

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592216

研究課題名(和文)CCN2のメタボリックサポーターとしての機能解明とその臨床応用研究

研究課題名(英文)Functional analysis of CCN2 as a metabolic supporter and potential clinical applications in chondrocyte regeneration

研究代表者

三宅 由晃(Miyake, Yoshiaki)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70594810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：CCN2は軟骨細胞の増殖と分化をともに促進するが、この一見矛盾する分子機能を可能とするメカニズムは明らかではなかった。本研究では、CCN2が軟骨細胞における代謝全般、特にエネルギー産生に与える影響、ならびにその背景にある分子基盤を解明することを目的とした。

その結果、CCN2欠損により軟骨細胞内ATP量が低下し、その原因が解糖系の抑制にあることが解明され、CCN2は軟骨細胞のATP産生を支えるメタボリック・サポーターであることが示された。また動物OAモデルにおいて関節軟骨再生効果が確認できたことからOA軟骨治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Functional analysis and potential clinical applications of CCN2 as a metabolic supporter in chondrocyte regeneration. The purpose of this study was to analyze the influence of connective tissue growth factor (CCN2) on overall metabolism in chondrocytes, especially energy production and a molecular basis related to the energy production. The result revealed that the absence of CCN2 caused the decrease in the amount of adenosine triphosphate (ATP) in chondrocytes and suppression of glycolysis. Also, CCN2 was shown to be a metabolic supporter in chondrocyte regeneration producing ATP. Furthermore, the effect of articular cartilage regeneration in an osteoarthritis (OA) model suggested future clinical application for osteoarthritis cartilage treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：CCN2 変形性関節症 メタボローム解析

### 1. 研究開始当初の背景

CCN2 は CCN ファミリーと呼ばれる、比較的新しく定義されたファミリーに属する遺伝子群の中の古典的メンバーのひとつであり、間葉系細胞の分化、成長を促進することがよく知られている。そのため connective tissue growth factor (CTGF) という名前も発見当初は与えられたが、分子機能はそれを超えて多様で複雑である。分子のアミノ末端にシグナルペプチドをもつ CCN2 は、基本的に細胞外でシグナル分子を指揮するタンパク質であると考えられている。このタンパク質は 4 つの特徴的モジュール、insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)、von Willebrand factor type C repeat (VWC)、thrombospondin type 1 repeat (TSP1) および C-terminal cysteine knot (CT) module が連結されて出来ており、これらモジュールは細胞表面受容体、BMP などの成長因子、プロテオグリカンなどの細胞外マトリクス分子など様々な分子と相互作用をもつ。この「4本の手」により、微細環境の分子を指揮していると考えられている。それに加えて、CCN2 が細胞内でも一定の役割を果たしているとの報告もあり、その守備範囲には想像を超えたものがある。

ところでこの CCN2 が、*in vitro* で内軟骨性骨形成を全面的に促進する作用を発揮することに注目し、以前申請者らはリコンビナント CCN2 を準備し、その OA に対する効果を、動物モデルを用いて検証した。その結果、徐放性担体とともに局所に適用された CCN2 は、通常は治癒しない関節軟骨欠損を見事に再生させ、化学物質で誘発した OA 様ダメージを受けた関節軟骨も修復させる能力を発揮したのである。また、骨折治癒は内軟骨性骨形成を経て起こることに着目し、同様に CCN2 の効果を *in vivo* で検証したところ、やはり有意な治癒促進効果を示した。さらに最近の研究では、あらかじめ CCN2 を関節軟骨に過剰発現しておくことにより、マウスにおける OA の自然発症を阻止できるとの所見も示されてきている。

以上の効果は、CCN2 が細胞の増殖と分化両方を促進するためと考えられる。しかしながら増殖と分化は細胞生物学的には逆の現象であり、それらをどのようにして CCN2 が同時に促進するのか？この疑問が本研究を始める契機となった。

### 2. 研究の目的

CCN2 は軟骨細胞の増殖と分化をともに促進するが、この一見矛盾する分子機能を可能とするメカニズムは明らかではなかった。そこで申請者らは、あらゆる生命活動を支えるエネルギー代謝に着目し、CCN2 が軟骨細胞における代謝全般、特にエネルギー産生に与える影響、ならびにその背景にある分子基盤を解明することを本研究の第一の目的とした。さらに得られた成果に基づき、OA で損傷を

受けた関節軟骨再生医療に向けて最適化された CCN2 誘導体の探索にも着手した。

### 3. 研究の方法

細胞トリコンビナントタンパク質の調製  
CCN2 欠損マウス胎児、ならびに同腹から得た野生型胎児から肋軟骨を摘出し、そこから酵素処理を経て軟骨細胞を分離、培養系に持ち込み実験に供した。また遺伝子ノックダウン実験のために、ヒト軟骨細胞様 HCS-2/8 細胞を維持し供用した。

添加実験に用いるリコンビナント CCN2 タンパク質は、CCN2 発現プラスミドを持った HeLa 細胞培養上清から精製し、各モジュール断片単独タンパク質は、発現ベクターを持った *Brevibacillus choshinensis* による分泌生産系により産生、精製した。

#### メタボローム解析

CCN2 欠損および野生型マウスから得た軟骨細胞をコンフルエント期にまで培養したあとマルトースで洗浄し、メタノールにて代謝産物を回収した。回収したサンプルからキャピラリー電気泳動法により代謝産物を分離した後、飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) により代謝産物の絶対定量を行った。測定対象の代謝産物 108 を網羅するために、質量分析はエレクトロスプレー法で代謝産物をイオン化後、アニオンモード、カチオンモードの両方で行った。

#### ATP の単独定量

上記と同様の軟骨細胞から市販の実験キット (Roche 社) を用いて細胞抽出液を調製し、化学発光反応を指標にした生化学的方法で ATP の相対定量を行った。結果は細胞抽出液中の総タンパク質量にて補正した。一部の実験では細胞培養時に 24 あるいは 48 時間、リコンビナント CCN2 で処理し、その細胞内 ATP 量に対する影響を評価した。

#### DNA マイクロアレイ解析

CCN2 欠損および野生型マウスから得た軟骨細胞をコンフルエント期にまで培養し、全 RNA を抽出、精製した。これを用い DNA マイクロアレイ解析にて CCN2 欠損による遺伝子発現プロファイルの変動を網羅的に分析した。使用した DNA マイクロアレイは Sigma 社の Mouse Panorama Micro Array である。

#### RNA 定量分析

抽出・精製した RNA からまず逆転写酵素により cDNA プールを合成し、そこから目的遺伝子特異的なプライマーを用いたリアルタイム PCR 法により目的 mRNA の定量解析を行った。

#### 遺伝子ノックダウン実験

ヒト CCN2 遺伝子に対する siRNA を合成し、

それをリポフェクション法にてヒト HCS-2/8 細胞株にて導入した。導入後 24 時間で細胞抽出液を作成し上述の方法により ATP 量を比較した。

ミトコンドリア活動性の測定  
ミトコンドリアの膜電位に反応して蛍光を発する色素 Mitotracker を用いて CCN2 欠損および野性型マウス軟骨細胞を染色し、ハイコンテンツスクリーニングシステム (Arrayscan: Thermo Scientific) により定量解析を行った。

OA に対する有効性の評価  
CCN2 および、それを構成する各モジュールのみからなるタンパク質断片の OA に対する効果は、HCS-2/8 細胞、ラット OA モデルを用いて *in vitro* および *in vivo* で行った。

#### 4. 研究成果

CCN2 欠損軟骨細胞で低下のみられた代謝産物

CCN2 の軟骨細胞代謝における役割解明に向けての網羅的情報を得るために、CCN2 欠損マウス軟骨細胞、および野性型軟骨細胞における代謝産物の量をメタボローム解析にて比較解析した。実験は 2 回、異なる個体からの細胞で繰り返したが、代謝様態は培養条件に敏感に反応するらしく、2 回の実験間で大きなバラツキが見られる代謝産物が多かった。しかしながらそんな中で、2 回の実験で安定して CCN2 欠損による影響がみられるものが数種あり、その 1 つが ATP であった。ATP はつねに CCN2 欠損軟骨細胞では野性型に比して 50% まで低下を示し、しかもその絶対量が実験間でほとんど変動しなかった。なお ATP が CCN2 欠損軟骨細胞で減少していることに符合して、GTP、UTP、CTP レベルにも同様の減少が見られた。ATP は生物のエネルギー代謝の中核に位置する重要分子であり、軟骨細胞では CCN2 はエネルギー代謝に深甚な影響力を持つことが明らかとなった。

以上の所見を確認するため、再び CCN2 欠損マウス軟骨細胞、および野性型軟骨細胞を準備し、伝統的な生化学的方法で ATP の相対定量を繰り返したところ、やはり CCN2 欠損マウス軟骨細胞における細胞内 ATP 量の減少が再現された。さらに同細胞に外部からリコンビナント CCN2 (rCCN2) を添加してやると、48 時間後には CCN2 欠損で損なわれた細胞内 ATP レベルが野性型の水準にまで回復することも確認された。したがって、軟骨細胞においては CCN2 が ATP 産生を支えていることが、ここに証明された。

メタボローム解析ではこれ以外でも多くの情報が得られたが、その中で目を引いたのは解糖中間体である。数多い解糖中間体のほとんどが、2 度の解析で一様に CCN2 欠損軟骨細胞において減少しており、この反応系の

ATP 産生低下への関与が窺われた。

ヒト HCS-2/8 細胞における一過性 CCN2 ノックダウンによるの結果の再現  
続いて HCS-2/8 細胞に CCN2 mRNA を標的として合成 siRNA を導入し、RNAi による発現ノックダウンを試みた。48 時間後における mRNA 定量解析の結果、siRNA 導入による CCN2 mRNA 量の低下が確認されたので、同じ条件で HCS-2/8 細胞を処理し、ATP 量の比較定量を、コントロール RNA 導入細胞との間で行った。その結果、CCN2 siRNA を導入した細胞では、やはり細胞内 ATP が有意に低下することが明らかとなった。この結果は、CCN2 の長期欠損のみならず短期欠損でも ATP 産生に影響すること、またマウスだけでなくヒトにおいても CCN2 が同じ機能を有していることを意味している。

CCN2 欠損による軟骨細胞における代謝関連遺伝子の変動

また、CCN2 が代謝に与える影響の背後で、どのような遺伝子が関与しているかについて情報を得ることを目的として、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの比較解析を、CCN2 欠損軟骨細胞および野性型間で行った。その結果、CCN2 欠損によって発現の亢進する遺伝子には、すでに同様の現象が知られている CCN3 などに加えて、多数のリボソームタンパク質遺伝子が含まれていた。これは恐らく、長期にわたる CCN2 欠損に基づくエネルギー代謝の低下に伴い、二次的に生じたタンパク質合成能力の低下を補償するために起こった現象と考えられる。逆に CCN2 欠損により、遺伝子発現の低下が示唆された遺伝子群には、ATP シンターゼ複合体のサブユニットなどの、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化、つまり好氣的 ATP 産生に直接関わる分子をコードする遺伝子が含まれていた。それだけではなく、嫌氣的 ATP 産生の中核代謝経路である解糖系関連遺伝子のうち、解糖反応後半を媒介する酵素、ホスホグリセリン酸キナーゼ、ホスソグリセリン酸ムターゼ、エノラーゼの遺伝子発現が一様に低下していた。こういった所見からは、CCN2 欠損が好氣的、嫌氣的 ATP 産生経路の両方に影響を与えていることを示している。

CCN2 欠損が好氣的 ATP 産生に及ぼす影響の確認

ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応では、細胞内各所から集められた高エネルギー電子が段階的に低いエネルギー状態に伝達され、解放されたエネルギーによりプロトンが膜間腔に輸送される。したがって活発な呼吸のもと ATP を産生しているミトコンドリアには膜電位が発生する。これを検知する蛍光色素 Mitotracker を用いて、CCN2 欠損軟骨細胞のミトコンドリアの状態を野性型のそ

れと比較し、好氣的 ATP 産生活性の指標とした。ところが予想に反して、定量画像解析の結果両者に有意な差はみられなかった。さらに、DNA マイクロアレイの結果を追試するため、別個体から得た両軟骨細胞から RNA を抽出し、特異的プライマーを用いて定量リアルタイム RT-PCR 法で ATP シンターゼ複合体のサブユニット 遺伝子発現を比較した結果、マイクロアレイの結果は必ずしも再現されなかった。よって CCN2 欠損による ATP 産生低下には、ミトコンドリアによる好氣的 ATP 産生システムはさほど関与していないという結論となった。

CCN2 欠損が解糖系 A に及ぼす影響の確認続いて DNA マイクロアレイ解析で示唆された、CCN2 欠損が解糖系酵素遺伝子発現に与える影響の確認に移った。すなわち ATP シンターゼ複合体のサブユニット 遺伝子の場合と同様に、CCN2 欠損および野性型軟骨細胞から RNA を抽出し、定量リアルタイム RT-PCR 法で解析を行った。その結果、今回は検討した全ての遺伝子、つまりホスホグリセリン酸キナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、エノラーゼ 3 種について、CCN2 欠損により発現の有意な低下が認められた。よって CCN2 欠損による ATP 量の低下は、主として解糖系酵素の発現抑制を介して嫌氣的 ATP 産生が滞ることによると考えられる (図)。

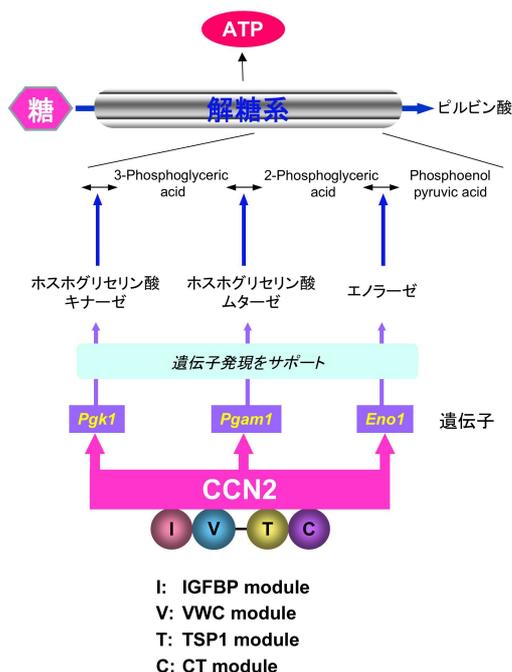


図: CCN2 分子の構造、各モジュールとメタボリックサポーターとしての機能

OA 治療への応用分子の探索  
ここまでの研究で CCN2 のメタボリック・サ

ポーターとしての機能が明らかになったので、OA 治療により有効な CCN2 誘導体の探索を開始した。すなわち CCN2 を構成する 4 つのモジュール断片を、それぞれ独立のタンパク質として準備し、それぞれをまず HCS-2/8 細胞に添加して軟骨分化マーカー発現を指標に効果をした。その結果に基づき絞り込んだ TSP1 モジュールの評価をラット OA モデルで行ったところ、全長 CCN2 を上回る関節軟骨再生効果が確認できた。ただしこの TSP1 モジュールの高い軟骨再生効果が、高い ATP 産生増強能力によるものか否かについては、今後の検討課題として残っている。

軟骨組織の特徴のひとつとして血管がないことが挙げられる。つまり、血流を介した酸素供給がないために、そこで細胞外気質に埋没している軟骨細胞はつねに低酸素状態におかれていることになる。本研究では CCN2 欠損により軟骨細胞内 ATP 量が低下し、その原因が解糖系の抑制にあることが解明されたが、これは軟骨細胞のおかれている上記のような特殊環境を考えれば納得できる結果と言える。

申請者が得た「軟骨細胞では CCN2 欠損が ATP 量の低下を招く」という所見は、すなわち「CCN2 は軟骨細胞の ATP 産生を支えるメタボリック・サポーターである」という、本研究で検証すべき第一の目標を達成するものである。しかしながら裏を返せば、CCN2 のサポートなしでも軟骨細胞は形成され、一応の増殖も分化も行う能力を保持しているのであって、これは生きるために必要な ATP ならば CCN2 なしでも得られることを意味している。したがって CCN2 は軟骨細胞にとって常に必要というよりも、活発に活動する際に必要なエネルギー供給を支えている、と考える方が妥当であろう。

本研究課題にはまだ検証すべき課題が残されている。その代表的な例としては、軟骨細胞でみられた CCN2 のメタボリック・サポーターとしての機能が、他の組織の細胞にまであてはまるか否か、という点である。研究成果の応用を OA 治療だけでなく、全身の代謝制御にまで広げて行くのであれば、これは今後急ぎ取り組むべき課題と言えよう。

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 1 件)  
1. Maeda-Uematsu, A, Kubota, S., Kawaki, H., Kawata, K., Miyake, Y., Hattori, T., Nishida, T., Moritani, N., Lyons, K.M., Iida, S. and Takigawa, M. 2014. CCN2 as a novel molecule supporting energy metabolism of chondrocytes. J Cell Biochem. 115: 854-865. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

前田 彩、久保田聡、川木晴美、河田かずみ、三宅由晃、服部高子、西田 崇、森谷徳文、Karen M Lyons、飯田征二、滝川正春:軟骨細胞のエネルギー代謝における CCN2 の役割。第 27 回日本軟骨代謝学会、2014 年 2 月 28 日-3 月 1 日、京都

前田 彩、久保田聡、川木晴美、河田かずみ、三宅由晃、服部高子、西田 崇、森谷徳文、飯田征二、滝川正春: CCN2 は軟骨細胞のエネルギー代謝に重要である。第 5 回日本 CCN ファミリー研究会、2013 年 9 月 20 日、岡山

Maeda, A., Kubota, S., Miyake, Y., Kawata, K., Hattori, T., Nishida, T., Moritani, N., Kawaki, H., Lyons, K., Iida, S.,  Takigawa, M.: Crucial role of CCN2 in energy metabolism in chondrocytes. 2nd joint meeting of IBMS-JSBMR, Kobe, Japan, May 28-June 1, 2013.

前田 彩、久保田聡、三宅由晃、河田かずみ、西田 崇、服部高子、森谷徳文、川木晴美、Karen M Lyons、飯田征二、滝川正春:軟骨細胞のエネルギー代謝を支える CCN2/CTGF。第 26 回日本軟骨代謝学会、2013 年 3 月 1-2 日、大阪

Maeda, A., Kubota, S., Miyake, Y., Kawata, K., Nishida, T., Hattori, T., Moritani, N., Kawaki, H., Lyons, K.M., Iida, S.,  Takigawa, M.: Roles of CCN2 in energy metabolism in chondrocytes. 2012 The American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, California, December 15-19, 2012.

前田 彩、久保田聡、三宅由晃、河田かずみ、西田 崇、服部高子、森谷徳文、川木晴美、Karen M Lyons、飯田征二、滝川正春:軟骨細胞のエネルギー代謝における CCN2/CTGF の役割。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡

前田 彩、久保田聡、三宅由晃、河田かずみ、服部高子、西田 崇、森谷徳文、川木晴美、Karen M Lyons、飯田征二、滝川正春:軟骨細胞の代謝システムにおける CCN2 の役割。第 33 回岡山歯学会学術集会、2012 年 11 月 25 日、岡山

前田 彩、久保田聡、服部高子、西田 崇、飯田征二、滝川正春: CCN2/CTGF 欠損が軟骨細胞のエネルギー代謝に及ぼす影響。第 54 回歯科基礎医学会、2012 年 9 月 14-16 日、郡山

前田 彩、久保田聡、三宅由晃、河田かずみ、森谷徳文、滝川正春:軟骨細胞の基本代謝における CCN2 の役割。第 30 回日本骨代謝学会、2012 年 7 月 19-21 日、東京

〔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

三宅 由晃 (MIYAKE YOSHIAKI)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70594810

(2)研究分担者

青山 絵理子 (AOYAMA ERIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10432650

古松 毅之 (FURUMATSU TAKAYUKI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：20432651

久保田 聡 (KUBOTA SATOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90221936

尾崎 敏文 (OZAKI TOSHIFUMI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：40294459

滝川 正春 (TAKIGAWA MASAHARU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：20112063

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：