

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861755

研究課題名(和文) OPGの新規破骨細胞形成抑制機構—破骨細胞形成促進因子CCN2との相互作用—

研究課題名(英文) New regulatory system of RANK signaling via the binding of CCN2 and OPG

## 研究代表者

青山 絵理子 (Aoyama, Eriko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10432650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：CCN2とOPGの直接的結合について固相化結合法と表面プラズモン共鳴法で解析した結果、OPGとCCN2の結合はOPGの本来のパートナーであるRANKLとの結合にも匹敵することが分かった。さらにOPGはCCN2とRANKとの結合を強く阻害した。次に、CCN2のOPGによるRANKシグナル抑制作用を検討するためマウス骨髄細胞から破骨細胞を誘導する系においてOPGとCCN2を共存させたところ、濃度依存的にCCN2はOPGの抑制作用を阻害した。このことはCCN2がOPGと結合し、その作用を抑制することを示している。  
以上の結果から、CCN2とOPGは直接結合し、相互にその作用を抑制していると言える。

研究成果の概要(英文)：CCN2 is known as a modulator of other cytokines and receptors via direct molecular interactions with them. We screened additional factors binding to CCN2 and found that receptor activator of NF-kappa B (RANK) can bind to CCN2. RANK signaling is a critical in osteoclastogenesis. Notable affinity between CCN2 and RANK was confirmed by using surface plasmon resonance (SPR) analysis. In fact, CCN2 enhanced the RANK-mediated activation of NF-kappa B, p38 and JNK pathways, in RAW264.7 cells; whereas CCN2 had no influence on RANK-RANK ligand (RANKL) binding. Moreover, CCN2 also significantly bound to osteoprotegerin (OPG), which is a decoy receptor of RANKL. Of note, OPG markedly inhibited the binding between CCN2 and RANK; and CCN2 cancelled the inhibitory effect of OPG on osteoclast differentiation. These findings suggest CCN2 as a fourth factor in the RANK/RANKL/OPG system for osteoclastogenesis, which regulates OPG and RANK via direct interaction.

研究分野：生化学

キーワード：OPG RANK CCN2 osteoclast bone marrow

## 1. 研究開始当初の背景

CCN2は骨形成の過程に関与する骨、軟骨、血管内皮細胞などの分化、増殖、遊走などに必須の因子であることが申請者の研究協力者らの研究から分かっている。しかしCCN2の作用機序の詳細は完全には解明されておらず、最近ではCCN2は自身に対応する特定の受容体をもたず、他の因子と結合することでその作用を制御し、多彩な機能を発揮していると考えられている。申請者は研究協力者である滝川正春教授らと共にCCN2が細胞外マトリックスであるaggrecanと結合し、その発現を制御すること(Aoyama et al., Biochem J., 2009)やFGF受容体であるFGFR2と結合してその下流のシグナル伝達を亢進させることでFGF2による骨芽細胞分化を促進していること(Aoyama et al., FEBS J., 2012)を明らかにしてきた。さらに最近、申請者はRANKとCCN2との結合およびCCN2のRANKシグナル促進作用をみいだした。この発見は本研究で解明を目指している作用機構の一部を成すものでもあり、本課題の着想の契機ともなった。RANKシグナルはRANKとそのリガンドであるRANKL、RANKのデコイであるOPGとの三者によって制御されているが、申請者はCCN2がこのOPGともまた生理的に有意義な結合力を示すという予備的なデータを得ており、OPGがRANKとCCN2との結合を強く阻害することを示唆する結果も得ている。このことはOPGがCCN2によるRANKシグナル促進作用を抑制する可能性を示している。また、CCN2は破骨細胞の多核化において重要な働きを担うDC-STAMPとも結合し、この作用を強めることも研究協力者らによって明らかにされている。このことからOPGはCCN2のDC-STAMPを介した破骨細胞分化促進作用においても抑制作用を示すのではないかと考え、この点についても検討を行う。また逆にOPGとRANKLとの結合をCCN2が阻害するか否かという点についても研究をすすめる。RANKL以外でRANK、OPGの両方の機能に関与する可能性をもつ因子としては今のところCCN2において他になく、その特異性を解明するためにも詳細な作用機序の検討が必要である。OPGはRANK/RANKLシグナルの抑制因子としてのみ知られているが、本研究によりCCN2との相互作用を介したOPGの新たな作用機構を明らかにすることができる。

## 2. 研究の目的

OPGがCCN2のRANKおよびDC-STAMP

を介した多核化促進作用を制御することが明らかにされればOPGが単にRANKのデコイ受容体としてRANK経路を阻害するだけでなく、RANK経路以外の経路を介して破骨細胞の分化を抑制する機構を持つことを示す初めての知見となる。すなわち、従来のOPGの作用機構を刷新しようとする点にその特色と独創性がある。また、本研究はその成果がデコイ受容体全般の作用機構に関する既成の概念を覆す新作用機構の解明につながる可能性を秘めている点で波及的効果の大きい革新的研究といえる。またOPGの作用を制御する生体内分子は今のところまだみつかっておらず、CCN2がOPGの破骨細胞形成を抑制する作用を阻害することが示されればCCN2はRANK/RANKL/OPG経路を制御する第四の因子であることが明らかになる。

RANK/RANKL/OPGシグナルを介した細胞間相互作用機構は骨粗鬆症、関節リウマチ、癌の骨転移などの骨代謝の異常を伴う疾患治療のための創薬において重要なターゲットとなっており、実際にOPGや抗RANKL抗体はすでに臨床で用いられている。本研究によりOPGの新たな破骨細胞抑制機構やCCN2のRANKシグナル制御因子としての役割を示すことができれば上記のような疾患の病態への理解がよりいっそう深まり、その結果、CCN2とRANKおよびOPGとの結合を制御するペプチドや抗体などの開発等創薬の新たな潮流が生まれることが期待される。

## 3. 研究の方法

### I. OPGとCCN2との結合に関する化学的な検討

OPGとCCN2という新しい分子間相互作用に関する基礎的なデータを得るだけでなく、RANK/CCN2/OPG相互作用の検討においても必要となる情報を得るため、以下の検討を行う。まず両者の結合の特異性を確認し、反応速度定数を算出する。これらの実験に関しては既に予備的な検討を行っており、この両者が特異的に結合することや反応速度定数の解析からこの結合はOPGとRANKLの結合に匹敵するものである可能性が示されている。さらにCCN2のどのドメインがOPGおよびRANKと結合性を持つのかという点についても明らかにしておく。

### II. RANKとの結合を介したCCN2の破骨細胞分化促進作用に対するOPGの抑制作用の検討

CCN2による破骨細胞形成促進機構の一つと考えられるRANKへの結合とそのシグナルの増強作用について再確認するとともにOPGの作用を検討するため以下の実験を行う。まずin vitroの系でCCN2とRANKとの結合をOPGが抑制するかどうかを調べる。さらにin vivoの系としてRAW264.7細胞を用いてCCN2のRANKシグナル増強作用がOPGによって抑制されるかどうかを調べる。

### III. DC-STAMP との結合を介した CCN2 の多核化促進作用に対する OPG の抑制作用の検討

CCN2によるもう一つの破骨細胞形成促進機構と考えられるDC-STAMPの発現促進とそれに対する結合および多核化の促進作用におけるOPGの作用を検討するため以下の実験を行う。まず、CCN2とDC-STAMPの結合はOPGが阻害するかどうかをin vitroの系で確認する。さらにRAW264.7細胞におけるCCN2によるDC-STAMPの発現促進作用がOPGの存在下で抑制されるかどうか、さらには多核化促進作用がOPGによって阻害されるのかどうかについても検討を加える。

### IV. OPGのRANKシグナル抑制作用に対する CCN2の阻害作用の検討

OPGとCCN2の結合はCCN2の破骨細胞形成促進作用に対して影響をおよぼすだけでなく、反対にCCN2がOPGの機能にもまた影響を与えているのではないかという可能性を明らかにするため以下の実験を行う。OPGはRANKのリガンドであるRANKLと結合し、RANKとの反応を妨げていることからOPGとRANKLとの結合がCCN2の共存によって変化するかどうかをin vitroの系で調べる。さらにRAW264.7細胞をもちいてOPGによるRANKシグナル阻害作用がCCN2によって回復できるかどうかを観察する。

### 4 . 研究成果

CCN2 の作用機構の特徴としてさまざまな因子と結合し、その作用を制御することが知られている。我々はCCN2の結合パートナーとなる因子を探索すべく、これまでさまざまなスクリーニングを行った。そして、その結果から aggrecan, FGFR, RANK などの細胞外基質、膜タンパク質と結合し、そのシグナルを制御することを示してきた。RANK は TNF 受容体ファミリーの一つであり、破骨細胞形成においては RANK シグナルが必須の役割を担っていることが知られている。RANK シ

グナルはそのリガンドである RANKL およびデコイレセプターである OPG との三者によって制御されている。我々はこれまでにCCN2がRANKと結合し、そのシグナルを促進していることを示してきた。

そこで、CCN2とRANKのデコイレセプターであるOPGとの関連について検討を行った。まず、CCN2とOPGの直接的結合について固相化結合法と表面プラズモン共鳴法で解析した。その結果、OPGとCCN2の結合はOPGの本来のパートナーであるRANKLとの結合にも匹敵することが分かった。さらにCCN2とRANKとの結合へのOPGの作用を調べたところ、OPGはこれらの結合を強く阻害した。次に、CCN2のOPGによるRANKシグナル抑制作用を検討するためマウス骨髄細胞から破骨細胞を誘導する系においてOPGとCCN2を共存させたところ、濃度依存的にCCN2はOPGの抑制作用を阻害し、RANKLによる破骨細胞形成を回復させた。このことはCCN2がデコイレセプターであるOPGと結合し、その作用を抑制することを示している。

以上の結果から、CCN2とOPGはそれぞれRANKおよびRANKLへの結合を介してRANKシグナルを制御するだけでなく、CCN2とOPGが直接結合し、相互にその作用を抑制していることが明らかになった。

### 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. Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Hany Mohamed Khattab, Takashi Nishida, Masaharu Takigawa: CCN2 enhances RANKL-induced osteoclast differentiation via direct binding to RANK and OPG. Bone 73 (2015) 242–248 (査読あり)

[学会発表](計 8 件)

1. 青山絵理子、星島光博、服部高子、久保田聡、滝川正春：破骨細胞分化における新規CCN2結合タンパク質DCL-1の発現と機能。第87回日本生化学会、2014、10、15-18、京都
2. 青山絵理子、星島光博、服部高子、久保田聡、滝川正春：新たなCCN2結合因子DCL-1の破骨細胞分化における役割。第56回歯科基礎医学会、2014、9、25-27、福岡

3. 青山絵理子、西田崇、久保田聡、滝川正春：RANK デコイレセプターOPG と CCN2 の相互作用. 第 6 回日本 CCN ファミリー研究会、2014.8.30、岡山
4. 青山絵理子、服部高子、滝川正春：CCN2 結合因子 DCL-1 の破骨細胞分化制御因子としての役割. 第 32 回日本骨代謝学会、2014, 7,24-26, 大阪
5. Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Takashi Nishida, Masaharu Takigawa: CCN2 induces osteoclastogenesis by regulating RANK/RANKL/OPG system. 2014 The European Calcified Tissue Society Congress, 17 - 20 May 2014, Prague, Czech Republic
6. Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Takashi Nishida, Masaharu Takigawa: CCN2 enhances osteoclastogenesis via its direct bindings to RANK and OPG. 第 3 回岡山医療教育・研究国際シンポジウム 2013.9.22-23、岡山
7. Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Takashi Nishida, Masaharu Takigawa: Molecular mechanism of CCN2-induced osteoclastogenesis. Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013, July 6th - 11th 2013, St. Petersburg, RUSSIA
8. Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Takashi Nishida, Masaharu Takigawa: CCN2 enhances osteoclastogenesis via its direct bindings to RANK and OPG. IBMS-JSBMR 2013, 2013.5.28 -6.1, 神戸

発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 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

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

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

〔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：