

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463017

研究課題名(和文) 組織再生起点となる血管形成におけるCCN3の役割解明と創薬基盤の構築

研究課題名(英文) The analysis of the role of CCN3 in the formation of vascularization at the tissue regeneration and the construction of the drug discovery

研究代表者

南里 篤太郎 (MINAMIZATO, Tokutaro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：50529807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CCN3は様々な細胞の増殖、分化に関与するCCNファミリーに属する。本研究では、組織再生時に調節因子の供給路となる血管新生におけるCCN3の機能を解明することを目的に、特に血管新生で着目されているCD34陽性細胞やVEGFとCCN3との関係に焦点を当て、in vivo、in vitroで機能解析を行った。その結果、CCN3が分泌タンパクであるVEGFと結合することにより、VEGFのVEGFレセプターへの結合を阻害し、血管新生を制御していることを実験的に示唆された。また、CCN3が骨再生時の血管新生に対し、Notchシグナルを介した間接的な作用により、抑制的に働いていることも実験的に示唆された。

研究成果の概要(英文)：Several lines of evidence have demonstrated that the CCN family of proteins regulates differentiation of the skeletal mesenchymal cells such as muscle cells, chondrocytes and osteoblasts. In this research, for the purpose of the analysis of function of CCN3 in the formation of vascularization in tissue regeneration, we focus on the interaction between CCN3 and VEGF, CD34 cells, especially. As the results, we verified that CCN3 controlled the formation of new vascularization by binding to the VEGF which is secreted protein, experimentally. In addition, we demonstrated that the CCN3-Notch pathway also regulate the new vascularization, indirectly.

研究分野：口腔外科学

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

CCN3 は様々な細胞の増殖、分化に関与する CCN ファミリーに属する。申請者らはマウス大腿骨の骨再生モデルにおいて、CCN3 の発現が再生の初期で上昇することを見出した。骨芽細胞分化は種々の因子により厳密に制御されているが、再生過程では、特定の遺伝子の発現増強とともに、正常時では発現していない遺伝子の発現が誘導されるため、CCN3 も再生過程において非常に重要な機能を有する可能性が示唆された。骨芽細胞の分化と骨再生において、強力な骨芽細胞分化・骨形成促進因子である BMP シグナルと幹細胞分化制御に関わる膜タンパク型受容体である Notch シグナルがクロストークし (*J. Biol. Chem.*, 280, 2005)、CCN3 はその Notch と結合して筋細胞の分化を抑制することが報告されていた (*J. Biol. Chem.* 277, 2002) ため、申請者らは BMP と Notch のクロストークに CCN3 が関与すると考えて研究を進めた結果、CCN3 が BMP シグナルと Notch シグナルを介して、骨芽細胞の分化を制御するコントロール遺伝子であることを明らかにした (*B.B.R.C.*, 354, 2007, *B.B.R.C.*, 368, 2008, *J. Biol. Chem.*, 288, 2013)。

近年、骨髄由来細胞 (BMDC) による細胞治療の有効性が血管や心筋、肝臓といった組織の再生や脳梗塞治療において示されている。骨折治療でも、尾静脈に注入した BMDC が骨折部へ遊走し、仮骨形成を促進して創部治癒をもたらすことが報告され (*Stem Cells*, 27, 2009)、組織の再生には細胞や成長因子を供給するための積極的な血管新生が不可欠であることは広く認識されている。骨髄由来の血管内皮前駆細胞が末梢血の単核球成分の一部として存在することが示され (*Science*, 275, 1997)、組織修復部位での BMDC、中でも血管内皮細胞に高効率で分化する CD34 陽性細胞による細胞治療の重要性が着目され、すでに臨床研究がなされている。その BMDC は骨組織と骨髄の境界領域に高頻度に存在し、骨の再生過程においても重要な役割を担っているはずであるが、詳細に解析した研究は未だ十分にない。そこで、CCN3 が血管内皮前駆細胞と発生的共通性を有する造血幹細胞を未分化な状態に維持していること (*Science*, 316, 2007)、その造血幹細胞の維持、増殖に重要な微小環境を血管内皮細胞が形成していること (*Cell*, 121, 2005) から、再生の開始起点で、組織再生因子の供給路となる血管新生に対しても、CCN3 が関与しているのではないかと推察し、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

CCN3 は CCN ファミリーに属する分泌性因子で、種々の細胞の増殖・分化に関与している。申請者はこれまでに、CCN3 が骨再生過程における抑制性制御因子であることを突き止めた。本研究では、組織再生時に調節因子の供給路となる血管

新生における CCN3 の機能を解明する。特に血管新生で着目されている CD34 陽性細胞や VEGF と CCN3 との関係に焦点を当て、*in vivo*、*in vitro* で機能解析を行う。得られた CCN3 の血管新生における知見を基に、悪性腫瘍や糖尿病など血管新生と密接に関与している病態に対する新規治療法の確立や創薬開発への足がかりを築くことを最終的な目標とした。

3. 研究の方法

(平成 26、27 年度: *in vivo*)

・血管新生における CCN3 の機能を解明するため、遺伝子改変マウス <CCN3 Tg, CCN3 KO> と野生型マウスでの胎児の血管新生、大腿骨骨再生モデルについて免疫組織学的に比較解析を予定した。

・CD34 陽性細胞の役割を解明するため、GFP 遺伝子改変マウス <C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)> から抽出した CD34 陽性細胞を、遺伝子改変マウス <CCN3 Tg, CCN3 KO>、野生型マウスで作製した骨再生モデルに移植し、免疫組織学的、形態学的に解析を予定した。

(平成 27、28 年度: *in vitro*)

・レトロウイルスベクターを用いて CD34 陽性細胞に CCN3 遺伝子の導入を行い、血管内皮細胞への分化を解析することにした。また、CCN3 が分泌タンパク質であることから、CCN3 Tg マウスから採取した骨芽細胞前駆細胞と GFP 遺伝子改変マウスから抽出した CD34 陽性細胞を共培養し、血管内皮細胞への分化を検証を予定した。

4. 研究成果

CCN3 が分泌タンパクである VEGF と結合することにより、VEGF の VEGF レセプターへの結合を阻害し、血管新生を制御していることが実験的に示唆された。また、CCN3 は、Notch シグナルを介した間接的な作用により、骨新生時の血管新生に対して、抑制的に働いていることも、実験的に示唆された。

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 15 件)

1. Sakamoto K, Matsushita Y, Minamizato T, Katsuki Y, Katsube KI, Yamaguchi A: The Bone Regeneration Model and Primary Osteoblastic Cell Culture Used in the Analysis of Ccn3 Transgenic and Knockout Mice. *Methods Mol Biol.* 2017;1489:309-324 (IF0.79) 【査読有】
2. Seigo Ohba, Noriko Nakao, Takako Kawasaki, Kei-ichiro Miura, Tokutaro Minamizato, Yoshiyuki Koga, Noriaki Yoshida, Izumi Asahina. Skeletal stability after sagittal splitting ramus osteotomy with physiological positioning strategy in skeletal

- mandibular prognathism with facial asymmetry. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 54(8):920-926, 2016. (IF1.237) 【査読有】
3. Ohba S, Nakao N, Nakatani Y, Minamizato T, Kawasaki T, Koga T, Matsuura T, Yoshimura H, Yoshida N, Sano K, Asahina I. The skeletal and dentoalveolar stability of the maxilla after LeFort I osteotomy for cant correction. *Cranio* 34:38-42, 2016. (IF0.60) 【査読有】
 4. Takamitsu Koga, Tokutaro Minamizato, Yosuke Kawai, Kei-ichiro Miura, Takashi I, Yuya Nakatani, Yoshinori Sumita, Izumi Asahina: Bone regeneration using Dentin Matrix depends on the degree of demineralization and particle size, *PLOS ONE*, 11(1): e0147235, 2016. (IF3.057) 【査読有】
 5. H. Kakehashi, T. Ando, T. Minamizato, Y. Nakatani, T. Kawasaki, H. Ikeda, S. Kuroshima, A. Kawakami, I. Asahina: Administration of teriparatide improves the symptoms of advanced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: preliminary findings. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. Volume 44, Issue 12, December 2015, Pages 1558–1564 (IF1.424) 【査読有】
 6. Ohba S, Nakao N, Nakatani Y, Minamizato T, Kawasaki T, Koga T, Matsuura T, Yoshimura H, Yoshida N, Sano K, Asahina I The skeletal and dentoalveolar stability of the maxilla after LeFort I osteotomy for cant correction *Cranio: The Journal of Craniomandibular Practice* e-pub, 2015. (IF:0.682) 【査読有】
 7. Ohba S, Nakao N, Awara K, Tobita T, Minamizato T, Kawasaki T, Koga T, Nakatani Y, Yoshida N, Asahina I: The three-dimensional assessment of dynamic changes of the proximal segments after intraoral vertical ramus osteotomy *Cranio. The Journal of Craniomandibular Practice* e-pub, 2015. (IF:0.682) 【査読有】
 8. Ohba S · Yoshida M · Kohara H · Kwasaki T · Minamizato T · Koga T · Nakatani Y · Watanabe E · Nakao N · Yoshida N · Asahina I. Short lingual osteotomy without fixation: a new strategy for mandibular osteotomy known as "physiological positioning". *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Feb;52(2):e9-e13. (IF2.717) 【査読有】
 9. Ikeda H · Minamizato T · Fujita S · Asahina I. Ameloblastic fibrodentinoma with a congenitally missing second premolar tooth: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Feb;117(2):e88-91. (IF1.495) 【査読有】
 10. I T, Sumita Y, Minamizato T, Umebayashi M, Liu Y, Tran SD, Asahina I. Bone Marrow-Derived Cell Therapy for Oral Mucosal Repair After Irradiation. *J Dent Res*. in press, 2014. (IF4.433) 【査読有】
 11. Minamizato T, I T, Ikeda H, Fujita S, Asahina I. Peripheral-type ameloblastic fibrodentinoma with features of so-called "immature dentinoma". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Jan;117(1):e61-4. doi:10.1016/j.oooo.2013.03.015. Epub 2013 May 10. (IF1.495) 【査読有】
 12. Ohba S, Nakao N, Nakatani Y, Minamizato T, Kawasaki T, Koga T, Matsuura T, Yoshimura H, Yoshida N, Sano K, Asahina I. The skeletal and dentoalveolar stability of the maxilla after LeFort I osteotomy for cant correction. *Cranio*. 2014 Sep 14 (IF0.723) 【査読有】
 13. Ohba S, Nakao N, Nakatani Y, Kawasaki T, Minamizato T, Koga T, Kohara H, Yoshida N, Asahina I. The skeletal stability after maxillo-mandibular osteotomy with a "physiological positioning strategy". *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Dec;52(10):965-9. (IF1.133) 【査読有】
 14. Ohba S, Nakao N, Awara K, Tobita T, Minamizato T, Kawasaki T, Koga T, Nakatani Y, Yoshida N, Asahina I. The three-dimensional assessment of dynamic changes of the proximal segments after intraoral vertical ramus osteotomy. *Cranio*. 2014 Sep 1: (IF0.723) 【査読有】
 15. Ohba S, Yoshida M, Kohara H, Kawasaki T, Minamizato T, Koga T, Nakatani Y, Watanabe E, Nakao N, Yoshida N, Asahina I. Short lingual osteotomy without fixation: a new strategy for mandibular osteotomy known as "physiological positioning". *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Feb;52(2):e9-e13. (IF1.133) 【査読有】

〔学会発表〕(計 26 件)

1. 大場誠悟,三浦桂一郎,南里篤太郎,川崎貴子,朝比奈 泉:【2-D2-2 外科矯正術による硬組織と軟組織の移動料の検討】第 60 回日本口腔外科学会総会・学術集会,2015 年(平成 27 年)10 月 16 日~18 日,名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
2. Seigo Ohba, Noriko Nakao, Takako Kawasaki, Tokutaro Minamizato, Noriaki Yoshida, Izumi Asahina: Comparison of the skeletal stability after sagittal split ramus osteotomy with physiological positioning strategy in patients with skeletal symmetry or asymmetry. ICOMS,Melbourne,Australia27-29,2015,October
3. 大場誠悟,中尾紀子,川崎貴子,南里篤太郎,三浦桂一郎,小原 悠,吉田教明,朝比奈 泉:【0-12-1 前歯部開咬例への physiological positioning strategy の適用】第 25 回日本顎変形症学会総会・学術大会,2015 年(平成 27 年)6 月 4 日~5 日,ベルサ神田(東京都千代田区)
4. 古賀喬充,吉田雅司,大場誠悟,南里篤太郎,中谷佑哉,朝比奈 泉:【011-5 生体吸収性系による骨片固定を行った SSRO の術後安定性】第 25 回日本顎変形症学会総会・学術大会,2015 年(平成 27 年)6 月 4 日~5 日,ベルサ神田(東京都千代田区)
5. 川崎貴子,大場誠悟,藤村裕治,三浦桂一郎,南里篤太郎,吉田教明,朝比奈 泉:【0-7-5 顎変形症手術を施行した顎顔面肩甲上腕型筋ストロフィーの 1 例】第 25 回日本顎変形症学会総会・学術大会,2015 年(平成 27 年)6 月 4 日~5 日,ベルサ神田(東京都千代田区)
6. 三浦桂一郎,吉田雅司,大場誠悟,南里篤太郎,古賀喬充,川崎貴子,朝比奈 泉:【0-6-1 顎変形症手術の術前と術後の摂食嚥下機能の変化.】第 25 回日本顎変形症学会総会・学術大会,2015 年(平成 27 年)6 月 4 日~5 日,ベルサ神田(東京都千代田区)
7. 南里篤太郎,古賀喬充,河井洋祐,井 隆司,三浦桂一郎,大場誠悟,住田吉慶,朝比奈 泉【P-28 脱灰象牙質の脱灰程度と顆粒の大きさの違いが骨再生に与える影響】第 18 回日本顎顔面インプラント学会学術大会 2014 年(平成 26 年)11 月 29 日~30 日ビッグハート出雲(島根県出雲市)
8. 中谷佑哉,住田吉慶,南里篤太郎,藤田修一,池田 通,朝比奈 泉【22 高齢女性に発生した口腔上皮線維腫の 1 例】第 47 回日本口腔科学会九州地方部会 2014 年(平成 26 年)11 月 22 日鹿児島県歯科医師会館 5 階大ホール(鹿児島県鹿児島市)
9. 中谷佑哉・住田吉慶・南里篤太郎・河井洋祐・井 隆司・古賀喬充・江頭寿洋・朝比奈 泉【2-P12.3-2 Platelet Rich Plasma (PRP) のフリーズ・ドライ保存における有用性の検討】第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2014 年(平成 26 年)10 月 17 日~19 日幕張メッセ(千葉県千葉市)
10. 南里篤太郎・榎原 峻・三浦桂一郎・河井洋祐・四道玲奈・池田久住・松下祐樹・林田 咲・梅田正博・朝比奈 泉【2-H5-3 顎骨内病変における開窓療法の適応と効果について】第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2014 年(平成 26 年)10 月 17 日~19 日幕張メッセ(千葉県千葉市)
11. 白石剛士・南里篤太郎・池田久住・藤田修一・池田 通・朝比奈 泉【1-G4-3 口腔扁平上皮癌の治療中に生じた上顎歯肉線維肉腫の一例】第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2014 年(平成 26 年)10 月 17 日~19 日幕張メッセ(千葉県千葉市)
12. 榎原 峻・南里篤太郎・柳本惣市・池田久住・白石剛士・高橋英哲・松下祐樹・藤田修一・梅田正博・朝比奈 泉【1-G2-5 当科における口腔内多発癌に関する臨床的検討】第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2014 年(平成 26 年)10 月 17 日~19 日幕張メッセ(千葉県千葉市)
13. 三浦桂一郎・川越 薫・南里篤太郎・河井洋祐・白石剛士・池田久住・四道玲奈・柳本惣市・梅田正博・朝比奈 泉【1-F5-4 高悪性度白板症 -Proliferative verrucous leukoplakia- に関する臨床的検討】第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2014 年(平成 26 年)10 月 17 日~19 日幕張メッセ(千葉県千葉市)
14. Hiroe K,Takao A,Tokutaro M,Shinichi K,Saki H,Souichi Y,Masahiro U Izumi A【Successful treatment of advanced the jaw,BRONJ,with an adjunctive teriparatide therapy】the XXII Congress of European Association For Cranio-Maxillo-Facial Surgery congress23-26September2014 Prague 4, Czech Republic
15. 河井洋祐・南里篤太郎・白石剛士・池田久住・三浦桂一郎・四道玲奈・川越 薫・朝比奈 泉【C1-17 歯性感染症から降下性壊死性縦隔炎へと移行した 1 例】第 24 回日本口腔内科学会・第 27 回日本口腔診断学会合同学術集会 2014 年(平成 26 年)9 月 18 日~20 日九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)
16. 南里篤太郎・小原 悠・大場誠悟・飛田尚慶・古賀喬充・中谷佑哉・吉田教明・朝比奈 泉【0-10-4 重度の骨格型下顎前突症患者に対して二期的に顎矯正手術を

- 施行した1例】第24回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会2014年(平成26年)6月10日～6月11日アウフ福岡(福岡県福岡市)
17. 大場誠悟・中尾紀子・中谷佑哉・南里篤太郎・川崎貴子・飛田尚慶・古賀喬充・井隆司・小原 悠・松浦多喜子・吉村仁志・吉田教明・佐野和生・朝比奈 泉【0-8-4 上下顎骨形成術に physiological positioning strategy を適用した際の安定性の検討】第24回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会2014年(平成26年)6月10日～6月11日アウフ福岡(福岡県福岡市)
18. 野田さわこ・住田吉慶・南里篤太郎・藤田修一・池田 通・朝比奈 泉【23 口腔に発生した軟部好酸球肉芽腫の一例】第82回(公社)日本口腔外科学会九州支部学術集会2014年(平成26年)6月7日ホテル大分(大分県大分市)
19. 四道玲奈・南里篤太郎・田島暢崇・藤田修一・池田 通・朝比奈 泉【21 先天性歯の萌出部位に発生した周辺性歯原性線維腫の1例】第82回(公社)日本口腔外科学会九州支部学術集会2014年(平成26年)6月7日ホテル大分(大分県大分市)
20. 池田久住・飛田尚慶・白石剛士・古賀喬充・南里篤太郎・藤田修一・田中克己・池田 通・朝比奈 泉【Session -3「口底に発生した類基底細胞癌の1例」九州地区口腔癌研究会第18回学術講演会2014年(平成26年)6月6日全労済ビル(大分県大分市)
21. 柳本惣市・山田慎一・高橋英哲・鳴瀬智史・六反田 賢・松下祐樹・池田久住・白石剛士・南里篤太郎・井 隆司・朝比奈 泉・梅田正博【1「舌・口底癌に対する根治的顎部郭清術の臨床的検討」九州地区口腔癌研究会第18回学術講演会2014年(平成26年)6月6日全労済ビル(大分県大分市)
22. 井 隆司・住田吉慶・南里篤太郎・渡辺大智・朝比奈 泉【2-P-38 放射線性の口腔内障害に対する骨髄由来幹細胞治療応用の検討】第68回NPO法人日本口腔科学会学術集会2014年(平成26年)5月7日～5月9日京王プラザホテル(東京都新宿区)
23. 古賀喬充・南里篤太郎・河井洋祐・三浦桂一郎・井 隆司・住田吉慶・朝比奈 泉【2-P-30 脱灰象牙質の脱灰程度と顆粒の大きさの違いが骨再生に与える影響】第68回NPO法人日本口腔科学会学術集会2014年(平成26年)5月7日～5月9日京王プラザホテル(東京都新宿区)
24. 中谷佑哉・縣 秀樹・住田吉慶・南里篤太郎・河井洋祐・古賀喬充・江頭寿洋・朝比奈 泉【0-20-1Platelet Rich Plasma(PRP)の効果的保存法の検討】第

13回日本再生医療学会総会2014年(平成26年)3月4日～3月6日国立京都国際会館(京都府京都市)

25. 古賀喬充・南里篤太郎・河井洋祐・縣 秀樹・井 隆司・中谷佑哉・住田吉慶・朝比奈 泉【0-3-3 脱灰象牙質の脱灰程度と顆粒の大きさの違いが骨再生に与える影響】第13回日本再生医療学会総会2014年(平成26年)3月4日～3月6日国立京都国際会館(京都府京都市)
26. 白石剛士・池田久住・南里篤太郎・田島暢崇・鳴瀬智史・高橋英哲・山田慎一・柳本惣市・梅田正博・朝比奈 泉【10-C17 当科における口腔癌血管柄付き遊離皮弁再建後の気道合併症に関する検討】第32回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会2014年(平成26年)1月23日～24日札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南里 篤太郎(MINAMIZATO, Tokutaro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)
客員研究員
研究者番号：50529807

(2) 研究分担者

朝比奈 泉 (ASAHINA, Izumi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授
研究者番号：30221039

山口 朗 (YAMAGUCHI, Akira)
東京歯科大学・歯学部
客員教授
研究者番号：00142430

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし