

論文要旨等報告書

氏名	前田 あずさ
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 8 3 6 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	CCN family 2/connective tissue growth factor modulates BMP signaling as a signal conductor, which action regulates the proliferation and differentiation of chondrocytes (CCNファミリー2/結合組織成長因子は軟骨細胞の増殖と分化を調節し、シグナルコンダクターとしてBMPシグナル伝達経路を制御する)
論文審査委員	教授 山城 隆 教授 山本 敏男 教授 滝川 正春

学位論文内容の要旨

緒言

CCNファミリー2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF; CCN2)ならびに骨形成因子(BMP)-2は共に軟骨細胞の増殖・分化の両面を促進する成長因子であり、内軟骨性骨化において非常に重要な働きを示す。また、CCN2はIGFBP, VWC, TSP-1, CTという特徴的な4つのドメイン構造を持つタンパク質であるが、2002年のNature Cell BiologyにCCN2はVWCドメインを介してBMP-4と結合し、BMP-4による形態形成作用を抑制することが報告された。このことは、内軟骨性骨化においてCCN2とBMP-2が互いに影響を及ぼし合って機能し、更にBMP-2の軟骨細胞に対する作用にCCN2が何らかの影響を与える可能性があることを示している。そこで今回、CCN2とBMP-2が分子間で相互作用するかを明らかにすると共に、BMP-2の軟骨細胞に対する作用にCCN2が与える影響について解析した。

材料と方法

細胞培養: ヒト軟骨細胞様細胞株HCS-2/8ならびにマウス初代肋軟骨細胞は10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地(D-MEM)ならびに α -MEMを用いて5%CO₂気相下37°Cで培養した。

遺伝子組換えタンパク質: 大腸菌由来組換えBMP-2タンパク質はオステオファーマ社から供与を受けた。Histidine (His)-tagを付加した大腸菌由来の組換えCCN2タンパク質はAoyamaらの方法で、哺乳類細胞由来のものはNishidaらの方法に準じて精製した。

固相化結合試験: 96穴プレートにBMP-2を固相化後、His-tagを付加した全長のCCN2ならびにCCN2の各モジュールタンパク質を添加、室温で2時間反応させた。よく洗浄した後、抗His-HRP抗体を用いた比色分析法にて両分子の結合性を測定した。

免疫沈降-Western blot法: HA-tagを付加したCCN2の発現プラスミドをHCS-2/8細胞にFugene6を用いて遺伝子導入し、2日間培養した。HCS-2/8細胞を可溶化後、組換えBMP-2タンパク質を添加し、4°Cで2時間反応後、抗BMP-2抗体を添加して免疫沈降を行った。抗BMP-2抗体による免疫沈降後、抗HA抗体を用いてHA-CCN2タンパク質を検出した。

表面プラズモン共鳴(SPR)分光法: 生体分子の相互作用解析装置、BIACORE Xを用いて、センサーチップ(CM5)にCCN2を固相化後、様々な濃度のBMP-2を流して両者の結合・解離を光の屈折率の変化を利用して測定した。解離定数は専用のソフトウェア(BIAevaluation)を用いて求めた。

組織学的解析: 胎生18.5日胚の野生型ならびにCCN2欠損マウス成長板のパラフィン切片を作製し、抗BMP-2抗体、抗CCN2抗体を用いて免疫染色を行った。Negative controlとして抗IgG抗体を用いた。

論文内容の要旨 (2000字程度)

細胞増殖試験: HCS-2/8細胞を96穴プレートに 1×10^4 /wellの密度で播種し、24時間後にCCN2, BMP-2あるいは両分子を共存させた状態で細胞に刺激を加え、更に24時間培養した。細胞増殖試験はMTS法にて生細胞数を測定した。

Northern blot法: CCN2, BMP-2あるいは両分子を共存させたものをマウス肋軟骨細胞に添加して6時間培養後、ISOGENを用いてtotal RNAを精製した。各total RNA10 μ gを1% formaldehyde-agarose gelに泳動後、Hybond-N filtersに転写し、*Type II collagen*, *aggrecan*, *Type X collagen*ならびに*Runx2*の特異的プローブを用いてそれぞれの遺伝子発現レベルを検出した。

プロテオグリカン合成量測定試験: HCS-2/8細胞ならびにマウス肋軟骨細胞を24穴プレートに播種し、サブコンフルエントに達した時点でCCN2, BMP-2あるいは両分子の混合液を添加して5時間培養後、37kBq/mlの $[^{35}\text{S}]$ sulfateを添加して更に17時間培養した。その後actinase Eにて細胞を溶解し、液体シンチレーションカウンターを用いて一定時間内のプロテオグリカン合成量を測定した。

統計処理: 全ての実験は少なくとも2回行い、同様の結果が得られた。統計分析はStudent's *t* testを用いて行った。

結果

CCN2とBMP-2の間に分子間相互作用が存在するのかどうかを同定するため、固相化結合試験ならびに免疫沈降-Western blot法を行った。その結果、CCN2とBMP-2はBMP-2の濃度依存的に結合し、CCN2の4つのドメイン構造のうちCTドメインと最も強く結合するものの、IGFBPドメインやWVCドメインともわずかに結合していることが明らかとなった。さらに、SPR分光法を用いた解析により、CCN2とBMP-2は解離定数0.77nMと強い結合親和性で結合し、CCN2がBMP-2と直接的に結合することが明らかとなった。

生体内においてCCN2とBMP-2が相互作用し得る部位に局在しているのかを胎生18.5日胚マウス成長板の免疫染色にて検討した。野生型マウスにおいてCCN2, BMP-2共に成長板の前肥大軟骨細胞層に局在が認められ、生体内においても相互作用し得る可能性が示された。興味深いことに、CCN2欠損マウスにおいてはBMP-2の局在が野生型とは異なり、成長板の増殖層付近に認められた。このことはCCN2がBMP-2と結合することで、BMP-2の局在を制御している可能性がある。

両分子の共存下による軟骨細胞の増殖ならびに分化に与える影響を検討した。まず、CCN2ならびにBMP-2のシグナル伝達経路に与える影響について、Smad1/5/8, ERK1/2, p38 MAPKのリン酸化をWestern blot法を用いて解析した。CCN2とBMP-2の共存下ではそれぞれ単独でリン酸化されたSmad1/5/8ならびにERK1/2が抑制され、特にERK1/2のリン酸化は著明に抑制された。一方、p38 MAPKのリン酸化には影響が見られなかった。このことから両分子の共存が細胞増殖に与える影響について検討したところ、CCN2, BMP-2それぞれ単独で添加した場合に比べて両分子の共存下では軟骨細胞の増殖は抑制されたが、軟骨細胞の分化マーカー遺伝子、*Type II collagen*, *aggrecan*, *Type X collagen*あるいは*Runx2*の発現レベルはそれぞれ単独で刺激した場合よりも上昇した。更に、軟骨細胞の分化マーカーであるプロテオグリカン合成量も両分子の共存下では促進された。

考察

これらの結果から、CCN2ならびにBMP-2はそれぞれ単独で軟骨細胞の増殖、分化の両面を促進するが、両分子が共存することでERK1/2のシグナルを著明に減弱させ、軟骨細胞の増殖を抑制する一方、軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現を上昇させ、軟骨細胞の分化を促進することが示唆された。このことは、成長板の免疫染色にて示したようにCCN2はBMP-2と前肥大軟骨細胞層で結合することでBMPシグナル伝達経路を修飾し、BMP-2あるいはCCN2自身による軟骨細胞の増殖ならびに分化を調節している可能性を示しており、内軟骨性骨化におけるCCN2の新規機能が示唆された。

論文審査結果の要旨

CCNファミリー2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF; CCN2)ならびに骨形成因子(BMP)-2は共に内軟骨性骨化において非常に重要な働きを示す成長因子であり、両分子の内軟骨性骨化における機能には多くの類似点が認められる。2002年にAbreuらはCCN2がBMP-4と結合してBMP-4の機能を抑制すると報告しているが、このことはCCN2とBMP-2も互いに影響を及ぼし合っている可能性があることを示している。

本研究では、CCN2とBMP-2が分子間で相互作用するか否かを明らかにすると共に、BMP-2の軟骨細胞に対する作用にCCN2が与える影響について解析することを目的として、まずCCN2とBMP-2に直接的な相互作用が存在するのかを免疫沈降-western blot法、固相化結合試験ならびに表面プラズモン共鳴(SPR)分光法を行い検討している。その後、両分子の局在を胎生18.5日齢マウス成長板の組織切片を用いた免疫染色にて明らかにしている。さらに、ヒト軟骨細胞様細胞株HCS-2/8細胞ならびにマウス肋軟骨細胞を用いて、両分子の相互作用がそれぞれのシグナル伝達経路ならびに軟骨細胞の増殖・分化へ与える影響について検討している。

その結果、1) CCN2とBMP-2は解離定数0.77nMと強い結合親和性で直接的に相互作用していること、2) CCN2とBMP-2は共にマウス成長板の前肥大軟骨細胞層に局在しており、*in vivo*においても両分子は相互作用し得ること、3) CCN2あるいはBMP-2それぞれ単独ではERK1/2のリン酸化が促進されるが、両分子の共存下ではコントロールレベルにまで抑制されたこと、4) CCN2とBMP-2はそれぞれ単独では軟骨細胞の増殖・分化の両方を促進するが、両分子の共存下では軟骨細胞の増殖を抑制する一方、分化を促進し、両分子の相互作用が軟骨細胞の増殖・分化をコントロールしている可能性があること、が示された。

これらの知見は、CCN2がBMP-2と前肥大軟骨細胞層で結合することでBMPシグナル伝達経路を修飾し、BMP-2あるいはCCN2自身による軟骨細胞の増殖ならびに分化を調節しているといった内軟骨性骨化におけるCCN2の新規機能を示唆しており、本申請論文は博士(歯学)の学位授与に十分値する論文であると判断した。