

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462810

研究課題名(和文) CCN2による骨細胞機能を標的とした新規骨粗鬆症治療薬の開発

研究課題名(英文) Effect of CCN2 on the osteocyte function regulating the osteoclast formation, and its possibility as a novel drug of osteoporosis

研究代表者

西田 崇 (Nishida, Takashi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30322233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞は骨のリモデリングを調節する司令塔としての役割が知られているが、CCN2/CTGFの作用は不明である。本研究課題ではCCN2刺激した骨細胞による破骨細胞への分化誘導能を解析した。組換えCCN2タンパク質を含むコラーゲンゲル内で3次元培養した骨細胞様細胞株MLO-Y4はOPGの産生を抑制することで、そのゲル上に播種したRAW264.7細胞の破骨細胞への分化を促進させた。また、Ccn2欠失マウスから単離した骨細胞様細胞では、逆に破骨細胞への形成は抑制された。これらの結果からCCN2を介した骨細胞による破骨細胞形成の調節機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well-known that osteocytes play a role in the regulation of bone remodeling. However, the effect of CCN2/CTGF on the bone remodeling in osteocytes is unknown. Therefore, the aim of this study is the investigation of osteoclastogenesis via osteocytes stimulated by CCN2. A mouse osteocytic cell line, MLO-Y4 embedded into collagen gel containing recombinant CCN2 protein, promoted the osteoclast differentiation of RAW264.7 cells inoculated on the collagen gel, and osteocyte-like cells isolated from Ccn2-deficient mice inhibited the differentiation of osteoclasts under the same condition. These findings suggest that osteoclastogenesis is modulated by osteocytes stimulated by CCN2.

研究分野：口腔生化学 細胞生物学

キーワード：CCN2/CTGF 骨細胞様細胞 破骨細胞形成 タモキシフェン誘導性Ccn2欠損マウス 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨細胞は骨組織に最も多く存在する細胞であるが、骨基質中に埋入されていること、高度に分化しているため細胞増殖をほとんどしないなどの理由から、細胞培養が難しく、これまで十分な機能解析が行われてこなかった。しかし、近年の遺伝子改変動物などを用いた分子生物学的な研究によって、骨細胞の表現型を強く持つ細胞株の確立や骨組織からの骨細胞の単離方法の確立などが行われるようになり、骨細胞が *in vitro* で比較的容易に培養できるようになったことで、骨細胞の機能解析がようやく行われ始めている。骨細胞は骨表面の骨芽細胞や破骨細胞、あるいは骨細胞同士と細胞突起を介して情報交換を行っていると考えられており、現在では、骨細胞が骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスを制御していると考えられているが、細胞突起を介した細胞間の情報伝達のメカニズムは未だほとんど解明されていない。我々のグループは骨細胞間に形成される細胞突起のネットワーク構造が神経細胞に形成される神経突起のネットワーク構造に類似したものではないかと考えた。この仮説の基、神経栄養因子様の分子が骨細胞にも存在し、この分子によって骨細胞間、あるいは骨芽細胞や破骨細胞との間で細胞突起のネットワークを形成し、情報交換を行っている可能性を考えた。

(2) CCN family protein 2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF)は骨芽細胞及び破骨細胞分化を制御すること、機械的刺激を加えた骨細胞で発現量が増加すること、さらに神経栄養因子受容体と結合することがすでに報告されていることから、我々は我々の想定した神経栄養因子様の分子が骨細胞に存在する CCN2 であると推測した。そこで、本研究課題では、骨細胞に対する作用や細胞突起の形成、さらには骨細胞のネットワーク形成に CCN2 がどのように関与しているかを骨細胞様細胞株及び *Ccn2* の遺伝子改変マウスからの骨細胞を用いて解析すると共に、骨細胞が破骨細胞形成に対してどのような作用を有しているのかにも着眼して解析した。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は骨細胞のマーカー遺伝子の発現及び細胞突起の形成に対する CCN2 の影響を解析すると共に骨細胞の作用を介した破骨細胞形成に CCN2 がどのように関与

するのかを骨細胞様細胞株 MLO-Y4 及び *Ccn2* 欠損マウスから単離した骨細胞様細胞を用いて解析することである。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) 組換え CCN2 タンパク質(rCCN2)で刺激した MLO-Y4 細胞及び *Ccn2* 欠損マウスから単離した骨細胞様細胞をコラーゲンゲル内で3次元培養し、骨細胞のマーカー遺伝子の発現及び細胞突起の伸長状態を解析した。

(2) 骨細胞様細胞を3次元培養しているコラーゲンゲル上に破骨細胞の前駆細胞を播種し、破骨細胞への分化に対する CCN2 の影響を解析した。

(3) タモキシフェン(Tx)誘導性 *Ccn2* 欠損マウスを作製し、Tx 投与後の骨組織の影響を組織学的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞様細胞を用いた3次元培養の確立とコラーゲンゲル上に播種した破骨前駆細胞による破骨細胞形成の測定

骨細胞様細胞に Cellmatrix Type I-A (組織培養用コラーゲン)と2倍濃縮した細胞培養液を等量混和した後に細胞培養用プレートに播種した。37℃で20分間静置してコラーゲンをゲル化した後、培養液を添加した。次に、そのコラーゲンゲル上にマウスマクロファージ系細胞株 RAW264.7 あるいは骨髄細胞を播種し、GST 融合 RANKL (GST-RANKL)で破骨細胞に分化誘導した。破骨細胞の形成は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色及び破骨細胞分化に重要な転写因子である NFATc1 の産生量を目安に測定した。

(2) Tx 誘導性 *Ccn2* 欠損マウスの作製と骨細胞様細胞の単離

CAG プロモーター下でエストロゲン受容体(ERT2)が発現するトランスジェニックマウス(CAG-ERT2Cre)は Jackson Laboratory から購入した。*Ccn2* floxed マウスは京都大学から供与された。これらマウスを交配し、Tx 誘導性 *Ccn2* 欠損マウスを作製した。また、Tx 投与後の大腿骨から段階的なコラーゲン処理によって骨細胞様細胞を単離した。

(3) Tx 誘導性 *Ccn2* 欠損マウスの骨組織の組織標本の作製

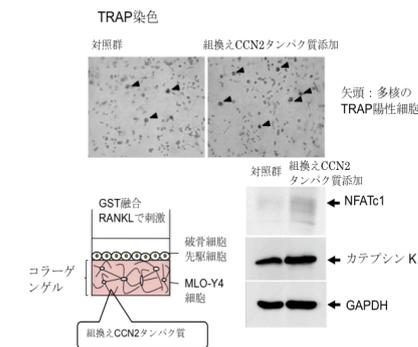
Tx 投与、1ヶ月及び6ヶ月後に当該マウスを安楽死させ、膝関節を含む骨組織部を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、10% EDTA による脱灰処置を行った。その後、パラフィンに包埋し、組織切片を作製した。ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色にて組織観

察を行った。

4. 研究成果

(1) rCCN2 を添加したコラーゲンゲル内で骨細胞様細胞株 MLO-Y4 を 3 次元培養すると、細胞突起の伸長は rCCN2 に影響なく、どちらの群においても観察された。また、骨細胞マーカーの 1 つである *Sost* や破骨細胞形成に重要な因子である RANKL の遺伝子発現レベルには影響が見られなかったが、RANKL のデコイ受容体である Osteoprotegerin (OPG) の遺伝子発現レベルは rCCN2 刺激で有意に減少した。

(2) 骨細胞による破骨細胞形成への効果を解析するために、rCCN2 を添加したコラーゲンゲル内で MLO-Y4 細胞を 3 次元培養し、そのコラーゲンゲル上に RAW264.7 細胞を播種した。続いて GST-RANKL で破骨細胞への誘導を行うと、rCCN2 を添加した群で破骨細胞形成の指標である多核の TRAP 陽性細胞数の増加と破骨細胞形成に重要な分子である NFATc1 及びカテプシン K の産生量の増加が見られた(図 1)。



(図1) 組織えCCN2タンパク質で刺激した骨細胞様細胞株による破骨細胞形成能

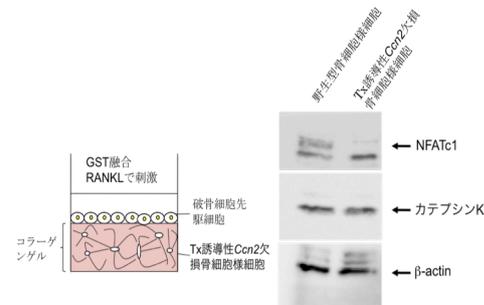
(3) CCN2 を一過性に強制発現させた MLO-Y4 細胞を用いて、コラーゲンゲル内で 3 次元培養し、GST-RANKL による RAW264.7 細胞の破骨細胞形成を調べた。rCCN2 添加で見られた結果と同様に TRAP 陽性細胞数の増加と NFATc1 の産生量の増加が見られた。

(4) Tx 誘導性 *Ccn2* 欠損マウスの大腿骨からコラーゲナーゼによる段階的消化によって骨細胞様細胞を単離した。骨細胞様細胞が単離できているかの確認は骨細胞マーカーの 1 つである *Sost* 遺伝子の発現レベルを指標に調べ、*Sost* 遺伝子の発現レベルが高いフラクションを骨細胞様細胞が豊富に含まれているフラクションと考え、以下の実験に用いた。

(5) Tx を投与しても CCN2 が欠失しない野生型マウスから単離した骨細胞様細胞を対照群にして、コラーゲンゲル内での細胞突起の伸長に影響が見られるかを調べると、CCN2 の欠失に関係なく、どちらの骨細胞様細胞にお

いても細胞突起の伸長は確認された。

(6) 3 次元培養した骨細胞様細胞上に RAW264.7 細胞を播種し、GST-RANKL で破骨細胞形成を誘導すると、CCN2 を欠失させた骨細胞様細胞による破骨細胞への誘導群は野生型マウス由来の骨細胞様細胞による破骨細胞誘導群と比べて、NFATc1 及びカテプシン K の産生量が減少した (図 2)。



(図2) Tx誘導性Ccn2欠損マウス由来骨細胞様細胞による破骨細胞の形成能

(7) Tx 誘導性 *Ccn2* 欠損マウスに Tx を投与し、1 ヶ月間飼育した後、当該マウスを安楽死させ、骨組織を採取し、組織切片を作製した。Tx 投与により *Ccn2* が欠失した骨組織では、同腹の野生型マウスの骨組織と比較して二次骨化部の海綿骨梁の減少が見られた。

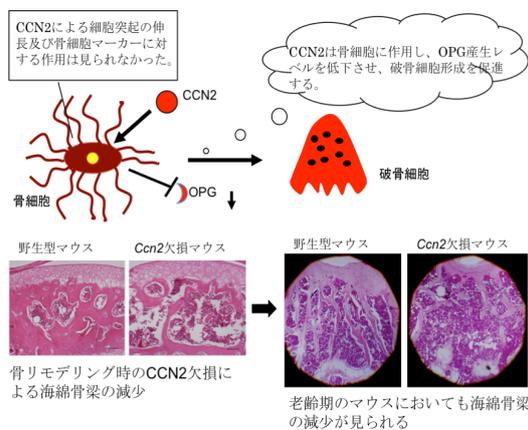
(8) Tx 誘導性 *Ccn2* 欠損マウスに Tx を投与し、6 ヶ月後に骨細胞様細胞を単離した。コラーゲンゲルで 3 次元培養すると、野生型と同様に *Ccn2* 欠損骨細胞においてもコラーゲンゲル内での細胞突起の伸長が見られた。

(9) 骨細胞様細胞を単離すると同時に骨髄細胞も単離し、M-CSF と RANKL 添加によって破骨細胞への形成を誘導した。RANKL 添加 3 日後に NFATc1 及びカテプシン K の産生量を Western blot 法で調べると、野生型マウス由来の骨細胞様細胞と骨髄細胞の組み合わせで NFATc1 及びカテプシン K の産生量が大きく、*Ccn2* 欠損マウス由来の骨細胞様細胞と骨髄細胞の組み合わせでこれら分子の産生量が低下した。

(10) Tx 誘導性 *Ccn2* 欠損マウスに Tx を投与し、6 ヶ月後に骨組織を採取し、組織切片を作製した。Tx 投与 1 ヶ月後と同様に、Tx 投与により *Ccn2* が欠失した骨組織では、同腹の野生型マウスの骨組織と比較して海綿骨梁の減少が見られた。

(11) 本研究課題を通して、CCN2 は骨細胞自身の細胞突起の伸張や骨細胞マーカーの遺伝子発現レベルに影響を与えなかったものの、骨細胞から産生される OPG の産生量を抑制することで、破骨細胞形成を正に制御していると考えられた。また、Tx 投与 1 ヶ月後の *Ccn2* 欠損マウスの二次骨化部の海綿骨梁の

減少はTx投与6ヶ月後の *Ccn2* 欠損マウスにおいても観察されたことから、骨のリモデリング期に CCN2 を欠損させることで生じた骨代謝バランスの乱れは老齢期になっても影響が残ることが示唆された(図3)。



(図3) 本研究課題の研究成果の概略図

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 12 件)

以下に示す論文は全て査読有である。

- ①. El-Seoudi, A., Abd El Kader, T., Nishida, T., Eguchi, T., Aoyama, E., Takigawa, M., Kubota, S.: Catabolic effects of FGF-1 on chondrocytes and its possible role in osteoarthritis. *J. Cell Commun. Signal.*, 2017. in press. doi: 10.1007/s12079-017-0384-8
- ②. Nishida, T., Kubota, S., Aoyama, E., Yamanaka, N., Lyons, K. M., Takigawa, M.: Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) treatment of cultured chondrocytes stimulates production of CCN family protein 2 (CCN2), a protein involved in the regeneration of articular cartilage: mechanism underlying this stimulation. *Osteoarthritis Cartilage*, 25, 759-769, 2017.
- ③. Janune, D., Abd El Kader, T., Aoyama, E., Nishida, T., Tabata, Y., Kubota, S., Takigawa, M.: Novel role of CCN3 that maintains the differentiated phenotype of articular cartilage. *J. Bone Miner. Metab.*, 2016. in press. <https://link.springer.com/article/10.1007%2F9500774-016-0793-4>
- ④. Hara, C., Kubota, S., Nishida, T., Hiasa, M., Hattori, T., Aoyama, E., Moriyama, Y., Kamioka, H., Takigawa, M.: Involvement of multiple CCN family members in platelets that support regeneration of joint tissues. *Mod. Rheumatol.*, 21, Apr, 1-10, 2016. doi: 10.3109/14397595.2016.1155255.
- ⑤. Murase, Y., Hattori, T., Aoyama, E., Nishida, T., Maeda-Uematsu, A., Kawaki, H., Lyons, K. M., Sasaki, A., Takigawa, M., Kubota, S.:

Role of CCN2 in amino acid metabolism of chondrocytes. *J. Cell Biochem.*, 117, 927-937, 2016.

- ⑥. Khattab, H.M., Aoyama, E., Kubota, S., Takigawa, M.: Physical interaction of CCN2 with diverse growth factors involved in chondrocyte differentiation during endochondral ossification. *J. Cell Commun. Signal.* 9, 247-254, 2015.
- ⑦. Aoyama, E., Kubota, S., Khattab, H. M., Nishida, T., Takigawa, M.: CCN2 enhances RANKL-induced osteoclast differentiation via direct binding to RANK and OPG. *Bone*, 73, 242-248, 2015.
- ⑧. Nishida, T., Kubota, S., Aoyama, E., Janune, D., Lyons, K. M., Takigawa, M.: CCN family protein 2 (CCN2) promotes the early differentiation, but inhibits the terminal differentiation of skeletal myoblasts. *J. Biochem.*, 157, 91-100, 2015.
- ⑨. Abd El Kader, T., Kubota, S., Anno, K., Tanaka, S., Nishida, T., Furumatsu, T., Aoyama, E., Kuboki, T., Takigawa, M.: Direct interaction between CCN family protein 2 and fibroblast growth factor 1. *J. Cell Commun. Signal.*, 8, 157-163, 2014.
- ⑩. Kondo, S., Mukudai, Y., Soga, D., Nishida, T., Takigawa, M. and Shirota, T.: Differential expression of vascular endothelial growth factor in high- and low- metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Anticancer Res.*, 34, 671-677, 2014.

[学会発表] (計 115 件)

- ①. Nishida, T. et al.: Induction of CCN2 by low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in cultured chondrocytes and its biological significance. Eight International Workshop on the CCN Family of Genes, Nice, France, November 3-8, 2015.
- ②. 西田: 骨のリモデリング期の CCN2 欠損は骨細胞由来の破骨細胞形成を抑制する。第 8 回日本 CCN ファミリー研究会、2016, 8, 27, 岡山
- ③. 西田: タモキシフェン誘導性 CCN2 欠損マウス由来の骨細胞様細胞の破骨細胞形成能。第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016, 8, 24-26, 札幌
- ④. 西田: 骨細胞様細胞における CCN2 の欠損は破骨細胞形成を抑制する。第 34 回日本骨代謝学会学術集会 第 3 回アジア太平洋骨代謝学会議、2016, 7, 20-23, 大阪
- ⑤. 西田: 骨細胞の作用を介した破骨細胞形成における CCN2 の役割。第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 BMB2015、2015, 12, 1-4, 神戸
- ⑥. 西田: CCN2 は骨細胞を介して破骨細胞形成を制御する。第 57 回歯科基礎医学会、2015, 9, 11-13, 新潟
- ⑦. 西田: CCN2 は骨細胞に作用し、破骨細胞

を正に制御する。第7回日本CCNファミリー研究会、2015, 8, 29, 岡山

- ⑧. 西田：破骨細胞形成を制御する骨細胞に与えるCCN2の作用。第33回日本骨代謝学会、2015, 7, 23-25, 東京
- ⑨. 西田：軟骨細胞分化に与えるセロトニンの作用。第28回日本軟骨代謝学会、2015, 3, 6-7, 東京

〔図書〕(計 21 件) 分担

- ①. Nishida, T., Kubota, S., Takigawa, M.: Production of recombinant CCN2 protein by mammalian cells. in *Methods in Molecular Biology: CCN Proteins: Methods and Protocols*, Takigawa, M. (ed), Springer, 1489, 95-105, 2017.
- ②. Nishida, T., Kubota, S., Takigawa, M.: Cell biological assays for measuring chondrogenic activities of CCN2 protein. in *Methods in Molecular Biology: CCN Proteins: Methods and Protocols*, Takigawa, M. (ed), Springer, 1489, 219-237, 2017.
- ③. Nishida, T., Kubota, S., Takigawa, M.: In vivo evaluation of cartilage regenerative effects of CCN2 protein. in *Methods in Molecular Biology: CCN Proteins: Methods and Protocols*, Takigawa, M. (ed), Springer, 1489, 273-282. 2017.

〔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・
准教授
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・
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

(4) 研究協力者

なし