

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890024

研究課題名（和文）CCN2 ノックアウトマウスの骨組織における機械的刺激応答メカニズムの
解明研究課題名（英文）Mechanisms of mechanical response in bony tissues derived from
CCN2 deficient mice.

研究代表者

川木 晴美（KAWAKI HARUMI）

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70513670

研究成果の概要（和文）：

(1) CCN2 ノックアウトマウスの軟骨組織ではCCN2 と、同ファミリーのCCN3 の発現量が増加し、両者はPTHrP-Ihh ループの調節にも関与しつつ協調して軟骨分化を制御することを見出した。(Kawaki et al., JBMR 2008.) (2) マウス骨組織中のCCN ファミリータンパク質の分布と初代骨芽細胞を用いた増殖・分化系にてmRNA レベルの変動とCCN タンパク質の機能を解析した結果、全メンバーが分化段階に応じて、それぞれの役割を果たしていることを明らかにした。(投稿準備中) (3) 同ファミリーのメンバーである、CCN4 の転写後発現調節について解析し、3' 非翻訳領域が mRNA の安定性に関与していることを見出した。(投稿準備中)

研究成果の概要（英文）：

(1) The lack of CCN2 caused up-regulation of CCN3 in CCN2-null mice, which resulted in the observed phenotypes, such as the resultant delay of terminal differentiation. The involvement of the PTHrP-Ihh loop in the regulation of CCN3 expression is also suggested. (Kawaki et al., JBMR 2008.)

(2) We investigated the expression of CCN family members and their functions osteoblast differentiation. Results showed that CCN members were differentially expressed and therefore could participate in osteoblast lineage progression. (manuscript in preparation.)

(3) We found that the stability of human *ccn4* mRNA was regulated by its 3' UTR region. (manuscript in preparation.)

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：CCN ファミリー、CTGF、ノックアウトマウス、骨芽細胞、骨細胞、軟骨細胞、メカニカルストレス、骨リモデリング

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療における歯の移動は、矯正力を負荷された骨のダイナミックなリモデリングを伴う。したがって矯正力に対する歯周組織の応答を解析することは歯の移動機構の解明に重要である。この観点から、申請者らは矯正歯の移動時における歯周組織を解析し、様々な遺伝子の発現量が変化することを報告してきた

(Takano-Yamamoto et al. J Histochem Cytochem. 1994., Terai et al. JBMR. 1999.)。その1つにCCN2がある。さらに申請者らはラットを用いた歯の移動実験系を確立し、移動後の歯槽骨中の骨芽細胞や骨細胞においてCCN2の発現量が著しく増加していることを見出した (Yamashiro et al. J Dent Res. 2001.)。また、ラット下顎枝骨折治癒過程において、メカニカルストレスを受けた未分化な軟骨細胞でもCCN2の発現が上昇することを報告した (Fukunaga et al. Bone. 2003.)。

一方、申請者らは、CCN2が軟骨細胞と骨芽細胞の増殖、成熟・分化、石灰化を促進し、血管内皮細胞の遊走と血管形成をも促進し内軟骨性骨化に重要な機能を果たす因子であることを報告してきたが

(Perbal, M. Takigawa, CCN Proteins: Imperial College Press. London. 2005.)、CCN2ノックアウトマウスでは、内軟骨性骨化の遅延だけでなく、骨芽細胞の活性が低下し、基質の蓄積量の減少や骨芽細胞マーカー遺伝子の発現量の低下、石灰化度の低下と、さらには破骨細胞の分化能の低下など膜性骨化にも異常が見られることを明らかにした (Nishida, Kawaki et al., J Cell Commun Signal. 2007., Kawaki et al BBRC. 2008.)。

このようにCCN2は骨組織の発生に重要な因子であることを報告してきたが、さらに未分化間葉系細胞の接着や軟骨細胞への分化を促進する因子であること (Ono, Kawaki et al. BBRC. 2007., Nishida et al. JBMR. 2004.)、骨折治癒過程における再生因子としての役割を果たしていることも報告し (Kikuchi, Kawaki et al. Tissue Eng. 2008.)、近年注目を集めている成長因子である。

2. 研究の目的

CCN2は、メカニカルストレス応答にも関与している可能性が示唆されていることから、骨リモデリング時の初期過程において重要な役割を担っていると推察できる。従って

CCN2を介したメカニカルストレス応答メカニズムの解明は骨リモデリング現象のコントロールを可能にする。以上をふまえ、CCN2ノックアウトマウスを用い、CCN2とファミリーを形成する他のCCNメンバー(類似あるいは相反する機能を持つと考えられている。)の動態がCCN2欠損によって変化するのかどうか、さらに他のCCNメンバーの骨組織における遺伝子発現制御とその機能を解析する。そしてCCNファミリーに関する分子基盤を確立した上で、メカニカルストレス負荷時のCCN2の機能について解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1). CCN2ホモ欠損マウスの基礎データの収集。

CCN2ホモ欠損ノックアウトマウスおよび野生型マウスより採取した軟骨細胞、骨芽細胞からRNAを精製し、マイクロアレイ解析を行って、CCN2欠損によって発現量の変化する遺伝子を探索する。

さらに、CCN2ホモ欠損マウスおよび同腹の野生型マウスの頭蓋冠や長管骨のパラフィン包埋切片を作成し、形態学的な観察と、各種マーカーの免疫組織化学的な染色による解析、さらに形態計測等を行い組織の成熟度等の野生型との相違点を明らかにする。

(2). CCN2ホモ欠損ノックアウトマウスおよび野生型マウスの軟骨組織における他のCCNメンバーの動態解析

免疫組織学的解析によるタンパクの分布とmRNA発現量の比較解析を行う。

(3). CCN2ホモ欠損ノックアウトマウスおよび野生型マウスの骨組織における他のCCNメンバーの動態解析

免疫組織学的解析によるタンパクの分布とmRNA発現量の比較解析を行う。

(4). CCN2ヘテロ欠損マウスの基礎データの収集。

ホモ欠損マウスのデータ収集と同様に形態学的な観察と、各種マーカーの免疫組織化学的な染色による解析、さらに形態計測等を行い組織の成熟度等の野生型との相違点を検索し、後に動物モデルとして用いる際に適切な週齢等の検討も行う。

(5). CCN2ヘテロ欠損ノックアウトマウスおよび野生型マウスの骨組織(頸骨、顎骨等)

を摘出し骨髄由来細胞やアウトグロースによる骨芽細胞を採取した後、固定し、マイクロCTにて比較解析を行う。採取した細胞からはRNAを精製し、CCN2の発現量および、その他の遺伝子について発現量を解析する。

(6). CCN2ヘテロ欠損マウスおよび野生型マウスを用いて実験的歯の移動モデルを作成し解析する。

CCN2ヘテロ欠損マウスおよび同腹の野生型マウスの上顎切歯にニッケル・チタン製ワイヤーを歯科充填用コンポジットレジンをを用いて接着し、上顎右側第一臼歯を口蓋側へ移動させる。次いで、実際に実験的歯の移動をタイムコースをとって追跡し、牽引側、圧迫側の形態学的・免疫組織学的観察と組織を破碎しRNAを回収し遺伝子発現レベルの比較解析を行う。

4. 研究成果

本研究は骨組織の発生・維持に重要な因子であるCCN2遺伝子を欠損させたCCN2ノックアウトマウスを用いて、欠損を補償する可能性のあるCCNファミリーメンバーの骨・軟骨組織における発現変化と機能の解析、およびメカニカルストレス応答に関するCCN2の機能の解析を目的として行われた。

(1) まず、野生型およびCCN2欠損マウスの肋軟骨より採取した初代軟骨細胞のRNAをマイクロアレイで解析したところ、細胞骨格の1つであるVimentinの発現量が最も低下していた。この結果を定量的に確かめるためにリアルタイムPCRにて解析したところ同様の結果を得た。さらに骨芽細胞でも評価したところ、CCN2欠損骨芽細胞では軟骨細胞同様、Vimentinの発現量が低下していた。(図1)

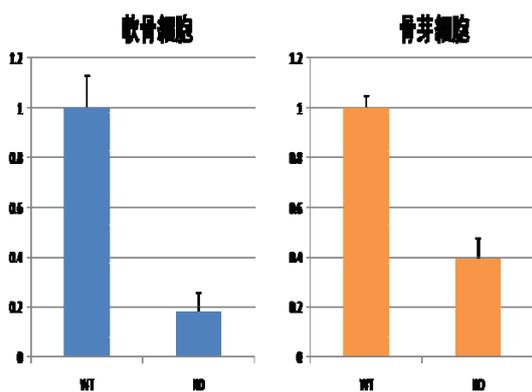


図1. 野生型およびCCN2欠損軟骨細胞(左)と骨芽細胞(右)におけるVimentinのmRNA発現量比較。

(2) 次いで、CCN2欠損マウスの軟骨組織におけるCCNファミリーメンバーの動態変化と機能解析を行った。内軟骨性骨化過程での全

CCNファミリーメンバーの局在を免疫染色で調べるとCCN1, 2, 3および6は増殖層から前肥大層に、CCN4と5は肥大層全域に分布していた。また、マウス軟骨芽細胞初代培養を用いた増殖・分化系でmRNAレベルの変動を調べると、*ccn3*がメンバー中最も早く、アグリカンmRNAと同時期にピークに達した。次いで、*ccn1, 2, 6*mRNAがピークに達し、*ccn4, 5*は培養を続けるに従って、すなわち肥大化しても上昇を続けた。さらに、CCN2欠損により、*ccn3*の発現量が増加し、CCN2とCCN3は互いに協調して、PTHrP-Ihhループの調節にも関与しつつ軟骨分化の制御に働いていることを見出した。(図2)

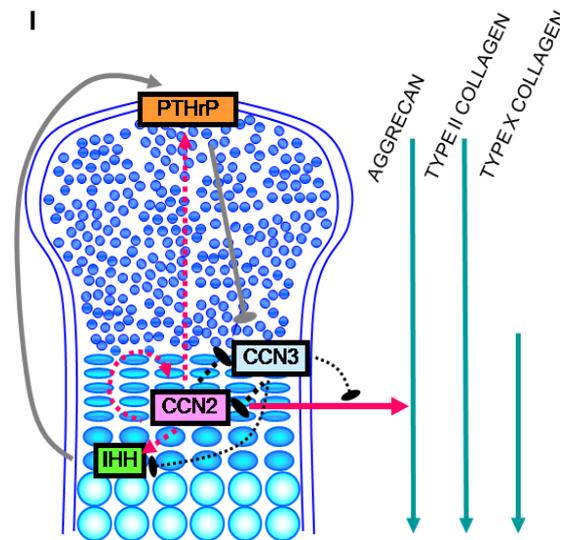


図2. CCN2とCCN3が協調してPTHrP-Ihhループと軟骨分化を調節する模式図。(Kawaki et al., JBMR 2008)

(3) さらに、CCN2と類似あるいは相反する機能を持つと考えられている他のCCN familyタンパク質の機能について、骨芽細胞を用いて解析した。その結果、*in vivo*では分化段階の早期にCCN3が分布し、次いでCCN1, 2が見られこの2つのメンバーは幼弱骨細胞にも分布していた。そしてCCN4, 5は成熟した骨細胞にも分布していることが分かった。*in vitro*でも、分化誘導を行った骨芽細胞においてCCNファミリー遺伝子は各メンバーがそれぞれ特徴的な発現パターンを示していた。さらにメンバーの機能を解析するために骨芽細胞の増殖、アルカリフォスファターゼ活性を指標とした分化、石灰化への作用を解析して1報を投稿準備中である。(図3)

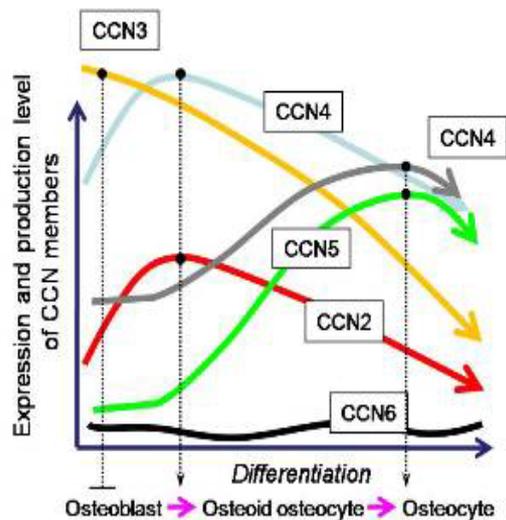


図 3. 骨芽細胞の分化と CCN ファミリー遺伝子の発現量変化の模式図 (投稿準備中)

(4) CCN2 欠損骨芽細胞に *in vitro* で分化誘導を行うと、*ccn3, 4* の発現量が野生型骨芽細胞に比較して増加しており、石灰化が遅れていること、リコンビナント CCN2 の添加で発現量増加と石灰化遅延がレスキューされたことから、骨芽細胞では CCN2 は CCN3 および CCN4 の発現量調節に関与していることが示唆された。(図 4)

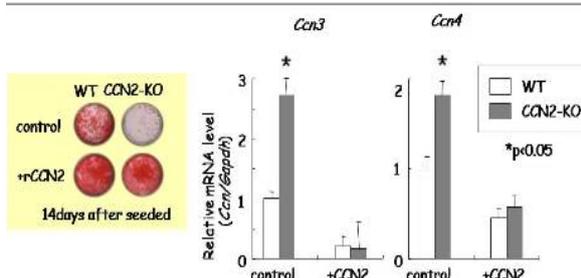


図 4. 野生型および CCN2 欠損骨芽細胞に rCCN2 を添加した時の石灰化と CCN3, 4 の mRNA 発現量変化

(5) そこで、CCN4 の発現について解析したところ、CCN4 タンパク質は骨芽細胞、軟骨細胞など主に骨組織に分布しており、その組織特異的発現に関与している 3'非翻訳領域による転写後調節機構を解析して 1 報を投稿準備中である。(図 5)

Evaluation of the effect of *ccn4* 3'-UTR on the gene expression in HeLa, HCS-2/8 and SaOS2 cells.

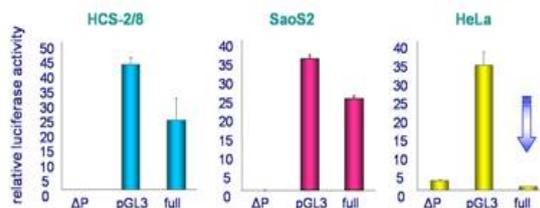


図 5. CCN4 の 3' 非翻訳領域によるルシフェラーゼ発現の低下は骨芽細胞様細胞の SaOS2 や軟骨様細胞である HCS-2/8 ではわずかであるが、上皮系細胞である HeLa では顕著であった。(投稿準備中)

(6) CCN2 ヘテロ欠損の影響についても解析を行った。

生後 6 か月、1 年の雄性マウスの左側の大腿骨、頸骨より骨髄を採取し付着した細胞を骨髄由来間質細胞として RNA を回収した。骨髄採取後の骨を小片化しアウトグロースにより骨芽細胞を得て、RNA を回収した。右側の大腿骨、頸骨は固定してマイクロ CT サンプルとして解析を行った。その結果、個体によって CCN2 発現量は異なるが、BMD 値や海面骨量は CCN2 の発現量に依存している傾向がみられた。また、歯の移動実験についても現在実施中であり、移動実験後は同様に骨髄細胞、骨芽細胞から RNA を回収し歯の移動度、新生骨の形成と CCN2 の発現量との相関関係について解析を行っている。

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 9 件)

1. Kawaki H, Kubota S, Aoyama E, Fujita N, Hanagata H, Miyauchi A, Nakai K, Takigawa M. Design and utility of CCN2 anchor peptide aptamers. *Biochimie*. 査読有、2010 年、印刷中

2. Imura H, Yamada T, Mishima K, Fujiwara K, Kawaki H, Hirata A, Sogawa N, Ueno T, Sugahara T. Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suggests abnormal palate development after palatal fusion. *Congenit Anom* (Kyoto). 査読有、2010 年、印刷中

3. Sumiyoshi K, Kubota S, Furuta RA, Yasui K, Aoyama E, Kawaki H, Kawata K, Ohgawara T, Yamashiro T, Takigawa M. Thrombopoietic-mesenchymal interaction

that may facilitate both endochondral ossification and platelet maturation via CCN2. *J Cell Commun Signal*. 査読有、2009年、印刷中

4. Ohgawara T, Kubota S, Kawaki H, Kondo S, Eguchi T, Kurio N, Aoyama E, Sasaki A, Takigawa M. Regulation of chondrocytic phenotype by micro RNA 18a: involvement of Ccn2/Ctgf as a major target gene. *FEBS Lett*. 査読有、583巻、2009年、1006-1010.

5. 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 Eng Part A*. 査読有、14巻、2008年、1089-1098.

6. Vincourt JB, Vignaud JM, Lionneton F, Sirveaux F, Kawaki H, Marchal S, Lomazzi S, Plénat F, Guillemin F, Netter P, Takigawa M, Mainard D, Magdalou J. Increased expression of matrilin-3 not only in osteoarthritic articular cartilage but also in cartilage-forming tumors, and down-regulation of SOX9 via epidermal growth factor domain 1-dependent signaling. *Arthritis Rheum*. 査読有、58巻、2008年、2798-2808.

7. Mukudai Y, Kubota S, Kawaki H, Kondo S, Eguchi T, Sumiyoshi K, Ohgawara T, Shimo T, Takigawa M. Posttranscriptional regulation of chicken ccn2 gene expression by nucleophosmin/B23 during chondrocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 査読有、28巻、2008年、6134-6147.

8. Kawaki H, Kubota S, Suzuki A, Lazar N, Yamada T, Matsumura T, Ohgawara T, Maeda T, Perbal B, Lyons KM, Takigawa M. Cooperative regulation of chondrocyte differentiation by CCN2 and CCN3 shown by a comprehensive analysis of the CCN family proteins in cartilage. *J Bone Miner Res*. 査読有、23巻、2008年、1751-1764.

9. Ono M, Kubota S, Fujisawa T, Sonoyama W, Kawaki H, Akiyama K, Shimono 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 Transplant*. 査読有、17巻、2008年、231-240.

[学会発表] (計11件)

1. 川木 晴美、鈴木 誠、藤井 俊哉、青沼 智、久保田 聡、滝川 正春、山本 照子、骨組織形成に関与するCCN4/WISP1 遺伝子の発現調節機構の解析、第68回 日本矯正歯科学会大会、2009年11月18日、福岡

2. 川木 晴美、鈴木 誠、藤井 俊哉、青沼 智、滝川 正春、山本 照子、骨組織形成に関与するCCN4/WISP1 遺伝子の発現調節機構の解析、第6回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム および 第14回 学際ライフサイエンスシンポジウム、2009年6月16日、仙台

3. Kawaki H, Suzuki M, Fujii T, Takigawa M, Takano-Yamamoto T. Possible role of CCN family proteins during osteoblast differentiation. Tohoku-Forsyth Symposium. 2009年3月10日、ボストン、USA

4. Kawaki H, Suzuki M, Fujii T, Takigawa M, Takano-Yamamoto T. Possible role of CCN family proteins during osteoblast differentiation. 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science. 2009年1月16日、仙台

5. 川木 晴美、久保田 聡、鈴木 晶子、前田 健康、山本 照子、滝川 正春、CCN2欠損マウスを用いた、CCN2 およびCCN3 によるPTHrP-Ihhループを介した軟骨細胞分化制御機構の解析、第26回 日本骨代謝学会学術集会、2008年10月29日、大阪

6. 川木 晴美、鈴木 誠、藤井 俊哉、久保田 聡、滝川 正春、山本 照子、CCN2 ノックアウトマウスを用いた骨芽細胞分化におけるCCNタンパク質の機能解析、第67回 日本矯正歯科学会大会、2008年9月18日、幕張

7. 川木 晴美、久保田 聡、鈴木 晶子、前田 健康、山本 照子、滝川 正春、マウス膜性骨化におけるCCNファミリーメンバーの役割解析、第2回 日本CCNファミリー研究会、2008年8月30日、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川木 晴美 (KAWAKI HARUMI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70513670