

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659872

研究課題名（和文） 軟骨内タンパク質輸送の新機構：多層トランスサイトーシス

 研究課題名（英文） A new protein transport system in cartilage:
Multilayered transcytosis

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：軟骨は無血管の組織で従来軟骨内タンパク質輸送は拡散によるものと考えられていた。本研究では、軟骨に発現する Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) が結合組織成長因子/CCN ファミリー2 (CTGF/CTGF/CCN2/CCN2) をトランスサイトーシスすることにより軟骨内を輸送すること、すなわち、軟骨に拡散以外のタンパク質輸送機構が存在することを明らかにした。また、軟骨特異的 LRP-1 欠損マウスを作成し、骨格異常が認められることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Protein transportation in cartilage has been believed to be due to diffusion because there is no blood vessel in cartilage. In the present study, we revealed that low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) transports connective tissue growth factor/CCN family 2 (CTGF/CCN2/CCN2) in cartilage by transcytosis, indicating that this mechanism is a new protein transport system in cartilage. We also uncovered that cartilage-specific defect of LRP-1 resulted in skeletal disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：口腔生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：LRP-1, protein transport, transcytosis, CCN family, CCN2/CTGF, cartilage

1. 研究開始当初の背景

我々は現在までに軟骨組織・細胞において LRP-1 が発現、局在していることを明らかにした。LRP-1 は神経細胞などではエンドサイトーシスと自己リン酸化、さらには古典的 WNT 経路を介してシグナル伝達を調節する受容体であることがよく知られているが、軟骨細胞における存在や役割についてはほとんど報告がなかった。このような状況下で、我々はさらに LRP-1 が軟骨細胞分化に重要な役割を果たしていることも明らかにした。

LRP-1 は様々なリガンドを有する受容体で、その一つには内軟骨性骨化を全面的に促進する CTGF/CCN2 がある。この CTGF/CCN2 の mRNA 発現細胞とタンパク質局在細胞がマウス軟骨組織において一致しないことを我々は以前の研究で発見した。一方、血管内皮細胞において LRP-1 がトランスサイトーシスを行っているという報告がある。このことから、今回、我々は無血管が故に拡散のみによりタンパク質輸送されると考えられていた軟骨組織においてもトランスサ

イトーシスによるタンパク質輸送、しかも、多層に亘るトランスサイトーシスによる広域に及ぶ輸送(多層トランスサイトーシスと命名)が行われており、その現象に LRP-1 が関与しているのではないかとの仮説をたてた。

2. 研究の目的

(1)軟骨細胞培養系で CTGF/CCN2 が LRP-1 によりトランスサイトーシスされているか否か調べる。

(2)軟骨組織でのみ *lrp-1* を欠損させた変異マウスを作成し、表現型を解析する。特に、野生型マウスと変異型マウスの軟骨組織間における CTGF/CCN2 や CTGF/CCN2 以外の因子の分布領域の相違を検討する。

(3)軟骨組織における LRP-1 以外の分子によるトランスサイトーシス機構の探索をする。

3. 研究の方法

(1)エンドサイトーシスにおける LRP-1 の役割の検討

軟骨細胞でのエンドサイトーシスにおける LRP-1 の役割を詳細に解析するために、siRNA を用い *lrp-1* をノックダウンしたヒト軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 にリコンビナント CTGF/CCN2 を加え、細胞画分への移行を western blotting によって分析する。この方法により、我々はすでに軟骨細胞において LRP1 がエンドサイトーシスに関与していることを示唆する事実を得ている。

(2)軟骨細胞におけるトランスサイトーシスの検証

この解析にはトランスウェルを用い、まず CTGF/CCN2 がトランスサイトーシスによって HCS-2/8 細胞を通過して運搬されるか否かを検証する。我々はすでに軟骨細胞においてトランスサイトーシスが起きている可能性が高いことを示す事実も得ている。また、トランスサイトーシスの起こる方向は pH や細胞種の違いにより決定されているという報告があり、*in vivo* の軟骨組織でもトランスサイトーシスの方向を決定する因子がいくつか(例えば低酸素など)想定される。そのような条件を *in vitro* で再現するため、輸送元/先のコンパートメントの環境を様々に変化させ、トランスサイトーシスの誘導条件についての詳細な情報を得る。具体的には細胞をトランスウェルの膜上に播種し、上側のフィルタコンパートメントにタグ標識した

CTGF/CCN2 を加える。一定の時間後、下側のコンパートメントの培地を回収し western blotting を行う。この方法によれば、内因性の CTGF/CCN2 の分泌に惑わされることなく、上側コンパートメントから移動した CTGF/CCN2 のみを解析することができる。

(3)軟骨細胞でのトランスサイトーシスにおける LRP-1 の機能の解析

この解析にあたっては、LRP-1 のアンタゴニストである receptor-associated protein (RAP) の存在下でトランスサイトーシスの質と量の変動を検討することが中心となる。現在までに我々は、軟骨細胞において RAP が CTGF/CCN2 のトランスサイトーシスを抑えるという予備的結果を得ている。

(4)変異動物を用いた統合的検証

通常の *lrp-1* ノックアウトマウスは着床期以降、発育出来ず、死亡してしまう。このため、このマウスを用いての軟骨組織における LRP-1 の機能を検討することは困難である。よって、軟骨組織でのみ *lrp-1* を欠損させた変異マウスの作成を行う。*col2a1* 遺伝子プロモーターを用いて Cre リコンビナーゼを発現するマウスは Jackson Laboratory から購入する。また、LRP-1 flox/flox マウスは研究協力者であるテキサスサウスウエスタン大学の Joachim Herz 教授および東京大学大学院医学系研究科の岩坪威教授からすでに提供して頂いている。現在までの報告で、この Col2a1-Cre マウスを用い、例えば、軟骨組織でのみ骨形成因子受容体 1a を欠損したマウスの表現型の観察に成功するなど、いくつもの論文発表もされている。また、LRP-1 flox/flox マウスを用いたものでは、血管内皮細胞でのみ *lrp-1* の欠損したマウスでアテローム性動脈硬化を促進するという報告もあることより、このシステムを用いたマウスは実験動物として有用であり、軟骨組織でのみ *lrp-1* の欠損したマウスでも重篤な表現型が期待できる。

4. 研究成果

(1) エンドサイトーシスにおける LRP-1 の役割の検討

siRNA を用いヒト軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 細胞での *lrp-1* の発現をノックダウンし、CTGF/CCN2 の HCS-2/8 細胞への結

合を検討した結果、*lrp-1* ノックダウン HCS-2/8 細胞では減少がみられた。また HCS-2/8 細胞に LRP-1 のアンタゴニストである receptor-associated protein (RAP) を作用させ、CTGF/CCN2 の HCS-2/8 細胞への結合を検討した場合でも、*lrp-1* ノックダウン時と同様に CTGF/CCN2 総結合量は減少した。

(2) 軟骨細胞におけるトランスサイトーシスの検証および軟骨細胞でのトランスサイトーシスにおける LRP-1 の機能の解析

トランスウェルを用いてトランスサイトーシスの評価を行ったところ、HCS-2/8 細胞に取り込まれた CTGF/CCN2 の一部分は細胞を通過して再び細胞外へ分泌され、この現象は RAP を作用させることにより抑制された。さらに軟骨組織の微細環境を模して、HCS-2/8 細胞を低酸素下で培養したところ、LRP-1 産生量は増加した。また、低酸素下の HCS-2/8 細胞ではトランスサイトーシスされる CTGF/CCN2 量も増加し、この現象は RAP を作用させることにより抑制された。なお、RAP のマウス脛骨軟骨部成長板での分布を免疫染色により確認したところ、CTGF/CCN2 のみられない静止軟骨細胞層に多く分布した。また、ニワトリ胸骨軟骨部の静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞、それぞれの *rap* mRNA レベルを real-time PCR により確認した場合でも、静止軟骨細胞での発現レベルが高いことが分かった。

これらの結果より、軟骨細胞において、酸素濃度や RAP により制御を受けながら LRP1 は CTGF/CCN2 をトランスサイトーシスに機能すると考えられる。

(3) 変異動物を用いた統合的検証

軟骨組織でのみ *lrp1* の欠損した変異 (Col2CreLRP1^{fllox/fllox}) マウスの作成を行い、得

られた変異動物の表現型を解析した。即ち、現在までに、Col2CreLRP1^{fllox/fllox} マウスは骨格異常を来すことを明らかにした。具体的には、Col2CreLRP1^{fllox/fllox} マウスの肋骨に対する肋軟骨の割合が野生型マウスと比べて大きくなった。また、野生型マウスの胸郭の形状は楕円形を示すのに対し、変異型マウスでは第 1 肋骨から第 12 肋骨にかけ広がった釣鐘状を呈した。さらに、変異型マウスでは脊椎にも異常が認められ、野生型と比較し、頸椎の幅は広く、短く、脊椎と脊椎の間も狭かった。ほとんどの Col2CreLRP1^{fllox/fllox} マウスが出生直後に死亡してしまうが、まれに出生後も成長する変異型マウスも存在し、このマウスは骨格異常により低身長を呈することも明らかとなった。また、2 か月齢の変異型マウスの脛骨軟骨部を採取し、アルシアンブルー染色を行ったところ、変異型マウスの軟骨細胞は野生型マウスの軟骨細胞と比べ丸い形状を呈していた。また、成長板軟骨部においては、野生型で認められる軟骨細胞が整然と並ぶカラム構造が、変異型マウスでは乱れていた。さらに、変異型マウスの関節軟骨部においては、野生型マウスと比較し、関節表層から二次骨化中心までの厚みの増加が認められた。

これらの結果より LRP1 は軟骨/骨の発達に総合的に機能することによって生命を維持することが示唆される。

以上の結果、無血管組織でのタンパク質輸送が拡散だけでなく LRP-1 によるトランスサイトーシスにより積極的に行われていることが明らかになり、その破綻により軟骨成長因子である CTGF/CCN2 の輸送が損なわれ、軟骨発生障害がおこることが明らかとなった。国内外を通じてこのような概念を提唱したのは本研究が初めてのことであり、その成果は国際的一流誌に公表された。

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 18 件)

- ① Tomita N, Hattori T, Ito S, Aoyama E, Yao M, Yamashiro T, and Takigawa M: Cartilage-specific overexpression of CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates insulin-like growth factor expression and bone growth. 査読有、Plos One, 2013;8(3):e59226.
- ② Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Aoyama E, Moritani N, Kondo S, Nishida T, and Takigawa M: Role of low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in CCN2/connective tissue growth factor (CTGF) protein transport in chondrocytes. 査読有、J Cell Sci, 15, 2965-2972, 2012.
- ③ Hoshijima M, Hattori T, Aoyama E, Nishida T, Yamashiro T, Takigawa M. Roles of heterotypic CCN2/CTGF-CCN3/NOV and homotypic CCN2-CCN2 interactions in expression of the differentiated phenotype of chondrocytes. 査読有、FEBS J, 279(19), 3584-3597, 2012.
- ④ Nishida T, Kubota S, Aoyama E, Janune D, Maeda A, Takigawa M: Effect of CCN2 on FGF2-Induced Proliferation and MMP9 and MMP13 Productions by Chondrocytes. 査読有、Endocrinology, 152, 4232-41, 2011.

[学会発表] (計 3 2 件)

- ①河田かずみ、久保田聡、服部高子、青山絵理子、ジャヌネ ダニーロ、滝川正春：軟骨組織特異的低密度リポタンパク受容体欠損マウスにおける骨格形成。第 85 回日本生化学会大会、2012, 12, 14-16, 福岡

- ②Takigawa M: CCN proteins in bone and cartilage. A Charles Perkinson Centre Symposium: The CCN Proteins and Family of Genes and The IGF Binding Proteins – Health and Disease. 2012.10.23. Sydney, Australia.
- ③Kawata K, Kubota S, Hattori T, Aoyama E, Janune D, Takigawa M: The low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) deficiency in the cartilage tissue leads to skeletal dysmorphisms. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011, 12, 13-16, 横浜
- ④河田かずみ：Role of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in regulation of chondrocyte differentiation. 第 32 回岡山歯学会奨励論文賞受賞講演、2011. 11. 13. 岡山
- ⑤Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Aoyama E, Kondo S, Hattori T, Takigawa M: Role of the low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in CCN2 protein transportation in chondrocytes. 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. Mérida, Yucatán, México, October 22-27, 2011.
- ⑥Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Aoyama E, Kondo S, Hattori T, Takigawa M: Role of the low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in CCN2 protein transportation in chondrocytes. 第 4 回日本CCNファミリー研究会 2011. 8. 26-27 岡山 (若手国際学術奨励賞受賞口演)
- ⑦河田かずみ、久保田聡、江口傑徳、青山絵理子、近藤誠二、滝川正春：低密度リポタンパク受容体関連タンパク 1(LRP1)による軟骨細胞でのCCNファミリー2/結合組織成長因子 (CCN2/CTGF) タンパク質輸送. 第 43

回日本結合組織学会学術大会・第 58 回マト
リックス研究会大会合同学術集会, 2011, 6,
10-11, 大分 (平成 23 年度日本結合組織学会
優秀演題賞)

[その他]

ホームページ等

http://www.dent.okayama-u.ac.jp/seika/index_sc_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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・
准教授

研究者番号 : 90221936

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

(3) 連携研究者

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

青山 絵理子 (AOYAMA ERIKO)

研究者番号 : 10432650