

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11247

研究課題名(和文) 軟骨再生医療を視野に入れたCTGF/CCN2発現促進機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the CTGF/CCN2 expression promotion system which classified cartilage regenerative therapy into the field

研究代表者

森谷 徳文 (Moritani, Norifumi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60467751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CEBPB, CEBPDがCTGF/CCN2の発現変化を調節し、この調節経路にIL16, COL12A1の関与を示唆する結果が得られた。また、CEBPB, CEBPDは核内で発現しCTGF/CCN2と同じ様な発現パターンを示し、CCN2のpromoter領域にCEBPB, CEBPDが作用していることを示唆する結果が得られた。さらにCEBPB, CEBPDを強制発現させるとプロテオグリカン合成の促進していることを示唆する結果が得られた。一方、鎖骨頭蓋異形成症症例についてRUNX2遺伝子のフレームシフト変異を同定し、歯の切片を用いてRUNX2とCTGF/CCN2の発現局在を確認した。

研究成果の概要(英文)：CEBPB, CEBPD-adjusted altered expression of CTGF/CCN2, and their regulatory pathways are suggested to influence IL16 and COL12A1 activities. Interestingly, CEBPB and CEBPD were observed to develop in the nucleus and exhibit expression patterns similar to CTGF/CCN2. Results suggesting CEBPB and CEBPD activity in the CCN2 promoter region were also obtained. Furthermore, results suggesting that CEBPB and CEBPD accelerated proteoglycan synthesis were obtained when they were forcibly expressed. Finally, we also identified a RUNX2 gene frameshift mutation in a cleidocranial dysplasia patient and confirmed RUNX2 expression and CTGF/CCN2 localization using teeth tissue sections.

研究分野：口腔外科学

キーワード：CTGF/CCN2 軟骨再生 RUNX2

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨組織は一度欠損すると元に戻すことは極めて困難で、現時点では軟骨再生医療は現実的ではないと考えられている。例えば、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA)、変形性膝関節症を含む変形性関節症 (osteoarthritis: OA)、顎顔面領域では RA や OA に続発する変形性顎関節症、顎変形症の術後に生じる Progressive Condylar Resorption (PCR) などの疾患では骨破壊の前に、まず軟骨破壊が起こる。ゆえにこれらの疾患に対しては軟骨再生が重要な課題であるが、現時点で有効な方法はなく、病状の進行を食い止める事に終始せざるを得ないのが現状である。このような現状を打破するには軟骨再生の確立が重要な要素であるため、それを目指す研究は広く行われてきた。しかしながら、現状では軟骨再生へのゴールにはまだほど遠い状況であるため、基盤となる基礎データの蓄積が最重要課題となっていた。

我々はこれまで CTGF/CCN2 の機能、とりわけ軟骨細胞におけるその機能について分子生物学的手法を用いて研究しており、CTGF/CCN2 は内軟骨性骨化を全面的に促進し、軟骨の成長・分化に重要な成長因子であることを明らかとしていた。この一連の研究の中で、ラット膝関節軟骨に全層欠損を作成し、そこへ徐放性担体に吸着させた組み替え CTGF/CCN2 タンパク質を充填すると、骨化は起こさずに、軟骨再生効果のみを発揮することを明らかとした。さらに、合成グルココルチコイドの1つ、デキサメタゾン (Dexamethasone; 以下 Dex と略す) を軟骨細胞に作用させると CTGF/CCN2 の mRNA、タンパク質の発現が促進することを見出した。すなわ

ちデキサメタゾンが、軟骨の成長、分化を促進する CTGF/CCN2 の発現を誘導すること、そしてその CTGF/CCN2 は軟骨再生機能を発揮することを明らかとした。しかしこれだけでは、軟骨再生への臨床応用には、ほど遠い状況であった。よく知られているように Dex は CTGF/CCN2 だけでなく多くの遺伝子に働き、細胞生理を大きく変調する。よってこれを直ちに軟骨再生目的に使用することは問題が多い。また興味深いことに、ヒト CTGF/CCN2 遺伝子にはグルココルチコイドが受容体とともに作用するはずの Glucocorticoid Response Element (GRE) が、いまだ同定されていなかった。

そこで我々は、Dex の作用を媒介して CTGF/CCN2 発現を促進する 2 次メッセンジャーの存在を疑い、直接 CTGF/CCN2 発現をコントロールしているこの因子を解明すれば、それを介して CTGF/CCN2 をコントロールし、軟骨の成長・分化を導くことが可能となる。申請者らはこれこそ軟骨再生への鍵となるのではないかと考えた。以上の発想に基づいて研究を開始し、すでにこれまでの研究で、Dex を軟骨細胞に作用させて発現変動する遺伝子の中から、転写因子として働く CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-beta、-delta の 2 遺伝子を選んで解析した。その結果 C/EBP-beta、-delta が CTGF/CCN2 の発現調節を行っている事を示唆する新たな知見が得られた。そのため今後はさらにこの 2 遺伝子が、どのように CTGF/CCN2 の発現調節を行っているかを解析することから開始し、最終的には軟骨再生に寄与する鍵となる因子の発見を目指した。

## 2. 研究の目的

現時点では軟骨再生医療は極めて困難と考えられている。しかし我々は結合組織成長

因子/CCN ファミリー2(CTGF/CCN2)が軟骨の成長・分化・再生機能を持ち、そのCTGF/CCN2 発現はグルココルチコイドの作用によって促進されることを見出した。ゆえにこのメカニズムを、より詳細に解析し応用すれば軟骨の効率的再生の実現が可能となるのではないかとこの着想に至った。本研究では CTGF/CCN2 発現促進メカニズムを解析し、CTGF/CCN2 発現の促進を直接指揮している新たな因子を見出し、それを *in vitro* および *in vivo* で解析することによって軟骨再生医療へつながる基盤的成果を得ることを目的とした。

### 3 . 研究の方法

本研究ではまず始めに、これまでの研究で明らかとなった遺伝子の候補の中でCTGF/CCN2 遺伝子発現を直接コントロールする他の新規の関連遺伝子を検索した。この解析には候補遺伝子に対して RNA 干渉(RNA interference; RNAi)と強制遺伝子発現(DNA transfection)の手法を用いて、それぞれの結果 CTGF/CCN2 遺伝子発現の抑制、促進がおこるか否かの検証をした。これにより新規の関連遺伝子が同定されれば、これを NCRF として、CTGF/CCN2 とともに軟骨代謝における役割を *in vitro* において検討した。そして、NCRF を介して CTGF/CCN2 を特異的に誘導する細胞外分子(NCRFim)を探索した。

### 4 . 研究成果

CEBPB、CEBPDがCCN2の発現変化を調節している可能性が示唆する結果が得られたため、この調節経路に関与している CEBPB、CEBPD以外の因子について検討したところIL16、COL12A1の関与を示唆する結果が得られた。軟骨細胞様細胞株HCS-2/8細胞株を dexamethasoneで刺激し、CEBPB、CEBPDの局在を確認したところ核内で発現しCCN2と同じ様な発現パターンを示唆する結果が得られた。また同細胞株にCEBPB、CEBPDの全長

遺伝子とCCN2のpromoterを組み込んだvectorをco-transfectionしルシフェラーゼアッセイを行ったところ、CCN2のpromoter領域にCEBPB、CEBPDが作用していることを示唆する結果が得られ、さらにHCS-2/8細胞株にCEBPB、CEBPD全長遺伝子をtransfectionするとプロテオグリカン合成を促進する可能性がある結果が得られ、CEBPB、CEBPDが軟骨細胞の成長・分化を促進する可能性が示唆された。

一方、過去の報告より、RUNX2遺伝子がCCN2をコントロールしていると考えられたためRUNX2遺伝子変異によって起こるとされる鎖骨頭蓋異形成症症例について

RUNX2遺伝子変異の同定を行ったところRUNX2遺伝子の1205塩基目のシトシンが欠失し、フレームシフト変異を起こしていることが明らかとなった。臨床症状についても詳細に検討し、鎖骨低形成、永久歯の晩期残存、乳歯の萌出遅延、過剰埋伏歯などを認めることが明らかとなった。次に正常萌出した小臼歯と同症例より抜歯した埋伏過剰歯の組織切片を作成し、免疫染色法にてRUNX2およびCCN2のタンパク質発現の局在を調べたところ、鎖骨頭蓋異形成症と健常者との間ではその発現パターンに違いがあることを示唆する結果が得られた。

### 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 2 件)

以下すべて査読有

1. K. Kawata, S. Kubota, T. Eguchi, E. Aoyama, N. Moritani, M. Oka, H. Kawaki, M. Takigawa. A tumor suppressor gene product, platelet-derived growth factor receptor-like protein controls chondrocyte proliferation and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017; 118(11): 4033-4044. doi: 10.1002/jcb.26059.

2. E. Yamachika, Y. Matsui, M. Matsubara, T. Matsumura, N. Nakata, N. Moritani, A. Ikeda, H. Tsujigiwa, N. Ohara, S. Iida, The influence of zoledronate and teriparatide on gamma delta T cells in mice Treatment of osteonecrosis of jaw. Journal of Dental Sciences; 2017: 12(4): 333-339.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. N. Moritani, Y. Yoshioka, E. Yamachika, Y. Matsui, M. Tabata, A. Ikeda, A. Uemura, K Nakatsuji, T. Matsumura, S. Iida. A familial case of cleidocranial dysplasia with a frameshift mutation in the *RUNX2* gene. The 23<sup>rd</sup> International Conference on Oral & Maxillofacial Surgery (ICOMS), Hong Kong, 31 March – 3 April 2017.

〔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

森谷徳文 (MORITANI Norifumi)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・顎口腔  
腔再建外科学分野・助教  
研究者番号：60467751

### (2) 研究分担者

久保田聡 (KUBOTA Satoshi)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔  
生化学分野・教授  
研究者番号：90221936

滝川正春 (TAKIGAWA Masaharu)  
岡山大学歯学部・先端領域研究センター・  
教授  
研究者番号：20112063

西田崇 (NISHIDA Takashi)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔  
生化学分野・准教授  
研究者番号：30322233

青山絵理子 (AOYAMA Eriko)  
岡山大学歯学部・先端領域研究センター・  
助教  
研究者番号：10432650

松村達志 (MATSUMURA Tatsushi)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・顎口  
腔再建外科学分野・講師  
研究者番号：70432648

### (3) 連携研究者

飯田征二 (IIDA Seiji)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・顎口  
腔再建外科学分野・教授  
研究者番号：40283791

### (4) 研究協力者

( )