

## 平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		TAKIGAWA MASA HARU					
①研究代表者氏名		滝川 正春		②所属研究機関・部局・職 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授			
③研究課題名	和文	新たな組織再生因子リジェネリンとしての CTGF の役割解明と再生医歯工学的応用					
	英文	The role of CTGF as a novel tissue-regenerating factor, regenerin, and its application for medical and dental tissue engineering					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		21,300	19,400	20,000	19,200	11,200	91,100
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
滝川 正春	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授	生化学・分子細胞生物学	細胞生物学的研究、組織学的研究と研究総括				
久保 田聡	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教授	生化学・分子生物学	分子細胞生物学的研究				
服部 高子	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手	分子細胞生物学 分子遺伝学	分子生物学的研究と遺伝子変異動物を用いた動物実験				
山本 照子	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授	歯科矯正学	頭蓋・顔面の発生、成長・発育、再生に関する研究				
山合 友一郎	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手	口腔解剖学 発生学	発生学、組織学的研究				
椋代 義樹	岡山大学・歯学部・教職員	分子細胞生物学	分子細胞生物学的研究				
小守 壽文	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授	発生分化機能再 建学	遺伝子変異マウスの作製と組織学的解析				
田畑 泰彦	京都大学・再生医科学研究所・教授	生体組織工学	CTGF の徐放性担体等の生体組織工学的研究				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>ヒト軟骨細胞様細胞株よりクローニングした結合組織成長因子/肥大軟骨細胞特異的遺伝子産物 24(CTGF/Hcs24)は CCN 遺伝子ファミリーに属するタンパク質である。我々は、この CTGF が生理的には内軟骨性骨化促進因子として機能していることを明らかにしつつあるが、本研究では、1) この CTGF の骨格の成長発育における役割の全容を解明すると共に、本因子が新たな組織再生・修復因子リジェネリンとして機能していることを明らかにする。即ち、骨格に加え種々の組織の再生への応用の可能性を分子細胞生物学的、遺伝子工学的、生体組織工学的手法を駆使して追求する。2) なお、その過程で、CTGF の多機能性と特徴的な4つのドメイン構造との間の機能—構造連関を明らかにする。3) また、遺伝子発現制御機構を解明し、遺伝子産物そのものを用いるのではなく、その遺伝子発現を制御することにより、組織再生を目指す手段を探索する。4) さらに、CTGF が産生・分泌されてから作用発現に至るまでの組織再生の“場”における作用機構の分子基盤を解明し、再生医歯工学的応用へと結びつける。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

本研究主題へのアプローチ法として、「当初の研究目的」の項に記載した、サブテーマ1)を最終目標と位置付け、サブテーマ2) - 4)をそのためのメカニズム解明の課題と設定している。以下、それぞれについて、これまで得られた知見ならびに今後の研究進展に有用と考えられる新たな解析ツールについて記す。

- 1) CTGF/CCN2/Hcs24(以下 CTGF と略す)の組織再生・修復因子リジネリンとしての機能解明と工学との連携
- マウスの胎仔の発育過程 (Yammi, J. Bone Miner. Metab., 2005)、骨延長術後の骨再生過程(Kadota, JBMM, 2003)、抜歯後の抜歯創治癒過程(Kanyama, Arch. Oral Biol., 2003)での CTGF の発現を調べると肥大軟骨細胞以外の増殖軟骨細胞や幼弱な骨芽細胞、損傷分の歯根膜細胞、血管内皮細胞など種々の細胞で発現が見られ、また、神経、腎でも発現が見られた。したがって、CTGF は、内軟骨性骨化促進因子という生理的な役割に加え、種々の組織、特に骨格系組織の修復・再生の際に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。
  - ラット実験的変形性関節症 (Nishida, J. Bone Miner. Res., 2004) およびヒト変形性関節症(Omoto, Osteoarthritis & Cartilage, 2004)で軟骨細胞クラスターに CTGF の発現が見られた知見を、上記の知見から軟骨修復・再生に働いているものと想定し、リコンビナント CTGF(rCTGF)を徐放性担体であるゼラチンハイドロゲルとともに、ラット実験的変形性関節症やドリルによる関節軟骨全層欠損に対し局所投与することにより、関節軟骨の再生がみられることを明らかにした (Nishida, J. Bone Miner. Res., 2004)。同様に CTGF をゼラチンハイドロゲルとともにマウス頭蓋冠骨欠損モデルに投与すると骨再生の促進効果が認められた。さらに、M-CSF が CTGF と協調して関節軟骨細胞の再生に関与することを示唆する知見を得た (Nakao, Bone, 2005)。CTGF が培養系で成長軟骨細胞は肥大化・石灰化させるが、関節軟骨細胞は肥大化・石灰化させないという我々の以前の報告と併せ考えると、CTGF は骨、軟骨系組織の各組織を本来あるべき特徴を維持しつつ再生させる仮想因子である“リジネリン”作用があることを示している。また、デキサメサゾンが CTGF の転写レベルの誘導を介して軟骨細胞の分化を促進することを示唆する知見も得た (Kubota, Bone, 2004)。
  - CTGF がウサギ骨髄間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化促進 (Nishida, J. Bone Miner. Res., 2004) するだけでなく、骨芽細胞への分化も促進する可能性を示唆する知見を得た。また、CTGF はヒト骨髄間葉系幹細胞および歯髄間葉系未分化細胞のヒドロキシアパタイトへの接着を強力に促進した (2005年 IADR, 2004年 COAST Symposium で発表)。
  - 創傷後の組織修復・再生の初発現象である血液凝固に注目し、血小板の CTGF 含量を調べたところ、大量に含まれていること、血液凝固とともに血小板から放出されることが判明した (Kubota, J. Biochem., 2004)。
  - なお、今後の解析ツールとして CTGF ノックアウトマウスは有用ではあるが、内軟骨性骨化異常による胸郭の低形成のため出生直後に死亡するので、その胎仔から軟骨細胞と骨髄間葉系幹細胞を培養する方法を確立した。
- 2) 4つのドメイン構造と機能との関連
- CTGF の各ドメインの機能解析を行うため、各ドメインに特異的なモノクローナル抗体を調製した (Minato, J. Biochem., 2004)。また、これらの抗体を用いて各ドメインタンパク質を特異的に測定できる ELISA システムを開発した(Kawaki, DNA Cell Biol., 2003)。
  - CTGF の各ドメインの組み換え体タンパク質を調製し、その生物学的作用を調べたところ、軟骨細胞のプロテオグリカン合成促進作用はTSP1 ドメインとCTドメインが活性が強く、血管内皮細胞の接着にはVWCとTSP1 が強力な作用を有することが明らかとなった (3rd International CCN Workshopで発表)。
- 3) CTGF の遺伝子発現制御機構
- 我々が同定した新たな軟骨特異的エンハンサーである transcription enhancer dominant in chondrocytes (TRENDIC) に結合するタンパク質をヒト軟骨細胞株 HCS-2/8 細胞の cDNA の  $\lambda$  フェージタンパク発現ライブラリーからクローニングした (投稿準備中)。
  - 3'-非翻訳領域の mRNA 不安定化配列をその poly-A tail から 50-100 塩基のところと同定し、この cis-element に結合する 40-kDa のタンパク質の存在を明らかにした(Mukudai, J. Biol. Chem., 2005)。このタンパク質は CTGF の発現レベルの低い増殖軟骨細胞では多く、CTGF が高発現している肥大軟骨細胞では少なく、BMP 等で増殖軟骨細胞を肥大化させると減少することから、cis-element に結合して mRNA を不安定化させる trans-factor であると考えられる(Mukudai, J. Biol. Chem., 2005)。
  - ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞株 HCS-2/8 を低酸素下で培養すると CTGF の mRNA レベルが上昇すること、この上昇は転写誘導によるものではなく、mRNA の 3'-非翻訳領域の cis-element を介する安定性の増大によること、また、この element に 35KDa のタンパク質が結合することを見出した (Kondo, Oncogene, revise 中)。
- 4) 作用機構の分子基盤
- プロテオグリカンの一つであるパールカンが軟骨細胞に対する CTGF の作用発現に必須であること、また、パールカンの発現が成長軟骨細胞の分化の過程で肥大化に伴って減少することを見出した (Nishida, J. Cell. Physiol., 2003)。即ち、パールカンはパラクリン因子 CTGF の co-receptor であることが示唆された。また、低密度リポタンパク関連タンパク (LRP-1) が CTGF の受容体の一つであるとの報告があるので、軟骨細胞での発現と細胞分化との関連を調べたところ、パールカンと同様 CTGF の発現とは逆に肥大化に伴って消失した (H16年日本生化学会、H17年日本軟骨代謝学会で発表)。なお、CTGF が血管内皮細胞のバイグリカンの合成を抑えデコリンの合成を促進することも見出した (Kaji, BBRC, 2004)。
  - 細胞内情報伝達機構として、CTGF の軟骨細胞増殖促進作用は ERK を、プロテオグリカン促進作用は p38MAPK を介することは報告したが、新たに PKC が両者の上流に、JNK が PKC とは別経路で増殖と分化を促進すること、さらに、PI3K が PKB を介して終末分化に関与することが判明した (Yoshimichi, J. Cell. Physiol., 投稿中)。
- 以上を総括すると、当初の年次計画とはサブテーマにより相前後するものもあるが、全体としてほぼ順調に進行している。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

CTGF が *in vitro* だけでなく、*in vivo* で実際に関節軟骨の損傷を修復・再生させる作用があること、その作用発現には、工学的手法の導入、すなわち、アテロコラーゲンを担体としゼラチンハイドロゲルを徐放剤として使用することが極めて効果的であることが明らかとなった (Nishida, J. Bone Miner. Res., 2004) ことは本研究課題の目的の一つを達成したと言える知見である。担体としてコラーゲンを用いることは以前から用いられている手法であるが、ゼラチンハイドロゲルは様々な徐放時間を設定でき、また、様々な形状に形成できるので非常に有用なドラッグデリバリーシステムとなり得る。特に、CTGF は種々のマトリックス分子や成長因子類と結合する性質があることから、CTGF とゼラチンハイドロゲルの組み合わせは再生医療に極めて有用と言える。なお、この実験では組織学的に関節軟骨の性状を有した軟骨が再生されており、肥大化や石灰化が起こっていない。この点は極めて重要な知見で、従来、軟骨移植や他の成長因子を用いた関節軟骨再生実験ではしばしば“望まれない石灰化”が起こってしまう、いわば“副作用”が問題となっている。しかし、CTGF にはこのような副作用はみられない。すなわち、CTGF は血管に対しては血管新生作用、骨に対しては骨再生作用を示すだけでなく、同じ軟骨でも成長軟骨、関節軟骨をそれぞれ“あるべき姿”を保ちつつ再生させる作用を有することになる。現在、弾性軟骨に対しても弾性軟骨の特徴を増強する知見を得ているので、今後はそのメカニズムを追求する必要があると考えている。特に、我々は CTGF がマウス骨髄幹細胞の軟骨細胞への分化を促進することを見出したが、真に骨髄幹細胞の軟骨分化を促進したのか、すでにコミットされた細胞の軟骨分化を促進したのか、骨芽細胞への分化の可能性も含めて詳細に解明すれば今後の応用範囲が広がるのが期待される。

また、血小板中に高濃度の CTGF が存在することが明らかになったことは軟骨以外の血管に富む組織の再生の際にその初発段階で血小板由来の CTGF が重要な働きをしていることを示唆する重要な知見である。即ち、無血管組織である軟骨の場合は CTGF の自己供給がなされるように、軟骨細胞には CTGF を高発現する (しやすい) 機構が備わっていると考えられ、そのうちの 하나가、下記および低酸素下での mRNA の 3'-非翻訳領域の不安定化配列および安定化配列を介する mRNA レベルの増大であろう。これらは、この因子の組織修復・再生作用の分子基盤を知る上で極めて重要であり、以下、論文として発表済み (Mukudai, J. Biol. Chem., 2005) の内容について概略を紹介する。

一般に、遺伝子発現制御機構に関しては、従来、プロモーター領域の解析等転写制御に関する研究は盛んに行われてきたが、mRNA の 3'-非翻訳領域による mRNA の分解の制御機構に関しての報告は数少ない。本課題では、CTGF の mRNA の 3'-非翻訳領域が非常に長いことに着目し、その poly-A tail から 50-100 塩基のところから mRNA の不安定化配列を同定し、この *cis*-element に結合する 40-kDa のタンパク質の存在を明らかにした上で、このタンパク質が CTGF の発現レベルの低い増殖軟骨細胞では多く、CTGF が高発現している肥大軟骨細胞では減少し、BMP 等で増殖軟骨細胞を肥大化させると減少することを示し、*cis*-element に結合して mRNA を不安定化させる *trans*-factor であることを示した。このことは、遺伝子発現制御機構全般としての観点から画期的な知見であるばかりだけでなく、本研究の重要課題の一つである内軟骨性骨形成の制御という観点からも特筆すべき知見である。すなわち、成長軟骨細胞の分化に関与する種々のタンパク質のレベルが、転写や翻訳だけでなく、“mRNA の分解”の調節という機構で調節されている可能性を示すものである。また、肥大軟骨細胞だけでなく、CTGF の発現が見られる他の正常組織や病的な高発現の見られる組織でも同様の調節機構が働いている可能性があり、CTGF の機能発現の調節機構の一つとして興味深い。今後、この経路を、分子生物学的手法を駆使して遮断ないしは促進する方法を探索し、組織再生への応用をはかりたい。

2004 年 10 月 20-23 日にフランス・サンマロで第 3 回 CCN ファミリー国際ワークショップが開催された。CCN ファミリーとは、当初そのプロトタイプともいべき CTGF (CCN2) と Cyr61 (CCN1) および Nov (CCN3) からなる遺伝子ファミリーとしてその頭文字をとって命名されたもので、2003 年秋に世界のこの分野の主だった研究者が共同声明 (Brigstock et al. Mol. Pathol., 2003) を出し、今後、その後見出された WISP4-6 (CCN4-6) を含めて発見順に CCN1-6 と呼ぶよう統一をはかることになった。従って、当研究課題の成果としての発表論文でも、CTGF、Hcs24 あるいはリジェネリンの代わりに CCN2 の名称を使用している場合もあるが同じものである。さて、そもそもこのワークショップはこれらのタンパク質が、構造的にも類似しているだけでなく、機能面でも類似、あるいは相反することもあることから、情報交換して研究を推進しようという趣旨で設立された International CCN Society (現在、研究代表者はこの Society の Vice-president を務めている) の国際会議である。2 年に一度、世界のこの分野の先導者が集まり開催されている。このワークショップでの研究発表や最近発表される CCN ファミリーの論文の知見を統合すると、当初結合組織成長因子 (CTGF) と名付けられた本研究での対象とする因子は単なる成長因子ではなく、我々の研究成果にもあるように細胞外マトリックス成分やさらには他の成長因子とも結合して細胞外微小環境を調節することにより、細胞分化を制御する 新たな概念で捉えるべき機能分子 であると思われる。このように他のファミリーメンバーの知見が我々の研究の進展に有用な情報をもたらすこともあり、Society の president であるパリ大学教授 Dr. B. Perbal と共同で “CCN Proteins: A New Family of Cell Growth and Differentiation Regulators” と題したこのファミリータンパクに関する世界で初めての本を編集し (2005 年 5 月発行予定)、その overview chapter を執筆するとともに、成長と再生の制御における CTGF (CCN2) の役割に関する chapter を執筆した。2006 年 10 月には第 4 回ワークショップを日本で初めて開催することになるので、研究期間後半とは言わず、同ワークショップまでに研究を強力に推進したい。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

## 発表論文

- 1) Nishida, T., Kubota S., Fukunaga, T., Kondo, S., Yosimichi, G., Nakanishi, T., Takano-Yamamoto, T. and Takigawa, M.: CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes. *J. Cell. Physiol.*, 196(2)(August), 265-75, 2003.
- 2) Brigstock DR, Goldschmeding R, Katsube KI, Lam SC, Lau LF, Lyons K, Naus C, Perbal B, Riser B, Takigawa M, Yeger H.: Proposal for a unified CCN nomenclature. *Mol Pathol.* 56(2), 127-8, 2003.
- 3) Hattori, T., Kawaki, H., Kubota, S., Yutani, Y., de Crombrughe, B., von der Mark, K., and Takigawa, M.: Downregulation of a rheumatoid arthritis-related antigen (RA-A47) by *ra-a47* antisense oligonucleotides induces inflammatory factors in chondrocytes. *J. Cell. Physiol.*, 197, 94-102, 2003.
- 4) Kanyama, M., Kuboki, T., Akiyama, K., Nawachi, K., Miyauchi, F. M., Yatani, H., Kubota, S., Nakanishi, T. and Takigawa, M.: Connective Tissue Growth Factor Expressed in Rat Alveolar Bone Regeneration Sites after Tooth Extraction. *Arch. Oral Biol.*, 48, 723-730, 2003.
- 5) Kawaki, H., Kubota, S., Minaro, M., Moritani, N. H., Hattori, T., Hanagata, H., Kubota, M., Miyauchi, A., Nakanishi, T. and Takigawa, M.: Novel enzyme-linked immunosorbent assay systems for the quantitative analyses of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24/CCN2): Detection of HTLV-1 tax-induced CTGF from a human carcinoma cell line. *DNA Cell Biol.*, 22, 641-648, 2003.
- 6) Fukunaga, T., Yamashiro, T., Oya, S., Takeshita, N., Takigawa, M. and Takano-Yamamoto, T.: Connective tissue growth factor mRNA expression pattern in cartilages is associated with their type I collagen expression. *Bone*, 33(6), 911-8, 2003.
- 7) Kubota, S., Moritani, N. H., Kawaki, H., Mimura, H., Minato, M. and Takigawa, M.: Transcriptional induction of connective tissue growth factor/ hypertrophic chondrocyte specific 24 (CTGF/Hcs24) gene by dexamethasone in human chondrocytic cells. *Bone*, 33: 694-702, 2003.
- 8) Kubota S and Takigawa M: Driving the driver: Molecular regulation of CTGF/HCS24/CCN2 that regulates chondrocyte growth and differentiation. *Recent Res. Develop. Biophys. Biochem.* 3 (part 2): 996-1012, 2003.
- 9) Yokoi, H., Mukoyama, M., Nagae, T., Mori, K., Suganami, T., Sawai, K., Yoshioka, T., Koshikawa, M., Nishida, T., Takigawa, M., Sugawara, A. and Nakao, K.: Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15, 1430-40, 2004.
- 10) Minato, M., Kubota, S., Kawaki, H., Nishida, T., Miyauchi, A., Hanagata, H., Kubota, M., Nakanishi, T., Yamamoto-Takano, T. and Takigawa, M.: Module-specific antibodies against human connective tissue growth factor: Utility for structural and functional analysis of the factor as related to chondrocytes. *J. Biochem.* 135 347-354. 2004.
- ⑪ Nishida, T., Kubota, S., Kojima, S., Kuboki, T., Nakao, K., Kushibiki, T., Tabata, Y. and Takigawa, M. Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor). *J. Bone Miner. Res.*, 19, 1308-1319, 2004.
- 12) Kadota, H., Nakanishi, T., Asaumi, K., Yamaai, T., Nakata, E., Mitani, S., Aoki, K., Aiga, A., Inoue, H and Takigawa, M.: Expression of Connective Tissue Growth Factor/Hypertrophic Chondrocyte-Specific Gene Product 24 (CTGF/Hcs24/CCN2) During Distraction Osteogenesis. *J. Bone Miner. Metab.*, 22(4), 293-302, 2004.
- 13) Jung, Y., Jong, J., Ryoo, H., Kim, H., Kim, Y., Park, E., Si, H., Kim, S., Takigawa, M., Lee, B., Park, R, Kim, I., Choi, J.: Gene expression profile of human chondrocyte HCS 2/8 cell line by EST sequencing analysis. *Gene*, 330, 85-92, 2004.
- 14) Kaji T, Yamamoto C, Oh-I M, Nishida T, Takigawa M.: Differential regulation of biglycan and decorin synthesis by connective tissue growth factor in cultured vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 322, 22-28, 2004
- 15) Omoto, S., Nishida, K., Shibahara, M., Nishida, T., Doi, T., Asahara, H., Nakanishi, T., Inoue, H. and Takigawa, M.: Expression and localization of Connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24/CCN2) by chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(10), 771-778, 2004.
- 16) Kubota, S., Kawata, K., Yanagita, T., Doi, H., Kitoh, T. and Takigawa, M.: Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. *J. Biochem.* 136(3), 279-82, 2004
- 17) Yokoi, H., Mukoyama, M., Nagae, T., Mori, K., Suganami, T., Sawai, K., Yoshioka, T., Koshikawa, M., Nishida, T., Takigawa, M., Sugawara, A. and Nakao, K.: Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15, 1430-40, 2004.

- 18) Kaji T, Yamamoto C, Oh-I M, Nishida T, Takigawa M.: Differential regulation of biglycan and decorin synthesis by connective tissue growth factor in cultured vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 322, 22-28, 2004
- 19) Mukudai Y, Kubota S, Eguchi T, Kondo S, Nakao K, Takigawa M.: Regulation of chicken *ccn2* gene by interaction between RNA *cis*-element and putative *trans*-factor during differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, 280, 3166-3177, 2005.
- 20) Okada H, Kikuta T, Kobayashi T, Inoue T, Kanno Y, Takigawa M., Sugaya T, Kopp JB and Suzuki H: Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16(1), 133-143, 2005.
- 21) Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, Takigawa M., and Takehara K.: Connective tissue growth factor causes persistent pro $\alpha$ 2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor- $\alpha$  in a mouse fibrosis model. *J. Cell. Physiol.* 203(2), 447-456, 2005.
- 22) Nakao K, Kubota S, Doi H, Eguchi T, Oka M, Fujisawa, T., Nishida T. and Takigawa M.: Collaborative action of M-CSF and CTGF/CCN2 in articular chondrocytes: possible regeneration roles in articular cartilage metabolism. *Bone*, 2005, April 4 [Epub ahead of print].
- 23) Yamaai T, Nakanishi T, Asano, M, Nawachi K, Yoshimichi G, Ohyama K, Komoari T, Sugimoto T. and Takigawa M.: Gene expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in calcifying tissues of normal and *cbfa1*-null mutant in late stage of mouse embryonic development. *J. Bone Miner. Metab.* 2005, in press.
- 24) Moritani NH, Kubota S, Sugahara S and Takigawa M.: Comparable response of *ccn1* with *ccn2* genes upon arthritis: An *in vitro* evaluation with a human chondrocytic cell line stimulated by a set of cytokines. *Cell Communication and Signaling*, in press. 2005 Apr. 15;3(1):6 April 4 [Epub ahead of print].
- 25) Perbal, B. and Takigawa, M. (Editors): *CCN Proteins: A New Family of Cell Growth and Differentiation Regulators*. 2005, in press.
- 26) Perbal, B. and Takigawa, M.: Introduction for CCN proteins. In *CCN Proteins: A New Family of Cell Growth and Differentiation Regulators* (Perbal B. & Takigawa M. eds.) 2005, in press.
- 27) Takigawa, M., Nishida, T., Kubota, S.: Roles of CCN2/CTGF in the control of growth and regeneration. In *CCN Proteins: A New Family of Cell Growth and Differentiation Regulators* (Perbal B. & Takigawa M. eds.) 2005, in press.
- 28) Takigawa M.: CTGF/Hcs24/CCN2 as a regeneration factor ("regenerin") acting on various types of mesenchymal cells. *Trends in Stem Cell Research* (Columbus F, ed), Nova Science, Hauppauge, NY, 2005 in press.
- 29) 西田 崇, 滝川正春: 1.細胞増殖因子を用いた組織再生療法 5)細胞増殖因子を用いた軟骨組織再生療法. 遺伝子医学別冊「ドラッグデリバリーシステム、DDS技術の新たな展開とその活用法」, メディカルドゥ社, 東京, 154-160, 2003.
- 30) 滝川正春: CCN ファミリー. *Molecular Medicine*, 41, 756-758, 2004.
- 31) 滝川正春: CCN ファミリー: その構造と機能. 細胞, 印刷中.

#### 国際会議、学会での発表

1. Takigawa M.: Role of CTGF/Hcs24/CCN2/ecogenin in skeletal growth control. The 5th Pan-Pacific Connective Tissue Society Symposium: The symposium on growth factors, cytokines and connective tissues:(chairman, invitation) Ube, Yamaguchi, June 3-7, 2003.
2. Nishida, T., Kubota, S., Kojima, S., Kuboki, T., Tabata, Y and Takigawa, M.: Regeneration of defects in the articular cartilage in rat knee joints by connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24(*ctgf/hcs24*). 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society of Bone and Mineral Research, Osaka, June 3-7, 2003.
3. Moritani, N. H., Kubota, S., Nakao, K., Sugahara, T. and Takigawa, M.: Coordinated gene induction and repression of two *ccn* family members, *ctgf* and *cyr61*, in chondrocytic cells. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society of Bone and Mineral Research, Osaka, June 3-7, 2003.
4. Kubota, S., Moritani, N. H., Kawaki, H., Mimura, H., Minato, M. and Takigawa, M.: Transcriptional induction of connective tissue growth factor/ hypertrophic chondrocyte-specific 24 gene by dexamethasone in human chondrocytic cells. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society of Bone and Mineral Research, Osaka, June 3-7, 2003.

5. Mukudai, Y., Kubota, S. and Takigawa, M.: The effect of the 5' end of the open reading frame of *cef-10/cyr61* mRNA as a cis element of gene expression. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society of Bone and Mineral Research, Osaka, June 3-7, 2003.
6. Nawachi, K., Kubota, S., Inoue, M., Nishida, T., Kuboki, T., Nakanishi, T., Yatani, H. and Takigawa, M.: Tyrosine kinase-type receptors *erbB4* and *m-csf/c-fms* gene expression in chondrocytes. IADR 81st General Session and Exhibition, Gothenburg, Sweden, June 25-28, 2003.
7. Nishida, T., Kubota, S., Fukunaga, T., Yosimichi, G., Kondo, S., Nakanishi, T., Takano-Yamamoto, T. and Takigawa, M.: CTGF/Hcs24/CCN2, Hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes. 25rd Annual Meeting of the ASBMR, Minneapolis, September 19-23, 2003.
8. Kubota, S., Moritani, N. H., Kawaki, H., Mimura, H., Minato, M. and Takigawa, M.: Induction of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific 24/CCN2 gene by dexamethasone in human chondrocytic cells: Mechanism and biological outcome. 25rd Annual Meeting of the ASBMR, Minneapolis, September 19-23, 2003.
9. Ono, M., Sonoyama, W., Maekawa, K., Nishida, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Takigawa, M., Kuboki, T.: CTGF coating enhanced human bone marrow stromal cell attachment in vitro. Conferences on Orthodontic Advances in Science and Technology (COAST) Foundation's Second Symposium on "Craniofacial Skeletal Bioengineering". San Francisco, August 27-30, 2004.
10. Eguchi, T., Kubota, S., Kawata, K., Ogawara, T., Mukudai, Y. and Takigawa, M.: Differential regulation of CTGF/CCN2 transcription in MDA231 breast cancer cell line and HCS-2/8 chondrocytic cell line. Third International Workshop on the CCN Family of Genes (2004.10.20-23, Saint-Malo, France)
11. Nishida, T., Kubota, S., Kojima, S., Kuboki, T., Nakao, K., Kushibiki, T., Tabata, Y. and Takigawa, M.: Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by connective tissue growth factor/ hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24/ CCN family protein 2 (CTGF/Hcs24/CCN2). The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (2004.10.2-5, Seattle, USA)
12. Kubota, S., Mukudai, Y., Eguchi, T., Kondo, S., Minato, M., Mimura, H. and Takigawa, M.: CCN2 gene regulation in chondrocytic differentiation. Third International Workshop on the CCN Family of Genes (2004.10.20-23, Saint-Malo, France)
13. Takigawa, M., Nishida, T., Kubota, S., Kojima, S., Kuboki, T., Nakao, K., Fujisawa, T., Kawata, K., Yanagita, T., Kadota, H., Asaumi, K., Kawaki, H., Kushibiki, T. and Tabata, Y.: The roles of CCN2 in skeletal repair and regeneration. Third International Workshop on the CCN Family of Genes(2004.10.20-23, Saint-Malo, France)
14. Ono, M., Sonoyama, W., Akiyama, K., Fujisawa, T., Kanyama, M., Takigawa, M., Kuboki, T.: hBMSC attachment was enhanced by CTGF adsorption in vitro. 83rd Annual meeting of International Association for Dental Research. Baltimore, March 9-12, 2005.

#### 海外大学での特別講演

1. Takigawa, M. : Role of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte specific gene product 24 (CTGF/Hcs24) in skeletal growth. University of Kuopio School of Medicine Kuopio, Finland, 2003.6.24
2. Takigawa, M. : Role of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24 in skeletal growth, University Erlangen-Nurember, Erlangen, Germany, 2003.6.30

#### 国内シンポジウム

- 1) Takigawa, M.: The CCN Family of Genes: Novel Matricellular Proteins-Overview. 第76回日本生化学会大会シンポジウム, 2003.10.15-17, 横浜 (オーガナイザー、座長、over view 講演)
- 2) 滝川正春: CCN ファミリー研究の最前線-オーバービュー。第26回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2003.12.10-13, 神戸 (オーガナイザー、座長、over view 講演)

その他、国内学会発表 41件