

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 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：2014～2015

課題番号：26670808

研究課題名(和文) デコイ受容体のnon-canonicalな作用経路の存在の立証とその意義

研究課題名(英文) The presence and its significance of non-canonical action of decoy receptors

研究代表者

滝川 正春 (TAKIGAWA, MASAHARU)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20112063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：デコイ受容体の作用機構と存在意義に関する既成概念を覆す2つのデコイ受容体様分子の新たな作用機構を見出した。即ち、OPGは、RANKLに結合してRANKに結合するRANKL量を減らすことにより、破骨細胞形成を阻害すると考えられていたが、CCN2に結合することによりCCN2の破骨細胞形成作用を阻害すること、PDGFRLはそのリガンドと想定されるPDGFとは結合せず、CCN2に結合して、CCN2の分子動態を制御することにより、軟骨細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、CD302がCCN2に結合することを見出したので、既成概念を覆す第3の例の発見も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we proposed a new concept showing the presence and its significance of non-canonical action of decoy receptor (-like) molecules by demonstrating 2 examples. 1) Osteoprotegerin (OPG) bound to CCN family protein 2 (CCN2), which binds to RANK and positively regulates RANK signaling, thereby inhibiting osteoclastogenesis via RANK signaling. 2) Platelet-derived growth factor receptor-like (PDGFRL) did not bind to PDGF which is the ligand for PDGF. Instead, PDGFRL did bind to CCN2 which plays important roles in chondrogenesis and endochondral ossification and another member of CCN family CCN3. These findings suggest that PDGFRL plays an important role in the cartilage biology, possibly by regulating the molecular behavior of CCN2. 3) We also found that c-type lectin receptor CD302 bound to CCN2, suggesting possible discovery of another example which supports our new concept.

研究分野：機能系基礎歯科学

キーワード：decoy receptor osteoprotegerin (OPG) PDGFRL CCN family CCN2 signaling osteoclasts chondrocytes

1. 研究開始当初の背景

我々は新たな CCN family protein 2 (CCN2)結合因子を特定するため種々のスクリーニングを行い、CCN2 が RANK と直接結合してそのシグナルを増強する作用を有することを見いだしていたが、最近新たに Osteoprotegerin(OPG)が CCN2 へ強く結合して CCN2 の破骨細胞形成促進作用を阻害することを見いだした。すなわち、このことは OPG という RANK のデコイ受容体がもとの受容体である RANK に対応するリガンド RANKL とは別の分子に結合してその作用を発揮する可能性を示している。また、一方、PDGF (血小板由来増殖因子) Receptor-Like(PDGFR)とそのリガンドと予測される PDGF との結合実験を行って見たところ、この分子は PDGF とは結合せず、その構造に反して canonical なデコイ受容体としては機能しないという preliminary な結果を得ていた。さらに、PDGFR が、軟骨の形成・維持に何らかの役割を果たす可能性や、その作用が PDGF-PDGFR シグナリングには無関係と考えられる CCN2 に結合することによる可能性を示唆する preliminary な結果も得ていた。このような報告は過去に無く、これらの分子の作用機構を深く追求すれば、「デコイ受容体は、本来の受容体とリガンドを奪い合うことにより、そのシグナリングを競合的に阻害する」というデコイ受容体(様)分子に関する既成の作用機構と存在意義に関する概念を覆す研究となると考え、本研究に着手するに至った。

2. 研究の目的

構造的、機能的デコイ受容体である osteoprotegerin(OPG)の non-canonical 作用経路を明らかにして細胞外情報伝達ネットワークにリガンド、受容体、デコイ受容体に加えて第4の因子が存在すること証明し、この第4の因子の存在を他の可溶性受容体にまで適応でき、細胞外情報伝達ネットワークにおける新概念を打ち立てるための端緒とする。また、この第4の因子が、platelet-derived growth factor receptor-like (PDGFR)のような、構造的にはデコイ受容体と類推されるが、機能的にはリガンドと結合しないが故に存在意義不明の分子の機能発現を介助している例を提示し、このようなデコイ受容体様分子も細胞外情報伝達ネットワークの一員としての存在意義があることを証明し、既成の細胞外情報ネットワークを刷新する新たな概念を提唱する。

3. 研究の方法

デコイ受容体 OPG が RANK のデコイとして機能する canonical な経路だけではな

く、CCN2 に結合して CCN2 の破骨細胞形成促進作用を阻害することによって、破骨細胞形成を阻害することを証明する。また、機能未知の PDGFR が PDGFR のデコイ様構造を有するものの PDGF とは結合せず、CCN2 と結合することによって軟骨細胞の増殖、分化に影響を与えることを証明する。このように、細胞外シグナル伝達ネットワークにおいてリガンド、受容体、デコイ受容体に続く第4の因子として CCN2 ファミリータンパク質を想定して、その他の可溶性受容体(デコイ受容体)や機能未知受容体様分子の CCN2 ファミリータンパク質との結合と標的臓器等における新規の機能を解明する。そして、これらの結果を統合して細胞外シグナル伝達ネットワークの概念を刷新する

4. 研究成果

(1) デコイ受容体 OPG の CCN2 を介する破骨細胞形成阻害作用

RANK と CCN2 との結合を、固相化タンパク結合実験および表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance : SPR) で調べたところ、高い親和性で結合した。なお、CCN2 は、RANK と RANKL の結合には影響を及ぼさなかった。

破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞を用い、CCN2 の RANKL シグナルにおよぼす作用を検討したところ NF- κ B の核移行を促進し、ERK、JNK、p-38 のリン酸化も増強した。また、CCN2 は、RAW264.7 細胞を RANKL 刺激した時にみられる NFATc1、Fos-1 の発現上昇を増強した。

OPG は RANK のデコイレセプターであり、RANK と同様に RANKL との結合性を有する。そこで RANK と結合することが明らかとなった CCN2 が OPG と結合するか否か調べたところ、RANK よりやや高い親和性で結合した。

OPG は RANKL 刺激による RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化を抑制するが、CCN2 を培養系に添加することで OPG による破骨細胞形成抑制作用が解除された。

(2) デコイ受容体様分子 PDGFR の CCN2 への結合を介した軟骨細胞の増殖・分化に与える影響

PDGFR がマウス成長板軟骨細胞の増殖・分化過程で、増殖期に強く発現することを、in situ hybridization 法と、成長軟骨細胞初代培養細胞増殖・分化系を用いた RT-PCR 法により確認した。

ヒト軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 細胞、乳がん細胞 MDA-231、HeLa 細胞で PDGFR の mRNA レベルを比較すると、HCS-2/8 細胞で圧倒的に高かった。また、免疫染色でも HCS-2/8 細胞に多量に観察され、その細胞内局在を調べると、細胞質だけでなく核内にも存在した。

HCS-2/8 細胞に PDGFR 遺伝子を導入して過剰発現させると同細胞の増殖が促進された。一方、軟骨分化マーカーであるアグリカ

ン、II型コラーゲン、MMP13の発現は低下した。

PDGFRFLとPDGF-ABおよびCCN2との結合をpull-down assayで調べたところ、PDGFとは結合せず、CCN2と結合した。また、PDGFRFLはCCN family 3(CCN3)とも結合した。

PDGFRFL過剰発現細胞のconditioned mediumはCCN2による軟骨培養細胞株の軟骨分化マーカー(アグリカン、II型コラーゲン、MMP13)の発現上昇を抑制し、protein kinase Czの活性化も阻害した。

これらの結果は、デコイ受容体様分子PDGFRFLがCCN2の分子動態を制御することにより、軟骨細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしていることを示している。

(3) 血小板中のCCN familyメンバーの存在。PDGFとCCN2は血小板に多量に含まれており、PDGFRFLがCCN2以外にCCN3とも結合することが判明したので、他のPDGFRFL結合分子探索を目的に、CCN2以外のCCNタンパクの血小板における存在を調べたところ、CCN1、CCN3、CCN5が存在することを、ウエスタンブロット法および免疫染色法で確認した。また、その由来は、CCN1とCCN5は巨核球であり、CCN3は血球系細胞、CCN2は巨核球から放出される未知の因子により刺激を受けた間葉系細胞であることが示唆された。これらの結果は、Modern Rheumatology誌に受理され印刷中である。

(4) 新たなCCN2結合能を有する機能未知受容体様分子の探索。新たにc-typeレクチンレセプターCD302がCCN2と結合することを見出した。この分子は細胞の接着、遊走、エンドサイトーシスに関与すると言われており、PDGFRFLとの協働作用やそのデコイの発見が期待される。

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 10 件)

Nishida T., Kubota S. and Takigawa M.: Cell biological assays for measuring chondrogenic activities of CCN proteins. *Methods Mol Biol.*, 査読無, Vol.未定, 2016, in press, Doi:未定
Hoshijima M., Hattori T., Takigawa M.: Protocols for screening for binding partners of CCN proteins: Yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol.*, 査読無, Vol.未定, 2016, in press, Doi:未定
Aoyama E. and Takigawa M.: Evaluation of molecular interaction between CCN2 protein and its binding partners by surface plasmon resonance (SPR). *Methods Mol Biol.*, 査読無, Vol.未定, 2016, page 未定, in press, Doi:未定
Kawata K., Kubota S. and Takigawa M.:

Analysis of transcytosis of CCN2 by chondrocytes, *Methods Mol Biol.*, 査読無, Vol.未定, 2016, page 未定, in press, Doi:未定

Takigawa M.: The CCN Proteins: An overview. *Methods Mol Biol.*, 査読無, Vol.未定, 2016, in press, Doi:未定
Hara C, Kubota S., Nishida T., Hiasa M., Hattori T., Aoyama E., Moriyama Y., Kamioka H., Takigawa M.: Involvement of multiple CCN family members in platelets that support regeneration of joint tissues. *Mod Rheumatol.* 査読有, 2016, Apr 21:1-10. [Epub ahead of print] Doi:未定

Khattab H.M., Aoyama E., Kubota S., Takigawa M. Physical interaction of CCN2 with diverse growth factors involved in chondrocyte differentiation during endochondral ossification. *J. Cell Commun. Signal.* 査読有, 9, 247-254. 2015. Doi:10.1007/s12079-015-0290-x.

Aoyama E., Kubota S., Khattab H.M., Nishida T., Takigawa M.: CCN2 enhances RANKL-induced osteoclast differentiation via direct binding to RANK and OPG. *Bone.* 査読有, 2015 Apr;73:242-8. Doi:10.1016/j.bone.2014.12.058.

Nishida T., Kubota S., Aoyama E., Janune D., Lyons K.M., Takigawa M.: CCN family protein 2 (CCN2) promotes the early differentiation, but inhibits the terminal differentiation of skeletal myoblasts. *J. Biochem.* 査読有, 2015 Feb;157(2):91-100. Doi:10.1093/jb/mvu056.

Kubota S. and Takigawa M.: Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and their role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 査読有, 128(3):181-96, 2015 (invited review). Doi: 10.1042/CS20140264.

[学会発表](計 19 件)

河田かずみ、久保田聡、江口傑徳、青山絵理子、森谷徳文、岡 森彦、川木晴美、滝川正春: 軟骨細胞分化における癌抑制遺伝子 PDGFR-like (PDGFRFL) の役割。第 29 回日本軟骨代謝学会、2016, 2, 19-20, 広島
青山絵理子、星島光博、服部高子、久保田聡、滝川正春: 成熟破骨細胞のアクチンリング形成における CD302 の機能と CCN2 による制御。第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 BMB2015、2015, 12, 1-4, 神戸
青山絵理子、星島光博、服部高子、久保田聡、滝川正春: 破骨細胞分化における新規

アクチン骨格制御因子としての
DCL-1/CD302 の役割と CCN2 との関連。第
57 回歯科基礎医学会、2015, 9, 11-13、新
潟
青山絵理子、久保田聡、滝川正春：CCN2
による TRAIL 誘導性アポトーシス促進作
用。第7回日本CCNファミリー研究会、2015,
8, 29, 岡山
Mohamed Khattab H., Aoyama E., Kubota S.,
Takigawa M.: interaction of CCN2 with
varied growth factors and cytokines
involved in chondrocyte
differentiation during endochondral
ossification. 第7回日本CCNファミリ
ー研究会、2015, 8, 29, 岡山
滝川正春：CCNファミリー研究の歴史と最
前線 Meet the Experts 第33回日本骨代
謝学会、2015, 7, 23-25, 東京
青山絵理子、服部高子、星島光博、久保田
聡、滝川正春：新たな破骨細胞制御因子
DCL-1/CD302 の作用機構の解明と CCN2 と
の関連。第33回日本骨代謝学会、2015, 7,
23-25, 東京
原 規子、久保田聡、青山絵理子、上岡 寛、
滝川正春：巨核球および血小板に存在す
る CCN ファミリータンパク質の存在様態
とその由来。第33回日本骨代謝学会、2015,
7, 23-25, 東京
青山絵理子、服部高子、星島光博、久保田
聡、滝川正春：破骨細胞の成熟を制御する
新規膜タンパク質 CD302/DCL-1 の機能と
CCN2 との結合。第6回骨バイオサイエン
ス研究会、2015, 7, 4 岡山
青山絵理子、星島光博、服部高子、久保田
聡、滝川正春：成熟破骨細胞の形成におけ
る CD302/DCL-1 の新機能と CCN2 との関連。
第1回日本骨免疫学会、2015.6.30-7.2,
沖縄
原 規子、久保田聡、青山絵理子、滝川正
春：血小板に存在する CCN ファミリーメ
ンバーとその由来。第35回岡山歯学会学
術集会、2014, 10, 26 岡山
青山絵理子、星島光博、服部高子、久保田
聡、滝川正春：破骨細胞分化における新規
CCN2 結合タンパク質 DCL-1 の発現と機能。
第87回日本生化学会、2014, 10, 15-18,
京都
原 規子、久保田聡、青山絵理子、滝川正
春：血小板に存在する CCN ファミリータ
ンパク質とその役割。第87回日本生化学
会、2014, 10, 15-18, 京都
青山絵理子、星島光博、服部高子、久保田
聡、滝川正春：新たな CCN2 結合因子 DCL-1
の破骨細胞分化における役割。第56回歯
科基礎医学会、2014, 9, 25-27, 福岡
青山絵理子、西田 崇、久保田聡、滝川正
春：RANK デコイレセプター OPG と CCN2 の
相互作用。第6回日本CCNファミリー研究
会、2014. 8. 30, 岡山
原 規子、久保田聡、青山絵理子、滝川正

春：血小板に存在する CCN ファミリーメ
ンバーの存在様態。第6回日本CCNファミ
リー研究会、2014. 8. 30, 岡山
青山絵理子、服部高子、滝川正春：CCN2
結合因子 DCL-1 の破骨細胞分化制御因子
としての役割。第32回日本骨代謝学会、
2014, 7, 24-26, 大阪
原規子、久保田聡、青山絵理子、滝川正春：
血小板に含まれるマトリセルラーCCNフ
ァミリータンパク質。第46回日本結合組
織学会学術大会・第61回マトリックス研
究会大会合同学術集会、2014.6.5-7. 名古屋
Aoyama E, Kubota S, Nishida T, and
Takigawa M: CCN2 induces
osteoclastogenesis by regulating
RANK/RANKL/OPG system. ECTS Congress
2014, Prague, Czech Republic, May 17-20,
2014

〔図書〕(計 1 件)

Takigawa M.: CCN Proteins: Methods and
Protocols, Springer, 2016 in press.

〔その他〕

ホームページ等

岡山大学 歯学部先端領域研究センター
(ARCOCS)

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

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・教
授

研究者番号：90221936

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

西田 崇 (NISHIDA TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授

研究者番号：30322233

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

(3)連携研究者

高江洲 かずみ (河田かずみ)

(TAKAESU KAZUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10457228