

論文要旨等報告書

氏 富田 奈緒
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 9 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 トランスジェニックマウスを用いたCCN2/CTGFの内軟骨性骨形成における役割解明に関する研究

論文審査委員 教授 山本 敏男 教授 滝川 正春 准教授 十川 紀夫

学位論文内容の要旨

【緒言】

結合組織成長因子 CTGF/CCN2 は、その4つのドメイン構造から Cyr61, Nov などと共に CCN ファミリーを形成しており、生理的には前肥大軟骨細胞層に特異的に高発現すること、また、培養細胞において軟骨細胞の増殖、成熟、分化を促進することなどを学位申請者らの研究グループはこれまで明らかにしてきた。また、CCN2 欠損マウスの解析により、そのマウスが骨の脆弱性により呼吸困難に陥り出生直後に死亡する事から、正常な内軟骨性骨形成過程に必須であると考えられるが、前述したように他のファミリーメンバーの作用も類似点が多い事から内軟骨性骨形成過程における CCN2 の生理的作用は不明な部分が多い。そこで学位申請者らは CCN2 の作用を *in vivo* で検証する事を目的として、CCN2 を 2 型コラーゲン(*col2a1*) プロモーター下で軟骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス(tg)を作製し、その解析を行った。

【材料および方法】

1. *ccn2* トランスジェニックマウス(tg)の作製と外来遺伝子の発現部位の確認
マウス *ccn2* cDNA に HA タグを付加し、*col2a1* のプロモーター/エンハンサーの下流に接続し、さらに、IRES を付加した *lacZ* 遺伝子を *ccn2* cDNA 下流に接続した。このコンストラクトをマウス受精卵に注入し、トランスジェニックマウスを作製した。作製した tg マウスの外来遺伝子の発現部位は、*ccn2* cDNA の下流に接続した *IRES-lacZ* 遺伝子の活性を X-gal 染色する事によって検出した。
2. tg における *ccn2* mRNA および CCN2 過剰発現の確認
軟骨組織から直接抽出した RNA および蛋白質を用いて、*ccn2* mRNA および CCN2 の過剰発現をノーザンブロットあるいはリアルタイムPCRおよびウエスタンブロットによりそれぞれ確認した。
3. 組織学的解析
長管骨のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン、アルシアンブルー、サフラニン-O 染色、また、各種抗体を用いた免疫染色により実施した。
4. 初代培養軟骨細胞における遺伝子発現レベルの変化
肋軟骨から単離した初代軟骨細胞を1週間、あるいは軟骨細胞の肥大化を認める1ヶ月間培養し、単離した RNA を用いてリアルタイムPCR解析を行った。また、培養細胞の一部はアルシアンブルー染色を行い、プロテオグリカンの蓄積を確認した。
5. 間葉系細胞の高密度培養
未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化過程における CCN2 過剰発現の影響を調べるため、胎生 11.5 日齢の肢芽から単離した間葉系細胞を高密度培養し、軟骨への分化を軟骨結節形成および遺伝子発現レベルで評価した。

6. マイクロ CT および骨塩量解析

骨形成における CCN2 の過剰発現の影響を調べるために、生後 8 週齢の大腿骨を骨端部から 1.2 mm および 4.0 mm の距離でマイクロ CT による画像解析および peripheral quantitative computed tomography (pQCT) (XCT Research SA+[Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany]) 解析により骨塩量、皮質骨厚の解析を行った。

7. 統計処理

各データの統計学的有意性は、Student-t 検定を用いて検討した。

【結果および考察】

1. tg における外来遺伝子の発現および CCN2 過剰発現の検出

作製した CCN2 tg マウスにおける外来性遺伝子の発現は、生後 1 日齢のホールマウント X-gal 染色により全ての軟骨組織に特異的である事を確認した。また、軟骨組織から直接抽出した RNA および蛋白溶液に外来性 *ccn2-lacZ* mRNA が発現していること、および CCN2-HA 蛋白が産生されていることをそれぞれ確認した。また、内因性 *ccn2* mRNA 発現も tg において増強されている事を確認した。これは、CCN2 強制発現によってオートクライン的に内因性 CCN2 の発現が誘導されたためだと思われる。

2. tg 長管骨の組織学的解析

tg マウスは、胎生期には非-tg (wt) マウスと比較して体長に大きな変化は見られないが、生後 1 日目には wt マウスに比べ体長が増大傾向にあり、この変化は観察した 8 週齢まで持続していた。この体長の増加は長管骨の骨領域の延長に起因しており、*ccn2* mRNA の発現量との間に相関傾向があった。組織学的な解析の結果、長管骨の成長板軟骨全体で細胞増殖が亢進し、軟骨組織全体でプロテオグリカンおよび 2 型コラーゲンの蓄積が観察された。

3. 初代培養軟骨細胞における遺伝子発現解析

これらの所見は、同腹マウスから単離した初代培養軟骨細胞における mRNA 解析において、*ccn2* mRNA の過剰発現と関連した *aggrecan*, *col2a1* mRNA の強力な発現増加からも裏付けられた。さらに長期培養では肥大化マーカーである *coll10a1*, 血管新生誘導因子である *vegf*, *mmp9* mRNA 発現が増加している事から、*ccn2* 過剰発現軟骨組織における軟骨細胞の増殖、分化、血管誘導が促進されている事が示唆された。

4. IGF-I および II の誘導

CCN2 過剰発現と骨延長との関連を調べるため、*IGF-I* および *II* の mRNA レベルを調べると、軟骨より直接抽出した RNA においても tg で、また、リコンビナント CCN2 を添加した初代培養軟骨細胞においても *IGF-I* および *II* の mRNA の発現レベルが上昇する事が観察された。

5. 未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化促進

胎生 11.5 日齢の肢芽から採取した未分化間葉系細胞を高密度培養すると軟骨マーカーが tg において早期に誘導されたことから、未分化間葉系細胞の軟骨への分化も促進されている事が明らかとなった。

6. 細胞増殖およびアポトーシスの促進

tg において軟骨組織全体で細胞増殖の亢進が観察され、また、骨への移行部でのアポトーシスも亢進が観察されたことから、骨への置換も促進されている事が明らかとなった。

7. 骨塩量解析

8 週齢大腿骨の μ -CT 解析により骨・軟骨移行部近くの骨の全骨塩量、海綿骨塩量、皮質骨厚が増加していたことから骨への置換が促進されている事が裏付けられた。

これらの現象をまとめると、CCN2 は内軟骨性骨形成過程における未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化、軟骨細胞の増殖と初期分化～最終分化までを促進し、さらに骨への置換、骨化も促進することが明らかになり、その結果、CCN2 の軟骨組織における過剰発現により長管骨の延長が誘導されたのではないと思われる。

【結論】

本研究では、軟骨組織特異的 CCN2 過剰発現マウスを作製し、内軟骨性骨化における CCN2 の生理的役割を解析した。その結果、CCN2 は内軟骨性骨形成過程における未分化間葉系細胞の軟骨細胞への分化、軟骨細胞の増殖・分化・成熟・肥大化、さらに骨への置換を促進する結果、長管骨を延長することが示唆された。

論文審査結果の要旨

結合組織成長因子 CTGF/CCN2 は, Cyr61/CCN1, Nov/CCN3 など 6 つの分子種からなる CCN ファミリーの一員で, 細胞増殖, 接着, 細胞死, 細胞外マトリックスの産生, 血管内皮細胞の遊走を含む多様な細胞の機能を制御することが知られている。申請者の研究グループはこれまで生理的には前肥大軟骨細胞層に特異的に高発現すること, 軟骨細胞と骨芽細胞の増殖, 分化を促進すること, また, 血管新生を誘導することを明らかにし, CCN2 が内軟骨性骨形成全般を促進する因子であることを示唆してきた。しかし, これまでのほとんどの知見は *in vitro* で得られたものであること, また, CCN2 欠損マウスが出生直後に死亡するため, *in vivo* での検証は十分なされていなかった。

そこで本研究では, CCN2 の作用を *in vivo* で検証する事を目的として, CCN2 を 2 型コラーゲン (*col2a1*) プロモーター下で軟骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。次いでこのマウスの外来遺伝子の発現部位の確認, *ccn2* mRNA および CCN2 過剰発現の確認, 組織学的解析, 初代培養軟骨細胞における遺伝子発現レベルの検討, 未分化間葉系細胞の高密度培養, マイクロ CT における骨の解析を行った。

その結果, CCN2 は内軟骨性骨形成過程における未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化, 軟骨細胞の増殖と初期分化～最終分化までを促進し, さらに骨への置換, 骨化も促進し, 最終的に長管骨が伸長することが明らかとなった。

本研究は, *in vivo* において CCN2 を軟骨特異的に過剰発現させることにより, 内軟骨性骨形成が亢進し, 骨が伸長することを初めて明らかにしたという点において新規性の高い重要な論文として高く評価され, 本論文審査委員会は, 全会一致で, 本学位申請論文が博士 (歯学) の学位を授与されるに値する論文であると認めた。