原 規子

Matricellular CCN family proteins in platelets:

Possible roles in bone and cartilage regeneration

Chikako Hara

緒言

Cyr61-CTGT-NOV (CCN) ファミリータンパク質は6つのメンバーからなり、1つモジ ュールを欠落する CCN5 を除いて、5つのメンバーは4つのモジュール構造を有している ¹⁻⁵⁾。このファミリーには cysteine-rich 61 (Cyr61/CCN1)、 connective tissue growth factor (CTGF/CCN2)、nephroblastoma-overexpressed (NOV/CCN3)の古典的な3 つのメンバーに加え、Wnt-inducible signaling protein (WISP) -1/CCN4、WISP-2/ CCN5、WISP-3/CCN6 が属する。CCN ファミリータンパク質は主に細胞外基質にあっ て、様々な細胞外シグナル分子や受容体、成長因子と相互作用し細胞機能を調整する。こ のような機能的特性から、これらのタンパク質はマトリセルラータンパク質に分類されて いる ^{3,4)}。

近年、硬組織の発生・成長における CCN ファミリーメンバーの重要な役割が広く知られ るようになった。軟骨内骨化の過程においては、全てのファミリーメンバーが産生される が ⁶、特に CCN2 は軟骨内骨化の全ての段階を促進する ^{7,8}。逆に CCN2 遺伝子の欠損は成 長板軟骨細胞のエネルギー代謝を障害し ⁹、マウスの骨格形態の異常を引き起こす事もこれ までの数多くの研究により示された ^{10,11}。また、これらの知見と一致して、*in vivo* におい ても CCN2 は損傷を受けた軟骨や骨の再生を促進し ^{12,13}、実際に、変形性関節症

(osteoarthrosis: OA) ラットモデルにおいて CCN2 は OA 軟骨を再生し¹³、また、CCN2 の過剰発現はマウスでの OA の発生を抑制する¹⁴⁾。注目すべき事に、組織再生の鍵となる 血小板には TGF-6、insulin-like growth factor (IGF)-I、platelet-derived growth factor (PDGF)-AB などの成長因子よりも多くの CCN2 が含まれている^{15,16)}。

自己血由来血小板は platelet-rich plasma (PRP) または他の誘導体の形で再生医療に広 く利用されている。血小板は成長因子やサイトカインを a 顆粒中に含み、これらは炎症や 細胞外マトリックス合成、血管新生を通して組織再生を促進する 17)。PRP は自家移植のた めの血小板を濃縮した血漿であり、臨床応用として骨や関節、皮膚、目さらには神経を含 む、損傷した軟組織および硬組織の治療への応用が検討されている 18-20)。関節組織修復に おける PRP の有用性は多くの臨床試験により示唆され、整形外科の臨床の場で用いられて いる。最近の報告では PRP が OA または関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA)の症 状を効果的に改善する事が示された ²¹⁻²³⁾。一方で、前十字靭帯損傷への適用例などに代表 されるように、PRP 療法の効果は時として安定せず ²⁴⁾、それゆえに血小板に含まれる生物 学的活性因子の詳細な検討は、関節再生療法において安定した成果をもたらすためのプロ トコル最適化に必要である。

CCN2のみならず他のCCNファミリーメンバーも組織修復に一定の役割を果たし得る事 が近年明らかになってきた。CCN4の機能については、CCN2と同様に細胞外基質(ECM) の産生・線維化を増強する事が報告されている^{25,26)}。一方で、CCN1とCCN3は線維化を 抑制する。CCN3はCCN2の線維化促進作用を阻害する事で線維化を抑制し²⁷⁻²⁹⁾、CCN1 はCCN3の作用メカニズムとは異なり、細胞老化を誘導することで線維性組織形成を制御 する^{4,30)}。さらに最近、CCN1が主要な軟骨プロテオグリカンであるアグリカンの分解酵素 として知られている ADAMTS4の阻害分子として機能している事が新たに明らかとなり、 CCN1がOAの進行を抑制する事が期待されている³¹⁾。しかし、血小板において CCN2 以 外のこのような CCN ファミリーメンバーが存在するか否かは今まで検討されていない。

そこで、本研究では、血小板中の全 CCN ファミリーメンバーの存在様態を包括的に分析 し、どのメンバーが軟骨再生や骨折における血小板の機能に寄与しているかを明らかとす る事とした。また、血小板中の CCN ファミリーメンバーの供給源や、血小板の関与する軟 骨再生過程におけるこれらのメンバー間の共同作業仮説についても考察を行った。

材料ならびに方法

1. 細胞培養

ヒト巨核芽球細胞株である MEG-01³²⁾と CMK³³⁾を 10% bovine serum alnumin (FBS)、 100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin 含有 RPMI1640 にて 37℃、5% CO₂ 下で培 養した。

MEG-01 細胞(5.0×10⁶ cells)には 0.4 µg/ml aphidicolin を添加し、37℃下で 3 日間急 速分化誘導を行った。また、MEG-01 細胞(6.0×10⁵ cells)の分化誘導培養は 2×10⁻³ M の valploic acid (VPA)または 10⁻¹¹ M の all trans retinoic acid (ATRA)³⁴⁾それぞれを用いて 37℃下で 20 日間の長期培養でも行った。細胞分化開始 5 日、10 日、15 日、20 日後に室温

 $\mathbf{2}$

で5分間遠心分離(400 RCF または 1500 RCF)を行い、MEG-01 細胞を回収した。

CMK 細胞(5.0×10⁶ cells)はコンフルエントに達するまで培養し、室温下で5分間の 遠心分離にて細胞回収を行った。

ヒト軟骨細胞様細胞株である HCS-2/8 細胞 ³⁵⁾は 10 % FBS 含有 Dulbecco's modification of Eagle's minimum essential medium (D-MEM) にて 80~90%コンフルエントまで培 養した。CCN ファミリータンパク質の軟骨細胞に対する効果を明らかとするため、CCN ファミリーリコンビナントタンパク質を添加する 12 時間前に 0.5 %FBS 含有 D-MEM へと 培地交換を行い、その後 CCN2 単独(最終濃度は 50 ng/ml、150 ng/ml bovine serum albumin : BSA と共に添加)、CCN1/2/3/5(最終濃度は各 50 ng/ml)、BSA(最終濃度は 200 ng/ml)をそれぞれ添加した。MEG-01 細胞培養上清の HCS-2/8 細胞への効果を明ら かにするため、20%の MEG-01 培養上清を含む D-MEM にて HCS-2/8 細胞を 12 時間細胞 培養し、RNA 解析のため細胞回収を行った。

2. ウェスタンブロッティング法

CCN ファミリータンパク質および β アクチンの検出は、ウェスタンブロッティング法に よって行った。まず AllCells LLC (Berkley, CA, USA)より提供された正常ヒト血小板、上 述の方法で aphidicolin による分化誘導を行った MEG-01 細胞、および CMK 細胞から RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, 4 mM EDTA, 1 % Nonidet P-40, 0.1 % sodium deoxycholate)を用いて細胞抽出液を調製した。総タンパク量 10 µg を含む細胞抽出液を ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファーと混合して5分間煮沸し、還元状態 にした後に SDS-PAGE で分離し、ポリビニリデン・ジフルオライド (PVDF) 膜 (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) へ通法に従い転写した。一次抗体は 1/500 濃度の goat polyclonal antibody against human CCN1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、1/1000 濃度の rabbit polyclonal antibody against human CCN2^{15,36)}、1/100 濃度 𝒫 goat polyclonal antibody against human CCN3 (Santa Cruz Biotechnology), 1/100 濃度の rabbit polyclonal antibody against human CCN4 (Santa Cruz Biotechnology)、 1/100 濃度の rabbit polyclonal antibody against human CCN5 (Abcam, Cambridge, MA, USA)、1/500 濃度の rabbit polyclonal antibody against human CCN6 (Abcam)、1/2000 濃度の mouse monoclonal antibody against human & actin (SIGMA, St. Louis, MO, USA) を使用した。二次抗体には horseradish peroxidase (HRP) でラベルされた anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology), anti-mouse IgG (ROCKLAND, Gilbertsville, PA, USA), anti-rabbit IgG (Abcam) をそれぞれ 1/3000、1/2000、1/3000 または 1/4000 の濃度で使 用した。PVDF 膜上の免疫複合体の検出には enhanced chemiluminescence (ECL) 蛍光

システム (Amersham) を用いた。ポジティブコントロールとして用いたリコンビナント (r) CCN1、rCCN4、rCCN5、rCCN6 タンパク質は Pepro Tech (Rocky Hill, NJ, USA)、 rCCN2 は BioVendor Laboratory Medicine (Karasek, Brno, Czech)より購入した。rCCN3 は大分大学、佐々木隆子博士より譲り受けた。

3. RNA の抽出およびリアルタイム RT-PCR

RNA の抽出は、培養細胞から ISOGEN(NIPPON GENE CO., Tokyo, Japan)を用い て行い、逆転写反応は全 RNA 500 ng を avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase(Takara, Ohtsu, Japan)にて行った。

定量的 PCR は StepOnePlus[™] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて 行った。酵素反応には SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を使用し、95℃ 10 秒、60℃ 30 秒のステップを 55 サイクル繰り返した。各 mRNA レベルの測定には StepOne[™] software v2.1 (Applied Biosystems)を用いた。各 mRNA 量 は glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gapdh) mRNA 量を用いて標準化した。 使用プライマーの塩基配列を表 1 に示す。

4. フローサイトメトリー

上記の通り回収した巨核球細胞株は抗 CD41 抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) あるいは mouse IgG K Isotype control (eBioscience, San Diego, CA, USA) を用い て 30 分間染色を行い、0.5 %BSA 含有 phosphate buffered saline (PBS) にて 3 回洗浄 を行った。染色した細胞は BD ACCURI C6 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて解析した。データ解析には FLOW JO (FLOW JO, LLC, OR, USA) を用いた。

5. 免疫蛍光染色

8-12 週齢のオス Balb/cJ マウスの大腿骨および脛骨から骨髄細胞を採取した。 Ammonium-chloride-potassium (ACK) バッファー (0.15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM Na₂ EDTA, pH 7.2⁻ 7.4)を用いて赤血球除去を行った後、PBS で懸濁した。骨髄 細胞懸濁液は wedge smear technique を用いてスライドガラスに展開し、4% ホルムアルデヒ ド溶液によって 10 分間固定後、blocking buffer (10% normal serum/ 0.3M glycine/ 0.1% BSA, 0.1% Tween-PBS)でブロッキングを行った。一次抗体には anti-human CCN1、CCN2、 CCN3、CCN5 (Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体には Alexa488 または Alexa568 で 標識された anti-goat IgG, anti-rabbit IgG (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた染色を行い、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による核染色の後蛍光顕微 鏡(BZ-X710:キーエンス,大阪,日本)で観察・画像取得を行なった。

6. 統計解析

各データ間の有意差は、Student's t検定を用いて検討した。

結果

1. Aphidicolin による MEG-01 細胞巨核球分化の急速な誘導

血小板は分化した巨核球により産生される。しかしヒト造血前駆細胞中の巨核球を、フ ィーダー細胞なしで分化誘導する事は非常に困難であるため、*in vitro*において非フィーダ ー細胞下で、血小板様粒子を形成する最終段階まで分化可能なヒト巨核芽球細胞株 MEG-01をモデル系として用いた。既存のプロトコルに従い、aphidicolinにより MEG-01 細胞の急速な最終分化を誘導したところ、MEG-01は巨核球の形質をすでにある程度保持 しているため、aphidicolin処理前から初期分化段階のマーカー遺伝子である GATA1の高 い発現が認められた(データ省略)。これとは対照的に、81-tubulin などの後期分化段階の マーカー遺伝子の発現は aphidicolin処理後、経時的に上昇する傾向が認められ、後期分化 の誘導が示された(図 1)。この MEG-01 分化誘導システムを主に用い、ヒト血小板中の CCN ファミリーメンバーとその供給源について比較検討を行った。

2. 血小板および巨核球ともに存在する CCN1 と CCN5

CCN1 と CCN5 は成長板軟骨の増殖層でともに産生されており⁶、軟骨内骨化における 関与が示唆される。また、CCN1 は細胞老化を誘導する事で炎症後の線維化を終結へ導く 事が知られており³⁰⁾、CCN5 は心肥大において CCN2 を阻害するという報告が過去に一例 ある³⁷⁾。このように以前の研究から組織リモデリングにおけるこれら 2 つのメンバーの関 与の可能性が示唆されるが、それらが血小板に存在するかどうかを示す報告はまだない。 この点をまず明らかとするため、ヒト血小板から細胞抽出液を作製し、ウェスタンブロッ ト法で検討した。図 2 に示すように、予想される分子量の位置に明確なバンドが確認され、 CCN1、CCN5 はヒト血小板に含まれる事が示された。

次に、これらのタンパク質が血小板の産生細胞である巨核球から内因的に供給されてい るかどうか検討した。使用した巨核球の in vitro モデルの一つは MEG-01 システム (図 1) であり、もう一つとして、安定して成熟巨核球の表現系を維持する CMK 細胞を用いた。ウ ェスタンブロッティング解析では、分化段階に関係なく CCN1 と CCN5 は共にこれら巨核 球系細胞中に存在する事が明らかとなった (図 2)。これらの結果は、血小板中の CCN1 と CCN5 の供給源が巨核球自身である事を示唆している。

 $\mathbf{5}$

3. 血小板に存在するが巨核球に存在しない CCN2、CCN3

CCN2 は前肥大軟骨細胞で強く発現し、軟骨内骨化のプロセス全体を促進する一方、 CCN3 は様々な間葉組織において CCN2 と機能的に拮抗する事が知られている²⁷⁻²⁹。CCN2 が血小板に含まれる事は既に知られており^{15,16}、CCN2 と PRP は共に関節や骨組織を再生 する^{12,13,18,19}。しかし、PRP が RA を改善²³⁾する一方で、最近の報告では、CCN2 が RA の発症を仲介する可能性がある事が示唆された³⁸。この一見矛盾する所見から、CCN2 だ けでなく、その拮抗因子 CCN3 も血小板に含まれているかどうかの解析に進んだ。

ウェスタンブロッティング解析において、CCN2 は血小板に含まれるが巨核球には含ま れない事が示された。興味深い事に、同様の知見が CCN3 でも認められた(図 3)。これら のデータは血小板機能における CCN2 と CCN3 の共同的役割や、CCN2 と同様に血小板中 の CCN3 が外部から供給されている事を示唆する。

4. 血小板に存在しない CCN ファミリーメンバー

CCN4の骨形成機能が近年報告され ³⁹、CCN6 は pseudorheumatoid dysplasia (PPD) の原因遺伝子として ⁴⁰、石灰化組織においてそれぞれの役割を演ずる。また、線維性組織 リモデリングへの関与^{25,26,41}も示されており、ECM 産生を増強する分子機能を考慮すると、 これら二つのメンバーが血小板中に存在する事も想定しうる。しかし我々の研究では、ウ ェスタンブロッティング解析で、巨核球の分化段階に関係なくこれらのタンパク質は血小 板、巨核球のいずれにおいても検出閾値以下であった。なお、rCCN4、rCCN6 タンパク質 からは明確なシグナルを確認できたことから、用いた抗体は正常に作用しており、解析が 正しく行われた事は明らかである(図 4)。

5. 緩やかな分化誘導条件下での MEG-01 にも検知されない CCN2、CCN3

更に CCN2 と CCN3 が巨核球により産生されていない事を確認するために、ATRA、 VPA³⁴⁾による長期誘導プロトコル(図 5A)を用いて MEG-01 細胞の分化誘導を行った。 VPA 誘導培養ではより多くの CD41 細胞が産生され、血小板様粒子形成を伴う高分化細胞 形態を示した(図 5B、C)。しかしながら、ここでも前述の aphidicolin による結果と同様 に CCN2 および CCN3 産生を示すシグナルは認められなかった(図 5D、E)。なお生物学 的意義は不明であるが、興味深い事に、長期培養により 6 アクチンの質的な変化(小分子 化)が認められる。

6. 巨核球系細胞における CCN1 と CCN5 mRNA の発現

ウェスタンブロッティング解析において、MEG-01 および CMK 細胞で CCN1 と CCN5 が検出されたので、リアルタイム PCR によっても全 CCN ファミリーメンバーの発現を評 価した。その結果、aphidicolin による MEG-01 細胞の分化誘導の後、CCN1 mRNA の明 確な発現を検出した(図 6)。CCN5 mRNA 発現は PCR によってかろうじて検出可能であ ったが、定量限界値以下であった(データ省略)。なお予想通り、他の CCN ファミリーメ ンバーの mRNA 発現は巨核球細胞で検出されなかった。これらの結果はタンパク質レベル での解析結果と符合するものである。

7. マウス骨髄巨核球における CCN1 と CCN5 の存在

実際に、*in vivo*において CCN1 と CCN5 が巨核球で産生されているかどうかを確認す るため、正常マウスの骨髄細胞から塗抹標本を作製し、免疫組織学的に分析を行った。こ れらのサンプル中の巨核球は通法の May-Gruenwald-Giemsa 染色により確認可能であっ た。またいくつかの巨核球は platelet ribbon(血小板前駆体)を形成する大きな構造体と して観察された(図7)。マウス CCN1 または CCN5 に対する特異的抗体を用いた免疫蛍 光染色では、巨核球における特異的なシグナルを認めた(図7A、B)一方で、骨髄中のそ の他の細胞に対してそれは観察されなかった。さらに、巨核球の約70%において、CCN1 と CCN5 の共局在を認めた(図7C)。対照実験として、抗 CCN2、CCN3 抗体を用いた 同様の分析を行ったところ、いずれも巨核球でのシグナルは認められなかった。注目すべ き事に、造血幹細胞⁴⁰と考えられる小さな球状細胞において CCN3 に陽性のシグナルが確 認された(図7D)。これらの知見は巨核球で CCN1、CCN5 が産生され、最終的に血小板 の中へ被包される事を示している。

8. MEG-01 初期分化段階の培養上清による間葉系細胞における CCN2 発現誘導

血小板は能動的なエンドサイトーシスを行うため、CCN2 と CCN3 が外部から取り込ま れていると考える事は合理的である。CCN2、CCN3 は共に巨核球細胞に存在していなかっ たため、我々は同じ環境内での他の生産者を求め、骨髄細胞中に CCN3 陽性細胞を見出し た。一方で、CCN2 陽性細胞は存在しなかった(図 7)。しかし以前の研究で、末梢血由来 血液幹細胞から得た前期分化段階の巨核球前駆細胞が、間葉系細胞に対して強い CCN2 産 生を誘導する可溶性因子を放出し、その後 CCN2 は血小板に取り込まれる事が示された⁴²⁾。 そこで、次に MEG-01 細胞を用いた実験系を用い、MEG-01 の前期(1 日目と 2 日目)分 化段階の培養上清が間葉系 HCS-2/8 細胞の CCN2 遺伝子発現を誘導するかどうかを検討し た。その結果、これら培養上清は HCS-2/8 細胞の CCN2 遺伝子発現を有意に増強した。一 方で CCN3 遺伝子発現の有意な上昇は認めなかった(図 8)。二つの異なる実験系で得られ た同等の知見は、巨核球が CCN2 を過剰生産するように間葉系細胞を刺激し、血小板がその CCN2 を取り込む可能性を示している。

9. 血小板を模倣した CCN ファミリーカクテルが軟骨細胞に与える効果

血小板に含まれる CCN ファミリータンパク質の組み合わせが血小板そのもの同様、軟骨 細胞を組織再生へ向かわせる事ができるか検討するため、ヒト軟骨様細胞である HCS-2/8 細胞³⁵⁾を用いた *in vitro*モデルを使用した。この *in vitro*モデルにおいて、50 ng/mlの CCN2 単独添加により軟骨 ECM 合成が増強される事が知られており、今回の実験においてもそれ は再現された。そして今回、血小板に共存することが明らかとなった 4 つの CCN ファミリ ーメンバーの組み合わせもまた、アグリカンおよび II 型コラーゲン遺伝子発現をより強力 に増強した (図 9)。これらの結果は、血小板に含まれる CCN ファミリーメンバーが軟骨 細胞自身の再生応答を誘導する可能性を強く示唆している。

考察

組織再生プロセスは通常、発生過程中に生じる一連の生物学的事象を模倣しており、実 際、骨折時には軟骨内骨化過程が繰り返される事が広く知られている。それゆえに、軟骨 や骨の再生に中心的な役割を果たす分子は、基本的に軟骨や骨の発生において働くものと 同じである。そういった分子の代表が、軟骨内骨化のステップ全てを増強し、軟骨や骨の 再生を促進する CCN2 である。また、CCN2 のみならず他のファミリーメンバーも軟骨内 骨化過程に出現するため、軟骨内骨化や軟骨/骨再生過程の両方に関与していると考えられ る。この点において、本研究で観察された事実は非常に重要である。我々は、血小板に CCN4 と CCN6 が存在しなかったのに対し、既に存在する事が知られている CCN2 に加えて CCN1、CCN3 および CCN5 が含まれる事を初めて明らかとした。興味深い事に、血小板 に含まれる4つのCCNファミリーメンバーは成長板軟骨増殖域のそれと全く同等であった (表 2)。すなわち、血小板は損傷を受けた軟骨や骨を再構成するために必要な CCN ファ ミリーメンバーを最適な組成で供給する事ができる。また、活性化された血小板は放出さ れた CCN1、2、3、および5にフィブリンマトリックスを供給することで、これらの ECM への貯蔵を可能にする。一方 CCN4 についてはいくつかの報告で線維化および創傷治癒へ の CCN4 の関与が示唆されているものの血小板では認められず、血小板による組織修復初 期段階において CCN4 の関与は僅かだと考えられる。これらの知見を総合すれば、血小板 が軟骨再生のための理想的な CCN ファミリーメンバーカクテルを含んでいると結論づけ られる。本研究はまた、硬組織再生治療への PRP の有用性を支持するための科学的根拠を 提示した。古くから口腔外科の分野では、PRP は抜歯および他の外科処置後の骨欠損に対

する、安全で効果的な組織再生手段として使用されてきた 43)。そして近年、PRP の有用性 は全身的な臨床分野へ多様に展開されており、特に関節組織再生のための整形外科的応用 は臨床医の関心を集めている 44,45)。

今回得られた結果に基づき、4 つの CCN ファミリーメンバーによる、軟骨/骨再生促進の ためのコラボレーションシステムを考察する。組織損傷後直ちにこれら 4 つのメンバーは 血小板から供給され、再生プロセスが開始する。最初、CCN2 は他の増殖因子との相互作 用のもと軟骨細胞の増殖、活発な ECM 産生を促進するが、それと同時に CCN3 は過剰な コラーゲン再生を抑制し、CCN1 は細胞老化を誘導する事で再生応答を終了させる。また、 CCN1 は ADAMTS4 の阻害分子として軟骨損傷に対抗し、組織再生において軟骨を保護す る。この 3 つの CCN ファミリーメンバー間のコラボレーションシステムは、線維症へと繋 がる持続的な ECM 蓄積を起こす事なく、正常な組織再生を遂行するために重要であると推 定される。CCN5 の創傷治癒における機能はあまり知られていないが、CCN5 の過剰発現 が心肥大および線維症を減少させる事が報告されており 4.370、ECM 蓄積への CCN5 の調節 的機能を示唆している。また軟骨細胞分化に対する CCN5 の効果を示す報告もあり ⁶、成 長板と血小板に含まれる CCN ファミリーメンバー群の生物学的意義をより明確にするた め、CCN5 の機能に関する更なる研究が必要とされる。

また、どのように CCN3 が血小板へ取り込まれるのかという点は実に興味深い。CCN2 の場合、巨核球が間葉細胞の CCN2 放出を促すような可溶性因子を産生し、血小板がエン ドサイトーシスを介して CCN2 を取り込む事を示した⁴²⁾。実際に本研究でも、MEG-01 に よって産生される可溶性因子によって間葉細胞の CCN2 遺伝子発現が誘導される事を確認 した。この見解は low-density lipoprotein receptor-relate protein 1 (LRP-1) によるエン ドサイトーシスを介して CCN2 が細胞内に取り込まれる⁴⁸⁾という最近の研究により、さら に裏付けられる。未だ CCN3 が LRP-1 と相互に作用するという報告はないが、CCN3 が CCN2 と直接的に結合する⁴⁹⁾事が証明されているため、CCN2 共存下での LRP-1 を介した CCN3 のエンドサイトーシスによる取り込みは、少なくとも理論上可能である。そして次 の疑問は、骨髄中のどの細胞が血小板へ CCN3 を供給しているのかという事である。この 点に関しては、造血幹細胞は CCN3 を産生すると知られており、実際それと推測される球 状の細胞を骨髄中で確認できた(図 7D)。こういった事実は血小板に存在する CCN3 の起源、 および想定される取り込み経路を、各分子の役割とともに示す。

本研究では、血小板に含まれる4つのCCNファミリーメンバーが様々な経路を介して取 り込まれ、血小板による軟骨および組織再生過程において共同して働く事を示す所見を得 た。我々は以前、結合組織の修復や再生におけるCCN2の有用性を報告したが、4つのCCN

9

ファミリーメンバーの組み合わせはマトリセルラータンパク質カクテルとして、組織再生 促進のためのより理想的な治療薬と成り得る。実際に、図9のデータはこの概念を裏付け ている。しかし4つの CCN ファミリーメンバーは血小板内で等量含まれるとは考えにくい ので、血小板と同様の割合の 4CCN ファミリーメンバーからなる他のカクテルを作製する 事により、更なる効果をもたらす事が期待される。より正確に血小板を模倣した CCN ファ ミリーカクテルを作製するため、血小板中 CCN ファミリーメンバーの定量的比較を現在進 めている。それに続く今後の *in vitro* および *in vivo* での橋渡し研究は、究極の骨/軟骨再生 カクテルを調製するためのレシピの確立につながる可能性をも秘めている。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なるご指導とご高閲を受け賜りました岡山大学大学院医歯 薬学総合研究科ロ腔生化学分野久保田聡教授ならびに歯学部先端領域研究センター滝川正 春教授、そして主任教授であります岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野上 岡寛教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、多くのご援助、ご 協力を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科ロ腔生化学分野の諸先生方に厚く御 礼申し上げます。

参考文献

- Brigstock, D.R., Goldschmeding, R., Katsube, K., Lam, S.C.T., Lau, L.F., Lyons, K., Naus, C., Perbal, B., Riser, B., Takigawa, M., & Yeger, H. (2003) Proposal for a unified CCN nomenclature. Mol. Pathol. 56, 127-128.
- 2. Perbal, B., & Takigawa, M. (2005) CCN Protein -A new family of cell growth and differentiation regulators-, pp. 1-311, Imperial College Press, London, UK.
- Leask, A., & Abraham, D.J. (2006) All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. J. Cell Sci. 119, 4803-4810.
- 4. Jun, J-I., & Lau, L.F. (2011) Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. Nat. Drug Discov. 10, 945-963.
- Kubota, S., & Takigawa, M. (2012) CCN in *Encyclopedia of Signaling Molecules* (Sangdun Choi ed) pp. 273-281, Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Kawaki, H., Kubota, S., Suzuki, A., Lazar, N., Yamada, T., Matsumura, T., Ohgawara, T., Maeda, T., Perbal, B., Lyons, K.M. & Takigawa, M. (2008) Cooperative regulation of chondrocyte differentiation by CCN2 and CCN3 shown by a comprehensive analysis of the CCN family proteins in cartilage. J. Bone Miner. Res. 23, 1751-1764.
- Takigawa, M., Nakanishi, T., Kubota, S., Nishida, T. (2003) Role of CTGF/HCS24/ecogenin in skeletal growth control. J. Cell. Physiol. 194, 256-266.
- Takigawa, M. (2013) CCN2: a master regulator of the genesis of bone and cartilage.
 J. Cell Commun. Signal. 7, 191-201.
- Maeda-Uematsu, A., Kubota, S., Kawaki, H., Kawata, K., Miyake, Y., Hattori, T., Nishida, T., Moritani, N., Lyons, K.M., Iida, S. & Takigawa, M. (2014) CCN2 as a novel molecule supporting energy metabolism of chondrocytes. J. Cell. Biochem. 115, 854-865.
- 10. Ivkovic, S., Yoon, B.S., Popoff, S.N., Safadi, F.F., Libuda, D.E., Stephenson, R.C.,

Daluiski, A., Lyons, K.M. (2003) Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. Development 130, 2779-2791.

- Kubota, S., & Takigawa, M. (2015) Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. Clin. Sci. 128, 181-196.
- Kikuchi, T., Kubota, S., Asaumi, K., Kawaki, H., Nishida, T., Kawata, K., Mitani,
 S., Tabata, Y., Ozaki, T., & Takigawa, M. (2008) Promotion of bone regeneration by
 CCN2 incorporated into gelatin hydrogel. Tissue Eng. Part A 14, 1089-1098
- Abd El Kader, T., Kubota, S., Nishida, T., Hattori, T., Aoyama, E., Janune, D., Hara, E. S., Ono, M., Tabata, Y., Kuboki, T. & Takigawa M. (2014) The regenerative effects of CCN2 independent modules on chondrocytes in vitro and osteoarthritis models in vivo. Bone 59, 180-188
- Itoh, S., Hattori, T., Tomita, N., Aoyama, E., Yutani, Y., Yamashiro, T. & Takigawa,
 M. (2013) CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF)
 has anti-aging effects that protect articular cartilage from age-related
 degenerative changes. PLoS One 8, e71156.
- Kubota, S., Kawata, K., Yanagita, T., Doi, H., Kitoh, T., & Takigawa, M. (2004) Abundant retension and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. J. Biochem. 136, 279-282
- Cicha, I., Garlichs, C.D., Daniel, W.G., & Goppelt-Struebe, M. (2004) Activated human platelets release connective tissue growth factor. Thromb Haemost. 91, 755-760.
- Nurden, A.T. (2011) Platelets, inflammation and tissue regeneration. Thromb. Haemost. 105 Suppl 1, S13-33.
- 18. De Pascale, M.R., Sommese, L., Casamassimi, A. & Napoli, C. (2015) Platelet

derivatives in regenerative medicine: an update. Transfus. Med. Rev. 29, 52-61.

- Kitoh, H., Kitakoji, T., Tsuchiya, H., Katoh, M. & Ishiguro, N. (2007) Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. Bone 40, 522-528.
- Anjayani, S., Wirohadidjojo, Y.W., Adam, A.M., Suwandi, D., Seweng, A. & Amiruddin, M.D. (2014) Sensory improvement of leprosy peripheral neuropathy in patients treated with perineural injection of platelet-rich plasma. Int. J. Dermatol. 53, 109-113.
- 21. Xie, X., Zhang, C. & Tuan, R.S. (2014) Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. Arthritis Res. Ther. 16, 204.
- 22. Laudy, A.B., Bakker, E.W., Rekers, M. & Moen, M.H. (2014) Efficacy of platelet-rich plasma injections in osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. Br. J. Sports Med. 49, 657-672
- 23. Lippross, S., Moeller, B., Haas, H., Tohidnezhad, M., Steubesand, N., Wruck, C.J., Kurz, B., Seekamp, A., Pufe, T. & Varoga, D. (2011) Intraarticular injection of platelet-rich plasma reduces inflammation in a pig model of rheumatoid arthritis of the knee joint. Arthritis Rheum. 63, 3344-3353.
- Figueroa, D., Figueroa, F., Calvo, R., Vaisman, A., Ahumada, X. & Arellano, S. (2015) Platelet-rich plasma use in anterior cruciate ligament surgery: systematic review of the literature. Arthroscopy 31, 981-988.
- Colston, J.T., de la Rosa, S.D., Koehler, M., Gonzales, K., Mestril, R., Freeman, G.L., Bailey, S.R., & Chandrasekar, B. (2007) Wnt-induced secreted protein-1 is a prohypertrophic and profibrotic growth factor. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 293, H1839-1846
- Königshoff, M., Kramer, M., Balsara, N., Wilhelm, J., Amarie, O.V., Jahn, A., Rose,
 F., Fink, L., Seeger, W., Schaefer, L., Günther, A., & Eickelberg, O. (2009)

WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. J Clin Invest. 119, 772-787

- 27. Riser, B.L., Najmabadi, F., Perbal, B., Peterson, D.R., Rambow, J.A., Riser, M.L., Sukowski, E., Yeger, H., & Riser, S.C. (2009) CCN3 (NOV) is a negative regulator of CCN2 (CTGF) and a novel endogenous inhibitor of the fibrotic pathway in an in vitro model of renal disease. Am. J. Pathol. 174, 1725-1734
- Borkham-Kamphorst, E., van Roeyen, C.R., Van de Leur, E., Floege, J., & Weiskirchen, R. (2012) CCN3/NOV small interfering RNA enhances fibrogenic gene expression in primary hepatic stellate cells and cirrhotic fat storing cell line CFSC. J. Cell Commun. Signal. 6, 11-25
- Leask, A. (2009) Yin & Yang: CCN3 inhibits the pro-fibrotic effects of CCN2. J.
 Cell Commun. Signal. 3, 161-162
- Jun, J.I., & Lau, L.F. (2010) The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. Nat. Cell Biol. 12, 676-685.
- 31. Chijiiwa, M., Mochizuki, S., Kimura, T., Abe, H., Tanaka, Y., Fujii, Y., Shimizu, H., Enomoto, H., Toyama, Y. & Okada, Y. (2015) CCN1 (Cyr61) Is Overexpressed in Human Osteoarthritic Cartilage and Inhibits ADAMTS-4 (Aggrecanase 1) Activity. Arthritis Rheumatol. 67, 1557-1567.
- 32. Ogura, M., Morishima, Y., Ohno, R., Kato, Y., Hirabayashi, N., Nagura, H., & Saito,
 H. (1985) Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line,
 MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. Blood 66, 1384-1392
- 33. Yasui, K., Furuta, R.A., Matsumoto, K., Tani, Y., & Fujisawa, J. (2005) HIV-1derived self-inactivating lentivirus vector induces megakaryocyte lineage-specific gene expression. Microbes Infect. 7, 240–247

- 34. Schweinfurth, N., Hohmann, S., Deuschle, M., Lederbogen, F., & Schloss, P. (2010) Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01. Platelets. 21, 648-657.
- 35. Takigawa, M., Tajima, K., Pan, H.O., Enomoto, M., Kinoshita, A., Suzuki, F., Takano, Y., Mori, Y. (1989) Establishment of a clonal human chondrosarcoma cell line with cartilage phenotypes. Cancer Res. 49:3996-4002.
- Kubota, S., Eguchi, T., Shimo, T., Nishida, T., Hattori, T., Kondo, S., Nakanishi, T., & Takigawa, M. (2001) Novel mode of processing and secretion of connective tissue growth factor/ecogenin (CTGF / Hcs24) in chondrocytic HCS-2/8 cells. Bone 29, 155-161
- 37. Yoon, P.O., Lee, M.A., Cha, H., Jeong, M.H., Kim, J., Jang, S.P., Choi, B.Y., Jeong, D., Yang, D.K., Hajjar, R.J., & Park, W.J. (2010) The opposing effects of CCN2 and CCN5 on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis. J. Mol. Cell. Cardiol. 49, 294–303
- Nozawa, K., Fujishiro, M., Kawasaki, M., Yamaguchi, A., Ikeda, K., Morimoto, S., Iwabuchi, K., Yanagida, M., Ichinose, S., Morioka, M., Ogawa, H., Takamori, K., Takasaki, Y. & Sekigawa, I. (2013) Inhibition of connective tissue growth factor ameliorates disease in a murine model of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 65, 1477-1486.
- 39. Maeda A, Ono M, Holmbeck K, Li L, Kilts TM, Kram V, Noonan ML, Yoshioka Y, McNerny EM, Tantillo MA, Kohn DH, Lyons KM, Robey PG, Young MF. (2015) WNT1-induced Secreted Protein-1 (WISP1), a Novel Regulator of Bone Turnover and Wnt Signaling. J. Biol. Chem. 290, 14004-14018.
- 40. Hurvitz, J.R., Suwairi, W.M., Van Hu, IW., El-Shanti, H., Superti-Furga, A., Roudier, J., Holderbaum, D., Pauli, R.M., Herd, J.K., Van Hul, E.V., Rezai-Delui,

H., Legius, E., Le Merrer, M., Al-Alami, J., Bahabri, S.A., & Warman, M.L. (1999) Mutations in the CCN gene family member WISP3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia. Nat Grnet. 23, 94-8.

- Batmunkh, R., Nishioka, Y., Aono, Y., Azuma, M., Kinoshita, K., Kishi, J., Makino, H., Kishi, M., Takezaki, A., & Sone, S. (2011) CCN6 as a profibrotic mediator that stimulates the proliferation of lung fibroblasts via the integrin 81/focal adhesion kinase pathway. J. Med. Invest. 58, 188-96
- 42. Sumiyoshi, K., Kubota, S., Furuta, R.A., Yasui, K., Aoyama, E., Kawaki, H., Kawata, K., Ohgawara, T., Yamashiro, T., & Takigawa, M. (2010) Thrombopoietic-mesenchymal interaction that may facilitate both endochondral ossification and platelet maturation via CCN2. J. Cell Commun. Signal. 4, 5-14
- Marx, R.E. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J. Oral Maxillofac. Surg. 62, 489-496
- 44. Mishra, A., Harmon, K., Woodall, J., & Vieira, A. (2012) Sports medicine applications of platelet rich plasma. Curr. Pharm. Biotechnol. 13, 1185-1195
- 45. Wang, S.Z., Rui, Y.F., Tan, Q., & Wang, C. (2013) Enhancing intervertebral disc repair and regeneration through biology: platelet-rich plasma as an alternative strategy. Arthritis Res. Ther. 15, 220
- Murphy-Ullrich, J.E., Sage, E.H. (2014) Revisiting the matricellular concept. Matrix Biol. 2014 37, 1-14.
- Sage, E.H. (2003) Purification of SPARC/osteonectin. Curr Protoc Cell Biol. Chapter 10, Unit 10.11.
- Kawata, K., Kubota, S., Eguchi, T., Aoyama, E., Moritani, N.H., Kondo, S., Nishida, T., & Takigawa, M. (2012) Role of LRP1 in transport of CCN2 protein in chondrocytes. J. Cell Sci. 125, 2965-2972
- 49. Hoshijima, M., Hattori, T., Aoyama, E., Nishida, T., Yamashiro, T., & Takigawa, M.

(2012) Roles of heterotypic CCN2/CTGF-CCN3/NOV and homotypic CCN2-CCN2 interactions in expression of the differentiated phenotype of chondrocytes. FEBS J. 279, 3584-3597

 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. (2011) Differential roles of CCN family proteins during osteoblast differentiation: Involvement of Smad and MAPK signaling pathways. Bone 49, 975-989.

表題脚注

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第46回日本結合組織学会学術大会・第61回マトリックス研究会大会合同学術大会(2014

年6月、名古屋)

第6回日本 CCN ファミリー研究会(2014 年 8 月、岡山)

第87回日本生化学会大会(2014年10月、京都)

第35回岡山歯学会総会·学術大会(2014年10月、岡山)

第56回日本生化学会中国·四国支部例会(2015年5月、島根)

第33回日本骨代謝学会学術集会(2015年7月、東京)

図の説明

図1 In vitro における巨核球 MEG-01 細胞の分化

(A)高用量(0.4 µg/ml)の aphidicolinを用いた急速分化誘導実験のプロトコル。(B) Aphidicolin処理中における、血小板形成に必要な転写因子である Nfe2の発現。(C)血小 板放出に中心的な役割を果たす 81-tubulin遺伝子の発現。パネル B および C において、 GAPDH(内部標準)に対する相対的な遺伝子発現レベルをリアルタイム RT-PCR によっ て評価した。2つのサンプルから得られた結果の平均値と標準偏差を示す。横軸の数字は aphidicolin添加後の細胞培養期間の日数を示す。

図2 血小板および巨核球に存在する CCN1 と CCN5

血小板(図左)および巨核球様細胞(図右)にそれぞれ存在する CCN1(A)および CCN5 (B)を示す。リコンビナント CCN1(rCCN1:15 ng)と CCN5(rCCN5:10 ng)は CCN1 と CCN5の抗原抗体反応の陽性対照として用いた(図上)。同じメンブレンにおける内部標 準 8 アクチンの再検出を図下に示す。画像上部の数字は細胞培養期間を表している。分子 量マーカーの位置を画像左側に kilodalton で、特異的なシグナルを右側に矢印でそれぞれ 示す。

図 3 血小板に存在する CCN2 と CCN3

それぞれ、血小板(図左)および巨核球細胞(図右)における CCN2(A)および CCN3 (B)のウェスタンブロッティング解析を示す。リコンビナント CCN2(rCCN2:20 ng) と CCN3(rCCN3:10 ng)は CCN2および CCN3検出のための陽性対照として用いた(図 上)。同じメンブレンにおける内部標準8アクチンの再検出を図下に示す。画像上部の数字 は細胞培養期間を表す。分子量マーカーの位置を画像左側に kilodalton で、特異的なシグ ナルを右側に矢印でそれぞれ示す。

図 4 血小板に存在しない CCN4 と CCN6

それぞれ、血小板(図左)および巨核球細胞(図右)における CCN4(A)および CCN6(B)のウェスタンブロッティング解析を示す。リコンビナント CCN4(rCCN4:5 ng)と CCN6(rCCN6:20 ng)は陽性対照として用いた(図上)。同じメンブレンにおける内部標準8アクチンの再検出を図下に示す。rCCN4、rCCN6の明確なシグナルは検出された。分子量マーカーの位置を画像左側に示す。

図 5 MEG-01 細胞の緩徐な分化誘導における CCN2 と CCN3 産生状況の検討

(A) VPA または ATRA による緩やかな分化誘導のプロトコルを示す。B) フローサイ トメトリー解析において、VPA 処理を行う事で経時的に CD41 陽性細胞数が上昇した(正 方形の点の実線)。コントロールと ATRA 処理を行ったデータについてはそれぞれ、円形の 点の実線と三角形の点の点線で示す。(C) VPA 処理 20 日後の MEG-01 細胞の位相差顕微 鏡像を示す。Scale bar:50 µm (D、E) VPA 処置をした MEG-01 からの細胞抽出液を用 いた、抗 CCN2 抗体 (D)、抗 CCN3 抗体 (E) によるウェスタンブロッティング解析の結 果を示す。図 3 と同様、陽性対照として rCCN2 および rCCN3 を用いた。図上部の数字は 細胞培養期間を表す。同じメンブレンにおける内部標準 8 アクチンの再検出を図下に示す。 分子量マーカーの位置は画像左側に示す。

図 6 MEG-01 細胞における CCN1 の遺伝子発現

MEG-01 細胞における CCN1 遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR にて定量化した。 GAPDH (内部標準)に対する相対的な遺伝子発現レベルを表す。横軸の数字は、aphidicolin 添加後の細胞培養期間を示す。

図7 マウス骨髄から採取した巨核球に存在する CCN ファミリーメンバー

マウス骨髄から塗抹標本の試料を作製し、抗 CCN1 抗体(A)、抗 CCN5 抗体(B)を用 いて免疫蛍光染色、および DAPI による核対比染色により解析した。明確な CCN1 シグナ ルは巨核を有する大きな巨核球にのみ観察される(A)。一方で、CCN5 シグナルは巨核球 で認められ、また、骨髄内の別の細胞群でも認められる(B)。同細胞内での CCN1 と CCN5 の共局在も観察された(C)。対照的に、抗 CCN2 抗体、抗 CCN3 抗体に対する特異的なシ グナルは巨核球で検出されなかった(D)。また、CCN3 陽性の球状細胞(矢印で示す)の 存在が注目される。Scale bar: 50 µm。

図 8 HCS-2/8 細胞における CCN2 および CCN3 遺伝子発現への MEG-01 培養上清の影響

(A)実験プロトコル。初期分化段階(0、1または2日目)のMEG-01培養上清を回収し、培養中のHCS-2/8細胞へ添加した。12時間後細胞を回収し、RNAをリアルタイム
 RT-PCRによって解析した。3つの独立したサンプルからの平均値を標準偏差とともに示す。
 Asterisk(*)はp<0.01における対照群(RPMI)に対する統計的有意差を示す。

図 9 血小板を模倣した CCN ファミリーカクテルによる HCS-2/8 での軟骨マトリックス 成分遺伝子の発現増強

20

ヒト軟骨細胞株 HCS-2/8 を図に示す CCN ファミリータンパク質または BSA (コントロ ール) で 12 時間処理し、アグリカン (A) および II 型コラーゲン (B) 遺伝子発現を評価 した。9 つの独立したサンプルからの平均値と標準偏差を示す。Asterisk (*) は p< 0.05 における対照群 (BSA) に対する統計的有意差を示す。

図 10 血小板含有 CCN ファミリーメンバーの軟骨再生における共同的作用とそれらの獲 得経路

得られた知見に基づくと、CCN1、CCN5 は巨核球によって産生され、血小板新生時に内因的に血小板へ供給されると推定される。これとは対照的に CCN2 は巨核球からの可溶性因子による刺激のもと間葉系(mesenchymal: M)細胞から、また CCN3 は造血系

(haematopoietic: H) 細胞からそれぞれ産生され、血小板がそれらを取り込むと考えられる。血小板におけるこれらの CCN ファミリーメンバーは共同して働き、形成不全や過形成を起こすことなく損傷後の必要十分な軟骨再生を促す。