

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792235

研究課題名(和文) 骨再生開始起点である血管新生とCCN3の相互関係の解析

研究課題名(英文) The analysis of the interaction between CCN3 and vascular genesis at the point of osteogenesis

研究代表者

南里 篤太郎 (Minamizato, Tokutaro)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50529807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：CCN3は様々な細胞の増殖、分化に関与するCCNファミリーに属する。申請者らはマウス大腿骨の骨再生モデルにおいて、CCN3の発現が再生の初期で上昇することを見出した。骨芽細胞の分化と骨再生において、BMPシグナルとNotchシグナルがクロストークすること、またCCN3はそのNotchと結合して筋細胞の分化を抑制することが報告されていたため、BMPとNotchのクロストークにCCN3が関与すると考えて研究を進めた結果、CCN3がBMPシグナルとNotchシグナルを介して、骨芽細胞の分化を制御するコントロール遺伝子であることを明らかにした(J.Biol.Chem., 288, 2013)。

研究成果の概要(英文)：Several lines of evidence have demonstrated that the CCN family of proteins regulates differentiation of skeletal mesenchymal cells such as muscle cells, chondrocytes and osteoblasts. Various members of CCN family genes were expressed in osteoblastic cells, and the expression is regulated by TGF and BMP-2. These studies suggest that the CCN family of proteins is involved in regulation of osteoblast differentiation by interacting with members of the TGF superfamily. Therefore, we demonstrated that CCN3 associated with the Notch1 extracellular domain and inhibited myoblast differentiation through Notch signaling pathway, indicating the involvement of CCN3 in Notch signaling. Further, we reported that Notch signaling plays a role in BMP-2-induced osteoblast differentiation. These results prompted us to investigate the role of CCN3 in osteoblast differentiation and its involvement in the BMP and Notch signaling pathways (J.Biol.Chem., 288, 2013).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：口腔顎顔面再建外科学 組織再生

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時に発現している特定の遺伝子の発現増強や正常時に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 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、分化に関与する CCN ファミリーに属する CCN3/NOV (nephropblastoma 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)が報告されていたため、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(B.B.R.C. 354, 2007)(右下図)。また、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、研究を進めた結果、CCN3 は骨再生時に、骨芽細胞と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ことを突き止めた。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、論文作成している。近年、骨髄由来の血管内皮前駆細胞が末梢血中の単核球成分の一部として存在することが示されて以降(Science, 275, 1997)、骨髄由来細胞(BMDC)による細胞治療の有効性が血管や心筋、肝臓といった組織の再生や脳梗塞治療などで立証され、骨折治療でも、尾静脈に注入した BMDC が骨折部へ遊走し、仮骨形成の促進による創部治癒への効果が報告された(Stem Cells, 27, 2009)。骨再生には細胞や成長因子を供給するための積極的な血管新生が不可欠なため、組織修復部位での BMDC、中でも血管内皮細胞へ高確率で分化する CD34 陽性細胞による細胞治療の可能性が示唆され、また、その BMDC は骨組織と骨髄の境界領域に高頻度に存在し、骨芽細胞との接触が幹細胞の維持に重要と考えられているが、それらに関する研究は未だ十分といえない。そこで、骨再生を含めた組

織再生には、過度の再生を抑制する制御因子の存在が重要で、今までの本申請者の研究により、CCN3 が骨再生時の骨芽細胞と破骨細胞の重要な制御因子であることが突き止められたこと、CCN3 は血管内皮前駆細胞と発生的共通性を有する造血幹細胞を未分化な状態に維持していること(Science, 316, 2007)、その造血幹細胞の維持、増殖に重要な微小環境、いわゆるニッチを血管内皮細胞が形成していること(Cell, 121, 2005)から、骨再生の開始起点で、その後の組織再生因子の供給路となる血管新生に対しても、CCN3 が直接的に関与、とりわけ抑制的な働きをしていると考えられる。

また、CCN3 がクロストークしている Notch シグナルが、腫瘍の血管新生において、あたかも機能的な血管ネットワークを形成するかのごとく、血管内皮細胞増殖因子で盛んに刺激された血管新生を負に調節している報告(Nature, 444, 2006)(Nature, 444, 2006)が連続でなされた。無論、腫瘍の脈管構造は異常で混沌としているが、正常な血管新生を制御する分子メカニズムも類似していると考えられるため、CCN3 は骨再生時の血管新生に対し、直接的な作用のみならず、Notch シグナル等を介した間接的な作用により、抑制的に働いている可能性が十分に示唆される。

以上より、本申請者は CCN3 と血管新生、特に血管内皮細胞前駆細胞ともいえる CD34 陽性細胞との関係に焦点を当て、CCN3 が担うさらなる役割について探究する。これは、骨再生のみならず、他の組織再生における創薬開発の一助となり、臨床応用への基盤構築に寄与する可能性がある。

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。本申請者はこれまで、CCN3 が骨芽細胞、破骨細胞に対し、いずれの分化も制御、調整しているコントロール因子であることを突き止めた。骨再生の開始起点となり、組織再生因子の供給路となる血管新生に関し、CCN3 が直接的、間接的に作用している可能性が過去に報告されていることから、血管新生で注目されている CD34 陽性細胞と CCN3 の関係に焦点を当てた詳細な解析を行い、CCN3 の役割について核心的な知見を得ることで、骨再生のみならず、組織再生の一助となり、創薬開発などの足がかりを築くことを目的とする。

3. 研究の方法

(平成 24 年度)

< in vivo での血管新生における CCN3 と CD34 陽性細胞の相互関係についての検討 >

1) 遺伝子改変マウスの表現型の検討

- 1) 骨芽細胞特異 *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 < C57BL/6 >

において、胎児の軟骨内骨化時の血管新生、8週齢マウス大腿骨骨再生モデル(若手(B)-1の図)での血管新生や骨形成について免疫組織学的な比較検討を行う。

2) CD34 陽性細胞の役割についての検討

CD34 陽性細胞は、GFP 遺伝子改変マウス < C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) > から抽出したものを使用し、それらを上記遺伝子改変マウス、野生型マウスの骨再生モデルに用いて検討する。

) BMDC ならびに CD34 陽性細胞の単離

まず、GFP 遺伝子改変マウスから BMDC を単離する。その後、比重遠心法により単核球分画を分離し、分画から FACS にて CD34 陽性細胞群を抽出し、約 1×10^5 個の細胞を 400 μ l の DMEM に濃縮する。

) 各種骨再生モデルへの CD34 陽性細胞の投与

遺伝子改変マウス < *CCN3* Tg, *CCN3* KO >、野生型マウスの計 3 群を動物実験モデルとして、大腿骨、頭蓋骨の 2 カ所に骨再生モデルとして長径 3 mm の円形骨欠損を作成する。また、CD34 陽性細胞の投与方法は、尾静脈から投与、骨欠損部に直接投与の 2 種類で行う。

) 評価方法

1. GFP をもちいた免疫組織学的評価

ホストである野生型マウス由来の血管新生や骨形成と、ドナーである GFP 遺伝子改変マウス由来の血管新生や骨形成の違いは、FGFP 発現の有無により免疫組織学的に容易に解析できる。それを用い、CD34 陽性細胞の投与後、経時的(3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月)に骨欠損部から組織を採取し、各群間での血管新生や骨形成に対する評価を行う。また、移植部位別検討も同時に行う。

2. 形態学的評価

CD34 陽性細胞の投与後、骨欠損部に対し、経時的(3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月)な形態学的評価を μ CT にて行う。

3. 分子生物学的評価

骨欠損部の血管新生ならびに骨再生に関して、経時的(3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月)に組織を採取し、免疫組織学的、形態学的な比較検討を行う。また、移植部位別検討も同時に行う。また、それらの部位から、mRNA やタンパクを抽出し、PCR 法や Western-blot 法を用いて血管新生のマーカーとなる VEGF、また、骨形成タンパクである BMP 群、リンタンパクの検出を行う。その際、野生型マウスの大腿骨をポジティブコントロールとして用い、検出量を比較検討する。

(平成 25 年度)

<平成 24 年度に得られた in vivo での検討

結果を、in vitro で再検証する >

1) レトロウイルスベクターを用いた検討

) レトロウイルスベクターの作成

RetroNectin を用いた CD34 陽性細胞への遺伝子導入法により、コーティングした培養器上でウイルスの感染を行うだけで高い遺伝子導入効率を得ることができる (Ohno et al. 2011) ため、まず、*CCN3* を強発現するレトロウイルスベクターを作成する。

) CD34 陽性細胞への遺伝子導入

上記の遺伝子導入法により、GFP 遺伝子改変マウス < C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) > から抽出した CD34 陽性細胞に *CCN3* 遺伝子の導入を行う。

) 評価方法

FGFP 発現の有無による免疫組織学的評価にて、CD34 陽性細胞の血管内皮細胞への分化傾向を確認する。また、分子生物学的手法を用い、血管新生のマーカーとなる VEGF の発現に関して、空ベクターを導入した CD34 陽性細胞をコントロールとした比較検討を行う。

2) 骨芽細胞前駆細胞と CD34 陽性細胞の共培養による検討

CCN3 が分泌タンパクであることから、*CCN3* Tg マウスから採取した骨芽細胞前駆細胞と GFP 遺伝子改変マウスから抽出した CD34 陽性細胞を共培養し、血管内皮細胞への分化傾向を確認する。評価方法は上記 1) の) と同様である。

4. 研究成果

CCN3 は様々な細胞の増殖、分化に関与する CCN ファミリーに属する。申請者はマウス大腿骨の骨再生モデルにおいて、*CCN3* の発現が再生の初期で上昇することを見出した。骨芽細胞の分化と骨再生において、BMP シグナルと Notch シグナルがクロストークすること、また *CCN3* はその Notch と結合して筋細胞の分化を抑制することが報告されていたため、BMP と Notch のクロストークに *CCN3* が関与すると考えて研究を進めた結果、*CCN3* が BMP シグナルと Notch シグナルを介して、骨芽細胞の分化を制御するコントロール遺伝子であることを明らかにした (J. Biol. Chem., 288, 2013)。

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 3 件)

1. *CCN3* protein participates in bone regeneration as an inhibitory factor. *J. Biol. Chem.* (査読有) 288: 19973-5, 2013. Matsushita Y, Sakamoto K, Tamamura Y, Minamizato T, Kihara T, Ito M, Katsube K, Koseki H, Harada K, Yamaguchi A.
2. Peripheral-type ameloblastic fibrodentinoma with features

of so-called "immature dentinoma"
Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.
Oral Radiol. (査 読 有)
S2212-4403(13)00175-2、2013

Minamizato T, I T, Ikeda H, Asahina I

3. Clinicopathological risk factors for local recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* (査 読 有) 41(10):1195-200, 2012. Yanamoto S, Yamada S, Takahashi H, Ikeda H, Minamizato T, Shiraiishi T, Fujita S, Ikeda T, Asahina I, Umeda M.

〔学会発表〕(計3件)

CCN3 participates in bone regeneration as an inhibitory factor. The Matsushita Y, Sakamoto K, Minamizato T, Harada K, Yamaguchi. The American Society for Bone and Mineral Research 2013 Annual Meeting (ASBMR) (Oct 3-7, 2013, Baltimore)

骨再生における CCN3 の役割, 松下祐樹、坂本啓、南里篤太郎、原田清、山口朗
第7回瀬戸内フォーラム, 神戸, 8月
CCN3 は骨再生における抑制因子である,
松下祐樹、坂本啓、南里篤太郎、原田清、山口朗: 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山, 9月

〔図書〕(計1件)

南里篤太郎 他、ザ・クインテッセンス、Auto-Tooth Bone 移植

〔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・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 50529807

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: