

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K19232
研究課題名（和文）内軟骨性骨化における軟骨細胞死の誘導機構：CCN2によるレドックス制御とその破綻

研究課題名（英文）Novel mechanism leading to the death of hypertrophic chondrocytes in endochondral ossification through the regulation of CCN2 expression

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、CCN2の発現調節を介した内軟骨性骨化における肥大軟骨細胞の新たな細胞死誘導メカニズムを解明することであった。軟骨細胞におけるCCN2の発現は、低濃度の過酸化水素処理では亢進したが、高濃度では低下した。軟骨細胞においてCCN2の発現を抑制するとアポトーシスが誘導されたが、誘導されたアポトーシスはROS阻害剤により抑制された。これらの成果から、軟骨細胞の分化の進行に伴って細胞内ROSレベルが上昇するとともにCCN2の発現も上昇するが、分化終末期には細胞内ROSレベルがさらに上昇して逆にCCN2の発現が低下し、肥大軟骨細胞のROS介在性アポトーシスが誘導され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、内軟骨性骨化の最終段階 肥大軟骨細胞の細胞死誘導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 was to investigate a novel mechanism that leads to the death of hypertrophic chondrocytes in endochondral ossification through the regulation of CCN2 expression. We found that CCN2 expression was up-regulated in low-concentration H2O2-treated chondrocytes but was down-regulated in high-concentration H2O2-treated ones. CCN2-silencing in chondrocytes induced apoptosis, and the induction of apoptosis was suppressed by a ROS inhibitor. These results suggest that CCN2 expression may be up-regulated by intracellular ROS rising during chondrocyte differentiation but finally down-regulated and thereby hypertrophic chondrocytes lead to ROS-mediated apoptosis.

研究分野：外科系歯学

キーワード：CCN2 軟骨 細胞死 ROS 内軟骨性骨化

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。内軟骨性骨化過程において、軟骨細胞は増殖、分化し、成熟して肥大軟骨細胞になり、最終的に細胞死へと導かれる。この肥大軟骨細胞の細胞死については、諸説あるが不明な点が多い。

研究代表者らのグループは、肥大軟骨細胞から多く産生される Cellular communication network factor 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)。一方で、CCN2 が軟骨細胞のアポトーシスを抑制することも報告しているが、そのメカニズムは未解明のままである。

軟骨細胞の分化が進行するとともに細胞内の活性酸素種 reactive oxygen species (ROS) レベルが上昇し、増加した ROS が肥大軟骨細胞のアポトーシスを誘導するとの報告がある。研究代表者は、軟骨細胞において CCN2 が活性酸素分解酵素 superoxide dismutase 2 (SOD2) の発現を正に制御することを見出した。この興味深い知見から、CCN2 が SOD2 の発現制御を介して、軟骨細胞内の ROS レベルを制御する可能性が推測された。一方で研究代表者らのグループは、軟骨細胞の分化終末期には CCN2 の発現が低下することを明らかにしている。そのため、軟骨細胞の分化終末期には CCN2 の発現が低下し、“CCN2 による SOD2 の発現制御を介した細胞内 ROS レベルの制御” が破綻することで、細胞内 ROS レベルが上昇して肥大軟骨細胞のアポトーシスが誘導される可能性も推察された。



図1: 内軟骨性骨化過程におけるCCN2の役割

2. 研究の目的

<大目的>

内軟骨性骨化における肥大軟骨細胞の細胞死誘導メカニズムを解明すること

<小目的>

大目的を達成するため、下記(1), (2)を解明すること

(1) CCN2 による SOD2 の発現制御を介した軟骨細胞内の ROS レベルの制御メカニズム

(2) (1)の破綻がもたらす肥大軟骨細胞の細胞死誘導メカニズム

3. 研究の方法

(1) 内軟骨性骨化過程における CCN2 と SOD2 の発現・局在

- ① 野生型マウスの成長板軟骨組織における CCN2 と SOD2 の局在を免疫組織学的染色法により解析した。
- ② マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 の軟骨分化誘導培養系における CCN2 と SOD2 の発現を real-time RT PCR 法により解析した。

(2) 軟骨細胞における酸化ストレスが CCN2 の発現に及ぼす影響

- ① ヒト軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 に 0.1, 0.5 mM 過酸化水素を添加して 1 時間培養し、培地交換後 12, 24 時間で CCN2 の発現を real-time RT PCR 法により解析した。
- ② ラット軟骨細胞様細胞株 RCS に 0.1, 0.4 mM 過酸化水素を添加して 2 時間培養し、培地交換後 24 時間で CCN2 の発現を real-time RT PCR 法により解析した。

(3) 軟骨細胞における CCN2 の発現低下が ROS 介在性アポトーシスに及ぼす影響

- ① HCS-2/8 において、siRNA を用いて 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染色し、FACS 法により解析した。
- ② HCS-2/8 において、CCN2 をノックダウンした後、ROS 阻害剤 N-acetyl-L-cysteine (NAC) を添加し、①と同様の手法により解析した。

4. 研究成果

(1) 内軟骨性骨化過程における CCN2 と SOD2 の発現・局在

- ① 野生型マウスの成長板軟骨組織において、SOD2 は CCN2 と同様に肥大軟骨細胞層に局在した。
- ② ATDC5 の軟骨分化誘導培養系において、CCN2 の発現は分化の進行に伴って上昇したが、SOD2 の発現に大きな変動は認められなかった。

(2) 軟骨細胞における酸化ストレスが CCN2 の発現に及ぼす影響

- ① HCS-2/8 に 0.1 mM 過酸化水素を添加した場合、CCN2 の発現は培地交換後 12 時間で亢進し、24 時間で低下した。0.5 mM 過酸化水素添加群では、培地交換後の時間依存的に CCN2 の発現は低下した。
- ② RCS における CCN2 の発現は、0.1 mM 過酸化水素添加群では亢進し、0.4 mM 過酸化水素添加群では低下した。

(3) 軟骨細胞における CCN2 の発現低下が ROS 介在性アポトーシスに及ぼす影響

- ① HCS-2/8 において、CCN2 をノックダウンすると、Annexin V 陽性/ヨウ化プロピジウム陰性細胞が増加（アポトーシスが亢進）した。
- ② HCS-2/8 において、CCN2 をノックダウンした後、ROS 阻害剤 NAC を添加すると、コントロール siRNA 導入/NAC 非添加群と同等のレベルまでアポトーシスが抑制された。

以上の成果から、軟骨細胞の分化の進行に伴って細胞内 ROS レベルが上昇するとともに CCN2 の発現も上昇するが、分化終末期には細胞内 ROS レベルがさらに上昇して逆に CCN2 の発現が低下し、肥大軟骨細胞の ROS 介在性アポトーシスが誘導される可能性が推測された。

本研究から得られた成果は、国内外で初めて、研究代表者が独自に見出したものである。内軟骨性骨化の最終段階—肥大軟骨細胞の細胞死については、諸説あるが不明な点が多いため、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る。また、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解明する新たな糸口ともなり得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村瀬友里香, 青山絵理子, 鈴木康弘, 佐々木 朗, 久保田 聡, 佐藤靖史, 滝川正春
2. 発表標題 軟骨細胞の分化過程におけるCCN2の発現変動の意義
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	滝川 正春 (TAKIGAWA Masaharu)		
研究協力者	佐藤 靖史 (SATO Yasufumi)		
研究協力者	久保田 聡 (KUBOTA Satoshi)		
研究協力者	佐々木 朗 (SASAKI Akira)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	青山 絵理子 (AOYAMA Eriko)		
研究協力者	鈴木 康弘 (SUZUKI Yasuhiro)		
研究協力者	服部 高子 (HATTORI Takako)		
研究協力者	桑原 美穂 (KUWAHARA Miho)		
研究協力者	吉田 祥子 (YOSHIDA Shoko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関