

令和元年6月7日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19756

研究課題名(和文)CCN2の新ポテンシャル：ワールブルグ・エフェクター機能の検証

研究課題名(英文)New potential of CCN2: Functional evaluation as a Warburg effector

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨肉腫由来細胞での検討の結果、CCN2遺伝子発現抑制で細胞内ATP量が低下する一方、解糖系の阻害によりCCN2遺伝子発現も低下した。この事実から、同細胞ではCCN2はワールブルグ・エフェクターを超え、正のフィードバックにより解糖系を活性化するワールブルグ・ブースターとして機能することが明らかになった。また解糖系阻害が全CCNファミリー遺伝子の発現に与える影響を解析したところ、CCN3の遺伝子発現が強く誘導された。この現象はミトコンドリアでのATP産生を阻害しても見られず、解糖系の活性に依存する。以上より、CCN2とCCN3は解糖活性を核として緊密な制御下にあることも本研究において解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍の形質に強い影響力を持つCCN2とCCN3が、悪性腫瘍細胞のエネルギー代謝において果たす役割を解明した本研究は、がん細胞の新たな特質を見出し、新たながん治療の方向性を指し示すという意味で学術的にも社会的にも意義深い。

また、CCN2は組織の線維化にも深く関与するが、本研究ではCCN2の抑制がエノラーゼ阻害剤であるフッ化ナトリウムによっても起こることも確認した。これは歯磨剤に高濃度で配合されているフッ素を用いて、口腔粘膜における組織線維化を制御する手段の開発につながるという点で非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：As a result of the investigation with a chondrosarcoma cell line, we found that cellular ATP level was repressed by CCN2 silencing; whereas CCN2 expression was repressed by glycolytic inhibition vice versa. These findings indicate the property of CCN2 as a Warburg booster, which is more than a Warburg effector. Furthermore, through the evaluation of the effects of glycolytic inhibition on the gene expression of all of the CCN family members, we discovered that CCN3 was contrarily induced by glycolytic inhibition. Such CCN3 induction was not observed by the inhibition of aerobic ATP synthesis by mitochondria and thus depends on glycolytic activity in the cells. Collectively, it was clarified in this study that both CCN2 and CCN3 gene expression was under a tight regulation by glycolytic activity, which eventually determines the status of energy metabolism in tumor cells.

研究分野：口腔生化学

キーワード：CCN2 CCN3 解糖系 エネルギー代謝 ワールブルグ効果

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

CCN2 は CCN ファミリーを構成する 6 つのメンバーの代表的分子である。これら分子は細胞外にあって成長因子、細胞表面受容体、細胞外基質分子などさまざまな分子との相互作用の下、微細環境に依存した多様な機能を発揮する。研究代表者は CCN2 の生理的、病的機能について長く研究を続け、そこにはがんにおける CCN2 の役割を探ったものも多く含まれる。CCN2 の発現亢進は種々の悪性腫瘍細胞で見られるが、そこで果たしている役割については結論が得られてはいない。そのような中で研究代表者は CCN2 が低酸素で誘導され腫瘍性血管新生を媒介すること、その中和抗体で乳がん細胞の転移を抑制できることを報告してきた。

しかし本研究の着想に至った直接の契機は、研究代表者らが 2014 年に誌上発表した CCN2 の軟骨代謝における斬新な機能を明らかにした研究成果である(Maeda-Uematsu et al., J Cell Biochem 115:854-865)。過去において、研究代表者らの研究によって CCN2 が軟骨細胞の分化と増殖両方を促進することは明らかにされていた。しかし「どのようにして CCN2 分子は、細胞生物学的に真逆の現象とも言える増殖と分化を同じように促進できるのか」は長い間謎であった。この謎を解くべく研究代表者は「すべての活動にはエネルギーが必要」という着想からメタボローム解析を行い、CCN2 が骨格成長を支える成長板軟骨において必要とされる高レベルの ATP 供給を、解糖系の活性化によりサポートしていることを発見した。血管のない軟骨組織での、解糖系に偏った代謝スタイルを支えている CCN2 分子と、ワールブルグ効果によって通常酸素分圧下でも解糖系を駆使し、巧妙に侵略を続けるがん細胞が産生している CCN2 分子、ここで同分子の 2 つの役割がつながり本研究の着想が生まれた。

### 2. 研究の目的

ワールブルグ効果は口腔がん等のがん細胞にみられる、解糖系の亢進を核として生ずる諸現象を表す、古くて新しい概念である。それは新たながん治療への糸口として期待されているが、その成立メカニズム、および病態上の意義には不明な点が多く、その解明は喫緊の課題である。

近年研究代表者らはメタボロミクスを駆使した研究で、軟骨細胞における解糖系の活性維持と ATP の十分な供給に、細胞外情報統括分子として知られる CCN ファミリータンパク質 2 (CCN2) が必須であることを明らかにし、上記の論文に発表した。

興味深いことにこの CCN2 の産生は低酸素で誘導され、さまざまな種のがん細胞で亢進しており、ワールブルグ効果の主要仲介者の 1 つである可能性が推察される。したがって本研究ではこの仮説、すなわち「CCN2 がワールブルグ・エフェクターであること」を徹底検証することを第一の目的とした。その検証後は、CCN2 が媒介するワールブルグ効果の病態上の意義を明らかにし、CCN2 を標的とした、さまざまながんに奏功する新しい治療法の開発へと道を拓くことを究極の目的として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

ヒト軟骨肉腫由来 HCS-2/8 細胞株、ヒト乳がん由来 MDA-MB231 細胞は 10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium 中で培養し実験に供した。

#### (2) エネルギー代謝経路の遮断

解糖系の酵素レベルでの遮断は、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 阻害剤であるモノヨード酢酸 (MIA) と、enolase 阻害剤であるフッ化ナトリウム (NaF) を培地中に添加することにより行った。また基質レベルでは、グルコース不含培地を用いて解糖基質の供給を絶つことにより解糖系活性の抑制を図った。またミトコンドリアにおける好氣的 ATP 産生の遮断には、培地中にオリゴマイシンを添加して ATP シンターゼを阻害することで行った。

#### (3) 遺伝子発現解析

CCN2, CCN3 などの遺伝子発現の定量評価は、細胞から全 RNA を抽出し、逆転写ののち各 mRNA 特異的増幅用プライマーを用いた定量リアルタイム PCR 法によって行った。内部標準としては  $\beta$ -actin 遺伝子発現量を同様に測定し、データの標準化を行った。

#### (4) タンパク質解析

CCN2, CCN3 のタンパク質量の評価は、通法に従い細胞からタンパク質を抽出し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にてゲル中で分離の後、PVDF 膜上に転写し、特異的一次抗体を用いたウェスタンブロット法にて行った。

#### (5) レポータージーンアッセイ

ヒト CCN3 遺伝子プロモーター部位を含むさまざまな長さのゲノム DNA 断片を、ゲノム DNA から PCR 法によって増幅し、これら DNA 断片を蛍ルシフェラーゼ遺伝子の upstream に配した、各種レポータープラスミドを作成した。そしてそれぞれを培養細胞内に DNA トランスフェクション法により導入した上でエネルギー代謝経路の遮断を行い、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を定量することによって、エネルギー代謝の遮断がプロモーター活性に与える影響を評価した。

## (6) *In silico* 解析

ヒト軟骨細胞の RNA シークエンシングデータ、ヒトがん細胞の転写因子 ChIP シークエンシングデータは ENCODE consortium (<http://www.encodeproject.org>) からダウンロードし、University of California Santa Cruz ゲノムブラウザ (<http://genome.ucsc.edu>)にて解析した。また転写因子結合配列の予測は TFBIND (<http://tfbind.hgc.jp>) にて行った。

## 4. 研究成果

### (1) CCN2 のワールブルグ・エフェクター機能の普遍性の検証

がん細胞代謝において特徴的にみられる現象であるワールブルグ効果において CCN2 分子が果たす役割を、CCN2 を強く発現する 2 つのヒト細胞株を用いて解析した。ひとつは軟骨肉腫由来の HCS-2/8、いま 1 つは乳がん由来 MDA-MB231 細胞である。その結果 HCS-2/8 については CCN2 遺伝子サイレンシングで細胞内 ATP 量に有意な低下がみられたが、MDA-MB-231 では顕著な影響は確認されなかった。続いて解糖系阻害薬であるモノヨード酢酸 (MIA) を両細胞に作用させたところ、こちらは両細胞で共通して CCN2 遺伝子発現の低下をきたした。また HCS-2/8 細胞をグルコース飢餓に曝して CCN2 遺伝子発現を検証したところ、やはり CCN2 遺伝子発現は抑制された。以上の結果は、少なくとも同細胞では CCN2 はワールブルグ効果を含むエネルギー代謝に深く関連する分子であることをさらに強調するものである。その一方で、こういった現象はすべて HCS-2/8 細胞では明確に観察されたものの、MDA-MB231 細胞では部分的にのみ再現されたことから、CCN2 のワールブルグ・エフェクターとしての機能はすべてのがん細胞で利用されているわけではなく、個々のがん細胞の形質に依存して発揮されるものと考えられる。この観点から、軟骨肉腫という悪性度の高い悪性腫瘍でこの CCN2 機能が発揮されていることは興味深い。ただし、CCN2 遺伝子が解糖系活性から正の制御を受けている点は両細胞株に共通してみられたため、エネルギー代謝と CCN2 遺伝子発現に緊密な関連があることは、多くのがんにおいて普遍的な現象である可能性が強まった。

### (2) 軟骨細胞における CCN 遺伝子ファミリーのエネルギー代謝による制御の概要

さらにこれに関連して、解糖系阻害が CCN2 以外の全 CCN ファミリー遺伝子発現に与える影響を解析したところ、新たに非常に興味深い現象を発見するに至った。すなわち解糖系を阻害することによって、CCN ファミリーの別メンバーである CCN3 の遺伝子発現が CCN2 とは逆に強く誘導されたのである。一方その他の CCN ファミリーメンバーについては、各解糖系阻害に一貫した反応を示したものはなかった (表 1) この現象は最初 mRNA レベルで、続いてタンパク質レベルでも実証された。さらにこの CCN3 遺伝子発現誘導は、グルコース飢餓状態でも誘導されることが確認され、またミトコンドリアでの好氣的 ATP 産生を阻害しても起こらないことが明らかになった。

	CCN1	CCN2	CCN3	CCN4	CCN5	CCN6
<b>MIA</b>	→	↓	↑	→	↑	→
<b>NaF</b>	→	↓	↑	→	→	→
<b>GS</b>	N.D.	↓	↑	N.D.	N.D.	N.D.

表 1: 解糖系阻害による全 CCN ファミリーメンバーの発現変動  
GS: グルコース飢餓状態  
N.D.: not determined

つまり CCN3 は解糖系の活性と密接に関連して、その遺伝子発現が制御されていることになる。特筆すべきは、CCN2 を欠損させた軟骨細胞においては、ATP 産生量の低下とともに CCN3 の強い発現誘導が起こっていることである。以上より、CCN2 と CCN3 は解糖活性を核として緊密な制御下にあることが本研究において解明され、研究所年度で早くも国際専門雑誌上にその成果の発表をみた (業績 6)。

### (3) 軟骨肉腫細胞における CCN2 のワールブルグ・ブラスター機能の発見

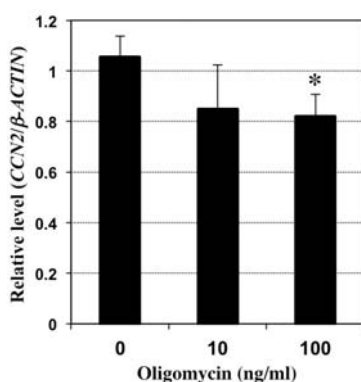


表 1 に示した通り、軟骨肉腫細胞株 HCS-2/8 細胞では、CCN2 が解糖によるエネルギー産生を亢進させるだけでなく、解糖系活性、もしくは細胞内 ATP 量によりその遺伝子発現が正に制御されていることとなる。そこで、このどちらが CCN2 遺伝子発現を制御しているかを確認するため、オリゴマイシンを用いて HCS-2/8 細胞でのミトコンドリアにおける好氣的 ATP 産生を阻害し、CCN2 遺伝子発現変動を検証した。その結果、興味深いことにここでも CCN2 遺伝子発現の有意な低下が見られた (図 1)。

図 1: オリゴマイシン添加がもたらす CCN2 発現への影響  
縦軸はβ-actin で補正後の相対値

したがって同細胞では CCN2 はワールブルグ・エフェクターを超え、正のフィードバックにより解糖系を活性化するワールブルグ・ブースターとして機能することが明らかになった。つまり CCN2 はミトコンドリアにおいて好氣的条件下で産生された ATP と、細胞質において嫌氣的に産生された ATP の総和に反応して解糖系を加速させる (図 2)。この CCN2 の機能は、ワールブルグ効果を発揮する腫瘍細胞では、なぜ好氣的条件下でも解糖系が活性化されるのか? という疑問にも一定の答えを与えるものである。

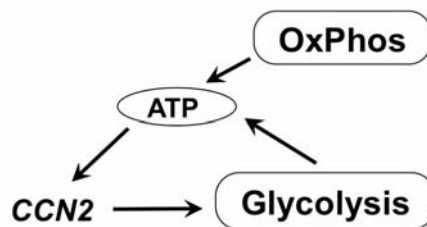


図 2 : CCN2 のワールブルグ・ブースター機能

#### (4) CCN2, CCN3 のエネルギー代謝による発現制御メカニズムの解明

本研究で得られた、当初想定していなかった発見、すなわち解糖系抑制によって CCN2 とは逆に CCN3 発現が誘導されることに着目し、CCN2 と CCN3 のエネルギー代謝による制御メカニズムの解明という新たな研究プロジェクトを開始した。まず、表 1 にも示した通り、この CCN2 の抑制と CCN3 の誘導が歯科領域で広く使用されているエノラーゼ阻害剤、フッ化ナトリウムによっても起こることを確認できた。これは組織線維化に深く関与する CCN2 と CCN3 の発現を、口腔内においては確実に制御する手段を得たという点で、非常に重要な発見と言える。続いてヒト CCN3 遺伝子のプロモーターの各種欠損変異体を組み込んだレポータープラスミドを用いて、解糖系抑制による CCN3 の発現誘導を媒介するエンハンサーを含むゲノム上の領域を同定した。さらに *in silico* で同領域に含まれる転写因子結合配列を予測するとともに、軟骨細胞の RNA シークエンシングデータ、および CCN3 を高発現する細胞株における転写因子 ChIP シークエンシングデータをデータベースからダウンロードして解析し、この現象を媒介する転写因子候補を割り出した。興味深いことに同転写因子の遺伝子発現も解糖系抑制によって誘導されることが、実験的にすでに確認できている。現在この転写因子が、同条件下における CCN2 の発現誘導や CCN2 の発現抑制に関わっているか、遺伝子サイレンシング実験などで検証中である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Fu, S., M. Kuwahara, Y. Uchida, S. Koudo, D. Hayashi, Y. Shimomura, A. Takagaki, T. Nishida, Y. Maruyama, M. Ikegame, A. Hattori, **S. Kubota** and T. Hattori. 2019. Circadian production of melatonin in cartilage modifies rhythmic gene expression. *J Endocrinol.* in press, DOI: 10.1530/JOE-19-0022. 査読有
- ② Kamatsuki, Y., E. Aoyama, T. Furumatsu, S. Miyazawa, A. Maehara, N. Yamanaka, T. Nishida, **S. Kubota**, T. Ozaki and M. Takigawa. 2019. Possible reparative effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on injured meniscus. *J. Cell Commun. Signal.* in press, DOI: 10.1007/s12079-018-0496-9. 査読有
- ③ Ohta, K., E. Aoyama, S.A.I. Ahmad, N. Ito, M.B. Anam, **S. Kubota** and M. Takigawa. 2019. CCN2/CTGF binds the small leucine rich proteoglycan protein Tsukushi. *J. Cell Commun. Signal.* 13:113-118, DOI: 10.1007/s12079-018-0487-x. 査読有
- ④ Khattab H.M., **S. Kubota**, M. Takigawa, T. Kuboki and W. Sebald. 2019. The BMP2 mutant L51P: A BMP receptor IA binding-deficient inhibitor of noggin. *J Bone Miner Metab.* 37:199-205, DOI: 10.1007/s00774-018-0925-0. 査読有
- ⑤ Ishikawa, T., T. Nishida, M. Ono, T. Takarada, H.T. Nguyen, S. Kurihara, T. Furumatsu, Y. Murase, M. Takigawa, T. Oohashi, H. Kamioka and **S. Kubota**. 2018. Physiological role of urothelial cancer-associated one long noncoding RNA in human skeletogenic cell differentiation. *J Cell Physiol.* 233:4825-4840, DOI: 10.1002/jcp.26285. 査読有
- ⑥ Akashi, S., T. Nishida, A. El-Seoudi, M. Takigawa, S. Iida and **S. Kubota**. 2018. Metabolic regulation of the CCN family genes by glycolysis in chondrocytes. *J. Cell Commun. Signal.* 12:245-252, DOI: 10.1007/s12079-017-0420-8. 査読有
- ⑦ Moritani, N.H., E.S. Hara and **S. Kubota**. 2018. New functions of classical compounds against orofacial inflammatory lesions. *Medicines* 5:118, DOI: 10.3390/medicines5040118. 査読有
- ⑧ Hori, A., T. Nishida, S. Takashiba, **S. Kubota** and M. Takigawa. 2017. Regulatory mechanism of CCN2 production by serotonin (5-HT) via 5-HT2A and 5-HT2B receptors in chondrocytes. *PLoS One* 12:e0188014, DOI: 10.1371/journal.pone.0188014. 査読有
- ⑨ Janune, D., T. Abd El Kader, E. Aoyama, T. Nishida, Y. Tabata, **S. Kubota** and M. Takigawa. 2017. Novel role of CCN3 that maintains the differentiated phenotype of articular cartilage. *J. Bone Miner. Metab.* 35:582-597, DOI: 10.1007/s00774-016-0793-4. 査読有
- ⑩ El-Seoudi A., T. Abd El Kader, T. Nishida, T. Eguchi, E. Aoyama, M. Takigawa and **S. Kubota**. 2017. Catabolic effects of FGF-1 on chondrocytes and its possible role in osteoarthritis. *J. Cell Commun. Signal.* 11:255-263, DOI: 10.1007/s12079-017-0384-8. 査読有
- ⑪ Nishida, T., **S. Kubota**, E. Aoyama, N. Yamanaka, K.M. Lyons and M. Takigawa. 2017.

Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) treatment of cultured chondrocytes stimulates production of CCN family protein 2 (CCN2), a protein involved in the regeneration of articular cartilage: Mechanism underlying this stimulation. Osteoarthritis Cartilage 25:759-769, DOI: 10.1016/j.joca.2016.10.003. 査読有

〔学会発表〕（計 5 2 件）

- ① Kamatsuki, Y., et al.: Regenerative repairing effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on meniscus. ORS Annual meeting, 2019, Austin, TX, USA.
- ② El-Seoudi, A., et al. Fibroblast Growth Factor 1 (FGF-1) impinges on Chondrocyte Degradation in OA through Matrix Metalloproteinase 13 (MMP-13) and Connective Tissue Growth Factor (CCN2). ASBMR annual meeting, 2018, Montreal, Canada.
- ③ Kubota, S., et al.: Small compounds that turn on CCN family genes. Ninth International Workshop on the CCN Family of Genes, 2017, Saint-Malo, France,
- ④ Takigawa, M., et al.: CCN proteins as targets for skeletal regulation therapy. Ninth International Workshop on the CCN Family of Genes, 2017, Saint-Malo, France.
- ⑤ El-Seoudi, A., et al.: Catabolic effects of FGF-1 on chondrocytes with reduced CCN2 production and its possible role in osteoarthritis. Ninth International Workshop on the CCN Family of Genes, 2017, Saint-Malo, France.
- ⑥ El-Seoudi, et al. Effects of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF-1) on Chondrocytes through CCN2 Regulation and its Possible Role in Osteoarthritis. ECTS 2017, 2017, Salzburg, Austria.
- ⑦ 西田 崇 他 5 名、培養軟骨細胞の CCN2 産生における低出力性パルス超音波(LIPUS)処置の作用メカニズムの解明、第 9 回日本 CCN ファミリー研究会 (招待講演) 2017、岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

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：大学院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：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：大学院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：高江洲 かずみ

ローマ字氏名：(TAKAESU, Kazumi)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学院医歯薬学総合研究科

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：10457228

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：大学院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：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：大学院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：志茂 剛  
ローマ字氏名：(SHIMO, Tsuyoshi)  
所属研究機関名：北海道医療大学  
部局名：歯学部  
職名：教授  
研究者番号 (8桁)：40362991

※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。