

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月27日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791992

研究課題名（和文）：骨再生過程における CCN3 の役割の解析とその臨床応用の基盤構築

研究課題名（英文）：The analysis for the role of CCN3 in bone regeneration and the build up the basis of the clinical application.

研究代表者

南里 篤太郎（MINAMIZATO TOKUTARO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50529807

研究成果の概要（和文）：

骨再生時において、CCN3 は骨芽細胞のみならず、破骨細胞のいずれの分化も、相互に制御、調整するコントロール因子である可能性が高いことが示された。このことは、骨格の維持に不可欠なリモデリング機構に CCN3 が深く関わっていることを示すものである。骨再生には、過度の再生を抑制する制御因子の存在が重要であり、その役割を CCN3 が担っていることは未だ報告がないことから、CCN3 が骨再生のメカニズムを総合的に解明する上で極めて重要な因子として、さらに詳細な検討を行う必要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The result of this research shows that CCN3 would have the potential of the regulatory or controllable factors for not only osteoblast differentiation but also that of osteoclast. This shows that CCN3 affects the remodeling mechanism that is indispensable for the maintenance of the frame deeply. Because the existence of the regulatory factor which controlled excessive reproduction is important to bone regeneration. This did not yet have a report that CCN3 carried the role, CCN3 is as an extremely important factor, more detailed need that I examined was suggested in elucidating mechanism of the bone regeneration generally.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成23年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：CCN3, 破骨細胞, 骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌による顎骨切除などの大きな骨欠損の回復には、現在、骨移植（人工骨も含む）による治療が主流となっているが、細胞移植、遺伝子導入を利用した骨再生治療の開発も試みられている。このような新たな治療法の実現にあたっては、疾患の病態メカニズムを十分に理解しておくことが重要なため、骨形成・骨再生の分子メカニズムを詳細に解析することにより優れた骨再生療法の実現基盤を構築できると考えられる。

骨芽細胞分化は種々の因子により厳密に制御されているが、骨再生過程では正常で発現している特定の遺伝子の発現増強や正常では発現していない遺伝子の発現が誘導される。骨芽細胞の分化と骨再生において Bone morphogenetic protein (BMP) シグナルと Notch シグナルがクロストークする (J. Biol. Chem. 280, 2005) ことが明らかにされたこと、また、種々の細胞の増殖、分化に関与しているとされている CCN ファミリーに属する CCN3/NOV (nephroblastoma overexpressed gene) が Notch と結合して筋細胞の分化を抑制すること (J. Biol. Chem. 277, 2002) が報告されていたことから、本申請者は強力な骨芽細胞分化・骨形成促進因子である BMP と幹細胞分化制御に関わる膜タンパク型受容体である Notch がクロストークし、その作用に CCN3 が関与している可能性を考え、CCN3 が BMP シグナルと Notch シグナルのクロストークに関与し、骨芽細胞の分化を制御していることを明らかにした (Minamizato, et al. Biochem Biophys Res Commun 354:567-573, 2007)。

骨格の維持には既存の骨が吸収され、そ

の部位に新しい骨が形成され、元の形状が維持される、いわゆるリモデリング機構が働く。それらの中心的役割は骨芽細胞と破骨細胞であり、破骨細胞の分化に対する CCN3 の役割を解明することも骨再生のメカニズムを総合的に考える上で極めて重要と考えられるが、未だ解明されていなかった。

## <マウス大腿骨骨再生モデル>

### 2. 研究の目的

CCN3/NOV は CCN ファミリーに属する分泌性因子で、種々の細胞の増殖、分化に関与しているとされている。本申請者は骨芽細胞の分化における CCN3 の役割を明らかにし、報告した。しかし、破骨細胞の分化における CCN3 の関与については未だ解明されていないことから、本研究では破骨細胞の分化における CCN3 の働きを明らかにし、骨のリモデリングにおける CCN3 の役割について総合的な知見を得ることで、望まずして失った顎骨に対する再生を早期に実現する足がかりを築くことを目的とした。

### 3. 研究の方法

< 2 2 年度：骨再生モデルを利用した種々の遺伝子改変マウスの表現型の解析 >

・次の2種類の遺伝子改変マウス（括弧内は各マウスの略称）ならびに野生型マウスを利用し、免疫組織学的、形態学的解析を行う。

- 1) 骨芽細胞特異的 *CCN3* トランスジェニックマウス (*CCN3*Tg)
- 2) *CCN3* ノックアウトマウス (*CCN3* KO)
- 3) 野生型マウス (C57B6)

< 23年度：siRNAを用いた解析 >

・野生型マウス大腿骨骨再生モデルに siCCN3 を導入し、骨再生過程における免疫組織学的、形態学的解析を行い、総括した結果を今まで蓄積した結果と合わせて論文発表を行う準備を整える。

#### 4. 研究成果

破骨細胞の分化に対する CCN3 の役割を解明することも骨再生のメカニズムを総合的に考える上で重要であったため、本科学研究費助成事業により以下の研究を進めた。なお、上記の2種類の遺伝子改変マウス(括弧内は各マウスの略称)ならびに野生型マウスを利用し、免疫組織学的、形態学的解析を行う研究は本研究者の所属研究機関の移動などでマウスの移管が困難になったことなど、それらを用いた研究を推進することが困難であったため、以下の研究により補完した

##### 1) 異所性骨の形成実験を用いた CCN3 の役割の検証

アテロコラーゲン膜を材料とした円形ディスクに BMP-2 タンパクと CCN3 タンパクを添加し、それらを凍結乾燥した後、マウスの後背筋下に埋入した。なお、コントロール群には BMP-2 タンパクのみ添加した。埋入期間は2週間と4週間とし、それぞれの実験群において、摘出した異所性骨様組織を免疫組織学的、形態学的解析を行った。埋入期間が2週間の群においては、CCN3 添加群とコントロール群において、顕著な差を認めることはできなかったが、埋入期間が4週間の群においては CCN3 添加群はコントロール群と比較し、軟X線撮影においてX線透過性が増しており、また  $\mu$ CT による解析における BMD 値では優位に低下していた。その結果、

CCN3 は、野生型マウス実験モデルにおいて骨形成が抑制する因子であることが再確認された。それらについて免疫組織学的検証を行ったところ、CCN3 添加群はコントロール群と比較し、骨様組織を形成している部位において、骨芽細胞のみならず破骨細胞の個数までも有意に差異を認めた。これにより、CCN3 は骨芽細胞のみならず、破骨細胞にも何らかの影響を与えている可能性が示唆されたため、次に、*in vitro* の系において、動物実験での結果を分子生物学的に解析した。

##### 2) *in vitro* の系における CCN3 と破骨細胞との関わりについての検証

*In vitro* の実験系では、破骨細胞に分化させるための前駆細胞として、マウスマクロファージ由来のがん細胞株である RAW264 細胞を用いた。実験培地は 10% FBS-EMEM 培地を用い、RANKL タンパクを作用させることで破骨細胞へ分化させた。最適なサイトカイン濃度は、RAW 細胞を  $1.4 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup> の細胞密度に対し、 $1 \mu$ g/ml の RANKL 濃度で十分に破骨細胞に分化することが TRAP 染色で確認できたため、それを至適濃度として用いた。これらの系に分泌タンパクである CCN3 を添加し、4日間の培養後、タンパクならびに mRNA を抽出した。その結果、特に PCR 法において、TRAF2/6 等、RANK の下流遺伝子群の発現が有意に抑制され、また、TRAP 染色では単位面積あたりの破骨細胞数が有意に減少した。これらの実験結果から、CCN3 は骨再生時において、骨芽細胞のみならず、破骨細胞のいずれの分化も、相互に制御、調整するコントロール因子である可能性が高いことが示された。骨再生には、過度の再生を抑制する制御因子の存在が重要であり、その役割を CCN3 が担っていることは

未だ報告がないため、現在、得られた知見をもとに追加実験を行い、論文作成にむけた準備を整えている。

(3)連携研究者  
なし

#### 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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

#### ○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

#### ○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

南里篤太郎 (MINAMIZATO TOKUTARO)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：50529807

##### (2)研究分担者

なし