

令和 7 年 4 月 30 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2024

課題番号：21K17104

研究課題名(和文)CCN2を応用した新規抗がん剤のスクリーニング

研究課題名(英文)CCN2-oriented anti-cancer drug screening

研究代表者

堀江 尚弘(Horie, Naohiro)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：30802318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】CCN2の骨芽細胞への影響を解析する。【方法】まずMC3T3-E1細胞にshRNAを応用してCCN2ノックダウン骨芽細胞；sh(+)とコントロール細胞；sh(-)を樹立し、PCR解析した。その後、各細胞群に骨芽細胞分化誘導を施しALP染色した。最後にRNAシーケンスにて群間比較をおこなった。【結果】sh(+)群では骨関連遺伝子が増加し、ALP陽性細胞も多く認められた。シーケンスではOcstamp遺伝子発現が増加していた。【考察】MC3T3-E1細胞におけるCCN2遺伝子のノックダウンには、同細胞の骨への分化促進と破骨細胞の活性化による、骨リモデリング増進作用があると想定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で樹立したCCN2ノックダウン骨芽細胞は、骨リモデリングに関するシグナル伝達研究への応用が期待されると共に、がんの骨浸潤や骨転移といった病態研究・抗がん剤の創薬研究にも役立つ可能性がある。故に、本研究成果は学術的・社会的両方の面で高い意義を持つといえる。

研究成果の概要(英文)：Objective: To analyze the effect of CCN2 on osteoblasts. Methods: First, CCN2 knockdown osteoblasts; sh(+) and control cells; sh(-) were established in MC3T3-E1 cells by applying shRNA, and PCR analysis was performed. Afterwards, osteoblast differentiation was conducted in each cell group and ALP staining was performed. Finally, RNA sequencing was performed to compare the results between groups. Results: Bone-related genes were increased in the sh(+) group, and more ALP-positive cells were observed in the sh(+) group. Ocstamp gene expression was increased in the sh(+) group. Discussion: Knockdown of the CCN2 gene in MC3T3-E1 cells was hypothesized to increase bone remodeling by promoting differentiation of these cells into bone and activating osteoclasts.

研究分野：口腔外科学

キーワード：CCN2 shRNA 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、口腔がんへの導入化学療法は、CDDP (シスプラチン) と 5-FU (5-フルオロウラシル) の併用療法 (PF または CF 療法) が標準とされ、再発・転移に対する化学療法には PF にセツキシマブを併用している。また、プラチナ製剤に対して不応・不適な症例に対しては免疫チェック阻害薬であるニボルマブも使用されている (日本口腔腫瘍学会・日本口腔外科学会編集, 口腔癌診療ガイドライン 2019 年版.)。しかしながら、PF は正常組織にも作用し、急性腎不全や悪心・嘔吐等の消化器症状、汎血球減少などの副作用を示す。また、進行がんに対する化学療法の効果は乏しく、予後が不良であることは以前から報告されており (Weeks ら, 2012.), がん組織へ特異的に作用する、所謂分子標的治療薬としての新たな抗がん剤の開発が求められている。

ここで、申請者は抗がん剤の標的になり得る因子として、結合組織増殖因子 (CTGF/CCN2) に着目した。CCN2 には破骨細胞新生の亢進による骨吸収促進作用や、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現・活性を制御し、血管増生作用があることが知られ、これらの作用は腫瘍の発生に大きく関与している (Jun ら, 2011.)。加えて、我々の研究グループの先行研究にて、顎骨浸潤が認められる口腔扁平上皮癌に CCN2 が高発現していること (Shimo ら, 2008.)。また、CCN2 が口腔扁平上皮癌の“独立した予後因子”であることを、臨床検体を用いた多変量解析にて明らかにしており (Shimo ら, 論文投稿中.), CCN2 は口腔扁平上皮癌の“悪性度”, “予後”を評価するマーカーとして有用な因子であると言える。

2. 研究の目的

上記背景のように CCN2 はがん研究に有用な因子である一方、骨への影響は諸説ある。先行研究で CCN2 過剰発現マウスが骨減少症様の症状を呈し、同マウスの骨芽細胞における Wnt シグナルと BMP 活性が低下していたことが報告されているが (Anna ら, 2008.), 骨芽細胞に CCN2 と FGF2 を添加することでオステオカルシン遺伝子発現が上昇したとの報告もある (Aoyama ら, 2012.)。発表者らの先行研究にて、下顎骨におけるメッケル軟骨の成熟過程への CCN2 の関与が示唆されたため (Shimo ら, 2004.), 本研究は軟骨内骨化, 膜内骨化に着目し、同機序への CCN2 の影響を評価した。

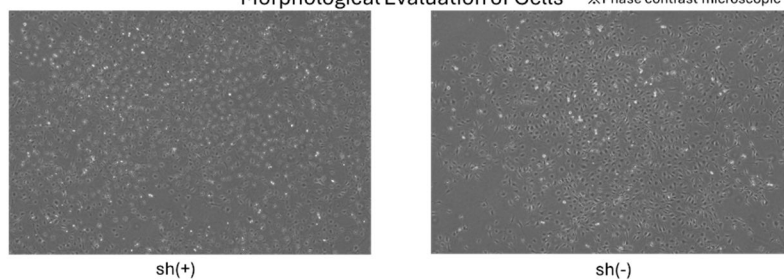
3. 研究の方法

まずは CCN2 の shRNA 発現プラスミドを組み込んだレンチウイルスベクターを骨芽細胞様細胞; MC3T3-E1 細胞に導入し、CCN2 ノックダウン骨芽細胞; sh(+) と sh コントロール細胞; sh(-) を樹立した。次に、樹立した細胞の骨関連遺伝子発現を解析したと共に、CCN2 関連タンパク質の発現量を評価した。さらに、各細胞群に骨芽細胞分化誘導を施し、ALP 染色をおこなった。最後に RNA シークエンスにて遺伝子発現を網羅的に比較・解析した。

4. 研究成果

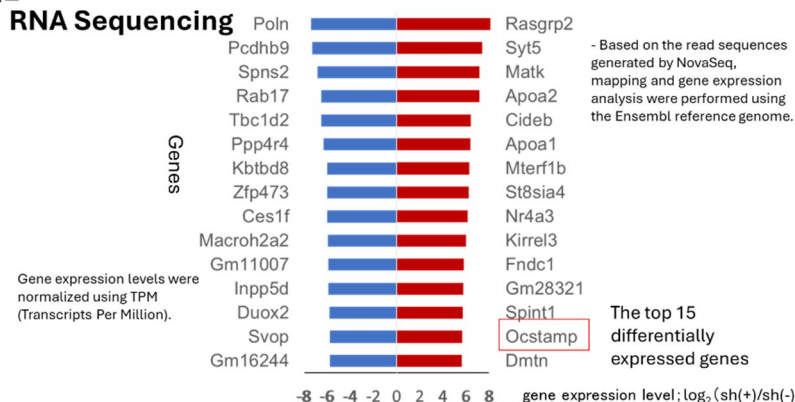
shRNA 技術により CCN2 ノックダウン骨芽細胞を樹立できた (図 1)。また CCN2 のノックダウンによって Runx2, Col1, Bglap 遺伝子の発現量は増加し、分化誘導実験において sh(+) 群で ALP 陽性細胞が多く認められた。

図1 Establishment and Characterization of CTGF Knockdown Osteoblasts
Morphological Evaluation of Cells ※Phase contrast microscopic images



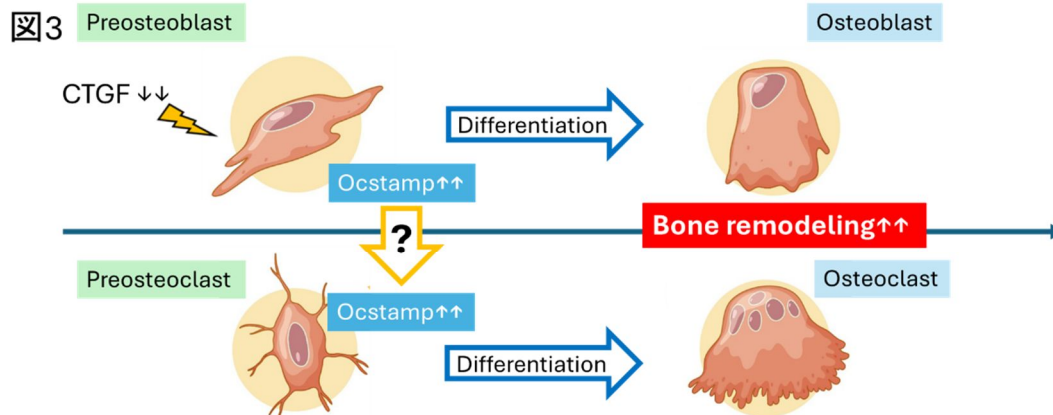
β-CATENIN, MRTF-A タンパク質量は CCN2 ノックダウン群で多い傾向がみられ、RNA シークエンスでは Ocstamp 遺伝子をはじめとする複数の遺伝子群でその発現の変化がみられた (図 2)。

本研究では、MC3T3-E1 細胞における CCN2 遺伝子のノックダウンが、同細胞の骨への分化を促



進していたため、CCN2 は前骨芽細胞の骨分化を抑制することが想定された（図3）。また sh(+) 細胞は、先行研究から推定された CCN2 関連タンパク質の発現傾向を示しており、RNA シークエンスでは CCN2 遺伝子発現の低下とともに、骨吸収関連遺伝子の変化も確認されたため、樹立した細胞は骨リモデリングに参与するシグナル伝達研究・創薬研究への応用が期待される。

加えて、上記研究を進める過程で珍しい硬組織の構造体を骨および歯の周囲に認めため、論文にまとめ、報告した（Horie ら，2025 .）。



Knockdown of CTGF in MC3T3-E1 cells is expected to be involved in bone remodeling by promoting osteogenic differentiation towards the osteoblasts and activating osteoclasts.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horie Naohiro, Murata Masaru, Minamida Yasuhito, Nagayasu Hiroki, Shimo Tsuyoshi, Akazawa Toshiyuki, Tsujigiwa Hidetsugu, Haikel Youssef, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Coronal Cementum and Reduced Enamel Epithelium on Occlusal Surface of Impacted Wisdom Tooth in a Human	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 348~348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/dj12110348	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 該当する

1. 著者名 堀江 尚弘、北川 孝雄、志茂 剛	4. 巻 49
2. 論文標題 リキッドバイオブシーと CCN2 を応用した 新規抗がん剤のスクリーニング	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 497~499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江 尚弘、北川 孝雄、Ekayani Nasrun Nisrina、永易 裕樹、志茂 剛
2. 発表標題 下顎骨発生におけるCTGFの関与について
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀江尚弘、藤田尚正、北川孝雄、永易裕樹、照光真、志茂剛
2. 発表標題 下顎骨の成長におけるCTGFの影響
3. 学会等名 第78回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 堀江尚弘 , 藤田尚正 , 北川孝雄 , 南田康人 , 沈 佳茵 , 照光 真 , 永易裕樹 , 志茂 剛
2. 発表標題 CTGFの骨芽細胞への影響
3. 学会等名 第32回硬組織再生生物学会学術集会・総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 沈 佳茵 , 堀江尚弘 , 藤田尚正 , 岸本有里 , 建部廣明 , 照光 真 , 永易裕樹 , 細矢明宏 , 志茂 剛
2. 発表標題 The effect of CTGF on Osteoblast
3. 学会等名 北海道医療大学歯学会 第43 回学術大会 定例講演会
4. 発表年 2025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
---------	---------