

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893161

研究課題名(和文) Rab14とCCN2の相互作用が骨・軟骨の細胞に与える新たな機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of novel intracellular function of interaction between CCN2 and Rab14 in bone and cartilage cells

研究代表者

星島 光博 (Hoshijima, Mitsuhiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30736567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Rab14とCCN2の結合様式を明らかにし、両者の相互作用が細胞内の小胞輸送に及ぼす影響や、骨・軟骨の細胞または組織に与える生理的作用を検証することを目的とした。初年度では、Rab14がCCN2のIGFBPドメインに結合すること同定し、両者が細胞内で共局在することで小胞輸送を制御することを明らかにしてきた。本年度は、Rab14およびCCN2の発現あるいは機能を抑制することで、軟骨細胞の小胞体ストレスが上昇し、プロテオグリカンの分泌が減少することを示した。これらの結果から、Rab14とCCN2は細胞内で相互作用し、軟骨細胞の基質産生を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify interactive domain between CCN2 and Rab14, and to investigate its role in the physiological activity in bone and cartilage cells. The studies revealed the following: .....  
 1) CCN2 bound to Rab14 through its IGFBP domain among the four domains in CCN2. 2) CCN2 and Rab14 co-localized in cells, and regulated in intracellular membrane trafficking. 3) ER and Golgi stresses were increased by suppressing the expression of rab14 and ccn2 mRNA. 4) A dominant negative form of Rab14 overexpression decreased proteoglycan accumulation in HCS-2/8 cells. These results suggest that intracellular CCN2 is associated with Rab14 on proteoglycan-containing vesicles during their transport from golgi to endosomes in chondrocytes and that the association play some role in proteoglycan synthesis by chondrocyte.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：骨・軟骨組織 細胞内輸送 Rab14 CCN2

1. 研究開始当初の背景

CCN2は軟骨に強い発現を示し、軟骨細胞の増殖・分化だけでなく、線維芽細胞や血管内皮細胞の接着・遊走など多彩な生理機能を発揮する液性因子である。また、CCN2の異所的な過剰発現は、線維症の誘発や乳癌の転移に関与することが知られていることから、生体内においてCCN2と相互作用する分子の機能を明らかにすることは、これらの疾病の原因や特異的な治療法の解明にもつながることが予想される。そこで、これまでに yeast two-hybrid 法を用いて、ヒト軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 より作製した cDNA ライブラリーから、CCN2 と結合する幾つかの因子を同定し、その1つは小胞の細胞内輸送に関与する Rab14 であった。

2. 研究の目的

本研究では、小胞の細胞内輸送を制御する因子 Rab14 と軟骨分化促進因子 CCN2 について、これらの分子間相互作用が骨、軟骨の細胞に与える新たな機能と作用機構の解明を目的とする。申請者はこれまでに、CCN2 の結合因子として Rab14 を同定してきた。また、今回の検討で各々が骨で強く発現し、軟骨においても発現を示すことを明らかにした。そこで、(1) CCN2 と Rab14 がどのような結合様式を取り細胞内の小胞輸送を制御しているか、(2) CCN2 と Rab14 の相互作用が骨や軟骨の細胞または組織にどのような生理的作用を与えるのかを検証することとした。これらの研究成果は、骨、軟骨の形成不全や過形成を症状とする疾病の原因や、特異的な治療法の解明にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

(1) Rab14 が CCN2 のどのドメイン構造を介して結合するかを、選択培地を用いた生育アッセイにより調べた。

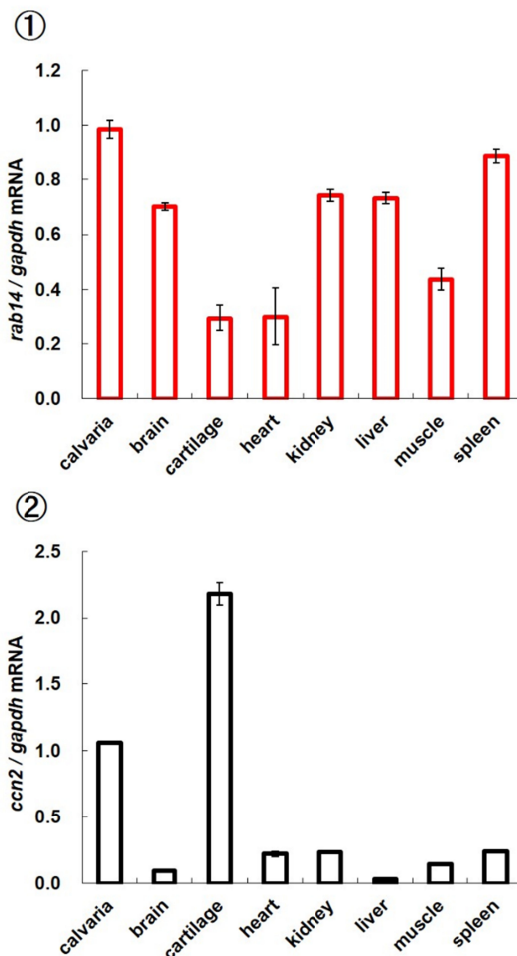
(2) CCN2 と Rab14、および Rab14 の constitutive active form あるいは dominant negative form を COS7 細胞中で異所性に発現させ、それらの細胞内局在を調べた。

(3) HCS-2/8 細胞で siRNA を用いて、CCN2 および Rab14 の発現をノックダウンし、小胞あるいはゴルジストレスに関与する因子の mRNA 発現レベルを、real time PCR 法により解析した。また、Rab14 およびその変異体を HCS-2/8 細胞に過剰発現させ、プロテオグリカンの蓄積をトルイジンブルーおよびアルシアンブルー染色により調べた。

4. 研究成果

(1) 生後 4 日目のマウスの各臓器から得られた mRNA を用い、*rab14* および *ccn2* mRNA の発現についてその分布を RT-PCR により調べた。*rab14* mRNA は頭蓋骨、脾臓等

で高い発現を示し、肋軟骨においても発現が見られた。*ccn2* mRNA は、肋軟骨およ



び頭蓋骨で高い発現を認めた。図 1 *rab14* および *ccn2* mRNA は、マウスの骨、軟骨組織で発現している。

(2) 酵母内に Rab14 の全長をコードする pGADT7/*rab14* と、CCN2 の各ドメインをコードする pGBKT7/*ccn2* fragments を遺伝子導入し、選択培地での生育性により結合を確かめた。Rab14 は IGFBP ドメインを含む CCN2 欠損変異体のみ結合したことから ( ), Rab14 と CCN2 の結合は、IGFBP ドメインを介することが明らかとなった (mock : pGBKT7 または pGADT7 コントロールベクター)。

pGBKT7/ <i>ccn2</i> fragments	pGADT7/	mock	<i>rab14</i>
mock			
- IGFBP - VWC - TSP-1 - CT -			+
- VWC - TSP-1 - CT -			
- TSP-1 - CT -			
- CT -			
- IGFBP -			+
- VWC -			
- TSP-1 -			

図2 CCN2はRab14と、IGFBPドメインを介して結合する。

(3) GFP融合CCN2タンパク質とHalo融合Rab14タンパク質(Rab14 WT)、またはそのconstitutive active form (Rab14 CA)あるいはdominant negative form (Rab14 DN)をCOS7細胞で共発現させ、細胞内の局在を調べた。コントロールとして、GFPおよびHaloタンパク質を発現させた。CCN2を共発現しない場合、Rab14 WTは細胞質全体に均一に分散した。CCN2とRab14 WTを発現すると、両者は細胞質全体でドット状に共局在した。CCN2とRab14 CAを発現することで、両者はより細胞質全体に広くドット状に共局在した。CCN2とRab14 DNは主に核周辺の領域に集積してドット状に共局在した。

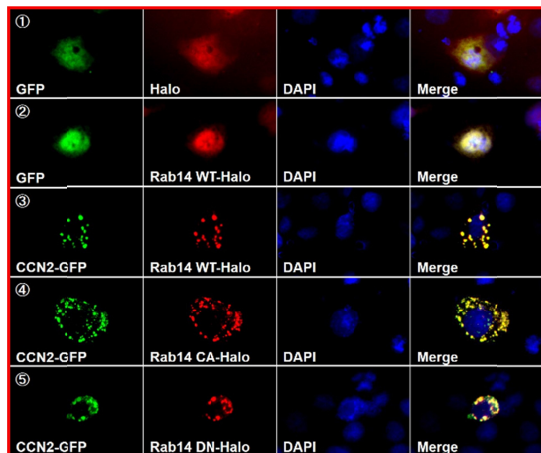


図3 Rab14はCCN2と相互作用することで小胞に集積し、細胞質輸送に関与している。

(4) HCS-2/8細胞において、*ccn2*あるいは*rab14* mRNAの発現をsiRNAによりノックダウンした(\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。 *ccn2* mRNAのノックダウンにより*rab14* mRNAの発現レベルに変化はなかったが、*aggrecan* mRNAの発現低下とともに小胞体ストレス下で誘導される*bip*、*chop* mRNA、ゴルジ体ストレスにより誘導される*siat4a* mRNAの発現レベル上昇が観察された。 *rab14* mRNAのノックダウンでは、*ccn2*および*aggrecan* mRNAの発現レベルに変化はなかったが、*bip*、*chop*および*siat4a* mRNAの発現レベルは有意に上昇していた。

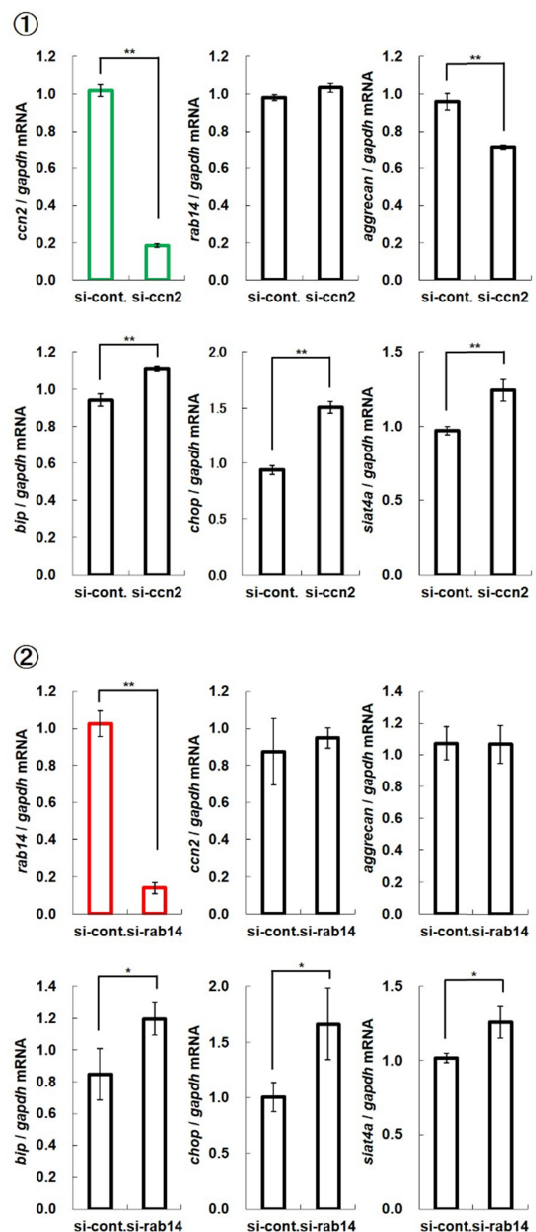


図4 軟骨細胞におけるCCN2およびRab14の発現抑制は、小胞体とゴルジ体にストレスを誘発する。

(5) Rab14 WTまたはRab14 CAあるいはRab14 DNをHCS-2/8細胞に過剰発現させ、プロテオグリカンの蓄積をトルイジンブルーおよびアルシアンブルー染色により調べた。Rab14 DNをHCS-2/8細胞に過剰発現させた際に、プロテオグリカンの蓄積がControlベクターを過剰発現させたものと比較して、75%以下に低下した。Rab14 WTまたはRab14 CAの過剰発現では、プロテオグリカンの蓄積に変化は見られなかった(\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。

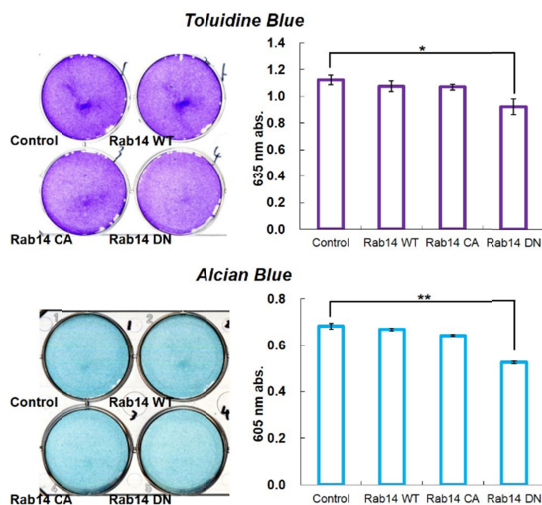


図5 Rab14の活性低下は、軟骨細胞におけるプロテオグリカンの蓄積を抑制する。

#### (6)まとめ

CCN2とRab14は、IGFBPドメインを介して相互作用する。  
 CCN2とRab14は細胞内で共局在し、小胞の分布を調節している。  
 軟骨細胞において、Rab14の発現抑制が小胞体、ゴルジ体ストレスを誘導する。  
 Rab14の活性を抑えることで、軟骨細胞におけるプロテオグリカンの蓄積が低下する。

これらの結果から、軟骨細胞内でRab14はCCN2と相互作用することで小胞に集積し、プロテオグリカンなどを含む小胞の輸送を促進していることが示された。

このような分子間相互作用の解明は、軟骨細胞の異常に起因する疾病の特異的治療薬開発や、病因の究明等に貢献できる可能性を秘めている。

#### <引用文献>

- Perbal B & Takigawa M *Imperial College Press*, London. 2005.  
 Hoshijima M et al. *FEBS J.* 279, 3584-3597, 2012.  
 Jagath R et al. *Molecular Biology of the Cell* 15, 2218-2229, 2004.  
 Takigawa M et al. *Cancer Res.* 49, 3996-4002, 1989.

#### 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)

Hoshijima M, Hattori T, Takigawa M: Protocols for screening binding partners to CCN proteins: Yeast two hybrid system. In *Methods in Molecular Biology: CCN Proteins: Methods and Protocols*, Springer, in press 2016.

#### [学会発表](計 4件)

Hoshijima M, Hattori, T., Aoyama, E., Nishida, T., Kubota, S., Kamioka, H., Takigawa, M.: Role of interaction between CCN2 and Rab14 in vesicle trafficking in chondrocytes novel intracellular function of CCN2. Eight International Workshop on the CCN Family of Genes, Nice, France, November 3-8, 2015. (Oral)

星島光博, 服部高子, 青山絵理子, 西田崇, 久保田聡, 上岡寛, 滝川正春: CCN2とRab14の相互作用が軟骨細胞の小胞輸送に及ぼす役割 ~ 軟骨分化促進因子CCN2の新たな細胞内機能 ~, 第57回歯科基礎医学会, 新潟, 2015.9.11-13 (口頭発表)

星島光博, 服部高子, 青山絵理子, 西田崇, 久保田聡, 上岡寛, 滝川正春: CCN2の新たな細胞内機能: CCN2とRab14の相互作用が軟骨細胞の小胞輸送に及ぼす役割, 第7回日本CCNファミリー研究会, 岡山, 2015.8.29 (口頭発表)

星島光博, 服部高子, 青山絵理子, 西田崇, 上岡寛, 滝川正春: CCN2とRab14の相互作用が軟骨細胞の小胞輸送に及ぼす役割, 第28回日本軟骨代謝学会, 東京, 2015.3.6-7 (口頭発表)

#### [その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/kyousei/classroom/event.html>

<http://www.dent.okayama-u.ac.jp/arcocs/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

星島 光博 (HOSHIJIMA, Mitsuhiro)

岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科

・助教

研究者番号: 30736567