

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592732

研究課題名(和文)CCNファミリー間のネットワーク形成による筋肉内異所性骨化の分子機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism of muscle heterotopic ossification by forming a network with CCN family proteins

研究代表者

西田 崇(Nishida, Takashi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30322233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：マウス筋芽細胞株C2C12に炎症性サイトカインの一つであるTNF- α を作用させると、CCN2/結合組織成長因子(CTGF)の産生量の増加が見られ、CCN2はC2C12細胞の細胞増殖とMyoD産生量を増加させた。この結果に一致して、Ccn2欠損マウスの筋組織では野生型と比べて筋芽細胞の細胞増殖が低下し、筋組織も低形成を示した。また、C2C12細胞にCCN2とBMP2を同時に添加すると、BMP2単独刺激で上昇したRunx2及びOsterixの遺伝子発現レベルは有意に減少した。

研究成果の概要(英文)：The protein production of CCN2 (also known as Connective tissue growth factor) was increased in mouse myoblastic cell line C2C12 by treatment with tumor necrosis factor- α , which is produced upon inflammation. CCN2 promoted cell proliferation and the protein production of MyoD in C2C12 cells. Consistent with these findings, in vivo analyses with Ccn2-deficient skeletal muscle showed the decreased PCNA staining and muscle hypoplasia. Furthermore, bone morphogenetic protein (BMP)2-induced Runx2 and Osterix gene expression levels were significantly decreased in C2C12 cells co-treated with CCN2.

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 C2C12細胞 骨格筋分化 異所性骨化 BMP2 Ccn2欠損筋芽細胞

1. 研究開始当初の背景

外傷などによって骨格筋に炎症がおこると、炎症性シグナルによって筋線維周囲のサテライト細胞が増殖し、筋芽細胞へと分化する。その後、これら筋芽細胞は互いに癒合して新しい筋線維を形成し、骨格筋は修復される。この過程は多くの転写因子やその転写因子によって制御されるタンパク質などが複雑に絡み合って機能することで進行すると考えられている。しかし、一旦、筋組織の修復メカニズムが破綻すると、再生能力に富む骨格筋組織は容易に病的な形質転換を引き起こし、骨格筋内に異所性骨化を引き起こす。骨格筋の異所性骨化に深く関わっている成長因子が骨形成因子(BMP)2である。BMP2は発生過程や骨折治癒の骨・軟骨形成を強力に促進する成長因子として知られているが、軟組織においては異所性骨化の原因因子として考えられている。そのため、異所性骨化の発症メカニズムを解明するためにはBMP2機能を制御する分子を理解することが必要不可欠である。

CCNファミリータンパク質は6種のメンバーから構成され、生体内で極めて多彩な生理活性を持つ。これはCCNファミリー間に共通して見られる4つのモジュール構造に種々の成長因子や細胞外基質タンパク質が結合するためと考えられており、BMP2もモジュールに結合する成長因子の一つである。我々の研究グループを含めた国内外の研究グループによってCCNファミリーメンバーのいくつかの分子とBMP2が結合し、BMP2機能を修飾する事が明らかにされている。とりわけ、CCNファミリーメンバーの一つであるCCN2は他のBMP2の調整因子と異なって、BMP2が作用を発揮する組織に応じてBMP2の機能を協調的にも抑制的にも修飾することが解明されつつあり、CCN2を中心としたCCNファミリータンパク質が異所性骨化の発症メカニズムに深く関わっている可能性は十分に考えられる。そこで、本研究課題はCCN2を中心にCCNファミリータンパク質間に互いを制御し合う発現制御ネットワークの様なものが形成されていると仮定し、このネットワークが骨格筋の修復過程や異所性骨化にどのように関わっているかを明らかにすることに主眼を置いた。

2. 研究の目的

本研究課題の目的はCCN2を中心にCCNファミリー間に形成されるネットワークを想定し、このネットワークの作用による骨格筋の細胞増殖及び筋芽細胞分化に与える影響と骨格筋内におこる病的な石灰化、即ち異所性骨化の発症メカニズムを明らかにすることである。この研究課題を解明するに当たって以下の手順で実験を行った。

(1) CCNファミリータンパク質間に互いの発現量を調整し合うネットワークの様なものが

存在するのかを*Ccn2*欠損マウス由来の筋芽細胞を用いて解析した。

(2) 炎症性サイトカインの一つであるTNF- α をC2C12細胞に作用させた時の筋芽細胞分化に与える影響とCCN1, 2, 3の古典的CCNファミリーメンバーの発現レベルの変動を検討した。

(3) CCN2による筋芽細胞の増殖及び分化に与える影響を検討した。

(4) *Ccn2*欠損マウスの筋組織を用いて筋芽細胞の増殖及び筋形成に与える影響を組織学的に検討した。

(5) BMP2による筋芽細胞の骨芽細胞様変化に与えるCCN2の作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) CCNファミリータンパク質間のネットワーク形成の有無の検討。

*Ccn2*欠損マウスの筋芽細胞を分離、培養し、成熟筋細胞に分化誘導した。野生型及び*Ccn2*欠損筋芽細胞からtotal RNAを抽出して定量RT-PCR解析を行った。

(2) TNF- α で刺激を加えたC2C12細胞におけるCCN2タンパク質の産生亢進作用の検討。C2C12細胞に分化誘導を行うと同時に用量及び作用時間の条件を変えてTNF- α を添加し、CCN2の産生量が促進されるかどうかをWestern blot法を用いて検討した。

(3) 組換えCCN2タンパク質(rCCN2)によるC2C12細胞の細胞増殖促進及び分化誘導に対する影響の検討。

C2C12細胞にrCCN2を添加し、BrdUの取り込みを指標とした細胞増殖試験及び抗MyoD抗体あるいは抗Myogenin抗体を用いたWestern blot解析を行った。

(4) *Ccn2*欠損筋組織における組織学的検討。*Ccn2*欠損マウスは出生直後に死亡してしまうため、胎生18.5日胚のマウスから筋組織を採取し、ヘマトキシリン-エオジン(H-E)及びマッソンゴールドナー染色を行った。また、抗PCNA抗体及び抗Desmin抗体による免疫組織学的検討を行った。

(5) 筋芽細胞の骨芽細胞様変化に対するCCN2の影響の検討。

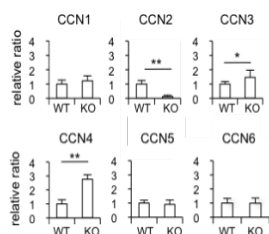
C2C12細胞にBMP2を添加すると、骨芽細胞の分化マーカー遺伝子(*Runx2*, *Osterix*)の発現量が増加する事は既に明らかされているので、BMP2刺激と同時にrCCN2を添加して、これら分化マーカー遺伝子の発現レベルがどのように変化するのかを定量RT-PCR法で検討した。

4. 研究成果

(1) CCNファミリータンパク質間のネットワーク形成。

*Ccn2*欠損筋芽細胞を分化誘導し、total RNAを抽出した。各CCNファミリータンパク質の特異的プライマーを用いて定量RT-PCR法を行った結果、*Ccn3*及び*Ccn4*の遺伝子発現レベ

ルが*Ccn2*欠損筋芽細胞で有意に上昇した(図1)。



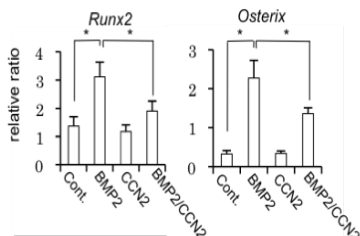
(図1) *Ccn2*欠損筋芽細胞におけるCCNファミリータンパク質の発現

(2) 分化誘導したC2C12細胞にTNF- α を添加した後に古典的CCNファミリータンパク質(CCN1, 2, 3)に対する特異的プライマーを用いて定量RT-PCR法を行った結果、CCN1はほとんど影響が見られず、CCN3は発現量の減少が見られた。CCN2のみがTNF- α 刺激によって発現レベルの亢進が見られた。また、TNF- α の用量及び作用時間の条件を変えてCCN2の産生量における影響を調べた所、濃度依存的及び時間依存的にCCN2の産生量の増加が見られた。

(3) C2C12細胞にrCCN2を添加し、細胞増殖試験を行うと、rCCN2の濃度依存的に細胞増殖の指標であるBrdUの取り込み量は有意に増加した。また、筋芽細胞の初期の分化マーカーであるMyoDの産生量はrCCN2により濃度依存的に増加したが、分化後期のマーカーであるMyogeninの産生量は逆に減少した。さらに、Myogeninの下流にあるMyosin heavy chain (MHC)やDesminの遺伝子発現レベルもCCN2添加によって抑制された。

(4) *Ccn2*欠損マウスの筋組織を採取し、H-E染色及びマッソンゴールドナー染色を行うと、野生型マウスの筋組織と比べて筋萎縮様の所見が見られた。また、抗PCNA抗体を用いた免疫染色を行うと、*Ccn2*欠損筋芽細胞の方が野生型筋芽細胞よりもPCNA陽性細胞数が減少した。

(5) C2C12細胞にBMP2を添加すると、C2C12細胞は骨芽細胞様に形質転換し、骨芽細胞の分化マーカー遺伝子を発現することが報告されている。実際、C2C12細胞にBMP2を添加すると、骨芽細胞のマスター遺伝子である*Runx2*や*Osterix*の遺伝子発現レベルが亢進したが、この系にCCN2をBMP2と同時に添加すると、*Runx2*や*Osterix*の遺伝子発現レベルはBMP2単独刺激よりも有意に減少した(図2)。



(図2) BMP2とCCN2を同時添加したC2C12細胞における骨芽細胞様変化

これまで国外を中心に筋芽細胞分化においてCCN2の作用は線維化などの病的な一面でしか述べられていなかったが、本研究課題によってCCN2は筋芽細胞の細胞増殖の促進や筋芽細胞の初期分化の促進と言った生理的な役割も担っていることが明らかにされた。また、本課題で得られた研究成果は我々が推定したCCNファミリーメンバー間で形成されるネットワークの様なものの存在を示唆しており、このネットワークの破綻が異所性骨化のような病態を引き起こすのかもしれない。さらに、CCN2は異所性骨化の原因因子であるBMP2に対して抑制的に作用することもこの課題で明らかにしており、異所性骨化の発症だけでなく、その治療にも将来応用できる研究成果であり、大変意義深いものとする。

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29件)

以下に示す論文は全て査読有である。

- ① Maeda-Uematsu, A., Kubota, S., Kawaki, H., Kawata, K., Miyake, Y., Hattori, T., Nishida, T., Moritani, N., Lyons, K. M., Iida, S., Takegawa, M.: CCN2 as a novel molecule supporting energy metabolism of chondrocytes. *J. Cell Biochem.*, 115, 854-865, 2014. doi: 10.1002/jcb.24728.
- ② Abd El Kader, T., Kubota, S., Nishida, T., Hattori, T., Aoyama, E., Janune, D., Hara, E. S., Ono, M., Tabata, Y., Kuboki, T., Takegawa, M.: The regenerative effects of CCN2 independent modules on chondrocytes in vitro and osteoarthritis models in vivo. *Bone*, 59:180-188, 2014. doi: 10.1016/j.bone.2013.11.010.
- ③ Itoh, S., Hattori, T., Tomita, N., Aoyama, E., Yutani, Y., Yamashiro, T., Takegawa, M.: CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) has anti-aging effects that protect articular cartilage from age-related degenerative changes. *PLoS One*, 8, e71156, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0071156. eCollection 2013.
- ④ Nakagawa, Y., Minato, M., Sumiyoshi, K., Maeda, A., Hara, C., Murase, Y., Nishida, T., Kubota, S., Takegawa, M.: Regulation of CCN1 via the 3'-untranslated region. *J. Cell Commun. Signal.*, 7, 207-217, 2013. doi: 10.1007/s12079-013-0202-x. Epub 2013 May 16.
- ⑤ Tomita, N., Hattori, T., Ito, S., Aoyama, E., Yao, M., Yamashiro, T., Takegawa, M.: Cartilage-specific overexpression of CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates insulin-like growth factor expression and bone growth. *PLoS One*, 8, e59226, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0059226. Epub 2013 Mar 28.
- ⑥ Nishida, T., Kubota, S., Aoyama, E., Takegawa,

M.: Impaired glycolytic metabolism causes chondrocyte hypertrophy-like changes via promotion of phospho-Smad1/5/8 translocation into nucleus. *Osteoarthritis Cartilage*, 21, 700-709, 2013. doi: 10.1016/j.joca.2013.01.013. Epub 2013 Feb 4.

⑦ Hoshijima, M., Hattori, T., Aoyama, E., Nishida, T., Yamashiro, T., Takigawa, M.: Roles of heterotypic CCN2/CTGF-CCN3/NOV and homotypic CCN2-CCN2 interactions in expression of the differentiated phenotype of chondrocytes. *FEBS J.*, 279, 3584-3597, 2012. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08717.x. Epub 2012 Aug 28.

⑧ Kawata, K., Kubota, S., Eguchi, T., Aoyama, E., Moritani, N., Kondo, S., Nishida, T., Takigawa, M.: Role of low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in CCN2/connective tissue growth factor (CTGF) protein transport in chondrocytes. *J. Cell Sci.*, 15, 2965-2972, 2012. doi: 10.1242/jcs.101956. Epub 2012 Mar 27.

⑨ Nishida, T., Kubota, S., Aoyama, E., Janune, D., Maeda, A., Takigawa, M.: Effect of CCN2 on FGF2-induced proliferation and MMP9 and MMP13 productions by chondrocytes. *Endocrinology*. 152, 4232-4241, 2011. doi: 10.1210/en.2011-0234. Epub 2011 Sep 13.

⑩ Janune, D., Kubota, S., Nishida, T., Kawaki, H., Perbal, B., Iida, S., Takigawa, M.: Novel effects of CCN3 that may direct the differentiation of chondrocytes. *FEBS Lett.*, 585, 3033-3040, 2011. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.024. Epub 2011 Aug 23.

〔学会発表〕(計 122 件)

①西田 軟骨細胞における低出力超音波 (LIPUS) と ROCK 阻害剤による CCN2 の相加的産生。第 27 回日本軟骨代謝学会、2014, 2,28-3,1, 京都

②西田 マウス筋芽細胞において CCN2 は BMP2 による骨芽細胞様変化を抑制する。第 55 回歯科基礎医学会、2013.9.20-22、岡山

③西田 軟骨細胞における CCN2 発現の低出力超音波 (LIPUS) による誘導。第 12 回日本再生医療学会総会、2013, 3,21-23, 横浜

④Nishida CCN2 is up-regulated in cultured chondrocytes treated with low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS). 2nd joint meeting of IBMS-JSBMR, Kobe, Japan, May 28- June 1, 2013.

⑤西田 軟骨細胞における CCN2 発現の低出力超音波 (LIPUS) による誘導。第 26 回日本軟骨代謝学会、2013, 3,1-2, 大阪

⑥西田 乳酸共存下での細胞内 ATP 量の減少は軟骨細胞の肥大化を引き起こす。第 54 回歯科基礎医学会、2012, 9, 14-16、郡山

⑦西田 乳酸共存下での細胞内 ATP 量の減少は軟骨細胞の肥大化を引き起こす。第 30 回日本骨代謝学会 2012, 7, 19-21 東京

⑧西田 CCN2/CTGF は BMP2 による骨格筋内異所性骨化に協調的に作用する。第 53 回歯科基礎医学会、2011. 10. 1-2、岐阜

⑨西田 CCN2/CTGF は BMP2 による骨格筋内異所性骨化に協調的に作用する。第 4 回日本 CCN ファミリー研究会 2011. 8.26-27. 岡山

⑩西田 骨格筋内異所性骨化における CCN2/CTGF の作用。第 29 回日本骨代謝学会、2011. 7.28-30, 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔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.okayama-u.ac.jp/user/seika/index.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

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

(3)連携研究者

なし