both CCN2 and VASH1 were localized in the hypertrophic chondrocyte layer. CCN2-silencing in chondrocytes reduced the expression of VASH1 and increased apoptotic cells, and its increase was suppressed by a ROS inhibitor, N-acetyl-L-cysteine. These results suggest that up-regulation of CCN2-VASH1 axis may suppress the elevation of ROS level that causes chondrocyte cell death/apoptosis and keep hypertrophic chondrocytes surviving until the terminal stage of chondrogenic differentiation.

研究分野：外科系歯学

キーワード：CCN2 VASH1 内軟骨性骨化 軟骨

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。内軟骨性骨化の過程では、軟骨細胞は増殖、分化し、成熟して肥大軟骨細胞になり、この肥大軟骨細胞層に血管が侵入して無血管組織である軟骨が血管に富む骨へ置換する。このように内軟骨性骨化の終盤で血管が侵入する際には、血管新生が重要な役割を果たしており、局所の血管新生因子とその阻害因子のバランスにより絶妙に調節されていると考えられている。

研究代表者らのグループは、肥大軟骨細胞において多く産生される CCN family protein 2 (CCN2) が、内軟骨性骨化の増殖・分化・肥大化・石灰化等あらゆるステージにおいて促進的に働く因子であることを明らかにしている (図1)。また、CCN2 が軟骨細胞だけでなく、血管内皮細胞(ECs)の増殖・分化も促進する血管新生因子であることを報告している<sup>1)</sup>。

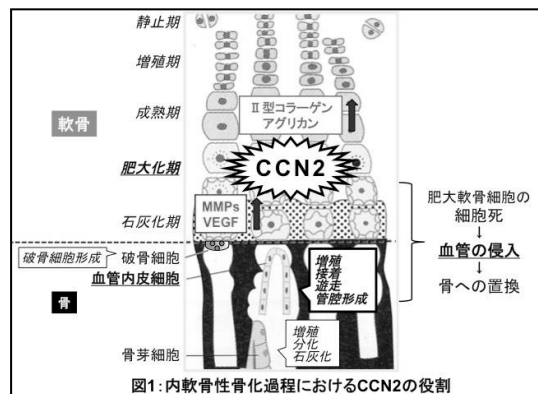


図1: 内軟骨性骨化過程におけるCCN2の役割

一方、研究協力者の佐藤らのグループは、ECs により分泌される血管新生阻害因子 vasohibin-1 (VASH1) を近年発見した<sup>2)</sup>。しかし、軟骨における VASH1 の発現や機能を解析した報告は皆無である。そのため、この相反する CCN2 と VASH1 両者の関係性を解明することは、血管新生および内軟骨性骨化の調節メカニズム、特に未だにほとんど解明されていない軟骨から骨への転化段階の調節メカニズムを理解する上で重要であると考えた。

研究代表者は、VASH1 の発現が、ヒト軟骨細胞株 HCS-2/8<sup>3)</sup>において低いこと、マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 の軟骨分化誘導培養系において CCN2 と同様の発現パターンで分化の進行に伴って上昇することを、予備実験で確認した。これらの結果は、軟骨においても VASH1 が発現しているという新たな知見をもたらすと同時に、軟骨由来の VASH1 が内軟骨性骨化の新規調節因子となる可能性を示唆した。またさらに、CCN2 と VASH1 が関連することで内軟骨性骨化を調節する可能性も示唆した。

### 2. 研究の目的

<大目的>

CCN2 と VASH1 による新たな内軟骨性骨化調節メカニズムを解明すること

<小目的>

- (1) 軟骨における VASH1 の発現・局在を明らかにすること
- (2) 軟骨細胞における CCN2 と VASH1 の発現制御連関を明らかにすること
- (3) CCN2 と VASH1 の発現制御連関が軟骨細胞・内軟骨性骨化に及ぼす影響を明らかにすること

### 3. 研究の方法

#### (1) 軟骨における VASH1 の発現・局在

- ① HCS-2/8 における VASH1 の発現を real-time RT PCR 法により解析した。
- ② ATDC5 の軟骨分化誘導培養系における CCN2 と VASH1 の発現を real-time RT PCR 法により解析した。
- ③ HCS-2/8 における VASH1 の産生をウェスタンブロット法により解析した。
- ④ 野生型マウスの成長板軟骨組織における VASH1 の局在を免疫組織学的染色法により解析した。

#### (2) 軟骨細胞における CCN2 と VASH1 の発現制御連関

軟骨細胞における CCN2 と VASH1 の関係性を loss or gain-of-function の手法により解析した。

- ① HCS-2/8 において、siRNA を用いて CCN2 をノックダウンし、VASH1 の発現を解析した。
- ② HCS-2/8 において、VASH1 発現ベクターを用いて VASH1 を過剰発現させ、CCN2 の発現・産生を解析した。
- ③ HCS-2/8 において、CCN2 発現ベクターを用いて CCN2 を過剰発現させ、VASH1 の発現・産生を解析した。

#### (3) CCN2 と VASH1 の発現制御連関が軟骨細胞・内軟骨性骨化に及ぼす影響

VASH1 は、血管内皮細胞において活性酸素分解酵素 superoxide dismutase 2 (SOD2) の発現を正に制御するという報告があるため、軟骨細胞においても同様の制御関係が成立するかを調べた。また、SOD2 を加えた三者の発現制御連関も調べた。

- ① HCS-2/8 において、VASH1 を過剰発現させ、SOD2 の発現を解析した。
- ② HCS-2/8 において、CCN2 をノックダウンし、SOD2 の発現を解析した。

血管内皮細胞において、VASH1はSOD2を誘導しROS (reactive oxygen species)レベルを低下させるという報告がある。また、軟骨細胞の分化が進行するとともに細胞内ROSレベルは上昇し、また、増加したROSは軟骨細胞のアポトーシスを誘導するとの報告がある。そのため、軟骨細胞においてCCN2、VASH1、SOD2の発現制御連関が細胞内ROSレベルとアポトーシスに及ぼす影響を調べた。

- ③HCS-2/8において、VASH1を過剰発現させ、ROS検出キットを用いて細胞内ROSレベルを解析した。
- ④HCS-2/8において、CCN2をノックダウンし、ROS検出キットを用いて細胞内ROSレベルを解析した。
- ⑤HCS-2/8において、CCN2をノックダウンし、Annexin Vアポトーシス検出キットを用いて初期のアポトーシスを解析した。
- ⑥HCS-2/8において、CCN2をノックダウンした後、ROS阻害剤であるNAC (N-acetyl-L-cysteine)を添加し、アポトーシスの変動を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 軟骨におけるVASH1の発現・局在

- ①HCS-2/8において、VASH1の発現レベルは低かった。
- ②ATDC5の軟骨分化誘導培養系において、VASH1はCCN2と同様の発現パターンで分化の進行に伴って上昇した。
- ③HCS-2/8において、VASH1の産生レベルは低かった。
- ④野生型マウスの成長板軟骨組織において、VASH1はCCN2と同様に、肥大軟骨細胞層に局在した。

##### (2) 軟骨細胞におけるCCN2とVASH1の発現制御連関

- ①HCS-2/8において、siRNAを用いてCCN2をノックダウンすると、VASH1の発現が低下した。
- ②HCS-2/8において、VASH1発現ベクターを用いてVASH1を過剰発現させても、CCN2の発現・産生に大きな変動は認められなかった。
- ③HCS-2/8において、CCN2発現ベクターを用いてCCN2を過剰発現させても、VASH1の発現・産生に大きな変動は認められなかった。

##### (3) CCN2とVASH1の発現制御連関が軟骨細胞・内軟骨性骨化に及ぼす影響

- ①HCS-2/8において、VASH1を過剰発現させると、SOD2の発現が上昇した。
- ②HCS-2/8において、CCN2をノックダウンすると、SOD2の発現が低下した。
- ③通常の培養条件下・何も処理していないHCS-2/8においても、高いレベルのROSが検出された(バックグラウンドが高すぎた)ため、HCS-2/8においてVASH1を過剰発現させた際の細胞内ROSレベルの変動は評価できなかった。  
※上記を評価するための工夫として、HCS-2/8の細胞内ROSレベルのベースを低くする培養条件(ただし、これまで明らかにしている三者の発現制御連関が再現できる条件)を見出す必要があると考えたが、本研究期間中に当該条件を検討するには至らなかった(∵さらに下流のアポトーシスを評価する実験を優先した)。  
※HCS-2/8は、細胞内ROSレベルがもともと高い可能性が推測され、軟骨細胞特異的なROS制御機構が存在する可能性も考えられた。
- ④③と同様に、HCS-2/8においてCCN2をノックダウンした際の細胞内ROSレベルの変動は評価できなかった。
- ⑤HCS-2/8において、CCN2をノックダウンすると、アポトーシスが亢進した。
- ⑥HCS-2/8において、CCN2をノックダウンした後、ROS阻害剤であるNACを添加すると、アポトーシスがコントロールsiRNA群と同等のレベルまで抑制された。

以上の成果は、軟骨細胞においてVASH1の発現は、CCN2の制御下にあること、またそのVASH1はSOD2の発現を上流で制御することを示している。そのため、肥大軟骨細胞においてSOD2は、上流のCCN2によるVASH1の発現亢進を介して誘導され、ROSレベルの上昇を抑制し、内軟骨性骨化の最終段階である肥大軟骨細胞の細胞死・アポトーシスを分化終末期まで防いでいる可能性が推測された。

また、以前に研究代表者らのグループは、マウス初代軟骨細胞の分化誘導培養系においてCCN2の発現が分化終末期には低下することを明らかにしている<sup>4)</sup>。そのため、軟骨細胞の分化終末期には下流のVASH1-SOD2の発現も低下し、その結果、細胞内ROSレベルが上昇して、肥大軟骨細胞が細胞死・アポトーシスへと導かれる可能性も推察された。

本研究から得られた成果は、国内外問わず、まったく初めて見出されたものである。内軟骨性骨化の最終段階—軟骨から骨への転化段階の調節メカニズムは、未だにほとんど解明されていないため、本研究の成果は非常に興味深く、インパクトの強いものであった。また、諸説あるが不明な点が多い、肥大軟骨細胞の細胞死の謎を解明する新たな糸口ともなり得ると考えられた。

《引用文献》

- 1) Takigawa M. *Methods Mol Biol*. Springer, New York, 2017, pp. 1-576.
- 2) Sato Y. *J Biochem.* (review), 153 (1): 5-11, 2013.
- 3) Takigawa M, et al. *Cancer Res.* 49 (14): 3996-4002, 1989.
- 4) Kawaki H, (中 9 名), Takigawa M. *J Bone Miner Res.* 23 (11): 1751-1764, 2008.

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Ishikawa T, Nishida T, Ono M, (中 4 名), Murase Y (8 番目), Takigawa M, (中 2 名), Kubota S. Physiological role of urothelial cancer-associated one long noncoding RNA in human skeletogenic cell differentiation. *J Cell Physiol.* 査読有、233 巻、2018、4825-4840、DOI: 10.1002/jcp.26285

[学会発表] (計 7 件)

- ① 村瀬友里香 他、CCN2-VASH1-SOD2 axis による軟骨細胞終末分化における細胞死の制御、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年
- ② 村瀬友里香 他、CCN2-VASH1-SOD2 axis を介した内軟骨性骨化調節機構、第 31 回日本軟骨代謝学会、2018 年
- ③ 村瀬友里香 他、Expression of vasohibin-1 (VASH1) during endochondral ossification and its significance、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年
- ④ 村瀬友里香 他、内軟骨性骨化過程における vasohibin-1 (VASH1) の発現とその意義、第 62 回 (公社) 日本口腔外科学会総会、2017 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

滝川 正春 (TAKIGAWA, Masaharu)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：20112063

佐藤 靖史 (SATO, Yasufumi)  
東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：50178779

久保田 聡 (KUBOTA, Satoshi)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：90221936

青山 絵理子 (AOYAMA, Eriko)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：10432650

鈴木 康弘 (SUZUKI, Yasuhiro)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号：60332277

服部 高子 (HATTORI, Takako)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：00228488

吉田 祥子 (YOSHIDA, Shoko)  
岡山大学・大学病院・医員  
研究者番号：00616047

佐々木 朗 (SASAKI, Akira)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：00170663