

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592142

研究課題名（和文）

マイクロRNAによるCCNファミリー遺伝子発現制御ネットワークとその生物学的意義

研究課題名（英文）

Regulation of CCN family gene expression via micro RNA regulatory network and its Biological significance

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：

マイクロRNA (miRNA) は小分子 noncoding RNA (ncRNA) であり、個々の miRNA が数千の mRNA の 3' 非翻訳領域を標的として、遺伝子の発現をネットワーク的に制御する。本研究では CCN ファミリー遺伝子の代表的メンバーであり、間葉系組織の成長ならびに再生を指揮する CCN2 遺伝子が特定の miRNA の制御ネットワーク下にあることを実証した。さらに、この miRNA による制御が、軟骨細胞の成熟形質の獲得・維持に重要であることも明らかとなった。また miRNA の作用機構や軟骨細胞後期分化における役割を今後解明していく上で、有用な知見をも得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
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・機能系基礎歯学

キーワード：口腔生化学・ゲノム医化学・細胞医化学

1. 研究開始当初の背景

ゲノム全塩基配列の解読が進んできた当初、全ゲノムの 98% を占める「タンパク質をコードしない領域」が何のために存在するのか？これが研究者の持つ最大の疑問のひとつであった。ところがその後の分子細胞生物学の進歩は著しく、一見狭義の「遺伝情報」とは無関係なこれら領域が、実はきわめて生物学的に重要であることが知られるようになった。こ

れらの中でもタンパク質ではなく、機能を持った RNA 分子をつくり出すための「遺伝子」がとりわけ最近の研究者たちの興味を集めている。その代表が、特定の遺伝子発現を制御する一群の「小さな」RNA 種であり、マイクロ RNA (miRNA) と総称されている。この miRNA は僅か 21-22 塩基と実に小さく、その標的は、さまざまな mRNA の 3' - 非翻訳領域

(3'-UTR) の「不完全に相補的な」配列である。標的配列を持ったmRNAがmiRNAに認識されると、そこからのタンパク質の翻訳が強く抑えられる。わずかに21塩基と完全には相補的でなくてもない配列を持つmRNAは少なからず存在するから、ひとつのmiRNAの標的は非常に多様であると予測されている。

ところで申請者らのグループは、CCNファミリータンパク質の研究を続けて来た。それは通常4つのドメインから形成され、各ドメインが様々な分子と結合する性質を持つ。従って分子間の情報ネットワークの形成、調節に重要な役割を果たし、多様な機能を発揮する。たとえばCCN2は線維化病変の形成と創傷治癒の主役と考えられていたが、申請者らの研究で軟骨細胞や骨芽細胞の増殖と分化の両方をも促進し、血管新生も誘導することも明らかになっている。この一群の遺伝子もmiRNAの制御下にあることに疑いはない。しかし研究開始時点では、それを示す知見は皆無に近かった。

2. 研究の目的

これまで申請者のグループではCCNファミリーメンバーの遺伝子発現調節機構の研究に精力的に取り組んで来たが、その過程でまず3'-UTRの重要性に気づいた。何故ならほとんど全てのメンバーの3'-UTRが、基礎遺伝子発現レベルを抑制していたからである。にもかかわらず、CCNファミリー遺伝子を研究対象にしている科学者の中にも、3'-UTRを制御標的とするmiRNAに注目している者は殆どない。したがって本研究では、これまでの成果に基づき、現在まで積極的に結びつけて考えられることのなかったmiRNAとCCNファミリー遺伝子間の制御ネットワークを解明することを直接の目的とした。さらにmiRNAがCCNファミリー遺伝子を制御し、その結果間葉系組織形成に関与している実態を解明し、これら組織の分化・発生における新たな標的を見出す

ことを最終的には目指したのである。

3. 研究の方法

(1) in silico解析

オンラインプログラムである、Targetscan 4.1 (<http://www.targetscan.org/>) を用いて、ヒトCCNファミリーmRNAを標的とするmiRNAの予測を行った。

(2) 細胞培養

10%の牛胎児血清(FBS)を添加したDMEM培地にて、ヒト軟骨細胞様細胞株HCS-2/8、ヒトの乳癌細胞株MDA-231、ヒト子宮頸癌由来の細胞株HeLa、およびニワトリ胸骨部軟骨から分離した軟骨細胞を培養した。

(3) マイクロアレイ解析

HCS-2/8およびHeLa細胞を培養し、全RNAを抽出した。その全RNAからmiRNAを精製し、mirVava™ miRNA Bioarray V2 (Ambion, 米国) を用いてmiRNAの網羅的比較解析を行った。同様の解析をニワトリ前肥大/肥大軟骨細胞および成熟増殖軟骨細胞間でも行なった。

(4) プラスミドの構築

以前の研究で構築されたpGL3L(+)/L(-)プラスミドを用いて、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子の下流にヒトCCN2 3'-UTR cDNA全長、あるいはそれを制限酵素Hind IIIで切断した前半断片および後半断片を接続したpGL3UTRS、pGL3SA1およびpGL3SS3を構築した。

(5) 合成miRNAsの合成、DNA/RNA遺伝子導入、およびルシフェラーゼ・アッセイ

成熟miRNAは受託合成を依頼し、対照としては、含有塩基の順序を入れ換えたスクランブルRNAを用いた。miRNAの細胞への導入には、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用い、終濃度50 nMの条件にて行った。導入から8時間後、(4)で記したレポータープラスミドDNAをFugene6 (Roche) を用い遺伝子導入した。48時間後に細胞を回収し通法に従いレポータージーンアッセイ

を行った。

(6) リアルタイムRT-PCR

上記方法で終濃度30 nMにてmiR-18aおよび対照miRNAを導入し、48時間後に細胞を回収してRNAの精製を行った。その後通法に従いリアルタイムRT-PCRにて、遺伝子発現を解析した。

(7) 酵素免疫法 (ELISA法)

CCN2タンパク質の定量は2個の異なる抗ヒトモノクロナル抗体を用いたサンドウィッチELISA法によって行った。キットは、ニチレイ社(東京)の懇意による提供を受けた。

4. 研究成果

(1) CCN2遺伝子のmiR-18による特異的制御の検証と、その標的エレメントの解明

ヒトCCN2遺伝子の3'-UTRの断片を蛍ルシフェラーゼ遺伝子直下流に接続したレポータープラスミドを準備し、これを化学合成したmiR-18aとともに軟骨細胞様HCS-2/8細胞に遺伝子導入し、miR-18aの標的を機能的に探った。その結果3'-UTRの最も下流側の230塩基長の部分に標的配列が存在することを実験的に確認した(図1)。これは*in silico*による予測結果に一致している。

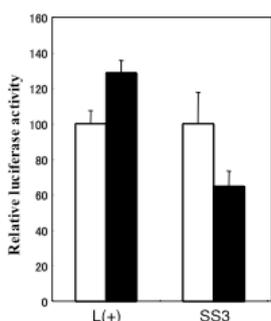


図1 ルシフェラーゼ遺伝子の発現量。黒がmiR-18a導入時。L(+)は標的を含まないプラスミド(対照)

また、同様に化学合成したmiR-18aをHCS-2/8細胞に導入し、内性CCN2遺伝子からのmRNA発現への影響をみたところ、有意な差はみられなかった。しかしCCN2タンパク質産生量は同じ条件下で強く抑制された(図2)。これはmiR-18a

による軟骨細胞におけるccn2遺伝子発現調節が翻訳段階で起こっていることを示す証拠である。しかしながら最近の報告によれば、miR-18aは肺癌細胞ではccn2 mRNAの選択的分解を惹起するとされており、今回の結果は細胞種によって同じmiRNAが異なった制御機構を稼働している可能性を示している。

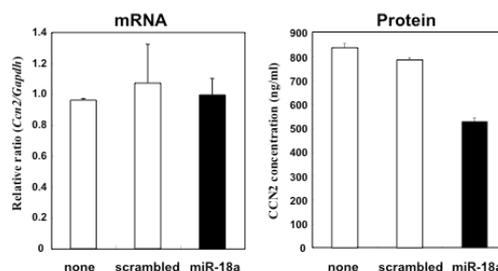


図2 miR-18a導入によるCCN2 mRNAおよびタンパク質量の変動。scrambledは対照。

この点に着目し、同様の実験をやはりCCN2を大量に産生している乳癌細胞株、MDA231細胞に対しても行なってみた。その結果、MDA231細胞ではCCN2タンパク質産生量ばかりでなく、mRNA量も低下させることが明らかになり、この可能性が証明された。もちろんこの現象はmRNAの分解をmiR-18aが加速しているためと考えられる(スペースの都合上データ省略)。

(2) miR-18aの軟骨細胞分化での役割の解析

軟骨細胞様HCS-2/8から低分子RNAを抽出し、未分化なHeLa細胞を対照としてmiRNAマイクロアレイにて網羅的にmiR-18を含む多様なmiRNAの発現を比較解析したところ、*in silico*でCCN2を標的とする予測されるmiRNAのうち、miR-18aおよびmiR-19aが軟骨細胞において最も著しく発現が抑制されていることが明らかになった(図3)。この結果からはmiR-18aおよびmiR-19aの発現抑制が結果的にCCN2遺伝子を活性化し、それを通じて軟骨細胞の成長・分化を進めている可能性が窺われる。

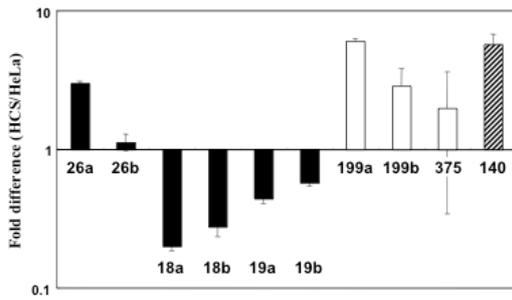


図3 HCS-2/8細胞における各miRNAの発現量のHeLa細胞に対する相対値。

続いて実際に軟骨細胞形質発現に対するmiR-18aの役割を機能的に検討するため、miR-18aをHCS-2/8細胞に導入し、マーカー遺伝子の発現変動を評価したところ、成熟軟骨細胞形質を代表するaggrecan遺伝子発現に有意な低下がみられた(図4)。

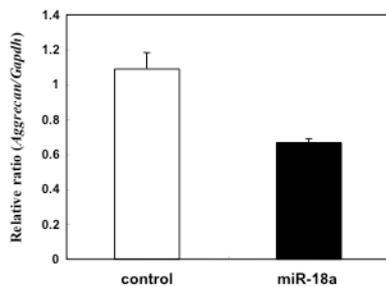


図4 miR-18aがaggrecan遺伝子発現に及ぼす影響

さらに成長板軟骨細胞の後期分化における役割の検討のため、発生過程のニワトリ胸骨から、前肥大・肥大軟骨細胞と成熟軟骨細胞をそれぞれ分離しmiRNA遺伝子発現パターンを比較解析したところ、miR-18、miR-19遺伝子群の発現に著変はみられなかった。したがってこれらmiRNAは軟骨細胞の分化過程においては、成熟形質獲得に至るまでの初期段階に重要な役割を果たすと考えられる。このような、特定のmiRNAの発現が抑制されることにより、標的遺伝子の発現増強を通じて軟骨細胞の形質獲得・維持に寄与しているという報告は世界初である。

(3) 軟骨細胞分化における、miR-18aを含む遺伝子クラスターによるCCNファミリー遺伝子制御の検証: ヒトmiR-18aを生むpri-miRNAはmiR-17、

18a, 19a, 19b, 19c, 20, 92を含み、そこから各々のpre-miRNAが生ずる。そこでCCNファミリー全メンバーmRNAに対し、in silicoで標的予測を行なった結果、CCN2を除いては上記pri-miRNAから生ずるmiRNAの制御を受ける可能性はむしろ低く、他種miRNAの制御下にあるとの予測結果を得た。今後研究を続ける上で貴重な情報である。

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20件: 全て査読あり)

- (1) 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.* in press.
- (2) Ohgawara, T., **S. Kubota**, H. Kawaki, S. Kondo, T. Eguchi, N. Kurio, E. Aoyama, A. Sasaki, and M. Takigawa. 2009. Regulation of chondrocytic phenotype by micro RNA 18a: Involvement of Ccn2/Ctgf as a major target gene. *FEBS Lett.* 583:1006-1010.
- (3) 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.
- (4) Nishida, T. S. Kondo, A. Maeda, **S. Kubota**, K.M. Lyons, and M. Takigawa. 2009. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) regulates the expression of Vegf through Hif-1 α expression in a chondrocytic cell line, HCS-2/8, under hypoxic condition. *Bone* 44: 24-31.
- (5) Maeda A, T. Nishida, E. Aoyama, **S. Kubota**, K.M. Lyons, T. Kuboki, and M. Takigawa. 2009. CCN family 2/connective tissue growth factor modulates BMP signalling as a signal conductor, which action regulates the proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Biochem.* 145: 207-216.
- (6) Mukudai, Y., **S. Kubota**, H. Kawaki, S. Kondo, T. Eguchi, K. Sumiyoshi, T. Ohgawara, T. Shimo, and M. Takigawa. 2008. Post-transcriptional regulation of chicken ccn2 gene expression by nucleophosmin/B23 during chondrocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 28: 6134-6147.

- (7) Kawaki, T., **S. Kubota**, A. Suzuki, N. Lazar, T. Yamada, T. Matsumura, T. Ohgawara, T. Maeda, B. Perbal, K.M. Lyons, and **M. Takigawa**. 2008. Cooperative regulation of chondrocyte differentiation by CCN2 and CCN3 revealed by a comprehensive analysis of the CCN family proteins in cartilage. *J. Bone Miner. Res.* 23:1751-1764.
- (8) Kikuchi, T., **S. Kubota**, K. Asami, H. Kawaki, K. Nishida, T. Kawata, S. Mitani, Y. Tabata, T. Ozaki, and **M. Takigawa**. 2008. Promotion of bone regeneration by CCN2 incorporated into gelatin hydrogel. *Tissue Engineering Part A* 14:1089-1098.
- (9) Nishida, T., A. Maeda, **S. Kubota** and **M. Takigawa**. 2008. Role of Mechanical-stress inducible protein Hcs24/CTGF/CCN2 in cartilage growth and regeneration: -Mechanical stress induces expression of Hcs24/CTGF/CCN2 in a human chondrocytic cell line HCS-2/8, rabbit hyaline costal chondrocytes and meniscus tissue cells- *Biorheology* 45: 289-299.
- (10) Eguchi, T., **S. Kubota**, K. Kawata, Y. Mukudai, J. Uehara, T. Ohgawara, S. Ibaragi, S. Sasaki, T. Kuboki and **M. Takigawa**. 2008. Novel transcription factor-like function of human MMP3 regulating CTGF/CCN2 gene. *Mol. Cell. Biol.* 28: 2391-2413.
- (11) Ono, M., **S. Kubota**, T. Fujisawa, W. Sonoyama, H. Kawaki, K. Akiyama, M. Oshima, **T. Nishida**, Y. Yoshida, K. Suzuki, **M. Takigawa** and T. Kuboki. 2008. Promotion of hydroxyapatite-associated, stem cell-based bone regeneration by CCN2. *Cell Transplant.* 17: 231-240.
- (12) Kawaki, H., **S. Kubota**, A. Suzuki, T. Yamada, T. Matsumura, T. Mandai, M. Yao, T. Maeda, K.M. Lyons and **M. Takigawa**. 2008. Functional requirement of CCN2 for intramembranous bone formation in embryonic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366: 450-456.
- (13) Shimo, T., **S. Kubota**, T. Goda, Y. Yoshihama, N. Kurio, **T. Nishida**, **M. Takigawa** and A. Sasaki. 2008. Clinical significance and function of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic mandible squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 28:2343-2348.
- (14) Fujisawa T, **T. Hattori**, M. Ono, J. Uehara, **S. Kubota**, T. Kuboki and **M. Takigawa**. 2008. CCN family 2 / Connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates proliferation and differentiation of auricular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 787-795.
- (15) Koitabashi, N., M. Arai, K. Niwano, A. Watanabe, M. Endoh, M. Suguta, T. Yokoyama, H. Tada, T. Toyama, H. Adachi, S. Naito, S. Oshima, **T. Nishida**, **S. Kubota**, **M. Takigawa** and M. Kurabayashi. 2008. Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Heart Failure* 10: 373-379.
- (16) Yanagita, T., **S. Kubota**, K. Kawata, H. Kawaki, S. Kondo, T. Takano-Yamamoto, S. Tanaka and **M. Takigawa**. 2007. Expression and physiological role of CCN4/Wnt-induced secreted protein 1 mRNA splicing variants in chondrocytes. *FEBS J.* 274: 1655-1665.
- (17) Ono, M., **S. Kubota**, T. Fujisawa, W. Sonoyama, H. Kawaki, K. Akiyama, M. Oshima, **T. Nishida**, Y. Yoshida, K. Suzuki, **M. Takigawa** and T. Kuboki. 2007. Promotion of attachment of human bone marrow stromal cells by CCN2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357: 20-25.
- (18) Eguchi, T., **S. Kubota**, K. Kawata, Y. Mukudai, T. Ohgawara, K. Miyazono, K. Nakao, S. Kondo and **M. Takigawa**. 2007. Different transcriptional strategies of *ccn2/ctgf* gene induction between human chondrocytic and breast cancer cell lines. *Biochimie* 89: 278-288.
- (19) Oka, M., **S. Kubota**, S. Kondo, T. Eguchi, C. Kuroda, K. Kawata, S. Minagi and **M. Takigawa**. 2007. Gene expression and distribution of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) during secondary ossification center formation. *J. Histochem. Cytochem.* 55: 1245-1255.
- (20) Koitabashi, N., M. Arai, S. Kogure, K. Niwano, A. Watanabe, Y. Aoki, T. Maeno, **T. Nishida**, **S. Kubota**, **M. Takigawa** and M. Kurabayashi. 2007. Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension* 49:1120-1127.

[学会発表] (計 8 件)

- (1) Ohgawara, T., **S. Kubota**, H. Kawaki, S. Kondo, T. Eguchi, A. Sasaki and **M. Takigawa**. Micro RNA 18 regulates chondrocytic phenotype: Involvement of *Ccn/Ctgf* as a major target gene. 2nd Joint Meeting, International Bone & Mineral Society and Australian and New Zealand Bone & Mineral Society. 2009年3月. Sydney, Australia.
- (2) Shimo, T., **S. Kubota**, T. Goda, Y. Yoshihama, N. Kurio, T. Okui, D. Yamamoto, A. Ono, **M. Takigawa** and A. Sasaki.

Expression and mechanisms of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) induction in osteolytic jaw invasion of human oral squamous cell carcinoma. ORS 55th Annual Meeting. 2009年2月. Las Vegas, U.S.A.

- (3) Eguchi, T., **S. Kubota**, K. Kawata, Y. Mukudai, J. Uehara, T. Ohgawara, S. Ibaragi, A. Sasaki, T. Kuboki and **M. Takigawa**. Novel transcriptional regulation of CCN2/CTGF by nuclear translocated MMP3. Fifth International Workshop on the CCN Family of Genes. 2008年10月. Toronto, Canada.
- (4) **Takigawa, M.**, N. Tomita, **T. Hattori**, H. Kawaki, **S. Kubota**, T. Kikuchi, S. Itoh, E. Aoyama, M. Yao, A. Suzuki, T. Maeda, K. Asaumi, **T. Nishida**, T. Ozaki, T. Yamashiro, K. M. Lyons, Y. Tabata. Roles of CCN2 in skeletal growth and regeneration - requirement for both endochondral and intramembranous bone formation. Fifth International Workshop on the CCN Family of Genes. 2008年10月. Toronto, Canada.
- (5) Ohgawara, T., **S. Kubota**, H. Kawaki, S. Kondo, T. Eguchi, A. Sasaki, **M. Takigawa**. Regulation of chondrocytic phenotype by micro RNA 18a: Involvement of Ccn/Ctgf as a major target gene. Fifth International Workshop on the CCN Family of Genes. 2008年10月. Toronto, Canada.
- (6) **Kubota, S.**, Y. Mukudai, H. Kawaki, S. Kondo, T. Eguchi, K. Sumiyoshi, T. Ohgawara, T. Shimo, and **M. Takigawa**. Nucleophosmin/B23: A multifunctional regulator that determines the fate of ccn2 mRNA. Fifth International Workshop on the CCN Family of Genes. 2008年10月. Toronto, Canada.
- (7) Eguchi, T., **S. Kubota**, Y. Mukudai, T. Yanagita, T. Ohgawara, J. Uehara and **M. Takigawa**. Novel transcription factor-like function of MMP-3/stromelysin-1 that regulates connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) gene expression. The 29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2007年9月. Honolulu, U.S.A.
- (8) Takeuchi, H., E. Murakashi, **S. Kubota**, **M. Takigawa** and Y. Numabe. Effect of nicotine on CCN2/CTGF in human periodontal tissue. 11th Biennial Congress of the International Academy of Periodontology. 2007年9月. Berne, Switzerland.

[図書] (計1件)

- (1) **Kubota, S.** and **M. Takigawa**. 2007. Role of CCN2/CTGF/Hcs24 in Bone Growth. In: International Review of Cytology (K. W.

Jeon. ed) Vol. 147. Elsevier Inc., San Diego, pp. 1-41.

[その他]

研究成果データベース

- (1) Kubota, S. and M. Takigawa. 2007. CCN2 Molecule Page, UCSD/Nature. The Signaling Gateway. AfCS ID A003961:
<http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A003961>
- (2) Kubota, S. and M. Takigawa. 2007. CTGF. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. under editorial review.
<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CTGFID40192ch6q23.html/>

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

(3) 連携研究者

なし