

令和 6 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：2019～2023

課題番号：19K10053

研究課題名(和文) CD302の新機能：破骨細胞の分化制御とその機構及び骨・軟骨代謝研究への展開

研究課題名(英文) CD302 is a novel regulator of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis.

研究代表者

青山 絵理子 (Aoyama, Eriko)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：10432650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CD302は樹状細胞などの一部の免疫系細胞で発現している他はほとんど発現分布も機能も知られていない分子であるが、本研究の成果により骨芽細胞の分化過程において発現が上昇し、いずれにおいても正常な増殖、分化に必要な因子であることが分かった。骨芽細胞ではCD302は細胞接着に関与しており、その発現が低下すると接着不全による細胞死がもたらされることを示した。また、骨、軟骨、脂肪細胞へ分化する間葉系幹細胞でCD302は低下すると脂肪細胞へ分化しやすくなることも分かった。この結果はCD302KOマウスが肥満になることとも一致しており、CD302は骨と脂肪との分岐点を左右する因子の一つである可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により機能不明であった膜タンパク質の一種であるCD302が骨芽細胞および間葉系幹細胞に発現し、その分化において重要な役割を担っていることが分かった。また、間葉系幹細胞においてCD302の発現を抑制すると脂肪細胞への分化が促進されることが分かった。一般的に生体内において間葉系幹細胞は加齢に伴って骨芽細胞分化は低下し、脂肪細胞へ分化することが知られている。今回の研究からCD302がその細胞分化の方向性を決定づける因子の一つである可能性を見いだした。今後、CD302は加齢に伴う骨量の低下に対する治療薬を模索する場合の標的の一つとなり得る点において社会的意義が見いだされる。

研究成果の概要(英文)：CD302 is a C-type lectin like receptor and the role is rarely known except that expression of CD302 in dendritic cells. This study revealed that CD302 expresses in pre-osteoblastic cell line MC3T3-E1 and has an essential role of the adhesion. The knocking -down of CD302 in MC3T3-E1 decreased migration and phosphorylation of Akt and FAK and induced cell death like anoikis. Furthermore, the knocking -down of CD302 in mesenchymal stem cell line C3H10T1/2 repressed osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis. It is consistent with that CD302KO mice tend to be fat. Taken together, CD302 is a positive regulator of osteoblastogenesis via the enhancement of cell adhesion.

研究分野：骨代謝学

キーワード：CD302 osteoblast adhesion adipocyte migration

1. 研究開始当初の背景

CD302 (DCL-1, CLEC13A)はCタイプレクチン(CTL)ドメインと呼ばれる特徴的な構造を持つ膜タンパク質である。一般的にレクチン様ドメインを持つ膜タンパク質は自然免疫系の受容体として糖鎖や核酸などを認識することが多いが、CD302はリガンド不明のオーファンレセプターである。また、その機能や分布についてもマクロファージなどの抗原提示細胞での発現や抗原貪食能および遊走に関する知見が知られている^{a)b)}のみで、それ以外には全く報告がない。我々は骨吸収細胞である破骨細胞はマクロファージ様の前駆細胞から分化することから、破骨細胞においてもCD302がなんらかの働きをしている可能性があると考えた。そこで予備検討を行ったところ、破骨細胞の分化過程においてもCD302が発現しており、その発現を阻害するとアクチンリングと呼ばれる破骨細胞に特徴的な細胞骨格の形成及び維持機能が抑制され、骨吸収能が低下した。このことはCD302がアクチン重合を制御することによって破骨細胞分化を制御していることを示唆している。次に我々はCD302のシグナル伝達経路についても予備検討を行った。CD302と同じくCTLドメインを持つレセプターは細胞内ドメインにチロシンキナーゼ活性を持つものが多い。実際、CD302もその細胞内ドメインにチロシン残基があり、特にマウスのCD302ではhem ITAMと呼ばれるアミノ酸配列(YxxL)を持つドメイン構造になっている。そこで我々が行った予備検討の結果、CD302はアクチン重合に関連するフォスファターゼであるSHP2と結合するという知見を得た。このことからCD302がチロシンキナーゼ型膜タンパク質としてアクチンを介した細胞応答に関わっている可能性が考えられるが、詳細なシグナル伝達経路や機能については十分に解明できていない。

2. 研究の目的

CD302はこれまで免疫系での働きしか報告されていなかったが、本研究はCD302の破骨細胞における解析を中心として広く骨・軟骨組織を構成する細胞におけるその発現および機能を明らかにしようとする研究である。即ち、CD302が免疫系細胞以外でも機能することを示す端緒となる点で、まず学術的に極めて独自性が高く創造性に富む研究と言える。

次いで、CD302は、細胞内シグナル伝達経路も全く不明な膜タンパクであったが、今回の研究はこのCD302が新規チロシン型膜タンパクであることを明らかにしようとするものであり、CD302が分子レベルで、機能性受容体であることを証明しようとする点で新規性が高い。

さらに、CD302の機能を発揮するうえで中核となると目されるアクチンは細胞骨格の構成因子であるが、増殖、遊走、多核細胞の生成時の細胞融合、シグナル伝達経路の制御、メカニカルストレス応答などにも関与しており、最近では核内アクチンによる遺伝子発現の制御など単に細胞骨格を構成するだけではないことで注目を集めている。本研究ではこれらのアクチン関連細胞応答に対してCD302がどのような役割を担っているのかも解析する。このため本研究の成果は骨代謝学分野にとどまらず、新規のアクチン制御機構を明らかにするという点で広く生命科学に影響を与える学術的な波及効果が期待できる。

3. 研究の方法

骨代謝全体におけるCD302の機能について明らかにするために、まず骨芽細胞系の細胞株MC3T3-E1細胞を用いて分化誘導培養を行い、骨芽細胞分化の各段階におけるCD302の発現変動を調べ

る。細胞間接触と CD302 の発現との関連を調べるため、複数の異なる細胞密度で細胞を培養し、CD302 の発現量を調べる。さらに、CD302 をノックダウンした時の細胞増殖、細胞死、細胞遊走能を解析し、CD302 とこれらの細胞応答との関連性を明らかにする。

CD302 は樹状細胞において遊走能を制御している可能性が示唆されていることから、細胞接着および生存維持に関与している可能性が考えられる。そこで、接着や生存に関わる細胞内シグナル伝達因子である FAK および Akt と CD302 との関係性について明らかにするため、CD302 をノックダウンした細胞でこれらのシグナル伝達因子の活性が変化しているかどうかをこれらのリン酸化体に対する抗体を用いたウエスタンブロット法による解析を行う。また、細胞接着因子であるファイブロネクチンで固相化された培養用プレートを用いて細胞接着の促進が CD302 欠損を補うことが出来るかどうか調べる。この実験により CD302 が単に細胞接着因子の一つとして増殖や生存を助けているのか、細胞接着以外の機能をもっているのかが明らかに出来る。

CD302 の長期的な影響について解明するためにウイルスベクターを用いて恒常的に CD302 をノックダウンした細胞株を作出し、これを用いて骨芽細胞分化誘導培地で成熟骨芽細胞まで誘導した時の石灰化やアルカリフォスファターゼなどの成熟骨芽細胞の形質を測定し、併せて骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現変動を解析する。また、間葉系幹細胞においても CD302 の恒常的ノックダウン細胞を確立し、脂肪、軟骨、骨芽細胞への分化の方向付けにおける CD302 の役割についても明らかにする。

4 . 研究成果

まず骨芽細胞系の細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて分化誘導培養を行い、CD302 の発現変動について調べたところ、分化初期である増殖期において CD302 の発現がやや上昇することを見いだした。また、細胞密度と CD302 の発現の関連を調べた結果、正の相関を示すことが分かった。さらに、CD302 の発現を抑制したところ、細胞数が減少し、caspase3/7 の活性上昇が見られた。加えて、CD302 の発現抑制による細胞遊走の抑制も見られた。これらの結果は CD302 が生存維持に関与していることを示すことから、接着や生存に関わる細胞内シグナル伝達因子である FAK および Akt に着目し、CD302 がこの両者の活性化に必要であることも分かった。この結果は CD302 が細胞接着因子と何らかの関連を有している可能性を示している。そこで、ファイブロネクチンで固相化することで培養用プレートの細胞接着性を上昇させると CD302 の発現抑制による細胞死が抑制された。これらのことから CD302 はファイブロネクチンを介した細胞接着において重要な役割を果たしており、生存維持や遊走を制御する分子の一つであることが明らかになった。また、骨、軟骨、脂肪細胞へ分化する間葉系幹細胞で CD302 の発現が低下すると脂肪細胞へ分化しやすくなることも分かった。この結果は CD302KO マウスが肥満になることとも一致しており、CD302 は骨芽細胞への分化の方向付けから生存維持にまで幅広く活躍する接着因子の一つであることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamatsuki Yusuke, Aoyama Eriko, Furumatsu Takayuki, Ozaki Toshifumi, Takigawa Masaharu	4. 巻 2582
2. 論文標題 The Evaluation of Meniscus Regenerative Effects of LIPUS-Induced CCN Proteins: Induction by LIPUS of CCN2 and Meniscus-Related Genes in Cultured Meniscus Cells and Meniscus Tissues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 223 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2744-0_15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoyama Eriko, Takigawa Masaharu	4. 巻 2582
2. 論文標題 Evaluation of the Molecular Interaction Between CCN Protein and Its Binding Partners: A Solid-Phase Binding Assay and Surface Plasmon Resonance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 77 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2744-0_7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hoshijima Mitsuhiro, Aoyama Eriko, Kamioka Hiroshi, Takigawa Masaharu	4. 巻 2582
2. 論文標題 Imaging of Molecular Interaction Between CCN Protein and Its Binding Partners: An In Situ Proximity Ligation Assay of Interaction Between CCN2 and Rab14 in Chondrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 31 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2744-0_4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kubota Satoshi, Aoyama Eriko, Takigawa Masaharu, Nishida Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Fibroblast Growth Factors and Cellular Communication Network Factors: Intimate Interplay by the Founding Members in Cartilage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8592 ~ 8592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 奥舎 有加, 江口 傑徳, Tran Manh T., 十川 千春, 吉田 賀弥, 板垣 まみ, Taha Eman A., 小野 喜章, 青山 絵理子, 岡村 裕彦, 小崎 健一, Calderwood Stuart K., 滝川 正春, 岡元 邦彰	4. 巻 2022
2. 論文標題 高転移性癌細胞由来の細胞外小胞に搭載されたMMP3によるCtgf/Ccn2発現調節機能と癌転移促進 (Extracellular vesicles enriched with moonlighting metalloproteinase are highly transmissive, Pro-tumorigenic, and trans-activates cellular communication network factor(CCN2/CTGF): CRISPR against cancer)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences Supplement	6. 最初と最後の頁 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 ホアンディン・ロック, 青山 絵理子, 久保田 聡, 窪木 拓男, 滝川 正春	4. 巻 2022
2. 論文標題 S-アデノシルメチオニンはポリアミン産生だけでなく増殖因子の遺伝子発現を促進することによって軟骨分化を促進する(S-adenosylmethionine induces chondrocytic differentiation not only as source of polyamine production but also by stimulating growth factor genes expression)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences Supplement	6. 最初と最後の頁 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sogawa Chiharu, Eguchi Takanori, Namba Yuri, Okusha Yuka, Aoyama Eriko, Ohyama Kazumi, Okamoto Kuniaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Gel-Free 3D Tumoroids with Stem Cell Properties Modeling Drug Resistance to Cisplatin and Imatinib in Metastatic Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 344 ~ 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10020344	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okusha Y, Eguchi T, Tran MT, Sogawa C, Yoshida K, Itagaki M, Taha EA, Ono K, Aoyama E, Okamura H, Kozaki KI, Calderwood SK, Takigawa M, Okamoto K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Enriched with Moonlighting Metalloproteinase Are Highly Transmissive, Pro-Tumorigenic, and Trans-Activates Cellular Communication Network Factor (CCN2/CTGF): CRISPR against Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10020344.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshijima M, Hattori T, Aoyama E, Nishida T, Kubota S, Kamioka H, Takigawa M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Roles of Interaction between CCN2 and Rab14 in Aggrecan Production by Chondrocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082769.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoji M, Ueda M, Nishioka M, Minato H, Seki M, Harada K, Kubo M, Fukuyama Y, Suzuki Y, Aoyama E, Takigawa M, Kuzuhara T.	4. 巻 519
2. 論文標題 Jiadifenolide induces the expression of cellular communication network factor (CCN) genes, and CCN2 exhibits neurotrophic activity in neuronal precursor cells derived from human induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 309-315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita H, Ochi M, Ono M, Aoyama E, Ogino T, Kondo Y, Ohuchi H.	4. 巻 53
2. 論文標題 Glutathione accelerates osteoclast differentiation and inflammatory bone destruction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radic Res.	6. 最初と最後の頁 226-236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2018.1563782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamatsuki Y, Aoyama E, Furumatsu T, Miyazawa S, Maehara A, Yamanaka N, Nishida T, Kubota S, Ozaki T, Takigawa M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Possible reparative effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on injured meniscus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Commun Signal.	6. 最初と最後の頁 193-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-018-0496-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta K, Aoyama E, Ahmad SAI, Ito N, Anam MB, Kubota S, Takigawa M.	4. 巻 13
2. 論文標題 CCN2/CTGF binds the small leucine rich proteoglycan protein Tsukushi.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Commun Signal.	6. 最初と最後の頁 113-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-018-0487-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計17件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Loc Hoang Dinh, Eriko Aoyama, Miki Hiasa, Hiroshi Omote, Satoshi Kubota, Takuo Kuboki, Masaharu Takigawa
2. 発表標題 Effective regulation of S-adenosylmethionine on chondrocytic differentiation via interstimulation of polyamine production and growth factor genes expression.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Masaharu Takigawa
2. 発表標題 C-type lectin receptor CD302 positively regulates the migration and adhesion of osteoblasts
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Masaharu Takigawa
2. 発表標題 The novel mechanism of CD302 for the regulation of osteoblast adhesion
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Loc Hoang Dinh, Eriko Aoyama, Miki Hiasa, Hiroshi Omote, Satoshi Kubota, Takuo Kuboki, Masaharu Takigawa
2. 発表標題	Efficient regulation of S-adenosylmethionine on chondrocytic differentiation via stimulating polyamine production and growth factor genes expression.
3. 学会等名	第95回日本生化学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Loc Hoang Dinh, Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Takuo Kuboki, Masaharu Takigawa
2. 発表標題	S-adenosylmethionine: A metabolite to the regulation of Chondrocytic differentiation.
3. 学会等名	第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	東原直裕、青山絵理子、古松毅之、久保田聡、尾崎敏文、滝川正春
2. 発表標題	CCN2とGDF5およびBMPRIIとの結合が軟骨細胞へ及ぼす影響の検討
3. 学会等名	第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Loc Hoang Dinh, Eriko Aoyama, Miki Hiasa, Hiroshi Omote, Satoshi Kubota, Takuo Kuboki, Masaharu Takigawa
2. 発表標題	S-adenosylmethionine can promote polyamine synthesis and gene expression of growth factors genes expression thereby regulating chondrocytic differentiation.
3. 学会等名	第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 Loc Hoang Dinh, Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, TakuoKuboki, Masaharu Takigawa
2. 発表標題 S-アデノシルメチオニンによる軟骨細胞分化促進作用とそのメカニズムの解析 S-adenosylmethionine positively modulates differentiation in chondrocytes via polyamine biosynthesis
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Masaharu Takigawa
2. 発表標題 Expression and function of C-type lectin CD302 in osteoblasts C型レクチン様受容体CD302の骨芽細胞における発現と機能
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Masaharu Takigawa
2. 発表標題 骨芽細胞におけるCD302の発現と機能 The role and expression of C-type lectin CD302 in osteoblasts
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Airi Tanai, Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Masaharu Takigawa
2. 発表標題 Mechanism of enhancement by S-adenosylmethionine (SAM) on chondrocyte proliferation and differentiation: possible involvement of polyamine synthesis
3. 学会等名 第61回日本生化学会中四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青山絵理子、棚井あいり、久保田聡、滝川正春
2. 発表標題 S-アデノシルメチオニンによるポリアミン合成促進を介した軟骨細胞の分化促進作用
3. 学会等名 第52回結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青山絵理子、久保田聡、滝川正春
2. 発表標題 S-アデノシルメチオニンはポリアミン合成経路を介して軟骨細胞の増殖および基質合成を促進する
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青山絵理子、久保田聡、滝川正春
2. 発表標題 破骨細胞分化過程における低出力超音波パルスの細胞死誘導作用とそのメカニズムの解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青山絵理子、西田崇、久保田聡、滝川正春
2. 発表標題 低出力パルス超音波（LIPUS）の半月板修復効果とその作用機序:CCN2/CTGFの関与
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青山絵理子、久保田聡、山中信康、滝川正春
2. 発表標題 破骨細胞に対する低周波超音波パルスの分化抑制作用とその機序の解明
3. 学会等名 第11回日本CCN研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青山絵理子、久保田聡、山中信康、滝川正春
2. 発表標題 低出力超音波パルス刺激による破骨細胞前駆細胞のアポトーシス誘導とそのメカニズム
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	滝川 正春 (Takigawa Masaharu) (20112063)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究 分担者	久保田 聡 (Kubota Satoshi) (90221936)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------