

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593014

研究課題名(和文)新規創薬に向けた、CCN2/3の協調作用による軟骨の発生・分化調節機構の解明

研究課題名(英文)Basic research for drug discovery: Modulation of early chondrogenesis by the interaction of CCN2 and CCN3

研究代表者

川木 晴美(KAWAKI, HARUMI)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：70513670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：CCN2はCCNファミリーに属し、軟骨細胞の増殖分化を調節する因子である。一方CCN3の軟骨細胞での機能は未だ不明な点が多い。そこで本研究ではCCN3の軟骨分化における機能およびCCN2との相互作用について解析した。そして、CCN3が軟骨分化予定域に発現しており、CCN2とCCN3が結合することを見いだした。また、肢芽由来の未分化な細胞でCCN3が増殖とプロテオグリカン合成を促進し初期軟骨分化の調節に関与していることが示唆された。さらに、これらCCN3の機能はERK1/2経路を介していることを見出した。以上より軟骨の再生療法開発にCCN2およびCCN3が有用であるとの示唆を得た。

研究成果の概要(英文)：CCN2 is best known as a promoter of chondrocyte proliferation and differentiation among the CCN family members. However, little is known concerning roles of the other CCN member, CCN3 in chondrocytes. These two proteins consists of 4 conserved modules that are highly interactive with a number of biomolecules. In the present study, we demonstrated that CCN3 protein promotes early chondrogenesis based on the following observations: 1) CCN3 was expressed in the embryonic limb mesenchymal cells, whereas, CCN2 was highly expressed in differentiated chondrocytes. 2) Exogenous recombinant CCN3 promoted the proliferation of limb mesenchymal cells in plane culture, and induced proteoglycan accumulation in micromass cultures. 3) By Ccn3 knockdown, chondrogenesis was inhibited in cultures. In addition, we found that extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway was involved in the CCN3-mediated modification of mesenchymal cell and chondroblast activities.

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：創薬 再生医療 軟骨 CCNファミリー 肢芽 高密度培養 ERK1/2 MAPK

### 1. 研究開始当初の背景

顎骨の成長は咬合に大きな影響を与えるため、成長発育を捉えることは矯正歯科学において非常に重要であり、成長期の患者の上下顎の成長発育を矯正装置によってコントロールする治療がしばしば行われる。先天的に骨格形成の異常をきたす骨系統疾患において顎顔面骨格の発育異常は顎変形症として、非可逆的な侵襲を伴う外科矯正治療の対象となる。このため、骨・軟骨の発生・分化機構を解明し、発育の促進/抑制、再生、再建によりそれらを克服することは歯学のみならず医学においても重大な使命の一つである。しかしながら、骨・軟骨領域は学術的には未成熟な分野であり、一部の原因遺伝子が同定されているのみで、形態異常の発生メカニズムの研究はまだまだ進んでおらず、革新的創薬に至っていない。内軟骨性骨化の最初のステップである軟骨細胞の発生分化機序は、近年、徐々に明らかになってきており、いくつかの因子が協調的に発現し作用し合い、時間的、空間的に細胞分化と組織形成を制御していると考えられている。しかし、未だ全ての機能分子が明らかになったわけではない。故に基礎研究の充実が重要であり、世界的にも注目されている分野である。

### 2. 研究の目的

申請者らは、軟骨細胞に高発現する因子である CCN2 のノックアウトマウスの詳細な解析を行って、同マウスの成長板軟骨で、CCN2 と同じファミリーを形成する CCN3 が過剰に発現し、CCN2 と拮抗する作用を発揮していることを見出した。このような性質を創薬に利用するために CCN2 と CCN3、2 つのタンパク質の軟骨組織の発生から分化の過程での動態と機能を詳細に解析し、生理作用の全貌を明らかにして臨床応用を図ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

1. 軟骨組織の発生・分化期における CCN2 と CCN3 の *in vivo*での動態解析。

軟骨原器の現れる胎生 9.5 日目以降出生までのマウス胎児の切片を作成し、CCN2, CCN3 に対する特異的抗体を用いた免疫染色を行い、CCN2 と CCN3 の発現時期や分布の変化と組織像との関係を解析した。

2. 未分化間葉系細胞等の長期培養における CCN2 と CCN3 の *in vitro*での動態解析。

胎生 9.5 日目の肢芽から 18.5 日目の四肢の組織を破碎して RNA、およびタンパクサンプルを抽出して発生段階依存的な CCN2 と CCN3 の発現パターンおよび CCN2 欠損下での発現パターンの変化をリアルタイム PCR 法ならびにウエスタンブロット法にて解析した。さらに、胎生 9.5 日目の肢芽から肢芽細胞を分離し高密度培養にて軟骨へと分化誘導を行い培養中に RNA、タンパクサンプルを適宜

回収し、CCN2 と CCN3 の発現パターンをリアルタイム PCR 法ならびにウエスタンブロット法にて解析した。

3. 組換えタンパク質の添加と siRNA を用いたノックダウン実験による CCN2,3 の機能解析と発現調節機構についての解析。

肢芽細胞にリコンビナント CCN2,3 を作用させ、両者の発現量に変化が見られるかどうか軟骨分化マーカー遺伝子の発現に關与しているのかをリアルタイム PCR 法にて解析した。同様に siRNA にて CCN2,3 をノックダウンした場合の CCN2,3 を含む軟骨分化関連因子の発現動態を解析した。さらに、高密度培養条件下でリコンビナント CCN2,3 と、各々をターゲットとする siRNA を用いて、軟骨分化への影響を解析した。分化の指標としてアルシアンブルー染色を行った。

4. CCN2-CCN3 相互作用のメカニズムについての解析。

1,2 で得た結果と免疫沈降ウエスタンブロット法により、CCN3 が CCN2 と結合し作用しているのかどうかについて検討した。

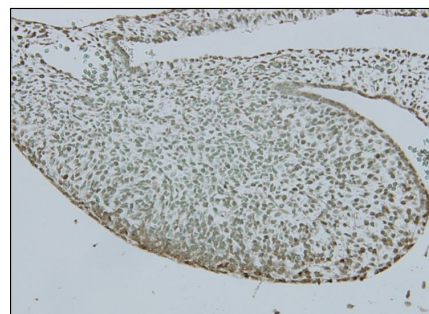
5. CCN3 の機能を発揮するシグナル伝達経路の解析

2,3 で得られた結果について、CCN3 の作用がいかなる経路で発揮されているのかを解析するため、リコンビナント CCN2,3 を肢芽細胞に作用させ、MAPKs (ERK1/2, p38MAPK, JNK) のリン酸化をウエスタンブロット法により検討し、さらにそれぞれの経路の阻害剤を用いて、CCN2,3 の細胞増殖、分化における作用について検討した。

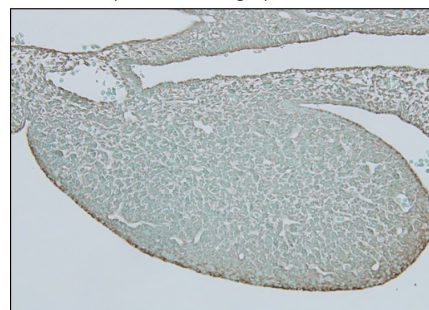
### 4. 研究成果

1. CCN3 は他の CCN メンバーの発現が見られない、胎生 9.5 日胚の肢芽において発現していた (下図)。

anti-CCN3

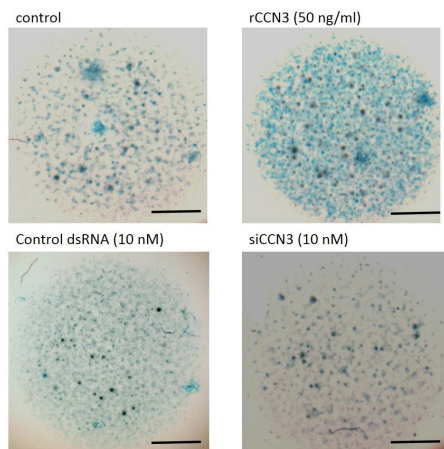


control (normal rabbit IgG)



2. 胎生 9.5 日目の肢芽から 18.5 日目の四肢の組織を破碎して得た RNA、およびタンパク試料の解析で、CCN3 は CCN2 に先立って、9.5 日目より発現し 13.5 日で発現量がピークに達した。その後、14.5 から 15.5 日で CCN2 の発現がピークに達した。

3. 肢芽細胞の単層培養系にリコンビナント CCN2,3 を作用させ、両者の発現量に変化が見られるかどうか軟骨分化マーカー遺伝子の発現に関与しているのかをリアルタイム PCR 法にて解析したところ、CCN2,3 とともにアグリカンの発現量を増加させた。しかしながら CCN2,3 による互いの発現量への関与はみとめられなかった。次いで、高密度培養条件下でリコンビナント CCN2,3 と、各々をターゲットとする siRNA を用いて、軟骨分化への影響を検討したところ、CCN2,3 の添加によりアルシアンブルーの染色性が増加した。そして CCN2 のノックダウンによる軟骨分化抑制はみとめられなかったが、CCN3 のノックダウンで軟骨細胞への分化が顕著に阻害された(下図)。



4. 実験に用いた肢芽細胞では CCN2 あほとんど産生されていない。この培養上清を試料として、リコンビナント CCN2 を添加し、さらに抗 CCN2 抗体で免疫沈降した試料をウエスタンブロット法にて解析した。ウエスタンブロットの検出には抗 CCN3 抗体を使用した。その結果、肢芽細胞が産生した CCN3 が CCN2 と結合する可能性が示された。また、1, 2 の結果から、胎生 12.5 日以降、CCN2 と CCN3 の発現がオーバーラップしており CCN2 と CCN3 が相互に作用する可能性が示唆された。

5. CCN3 の機能を発揮するシグナル伝達経路の解析リコンビナント CCN2,3 を肢芽細胞に作用させ、MAPKs (ERK1/2, p38MAPK, JNK) のリン酸化をウエスタンブロット法により検討したところ、リコンビナント CCN3 の添加で ERK1/2 のリン酸化が顕著に増加し、この経路の阻害によりリコンビナント CCN3 の作用が消失したことから、CCN3 の肢芽細胞における作用の一部は ERK1/2 経路を介していることが示唆された。

## 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)

[雑誌論文](計 7 件) 全て査読有

1) 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. 2011, 585:3033-3040.

2) Kawaki H, Kubota S, Suzuki A, Suzuki M, Kohsaka K, Hoshi K, Fujii T, Lazar N, Ohgawara T, Maeda T, Perbal B, Takano-Yamamoto T, Takigawa M. Differential roles of CCN family proteins during osteoblast differentiation: Involvement of Smad and MAPK signaling pathways. Bone. 2011, 49:975-989.

3) Ohgawara T, Kubota S, Kawaki H, Kurio N, Abd El Kader T, Hoshijima M, Janune D, Shimo T, Perbal B, Sasaki A, Takigawa M. Association of the metastatic phenotype with CCN family members among breast and oral cancer cells. J Cell Commun Signal. 2011, 5:291-299.

4) Kondoh N, Takayama E, Kamiya M, Kawaki H, Motohashi M, Muramatsu Y, Shikimori M, Mitsudo K and Tohnai I. Comprehensive study of oral squamous cell carcinoma patients using blood samples and gene expression profiles. Journal of Cancer Science Ther. 2012, S18-001.

5) Hoshi K, Kawaki H, Takahashi I, Takeshita N, Seiryu M, Murshid SA, Masuda T, Anada T, Kato R, Kitaura H, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Compressive Force-Produced CCN2 Induces Osteocyte Apoptosis Through ERK1/2 Pathway. J Bone Miner Res. 2013 Oct 24. (in press)

6) Nagaya R, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Onoe I, Tanabe T, Nagahara K, Kondoh N. Mechanisms of the immunosuppressive effects of mouse adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on mouse alloreactively stimulated spleen cells. Exp Ther Med. 2014, 7:17-22.

7) Maeda-Uematsu A, Kubota S, Kawaki H, Kawata K, Miyake Y, Hattori T, Nishida T, Moritani N, Lyons KM, Iida S, Takigawa M. CCN2 as a novel molecule supporting energy metabolism of chondrocytes. J Cell Biochem. 2014, 115:854-865.

〔学会発表〕(計 41 件)

1) 川木晴美, 久保田聡, 鈴木誠, 高坂久美子, 星健治, 加藤龍史, 高山英次, 神谷真子, Bernard Perbal, 山本照子, 近藤信夫, 滝川正春. CCNファミリータンパク質によるMAPK経路を介した骨芽細胞増殖・分化調節. 第4回日本CCNファミリー研究会. 2011年8月27日. 岡山.

2) 川木晴美, 久保田聡, 鈴木晶子, 星健治, 高山英次, 神谷真子, 前田健康, 山本照子, 近藤信夫, 滝川正春. 骨芽細胞分化におけるCCNファミリータンパク質の分布と機能解析. 第53回基礎歯科医学会. 2011年10月1日. 岐阜.

3) 尾上一平, 川木晴美, 近藤雄三, 田中雅士, 小栗健策, 土井豊, 永原國央, 近藤信夫. 骨髄由来間質細胞の増殖分化における焼結炭酸アパタイトの機能解析. 第10回日本再生歯科医学会2012年9月1日~2日. 神戸.

4) Kondoh N, Takayama E, Kamiya M, Kawaki H, Motohashi M and Muramatsu Y. Comprehensive study of oral squamous cell carcinoma patients using blood samples and gene expression profiles. 2nd World Congress on Cancer Science and Therapy. 2012年9月10日~12日. San Antonio.

5) 尾上一平, 川木晴美, 近藤雄三, 神谷真子, 高山英次, 土井豊, 永原國央, 近藤信夫. 骨髄由来間質細胞の増殖と骨芽細胞への分化における焼結炭酸アパタイトの機能解析. 第54回歯科基礎医学会. 2012年9月14日~16日. 郡山.

6) 川木晴美, 久保田聡, 尾上一平, 近藤雄三, 神谷真子, 高山英次, 近藤信夫, 滝川正春. 初期軟骨分化におけるCCN3の機能解析. 第54回歯科基礎医学会. 2012年9月14日~16日. 郡山.

7) Hiroko Takeuchi, Eiji Takayama, Syuri Kubo, Harumi Kawaki, Masako Mizuno-Kamiya, Masafumi Shiraki, Nobuo Kondoh, Toshiaki Shibutani. Systemic immunity of the murine model for periodontal disease. 第98回米国歯周病学会/日本歯周病学会共催2012年9月29日~10月02日. ロサンゼルス.

8) 小栗健策, 田中雅士, 森春菜, 川木晴美, 近藤信夫, 吉田隆一. 象牙質顆粒はヒト歯髄および骨髄由来幹細胞の増殖を促進する. 第137回日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会・第14回日韓歯科保存学会学術大会. 2012年11月22日~23日. 広島.

9) 田中雅士, 小栗健策, 森春菜, 川木晴美,

近藤信夫, 吉田隆一. 象牙質顆粒と幹細胞を用いた骨再生療法の開発. 第137回日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会・第14回日韓歯科保存学会学術大会. 2012年11月22日~23日. 広島.

10) Kubo S, Takayama E, Adachi N, Kawaki H, Kamiya M, Kurachi M, Kondoh N, Shibutani T. Influences of LPS upon the immunological response against metal ion. 第60回国際歯科研究学会日本支部(JADR)学術大会. 2012年12月14日~15日. 新潟.

11) 前田彩, 久保田聡, 三宅由晃, 河田かずみ, 西田崇, 服部高子, 森谷徳文, 川木晴美, Karen M. Lyons, 飯田征二, 滝川正春. 軟骨細胞のエネルギー代謝を支えるCCN2/CTGF. 第26回日本軟骨代謝学会. 2013年3月1日~2日. 豊中.

12) 尾上一平, 川木晴美, 近藤雄三, 高橋潤, 神谷真子, 土井豊, 永原國央, 近藤信夫. ラット骨髄由来細胞の増殖・分化における炭酸含有アパタイトの焼結温度依存的影響. 第11回日本再生歯科医学会学術大会・総会. 2013年8月31日. 東京.

13) 市川恭大, 川木晴美, 尾上一平, 田辺俊一郎, 永原國央. ERK1/2経路を介した炭酸含有アパタイトの骨髄由来間質細胞の接着・増殖促進効果の検討. 第43回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会. 2013年9月13日~15日. 福岡.

14) 尾上一平, 川木晴美, 高橋潤, 田辺俊一郎, 永原國央. 炭酸含有アパタイトの骨芽細胞増殖分化調節メカニズムの解析. 43回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会. 2013年9月13日~15日. 福岡.

15) 川木晴美, 久保田聡, 尾上一平, 近藤雄三, 高橋潤, 神谷真子, 高山英次, 近藤信夫, 滝川正春. ERK1/2経路を介したCCN3の初期軟骨分化における作用の検討. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会 サテライトシンポジウム. 2013年9月20日~22日. 岡山.

16) 前田彩, 久保田聡, 川木晴美, 河田かずみ, 三宅由晃, 服部高子, 西田崇, 森谷徳文, 飯田征二, 滝川正春. CCN2は軟骨細胞のエネルギー代謝に重要である. 55回歯科基礎医学会学術大会・総会 サテライトシンポジウム. 2013年9月20日~22日. 岡山.

17) 田中雅士, 川木晴美, 小栗健策, 森春菜, 神谷真子, 高山英次, 吉田隆一, 近藤信夫. 象牙質・幹細胞複合体の骨再生への応用. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会.

2013年9月20日～22日．岡山．

18) 東康加, 神谷真子, 稲垣俊弘, 川木晴美, 高山英次, 櫻井学, 智原栄一, 近藤信夫. マウス口腔扁平上皮癌(Sq1979)の進展が脾細胞 IFN- $\gamma$  産生能に及ぼす影響. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013年9月20日～22日．岡山．

19) 星健治, 川木晴美, 高橋一郎, 竹下信郎, 清流正弘, Sakhr A Murshid, 益田泰輔, 穴田貴久, 加藤龍史, 北浦英樹, 鈴木治, 山本照子. 圧縮力負荷に伴い骨細胞より産生された CCN2 は ERK1/2 経路を介しアポトーシスを誘導する. 第 53 回日本生体医工学会大会. 2014年6月24日～26日．仙台．

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕  
ホームページ等

朝日大学歯学部口腔生化学分野ホームページ  
<http://scw.asahi-u.ac.jp/~biochem/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川木 晴美 (KAWAKI HARUMI)  
朝日大学・歯学部口腔生化学分野・講師  
研究者番号：70513670

### (2)研究分担者

近藤 信夫 (KONDOH NOBUO)  
朝日大学・歯学部口腔生化学分野・教授  
研究者番号：40202072

(3)高山 英次 (TAKAYA EIJI)  
朝日大学・歯学部口腔生化学分野・准教授  
研究者番号：70533446

(4)神谷 真子 (KAMIYA MASAKO)  
朝日大学・歯学部口腔生化学分野・助教  
研究者番号：80181907

(5)連携研究者  
( )

研究者番号：