

機関番号：12501  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591078  
 研究課題名 (和文) 新しい平滑筋細胞増殖抑制因子 CCN3 の機能解明と血管病治療への応用  
 研究課題名 (英文) Functional analysis of CCN3, a novel growth inhibitor for vascular smooth muscle cells, and its application in the treatment of vascular diseases.

研究代表者  
 横手 幸太郎 (YOKOTE KOUTARO)  
 千葉大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号：20312944

## 研究成果の概要 (和文)：

CCN3/NOV は CCN ファミリーに属するタンパクである。培養血管平滑筋細胞(SMC)を用いた検討から、CCN3 は TGF- $\beta$  非依存性に Notch 経路を介して SMC の増殖抑制作用を有すること、並びに SMC 遊走抑制作用も有することを明らかにした。CCN3 ノックアウトマウスを作成し、内皮障害後の内膜肥厚を観察した所、野生型に比してノックアウトマウスで約 6 倍の増強を示した。CCN3 は SMC 増殖、遊走抑制作用を通じて内膜肥厚を抑制すると考えられた。

## 研究成果の概要 (英文)：

CCN3 belongs to CCN family, which constitutes multifunctional secreted proteins that act as extracellular matrix regulators. CCN3 suppressed the rat smooth muscle cells (VSMC) migration as well as proliferation induced by fetal bovine serum. CCN3 knockout mice were created and the neointimal hyperplasia induced by photochemically-induced thrombosis, were investigated. Histopathological evaluation of the arteries 21 days after the endothelial injury revealed a 6-fold enhancement of neointimal thickening in the null mice compared with the wild-type. Our findings indicate the involvement of CCN3 in vascular homeostasis, especially upon injury, and the potential usefulness of this molecule in the modulation of atherosclerotic vascular disease.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：CCN, 動脈硬化、平滑筋細胞、増殖、遊走、糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病に合併する動脈硬化など血管障害の成因とその根本的治療法は未だ開発さ

れていない。本研究は CCN3/NOV という分子に着目して動脈硬化症発症メカニズムの解

明を目指した。CCN3 は、Cyr61/CCN1、CTGF/CCN2、Wnt-1-induced secreted protein-1,2,3 (CCN4,5,6) とともに CCN ファミリーを形成する分泌型蛋白である。神経芽細胞腫に高発現することから、Neuroblastoma-Overexpressed (NOV) とも呼ばれている。CCN 分子は、細胞増殖、遊走、接着、そして分化に重要な役割を担うことが示唆されているが CCN3 の動脈硬化巣形成に関する役割は未解明である。これまで申請者は、主に細胞の増殖制御の観点から、血管障害の病態解明に取り組んできた。特に SMC に対する強力な増殖因子である PDGF のシグナル伝達機構の解明に従事し、近年では代表的な増殖抑制因子である TGF- $\beta$  の主要シグナル分子である Smad3 のノックアウト (KO) マウスを用い、内因性の TGF- $\beta$ /Smad3 経路が内皮傷害後の内膜肥厚病変および高脂血症による粥状動脈硬化病変の抑制に働くことを示した。この過程において、血管壁には TGF- $\beta$  以外の増殖抑制因子が存在し、病変の形成に寄与することを予測し、その候補として CCN3 に遭遇した次第である。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、血管平滑筋細胞 (以下 SMC) に対する新規の増殖抑制因子 CCN3/NOV の生物学的機能を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) KO マウスを用い、内皮傷害時の内膜肥厚 (SMC 増殖・遊走反応) における CCN3 の作用を検討する。

2) 培養 SMC に対する CCN3 の増殖抑制効果を担う細胞内シグナルを、特に TGF- $\beta$  シグナルとの対比から、明らかにする。

3) 培養 SMC の遊走・炎症性遺伝子発現に対する CCN3 の役割を明らかにする。

4) 血管壁における CCN3 の発現を制御する因子とその性質について明らかにする。

5) CCN3 に対する特異抗体を作成し、ELISA を確立、ヒト (健常者および冠動脈疾患・脳梗塞などの血管病患者) 血液中の CCN3 濃度と血管病との関連を明らかにする。

## 4. 研究成果

最初に CCN3 のマウス大動脈血管壁における発現を免疫組織染色法で検討したところ、CCN3 タンパクは血管内皮細胞には発現せず、血管壁中膜平滑筋細胞に発現していることを明らかにした (図 1)。

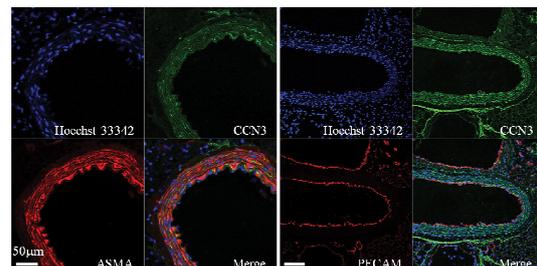


図 1 マウス大動脈血管壁における CCN3 の発現様式 Hoechst 33342: 核 ASMA: alpha smooth muscle actin: 中膜平滑筋細胞 PECAM: platelet endothelial cell adhesion molecule: 内皮細胞

続いて、CCN3 の SMC に対する生物学的作用に関して検討を開始した。先に述べたように、動脈硬化病変の形成には SMC の増殖、遊走が重要なことや、既に CCN3 が他の細胞種において増殖抑制作用が報告されていることより、CCN3 の SMC 増殖抑制作用に関して検討を開始した。その結果、CCN3 リコンビナントタンパク (rCCN3) を SMC に添加し培養することにより、有意に細胞数の増加を減少させることや、BrdU の取り込みを指標に細胞増殖能を検討した所、rCCN3 添加によって濃度依存性に最大約 40%、血清添加や血小板由来増殖因子 (PDGF) 添加による BrdU の取り込みを抑制することを明らかにした (図 2)。

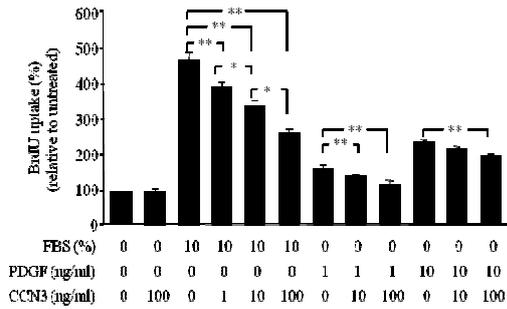


図2 CCN3のSMC細胞増殖に与える影響

この時に用いた rCCN3 濃度は 10~100ng/ml であり、これまでに報告にある ELISA 法で測定されたヒト血中 CCN3 濃度の測定範囲内であることより、CCN3 が生理学的な濃度の範囲で SMC の細胞増殖抑制作用を有することが明らかとなった。さらに筆者らは血清添加による SMC 遊走能に CCN3 が与える影響をボイデンチャンパー法で検討したところ、rCCN3 は血清添加による SMC 遊走を濃度依存性に最大約 70%抑制することも明らかにした。

#### CCN3 の SMC 細胞増殖抑制機序に関して

続いて、著者らは CCN3 の SMC 増殖抑制作用機序に関して検討を開始した。細胞増殖抑制作用を持つ物質として Transforming growth factor beta (TGF-β)があり、TGF-βは最終的に p21 に代表される Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) を活性化することで細胞周期が抑制され、細胞増殖を抑制することが知られている。そこで CCN3 の CDKI mRNA 発現に対する影響を RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、rCCN3 は TGF-β同様に添加 12 時間において CDKI である p21、p15 の発現を増加させた。しかしながら、時間経過を追った所、CCN3 は添加後 12 時間で p21 mRNA 発現増加のピークをむかえるのに対して、TGF-β添加では 24 時間以降に p21 mRNA 発現増加のピークをむかえることより、CCN3 が TGF-βとは別のシグナル経路を介して SMC 細胞増殖抑制作用を発揮することが示唆され

た。そこで CCN3 が TGF-β非依存性に SMC 細胞増殖抑制作用を有するか否かを検討する目的で TGF-β中和抗体を用いた実験を行った。その結果、1ng/ml の TGF-βは 100ng/ml の rCCN3 とほぼ同等の SMC 増殖抑制作用を持つが、その効果は TGF-β中和抗体添加により完全に解除された一方で、rCCN3 の増殖抑制作用は TGF-β中和抗体添加によって解除されなかった (図 3)。さらに、rCCN3 添加によって SMC における TGF-βの細胞内シグナル分子である Smad2 のリン酸化は促進されず、TGF-βの mRNA 発現や転写調節部位に TGF-β反応領域を持つ plasminogen activator inhibitor 1 の転写活性を上昇させないことから CCN3 の増殖抑制作用への TGF-βの関与は否定的であった。

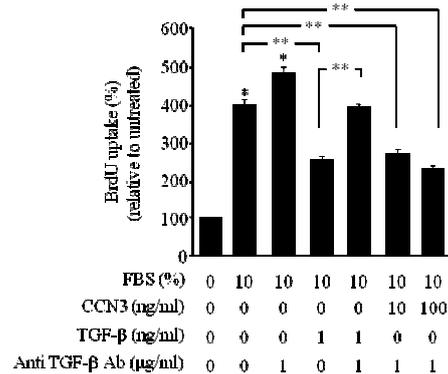


図3 CCN3のSMC増殖抑制作用に対するTGF-βの関与に関する検討

#### CCN3 と Notch 経路

近年、Katsuki ら [1]によって、CCN3 がその CT ドメインを介して Notch 受容体と結合し、その細胞内経路を介して p21 の発現上昇をもたらして細胞周期を抑制することが報告された。彼らの実験は軟骨細胞である Kusa-1 を用いた検討であった為、著者らは SMC においても同様の結果が観察されるか否かを検討した。Notch 経路は Jagged1 等のリガンドが Notch1 受容体に結合すると γ-secretase の働きにより Notch1 の細胞内ドメインである

Intracellular domain of Notch1 (ICN1) が形質膜より切り離され、ICN1 が核内移行シエフェクターと結合し、目的遺伝子を活性化することが知られている。そこで著者らは、rCCN3 添加による ICN1 の発現を免疫組織染色法で観察した。その結果、SMC において CCN3 添加後 30 分で ICN1 の発現増加を認めた。しかしながら、TGF- $\beta$  添加後 30 分では、ほんの僅かな ICN1 の発現を認めただけであった。さらに Notch シグナルをブロックするために  $\gamma$ -secretase inhibitor を加えることにより rCCN3 添加による p21 mRNA 発現上昇が部分的に抑制されることも明らかにした。これらの検討により、少なくとも CCN3 添加後比較的早期の細胞増殖抑制作用の機序の一部に TGF- $\beta$  経路とは独立して Notch 経路が関与している可能性が示唆された。

#### CCN3 ノックアウトマウスを用いた検討

これまでの *in vitro* の検討によって CCN3 が SMC 増殖、遊走抑制作用を持つことが示されたが、*in vivo* における CCN3 の作用はどうか。この疑問を解決する目的で我々は CCN3 ノックアウトマウス (CCN3 KO マウス) を作成した。このマウスは CCN3 タンパクをコードする 5 個のエクソンのうち、エクソン 2 からエクソン 5 まで欠損したマウスであり、完璧に CCN3 遺伝子を欠損したマウスである。*in vitro* においては細胞増殖抑制作用を有するにも関わらず、驚いたことに CCN3 KO マウスは発生過程に異常を認めず、血圧や大動脈血管壁の形態も野生型と比較して明らかな差異を示さなかった。そこで、内膜肥厚病変形成における CCN3 の役割を検討するために 10 週齢の CCN3 KO マウスおよび野生型マウス大腿動脈に Photochemically Induced Thrombosis (PIT)法を行い、血栓形成による内皮傷害を加え、3 週間後に局所の病理組織

学的な解析を行った (図 4)。その結果、CCN3 KO マウスにおいては野生型に比べ約 6 倍の血管壁内膜肥厚病変の増大を認めた (図 5)。

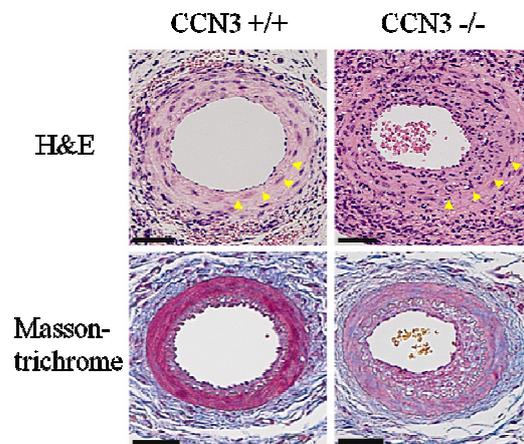


図 4 野生型 (CCN3 +/+) 並びに CCN3 ノックアウトマウス (CCN3 -/-) 大腿動脈における PIT 法による内膜肥厚度の比較

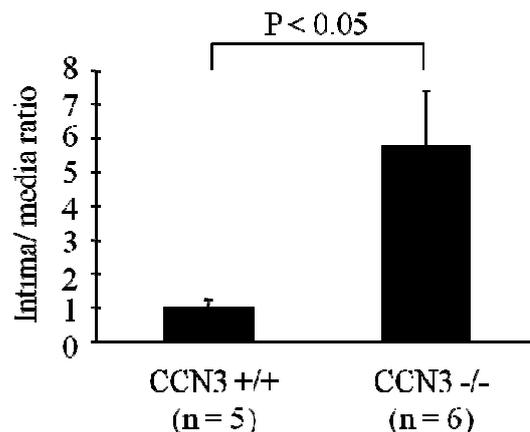


図 5

#### 糖尿病惹起マウス血管壁における CCN3 の発現

糖尿病患者では健常者に比べて動脈硬化性病変や、冠動脈疾患に対する PCI 後の再狭窄率が高いことが知られている。そこで我々はストレプトゾトシン惹起糖尿病マウスの大動脈における CCN3 タンパクの発現を免疫組織染色法を用いて野生型と比較した。その結果、糖尿病惹起マウスの大動脈壁においては CCN3 蛋白の発現が野生型に比し有意に減弱

していた。この結果は抗動脈硬化作用を有する CCN3 が糖尿病血管壁において発現低下することにより糖尿病状態の易血管障害性を来たしうる可能性を示唆するものであり、今後臨床検体においても糖尿病状態血管壁において CCN3 が発現低下しているのか否かの検討や、もし低下しているのであれば、その機序を探る事は糖尿病性大血管障害の発症機序の理解にも繋がる事が期待される。

おわりに

今回の我々の検討によって CCN3 が SMC の増殖や遊走を阻害することにより動脈硬化抑制的に働くことが示唆された。CCN3 は血管の恒常性維持作用、特に傷害時の血管保護作用を持つと考えられる。今後はさらに CCN3 の生物学的作用やその発現機構を解析することにより動脈硬化症の発症機序の理解や新しい治療法の開発に繋がる可能性が示唆される。

参考文献

[1] Y. Katsuki, K. Sakamoto, T. Minamizato, H. Makino, A. Umezawa, M.A. Ikeda, B. Perbal, T. Amagasa, A. Yamaguchi, and K. Katsube, Inhibitory effect of CT domain of CCN3/NOV on proliferation and differentiation of osteogenic mesenchymal stem cells, *Kusa-Al. Biochem Biophys Res Commun* 368 (2008) 808-14.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- ① Ohnishi, S., Fujimoto, M., Oide, T., Nakatani, Y., Tsurutani, Y., Koshizaka, M., Mezawa, M., Ishikawa, T., Takemoto, M., and Yokote, K. (2010) Primary lung cancer associated with Werner syndrome. *Geriatr Gerontol Int.* 査読有、10(4)319-323.
- ② Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. (2010) Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible

regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 査読有、107:7461-7466.

③ Iose S, Misawa S, Sakurai K, Kanai K, Shibuya K, Sekiguchi Y, Nasu S, Noto Y, Fujimaki Y, Yokote K, Kuwabara S. (2010) Mexiletine suppresses nodal persistent sodium currents in sensory axons of patients with neuropathic pain. *Clin Neurophysiol.* 査読有、121:719-724.

④ Ogiwara Y, Mori S, Iwama M, Sawabe M, Takemoto M, Kanazawa N, Furuta K, Fukuda I, Kondo Y, Kimbara Y, Tamura Y, Chiba Y, Araki A, Yokote K, Maruyama N, Ito H. (2010) Hypoglycemia due to ectopic secretion of insulin-like growth factor-I in a patient with an isolated sarcoidosis of the spleen. *Endocr J.* 査読有、57:325-330.

⑤ Kimura K, Shimano H, Yokote K, Urashima M, Teramoto T. (2010) Effects of Pitavastatin (LIVALO Tablet) on the Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) in Hypercholesterolemic Patients with Chronic Kidney Disease. *J Atheroscler Thromb.* 査読有、17:601-6

⑥ Shimoyama, T., Hiraoka, S., Takemoto, M., Koshizaka, M., Tokuyama, H., Tokuyama, T., Watanabe, A., Fujimoto, M., Kawamura, H., Sato, S., Tsurutani, Y., Saito, Y., Perbal, B., Koseki, H., Yokote, K. (2010) CCN3 Inhibits Neointimal Hyperplasia Through Modulation of Smooth Muscle Cell Growth and Migration. *Arterioscler Thromb Vasc.* 査読有、Biol.30:675-682

[学会発表] (計13件)

- ① 横手幸太郎 (2010) 新たな抗肥満薬とその展望。第31回日本肥満学会、10月2日、群馬。
- ② 横手幸太郎 (2010) 動脈硬化予防の現状と展望。第31回日本肥満学会、10月1日、群馬。
- ③ 横手幸太郎 (2010) 新しい診断基準における合併症の考え方。第31回日本肥満学会、10月1日、群馬。
- ④ 横手幸太郎 (2010) 日本におけるスタチン治療のエビデンス。第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、7月16日、岐阜。
- ⑤ Yokote, K. (2010) Trends in guidelines overseas. Special symposium: Update for JAS guideline on management of Atherosclerosis. The 42nd Annual scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society. July 15, 2010, Gifu
- ⑥ 石川崇弘、竹本稔、藤本昌紀、葛谷雅文、森聖二郎、横手幸太郎 ウェルナー症候群の病態把握、診療指針作成と新規治療法の開発を目的とした全国研究 第52回日本老年病医学会学術集会 2010年6月25日、神戸。
- ⑦ 横手幸太郎 (2010) 高脂血症。第52回日本老年医学会学術集会、6月24日、神戸。
- ⑧ 横手幸太郎 (2010) (質異常から見たCKDへのアプローチ。第53回日本腎臓学会学術総会ランチョンセミナー6、6月16日、神戸。
- ⑨ 横手幸太郎 (2010) 早老症から学ぶ血管のアンチエイジング。第10回日本抗加齢医学会総会、6月13日、京都。
- ⑩ 田守義和、高橋哲也、中島進介、西本祐希、大野恭太、竹本稔、横手幸太郎、喜多哲也 WRN 遺伝子に複合型ヘテロ接合体変異を同定したウェルナー症候群の一例 第191回日本内科学会近畿地方会 2010年6月12日、京都。
- ⑪ 横手幸太郎 (2010) 我が国における脂質関連大規模臨床試験。第53回日本糖尿病学会年次学術集会、5月28日、岡山。
- ⑫ 横手幸太郎 (2010) 糖尿病・IGTにおけるスタチンの役割：臨床的立場から。第53回日本糖尿病学会年次学術集会、ランチョンセミナー25、5月28日、岡山。
- ⑬ Fujimoto, M., Yokote, K. (2010) Twist-1: A new negative-feedback regulator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1. The 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010). March 29, Kyoto.

[図書] (計1件)

1. 横手幸太郎 (2010) Werner 症候群、今日の診断指針、6, 1219-1221. 医学書院

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横手 幸太郎 (YOKOTE KOUTARO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：20312944

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし