

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791788

研究課題名（和文） 結合組織成長因子（CCN2/CTGF）によるRANKシグナル制御機構の解明

研究課題名（英文） The analysis of binding of CTGF/CCN2 to RANK and its effects on RANK/RANKL signaling

研究代表者

青山 絵理子（AOYAMA ERIKO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10432650

研究成果の概要（和文）：CCN2/CTGFはCCNファミリーの一つであり、様々な生理活性因子と結合し、その作用を制御することが報告されている。我々はこの点に注目し、CCN2/CTGFの結合因子をさらにスクリーニングした結果、CCN2/CTGFはTNFRファミリーの一員であるreceptor activator of NF-kappaB（RANK）と結合し、さらにRANKのデコイレセプターでありその作用を抑制する因子OPGとも結合性を有することを示した。さらに骨を破壊する細胞である破骨細胞の前駆細胞であるRAW264.7細胞ではRANKL刺激によって引き起こされる種々のRANKシグナルの活性化がCCN2/CTGFによって増強された。また、CCN2/CTGFはOPGによるRANKL刺激の抑制を減弱させた。これらのことからCCN2/CTGFは二種類の経路を介して成熟破骨細胞の細胞形成促進することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：CCN2/CTGF which is a member of CCN2 family proteins binds to various cytokines and modulates the effects. We screened the binding proteins to CCN2/CTGF and found receptor activator of NF-kappaB (RANK). CCN2/CTGF also could bind to OPG which was a decoy receptor and inhibited the effect of RANK. In the RAW264.7, preosteoclast, CCN2/CTGF augmented the stimulation of RANKL (RANK ligand) and attenuated the inhibitory effect of OPG on RANK/RANKL signaling. These data showed that CCN2/CTGF enhanced differentiation of osteoclast via two different pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：CTGF/CCN2, RANK, OPG, RANKL, RAW264.7, SPR, MAPK

1. 研究開始当初の背景

CCN family 2/connective tissue growth

factor (CCN2/CTGF) は主に間葉系の細胞、組織において増殖、分化、遊走などを促進する因子であるが、その作用経路は未解明な部分が多い。これまでに得られた報告から CCN2/CTGF は数多くの生理活性因子やそのレセプターなどと結合し、そのシグナル経路を制御することで作用を発揮しているものと考えられている。そこで申請者はファージディスプレイ法を用いて CCN2/CTGF と結合するペプチド配列を広く探索したところ、Receptor Activator of NF- κ B (RANK)との結合を示唆するデータが得られた。

2. 研究の目的

RANK がそのリガンドであるRANKL と結合することによってもたらされるシグナルは破骨細胞分化に必須であることは、すでに明らかにされている。そこで本研究ではCCN2/CTGF はRANK とどのように結合するのか、CCN2/CTGF とRANKとの結合はRANK-RANKL シグナルにどのような影響を与えうるのかを解析する。本研究によって得られる知見によってRANK-RANKL シグナルの新しい制御機構が解明され、RANK-RANKL シグナルの異常に関連する諸疾患の理解と治療法の開発、例えば高齢化に伴い増加している骨粗鬆症の新治療法の創出などに寄与することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) CCN2 とRANK の結合の化学的性質に関する解析

① 固相化結合実験法によるCCN2/CTGF とRANK との結合の確認およびCCN2/CTGF のRANK-RANKL 結合に及ぼす影響の検討

② 表面プラズモン共鳴法によるアフィニティ解析

③ RANK の細胞内ドメインとの結合の確認

④ RANK との結合におけるCCN2/CTGF の4つのモジュールの役割と結合阻害分子の検討

(2) CCN2 とRANK との結合の生理的意義に関する解析

① RANK 発現細胞上でのCCN2/CTGF-RANK 結合の確認

② CCN2/CTGF の結合によるRANK-RANKL シグナルの変動の検討

③ CCN2/CTGF-RANK 結合の阻害因子による破骨細胞誘導の抑制作用の検討

4. 研究成果

(1) 主な成果

①CCN2/CTGF をEIA プレートに固相化し、ヒトIgG Fc 融合リコンビナントRANKを反応させ、その結合量を抗ヒトIgG抗体で検出する固相化結合実験法によってRANKとCCN2/CTGFの間に特異的結合がみられた。

②RANKとCCN2/CTGFとの解離定数をプラズモン共鳴法によって求めたところ、95.1 nMであることが分かった。

③CCN2/CTGFはRANKの特異的リガンドであるRANKLとRANKとの結合にはほとんど影響を及ぼさなかった。

④RANKとCCN2/CTGFとの結合を示唆したファージディスプレイで用いられていたペプチドの配列をBLAST等で解析したところTNFR superfamilyのリガンド結合領域のホモログである4つのシステイン・リッチ・ドメイン(CRD)の一部と相似していることが分かった。そこでこの配列を含むペプチドを合成し、RANKとCCN2/CTGFの固相化結合実験に加えてみたところ予想に反して両者の結合を促進した。

⑤RANKのデコイレセプターであるOPGもまたCCN2/CTGFと結合することが示された。この両者の解離定数は24.5 nMであり、これはOPGとRANKLとの解離定数として報告されている

ものにほぼ等しい。

⑥OPGをRANKとCCN2/CTGFの固相化結合実験系に添加したところ濃度依存的に両者の結合を阻害することが分かった。

⑦破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞を用いた検討からRANKシグナルの活性化に伴うNF- κ Bの核移行が、CCN2/CTGFを共存することによって促進されることが分かった。

⑧同じくRAW264.7細胞を用いた検討からCCN2/CTGFによってRANKL刺激によるERK、p38、JNKといったMAPKのリン酸化が促進されることが明らかになった。

⑨マウス胎仔肝細胞から誘導された破骨細胞の成熟をCCN2/CTGFが促進することが成熟破骨細胞マーカーであるTRAP染色法で示された。

⑩OPGはRANKLによるTRAP染色陽性細胞の増加を抑制するが、CCN2/CTGFはOPGのRANKL抑制作用を阻害し、TRAP陽性細胞の増加を回復させた。

(2) 今後の展望

CCN2/CTGFはRANKと直接結合し、この結合は比較的強力なものであるといえる。また、このCCN2/CTGFとRANKとの結合はRANKの本来のリガンドであるRANKLとの結合には直接影響しないものの破骨細胞前駆細胞においてRANKLによってもたらされるRANKシグナルの活性化を促進しうるということが分かった。また、マウス胎仔肝細胞からの破骨細胞誘導に促進的に働いていることも明らかになった。これまでに本研究の研究協力者である西田らによってCCN2/CTGFが破骨細胞の分化に必須であることが示されているが、今回の研究でCCN2/CTGFは破骨細胞分化に不可欠なRANKLのレセプターであるRANKに直接作用し、そのシグナルを増強することによってその機能を発揮していることが示された。また、さらにCCN2/CTGFはRANKのデコイレセプターであるOPGとも強く結合し、その作用を抑制

することからRANKシグナルの抑制系を抑制することによっても破骨細胞分化を促進しているといえる。今回の研究からCCN2/CTGFによる破骨細胞分化はRANKシグナルの促進およびOPGの抑制といった二つの経路を介していることがわかった。これまでに破骨細胞の分化に影響するさまざまな因子が見いだされているがこのように促進系および抑制系の両方の経路に同時に関与することで機能している因子はCCN2/CTGFのみである。この他にもCCN2/CTGFは骨芽細胞の増殖、分化にも促進的に働いていることが分かっており、骨代謝において非常に多彩な機能を発揮する重要な因子であることが示された。

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)

[学会発表] (計6件)

1. 青山絵理子、久保田聡、西田崇、滝川正春
Receptor activator of NF- κ B (RANK) 結合タンパク質であるCCN2/CTGFのRANKL誘導性破骨細胞形成における機能
第32回岡山歯学会
2011. 11. 13
岡山
2. 青山絵理子、久保田聡、西田崇、滝川正春
The function of CCN2/CTGF, a receptor activator of NF- κ B (RANK) - binding protein, in RANKL-induced osteoclastogenesis
第84回日本生化学会大会
2011. 9. 21-24
京都
3. 青山絵理子、久保田聡、西田崇、滝川正春
CCN2のRANK (receptor activator of nuclear factor kappa B)の結合とRANK-RANKLシグナル制御作用

第4回日本CCNファミリー研究会

2011. 8. 26-27

岡山

4. 青山絵理子、久保田聡、西田崇、滝川正春
RANK 結合タンパク質 CCN2/CTGF は
RANK-RANKL シグナルを促進する
第29回日本骨代謝学会
2011. 7. 28-30
大阪

5. Eriko Aoyama, Satoshi Kubota, Takashi
Nishida, Masaharu Takigawa
The role of CCN2/CTGF binding to
receptor activator of NF- κ B (RANK) in
the RANK-RANK ligand system
第33回日本分子生物学会年会・第83回日本
生化学会大会合同大会
2010. 12. 7-10
神戸

6. 青山絵理子、久保田聡、滝川正春
CCN2/CTGF とRANK の分子間相互作用の解
析と骨代謝における意義
第28回日本骨代謝学会
2010. 7. 21-23
東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 絵理子 (AOYAMA ERIKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教
研究者番号：10432650

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

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

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