

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791427  
 研究課題名（和文）二次骨化中心形成過程における組織再生因子CCN2の発現様式と細胞外環境の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of gene expression pattern and extracellular environment of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) during secondary ossification center formation  
 研究代表者  
 岡 森彦 (OKA MORIHIKO)  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：90335612

研究成果の概要（和文）：組織再生因子 CCN2 は、二次骨化中心形成において骨端部の血管新生誘導因子としての重要な役割を担い、その後の骨化に MMP-9 とともに関与することが強く示唆された。また、二次骨化中心形成過程に発現する CCN2 は、骨端中央部のパールカン陽性の肥大化傾向を示す軟骨細胞に集積する傾向を示した。多様な細胞から産生された CCN2 がこれらの細胞へ蓄積することは、パールカンの CCN2 シグナル伝達における役割にのみならず、その選択的捕捉機能をも示唆している。

研究成果の概要(英文):CCN2/connective tissue growth factor (CCN2) is a critical signaling modulator of mesenchymal tissue development. This study investigated the localization and expression of CCN2 as a factor supporting angiogenesis and chondrogenesis during development of secondary ossification centers in the mouse tibial epiphysis. Immunostaining showed that CCN2 was distributed broadly around the expressed cells located in the central region of the epiphysis, where the chondrocytes become hypertrophic and the cartilage canal enters into the hypertrophic mass. Furthermore, an overlapping distribution of metalloproteinase (MMP)9 and Heparan sulfate proteoglycan(Perlecan) and CCN2 was found in the secondary ossification center. These findings suggest that the CCN2 is involved in establishing epiphyseal vascularization and remodeling, which eventually determines the secondary ossification center in the developing epiphyseal cartilage

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：CCN2、二次骨化中心、内軟骨性骨化、組織再生因子、細胞外環境

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えて、益々増加する骨・軟骨疾患の治療に対して、再生医療は今もっとも注目されている先端医療技術です。申請者は、組織再生因子として再生医療への応用が期待される CCN2 遺伝子の骨・軟骨組織での機能を調べてきた。CCN2 は、軟骨から骨のできる過程(内軟骨性骨化)において、骨化直前の肥大軟骨細胞で最も盛んに再生され、周囲の軟骨細胞、骨芽細胞ならびに血管内皮細胞に働いて、内軟骨性骨形成全体を促進することができる成長因子である。さらに CCN2 は、組織の修復や再生の初期に必須な細胞の接着ならびに遊走も促進し、細胞外マトリックスや他の成長因子にも結合しその作用を修飾するなど多様な作用を併せ持つことがわかっている。このような多機能性は、単体作用だけでなく、種々の分子と結合する特徴的なモジュール構造に由来すると考えられている。つまり遺伝子発現部位やタンパク局在部位に共局在する他分子との結合によって多様な生理作用を示すと考える。そこで、申請者は、CCN2 の内軟骨性骨化における発現細胞や局在部位を調べ、その生理作用と他因子との関連性を調べることを目的として、二次骨化中心形成過程についてその遺伝子発現と局在分布を調べたところ、この過程において CCN2 は、血管新生を誘導し、その後の軟骨分化、骨化形成過程において中心的な働きをすることを初めて発見した (Oka et al. : Gene expression and distribution of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) during secondary ossification center

formation. J. Histochem. Cytochem, 2007)。また、発現部位と局在は時間的・空間的にも異なっており、CCN2 の作用は、発現細胞の種類 (内皮細胞、軟骨細胞) とさらにその細胞外周囲組織にも依存していることが示唆された。特に細胞外マトリックスの構成因子の 1 つであるパールカン陽性軟骨細胞への特異的集積が認められることは興味深い点であった (岡ら : 二次骨化中心形成過程に発現する結合組織成長因子 CTGF/CCN2 のパールカン陽性軟骨細胞への特異的集積, 日本骨代謝学会雑誌, プログラム抄録集, 229, 2005)。

細胞はその外部に細胞外マトリックスを分泌し、ここにシグナル分子やプロテアーゼを配備することによって細胞外環境を形成する。実際に軟骨組織や皮下の結合組織には多量の細胞外マトリックスが存在している。そして細胞外環境は発生や再生の過程でダイナミックにその構造と機能を変えながら形態形成を制御すると考えられる。しかしながら細胞外環境がどのように形成され、どのように改変され、どのように細胞や組織に働きかけるのかは、ほとんど未解決の領域である。したがって、パールカン陽性軟骨細胞に特異的に集積した組織成長因子 CCN2 がどのように存在し標的細胞に提示されるかを検討することは、生理作用を解明する上で大変重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、再生医療への応用が期待できる組織再生因子 CCN2 の内軟骨性骨化における多様な生理作用と細胞外環境因子との関連を解明するために、

(1) マウス脛骨における二次骨化中心形成(骨端軟骨への血管組織の進入から骨端部の骨化にいたる過程)において、その遺伝子発現とタンパクの局在をin situ hybridization法と免疫染色法によって経時的に組織学的検討を行い、二次骨化中心形成過程におけるCCN2の生理作用について検討する。

(2) 同時にCCN2 が特異的に集積するパールカン陽性細胞の細胞外環境について細胞外マトリックス(パールカン)と細胞外プロテアーゼの局在について免疫染色法を用いて経時的に組織学的検討を加える。

(3) 上記の結果をあわせることにより、二次骨化中心過程におけるCCN2の作用機構について細胞外環境因子を含めた精密な解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 組織標本の作製; 実験動物にはマウスを用い、二次骨化中心形成過程(生後1, 3, 7, 14, 28日)における膝関節組織をペントバルビタール腹腔内麻酔下で摘出する。各群5匹(計25匹)とする。4%パラホルムアルデヒドにより16時間固定後、EDTA (pH7.4)による脱灰を行い通常に従いパラフィン包埋を行い、厚さ7 $\mu$ mの連続切片を作製する。動物の取り扱いは、岡山大学動物実験指針に従う。

(2) 免疫染色;

①CCN2の局在: 抗CCN2抗体としては、CCN2合成ペプチド(240-259)でウサギを免疫することにより作製した抗血清を使用する(作製済み)。抗ウサギHRP標識二次抗体(Dako社)を用いたのち、DABを用いて発色させる。

②細胞外環境因子(細胞外マトリックス、マトリックスメタロプロテアーゼ)の局在:

a) 軟骨組織の細胞外マトリックスの主要成分であるII型、IV型、X型コラーゲンとプロテオグリカン(パールカン)ならびにb) マト

リックスメタロプロテアーゼ

(MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP13)についても同様に免疫染色をおこなう。(市販の抗体使用)

(3) *in situ* hybridization;

① CCN2 Riboprobeの作成: マウス肋軟骨から抽出した全長マウスcDNA(1047bp)をpGEM-3zf plasmid (Promega社)にサブクローニングした後、DIG-RNA labeling kit (Roche社)を用いて作成する。得られたRiboprobeは、加水分解により150bpの長さとし、DIG Quantification Teststrips (Roche社)により検定を行い最終濃度1 $\mu$ g/mlで使用する。

② 標本の前処置: 切片の脱パラフィンを行った後、プロテアーゼ処理(10 $\mu$ g/ml 15分)、塩酸処理(0.2M 10分)、アセチル化処理(0.25%無水酢酸 10分)を行う。

③ ハイブリダイゼーション: Riboprobeを含むハイブリダイゼーション溶液を1切片に対し50 $\mu$ l滴下し、50 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートする。

④ 洗浄処置: RNase処理の後、SSCを用いて洗浄する

⑤ 免疫学的検出: 抗DIG抗体(Roche社)を用いた後、levamisole添加した発色基質(NBT+BCIP)と反応させる。

(4) 光顕的観察およびデジタル記録; 観察期間毎に、HE染色、免疫染色およびin situ hybridizationを行った連続切片を、コンピューターとつながれたデジタル顕微鏡(申請品: NIKON COOLSCOPE)にて光顕的観察および撮影を行う。

(5) 遺伝子発現部位とタンパク局在の三次元構築; 得られたデジタル画像から二次骨化中心形成過程においてCCN2遺伝子発現とタンパク局在の分布の三次元構築像を作成する。各週齢において20 $\mu$ m毎(マイクロームに計測機能あり)の連続切片のデジタルデータから

三次元像を構築する。同様に細胞環境因子についても同様にデジタル画像から三次元構築する。

(6) 二次骨化中心形成におけるCCN2遺伝子の発現分布と組織変化との関連性について；二次骨化中心過程におけるCCN2遺伝子発現部位とタンパク局在の3次元構築像を作成することにより、関節組織単位でのCCN2の時間的および空間的な分布と作用方向について関節組織の生化学的特性を含めて精密な検討を加える。最後に、二次骨化中心過程における組織変化を与えるCCN2の作用機構について考察する。

(7) 二次骨化中心形成におけるCCN2の特異的集積部位と細胞外環境因子との関連性について；CCN2は、パールカン陽性細胞に集積する傾向があるが、一度細胞外に貯蓄されたタンパクが細胞外マトリックスの構造変化に合わせてどのように細胞にシグナルを与えるかを調べるために、二次骨化中心過程における細胞外マトリックスと細胞外プロテアーゼの局在の3次元構築像を作成することにより、CCN2の関節組織単位でのCCN2の時間的および空間的な分布と作用方向における細胞外環境の役割について精密な検討を加える。

#### 4. 研究成果

二次骨化中心の形成は、生後7日後、骨端部の血管侵入により開始し、骨端部中心あたりの軟骨細胞は肥大化を認め、14日後には、同部位に骨化中心が認められた。CCN2 のmRNAの発現は7日後では、骨端部において軟骨膜から派生する軟骨管組織に一致してみられ、14日後では骨化中心周囲の血管内皮細胞ならびにCol1Xの発現を認めない未熟な軟骨細胞に発現を認めた。CCN2のタンパクは7日後では、骨端部中心付近の軟骨細胞に、また14日後以降は骨化中心周囲のいずれも肥大化傾向の軟

骨細胞に局在した。興味深いことにこのような軟骨細胞には、パールカンの共局在がみられた。さらに二次骨化中心周囲では、CCN2とMMP9との共局在が観察された。

組織再生因子CCN2は、二次骨化中心形成において骨端部の血管新生誘導因子としての重要な役割を担い、その後の骨化にMMP-9とともに関与することが強く示唆された。また、二次骨化中心形成過程に発現するCCN2は、骨端中央部のパールカン陽性の肥大化傾向を示す軟骨細胞に集積する傾向を示した。多様な細胞から産生されたCCN2がこれらの細胞へ蓄積することは、パールカンのCCN2シグナル伝達における役割にのみならず、その選択的捕捉機能をも示唆している。

高齢化に伴い、歯科補綴学分野ではインプラントや審美歯科のような高度のQOLを求める医療が求められている。しかし、インプラント治療を希望する多くの患者の顎骨は加齢による吸収が著しくインプラント治療に足る骨質・骨量が得られずに、修復することが困難である場合が多い。こうした課題に対し、歯周組織や顎骨に対する再生医療あるいは、新しい顎骨の保存療法を開発し対応する必要がある。

ティッシュエンジニアリングの概念では、生きた細胞、細胞の足場、成長因子といった3つの主要要素を用いて組織再生を図るもので、最終的には細胞による理想的な再生を目指すものであると定義されている。成長因子に関しては、歯科領域では今までPRPやエムドゲインのような成長因子が使われてきたが効果についての評価はわかれており、より確実な作用と安全で副作用のないものが切望されている。本研究のターゲットであるCCN2は、細胞増殖あるいは細胞分化だけの組織再生の一面だけを促進するのではなく、細胞の遊走、接着をはじめ増殖から分化までの組織再生に

幅広く関与する特殊な因子である。また、骨折や抜歯創の治癒過程や、発生過程においては骨芽細胞、血管内皮細胞、歯などにも遺伝子発現することが報告されており、骨の再生や維持、歯の再生等色々な組織の再生因子であることがわかってきている。本研究によって、CCN2が作用する細胞外環境についての有用な情報が得ることができた。パールカンのCCN2のシグナル伝達ならびに選択的捕捉機能について、今後は、*in vitro* の実験系で検討を加えていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ①岡 森彦：二次骨化中心形成過程に発生するオートファジー関連タンパクの局在。  
[第 51 回歯科基礎医学会学術大会] (2009 年 10 月 09-11 日, 新潟)
- ②岡 森彦：二次骨化中心形成過程の軟骨分化段階に発生するオートファジー関連タンパクの局在[第 26 回日本骨代謝学会学術集会] (2008 年 10 月 29-31 日, 大阪)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡 森彦 (OKA MORIHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90335612