

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592360

研究課題名（和文） CCN2結合性ペプチド・RNAアプタマーの開発と組織再生・疾患治療への応用

研究課題名（英文） Development and medical application of peptide and RNA aptamers that bind to CCN2

研究代表者

久保田 聡 (KUBOTA SATOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90221936

研究成果の概要（和文）：CCN2は骨や軟骨組織を調和のとれた再生に導く分子であるとともに、様々な臓器の線維化病変に関与することが知られている。したがってCCN2の機能をコントロールすることには、再生医療や線維化疾患治療の観点から大きな意味がある。本研究ではこのCCN2に結合する小分子、アプタマーを設計・作成し、CCN2の分子機能の制御を試みた。その結果、軟骨組織の再生を促進するアプタマー、骨リモデリングを制御するアプタマーをそれぞれ開発することができた。

研究成果の概要（英文）：CCN2 is known to promote harmonized regeneration of bone and cartilage tissues and to be involved in fibrotic disorders of a variety of organs. Therefore, regulating CCN2 function is of great significance in the field of regenerative medicine and fibrosis therapeutics. In this study, we designed, synthesized and evaluated the effect of aptamers that bind to CCN2, in order to control the molecular action of CCN2. As a result, we could obtain a few aptamers that could promote cartilage regeneration, or might regulate bone remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学・細胞生物学・再生医工学

1. 研究開始当初の背景

近年再生医工学・幹細胞生物学は発展を遂げ、再生された組織にも生物学的秩序を厳しく保った、機能的・形態的に正常なものが求めら

れる段階に入っている。そこで申請者らが注目したのがCCNファミリータンパク質であった。これらタンパク質は、一次構造的には3～4のモジュールが連結されて形成されてい

るのが特徴であり、各モジュールはすべて数多くの生体分子と相互作用を持つ。こうしてもたらされる他の生体分子との多彩な相互作用こそが、CCNファミリータンパク質の特異的な機能を支えている。その主たる機能は細胞外情報ネットワークの統括指揮であり、CCNファミリータンパク質は一見無秩序な細胞外因子の群れと多彩な相互作用を演じつつ、結果としての秩序正しい組織の形成維持を導く。

以前から申請者らはCCN2が、軟骨細胞や骨芽細胞に対して、増殖と分化という通常相反する現象両方を促進することを明らかにしてきた。またラットを用いた関節軟骨欠損、骨欠損モデルに対しても期待通りCCN2は両組織の再生をCCN2は促進したが、注視すべきは再生された組織の質である。それは周囲の正常組織と見事なまでに調和し、両者の境界が判別し得ないほどであった。一方CCN2には、以上のような機能とは別の暗い側面も存在する。それは強皮症に代表される線維化病変への関与である。組織の線維化は多くの場合不可逆的であって、重要臓器に起こると時として致命的となる。そして多くの線維化病変ではCCN2の過剰発現が見られるのである。

以上の所見からは、調和のとれた再生と線維化病変のコントロールのためには、CCN2の分子動態を制御することが重要であることが判る。しかしCCN2タンパク質の安定した生産、供給はきわめて難しく、世界中のいくつもの企業も商品化の過程で様々な問題点に直面しているようである。逆に線維化病変をコントロールすべくCCN2の分子機能を抗CCN2抗体により抑制する試みもなされているが、抗体療法には様々な問題が伴う。第一に適当な中和抗体を選び出し、大量に調製して安定供給するのにかなりの費用、時間そして労力が必要である。さらに抗体には炎症・免疫反応を惹起してしまう可能性が回る。こ

れらに代わる新たなツールの開発が切に望まれて来た所以である。

2. 研究の目的

このような状況を打開するための切り札として、申請者らが注目したのがアプタマーである。アプタマーとはラテン語の“aptus”に由来する呼称をもつ一群の分子で、特定の分子に結合する性質をもつ比較的小さな化合物である。主要なアプタマーとしては大きく分けてペプチドアプタマーと核酸アプタマーがあり、臨床現場ですでに应用され疾患治療に効果を上げている例もある。これらは標的分子に結合し、その分子機能を修飾することにより生物学的効果を発揮する。アプタマーは生化学的あるいは有機化学的に合成されるため安定した大量供給が可能であり、免疫応答などの問題を生じにくいのも大きな利点である。

一般的にアプタマー開発の目的は、標的となる分子のアンタゴニスト、あるいはアゴニストの獲得に集約されるものだが、CCN2を標的とするアプタマー探索には、より深い科学的意味を認めることができる。なぜならCCN2機能の本質は、さまざまな分子と4つのモジュールを介して多面的相互作用を行うことにあるからである。つまりCCN2に対する様々なアプタマーを作成し、まずCCN2との相互作用、そしてCCN2-アプタマー相互作用の結果生まれる生物学的効果、およびそれに随伴するCCN2と他分子との相互作用の変調を総合的に解析することで、CCN2という特異な性質を持つ分子の機能の全容を解明する上でも有用な情報が得られることもまた確実なのである。

3. 研究の方法

(1) CCN2タンパク質の調製：アプタマー開発の基本となる組換えヒトCCN2タンパク質として、大腸菌由来、*Brevibacillus*由来、哺乳類細胞由来のリコンビナントタンパク質をそれ

ぞれ準備し、目的に応じて実験に供した。うち1つはCCN2の高次構造を認識する抗体でフォールディングの状況も検証済みである。

(2) アプタマーの設計戦略と合成: ペプチドアプタマー設計の基本情報を得るために、CCN2に結合するペプチド配列のスクリーニングを行った。用いた方法はPhage display法と呼ばれるもので、表面に12残基からなるランダムなアミノ酸配列を持つペプチドを呈示するバクテリオファージライブラリーからCCN2に結合するものを選び出すものである。こうして得られたCCN2結合配列に基づき、固相合成法にてペプチドの委託合成を行った。

(3) 分子間相互作用の解析法: アプタマーとCCN2との結合評価の第一段階では、一般の酵素抗体法 (ELISA) に準ずる固相結合法を適用した。この方法で結合が確認された場合、さらに表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により分子間相互作用の動的評価に進んだ。

(4) 軟骨再生効果の検証法: 軟骨組織の*in vitro*モデルとして軟骨細胞様HCS-2/8細胞を用いて、アプタマー添加によって現れる細胞生物学的影響を放射性チミジン、硫酸の取り込みおよび軟骨細胞マーカー遺伝子発現の定量によって評価した。

(5) 破骨細胞形成効果の評価法

破骨細胞前駆細胞株であるRAW264.7細胞を用い、アプタマーの存在下・非存在下においてRANKLによって誘導される破骨細胞分化の度合いを細胞内シグナル伝達、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ活性発現などのパラメータに基づき比較解析した。

4. 研究成果

(1) アプタマーの設計と試作: Phage display libraryを用いて、CCN2に結合する12残基からなるペプチド配列の同定を試み、数十種類の配列を実験的に抽出することに成功した。得

られた情報の*in silico*解析を経て、8-12残基からなるペプチドアプタマーを多数試作した。

(2) 試作アプタマーのCCN2との相互作用の解析: 続いて(1)で合成した各ペプチドアプタマーのCCN2への結合を固相結合法ならびにSPR法により分析を行った。その結果、合成したペプチドの半数程度でCCN2への特異的な結合が確認できた。

(3) 軟骨組織再生アプタマーの機能評価: さらに(2)で結合の確認できたペプチドアプタマーに対し、CCN2を介した細胞生物学的効果の検証にまで進んだ。まずCCN2を常時大量に生産しているヒト軟骨細胞様HCS-2/8細胞株を用いて、その細胞増殖に対する影響を放射性チミジンの取り込み量で評価した。その結果、2種のペプチドのうち1つが、HCS-2/8細胞の増殖を有意に促進することが見出された。このアプタマーは、軟骨組織再生医療における応用できる可能性がある。しかしその一方で、残る1つのペプチドには、そのような効果も増殖阻害的効果も認められなかった。興味深いことに、このペプチドは3でのCCN2への結合評価では、先のアプタマーより強いCCN2への親和性を示していた。

次にこのアプタマーの発揮する機能がCCN2に依存するかを検証した。すなわちCCN2を産生しない細胞株に当該アプタマーを加えても影響がないこと、しかし同時にCCN2を外から添加すると効果を発揮することを証明した。

(4) 破骨細胞形成促進アプタマーの機能評価: 試作アプタマーのうち1つは、破骨細胞形成において重要な役割を演ずるreceptor activator of NF- κ B (RANK)の部分アミノ酸配列に類似性を有することが*in silico*解析で明らかになった。この事実はRANKと、破骨細胞形成にやはり関与するCCN2の相互作用を暗示するが、現在までにCCN2とRANKが相互作用を持つという報告はない。そこでまず

RANK分子とCCN2の相互作用を検証した結果、両者の強力な結合が確認された。この発見はCCN2の機能そのものの未知の局面の解明に繋がるものとして重要である。

以上を踏まえRANK類似の当該アダプターが、CCN2とRANKとの分子間相互作用に対して影響を与えるか否かを検討した。その結果、当該アダプターはCCN2とRANKの結合をむしろ促進する効果を発揮した。さらにRANKL刺激によってRANKから細胞内に惹起される細胞生物学的影響を評価したところ、当該アダプターは、RANKのリガンドRANKL添加によって前破骨細胞に誘導されるNF- κ Bの核移行を加速し、破骨細胞形成を促進する可能性が明らかとなった。以上の結果は、CCN2に対するアダプターによる骨リモデリング制御の可能性を示すものである。

(5) CCN 2 機能抑制型ペプチドアダプターの機能評価：RANKの構造を模した別のペプチドアダプターのひとつは、*in vitro*でRANK分子とCCN2との相互作用を抑制するとの結果を得た。このアダプターはCCN2の破骨細胞形成促進作用を抑制する可能性を持つ分子として今後注視に値する。

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 2 1 件) すべて査読あり

- ① Kawata, K., S. Kubota, T. Eguchi, E. Aoyama, N. Moritani, S. Kondo, T. Nishida and M. Takigawa. 2012. Role of low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in CCN2/connective tissue growth factor (CTGF) protein transport in chondrocytes. J Cell Sci., in press.
- ② Kubota, S. 2012. CCN2 and orofacial tissue development and remodeling. Jpn. Dental Sci. Rev. in press (invited review).

- ③ Kubota, S., and M. Takigawa. 2011. The role of CCN2 in cartilage and bone development. J. Cell Commun. Signal. 5: 209-217 (invited review).

- ④ ÉKawaki, H., S. Kubota, A. Suzuki, M. Suzuki, K. Kohsaka, K. Hoshi, T. Fujii, N. Lazar, T. Ohgawara, T. Maeda, B. Perbal, T. Takano-Yamamoto and M. Takigawa. 2011. Differential roles of CCN family proteins during osteoblast differentiation: involvement of Smad and MAPK signaling pathways. Bone 49: 975-989.

- ⑤ Nishida, T., S. Kubota, E. Aoyama, D. Janune, A. Maeda and M. Takigawa. 2011. Effect of CCN2 on FGF2-Induced Proliferation and MMP9 and MMP13 Productions by Chondrocytes. Endocrinology 152: 4232-4241.

- ⑥ Kondo, S., S. Kubota, Y. Mukudai, T. Nishida, Y. Yoshihama, T. Shirota, S. Shintani and M. Takigawa. 2011. Binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to the cis-acting element of structure-anchored repression in *ccn2* mRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 405: 382-387.

- ⑦ Nishida, T., K. Emura, S. Kubota, K.M. Lyons and M. Takigawa. 2011. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes osteoclastogenesis via induction of and interaction with dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). J Bone Miner Res. 26: 351-363.

- ⑧ Miyake, Y., T. Furumatsu, S. Kubota, K. Kawata, T. Ozaki and M. Takigawa. 2011. Mechanical stretch increases CCN2/CTGF expression in anterior cruciate ligament-derived cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 409: 247-252.

- ⑨ Kodama, T., S. Kubota (14番目) , M.

Takigawa (15番目 : 18名略) . 2011. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 121: 3343-3356.

⑩ Ohgawara, T., S. Kubota, H. Kawaki, N. Kurio, T. Abd El Kader, M. Hoshijima, D. Janune, T. Shimo, B. Perbal, A. Sasaki and M. Takigawa.

2011. Association of the metastatic phenotype with CCN family members among breast and oral cancer cells. *J. Cell Commun. Signal.* 5: 291-299.

⑪ Sumiyoshi, K., S. Kubota, T. Ohgawara, K. Kawata, T. Nishida, T. Shimo, T. Yamashiro and M. Takigawa. 2010. Identification of miR-1 as a micro RNA that supports late-stage differentiation of growth cartilage cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 286-290.

⑫ Takeuchi, K., S. Kubota, E. Murakashi, Y. Zhou, K. Endo, P.S. Ng, M. Takigawa, and Y. Numabe. 2010. Nicotine-induced CCN2: from smoking to periodontal fibrosis. *J. Dent. Res.*, 89: 34-39.

⑬ Sumiyoshi, K., S. Kubota, R.A. Furuta, K. Yasui, E. Aoyama, H. Kawaki, K. Kawata, T. Ohgawara, T. Yamashiro, and M. Takigawa. 2010. Thrombopoietic-mesenchymal interaction that may facilitate both endochondral ossification and platelet maturation via CCN2. *J Cell Commun Signal.* 4: 5-14.

⑭ Kawaki H, S. Kubota, E. Aoyama, N. Fujita, H. Hanagata, A. Miyauchi, K. Nakai and M. Takigawa. 2010. Design and utility of CCN2 anchor peptide aptamers. *Biochimie* 92: 1010-1015.

⑮ Aoyama E., T. Hattori, M. Hoshijima, D. Araki, T. Nishida, S. Kubota, and M. Takigawa. 2009. N-terminal domains of CCN protein 2/connective tissue growth factor bind to aggrecan. *Biochem. J.* 420: 413-420.

⑯ Takeuchi, H., S. Kubota, E. Murakashi, T. Fukada, S. Hashimoto, M. Takigawa and Y. Numabe. 2009. Effect of TGF- β 1 on CCN2/CTGF in normal human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J. Perio. Res.* 44: 161-169.

[学会発表] (計 5 3 件)

① Nishida, T. CCN2 promotes osteoclastogenesis via induction of and interaction with DC-STAMP and by enhancing RANKL signaling via interaction with RANK and osteoprotegerin. *Cell Signaling Networks 2011: the 13th IUBMB Conference, the 1st PABMB Conference and the 3rd Meetings of the Signal Transduction Branch & Oxidative Stress Branches of SMB* 2011年10月22-27日 Mérida, México.

② Kubota, S. Role of CCN2 in the remodeling of periodontal tissue upon nicotine exposure. Novel targets for cancer and connective tissue diseases: A meeting sponsored by the International CCN Society 2011年9月24-27日 Vancouver, Canada.

③ 青山絵理子 RANK 結合タンパク質 CCN2/CTGF は RANK-RANKL シグナルを促進する。第 29 回骨代謝学会学術集会 2011年7月28-30日 大阪市

④ Aoyama, E. The role of CCN2/CTGF binding to receptor activator of NF- κ B (RANK) in the RANK-RANK ligand system. *BMB2010* (第 83 回日本生化学会大会、第 33 回日本分子生物学会年会)、2010年12月7-10日、神戸市

⑤ Aoyama, E. CCN2/CTGF binds to fibroblast growth factor receptor 2 and modulates its signaling. *Sixth International Workshop on the CCN Family of Genes* 2010年10月20-24日 Newcastle, Northern Ireland.

- ⑥ Kubota, S. Screening of CCN2-binding peptides and its scientific utility. Sixth International Workshop on the CCN Family of Genes 2010年10月20-24日 Newcastle, Northern Ireland
- ⑦ Nishida, T. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes osteoclastogenesis via interaction with dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). The 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2009年9月11-15日 Denver, U.S.A.
- ⑧久保田 聡 CCNファミリー遺伝子の転写後制御とその生物学的意義 第3回日本CCNファミリー研究会シンポジウム 2009年8月28-29日 岡山市
- ⑨久保田 聡 遺伝子発現の転写後調節の重要性：組織再生因子CCN2の場合 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻主催ミニシンポジウム 2009年8月11日 岡山市
- ⑩ Kubota, S. CCN family proteins and micro RNAs: Extracellular and intracellular conductors of molecular networks. The Second International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama 2009年5月17-18日 岡山市
- [図書] (計4件)
- ① Kubota, S. and M. Takigawa. 2012. CCN. In: Encyclopedia of Signaling Molecules (Sangdun Choi ed) Springer, Dordrecht, Netherlands, in press.
- ② Kubota, S., Y. Mukudai, H. Kawaki, S. Kondo, T. Eguchi, K. Sumiyoshi, T. Ohgawara, T. Shimo and M. Takigawa. 2010. Nucleophosmin/B23: A multifunctional regulator that determines the fate of ccn2 mRNA. In: CCN Proteins in Health and Disease (A. Perbal, M.

Takigawa & B. Perbal eds) Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 41-55.

③ Eguchi, T., S. Kubota, K. Kawata, Y. Mukudai, J. Uehara, T. Ohgawara, S. Ibaragi, A. Sasaki, T. Kuboki and M. Takigawa. 2010. Novel transcriptional regulation of CCN2/CTGF by nuclear translocation of MMP3. In: CCN Proteins in Health and Disease (A. Perbal, M. Takigawa & B. Perbal eds) Springer, Dordrecht, Netherlands, pp.255-264.

④ Takigawa, M., H. Kawaki, S. Kubota, K.M. Lyons and B. Perbal. 2010. Cooperative regulation of cell proliferation and differentiation by CCN2 and CCN3. In: CCN Proteins in Health and Disease (A. Perbal, M. Takigawa & B. Perbal eds) Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 105-109.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 聡 (KUBOTA SATOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：90221936

(2) 研究分担者

滝川 正春 (TAKIGAWA MASAHARU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：20112063

服部 高子 (HATTORI TAKAKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00228488

西田 崇 (NISHIDA TAKASHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30322233

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

(3) 連携研究者