

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18756

研究課題名(和文)細胞内糖代謝をベースとした軟骨細胞における変形性関節症防御システムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of osteoarthritis defense system based on glucose metabolism in chondrocytes.

研究代表者

水川 朋美 (Mizukawa, Tomomi)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：60868412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)は患者のQOLを著しく低下させる慢性疾患であり、そこには解糖系の破綻の関与が示唆されている。Cellular communication network factorファミリーメンバーの1つCCN3は軟骨細胞で産生されその増殖や成熟に関与しているが、解糖系が遮断された場合強く発現誘導される。本研究ではこの飢餓・解糖遮断によるCCN3発現誘導が、プロモーター近傍のエンハンサーに転写因子RFX1が作用することによって起こること、そうして増産されたCCN3は軟骨細胞の生存を支えることを明らかにした。この成果はCCN3発現制御を通じた、新たなOA治療の開発へと道を開くものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による「CCN3遺伝子の転写制御メカニズムの一端が解明された」成果は、新たなTMJ-OA治療法の創造への足場の一つとなる可能性がある。現在のTMJ-OA治療は、夜間のメカニカルストレスを軽減するスプリント装着など、いわば口腔理学療法による予防にとどまる。軟骨破壊に対する再生療法が確立していないのは、整形外科領域のOAと同様だが、その代わりに務める人工物置換術もTMJ-OAでは困難で実施されていない。このような条件下で、TMJ-OA治療に福音をもたらす可能性のある本研究の創造性は鮮明である。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis (OA) that is observed also in the temporomandibular joints is a chronic disorder harming the quality of life. Impaired glycolysis, which is suggested to be involved in OA development, induces cellular communication factor (CCN) 3 that contributes to the growth regulation and maturation of chondrocytes. In this study, it was clarified that the CCN3 induction by starvation/impaird glycolysis was mediated by regulatory factor binding to the X-box (RFX)1 via a transcription enhancer located near the CCN3 promoter. Moreover, CCN3 produced in this way was found to support the survival of chondrocytes. These findings provide a scientific basis for the development of novel therapeutic approach against OA via the regulation of CCN3 production in cartilage.

研究分野：口腔生化学

キーワード：TMJ-OA CCN3 糖代謝 転写因子 エンハンサー領域 軟骨細胞 解糖阻害

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節は人体で唯一、2つの関節がつねに協調して複雑な運動を可能にしている特異な器官である。顎関節は咀嚼時以外にもストレスによる噛みしめ、不正咬合、そして睡眠時のブラキシズムによっても負荷を受け続けるため、これが変形性顎関節症(TMJ-OA)の発症原因の一つと考えられている。TMJ-OAは咀嚼に影響を与えるだけでなく、患者の quality of life を著しく低下させる疾患であるにもかかわらず、未だその病態や根本的治療法は確立されていない。膝や股関節では進行したOAの外科的根治療法が確立しているのに対し、顎関節にはそれがなく、また審美的な配慮が重要なため大きな外科処置はできず、内科的に軟骨組織を徐々に再生させる方法が理想的である。

OAの研究では解糖系阻害薬を用いたOAモデルが広く用いられている。これはOAの発症過程において、解糖系の障害が何らかの形で関わっていることを示唆している。応募者の研究グループでは、モノイodoacetate (MIA)を用いて軟骨細胞の解糖系を阻害すると、cellular communication network factor 3 (CCN3)の遺伝子発現が強く誘導されることを発見した。興味深いことにCCN3は関節軟骨細胞の成熟に重要な分子であることが明らかにされている。以上の結果から、MIAなどを用いた解糖系阻害によるCCN3の発現誘導は、軟骨細胞に備わっているOAに対する防御反応の一つではないかと考えられる。本研究は、そのメカニズムを解明し、CCN3の発現をコントロールすることでOAの防御、そして人工物置換に頼らない内科的な治療法の確立も可能になるのではないかと仮説のもと立案された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、軟骨細胞の潜在的な力を制御することによって、TMJ-OAの発症を阻止し傷ついた軟骨を修復する新しい治療法を生み出すための基盤を築くことである。そのために軟骨細胞でOA様変化をもたらす局所的糖代謝不全が、関節軟骨の成熟に深く関与するCCN3を強く発現誘導することに着目し、どのような分子がそれを媒介しているかを明らかにする。本課題開始時点でこのCCN3発現制御は転写段階で行われていることが分かりつつあったため、この制御を媒介するエンハンサーを決定し、そこに作用する転写因子を同定することを当面の到達目標とした。そして責任転写因子同定の後、それを制御する小分子を探索・改良し、TMJ-OA治療に続く成果を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 解糖系阻害によるCCN3遺伝子発現誘導現象の確認

ヒト軟骨細胞様HCS-2/8細胞に解糖系酵素の一つであるglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenaseを阻害するmonoiodoacetate (MIA)を作用させるとCCN3が誘導されることが過去の研究より明らかとなっていた。この現象が別の解糖系酵素であるenolaseを阻害するフッ化ナトリウム(NaF)でも再現されるかを、定量リアルタイムRT-PCRで検証した。続いてこれがヒト乳がん細胞株MCF7およびMDA-MB-231でも起こるかを同様に確認した。

### (2) 軟骨細胞においてCCN3を解糖系阻害下で誘導するエンハンサーの決定

解糖系阻害がCCN3プロモーターからの転写を強く活性化することはすでに知られていた。そこでCCN3プロモーター各種断片を蛍光シフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだプラスミドをHCS-2/8細胞に導入し、レポーター遺伝子アッセイによりこのCCN3発現調節を媒介しているエンハンサー領域をCCN3遺伝子座の中に突き止めた。

### (3) エンハンサーに結合する転写因子の同定

2で同定されたCCN3エンハンサー領域を*in silico*解析し、エンハンサーに結合する転写因子候補をリストアップした。続いてENCODEポータルサイトで公開されている、MCF7細胞における転写因子クロマチン免疫沈降(ChIP)-PCRデータを解析し、上記の転写因子候補からCCN3プロモーターに結合しているものを絞り込んだ。

### (4) 上記転写因子の機能検証

3で実際に HCS-2/8 細胞において見出された転写因子が、解糖系阻害による CCN3 誘導に関与しているかを検証した。まず当該転写因子の遺伝子発現が解糖系阻害により誘導されるかを 1 と同様の方法で検証した。続いて siRNA によって候補転写因子の発現をノックダウンし、NaF による解糖系阻害により CCN3 の発現誘導が起こるかを検証した。

(5) 解糖阻害下で CCN3 が軟骨細胞の viability に与える影響の検討

HCS-2/8 細胞を解糖阻害下におき、抗 CCN3 抗体を培地に添加して細胞の viability に与える影響を WST-8 アッセイで評価した。

(6) マウス骨端軟骨における CCN3 の産生状況の確認

胎生 16 日のマウス脛骨軟骨原基における CCN3 の分布を、免疫組織染色により確認した。

#### 4. 研究成果

(1) NaF による CCN3 発現誘導の、軟骨細胞ならびに乳がん細胞における確認

HCS-2/8 細胞、ヒト乳がん細胞株 MCF7 および MDA-MB-231 細胞において、MIA のみならず NaF による解糖阻害、およびグルコース飢餓状態によって CCN3 の発現が上昇することが確認された。したがって解糖系による CCN3 制御は軟骨細胞だけでなく他種細胞でも機能していることが分かった。また、この CCN3 の誘導は mRNA レベルだけでなくタンパク質レベルでも確認された。

(2) 解糖遮断による CCN3 発現誘導を媒介するエンハンサーの同定

CCN3 プロモーター断片を組み込んだ各種レポータープラスミドを HCS-2/8 細胞に導入し、解糖系遮断によるレポーター遺伝子の発現変動を解析することにより、CCN3 の発現誘導を媒介するエンハンサー領域をプロモーター近傍の 200 塩基対の領域にまで絞り込んだ。

(3) 解糖による CCN3 制御を担う転写因子の同定

まず上記で絞り込んだエンハンサー領域に結合しうる転写因子群を *in silico* で予測した。続いて ENCODE ポータルサイトの転写因子 ChIP データベースを解析し、MCF7 細胞において当該エンハンサーに実際に結合している転写因子群をリストアップした。上記 2 つの転写因子群両方に含まれる転写因子 regulatory factor binding to X-box (RFX)1 に着目し、その発現が解糖阻害によって増強することを見出した。さらに siRNA で RFX1 をサイレンシングすると、解糖阻害による CCN3 遺伝子の発現上昇が起こらなくなることを証明した。以上より、飢餓状態によって軟骨細胞において解糖系が遮断されると RFX1 が誘動され、それが CCN3 遺伝子を転写レベルで活性化することでその発現を上昇させることが証明された。

(4) 解糖阻害下で産生された CCN3 の役割の解明

解糖阻害によって生成される CCN3 が、どのような生物学的役割を担っているかを明らかにするため、解糖阻害条件下で培養した HCS-2/8 細胞に抗 CCN3 抗体を加えて CCN3 を吸着し、その分子機能の阻害を試みた。その結果、抗 CCN3 抗体の添加が軟骨細胞の viability を低下することが分かった。すなわち CCN3 は飢餓状態において軟骨細胞の生存を、おそらく細胞活動を制限することで支えているものと考えられた。

(5) *in vivo* での CCN3 産生部位・程度の検討

発生途中の脛骨軟骨原基を抗 CCN3 抗体を用いた免疫組織染色法にて解析したところ、関節液から遠く栄養供給に乏しい軟骨組織深部において比較的 CCN3 の産生が認められた。したがって軟骨組織では栄養の乏しい条件下で CCN3 が産生され飢餓状態に順応させる役割を担っていることが *in vivo* でも示唆された。

これらの成果に基づき、RFX1 を介して CCN3 の発現を制御できるような小分子化合物を探索したところ、意外なことにチミジンが候補分子として挙がってきた。研究期間内ではその効果を実験的に確かめるには至らなかったが、こういった分子を用いて CCN3 の発現を制御することで軟骨細胞の代謝を正常な方向に向け、TMJ-OA を治癒に向かわせることがで

きるかどうか、後続研究で明らかにして行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizukawa Tomomi, Nishida Takashi, Akashi Sho, Kawata Kazumi, Kikuchi Sumire, Kawaki Harumi, Takigawa Masaharu, Kamioka Hiroshi, Kubota Satoshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 RFX1 mediated CCN3 induction that may support chondrocyte survival under starved conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤壮真、河田かずみ、西田 崇、水川朋美、飯田征二、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるCCN2由来環状RNAの発現とその機能の探索。
3. 学会等名 第13回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤壮真、河田かずみ、水川朋美、西田 崇、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるCCN2由来環状RNAの探索とその機能。
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 水川 朋美、西田 崇、明石 翔、上岡 寛、滝川 正春、久保田 聡
2. 発表標題 軟骨細胞における解糖系によるCCN3遺伝子発現制御メカニズム
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川 朋美、西田 崇、明石 翔、河田 かずみ、菊池 董、川木 晴美、滝川 正春、上岡 寛、久保田 聡
2. 発表標題 軟骨細胞でのRFX1によるCCNファミリータンパク質3遺伝子制御メカニズム
3. 学会等名 第12回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川 朋美、西田 崇、明石 翔、堀 彩花、高柴 正悟、上岡 寛、滝川 正春、久保田 聡
2. 発表標題 解糖阻害剤NaFによるCCNファミリー遺伝子の制御を介した歯肉線維化抑制効果の検討
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川 朋美、西田 崇、河田 かずみ、川木 晴美、滝川 正春、上岡 寛、久保田 聡
2. 発表標題 飢餓状態の軟骨細胞におけるRFX1を介したCCN3の誘導機構とその意義
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 水川 朋美、西田 崇、明石 翔、河田 かずみ、菊池 董、川木 晴美、滝川 正春、上岡 寛、久保田 聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるRFX1を介したCCN3の発現制御機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川 朋美、西田 崇、明石 翔、大杉 綾花、大森 一弘、中山 真彰、高柴 正悟、上岡 寛、滝川 正春、久保田 聡
2. 発表標題 フッ化ナトリウムによるCCNファミリー遺伝子制御を介した歯肉線維化抑制作用の検討
3. 学会等名 第42回岡山歯学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川 朋美、西田 崇、明石 翔、上岡 寛、滝川 正春、久保田 聡
2. 発表標題 軟骨細胞における解糖系によるCCN3遺伝子発現制御メカニズム
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川 朋美、西田 崇、明石 翔、上岡 寛、滝川 正春、久保田 聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるエネルギー代謝不全を介したCCN3の増産システムの解明
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水川 朋美、西田 崇、明石 翔、上岡 寛、滝川 正春、久保田 聡
2. 発表標題 軟骨細胞での解糖活性による CCN3 遺伝子の発現調節
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水川 朋美、西田 崇、上岡 寛、久保田 聡
2. 発表標題 フッ素イオンによるCCNファミリー遺伝子の制御を介した歯肉線維化抑制効果の検証.
3. 学会等名 第79回日本矯正歯科学会学術大会 (79th JOS)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Mizukawa, T. Nishida, S. Akashi, H. Kamioka, M. Takigawa, S. Kubota
2. 発表標題 Regulation of CCN3 gene expression by glycolytic activity in chondrocytes
3. 学会等名 第9回国際矯正歯科会議世界大会 (9th IOC) (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究協力者	滝川 正春  (Takigawa Masaharu)		
研究協力者	久保田 聡  (Kubota Satoshi)		
研究協力者	上岡 寛  (Kamioka Hiroshi)		



6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	西田 崇  (Nishida Takashi)		
研究協力者	服部 高子  (Hattori Takako)		
研究協力者	河田 かずみ  (Kawata Kazumi)		

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