

平成 30 年 6 月 11 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：15K11038

研究課題名(和文)新規CCN2結合分子DCL-1の破骨細胞成熟促進因子としての新機能の解明

研究課題名(英文)Mechanism and expression of CD302 as a new regulator of osteoclast maturation

研究代表者

青山 絵理子(Aoyama, Eriko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10432650

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)：CD302は骨吸収細胞である破骨細胞分化過程において発現しており、CD302を発現抑制させると成熟破骨細胞の形成および骨吸収が抑制された。さらに骨吸収能を発揮するために必要な細胞内構造であるアクチンリングの形成と維持に関与していることが分かった。また、破骨細胞分化促進因子であるCCN2とアクチンリングにおいて共局在していることが明らかになった。CD302のシグナル伝達についてはSHP-2が関与している可能性が見いだされている。これらのことから本研究の成果はCD302が破骨細胞の機能制御のための治療薬開発などの新たな標的となり得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CD302/DCL-1 is one of the C-type lectin receptors, but the distribution and the function has been mostly not clarified. We found that CD302 was expressed on osteoclasts induced from murine bone marrow cells. The inhibition of CD302 expression caused fragmentation of actin ring in mature osteoclasts and reduced bone resorption in vitro. Also, CD302 was co-localized with CCN2 which is a positive regulator of osteoclast maturation. Moreover, SHP-2 was identified as a potent candidate as a signal transducer of CD302 signaling. These results showed that CD302 could be a new target protein to regulate osteoclast maturation.

研究分野：生化学、骨代謝学

キーワード：破骨細胞 アクチンリング CD302/DCL-1 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

CCN familyタンパク質のメンバーであるCCN2は骨軟骨組織をはじめとして主に間葉系の組織の増殖、分化、接着などを促進する因子として知られている。このような多機能性はCCN2が他のさまざまな生理活性物質や膜タンパク質などとの結合を介してこれらを制御するという特徴的な作用機構を有していることと密接な関係があると考えられる。そこで申請者らのグループではさらなるCCN2結合因子を探索し、その制御機構を解明することによってCCN2の新機能の探索および作用機序の解明を目指してきた。我々はCCN2結合因子のyeast two-hybridスクリーニングの結果からCD302(DCL-1, CLEC13A)がCCN2に結合する可能性を見いだした。CD302は2003年にKato M.らによってHodgkin lymphomaから同定されたC type lectinドメインを有する膜タンパク質である。当初はDEC-205と呼ばれる別の膜タンパク質とfusionしてのみ発現するものと考えられていたが、2007年に単独でマクロファージ上に発現し、アクチンとの結合を介して抗原貪食作用に関与していることが報告された。

2. 研究の目的

CD302は膜タンパク質ではあるもののそのリガンドや細胞内での協働因子、およびシグナル伝達などについてはいまだ不明である。また、マクロファージ系の前駆細胞から分化することが知られている破骨細胞においてはその発現、機能ともに全く報告がない。そこで、予備的な検討として破骨細胞前駆細胞を分化誘導因子で刺激し、破骨細胞の分化、成熟過程においてCD302がどのように発現、分布し、また分化・成熟の過程にどのように関わっているのかについて検討を行ったところ、破骨細胞成熟および骨吸収能におけるCD302の重要性を示唆する興味深いデータが得られた。このことからCD302の破骨細胞における発現と機能、および機能制御因子となりうるCCN2

との関係についての解明が必要と考え本研究を行った。

3. 研究の方法

(1)破骨細胞誘導過程におけるCD302の発現変化

マウス骨髄由来の破骨細胞前駆細胞をRANKLおよびM-CSFで刺激すると経日的にCD302の発現が上昇することを示す予備的なデータは得られているが、破骨細胞の分化の各段階で発現し、破骨細胞の成熟度合いの指標となっているNFATc1やc-Fos、Cathepsin Kなどの発現との関連性は分かっていない。そこでreal time PCRおよびウエスタンブロットリング法でこれらの因子のRNAおよびタンパク質の発現変化を経時的に観察し、CD302が分化のどの段階で発現が上昇するのかを調べる。また、上記の分化マーカー因子の発現をsiRNAなどで抑制したときのCD302の発現を調べることでCD302発現に関わる経路を明らかにすることができる。

(2)破骨細胞誘導過程におけるCD302の機能解明

先述のとおり、CD302はマクロファージにおいてアクチンと協働し、抗原貪食機構の一端を担っていることが報告されている。そこで破骨細胞におけるアクチンとの局在を示すためCD302およびアクチンの免疫染色を行ったところ、両者はアクチンリング上で共局在していることが分かった。また、成熟破骨細胞の形成に及ぼすCD302の作用を明らかにするためsiRNAによる抑制システムを用いて予備検討したところ、成熟破骨細胞を示すTRAP陽性の多核細胞の生成が低下していた。さらに、同様の実験系を用いてpit assayを行ったところ、siRNAによるCD302発現抑制下での骨吸収能が著しく抑制されている様子が観察されている。この時、CD302発現を抑制した細胞ではRANKL刺激によって「多核にはなっているものの巨細胞になっていないTRAP陽性細胞」が散見される。これらの予備的検討の

結果からCD302はアクチンリングおよび骨吸収能を持った成熟破骨細胞の形成に必須の役割を担っているのではないかと推測している。そこで、CD302のsiRNAで処理した成熟破骨細胞形成期の細胞をタイムラプス撮影し、その過程を詳細に観察し、無処理群と比較検討することで上述の推測を裏付けるデータを得られるものと考えている。

また、破骨細胞においてアクチンの構造変化によってもたらされる細胞機能はアクチンリング形成以外にも細胞の遊走やラメリポディアの形成などが挙げられる。そこで単核の前駆細胞の遊走や多核化した後に細胞体が拡大する際の偽足形成についても同様のタイムラプス撮影を用いて観察する。さらに細胞の遊走能についてはトランスウェルを用いた遊走実験やスクラッチ実験なども併せて行う。

(3)CD302の結合因子としてのCCN2の役割の検討

予備的検討としてマウス骨髄細胞から誘導した破骨細胞およびマクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞株の細胞溶解物とリコンビナントCCN2を混和したものをCD302に対する抗体を用いて免疫沈降法を行ったところ、CCN2とCD302は細胞表面上で結合していることを示唆するデータが得られている。そこでCD302とCCN2との結合の確認とこの結合がCD302の機能にどのように関連するのかについて明らかにするため以下のような検討を行う。まず、CCN2とCD302との結合を阻害する抗体あるいはペプチドを用いて両者の結合を抑制したときの破骨細胞形成を観察する。これによってCCN2がCD302の機能を発揮するのに必要とされるかどうかを示すことができる。また、CCN2はpodosome形成の一端を担うintegrin α v β 3とも結合することが分かっており、これを介した活性がCD302の機能発現に寄与している可能性も考えられる。そこでCD302とCCN2との結合阻害がintegrin α v β 3の下流で活性化されるc-Srcなどの活性に及ぼす

影響をc-Srcのリン酸化体のウエスタンブロットティングを用いて確認する。

さらに、これまでにアクチンとCD302の共存に関する予備的データが得られていることを示しているが、CCN2もまたアクチンと結合することを本申請課題の研究分担者のグループが以前に報告しており、CCN2もまたアクチンと共存している可能性が高いと考えられる。そこでアクチン、CD302に併せてCCN2も染色し、三者のアクチンリングにおける局在を観察する。

(4) CD302欠損マウスを用いたCD302のin vivoでの骨代謝への影響の解明

In vivoにおけるCD302の機能を明らかにするためCD302欠損マウスを作製し、骨格形成、骨代謝活性について検討する。27年度中にターゲットベクターのデザインと作製を行う。これを用いて、CD302欠損マウスを作出する。このマウスの骨格の形成期である胎児期の骨格標本作製し、正常マウスのもものと比較する。また、骨のリモデリングにおけるCD302欠損の影響を調べるため、誕生後の長管骨の組織切片を作製し、骨組織の形成および破骨細胞分布を観察する。CD302を全身的に欠損させた動物が成長不全などによって早期に死亡し、成長後の骨リモデリングにおけるCD302の作用を観察するのが難しい場合はCathepsin Kなどの後期に発現が上昇する因子を用いたコンディショナル・ノックアウトマウスを作製し、同検討に用いる。

4. 研究成果

CD302は破骨細胞分化過程において発現しているだけでなく、破骨細胞の成熟に伴って形成されるアクチンリングの周辺に多く存在することを見いだした。さらにCD302を破骨細胞分化過程においてsiRNAを用いて発現抑制させると成熟破骨細胞の形成および骨吸収が抑制された。そこでこのCD302発現抑制系において何が起きているかを明らかにするためタイムラプス撮影を行ったところ、

成熟したアクチンリングの断片化および未成熟なアクチンリングの収縮が見られた。これらのことから CD302 はアクチンリングの形成維持および生成の両方に関与していると思われる。

次に細胞骨格が関連するシグナル伝達系においてしばしば活性が見られる Fak のリン酸化と CD302 の関連について調べたが、CD302 の発現を抑制してもこの因子の活性化にはあまり変化が見られなかった。また、細胞の生存に関わっている可能性があるため CD302 が Akt の活性に影響を及ぼしている可能性も考えられたが、Fak と同様に CD302 の抑制によって変化は見られなかった。その一方で抗 CD302 抗体を用いた免疫沈降法により SHP-2 と Syk は CD302 と結合する可能性があることが分かった。

さらにマウス骨髄細胞由来破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞誘導系に破骨細胞分化誘導因子の一種である rCCN2 を添加しても CD302 の発現自体は変化しないことも分かった。CD302 を抑制しても CCN2 は変わらないのでこれらはお互いにその発現自体を制御するのではなく直接的あるいは間接的にタンパク質同士の結合を通して影響を与えていると考えられる。

さらに、CCN2およびCD302のタンパク質間相互作用を確認するためヒトCCN2のリコンビナントタンパク質およびヒトCD302細胞外ドメインのリコンビナントタンパク質を用いて固相化結合実験および共沈降実験を行ったところ、いずれの方法でも相互作用は検出できなかった。このことから少なくともCD302の細胞外ドメインはCCN2 と反応しないことが分かった。また、CD302のC末端側に Mycタグを付加されたマウスCD302を発現するベクターを作製し直してサル腎臓由来肉腫細胞株であるCos7細胞にtransfectionして強制発現させた。しかし、抗CD302抗体を用いたウ エスタンブロットでは発現が確認できたが、Mycタグに対する

抗体では発現が確認できなかった。このことからCD302は翻訳後に膜移行するまでにC末端側でなんらかの修飾あるいは切断がなされている可能性が考えられる。

以上の結果からCD302は破骨細胞形成においてアクチンリングの形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

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 9 件)

1. Janune D, Abd El Kader T, Aoyama E, Nishida T, Tabata Y, Kubota S, Takigawa M. Novel role of CCN3 that maintains the differentiated phenotype of articular cartilage. J Bone Miner Metab. 査読有、2017 Nov;35(6):582-597. doi: 10.1007/s00774-016-0793-4.
2. Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Aoyama E, Moritani NH, Oka M, Kawaki H, Takigawa M. A Tumor Suppressor Gene Product, Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Like Protein Controls Chondrocyte Proliferation and Differentiation. J Cell Biochem. 査読有、2017 Nov;118(11):4033-4044. doi: 10.1002/jcb.26059.
3. El-Seoudi A, Abd El Kader T, Nishida T, Eguchi T, Aoyama E, Takigawa M, Kubota S. Catabolic effects of FGF-1 on chondrocytes and its possible role in osteoarthritis. J Cell Commun Signal. 査読有、2017 Sep;11(3):255-263. doi: 10.1007/s12079-017-0384-8.
4. Ishikawa T, Toyama T, Nakamura Y, Tamada K, Shimizu H, Ninagawa S, Okada T, Kamei Y, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Aoyama E, Takigawa M, Harada A, Mori K. UPR transducer BBF2H7 allows export of

type II collagen in a cargo- and developmental stage-specific manner. *J Cell Biol.* 査読有、2017 Jun 5;216(6):1761-1774. doi: 10.1083/jcb.201609100.

5. 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 Nov;26(6):940-949. doi: 10.3109/14397595.2016.1155255.

6. Murase Y, Hattori T, Aoyama E, Nishida T, Maeda-Uematsu A, Kawaki H, Lyons KM, Sasaki A, Takigawa M, Kubota S. Role of CCN2 in Amino Acid Metabolism of Chondrocytes. *J Cell Biochem.* 査読有、2016 Apr;117(4):927-37. doi: 10.1002/jcb.25377.

7. Yoshioka Y, Ono M, Maeda A, Kilts TM, Hara ES, Khattab H, Ueda J, Aoyama E, Oohashi T, Takigawa M, Young MF, Kuboki T. CCN4/WISP-1 positively regulates chondrogenesis by controlling TGF- β 3 function. *Bone.* 査読有、2016 Feb;83:162-170. doi: 7.1016/j.bone.2015.11.007.

8. Shimo T, Matsumoto K, Takabatake K, Aoyama E, Takebe Y, Ibaragi S, Okui T, Kurio N, Takada H, Obata K, Pang P, Iwamoto M, Nagatsuka H, Sasaki A. The Role of Sonic Hedgehog Signaling in Osteoclastogenesis and Jaw Bone Destruction. *PLoS One.* 査読有、2016 Mar 23;11(3):e0151731. doi: 10.1371/journal.pone.0151731.

9. Khattab HM, 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、2015 Sep;9(3):247-54. doi: 10.1007/s12079-015-0290-x.

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 青山絵理子、GDF5 との結合を介した CCN2 の軟骨分化促進作用、第 59 回歯科基礎医学会・学術大会、2017 年 9 月 17 日、松本歯科大(松本)
2. 青山絵理子、CCN2 結合因子 GDF5 の軟骨細胞における作用の解明、第 9 回日本 CCN 研究会、2017 年 8 月 26 日、岡山大学(岡山)
3. 青山絵理子、低出力超音波パルス (LIPUS) 刺激による破骨細胞形成の抑制、第 90 回日本生化学会大会、2017 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド(神戸)
4. 青山絵理子、A novel regulatory factor in osteoclastogenesis DCL-1/CD302: Significance of its binding to CCN2/CTGF、43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress、2016 年 5 月 16 日、Rome(イタリア)
5. 青山絵理子、Role of CCN2/CTGF-related CD302 in osteoclast maturation、94th IADR General session、2016 年 6 月 24 日、Seul(韓国)
6. 青山絵理子、CCN2 結合因子 DCL-1/CD302 による破骨細胞の成熟促進作用の機構解明、第 34 回日本骨代謝学会学術集会・第 3 回アジア太平洋骨代謝学会議、2016 年 7 月 21 日、大阪国際会議場(大阪)
7. 青山絵理子、破骨細胞における CCN2 結合性アクチン骨格制御因子 CD302 の作用機序の解明、第 58 回歯科基礎医学会・学術大会、2016 年 8 月 26 日、札幌コンベンションセンター(札幌)
8. 青山絵理子、CCN2 結合因子 CD302 の破骨細胞機能制御作用、第 8 回日本 CCN 研究会、2016 年 8 月 29 日、岡山大学(岡山)

9. 青山絵理子、CCN2 結合因子 CD302 による破骨細胞成熟促進作用とその機序の解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター(仙台)
10. 青山絵理子、破骨細胞成熟過程における CD302 の機能と CCN2 との関わり、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜(横浜)
11. 青山絵理子、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 88 回日本生化学会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド(神戸)
12. 青山絵理子、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 年 9 月 10 日、朱鷺メッセ(新潟)
13. 青山絵理子、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 年 7 月 24 日、京王プラザホテル(新宿)
14. 青山絵理子、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 年 6 月 30 日、ホテルブリーズベイマリーナ(沖縄)
15. 青山絵理子、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 年 7 月 4 日、ママカリフォーラム(岡山)
16. 青山絵理子、CCN2 による TRAIL 誘導性アポトーシス促進作用、第 7 回日本 CCN 研究会、2015 年 8 月 29 日、岡山大学(岡山)

{ 図書 } (計 2 件)

1. Aoyama E, Hattori T, Kubota S, Takigawa M. Production of Recombinant CCN2 Protein in Escherichia coli. Methods Mol Biol. 2017;1489:77-84. PubMed PMID: 27734367.
2. Aoyama E, Takigawa M. Evaluation of Molecular Interaction between CCN2

Protein and Its Binding Partners by Surface Plasmon Resonance (SPR). Methods Mol Biol. 2017;1489:169-176. PubMed PMID: 27734376.

{ 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
青山 絵理子 (AOYAMA Eriko)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10432650

(2) 研究分担者
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

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

服部 高子 (HATTORI Takako)
岡山大学・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・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：30322233

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

()
研究者番号：