

平成23年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592173

研究課題名 (和文)

CCNファミリー2/CTGFによる破骨細胞形成促進作用の分子メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Clarification of molecular mechanism on the osteoclastogenesis promoted by CCN family 2/connective tissue growth factor

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：マウスマクロファージ系細胞株(RAW264.7)及び胎生14.5日肝細胞にRANKL, M-CSF及びCCN2を添加すると、多核巨細胞数はRANKL, M-CSF刺激群よりも増加した。このメカニズムを調べるために胎生14.5日のCCN2欠損マウスから肝細胞を採取し、RANKL, M-CSFを添加すると、単核の破骨細胞までは分化するが、その後の細胞融合は抑制された。またCCN2欠損マウス由来の単核破骨細胞にCCN2を添加すると破骨細胞融合が回復した。これらの結果はCCN2が破骨細胞形成、特に細胞融合に関与する事を示唆している。

研究成果の概要 (英文)：Combination of RANKL, M-CSF and CCN2 significantly enhanced tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive multinucleated cell formation compared with RANKL and M-CSF. Therefore, we suspected the involvement of CCN2 in cell-cell fusion during osteoclastogenesis. To clarify the mechanism, we isolated fetal liver cells from *Ccn2*-null mice at E14.5 days, and investigated TRAP-positive multinucleated cell formation. The results showed that RANKL-induced osteoclastogenesis was impaired in fetal liver cells from *Ccn2*-null mice, and the impaired osteoclast formation was rescued by the addition of exogenous CCN2. These results suggest that CCN2 involves in cell-cell fusion during osteoclastogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：CCN2/CTGF, 破骨細胞形成, GST-RANKL, CCN2欠損マウス, 骨吸収活性, fetal liver cells, DC-STAMP, retrovirus

1. 研究開始当初の背景

内軟骨性骨化は軟骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、破骨細胞が関わるダイナミックな

組織変化を伴う骨化であり、長管骨など生体内で広くおこる骨化様式である。この骨化様式には多くの成長因子やホルモンなどの局

所因子が関わっていることが明らかにされているが、とりわけCCNファミリー2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF; CCN2)は軟骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に作用することが明らかにされており、内軟骨性骨化の進行を調節する重要な成長因子であることが示唆されている。以下、その作用を簡潔に示す。

(1) 軟骨細胞に対する作用：成長板軟骨細胞の増殖・分化、石灰化までを促進する一方、関節軟骨細胞では石灰化に関与することなく増殖・分化を促進する。

(2) 骨芽細胞に対する作用：骨芽細胞の増殖・分化を促進する。

(3) 血管内皮細胞に対する作用：CCN2単独では血管内皮細胞の増殖、遊走、血管新生を促進するが、血管内皮増殖因子(VEGF)に結合することで、VEGF機能を抑制する。

このようにCCN2は内軟骨性骨化全般を制御する非常にユニークな成長因子であるが、内軟骨性骨化の最終局面での軟骨から骨への置換の際の軟骨基質吸収に関わる破骨細胞形成にどのような役割があるかは不明であった。破骨細胞の形成には骨芽細胞が産生するM-CSFと骨芽細胞の細胞膜上に発現するRANKLの両者が必須であり、両者の刺激により血球系細胞は破骨前駆細胞を経て単核破骨細胞に分化し、さらに骨吸収活性を持つ多核破骨細胞になる。上記のCCN2の機能から考えると破骨細胞形成に対して何らかの作用があることは容易に想定でき、実際CCN2欠損マウスの成長板の組織学的所見では肥大軟骨細胞層の増大が認められている。このことは軟骨から骨への置換期での軟骨基質の破壊が十分に行われていないことを示唆しており、破骨細胞形成及び破骨細胞機能にCCN2が関わっている事が考えられる。そこで、本研究課題ではCCN2における破骨細胞形成及び機能に対する作用の解明に主眼を置いた。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は破骨細胞形成及びその機能に与えるCCN2の役割を解析することである。

(1) 破骨細胞形成の鍵分子であるM-CSF及びRANKL発現をCCN2が促進するかどうか骨芽細胞株を用いて解析する。

(2) M-CSF及びRANKL刺激による破骨細胞形成過程のどの段階でCCN2が関わっているのかを明らかにする。

(3) 破骨細胞の骨吸収能におけるCCN2の作用を明らかにする。

(4) CCN2欠損マウスから破骨前駆細胞を単離し、破骨細胞形成及び破骨細胞機能における

CCN2の作用を解析する。

(5) CCN2欠損ヘテロマウスを用いて骨粗鬆症モデルを作製し、骨吸収に対するCCN2の作用を*in vivo*の系で解析する。

本研究課題の最終的な目的はCCN2による生理的あるいは病的な骨・軟骨破壊を制御するメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) マウスマクロファージ系細胞株RAW264. 7を用いた破骨細胞様細胞の形成に対するCCN2の効果

RAW264. 7細胞にGST-RANKLを添加し、7日間培養すると、多核の破骨細胞様細胞に分化する。この分化過程のどの時期にCCN2の発現が見られるかを検討した。また、CCN2タンパク質を破骨細胞様細胞分化系に添加し、その分化が促進されるか検討した。

(2) RAW264. 7細胞を用いたCCN2とDC-STAMPとの共局在の検討

近年破骨細胞の細胞融合に必須分子であるDC-STAMPが報告された。CCN2が破骨細胞分化系の後期から発現レベルの上昇が見られる事、CCN2欠損マウスの骨髓腔内での多核破骨細胞数が少ない事からCCN2が細胞融合に関与している可能性を考え、DC-STAMPとの相互作用を解析した。

(3) CCN2欠損マウス由来の胎児性肝細胞を用いた破骨細胞形成及びその機能解析の検討

生後すぐに死亡してしまうCCN2欠損マウスでは骨髓から細胞を採取することは困難である。そこで、胎生期において造血器官として働く肝臓から細胞を採取し、M-CSF及びRANKL存在下でCCN2欠損マウス由来の胎児性肝細胞による破骨細胞形成を検討した。また、実際に分化した破骨細胞が骨基質吸収活性を持つかどうかを検討するため、人工ヒドロキシアパタイトをコーティングしたプレート上に細胞を播種し、ヒドロキシアパタイトの吸収部分の数を測定した。

(4) CCN2欠損マウス由来の破骨細胞に対するCCN2タンパク質の影響

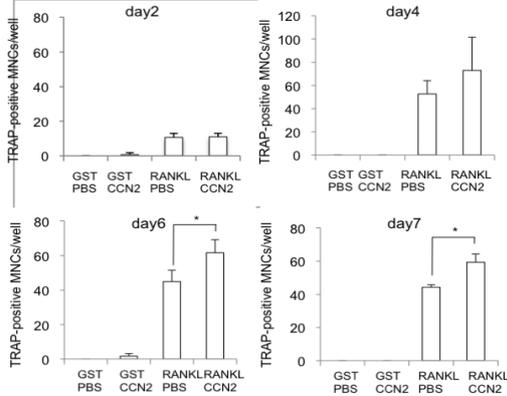
野生型及びCCN2欠損マウスから胎児性肝細胞を採取し、M-CSF及びRANKLによって破骨細胞様の細胞に分化させた時の両者の違いがCCN2タンパク質の添加によって補われるかどうかを検討した。また、DC-STAMP遺伝子の発現量にも影響が出るのかも検討した。

4. 研究成果

(1) GST-RANKLをRAW264. 7細胞に添加し、1, 6, 7日にtotal RNAを抽出した。各種破骨細胞の分化マーカー遺伝子と共にCCN2の発現レベル

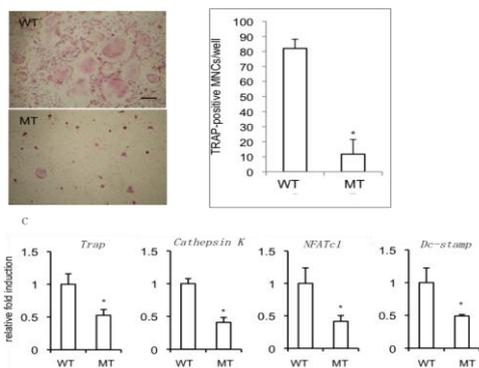
を調べると、培養開始6日目及び7日目にCCN2の発現レベルが著明に上昇した。この培養系にCCN2タンパク質を添加すると、培養開始6日目及び7日目で、GST-RANKL単独刺激に比べて有意に多核破骨細胞数は増加した。(図1)

(図1: CCN2によるTRACP陽性多核巨細胞形成の促進作用)



(2) RAW264.7細胞による破骨細胞形成において培養開始6日目及び7日目でCCN2発現量が著明に増加したことから、破骨細胞分化の後期でおこる細胞融合に関与している可能性を考えた。近年、破骨細胞の細胞融合に7回膜貫通型受容体であるDC-STAMP分子が重要な役割を果たしていることが報告されたため、CCN2とDC-STAMPとの相互作用を解析した。その結果、CCN2とDC-STAMPは共局在すると共に両分子は直接的に相互作用することが明らかとなった。(3) CCN2欠損マウスの胎児性肝細胞を採取し、RANKL及びM-CSFで破骨細胞分化を誘導すると、野生型に比べてCCN2欠損マウス由来の細胞で破骨細胞形成の抑制と、その分化マーカー遺伝子発現レベルの減少が見られた。(図2)

(図2: CCN2欠損マウス由来胎児性肝細胞を用いた破骨細胞形成の測定)



(4) CCN2欠損マウス由来の胎児性肝細胞による破骨細胞形成では野生型と比べて多核破骨細胞数及びDC-STAMPなどの破骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現レベルの低下が見られたが、この培養系にCCN2タンパク質を添加すると、ほぼ野生型と同程度の多核破骨細胞の形成と分化マーカー遺伝子である *Trap* 及び

Dc-stamp の遺伝子発現レベルの回復が見られた。また、破骨細胞機能である骨吸収活性においても *Ccn2* を siRNA でノックダウンすると、対照群と比較して骨吸収活性の抑制が見られたが、この系にCCN2タンパク質を添加すると、骨吸収活性の回復が見られた。しかし、細胞融合に必須のDC-STAMP遺伝子をレトロウイルスベクターによって過剰発現させても多核の破骨細胞数は野生型と同程度までは回復しなかった。

本研究課題で得られた研究成果は内軟骨性骨化において多機能性を発揮するCCN2が破骨細胞形成の後期でおこる細胞融合に促進的に関与していることを明らかにしたものであり、これまでの破骨細胞形成にCCN2が何らかの作用があるという報告をさらにメカニズムまで踏み込んで明らかにしたという点で大変意義深いものである。このような報告は国内外にこれまでなく、この成果はアメリカ骨代謝学会の機関誌である *Journal of Bone Mineral Research* に発表した。今度は骨吸収が亢進している骨粗鬆症のような疾患に対してCCN2がどのような役割を果たしているのかを明らかにすることで、これまでの骨粗鬆症治療法とは異なった観点から新規治療法の開発に繋がる可能性が考えられ、今後の展望が期待できる。

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 34 件)

以下に示す論文は全て査読有である。

① Nishida T, Emura K, Kubota S, Lyons KM, Takigawa M CCN family 2/ connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes osteoclastogenesis via induction of and interaction with dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *J. Bone Miner. Res.* 26, 351-363, 2011.

② Kondo S, Kubota S, Mukudai Y, Nishida T, Yoshihama Y, Shirota T, Shintani S, Takigawa M Binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to the cis-acting element of structure-anchored repression in *Ccn2* mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 405, 382-387, 2011.

③ Sumiyoshi K, Kubota S, Ohgawara T, Kawata K, Nishida T, Shimo T, Yamashiro T, Takigawa M. Identification of miR-1 as a micro RNA that supports late stage differentiation of growth cartilage cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402, 286-290, 2010.

④ Aoyama E, Hattori T, Hoshijima M, Araki D, Nishida T, Kubota S, Takigawa M N-terminal domains of CCN protein 2/connective tissue growth factor bind to aggrecan. *Biochem. J.*,

420: 413-420, 2009.

⑤ Maeda A, Nishida T, Aoyama E, Kubota S, Lyons KM, Kuboki T, Takigawa M CCN family 2/connective tissue growth factor modulates BMP signaling as a signal conductor, which action regulates the proliferation and differentiation of chondrocytes. *J. Biochem.* 145: 207-216, 2009.

⑥ Nishida T, Kondo S, Maeda A, Kubota S, Lyons KM, Takigawa M CCN family 2 /Connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) regulates the expression of *Vegf* through *Hif-1a* expression in a chondrocytic cell line, HCS-2/8, under hypoxic condition. *Bone* 44: 24-31, 2009.

⑦ Shimo T, Kubota S, Goda T, Yoshihama Y, Kurio N, Nishida T, Ng PS, Endo K, Takigawa M, Sasaki A Clinical significance and pathogenic function of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic mandibular squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 28 (4C): 2343-2348, 2008.

⑧ Kikuchi T, Kubota S, Asaumi K, Kawaki H, Nishida T, Kawata K, Mitani S, Tabata Y, Ozaki T, Takigawa M Promotion of bone regeneration by CCN2 incorporated into gelatin hydrogel. *Tissue Engineering Part A* 14, 1089-1098, 2008.

⑨ Nishida T, Maeda A, Kubota S, Takigawa M Role of mechanical-stress inducible protein Hcs24/CTGF/CCN2 in cartilage growth and regeneration: -Mechanical stress induces expression of Hcs24/CTGF/CCN2 in human chondrocytic cell line, HCS-2/8, rabbit hyaline costal chondrocytes and meniscus cells-*Biorheology*, 45(3-4), 289-299, 2008.

⑩ Ono M, Kubota S, Fujisawa T, Sonoyama W, Kawaki H, Akiyama K, Oshima M, Nishida T, Yoshida Y, Suzuki K, Takigawa M, Kuboki T Promotion of hydroxyapatite-associated, stem cell-based bone regeneration by CCN2. *Cell Transplantation*, 17(1-2), 231-240, 2008.

[学会発表] (計 131 件)

① 西田 崇 FGF2 刺激による軟骨細胞増殖促進及び MMP13 酵素活性上昇に与える CCN2/CTGF の影響。BMB2010 (第 83 回日本生化学会大会、第 33 回日本分子生物学会年会) 2010. 12.7-10. 神戸

② 西田 崇 軟骨細胞における FGF2 機能の新規モジュレーターとしての CCN2/CTGF の作用。

第 52 回歯科基礎医学会 2010. 9. 20-22. 東京

③ 西田 崇 CCN2/CTGF は FGF2 と結合することで軟骨細胞に対する FGF2 作用を修飾する。第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010. 7. 21-23. 東京

④ 西田 崇 線維芽細胞増殖因子(FGF)2 刺激による軟骨細胞増殖促進作用に与える結合組織成長因子(CCN2/CTGF)の影響。第 23 回日本軟骨代謝学会 2010. 4. 2-3. 鹿児島

⑤ 西田 崇 破骨細胞分化に与える CCN ファミリー2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF)の促進作用。第 82 回日本生化学会大会 2009, 10, 21-24 神戸

⑥ Nishida T. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes osteoclastogenesis via interaction with dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) 31th Annual Meeting of the ASBMR September 11-15, 2009 Denver

⑦ 西田 崇 CCN family2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF)は線維芽細胞増殖因子(FGF)-2 に結合し、FGF-2 によるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)13 発現を制御する。第 3 回日本 CCN ファミリー研究会 2009. 8.28-29 岡山

⑧ 西田 崇 CCN ファミリー2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF)は DC-STAMP の遺伝子発現レベルの上昇を介して破骨細胞形成を促進する。第 27 回日本骨代謝学会学術集会 2009.7.23-25 大阪

⑨ 西田 崇 CCN2/CTGFとBMP-2の相互作用が軟骨細胞の増殖と分化を制御する。BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008.12.9-12, 神戸

⑩ 西田 崇 破骨細胞形成における CCN2/CTGF の役割。第 2 回日本 CCN ファミリー研究会 2008. 8.29-30. 岡山

[図書] (計 2 件)

① Kubota S 他 Nucleophosmin/B23: A multifunctional regulator that determines the fate of *CCN2* mRNA. *CCN Proteins in Health and Disease*. A. Perbal, M. Takigawa & B. Perbal (eds), Springer, Dordrecht, Netherlands, 2010, p41-55.

② Takigawa M 他 Cooperative regulation of cell proliferation and differentiation by CCN2 and CCN3. *CCN Proteins in Health and Disease*. A. Perbal, M. Takigawa & B. Perbal (eds), Springer, Dordrecht, Netherlands, 2010, p105-109.

[その他]

岡山大学歯学部口腔生化学分野ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

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