

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861734

研究課題名(和文)骨再生過程におけるCCNファミリー分子の役割の解析と骨再生療法への応用

研究課題名(英文)Role of CCN family proteins during bone regeneration and bone regeneration therapy

研究代表者

松下 祐樹 (MATSUSHITA, Yuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：00713827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：CCN3はCCNファミリーに属する分泌性タンパク質であり、申請者はこれまでにCCN3が骨再生過程で発現が上昇し、骨再生に対して抑制的に働くことを明らかにした。本研究では、CCN3以外のCCNファミリー遺伝子、BMPアンタゴニストとのクロストークに着目し、解析を行った。

野生型マウス、Ccn3遺伝子改変マウスを用いて骨再生過程におけるCCN1、CCN2、Noggin、Chordin、Gremlin 1の発現を免疫染色、Real time RT-PCRで解析したところ、CCN3の欠失、過剰発現によりCCNファミリー遺伝子、BMPアンタゴニストの発現の変動が認められた。

研究成果の概要(英文)：CCN3, a member of the CCN protein family, is a matricellular protein. We had elucidated that CCN3 is upregulated during bone regeneration and inhibits osteoblastogenesis. In this study, we investigated the relationship between CCN3 and other CCN family proteins or BMP antagonists. We analyzed the expression levels of CCN1, CCN2, Noggin, Chordin, and Gremlin 1 by immunohistochemistry and Real time RT-PCR analysis using CCN3 mutant mice. Both loss of function and gain of function of CCN3 induced fluctuation of CCN family proteins and BMP antagonists.

研究分野：医歯薬学

キーワード：CCN3 BMPアンタゴニスト 骨再生

1. 研究開始当初の背景

骨組織は再生能力の強い組織の一つである。骨再生はサイトカイン、ケモカイン、転写因子、細胞外マトリクスなどの種々の因子の相互作用で進行するが、その詳細は十分に明らかにされていない。このような複雑な骨再生過程における分子機構を解明するために、研究協力者の山口朗はマウス骨再生モデルを用いて骨再生過程で発現する分子の網羅的解析を行い、骨再生初期で発現が上昇する遺伝子として *Ccn3* を同定した。本研究申請者は、山口らと共同で骨再生過程における CCN3 の役割を明らかにすることを目的として研究を推進してきた。

CCN3 は CCN ファミリー (*CYR61*, *CTGF*, *NOV* の頭文字に由来する) に属する分泌性タンパク質で、現在までに 6 種類の CCN ファミリー分子 (*CCN1-CCN6*) が知られている。これらの CCN ファミリー分子は 4 つのドメインで構成され、細胞の増殖、遊走、分化などを制御し、血管形成、創傷治癒、腫瘍形成などで重要な役割を担っている (*Lancet* 363:62-64, 2004, *Science* 316:590-593, 2007)。CCN3 は、骨芽細胞の分化過程で BMP-2 と直接結合して、BMP シグナル経路を抑制し、骨芽細胞分化を抑制することが報告されている (*Biochem Bioph Res Co* 354:567-573, 2007)。また CCN3 以外の CCN ファミリー分子は骨芽細胞の分化過程で、時期特異的に発現が上昇することも報告されているが (*BONE* 49:975-989, 2011)、各々の CCN ファミリー分子の骨再生過程における役割は明らかにされていない。このような背景を基盤として、申請者は野生型マウス、transgenic (*Ccn3* Tg)、CCN3 knockout (*Ccn3* KO) mouse の骨再生過程を解析することにより、以下のことを明らかにした (*J Biol Chem* 288:19973-19985, 2013)。

- 1) 野生型マウス大腿骨の正常状態における CCN3 の発現は mRNA・タンパク質レベルで極めて低かったが、骨再生過程では発現が著明に上昇した。
- 2) *Ccn3* Tg マウス (2.3-kb *Coll1a1* promoter を使用) は野生型マウスに比べて有意な骨量減少を呈し、*Ccn3* KO マウスの

骨格の表現型は野生型マウスと有意な差は認められなかった。

- 3) *Ccn3* KO マウスでは、野生型マウスに比べて骨再生初期での骨芽細胞分化関連遺伝子の発現が有意に上昇し、骨再生も亢進していた。*Ccn3* Tg マウスでは、骨再生過程に顕著な変化はみられなかった。

以上の結果より、申請者は CCN3 は骨再生過程の初期に発現が特異的に上昇することにより BMP のアンタゴニストとして働き、骨再生を抑制していることを明らかにした。また、*Ccn3* KO マウスと野生型マウスの表現型に差がないことから、CCN3 は成長した野生型マウスの骨格の維持には重要な役割を担っておらず、その作用は他の因子で代償されていることが示唆された。しかしながら CCN3 とそれに類似した構造を持つ他の CCN ファミリー分子の骨再生過程における発現、機能とその相互関係はこれまでに解明されていなかった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、骨再生過程において発現が上昇する遺伝子として CCN3 に着目し、CCN3 が骨再生過程で抑制的に働くことを明らかにした。また、骨再生過程では、様々な遺伝子の発現変動あり、CCN3 の機能を代償する因子が存在している可能性も示唆された。そのため、本研究では、CCN3 と BMP アンタゴニストとのクロストークに着目し解析し、骨再生機構の統合的理解を深めることによって、CCN3 の骨再生療法への応用へ寄与させることを目的とする。

3. 研究の方法

1) マウス骨再生モデル

8 週齢雄性マウス大腿骨骨幹部に直径 1.2mm のドリルを用いて円形骨欠損を作成し、骨再生モデルとし、経時的な治癒過程を観察する。この方法では、骨欠損部周囲の骨膜を削除するので、軟骨内骨化を起こさない治癒過程を示し、骨再生過程を特異的に観察することができる。

2) 骨再生過程における CCN ファミリー、BMP アンタゴニストの発現

上記骨再生モデルを用いて、野生型マウスおよび *Ccn3* KO マウスに骨欠損作成後、5、10、15 日目に骨再生部位の解析を行う。遺

伝子発現の解析として、骨再生部位よりRNAを抽出し、*Ccn1*, *Ccn2*, *Ccn4*, *Ccn5*, *Ccn6*などのCCNファミリーの発現と*Noggin*, *Chordin*などのBMPアンタゴニストの発現をreal time RT-PCR法を用いて解析する。また、骨再生部位のパラフィン包埋した脱灰切片を用いて、CCNファミリー、BMPアンタゴニストの発現を免疫染色とin situ hybridization法で解析する。現時点で、*Ccn3* KOマウスにおいて、骨再生時に*Noggin*, *Chordin*, *Gremlin1*の発現が上昇していることがreal time RT-PCRにより確認できている。

3) rhCCN3を添加した培養細胞における、CCNファミリー、BMPアンタゴニストの発現の変動

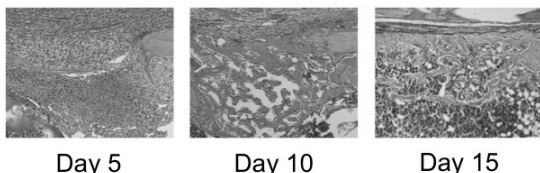
MC3T3-E1細胞、ST2細胞に対してrhCCN3を添加し、3日、6日でRNAを抽出し、CCNファミリー、BMPアンタゴニストの発現を解析する。

4) CCN3と強い関連のある遺伝子を上記実験でつきとめ、その遺伝子との相互作用のメカニズムを解析する。

4. 研究成果

1) マウス骨再生モデル

8 週齢雄性マウス大腿骨骨幹部に直径1.2mmのドリルを用いて円形骨欠損を作成後、5、10、15日後にマイクロCT解析、組織学的解析を行った。5日目では骨欠損部位の骨髄側に間葉系細胞が出現し、10日目で類骨の形成を認めた。15日目では残存皮質骨から連続的なBone Bridgeを認めた。また骨髄中心部に存在していた類骨は減少した。治癒過程を通して軟骨の形成はなかった。このことから安定した膜性骨化モデルとして以降の解析に使用した。



2) 骨再生過程におけるCCNファミリー、BMPアンタゴニストの発現

上記骨再生モデルを用いて、野生型マウス、*Ccn3* KOマウス、*Ccn3* Tgマウスの骨再生過

程における他のCCNファミリーの発現、BMPアンタゴニストの発現を評価した。CCN1、CCN2は免疫染色により骨再生時に発現が上昇することが明らかとなった。野生型マウスと*Ccn3* KOマウスを比較したところ、有意差は認められなかったものの、野生型マウスでのCCN1、CCN2の発現強度が*Ccn3* KOに比べて強い傾向があった。*Ccn3* KOマウスでは骨再生時にBMPアンタゴニストのmRNA発現が上昇していた。一方で、*Ccn3* Tgマウスでは野生型マウスに比べて有意差は認められなかった。

3) rhCCN3を添加した培養細胞における、CCNファミリー、BMPアンタゴニストの発現の変動

当初MC3T3-E1細胞、ST2細胞を用いて解析する予定であったが、野生型マウス大腿骨より骨髄細胞を採取、培養し、rhCCN3添加による効果を解析した。

本研究の結果から、CCN3はBMPアンタゴニストや他のCCNファミリーと相互作用を持つことが示唆された。しかしながら、CCN3とクロストークする遺伝子をin vivoにおいて解明するためには免疫染色や組織からのmRNA発現解析以外の手法として、*Ccn3*-GFPマウスと現在所持している遺伝子改変マウスを交配させ、CCN3を可視化させた上でフローサイトメトリーやRNAシーケンスなどを行うことで、より詳細なメカニズムをつきとめられると考えられ、今後の検討課題としたい。

本研究内容とその研究手法を"Methods in Molecular Biology" seriesの"CCN Proteins: Methods and Protocols"として発表予定である。

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)
Sakamoto K, Matsushita Y, Minamizato T, Katsuki Y, Katsube K, Yamaguchi A. The bone regeneration model and primary osteoblastic cell culture used in the analysis of CCN3 transgenic and knockout mice. Methods in Molecular Biology. In press.

[学会発表] (計1件)
Matsushita Y, Yamaguchi A. CCN3 Protein

Participates in Bone Regeneration as an Inhibitory Factor. The 40th International Conference on Craniofacial Research (ICCR). March 6, 2015, Ann Arbor, USA.

〔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

松下 祐樹 (MATSUSHITA, Yuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・客員研究員

研究者番号：00713827