

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18601

研究課題名（和文）CCN3を介した新たな軟骨細胞老化制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of chondrocyte senescence mediated by CCN3

研究代表者

桑原 実穂（Kawahara, Miho）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：30868287

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）：本研究ではヒト初代関節軟骨細胞において年齢とCCN3遺伝子発現レベルに正の相関関係を認めたこと、老化誘導によりCCN3発現亢進を認めたことから、加齢によるCCN3発現促進が示唆された。さらに、軟骨特異的CCN3過剰発現マウスの関節軟骨に変性所見を認め、細胞老化関連分泌形質（SASP）因子の産生亢進が確認された。またプロモータージーンアッセイによる解析から、CCN3はp53の誘導を介しp21の活性を上昇させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果は、加齢に伴いCCN3発現が誘導されるだけでなく、CCN3の過剰発現により軟骨組織の変性を誘発することを示している。またCCN3の細胞周期調節因子への影響を明らかにし、軟骨細胞老化におけるCCN3の新たな役割を提示した点で学術的な意義がある。さらに今回の成果は、加齢性の変形性関節症発祥の病態解明の一助にもなると考えられ、その社会的な意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed a positive correlation between age and the expression level of CCN3 in primary human articular chondrocytes. The CCN3 expression levels was upregulated by inducing cellular senescence also. In addition, degenerative changes were observed in the articular cartilage of cartilage-specific CCN3 overexpressing mice, and increased production of cell senescence-associated secretory trait (SASP) factors was confirmed. Furthermore, analysis of promoter gene assay suggests that CCN3 increases p21 activity via induction of p53.

研究分野：細胞生物学

キーワード：加齢 細胞老化 CCN3

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢者にみられる関節軟骨の変性を特徴とする変形性関節症は、顎関節を含む全身の関節に生じ、関節機能障害と疼痛による日常生活動作の困難と社会活動の制限が問題となる。しかしその病態は未だ解明されていないことから根治療法がないのが現状である。

変形性関節症の病因としては機械的負荷以外には加齢が広く知られている。酸化ストレス、テロメア短縮、DNA複製障害等加齢に伴う現象によって、細胞周期の不可逆的な停止を起こす細胞老化が軟骨組織でも確認されている。また、軟骨細胞は加齢に伴い増殖能力と基質合成能が低下する一方、炎症性メディエーターやマトリックス分解酵素産生は維持もしくは促進することが示されている。つまり、加齢による軟骨代謝の恒常性破綻が関節軟骨の破壊と喪失を惹起すると考えられる。さらに、老化細胞の選択的な除去によって変形性関節症の進行抑制が可能だったとの報告もあり、加齢あるいは細胞老化を介した変形性関節症のメカニズム解明が着目を浴びている。

2. 研究の目的

申請者は軟骨組織の発生・分化・再生における多様な生理作用をもつ CCN ファミリー遺伝子のうち、CCN3 (Cellular communication network factor) に着目し、高齢のヒトから得られた関節軟骨細胞において CCN3 遺伝子の発現が上昇していることを予備実験で明らかにした。さらに軟骨細胞用細胞株に人為的老化誘導を施した結果、CCN3 遺伝子の発現レベルが上昇したことから、CCN3 の細胞老化への関与を示唆していた。このことから、本研究課題では、CCN3 の作用を細胞老化の点から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞老化時の CCN3 発現レベルの検証

年齢別の CCN3 発現の解析

岡山大学医療系部局生命倫理審査委員会臨床研究審査部門委員会の承認を受け、整形外科手術のインフォームドコンセントを得た患者から軟骨組織を採取した。人工関節置換術を受けた 6~91 歳の患者から得た関節軟骨組織にて初代関節軟骨細胞を単離し培養後、RNA を抽出し CCN3 を含む各種遺伝子発現レベルを分析した。また各年齢の軟骨組織について CCN3 の免疫染色を行った。

細胞老化誘導

ヒト初代関節軟骨細胞に対し、人為的な老化誘導を行った。0~200 μM の H_2O_2 で 2 時間処理し、24 時間のインキュベーション後 CCN3 を含む各種遺伝子発現レベルの解析とウエスタンブロット法による CCN3 タンパクレベルの解析を行った。

(2) CCN3 による細胞周期調節因子への影響の検証

プロモーター遺伝子アッセイ

軟骨細胞様細胞株 RCS 細胞に pEGFP-CCN3 ベクターをトランスフェクションさせた 48 時間後、p53 結合領域を含むプラスミドコンストラクトで p21 プロモーターの活性をモニタリングした。

RCS 細胞に対し、リコンビナント CCN3 100ng/mL を添加し 24 時間インキュベーション後、細胞周期調節因子発現レベルを解析した。

(3) CCN3 過剰発現マウスの解析

Co12a1 プロモーター下流に CCN3 遺伝子を接続したコンストラクトを用い、軟骨組織特異的に CCN3 を過剰発現するマウスを作製した。2 か月齢、7 か月齢の膝関節組織についてサフラニン-0 染色、アグリカンネオエピトープの免疫染色を行った。また、3 か月齢の関節軟骨と肋軟骨から RNA を抽出し、細胞周期調節因子や基質産生、分解マーカー、SASP factor 遺伝子について解析した。

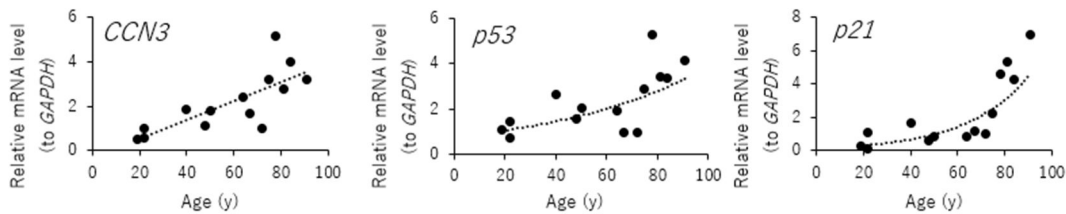
4. 研究成果

(1) 軟骨細胞老化時の CCN3 発現レベルの検証

年齢別の CCN3 発現の解析

ヒト初代関節軟骨細胞において、年齢と CCN3 遺伝子発現レベルとの間に有意な正の相関を示した(図1)。この相関は老化指標として用いられている p53、p21 遺伝子発現レベルの挙動と近似していた。また、免疫染色では高齢の関節軟骨表層で高い染色性を示した。

図1. 年齢と遺伝子発現レベルの相関



細胞老化誘導

ヒト初代関節軟骨細胞に H₂O₂ 処理による人為的な老化誘導を行ったところ、H₂O₂ 濃度の用量依存的に CCN3、p53、p21 遺伝子発現レベルの増加を認めた。また、ウエスタンブロット法においても H₂O₂ 処理による CCN3 タンパクの高発現を認めた。以上から、老化に伴い CCN3 の発現が上昇することが示され、CCN3 は軟骨細胞における新たな老化マーカーとなることが示唆された。

(2) CCN3 による細胞周期調節因子への影響の検証

RCS 細胞で p53 結合部位を含む p21 プロモーターの活性を解析したところ、CCN3 過剰発現による p21 プロモーター活性の増加が認められた。

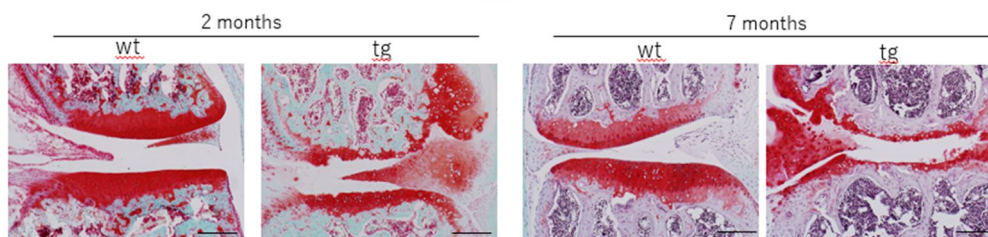
RCS 細胞でリコンビナント CCN3 を添加後、p21、p53 遺伝子発現レベルの有意な上昇を認めた。これらの結果は、RCS 細胞における CCN3 の発現が、p53 を介して p21 の発現を誘導することを示唆している。

(3) CCN3 過剰発現マウスの解析

軟骨特異的 CCN3 過剰発現マウス (tg) は野生型と比較し、生後 2 か月の時点で関節軟骨表面の粗造化、軟骨層の菲薄化を認めた(図2)。生後 7 か月になるとその傾向はさらに顕著にみられた。また、アグリカンネオエピトープの強い染色像を示し、CCN3 過剰発現によるアグリカンの切断亢進が示唆された。さらに RNA を解析したところ、tg では p53、p21、ADAMTS-5 および Mmp13 遺伝子の発現が増加しており、Col2a1 の発現が減少していた。また、SASP 因子である Il-6、Il-8 および Tnf- α が誘導されていた。以上の結果から、CCN3 の過剰発現による軟骨組織の破壊が示唆された。

細胞老化は炎症性サイトカインの放出等を介して組織障害をもたらすが、一方で腫瘍形成に対する安全システムとして機能している。CCN3 は複数の腫瘍細胞株で抗増殖活性を持つ(Yu et al. 2003, Chevalier et al. 1998) こと、また軟骨細胞においてグルコース欠乏状態で CCN3 の発現上昇が報告されている(Akashi et al. 2017) ことを踏まえると、CCN3 は加齢に伴う酸化ストレスや飢餓状態等のストレスに対する防御反応として機能している可能性が考えられる。

図2. 軟骨組織特異的 CCN3 過剰発現マウス (tg) の膝関節におけるサフラニン-O 染色



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuwahara, M., Kadoya, K., Kondo, S., Fu, S., Miyake, Y., Ogo, A., Ono, M., Furumatsu, T., Nakata, E., Sasaki, T., Minagi, S., Takigawa, M., Kubota, S., Hattori, T.	4. 巻 21
2. 論文標題 CCN3 (NOV) Drives Degradative Changes in Aging Articular Cartilage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 e7556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Asuka, Hara Tetsuya, Yamada-Kubota Chie, Kuwahara Miho, Ichikawa Tomoka, Minagi Shogo	4. 巻 66
2. 論文標題 Lack of occlusal support did not impact amyloid deposition in APP knock-in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 161 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPR_D_20_00205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagatsuka Hiroaki, Kawakami Shigehisa, Kuwahara Miho, Kubota Chie, Kodama Naoki, Minagi Shogo	4. 巻 66
2. 論文標題 Newly designed flat surface artificial tongue system for speech improvement in glossectomy patients: A preliminary study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 87 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPR_D_20_00230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑原実穂、武内聡子、近藤 星、Fu Shanqi, 大野充昭、古松毅之、中田英二、滝川正春、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 軟骨細胞老化促進因子としてのCCN3
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原実穂、近藤 星、Fu Shanqi, 大野充昭、古松毅之、中田英二、滝川正春、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 CCN3は関節軟骨の加齢性変性を促進する
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原実穂、近藤 星、Fu Shanqi、大野充昭、古松毅之、中田英二、皆木省吾、滝川正春、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 軟骨組織におけるCCN3の老化促進作用
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑原実穂、武内聡子、近藤 星、Fu Shanqi, 大野充昭、古松毅之、中田英二、滝川正春、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 軟骨細胞老化促進因子としてのCCN3
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fu, S., Kuwahara, M., Uchida, Y., Hyashi, D., Shimomura, Y., Takagaki, A., Nishida, T., Nakata, E., Furumatsu, T., Kondo, S., Maruyama, Y., Hattori, A., Kubota, S., Hattori, T.
2. 発表標題 Effect of melatonin on rhythmic gene expression in human articular chondrocytes.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fu, S., Kuwahara, M., Uchida, Y., Kondo, S., Hyashi, D., Shimomura, Y., Takagaki, A., Nishida, T., Maruyama, Y., Ikegami, M., Hattori, A., Kubota, S., Hattori, T.
2. 発表標題 Effect of melatonin on rhythmic gene expression in human articular cartilage.
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤星, 服部高子, 桑原実穂, Fu Shanqi, 森谷徳文, 飯田征二, 滝川正春, 久保田聡
2. 発表標題 メトホルミンの軟骨細胞分化に対する作用の解析
3. 学会等名 第41回岡山歯学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤 星、服部高子、桑原実穂、Fu Shanqi、西田 崇、吉岡洋祐、森谷徳文、飯田征二、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 non-coding RNAを介したメトホルミンの抗線維化作用の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田瑤子、服部高子、福原大樹、Fu Shanqi、近藤 星、桑原実穂、イスラム モニルル、片岡広太、江國大輔、久保田聡、森田 学
2. 発表標題 腸内細菌の有無が胎児内軟骨成長に与える影響
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------